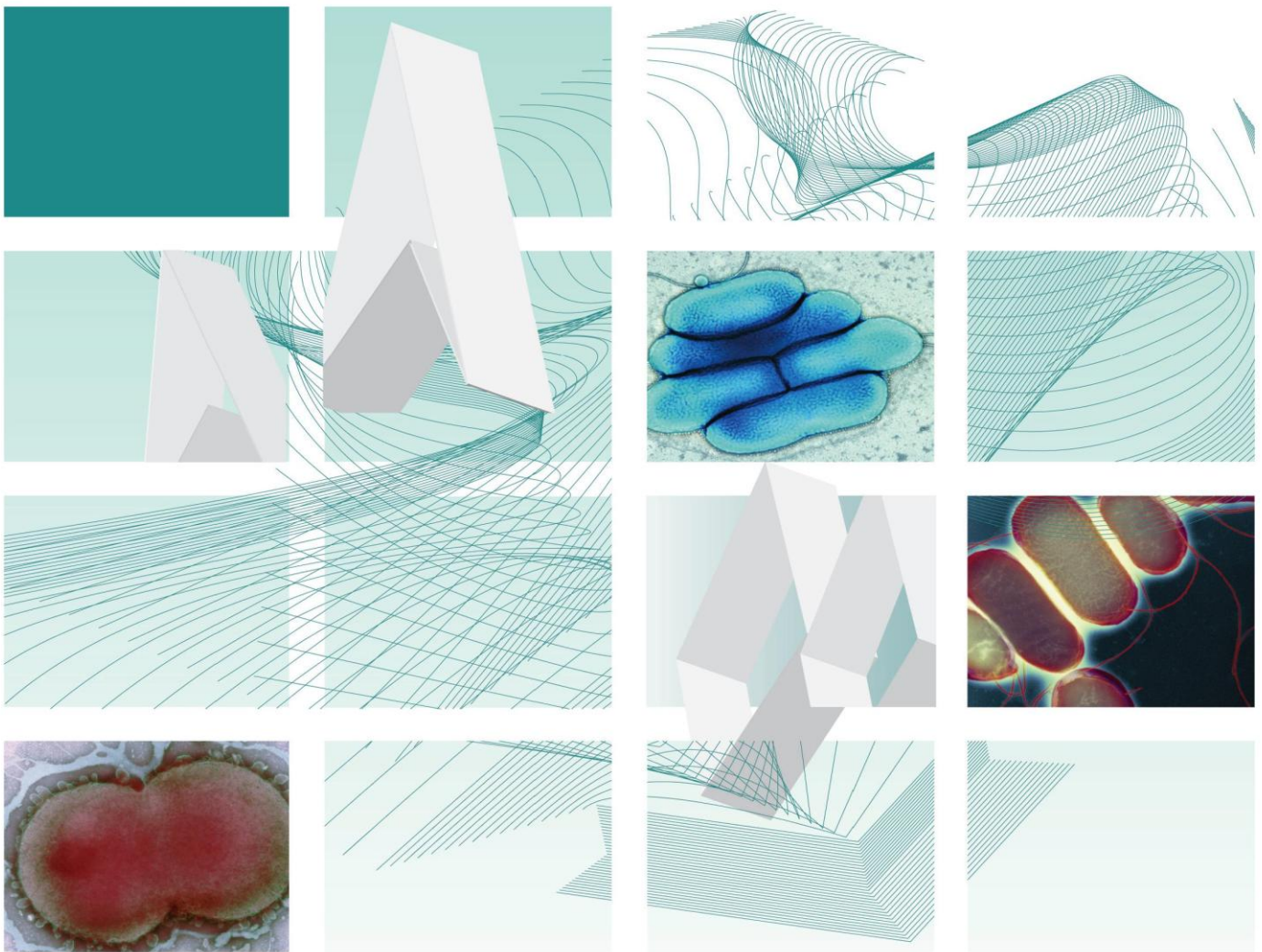




# Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito

## Identificazione di specie *Bacillus*



## Ringraziamenti

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

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

Per ulteriori informazioni contattare:

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

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

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



I loghi sono aggiornati al momento della pubblicazione

## Contenuti

---

RINGRAZIAMENTI.....	2
TABELLA MODIFICHE .....	4
RICERCHE MICROBIOLOGICHE: PROCEDURE STANDAD DEL RU: SCOPPO E OBIETTIVO .....	6
SCOPO DEL DOCUMENTO .....	9
INTRODUZIONE.....	9
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI .....	13
1     CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA.....	14
2     MICRORGANISMI BERSAGLIO.....	14
3     IDENTIFICAZIONE .....	14
3     IDENTIFICAZIONE DI SPECIE <i>BACILLUS</i> .....	20
5     REFERTAZIONE.....	21
6     INVIO .....	22
7     NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE .....	23
BIBLIOGRAFIA.....	24



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](http://www.nice.org.uk/accreditation).

Per ulteriori informazioni sul nostro accreditamento consultare: : [www.nice.org.uk/accreditation](http://www.nice.org.uk/accreditation)

## Tabella delle modifiche

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso la [standards@phe.org.uk](mailto:standards@phe.org.uk).

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

Modifica No/Data.	11/04.04.18
Emissione eliminata. no	3
Emissione inserita no.	3.1
<b>Sezione(i) interessate</b>	<b>Modifica</b>
Pagina 9.	<p>E' stato inserito un chiarimento nella sezione introduttiva del documento:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Il Gruppo 1 è stato aggiornato per ricordare che comprende due sottogruppi: sottogruppi di celle grandi e di cellule piccole.</li> <li>• Il Gruppo 2 della specie <i>Bacillus</i> è stato modificato per comprendere <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Bacillus pumilus</i> e <i>Bacillus licheniformis</i> che non possiedono sporangi rigonfi e appartengono al sottogruppo a cellule piccole del gruppo 1. Tutte le altre specie <i>Bacillus</i> nel Gruppo 2 sono dotati di sporangi rigonfi.</li> </ul>

Modifica No/Data.	10/24.02.15
Emissione eliminata. no	2.3
Emissione inserita no.	3
<b>Sezione(i) interessate</b>	<b>Modifica</b>
Documento intero.	Collegamenti ipertestuali aggiornati a gov.uk.
Pagina 2	Loghi aggiunti aggiornati.
Intero documento	<p>Documento presentato in un nuovo formato.</p> <p>Riorganizzazione di parte del testo.</p> <p>Edito per chiarezza.</p> <p>Aggiornata informazioni relativa a <i>Bacillus antraci</i>.</p> <p>Procedure di prova aggiornate.</p> <p>Aggiornate le informazioni riguardanti il Laboratorio di</p>

