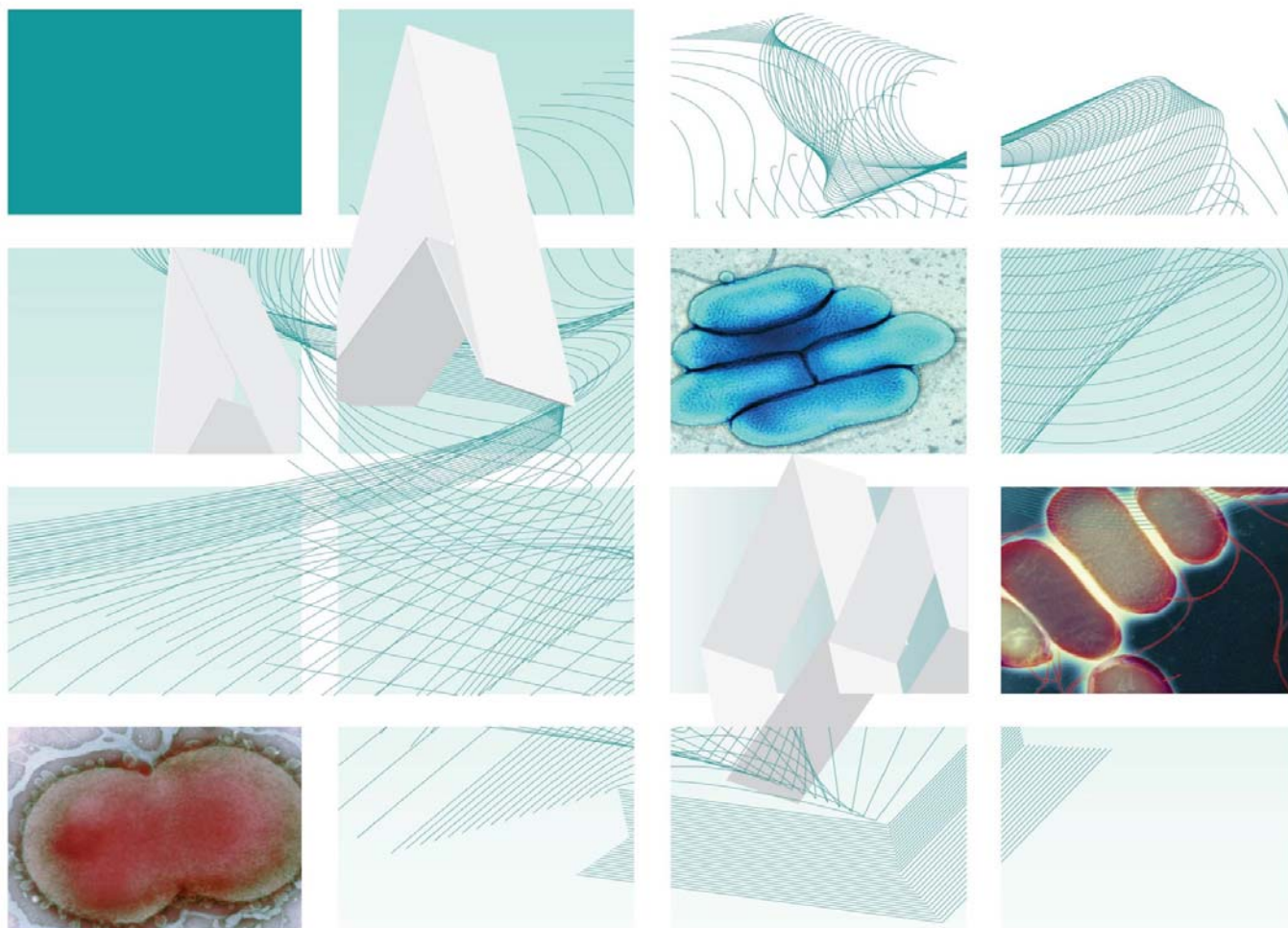




Protezione e miglioramento della salute pubblica nazionale

Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito

Identificazione di specie *Neisseria*



Ringraziamenti

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

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

Per ulteriori informazioni contattare:

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

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

Numero di accesso alle pubblicazioni PHE 2015013

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.....	14
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA.....	16
2 MICRORGANISMI BERSAGLIO	16
3 IDENTIFICAZIONE	17
4 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE <i>NEISSERIA</i>	22
5 REFERTAZIONE	23
6 INVII	24
7 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE	25
BIBLIOGRAFIA	26



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

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

Tabella delle Modifiche

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso 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.	7/26.06.15
Emissione eliminata. no	2.2
Emissione inserita no.	3
Sezione(i) interessate	Modifica.
Intero documento	Collegamenti ipertestuali aggiornati al gov.uk.
Pagina 2.	Loghi aggiornati aggiunti.
Scopo del documento.	Lo scopo è stato aggiornato per includere tutte le specie <i>Neisseria</i> isolate da materiale clinico, ma con maggiore rilevanza per le due specie più riscontrate nelle infezioni degli esseri umani. Sono stati aggiunti collegamenti web per i documenti ID 11 e ID 12.
Introduzione	La tassonomia delle specie <i>Neisseria</i> è stata aggiornata . Ulteriori informazioni sono state aggiunte alla sezione Caratteristiche. Vengono menzionate le specie clinicamente rilevanti e descritte le loro caratteristiche. Utilizzare la bibliografia aggiornata La sezione relativa ai Principi d'Identificazione è stata aggiornata per includere i nomi attuali dei Laboratori di Riferimento dove inviare le presunte specie <i>Neisseria</i> .
Informazione Tecnica/limitazioni	Aggiunte informazioni riguardanti il test dell'ossidasi, terreni agar e sistemi di identificazione commerciale descritti con riferimenti bibliografici.
Considerazioni sulla Sicurezza .	Questa sezione è stata aggiornata per le infezioni acquisite in laboratorio e la manipolazione dei microrganismi in laboratorio. Inclusa anche la relativa bibliografia.
Microrganismi Bersaglio	La sezione sui organismi bersaglio è stato aggiornata e presentata in modo chiaro. La bibliografia relativa è stata