	Riferimento.
Scopo del documento.	Aggiornati scopo del documento per includere collegamento web a B 37. Aggiornata informazione riguardante <i>Bacillus anthracis</i> .
Introduzione	Aggiornata tassonomia della specie <i>Bacillus</i> . Aggiunte altre informazioni alla sezione Caratteristiche. Le specie clinicamente importanti sono state raggruppate e descritte le loro caratteristiche. Utilizzare bibliografia aggiornata La section dei Principi d' Identification è sta modificata per chiarezza.
Informazione Tecnica/Limitazioni.	Aggiunte informazioni riguardanti i metodi rapidi (MALDI-TOF) e descritti sistemi commerciali d'identificazione con riferimento bibliografico.
Considerazioni sulla sicurezza.	Aggiornamento sulla infezione acquisite in laboratorio con bibliografia. In questa sezione sono segnalate maggiori informazioni sulla manipolazione di <i>B. anthracis</i>
Microrganismi bersaglio.	La sezione sui microrganismi bersaglio è stata aggiornata e presentata in modo chiaro. Bibliografia aggiornata.
Identificazione.	Eseguite modifiche per aggiornamento su 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4 per adeguamento degli standard nella pratica. Tabella 3.4 modificata e aggiornata. Sottosezione 3.5 aggiornata per includere i Metodi Molecolari Rapidi. 3.6 Riformulata per informare gli utenti di fare riferimento al manuale dell'appropriato laboratorio per gli invii.
Identificazione diagramma di flusso	Modifica del diagramma di flusso d'identificazione di specie per facilitare la consultazione.
Refertatazione	Sottosezioni 5.1 e 5.6 aggiornate per adeguare la procedura di refertazione nella procedura
Invio.	Aggiornati gli indirizzi dei laboratori di riferimento.
Bibliografia .	Bibliografia in parte aggiornata.

# Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito<sup>#</sup>: 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 test 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

---

<sup>#</sup> 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 assoggetto agli obiettivi PHE di Uguaglianza

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

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

## Dichiarazione Legale

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

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

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

### Citazione Suggesta per questo Documento

Public Health England. (2018). Identification of *Bacillus* species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 9 Emissione 3.1. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>



## Scopo del Documento

---

Questa SMI descrive l'identificazione delle specie *Bacillus*. I microrganismi descritti nel documento sono quelli che si possono isolare dai materiali clinici, sebbene non per tutti sia documentata l'azione patogena nell'uomo.

Se clinicamente si sospetta *B. anthracis*, inviare i campioni direttamente al laboratorio di riferimento appropriato senza eseguire qualsiasi altra operazione/manipolazione.

Dettagli sul potenziale focolaio epidemico o di bioterrorismo sono descritti in [B 37- Investigation of Blood Cultures \(for Organisms other than \*Mycobacterium\* species\)](#).

Questa SMI deve essere usata insieme alle altre SMI.

## Introduzione

---

### Tassonomia

Questo genere è uno dei più grandi e ubiquitario, e ha acquisito notorietà fra gli specialisti in tassonomia per la sua estrema eterogeneità e diversità fenotipica. Al genere *Bacillus* ora appartengono 268 specie e 7 sottospecie, anche se alcune di loro sono state assegnate ad altri generi, che si riscontrano comunemente nell'ambiente e come contaminanti di laboratorio, ma alcune di loro sono state riconosciute come causa d'infezioni nell'uomo<sup>1,2</sup>.

Due specie *Bacillus* sono considerate clinicamente importanti: *B. anthracis*, che provoca l'antrace, e *B. cereus*, che causa una malattia alimentare simile a quella da *Staphylococcus*.

### Caratteristiche

Le specie *Bacillus* sono costituite da bastoncini Gram-positivi, spesso disposti in coppie o catene con estremità arrotondate o tozze, e solito contengono un'unica endospora. Le endospore sono generalmente ovali, talvolta rotonde o cilindriche e sono molto resistenti alle condizioni avverse. La sporulazione non è inibita dall'esposizione all'aria<sup>3</sup>. Tradizionalmente, la specie *Bacillus* è stata classificata in tre gruppi in base alla morfologia delle spore e dello sporangio<sup>4,5</sup>. Questi sono:

- Gruppo 1 – Bastoncini Gram positivi, producono una spora centrale o terminale, ellissoidale o cilindrica che non rigonfia lo sporangio. Comprende due sottogruppi:
  - Sottogruppo a cellule grandi che comprende *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*
  - Sottogruppo a cellule piccole che comprende *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*
- Gruppo 2 - Gram variabile, con spore ellissoidali e sporangi rigonfi: *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus licheniformis*. *Bacillus alvei*, *Bacillus brevis* e *Bacillus macerans* appartenevano a questo gruppo, ma poi sono stati riclassificati in altri generi<sup>6</sup>
- Gruppo 3 – Gram variabile, sporangi rigonfi con spore terminali o subterminali: *Bacillus sphaericus*

Negli ultimi anni, si è avuta una variazione tassonomica in due gruppi selezionati del genere *Bacillus*<sup>7</sup>. Questi sono stati definiti gruppo *B. subtilis* e gruppo *B. cereus*.

## Gruppo *Bacillus cereus*

Il gruppo *Bacillus cereus* include *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* e *B. weihenstephanensis*. Più recentemente è stato proposto un insieme di ceppi termofili di origine clinica definito *Bacillus cytotoxicus*<sup>8</sup>. Questi ceppi sono ancora indicati come *B. cereus* subsp. *cytotoxis* nella letteratura e le banche dati pubbliche sono in attesa dell'approvazione ufficiale della nuova denominazione della specie.

Questo gruppo è facilmente distinguibile dagli altri appartenenti ai batteri aerobi che formano endospore, ma sono difficili da differenziare l'uno dall'altro. Le cellule sono larghe più di 1 µm, lo sporangio non è rigonfio, e le spore hanno forma ellissoidale. Sono principalmente mesofili e neutrofilo e sono stati classificati nel gruppo 16S rRNA/DNA 1. Le caratteristiche più importanti per differenziare questo gruppo da tutti gli altri batteri aerobi che formano endospore risiedono nella loro incapacità di produrre acido da mannitolo e per la produzione di lecitinasi. La differenziazione fenotipica all'interno del gruppo è difficile. Due specie (*B. cereus* e *B. thuringiensis*) sono generalmente mobili e tre specie (*B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycoides*) sono descritte come emolitiche e resistenti alla penicillina. *B. anthracis* è lisato esclusivamente dal fago gamma.

Molte specie *Bacillus* sono emolitiche, caratteristica utile che li differenzia da *B. anthracis* (che non è emolitico). Sono aerobi o anaerobi facoltativi e la maggior parte delle specie è mobile per flagelli peritrichi (un'eccezione importante è rappresentata da *Bacillus anthracis*). La maggior parte delle specie è ossidasi positiva, ciò può generare confusione con le specie *Pseudomonas*, soprattutto se la specie *Bacillus* sono mal colorate. Di solito sono catalasi positive e metabolizzano i carboidrati per fermentazione.

*B. anthracis* è quasi sempre sensibile alla penicillina, mentre altre specie sono in genere resistenti<sup>9</sup>.

## *Bacillus anthracis*

Se si sospetta *B. anthracis*, i campioni devono essere inviati direttamente al Laboratorio di Riferimento appropriato senza fare altre operazioni/manipolazioni. Questo microrganismo è descritto sul [PHE website](#). Questa sezione è inclusa solo per informazioni.

*B. anthracis* è un battere a forma di bastoncino che produce endospore, la sua larghezza è di 1-1.5 µm e la lunghezza di 3-10 µm<sup>10</sup>. Può essere coltivato in terreno nutritivo normale in condizione aerobica o anaerobica<sup>3</sup>. Presenta stretta somiglianza genotipica e fenotipica con *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*. Tutte e tre le specie condividono dimensioni e morfologia cellulare. Tutte formano spore ovali in posizione centrale con sporangio non rigonfio. In particolare, le spore di *B. anthracis*, sono molto resistenti, sopravvivono a temperature estreme, in ambienti a ridotto contenuto di sostanze nutrienti, e a trattamento chimico intenso nel corso di decenni o secoli.

Diversamente dagli altri appartenenti al gruppo *B. cereus*, *B. anthracis* non è mobile e su agar sangue di cavallo (o di pecora) non è emolitico, cresce a 37°C, e forma tipiche colonie piatte, di colore grigio/bianco, con aspetto a occhio d'ape (cioè, di forma ovale, leggermente granulosa ma non secca, con diametro di circa 2-5 mm), margini irregolari, che sono tipicamente resistenti al prelievo con l'ansa<sup>10</sup>. I margini di *B. anthracis* sono spesso descritti come 'testa di medusa', ma questa è una caratteristica che può essere riscontrata in tutto il gruppo *B. cereus*<sup>5</sup>.

Le spore non si formano nei tessuti dell'ospite se non quando i fluidi corporei infetti sono esposti all'aria. Quando le sostanze nutrienti sono esaurite, si formano spore resistenti che possono

sopravvivere nel suolo per decenni. Queste spore germinano poi quando esposte in ambiente ricco di sostanze nutrienti, come tessuti o sangue di un ospite animale o umano<sup>10</sup>.

I ceppi virulenti di *B. anthracis* producono una caratteristica capsula polipeptidica, che può essere dimostrata usando terreno di coltura contenente bicarbonato allo 0,7%, incubato per una notte in ambiente con elevata concentrazione di CO<sub>2</sub>. In alternativa, seminare in un piccolo volume di sangue sterile defibrinato di cavallo e incubare per 6 – 18 ore. Le colonie di *B. anthracis* dotate di capsula appaiono mucose e la presenza della capsula può essere rilevata usando blu di metilene policromo di McFadyean<sup>11,12</sup>. Possono essere isolati ceppi avirulenti che non producono capsula o tossina e questi possono essere erroneamente identificati come *Bacillus cereus*.

## ***Bacillus cereus***

Le dimensioni di *Bacillus cereus* sono di 1 x 3-4 µm. Sono bacilli sottili dritti o leggermente ricurvi con estremità tozze a cellule isolate o in corte catene. Sono anaerobi facoltativi, e come gli altri appartenenti al genere *Bacillus*, possono produrre endospore protettive. Non formano capsule, ma le spore e sporangio sono morfologicamente simili a quelli di *B. anthracis*<sup>5</sup>. Sono mobili per presenza di flagelli peritrichi e manifestano due tipi di motilità, natatoria e sciamante, in funzione dell'ambiente e sono resistenti alla lisi da fago gamma. Sulla piastra di agar sangue, appaiono colonie grandi, debolmente o fortemente β-emolitiche, grigie opache piatte o leggermente convesse, irregolari con una leggera sfumatura verde, con diametro di circa 2-5 mm<sup>4</sup>. In alcuni casi, si sviluppano solo colonie lisce o associate a colonie ruvide<sup>13</sup>. Crescono in modo ottimale a temperature comprese tra 5°C e 50°C e sono in grado di adattarsi a una grande varietà di condizioni ambientali<sup>4</sup>.

Metabolizzano carboidrati, proteine e aminoacidi e possono ridurre i nitrati a nitriti. In condizioni anaerobiche, *B. cereus* utilizza la fermentazione per produrre energia. Le caratteristiche classiche per differenziare il gruppo 1 (che comprende, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides* e *Bacillus thuringiensis*) dagli altri gruppi sono dovute alla loro incapacità di produrre lecitinasi e acido dal mannitolo<sup>7</sup>.

*B. cereus* è resistente alla penicillina e al fago gamma e ciò lo distingue da *B. anthracis*<sup>4</sup>.

*B. thuringiensis* è molto simile a *B. cereus*, ma può essere differenziato dalla presenza di formazioni di cristallo<sup>5</sup>.

I ceppi di *B. weihenstephanensis* possono essere dotati di geni che codificano per endotossine generalmente associate con *Bacillus cereus*<sup>14</sup>.

Alcuni ceppi di *B. cereus* sono nocivi per l'uomo e causano malattie a trasmissione alimentare, mentre altri ceppi possono essere utili per gli animali come probiotici.

## **Gruppo *Bacillus subtilis***

Comprendono *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. clausii*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. sonorensis*, *B. firmus*, *B. lentus* e *B. sporothermodurans*).

I componenti il gruppo *B. subtilis* sono strettamente correlati e non sono facilmente distinguibili. Le cellule di questi organismi sono di larghezza inferiore a 1 µm, sporangio senza rigonfiamento, e le spore sono di forma ellissoidale. Sono di solito mesofili per quanto riguarda la temperatura e neutrofilo per quanto riguarda il pH di crescita, pur essendo spesso tolleranti ai livelli di pH

superiori. Tutti i componenti del gruppo sono classificati nel gruppo 1 16S rRNA/DNA.

L'applicazione delle prove fenotipiche classiche per la differenziazione delle specie *Bacillus* indica che solo per alcune di loro state determinate chiaramente caratteristiche discriminanti. Per altre, il grado di differenziazione fenotipica è scarso, come per *B. atrophaeus*, per il quale è stata descritta la formazione di pigmento su terreno contenente tirosina per differenziarlo da *B. subtilis* dal quale altrimenti non sarebbe distinguibile<sup>7</sup>.