	aggiornata.
Identificazione.	Eseguiti aggiornamenti in 3.1, 3.2 e 3.4 in riferimento agli standard pratici. Aggiornata la sottosezione 3.5 per includere i Metodi Molecolari Rapidi.
Diagramma di flusso per Identificazione	Modifica del diagramma di flusso per identificazione delle specie <i>Neisseria</i> per facilitare l'orientamento.
Refertazione	Modifiche minori apportate a 5.1, e 5.2. La sottosezione 5.4 è stata aggiornata in riferimento alla procedura di refertazione
Invio	Aggiornati gli indirizzi dei laboratori 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 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. (2015). Identification of *Neisseria* species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 6 Emissione 3. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Scopo del Documento

Questa SMI descrive le modalità di identificazione delle specie *Neisseria* patogene isolate da materiali clinici e la loro differenziazione dalle specie non patogene ed i generi correlati *Moraxella* e *Kingella*. L'identificazione di questi due generi è descritta nella [ID 11 - Identification of *Moraxella* Species and Morphologically Similar Organisms](#) e [ID 12 – Identification of *Haemophilus* species and the HACEK group of organisms](#).

Questa SMI deve essere usata con le altre SMI

INTRODUZIONE

Tassonomia

Il genere *Neisseria* appartiene alla famiglia delle Neisseriaceae. Attualmente sono note 25 specie *Neisseria* e 3 sottospecie che possono essere isolate da esseri umani e animali¹. Quattro specie sono state riclassificate^{1,2}. Le specie clinicamente importanti di *Neisseria* (*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica* e *Neisseria cinerea*) sono relativamente facili da identificare dalle *Neisseria* non patogene. *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* sono i due principali patogeni del gruppo. Le altre specie di *Neisseria* quali *N. lactamica* e *N. cinerea* sono generalmente considerate commensali, ma sono state implicate come cause di infezione nei pazienti immunocompromessi. Le specie più recenti incluse nel genere *Neisseria* isolate da campioni clinici umani sono *N. oralis*, *N. shayegani*, *N. wadsworthii*, *N. zoodegmatis* e *N. animaloris*.

Caratteristiche

Specie *Neisseria*

Le specie *Neisseria* sono patogene obbligate dell'uomo e senza altri ospite naturali³. Sono cocchi Gram negativi di diametro di 0.6-1.0 µm, si presentano come cellule singole, ma spesso appaiate, con lati adiacenti appiattiti, tranne *Neisseria elongata*, *Neisseria weaveri* e *Neisseria bacilliformis* che hanno forma a bastoncino, spessore 0.5µm e sono disposte come diplococchi o in brevi catenelle⁴⁻⁶. Non sono mobili e i flagelli sono assenti. Alcune specie producono un pigmento carotenoide giallo-verdastro e alcune possono essere nutrizionalmente esigenti ed emolitiche. Alcune specie sono saccarolitiche. La temperatura ottimale di crescita è di 35-37°C. Sono ossidasi e catalasi positive (tranne *Neisseria elongata*). Tutte, tranne *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria canis*, riducono i nitriti.

Patogene

Neisseria gonorrhoeae

Le cellule sono a forma di cocchi e si presentano in coppie. Su agar sangue non sono emolitiche e non producono pigmento giallo. *N. gonorrhoeae* forma colonie lisce, rotonde, umide, grigio-marroni uniformi con un colore verdastro sotto il terreno di isolamento primario. *N. gonorrhoeae* può crescere in modo ridotto su agar sangue quando il terreno è molto recente o il numero di batteri presenti nel campione è particolarmente elevato. Producono acido dal metabolismo del glucosio e possono anche ridurre il nitrito di potassio a basse concentrazioni ma non i nitrati⁴.

Neisseria meningitidis

Le cellule sono a forma di cocchi e si presentano in coppia e utilizzano glucosio e maltosio per produrre acido. Il sierogruppi A, D, e Y di *N. meningitidis* possono ridurre i nitriti se presenti in bassa concentrazione. Non sono emolitiche su piastra di agar sangue e non riducono i nitrati. *N. meningitidis* come *N. gonorrhoeae* forma grandi colonie lisce, rotonde, umide, grigio-marroni uniformi con una superficie lucente e bordo continuo². Non producono pigmento giallastro⁴. A causa di autolisi con l'invecchiamento, le colonie possono diventare più butirrose e gombose se sfiorate con un ago da semina.

Altre specie *Neisseria* associate a malattie umane.***Neisseria lactamica***

Le cellule sono a forma di cocchi che appaiono in coppie e producono un pigmento giallo, e alcuni ceppi sono emolitici su agar sangue di cavallo. Le colonie assomigliano di *N. meningitidis*, ma possono essere meno umide e più piccole. Utilizzano glucosio, maltosio e lattosio producendo acido. Si distinguono dalle altre specie *Neisseria* per la loro capacità di produrre acido dal lattosio. Riducono i nitriti e inoltre da questi producono gas. Non riducono i nitrati⁴.