Le due sottospecie di *B. subtilis* (*B. subtilis* subsp. *subtilis* e *B. subtilis* subsp. *spizizenii*), *B. mojavensis*, e *B. vallismortis* non sono finora fenotipicamente differenziabili. Lo stesso vale per *B. licheniformis* e *B. sonorensis*. Tutte le specie possono essere differenziate a livello genetico e si ritiene che saranno definite altre specie quando le analisi genotipiche saranno applicate a una vasta gamma di ceppi appartenenti alle specie classiche di cui sopra. *B. clausii* non è, in senso stretto, un appartenente al gruppo *B. subtilis*; tuttavia, è qui classificato per ragioni di completezza, perché un certo numero di ceppi in precedenza classificato come *B. subtilis* e utilizzato come probiotici, recentemente è stato riclassificato come *B. clausii*<sup>7</sup>. Ancora più scarsamente inserite in questo gruppo sono la specie *B. firmus*, *B. lentus*, e *B. sporothermodurans*, che sono chiaramente distinguibili dalle altre.

## Principi di Identificazione

Gli isolati da coltura primaria su agar non selettivo sono identificati dall'aspetto delle colonie e dalla presenza o assenza di  $\beta$ -emolisi. Su agar selettivo come il Polimixina tuorlo d'uovo mannitolo bromotimolo blu agar (PEMBA), *B. cereus* (che è mannitolo negativo e idrolizza la lecitina) produce caratteristiche colonie blu con una zona di precipitato. *Bacillus thuringiensis* produce una reazione simile. *B. cereus*, diversamente da *B. thuringiensis*, non produce cristalli cuboidi o a forma di diamante nelle colture di agar per formazione di spore o in agar nutriente. I cristalli sono rilevati con il microscopio a contrasto di fase o colorazione con verde malachite. Si deve porre attenzione a distinguere *B. cereus* da altri organismi, quali *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* e *Proteus vulgaris*, che crescono pure su agar Pemba. Queste colonie possono essere differenziate da *B. cereus* per morfologia e colore delle colonie. Inoltre, questi microrganismi producono una reazione di chiarificazione del tuorlo d'uovo chiaramente diversa dal precipitato prodotto da *B. cereus*. L'identificazione è dimostrata con la colorazione di Gram, attività della lecitinasi, motilità, sensibilità alla penicillina e prove biochimiche.

Gli isolati clinicamente significativi, tra cui quelli da sedi sterili, e da campioni di feci in casi di gastroenterite, devono essere inviati al Laboratorio di Riferimento per successiva conferma.

Tutti i campioni in cui si prevede la possibile presenza di *B. anthracis*, gli isolati di presunti *B. anthracis* o di *B. cereus* che sono identificati sulla piastra PEMBA/MALDI-TOF e non sono emolitici, dovrebbero essere inviati direttamente al Rare and Imported Pathogens Laboratory (RIPL), Porton Down.

La differenziazione in specie del genere è complessa e; in un laboratorio di routine, la combinazione delle informazioni emerse da colorazione Gram, aspetto delle colonie e la crescita su PEMBA o MALDI-TOF, possono essere considerate in alcuni casi indicazione sufficiente di specie di *Bacillus* se l'isolato è riscontrato in un campione clinico.

## Informazione Tecnica/Limitazioni

---

### Sistemi di identificazione commerciali

Al momento della pubblicazione, alcune confezioni commerciali possono fornire risultati inaffidabili per l'identificazione delle specie *Bacillus* a causa della loro scarsa capacità discriminante tra le specie strettamente correlate (*B. cereus*/*B. thuringiensis*/*B. mycoides*); pertanto sono raccomandate prove supplementari per la differenziazione; o errata identificazione, (dove le specie individuate dai sistemi d'identificazione sono discordanti con quella di riferimento) o mancata identificazione<sup>15</sup>.

### MALDI-TOF MS

L'individuazione rapida di *B. anthracis* può essere difficile per la grande similitudine genetica ad altre specie del gruppo *B. cereus* e le difficoltà di differenziazione fenotipica dei componenti il gruppo *B. cereus*. Tuttavia, il metodo MALDI-TOF MS è stato utile per l'identificazione rapida e affidabile delle cellule vegetative dell'agente eziologico dell'antrace, *Bacillus anthracis*, purché siano trattate in condizioni standardizzate e inattivate secondo un protocollo MS recentemente sviluppato, compatibile per i microrganismi particolarmente patogeni. La tecnica è stata utilizzata anche per la classificazione accurata del gruppo *Bacillus cereus* e pure per il gruppo non *Bacillus cereus*, in particolare per differenziare *B. subtilis* e *B. cereus* rispettivamente da *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus thuringiensis*<sup>16-18</sup>.

MALDI-TOF non è stato molto utile nel differenziare *B. licheniformis* e *B. sonorensis* perché strettamente correlati e in quanto condividono più tratti fenotipici tra loro che con qualsiasi altro taxon<sup>19</sup>. Altri studi sono ancora necessari per saggiare questa tecnologia con un'ampia collezione di *Bacillus* di origini diverse.

# 1 Considerazioni sulla Sicurezza<sup>20-36</sup>

*Bacillus anthracis* appartiene al Gruppo di Rischio 3.

**Se si sospetta clinicamente *B. anthracis*, inviare direttamente i campioni al RIPL, Porton Down senza fare altre operazioni/manipolazioni.**

Dettagli sul un potenziale focolaio o azioni di bioterrorismo possono essere trovati in [B 37- Investigation of Blood Cultures \(for Organisms other than \*Mycobacterium\* species\)](#).

*B. anthracis* causa una grave malattia talvolta fatale. E' stata segnalata un'infezione acquisita in laboratorio<sup>37</sup>.

In caso sospetto di *B. anthracis*, tutte le procedure di laboratorio devono essere eseguite da personale esperto, in una struttura di contenimento di livello 3 con una cappa di sicurezza di protezione di Classe 1. La documentazione riguardante la concatenazione degli eventi dovrebbe accompagnare i campioni. In queste circostanze, non vi è alcuna indicazione per la profilassi antibiotica al personale di laboratorio se non nel caso di una lesione penetrante o perdita con rilascio di aerosol contenente spore. La vaccinazione è indicata solo per il personale di laboratorio che lavora di routine con il microrganismo<sup>38,39</sup>.

Tutte le procedure di laboratorio che generano aerosol infettivi devono essere eseguite in cabina microbiologica di sicurezza<sup>28</sup>.

Fare riferimento alle attuali linee guida per la manipolazione sicura di tutti i microrganismi descritti in questa SMI.

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 *Bacillus* segnalate come causa di Infezione umana<sup>5,11,13,40</sup>

**Nota:** Se si sospetta *B. anthracis*, i campioni devono essere inviati direttamente al Laboratorio di Riferimento appropriato.

**Gruppo *Bacillus cereus*** - *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*

**Gruppo *Bacillus subtilis*** - *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*

**Altre specie *Bacillus* associate alle infezioni nell'uomo** - *Bacillus sphaericus*

Altre specie possono raramente essere associate con l'infezione umana.

## 3 Identificazione

### 3.1 Aspetto Microscopico

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

#### Colorazione Gram

Grandi bastoncini Gram positivi, spesso in coppie o catenelle con estremità arrotondate o tozze (possono avere un'unica endospora). Alcune specie possono essere Gram variabili.