Neisseria cinerea

Le cellule sono a forma di cocchi tondeggianti che appaiono in coppie o più spesso in gruppi sparsi e sulla piastra di agar sangue non sono emolitiche. Alcuni ceppi producono pigmento giallo. Le colonie sono piccole (1,0 - 1,5 mm di diametro), grigio-bianche con bordo continuo, e leggermente granulose. Non utilizzano carboidrati e possono ridurre i nitriti con produzione di gas, ma non i nitrati. Questa è la specie più comunemente identificata in modo errato come *N. gonorrhoeae* a causa della similitudine fenotipica e dell'incapacità di produrre acido dal glucosio⁷.

Neisseria elongata

Le cellule sono costituite da piccoli bastoncini sottili disposti in catenelle e si differenziano dagli altri componenti del genere *Neisseria* a forma di cocchi. A differenza delle altre *Neisseria*, sono catalasi negativi, non mobili e non dotati di capsula. Si allungano in filamenti quando esposti a concentrazioni subletali di penicillina. Su agar sangue, formano colonie bianco grigiastre, opache lucidenti, di circa 1 - 1,5 mm di diametro, a ridotta emisfericità con bordo continuo. Le colonie hanno una evidente consistenza di tipo argilloso, non sono emolitiche e sono capaci di una certa erosione dell'agar. Non producono acido dai carboidrati, e non riducono i nitrati, ma i nitriti. Producono anche un pigmento di colore debolmente giallastro⁸.

Attualmente sono note 3 sottospecie di *N. elongata* - *Neisseria elongata* subsp. *elongata*, *Neisseria elongata* subsp. *glycolytica* e *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens*. Tutte le sottospecie sono state segnalate come causa di malattie umane. La loro classificazione si avvale delle differenze biochimiche tra ciascuna sottospecie⁹.

Neisseria elongata* subsp. *elongata

Su agar sangue, le colonie appaiono piatte e non emolitiche. Sono ossidasi positive ma catalasi negative, non mobili, e non producono acido dal glucosio. Non riducono i nitrati, ma i nitriti. *N. elongata* subsp. *elongata* si differenzia dalle altre due sottospecie per la incapacità di produrre l'acido da D-glucosio¹⁰.

Neisseria elongata* subsp. *glycolytica

Sono a forma di sottili bastoncini piccoli, corti con una spiccata tendenza a formare catene. Non sono mobili e sono simili alle cellule di *N. elongata*. Sulla piastra di agar sangue, le colonie sono

relativamente grandi (2 - 3 millimetri di diametro, dopo circa 20 ore di incubazione), grigie, opache, moderatamente rilevate con la parte superiore piatta e liscia con consistenza soffice, omogenea. Le colonie sono facilmente emulsionabili in soluzione fisiologica e possono essere o non essere emolitiche, ma sembrano assumere una leggera colorazione gialla dopo pochi giorni. Producono acido dal glucosio ma non da galattosio, fruttosio, xilosio, mannosio, maltosio, saccarosio o lattosio. Sono strettamente aerobie e sono positive per ossidasi, catalasi e riduzione dei nitriti^{11,12}.

Questa sottospecie differisce da *N. elongata* subsp. *elongata* per la produzione di acido dal glucosio, per la catalasi fortemente positiva e per la consistenza delle sue colonie sull'agar.

Differiscono da *N. elongata* subsp. *nitroreducens* per la produzione di catalasi e l'incapacità di ridurre i nitrati¹³.

Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens

Sono bastoncini simili alle cellule di *N. elongata*. Sono catalasi negative, positive per riduzione dei nitrati e nitriti, senza produzione di gas, e presentano reazione debole variabile o assente al D-glucosio. *N. elongata* subsp. *nitroreducens* differiscono da *N. elongata* subsp. *elongata* e *N. elongata* subsp. *glycolytica* per la capacità di ridurre il nitrato⁹.

N. elongata subsp. *nitroreducens* sembra essere raramente un patogeno umano, ma spesso è un agente eziologico grave. La sua associazione con l'endocardite e altre malattie sistemiche la differenzia dalle altre sottospecie di *N. elongata*⁹.

Neisseria sicca

Neisseria sicca forma cocchi che si presentano in coppie e tetradi. Alcuni ceppi producono un pigmento giallo e su agar sangue evidenziano emolisi. Dopo 24 ore di incubazione, appaiono sulle piastre di agar sangue colonie piccole rotonde, con una superficie liscia e un bordo continuo, ma dopo 48 ore, aumentano di dimensioni e appaiono in rilievo, rugose, e nere.. Le colonie sono molto compatte e aderenti al terreno, sono difficili da frantumare e da disperdere¹⁴. Agglutinano spontaneamente in soluzione fisiologica².

Utilizzano anche glucosio, maltosio, fruttosio e saccarosio per produrre acido e non lattosio e mannosio. Sono ossidasi e catalasi positive e riducono i nitriti, ma non i nitrati⁴.

Neisseria mucosa

Le cellule sono cocchi che si presentano in coppie. Alcuni ceppi non mostrano emolisi su agar sangue. Le colonie sono grandi, mucose, e spesso aderenti. La maggior parte dei ceppi non è pigmentata o con colorazione da grigiastro al giallo lucido. Utilizzano anche glucosio, maltosio, fruttosio e saccarosio per produrre acido e non lattosio e mannosio. Sono ossidasi positive. Riducono sia i nitriti che i nitrati, caratteristica che le differenzia dalle altre specie *Neisseria*⁴.

Neisseria canis

Sono cocchi che si presentano in coppie e raramente in tetradi. Non producono pigmento giallo e non mostrano emolisi su agar sangue. Le colonie sono lisce, butirose con una sfumatura di colore giallo chiaro. Non utilizzano i carboidrati, ma riducono i nitrati e non i nitriti⁴.