*B. anthracis* appare come un grande bastoncino dotato di capsula, Gram positivo (a forma di box per auto) a corte catene.

### Colorazione McFadyean

Usata per colorare la capsula di *B. anthracis*.

### Colorazione Giemsa

Usata per colorare la capsula di *B. anthracis*. Le capsule sono normalmente osservate solo se *B. anthracis* cresce in siero di sangue o sono ricercate in campioni di tessuto molto fresco.

### Colorazione Spore

Usata per colorare le spore di specie *Bacillus*. Le spore appariranno di colore verde chiaro e le pareti delle cellule vegetative prenderanno la contro-colorazione di contrasto della safranina. La posizione della spora nella cellula differisce nelle diverse specie.

**Nota:** Dovrebbero essere utilizzate le culture più vecchie quando si esegue la colorazione per le spore perché in queste condizioni si trovano prive di nutrimento e in ambiente di vita competitivo.

## 3.2 Terreno di Primo Isolamento

Agar sangue incubato in aria/CO<sub>2</sub> a 35°C - 37°C per 24 – 48 ore.

Agar polimixina, tuorlo d'uovo, mannitolo, blu di bromotimolo (PEMBA) – opzionale.

## 3.3 Aspetto delle Colonie

L'aspetto delle colonie varia con le specie e di seguito è riportata una succinta descrizione.

**Nota:** Se si sospetta *B. anthracis*, i campioni devono essere inviati direttamente al Laboratorio di Riferimento appropriato senza eseguire altre operazioni/manipolazioni.

Microrganismo	Emolisi	Caratteristiche di crescita su agar sangue di cavallo o PEMBA dopo incubazione a 35°C – 37°C per 18 – 24 ore
<i>B. anthracis</i>	Non emolitico (occasionalmente debole emolisi)	Agar sangue - Le colonie sono piatte e irregolari, diametro di 2 – 5 mm, colore grigio/ bianco con un aspetto di vetro smerigliato. Le colonie mostrano una capacità di adesione che permette loro di essere raccolte e rimanere in posizione verticale durante il prelievo con un'ansa.  PEMBA - Questi batteri possono essere erroneamente identificati come <i>B. cereus</i> su PEMBA ( <i>B. anthracis</i> è un <i>B. cereus</i> dotato di un plasmide).
Gruppo <i>B. cereus</i>  ( <i>B. cereus</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. pseudomycoides</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. weihenstephanensis</i> )	β-emolitico	Sangue agar – Aspetto delle colonie simile a quello di <i>B. anthracis</i> sebbene quelle di <i>B. cereus</i> siano da crema a bianche o grigie e abbiano una lieve sfumatura verde e <i>B. mycoides</i> sono rizoidi o villose aderenti al terreno, e diffondono sull'intera superficie del terreno in 48 ore.  PEMBA – Le colonie sono crenate, diametro di 5 mm, colore da turchese a blu pavone con una zona di tuorlo d'uovo con precipitazioni dopo 18-24 ore d'incubazione.
Altre specie <i>Bacillus</i>	β-emolitiche	Agar sangue - Le colonie sono grandi (2 - 7 mm) con un aspetto di vetro smerigliato, ma possono diventare opache. Il colore varia. Morfologia variabile delle colonie - alcune specie possono produrre colonie mucose o lisce o rugose in rilievo.  PEMBA - Colonie sono crema a giallo paglierino con nessuna zona

		di precipitazione di tuorlo d'uovo.
--	--	-------------------------------------

### 3.4 Procedure di Prova

#### Prove biochimiche

##### Produzione di lecitinasi ([TP 22 – Prova di Nagler](#))

Seminare una piastra di agar tuorlo d'uovo e incubare a 35°C – 37°C per 18 - 24 ore e controllare la formazione di una zona di precipitato di tuorlo d'uovo. *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycoides* sono positivi.

##### Motilità ([TP 21 – Prova di Motilità](#))

Tutte le specie *Bacillus* sono mobili con eccezione di *B. anthracis* e *B. mycoides*.

##### Sensibilità alla penicillina

Tutte le specie *Bacillus*, con eccezione di *B. anthracis*, sono di solito resistenti alla penicillina come determinato con l'E-Test.

##### Formazione di cristalli

Da usare per differenziare *B. cereus* da *B. thuringiensis*. Dopo crescita per almeno 48 ore su agar di sporulazione o su agar nutriente; *B. thuringiensis* produce cristalli di forma cuboide o simili a diamante in prossimità delle spore. Queste sono dimostrabili con il microscopia a contrasto di fase o con la colorazione con verde malachite.

#### Riassunto dei risultati delle procedure di prova

	Lecitinasi	Motilità	Sensibilità penicillina	Formazione cristalli
<i>Bacillus anthracis</i>	+*	-	S	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	R	-
<i>Bacillus megaterium</i>	-	+	R	-
<i>Bacillus mycoides</i>	+	-	R	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	R	+
<i>Bacillus circulans</i>	-	+	R	-
<i>Bacillus coagulans</i>	-	+	R	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	+	R	-
<i>Bacillus pumilus</i>	-	+	R	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	R	-
<i>Bacillus sphaericus</i>	-	+	R	-

\* *B. anthracis* può produrre aree di lecitinasi strette e le colonie possono richiedere la raschiatura per evidenziare la reazione



### 3.4.2 Sistemi d'Identificazione Commerciali

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

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

Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), può essere utilizzato per analizzare la composizione proteica della cellula batterica, è emersa come nuova tecnologia per l'identificazione delle specie. Ha dimostrato di essere un potente strumento per la sua rapidità riproducibilità, velocità e sensibilità d'analisi. Il vantaggio di MALDI-TOF rispetto ad altri metodi d'identificazione risiede nel fatto 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 minimi di consumo, rendono questo metodo adatto per uso di routine e alta produttività<sup>41</sup>.

Il metodo MALDI-TOF MS è stato trovato utile per l'identificazione rapida e affidabile di cellule vegetative dell'agente eziologico dell'antrace, *Bacillus anthracis*, del gruppo *Bacillus cereus* e gruppo non *Bacillus cereus*<sup>16,17</sup>. La ricerca di Lasch è stata particolarmente degna di nota perché le prove fenotipiche e le analisi della sequenza del gene 16S rRNA non potevano differenziare in modo affidabile i componenti del gruppo *Bacillus cereus*<sup>42</sup>. Questa tecnica è stata riconosciuta per essere un buon approccio complementare al sequenziamento 16S rRNA e pure uno strumento più potente per un'accurata classificazione delle specie *Bacillus*, in particolare per differenziare rispettivamente *B. subtilis* e *B. cereus* da *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus thuringiensis*<sup>18</sup>.

MALDI-TOF non è stato molto utile nella differenziazione di *B. licheniformis* e *B. sonorensis* perché sono strettamente correlati e condividono più tratti fenotipici tra loro che con qualsiasi altro taxon<sup>19</sup>.