Neisseria flava

Neisseria flava forma cocchi che appaiono in coppie. Su agar cioccolato, appaiono colonie isolate, opache, gialle pallido, un poco più appiattite rispetto a quelle dei *Neisseria meningitidis*. Il pigmento è appena percettibile, eccetto quando i microrganismi sono stati coltivati su un terreno di colore chiaro, quale il siero di sangue coagulato.

I ceppi di *N. flava* fermentano glucosio, maltosio, levulosio e producono l'acido.

Neisseria Flava differisce da *Neisseria gonorrhoeae* solo perché dotata di due sistemi enzimatici aggiuntivi, uno dei quali consente la fermentazione dei disaccaridi e l'altro la formazione di pigmento¹⁵.

N. subflava

Le cellule sono a forma di cocchi che si presentano in coppie e tetradi e hanno la tendenza a resistere alla decolorazione Gram. Producono un pigmento giallo e su agar sangue non mostrano emolisi. Le colonie sono lisce, trasparenti o opache, spesso aderenti. Spesso agglutinano spontaneamente in soluzione fisiologica. Utilizzano glucosio e maltosio per produrre acido e non lattosio e mannosio. Alcuni ceppi utilizzano fruttosio e saccarosio per produrre acido. Sono ossidasi positive e riducono i nitriti, ma non nitrati^{2,4}.

Neisseria ovis**(Recentemente riclassificata come *Moraxella ovis* sotto la famiglia *Moraxellaceae*)²**

Le cellule sono a forma di cocchi che si presentano in coppie. L'incubazione aerobica su piastre di agar sangue bovino a 37°C produce colonie grigie, opache, convesse, β-emolitiche. Sono ossidasi e catalasi positive, non mobili e riducono i nitrati, ma non i nitriti. Non producono acido dai carboidrati¹⁶.

Neisseria bacilliformis

Sono le più recenti specie bacillari di specie *Neisseria* isolate da infezioni umane. Sono a forma di piccoli bastoncini di 0.6µm per 1.3 - 3.0µm. Questo microrganismo cresce bene sia su agar cioccolato che su agar sangue di montone con colonie che misurano 0,5 - 1 mm a 24 ore. Le colonie appaiono rotonde, lisce, lucenti, di colore grigio chiaro. Biochimicamente sono asaccarolitiche e negative per la produzione di indolo, ma positive per ossidasi. Le reazioni della catalasi e test di riduzione dei nitrati variano in funzione del ceppo.

La morfologia e la natura asaccarolitica di *N. bacilliformis* possono anche portare a confusione con l'identificazione delle specie *Pasturella* e *Moraxella*, che sono entrambe commensali delle vie aeree superiori. Attualmente, il metodo 16S rRNA gene sequencing rappresenta il modo più affidabile per identificare *N. bacilliformis*⁵.

Neisseria weaveri

Queste sono a forma di bastoncini diritti larghi, paffuti, medio-grandi, di lunghezza variabile, se coltivate su becchi di clarino o piastre, con una tendenza a crescere in catene o bastoncini più lunghi in brodocoltura. Non sono mobili, aerobie, e non richiedono sale, e crescono bene tra 25 e 35°C; la maggior parte dei ceppi cresce a 42°C. Le colonie sono di colore grigio-bianco con bordo continuo, piatte, talvolta luccicanti e lisce e di dimensioni variabili. Diametro di 1 - 2 millimetri dopo 24 ore di incubazione a 35°C e 2 - 4mm dopo 48 ore di incubazione su piastra di agar sangue di montone (SBAP - sheep blood agar plate). Producono alfa-emolisi su SBAP in aree di crescita abbondate. Le reazioni ossidasi e catalasi sono intensamente positive. Il battere non utilizza carboidrati; riduce i nitriti ma non i nitrati e ha una reazione debolmente positiva per la fenilalanina deaminasi da cultura coltivata su SBAP^{2,6}.

Neisseria flavescens

Le cellule sono cocci e si presentano in coppie e tetradi. Non sono emolitiche, lisce e opache con pigmento giallo dorato. Sono positive per la riduzione dei nitriti e la sintesi di polisaccaridi dal saccarosio. Non producono acido dai carboidrati né riducono i nitrati.

Neisseria oralis

Il diametro delle cellule è di 0.5µm, possono essere presenti in catenelle e non sono mobili. Le colonie sono piccole, circolari, a bordo continuo, rilevate, umide, gialle, debolmente alfa-emolitiche con diametro di 1 - 1,5 mm di dopo 48 ore di crescita a 37°C in 5% CO₂. Sono anaerobie facoltative e la crescita compare a 28 e 42°C, e non a 10°C. Non crescono su agar MacConkey dopo 5 giorni. Sono positive per catalasi, ossidasi e riduzione dei nitrati; e negative per la produzione di acido dai test di ossidazione-fermentazione, utilizzo di citrato di Simmons, idrolisi dell'esculina, urea e gelatina, produzione di indolo, decarbossilazione di arginina, lisina e ornitina usando il terreno decarbossilasi di Moeller e produzione di H₂S su triple sugar iron agar¹⁷. Sono state isolate dalla placca ginivale di soggetti sani e da altri campioni clinici³.

Neisseria shayegani

Le cellule sono a forma di bastoncini di 1.0 - 1.5µm di larghezza e 2.5 - 5.5µm di lunghezza. La crescita si manifesta tra 10 e 42°C. Non crescono su agar MacConkey dopo 5 giorni. Sono anaerobi facoltativi. Le colonie sono piccole, circolari, margine continuo, convesse, umide, da giallo chiaro al grigio e non emolitiche. Sono positive per catalasi, citocromo ossidasi e riduzione dei nitrati; e negative per la produzione di acido dai carboidrati, utilizzazione del citrato di Simmons, idrolisi dell'esculina, urea e gelatina, la produzione di indolo, decarbossilazione di arginina, lisina e ornitina¹⁸.

Nell'uomo sono state isolate da ferite del braccio e anche dall'espettorato.

Neisseria wadsworthii

Le cellule sono a forma coccoide, 1.3 - 1.8µm di diametro, e possono essere presenti in coppie e in catenelle. La crescita si manifesta tra 10 e 42°C. Non crescono su agar MacConkey dopo 5 giorni. Sono anaerobie facoltative. Le colonie sono piccole, circolari, margine continuo, convesse, umide, colore da giallo chiaro all'arancione e non emolitiche. Sono positive per catalasi, citocromo ossidasi e riduzione dei nitrati; e negative per la produzione di acido dai carboidrati, utilizzazione del citrato di Simmons, idrolisi dell'esculina, urea e gelatina, produzione di indolo, decarbossilazione di arginina, lisina e ornitina¹⁸.

Nell'uomo sono state isolate da ferite mano e dal liquido peritoneale.

***Neisseria zoodegmatis* (era precedentemente nota come Centers for Disease Control (CDC) Group Eugonic Fermenter (EF -4b).**

Le cellule hanno forma di bastoncini coccoidi. Le colonie sono circolari, convesse, margine continuo, opache, lucide, lisce ed emolitiche. Sono positive per produzione di catalasi, citocromo ossidasi, crescono a 37°C e a temperatura ambiente (18 - 22 ° C) e su agar MacConkey. La maggior parte dei ceppi sono positivi per produzione di acido (in acqua peptonata) dal glucosio, sono fermentanti nel test ossidazione-fermentazione di Hugh e Leifson, produzione di gelatinasi, riduzione dei nitrati e utilizzo del citrato. Tutti i ceppi sono negativi per la produzione di acido (in soluzione acquosa di peptone) da adonitolo, arabinosio, cellobiosio, dulcitol, glicerolo, inositolo, lattosio, maltosio, mannitolo, raffinosa, ramnosio, salicina, sorbitolo, amido, saccarosio,

trealosio e xilosio. Tutti i ceppi sono negativi per produzione di acetoina, diidrolasi arginina, digestione della caseina, ossidazione del gluconato, produzione di β -galattosidasi, motilità, produzione di ornitina-decarbossilasi, fenilalanina deaminasi, produzione di pigmento e utilizzo del citrato¹⁹.

Sono stati isolati da ferite umane derivanti da morsi di cani e gatti²⁰.

***Neisseria animaloris* (era precedentemente conosciuta come Centers for Disease Control (CDC) Group Eugonic Fermenter (EF) -4a).**

Le cellule hanno forma di bastoncini coccoidi. Le colonie sono circolari, convesse, margine continuo, opache, lucide, lisce ed emolitiche. Sono positive per produzione di acido (in soluzione acquosa di peptone) da glucosio, produzione di arginina diidrolasi, catalasi, citocromo ossidasi, crescita a 37°C e a temperatura ambiente (18-22°C), crescita su agar MacConkey e riduzione dei nitrati. La maggior parte dei ceppi sono positivi per fermentazione nel test di ossidazione-fermentazione di Hugh e Leifson e test della gelatinasi. Tutti i ceppi sono negativi per la produzione di acido (in soluzione acquosa di peptone) da adonitolo, arabinosio, cellobiosio, dulcitolio, glicerolo, inositolo, lattosio, maltosio, mannitolo, raffiniosio, ramnosio, salicina, sorbitolo, amido, saccarosio, trealosio e xilosio. Tutti i ceppi sono negativi per la produzione di acetoina, motilità, produzione di ornitina decarbossilasi, fenilalanina deaminasi, produzione di pigmenti e utilizzo del citrato¹⁹.

Sono state isolate da ferite umane derivanti da morsi di cani e gatti²⁰.

Principi di identificazione

Gli isolati da coltura primaria sono identificati con la colorazione Gram, prova dell'ossidasi ed almeno due dei seguenti criteri d'identificazione: utilizzazione dei carboidrati, rilievo di enzimi in dotazione o reattività a reagenti immunologici.

Se è necessaria ulteriore identificazione, i presunti isolati di *N. gonorrhoeae* e di altre specie di *Neisseria* dovrebbero essere inviati al Sexually Transmitted Bacteria Reference Laboratory. Se gli isolati sono noti per essere *N. meningitidis*, devono essere inviati al Meningococcal Reference Unit (MRU) Manchester.

Contattare il laboratorio o consultare il seguente sito per i dettagli:

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

Informazione Tecnica/Limitazione

Non devono essere sottovalutate le conseguenze sociali per il paziente e l'organizzazione derivanti da una diagnosi errata d'identificazione della malattia gonococcica.

Test ossidasi

Le specie *Kingella* e *M. catarrhalis* sono ossidasi positive e possono essere erroneamente identificate come *Neisseria*.

Terreni

Se il ceppo *Neisseria gonorrhoeae* in questione è sensibile alla vancomicina non riuscirà a crescere su terreno selettivo.

Sistema di identificazione commerciale

I reagenti immunologici disponibili in commercio contengono una miscela di anticorpi monoclonali specifici per epitopi della principale proteina della membrana esterna, *Por*. Poiché i reagenti contengono una miscela di anticorpi e non un singolo anticorpo per epitopo cross-reattivo, si

possono manifestare false reazioni negative, anche se non frequenti. Poiché le miscele stesse sono differenti gli isolati occasionali possono presentare risultato falso negativo con un reagente, ma positivo con un reagente diverso.