Tuttavia, sono ancora necessari altri studi per verificare questa tecnologia con una grande collezione di *Bacillus* di origini diverse.

Qualsiasi *B. cereus* presunto individuato con MALDI TOF può essere inviato per la conferma a un laboratorio di riferimento.

### 3.4.4 Test Nucleic Acid Amplification (NAAT)

La PCR è generalmente considerata un buon metodo di rilevazione batterica perché semplice, sensibile e specifica. Tuttavia, ha dei limiti. Sebbene il gene 16S rRNA sia generalmente destinato alla progettazione di primer specie-specifici PCR per l'identificazione, la progettazione dei primer è difficile quando le sequenze dei geni omologhi hanno elevata affinità.

Sono note molte PCR differenti per i diversi gruppi (gruppo *B. cereus* e *B. subtilis*) e dei loro geni bersaglio dipendenti dalle caratteristiche cliniche; sarà utilizzata la PCR appropriata<sup>43-45</sup>. Per esempio, nel caso del gruppo di *Bacillus cereus*, una tecnica rapida PCR è stata sviluppata sulla base della sequenza unica conservata del gene *motB* (che codifica la proteina flagellare motrice) di *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis*<sup>43</sup>. I primer progettati per questa PCR sono gruppo specifici e non rilevano le altre specie *Bacillus* o non *Bacillus*, e questo è uno dei limiti di questo metodo.

### 3.5 Identificazione Successiva

Riflettendo le possibilità dei nuovi metodi di analisi, la classificazione delle diverse specie in una varietà di taxa batterici è stata continuamente modificata in modo molto dinamico. Un gruppo che illustra adeguatamente il disaccordo tra i metodi molecolari e quelli di classificazione fenotipica/ecologica in *Bacillus* è il gruppo *B. cereus*. A questo gruppo, classificato anche *B. cereus* in senso lato, appartengono sei specie strettamente correlate secondo l'attuale tassonomia: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, e *B. weihenstephanensis*. Nel corso dell'ultimo secolo o circa in questo periodo, queste sei sono state descritte come singole specie del genere *Bacillus*, utilizzando come criteri di riferimento i diversi ospiti dei patogeni, morfologia delle colonie e proprietà metaboliche, con riferimento anche a motilità, resistenza alla penicillina e sensibilità al fago gamma. Tuttavia, i metodi molecolari hanno da allora dimostrato che le specie confinanti tra i membri di questo gruppo sono difficili da definire, richiedendo la revisione delle attuali descrizioni di queste e di altre specie *Bacillus*<sup>46</sup>.

#### Metodi Rapidi

Sono stati sviluppati numerosi metodi d'identificazione rapida e sensibile per isolati da campioni clinici; questi includono tecniche molecolari, come la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multilocus Sequence Typing (MLST), and 16S rRNA gene sequencing. Tutti questi approcci permettono di sottotipizzare ceppi non correlati, ma lo fanno con diversa accuratezza, potere discriminante, e riproducibilità.

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

#### 16S rRNA gene sequencing

Il Sequenziamento dei geni 16S rRNA è stato utile negli studi filogenetici a livello di genere, il suo uso è stato messo in discussione nel caso di gruppi di specie strettamente correlate, quali i *Bacillus*, dove l'insufficiente diversità dei 16S rDNA non ha consentito il riconoscimento dei ceppi e i rapporti fra le specie<sup>46</sup>. L'utilizzo successivo di geni strutturali, considerati essenziali, e quindi non persi dai genomi, ma che evolvono più rapidamente del 16S rDNA, ha dimostrato di essere utile per la classificazione tassonomica<sup>47</sup>. Anche se tali approcci sono utili per singoli isolati studiati intensamente in laboratorio, il metodo 16S rDNA rimane lo standard di riferimento per progetti di sequenziamento ambientale grazie alla sua ubiquità e facilità di amplificazione per le specie divergenti<sup>48</sup>.

Un insieme che illustra adeguatamente il mancato accordo tra i metodi molecolari e metodi di classificazione fenotipi/ecologici di *Bacillus* è il gruppo di *B. cereus*. Questo gruppo, chiamato anche *B. cereus* in senso lato, contiene sei specie strettamente correlate secondo la tassonomia corrente: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, e *B. weihenstephanensis*<sup>46,49</sup>.

Tuttavia, miglioramenti significativi potrebbero essere ottenuti aggiungendo dati ecologici, come nel caso del gruppo *B. cereus*. Ad esempio, il sequenziamento del 16S rDNA, o di altri loci conservati, può essere utilizzato per un raggruppamento iniziale e l'identificazione dei ceppi strettamente specie/correlati, sequenziamento che potrebbe poi essere seguito da una più approfondita caratterizzazione genomica dei gruppi dei ceppi interessati. Tale studio è stato recentemente eseguito per *B. subtilis* utilizzando tecnologie microarray e di sequenziamento e, in questo modo, è stata rilevata una grande diversità genomica all'interno di questo gruppo ceppi di *B. subtilis* strettamente correlati<sup>50-52</sup>.

### Multilocus Sequence Typing (MLST)

La Multilocus sequence typing (MLST) è uno strumento ampiamente utilizzato per la tipizzazione filogenetica dei batteri. MLST si avvale dell'amplificazione PCR e del sequenziamento di frammenti interni di un numero (di solito 6 o 7) di geni essenziali o strutturali sparsi nel cromosoma batterico. La MLST è stata ampiamente utilizzata come metodo di tipizzazione principale per analizzare le relazioni genetiche all'interno dell'intera popolazione del gruppo *B. cereus*.

Questo metodo rafforza la considerazione che il gruppo *B. cereus* costituisca una popolazione coerente in cui i membri sono unificati dalla presenza di elementi genetici onnipresenti e specifici la cui sede genomica e le sequenze non consentono alcuna distinzione tra le varie specie del gruppo e che questa popolazione è dinamica<sup>53</sup>. Questo è fatto con l'uso di un archivio sviluppato (denominato 'SuperCAT'), che raccoglie e integra tutti i dati della MLST da 5 schemi<sup>54</sup>.

### Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

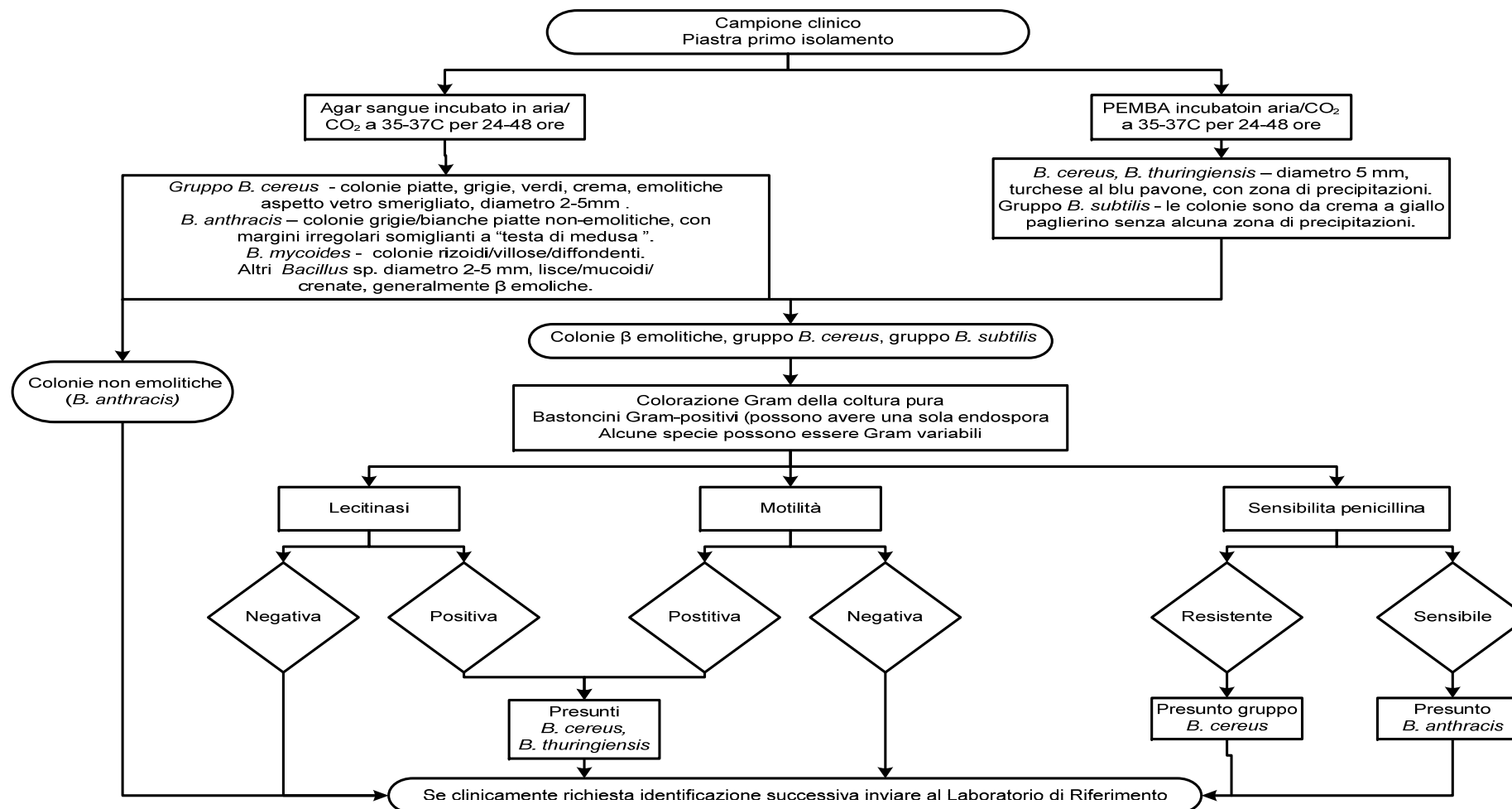
La PFGE rileva la variazione genetica tra ceppi con rari tagli ottenuti con endonucleasi di restrizione, seguita da separazione su gel di agarosio dei grandi frammenti genomici ottenuti. La PFGE è nota per avere un'elevata capacità discriminante ed è frequentemente utilizzata per le indagini di epidemie. Tuttavia, la stabilità della PFGE può essere insufficiente per un'applicazione affidabile in studi epidemiologici a lungo termine. Inoltre, in funzione delle sue caratteristiche quali, richiesta di tempo (30 ore o più per l'esecuzione), attrezzature speciali, la PFGE non è diffusamente usata se non nei laboratori di riferimento<sup>55,56</sup>.

Questa è stata utilizzata con successo per differenziare *Bacillus anthracis* da *B. cereus* e *B. thuringiensis* utilizzando profili PFGE da digestione *NotI*, dopo alcune modifiche alla procedura PFGE per facilitare la completa lisi<sup>57,58</sup>.

## 3.6 Conservazione e Invio

Conservare un isolato puro su becco di clarino di agar nutriente per l'invio al Laboratorio di Riferimento.

## 4 Identificazione di specie *Bacillus*



Il diagramma di flusso è solo indicativo

## 5 Refertazione

### 5.1 Identificazione Presunta

Se sono riscontrate appropriate caratteristiche di crescita, aspetto morfologico delle colonie, colorazione Gram della coltura.

### 5.2 Conferma dell'Identificazione

Successiva al riscontro di attività lecitinasica, motilità, sensibilità alla penicillina e identificazione con confezione commerciale e/o dopo il referto del Laboratorio di Riferimento

### 5.3 Medico Microbiologo

Informare il medico microbiologo di tutte le colture positive da campioni da sedi normalmente sterili e di tutti gli isolati con identificazione preliminare o confermata di *Bacillus anthracis*.

Secondo i protocolli locali, il medico microbiologo deve essere informato ogni volta che il modulo di richiesta contiene importanti informazioni che suggeriscono l'antrace fra le possibili diagnosi differenziali.

- Lesioni ulcerative cutanee con escara nera.
- Polmonite fulminante (specialmente con coinvolgimento del mediastino all'esame radiologico) e durante epidemie dallo stesso agente causale.
- Condizioni predisponenti l'infezione da *B. Anthracis* quali agricoltore, orticoltore, veterinario, portuale, conciatore, lavoratore tessile di lane o dipendente di laboratorio medico
- Rilascio volontario
- Inoculo in tossicodipendenti

Informare il microbiologo medico per altre specie *Bacillus*, con identificazione preliminare o confermata, (diverse da *B. anthracis*), secondo il protocollo locale, quando il modulo di richiesta può fornire informazioni aggiuntive rilevanti, quali ad esempio:

- Traumi penetranti, frattura composta o ritenzione di corpo estraneo
- Infezione di dispositivi medicali permanenti, quali valvole protesiche, pacemaker, derivazioni del LCR o catetere peritoneale o vascolare
- Intossicazione alimentare
- Ricerca in corso di possibile epidemia

Seguire il protocollo locale per la refertazione al medico del paziente

### 5.4 CCDC

Fare riferimento al Memorandum locale di Informazione.

### 5.5 Public Health England<sup>59</sup>

Fare riferimento alle linee guida sul CDSC e alle indicazioni del COSUR.

## 5.6 Gruppo Controllo Infezione

Informare il gruppo di controllo delle infezioni di isolati con identificazione preliminare o confermata di *B. anthracis* secondo i protocolli locali.