In Inghilterra e nel Galles sono prevalenti le *N. gonorrhoeae* che manifestano una mutazione nel gene prolina iminopeptidase e risultano quindi negative per questo enzima; pertanto le confezioni che rilevano solo produzione di aminopeptidasi non dovrebbero essere utilizzate da sole^{21,22}. Le *N. gonorrhoeae* che sono prolina iminopeptidase negative presenteranno risultati anomali con i carboidrati e le confezioni con enzimi pre-formati e dovrebbero essere confermate con un reagente immunologico.

Sono stati descritti ceppi di *N. meningitidis* maltosio negativi che possono essere differenziati da *N. gonorrhoeae* per la loro capacità di produrre gamma-glutamylaminotransferasi. Possono essere osservate anche varianti di *N. meningitidis* glucosio negative.

Differenziazione tra le specie *Neisseria*

N. wadsworthii e *N. shayegani* si differenziano dalla maggior parte delle altre specie di *Neisseria* e sono riconosciute per assenza di produzione di acido da numerosi zuccheri e/o per la capacità di ridurre il nitrato.

1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA²³⁻³⁹

Microrganismi del Gruppo 2 di Rischio

Sebbene *N. meningitidis* sia un microrganismo appartenente al gruppo di Rischio 2, la procedura diagnostica dei campioni può essere effettuata a Livello di Contenimento 2.

A causa della gravità della malattia e dei rischi associati alla formazione di aerosol, qualunque manipolazione su isolati sospetti di *N. meningitidis* deve sempre essere effettuata in cabina microbiologica di sicurezza fino a quando sia stata esclusa *N. meningitidis* (come si deve per ogni procedura di laboratorio che ha dato luogo ad aerosol)³¹.

N. meningitidis causa talvolta malattie gravi e letali. Sono state segnalate infezioni acquisite in laboratorio^{40,41}. Il microrganismo infetta principalmente l'apparato respiratorio. Per alcuni seirogruppi di meningococchi è disponibile un efficace vaccino. Il vaccino è richiesto per il personale di laboratorio che lavora di routine con questo microrganismo

Anche *N. gonorrhoeae* appartiene un gruppo dei microrganismi di Rischio 2 ed è responsabile della trasmissione sessuale dell'infezione, nota come gonorrea, dispone di un potenziale per danneggiare anche gli occhi o determinare infezione della gola, quest'ultima rappresenta il rischio più probabile per gli operatori di laboratorio con trasmissione verticale o scarsa igiene o inalazione di aerosol.

Fare riferimento alle linee guida attuali sulla sicurezza della manipolazione di tutti i microrganismi appartenenti al Gruppo di Rischio 2 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^{1,5,9-11,13,15,17,19,42,43}

Le principali specie *Neisseria* segnalate come causa di infezione nell'uomo sono:

N. gonorrhoeae, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. sicca*

Altre specie *Neisseria* che possono essere associate a malattie nell'uomo:

N. flava, *N. subflava*, *N. cinerea*, *N. canis*, *N. elongata* subspecie *elongata*,
N. elongata subspecie *glycolytica*, *N. elongata* subspecie *nitroreducens*, *N. mucosa*,
N. bacilliformis, *N. weaveri*, *N. flavescens*, *N. oralis*, *N. shayegani*, *N. wadsworthii*,
N. zoodegmatidis (precedentemente nota come Centers for Disease Control (CDC) Group Eugonic Fermenter (EF)-4b), *N. animaloris* (precedentemente nota come Centers for Disease Control (CDC) Group Eugonic Fermenter (EF)-4a)

Specie *Neisseria* asaccarolitiche che possono essere erroneamente identificate come *N. gonorrhoeae* or *N. meningitidis* - *N. canis, *N. caviae*, *N. cinerea**, *N. cuniculi*, *N. elongata**, *N. flavescens*, *N. ovis** riclassificata come *Moraxella ovis***

Altri microrganismi che possono essere erroneamente identificati come specie *Neisseria* *Moraxella catarrhalis, *Kingella denitrificans****

*Queste sono state segnalate come causa d'infezione nell'uomo

3 Identificazione

3.1 Aspetto microscopico

Colorazione Gram (consultare [BSOFTP 39 – Procedure di colorazione](#))

Specie *Neisseria*

Cocchi Gram-negativi accoppiati lungo gli assi paralleli.



Bastoncini Gram negativi disposti in catenelle o come diplococchi

3.2 Terreni di isolamento primario

Incubare l'agar selettivo GC fino a 48 ore in 5-10% di CO₂ a 35-37°C.

L'agar selettivo GC è di solito ottenuto dall'agar base GC arricchito con sangue lisato o laccato di cavallo arricchito con o privo di VitoX o IsoVitaleX. Il cocktail di antibiotici usati per la selezione contiene vancomicina o lincomicina, colistina, trimetoprim e nistatina o anfotericina⁴⁴.

Incubare l'agar Sangue intero/Sangue cotto (cioccolato) per 18-48 ore in 5-10% di CO₂ a 35-37°C. Questi terreni contengono di solito agar Columbia base arricchito con 5% di sangue di cavallo o con sangue laccato di cavallo.

3.3 Aspetto delle colonie

Le specie *Neisseria* sono solitamente pigmentate ed opache. Entrambe le *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* formano sulle piastre di isolamento primario colonie lisce, rotonde, umide, uniformi, grigio/marrone con una colorazione verdastra sottostante il terreno di isolamento primario. *N. gonorrhoeae* cresce meno su agar sangue rispetto *N. meningitidis*.