# 6 Invio

---

## 6.1 Laboratorio di Riferimento

Per informazioni su accertamenti disponibili, tempi di risposta, procedure di trasporto ed altre informazioni riguardanti procedure di trasporto ed altre richieste per l'invio del campione contattare l'appropriato laboratorio nazionale di riferimento,

### ***Bacillus anthracis***

Rare and Imported Pathogens Laboratory  
Public Health England  
Porton Down  
Salisbury  
Wiltshire  
SP4 OJG  
United Kingdom SP5 OJG  
Telefono +44 (0) 1980 612100

<https://www.gov.uk/government/collections/rare-and-imported-pathogens-laboratory-ripl>

### ***Bacillus cereus e altre specie Bacillus***

Gastrointestinal Bacteria Reference Unit  
Bacteriology Reference Department  
Public Health England  
61 Colindale Avenue  
London  
NW9 5EQ

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

<https://www.gov.uk/qbru-reference-and-diagnostic-services>

Inghilterra e Galles

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

Scotia

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

Irlanda del Nord

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

## 7 Notifica al PHE<sup>59,60</sup> o Equivalente<sup>61-64-</sup>

---

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

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

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

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

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

Esistono accordi diversi in [Scotland](#)<sup>61,62</sup>, [Wales](#)<sup>63</sup> and [Northern Ireland](#)<sup>64</sup>.

## Bibliografia

---

1. Euzéby, J. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Bacillus*.
2. Koneman EW, Allen S D, Janda W M, Schreckenberger P C, Winn W J, editors. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1997. p. 651-708
3. Holt JG, Krieg N R, Sneath P H A, Staley J T, Williams S T, editors. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994. p. 559
4. Drobniński FA. *Bacillus cereus* and related species. Clin Microbiol Rev 1993;6:324-38.
5. *Bacillus*, *Aliscylobacillus* and *Paenibacillus*. In: Berkeley RCW, Logan NA, editors. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. Chichester: John Wiley & Sons; 1997. p. 185-207.
6. Todar K. The Genus *Bacillus* (page 1). Todar's Online Textbook of Bacteriology. 2012.
7. Fritze D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. Phytopathology 2004;94:1245-8.
8. Lapidus A, Goltsman E, Auger S, Galleron N, Segurens B, Dossat C, et al. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. Chem Biol Interact 2008;171:236-49.
9. Lightfoot NF, Scott RJD, Turnball PCB. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis*. Salisbury Med Bull 1990;69:S98.
10. Spencer RC. *Bacillus anthracis*. J Clin Pathol 2003;56:182-7.
11. Turnball PCB, Bohm R, Chizyuka HGB, Fujikura T, Hugh-Jones ME, Melling J. Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals. World Health Organization 1993.
12. Leise JM, Carter CH, Friedlander H, Freed SW. Criteria for the identification of *Bacillus anthracis*. J Bacteriol 1959;77:655-60.
13. Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Clin Microbiol Rev 2010;23:382-98.
14. Stenfors LP, Mayr R, Scherer S, Granum PE. Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. FEMS Microbiol Lett 2002;215:47-51.
15. Halket G, Dinsdale AE, Logan NA. Evaluation of the VITEK2 BCL card for identification of *Bacillus* species and other aerobic endosporeformers. Lett Appl Microbiol 2010;50:120-6.
16. Lasch P, Nattermann H, Erhard M, Stammler M, Grunow R, Bannert N, et al. MALDI-TOF mass spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. Anal Chem 2008;80:2026-34.
17. Lasch P, Beyer W, Nattermann H, Stammler M, Siegbrecht E, Grunow R, et al. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. Appl Environ Microbiol 2009;75:7229-42.
18. Fernandez-No IC, Bohme K, Diaz-Bao M, Cepeda A, Barros-Velazquez J, Calo-Mata P. Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting. Food Microbiol 2013;33:235-42.



19. Rooney AP, Price NP, Ehrhardt C, Swezey JL, Bannan JD. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:2429-36.
20. 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".
21. 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.
22. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
23. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
24. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
25. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
26. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
27. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
28. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
33. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
34. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
35. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.

36. 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
37. Singh K. Laboratory-acquired infections. Clin Infect Dis 2009;49:142-7.
38. Salisbury D, Ramsay M, Noakes K, editors. Immunisation against infectious disease 2006 - The Green Book. Updated 04 November 2013. 3rd ed. Great Britain: The Stationery Office; 2013. p. 1-514
39. Health Protection Agency. Guidelines for Action in the Event of a Deliberate Release: Anthrax. 2010. p. 1-23.
40. Logan NA. Bacillus species of medical and veterinary importance. J Med Microbiol 1988;25:157-65.
41. 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.
42. Murray PR. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2010;16:1626-30.
43. Oliwa-Stasiak K, Molnar CI, Arshak K, Bartoszcze M, Adley CC. Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species. Journal of Applied Microbiology 2010;108:266-73.
44. Ko KS, Kim JM, Kim JW, Jung BY, Kim W, Kim IJ, et al. Identification of Bacillus anthracis by rpoB sequence analysis and multiplex PCR. J Clin Microbiol 2003;41:2908-14.
45. Huang CH, Chang MT, Huang L, Chu WS. Development of a novel PCR assay based on the gyrase B gene for species identification of Bacillus licheniformis. Mol Cell Probes 2012;26:215-7.
46. Maughan H, Van der Auwera G. Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. Infect Genet Evol 2011;11:789-97.
47. Palys T, Berger E, Mitrica I, Nakamura LK, Cohan FM. Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two *Bacillus* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2000;50:1021-8.
48. Pignatelli M, Moya A, Tamames J. EnvDB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa. Environmental Microbiology Reports 2009;1:191-7.
49. Chen ML, Tsen HY. Discrimination of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis with 16S rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. J Appl Microbiol 2002;92:912-9.
50. Earl AM, Losick R, Kolter R. Bacillus subtilis genome diversity. J Bacteriol 2007;189:1163-70.
51. Earl AM, Losick R, Kolter R. Ecology and genomics of Bacillus subtilis. Trends Microbiol 2008;16:269-75.
52. Wang LT, Lee FL, Tai CJ, Kasai H. Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the Bacillus subtilis group. Int J Syst Evol Microbiol 2007;57:1846-50.
53. Tourasse NJ, Helgason E, Okstad OA, Hegna IK, Kolsto AB. The Bacillus cereus group: novel aspects of population structure and genome dynamics. J Appl Microbiol 2006;101:579-93.

54. Tourasse NJ, Kolsto AB. SuperCAT: a supertree database for combined and integrative multilocus sequence typing analysis of the *Bacillus cereus* group of bacteria (including *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*). *Nucleic Acids Res* 2008;36:D461-D468.
55. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* 2006;55:645-59.
56. 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.
57. Zhong W, Shou Y, Yoshida TM, Marrone BL. Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by using pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:3446-9.
58. Harrell LJ, Andersen GL, Wilson KH. Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *J Clin Microbiol* 1995;33:1847-50.
59. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.
60. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
61. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
62. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
63. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
64. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).