3.4 Procedure di prova

Prova dell'ossidasi ([consultare TP 26 - Oxidase test](#))

Nota: Le specie *Kingella* e *M. catarrhalis* sono ossidasi positive e possono essere erroneamente identificate come specie *Neisseria*,

3.5 Identificazione successiva

Le *Neisseria* sono dotate di un tipico involucro Gram negativo, formato da una membrana citoplasmatica, un sottile strato di peptidoglicano e una membrana esterna. Molti dei principali antigeni dell'involucro cellulare sono condivisi da *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*, con l'eccezione della capsula che non è mai espressa da *N. gonorrhoeae* ma, quando espressa da *N. meningitidis*, migliora la sua sopravvivenza nel sangue

Le specie *Neisseria* possono essere differenziate da microrganismi simili con prove biochimiche o di altro tipo. Dovrebbero essere utilizzati almeno due principi identificativi in quanto le differenze tassonomiche fra i diversi componenti del genere sono molto scarse e pertanto l'identificazione definitiva può essere problematica.

3.5.1 *Neisseria Gonorrhoeae*⁴⁵

N. gonorrhoeae è trasmessa per via sessuale, causando principalmente infezione del tratto anogenitale ed è sempre considerata patogena. Ciò la differenzia da *N. meningitidis* che colonizza la parte superiore dell'apparato respiratorio come commensale ed occasionalmente diventa invasiva causando malattia sistemica.

3.5.1.1 Prove di gruppi a rischio e altri casi

Pazienti ad alto rischio: che frequentano strutture sanitarie per la cura della salute sessuale come i pazienti afferenti alle GUM (genitourinary medicine)

Uno, preferibilmente due, accertamenti successivi sono necessari per la conferma di isolati da campioni genitali dove la colorazione di Gram e la prova dell'ossidasi sul campione ha fornito una diagnosi presunta d'infezione da *N. gonorrhoeae*. Questi dovrebbero essere di tipo biochimico e immunologico. Eventuali isolati che forniscono un risultato negativo con un test immunologico dovrebbero essere saggiati con un test biochimico addizionale che rileva l'utilizzazione dei carboidrati con o senza aminopeptidasi per eliminare la possibilità di una *N. gonorrhoeae* aminopeptidasi negativa.

Basso rischio: Pazienti sottoposti a cure primarie (popolazioni a bassa prevalenza)^{46,47}

Si raccomanda che per gli isolati da pazienti considerati a basso rischio (ma senza implicazioni medico-legali) possano essere utilizzate due prove per la conferma dopo l'identificazione presunta. Queste dovrebbero essere di tipo biochimico e immunologico. Le confezioni biochimiche non dovrebbero includere quelle che rilevano unicamente le aminopeptidasi, ma quelle che comprendono i carboidrati e le aminopeptidasi.

Medicolegali: Bambino o abuso sessuale^{46,47}

Qualora i risultati possano avere rilevanza medico-legale, i campioni devono essere trattati in accordo con le Royal College of Pathologists guidance^{48,49}.

Nota: La "Guidelines for handling medicolegal specimens and preserving the chain of evidence" pubblicato dal Royal College of Pathologists è stato ritirato ed è in fase di revisione. Una volta pubblicato, il documento (ID 6) sarà di conseguenza aggiornato.

3.5.1.2 Approcci alla identificazione di *N. gonorrhoeae*

L'identificazione può essere ottenuta con una combinazione di procedure di prova che identificano il microrganismo e escludono altre specie *Neisseria*. *N. gonorrhoeae* è generalmente isolata da pazienti ad alto rischio, dove è solo necessario eseguire l'identificazione presunta seguita da un solo test di conferma. Tuttavia, nei pazienti a basso rischio e nei bambino e nei casi di abusi sessuali (medico-legali), è necessario utilizzare più di un test di conferma. Il rilievo di *N. gonorrhoeae* può essere ottenuto con test NAAT o la coltura. La coltura dovrebbe essere eseguita in tutti i casi di *N. gonorrhoeae* diagnosticati dal NAAT⁵⁰.

Identificazione presunta

Dovrebbero essere rispettati quattro criteri minimi per tutti gli isolati di *N. gonorrhoeae*⁴⁴:

1. Crescita su terreni selettivi per specie patogene di *Neisseria*

Nota: Se il ceppo *N. gonorrhoeae* in questione è sensibile alla vancomicina non cresce su questo terreno

2. Adeguata morfologia delle colonie su questi terreni
3. Morfologia tipica con colorazione (diplococchi Gram negativi)

4. Ossidasi positiva

Identificazione di *N. gonorrhoea*

Sono disponibili criteri che possono essere adottati per confermare l'identità di *N. gonorrhoeae* ed eliminare le altre specie di *Neisseria*.

1. Uso di anticorpi specifici anti gonococcici, che confermano solo *N. gonorrhoeae*
2. .Uso di test per l' utilizzo dei carboidrati, con o senza la rilevazione di enzimi preformati come le aminopeptidasi e β -galattosidasi, che forniscono la speciazione del microrganismo⁴⁶
3. Uso di Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) per conferma di *N. gonorrhoeae*⁵¹
4. .Conferma molecolare della presenza del DNA specifico di *N. gonorrhoeae* DNA usando la Polymerase Chain Reaction (PCR)^{50,52}

3.5.1.3 Test disponibili per identificazione**Metodi immunologici**

L'identificazione mediante metodi immunologici può essere ottenuta utilizzando anticorpi legati ad una proteina stafilococcica A o lattice. Questi reagenti disponibili in commercio contengono una miscela di anticorpi monoclonali specifici per epitopi della principale proteina della membrana esterna Por. Poiché i reagenti contengono una miscela di anticorpi piuttosto che uno per epitopo cross-reattivo, si possono verificare false reazioni negative, anche se non sono frequenti. Poiché le miscele stesse sono differenti, per alcuni isolati si verificano occasionali falsi negativi con un metodo, ma risultano positivi con un l'altro.

Utilizzazione dei carboidrati

Tradizionalmente l'identificazione è stata confermata con la ricerca dell'acidificazione di terreni contenenti glucosio, ma non con quelli con maltosio, saccarosio o lattosio. Si tratta di un processo ossidativo e non fermentativo. E' importante che il terreno base sia privo di carboidrati (se si utilizzano siero e zuccheri, verificare il siero per la presenza di maltasi). Le piastre o le provette seminate sono incubate in 5-10% CO₂ per ventiquattro ore con tappi allentati e poi lasciate stazionare per 30 minuti per dissolvere qualsiasi acidificazione dovuta alla CO₂ disciolta. Gli svantaggi di questo metodo sono la sua richiesta di tempo e di un inoculo abbondante con semina pura di gonococchi. Alcuni meningococchi metabolizzano lentamente il maltosio e possono richiedere almeno due giorni per l'acidificazione dei sistemi convenzionali; alcuni gonococchi possono metabolizzare lentamente il glucosio. Sono disponibili alcuni sistemi commerciali per il rilievo rapido dell'utilizzazione dei carboidrati.

Enzimi preformati

Il rilievo di aminopeptidasi, gamma-glutamyl transferasi e prolina iminopeptidase associato a β -galattosidasi con substrati cromogeni consente l'identificazione a livello di specie. I reagenti sono disponibili in confezioni commerciali. Questa può rappresentare un'alternativa utile all'approccio precedente, ma deve essere utilizzata con ceppi isolati solo da terreni selettivi, perché alcune *Neisseria* non-patogene producono reazioni simili a quelle di *N. gonorrhoeae*. In Inghilterra e nel Galles sono prevalenti *N. gonorrhoeae* che hanno subito una mutazione nel gene della prolina

iminopeptidase, risultando negative per questo enzima; pertanto, le confezioni che rilevano solo la produzione di aminopeptidasi non devono essere usate in modo esclusivo^{21,22}.

Combinazione carboidrati enzimi preformati

Molte delle confezioni commerciali per le prove di utilizzazione dei carboidrati includono la aminopeptidasi. Le *N. gonorrhoeae* che sono prolina iminopeptidasi negative forniranno risultati anomali con queste confezioni e dovranno essere confermate con reagenti immunologici.

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

Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight (MALDI-TOF) che può essere utilizzato per analizzare la composizione proteica di una cellula batterica, è emerso come una nuova tecnologia per l'identificazione delle specie. Questo metodo ha dimostrato di essere uno strumento potente e rapido per la sua riproducibilità, velocità e sensibilità dell'analisi. Il vantaggio di MALDI-TOF rispetto ad altri metodi di identificazione è che i risultati delle analisi sono disponibili entro poche ore anziché diversi giorni.

Sebbene il problema dello studio del genere *Neisseria* sia complesso, MALDI-TOF è stato sviluppato e validato per determinare le specie clinicamente importanti di *Neisseria* - *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*, entrambe sono relativamente semplici da identificare; le differenze tra molti dei ceppi non patogeni sono scarse e in un contesto diagnostico la speciazione di questi non è sempre possibile⁵³. Mentre non è generalmente richiesta l'identificazione a livello di specie di una *Neisseria* non patogena, l'errata identificazione di questi ceppi come *N. gonorrhoeae* o *N. meningitidis* può avere gravi conseguenze per la salute, legali e sociali⁵⁴.

Gli studi di validazione formale per MALDI-TOF MS per *N. gonorrhoeae* sono limitati⁵³. Pertanto, in situazioni sensibili o critiche, la conferma dell'identificazione delle specie *Neisseria* dovrebbe essere confermata con metodi fenotipici e molecolari^{49,50}.

Conferma molecolare mediante reazione a catena della polimerasi (PCR)

I metodi molecolari sono attualmente i metodi di scelta per il rilevamento di *N. gonorrhoeae* ma possono essere utilizzati anche per la conferma dell'identità degli isolati presunti. Questa operazione può essere eseguita utilizzando test in-house e il pseudogene *porA* e PCR real time con gene *opa*, che può appartenere a una multiplex; questi sono stati riscontrati utili o con test disponibili in commercio. Recenti segnalazioni hanno riscontrato il mancato bersaglio di *N. gonorrhoeae* per lo pseudogene *porA* e pertanto è consigliabile usare questi test in associazione con altri approcci diagnostici^{51,52,55}.

3.5.2 *Neisseria meningitidis*

Per informazioni sullo screening per meningococchi consultare [B 51 - Screening for *Neisseria meningitidis*](#).

Una volta che un isolato è stato identificato con il metodo indicato nella sezione 3, la conferma dell'isolato è eseguita nel modo seguente:

- confezione prove biochimiche. È importante notare che sono stati segnalati un certo numero di meningococchi glucosio e maltosio negativi⁴⁶
- confezione commerciale biochimica rapida
- la caratterizzazione ove è richiesta la definizione a livello di sierogruppo comporta normalmente l'uso di confezione di lattice commerciale o di agglutinazione su vetrino. Le

confezioni di agglutinazione con lattice sono progettate per l'uso diretto su LCR o con siero, ma funzionano anche sulle colture. I sieri per l'agglutinazione su vetrino sono utilizzati solo per le colture. Per ridurre gli aerosol i campioni clinici trattati con calore o sospensioni di colture trattate con formalina dovrebbero essere manipolati in cabine microbiologica di sicurezza

- uso di MLST per caratterizzare *N. meningitidis*

Multi-locus sequence typing (MLST)

La MLST misura direttamente le variazioni di sequenza del DNA in un set di geni strutturali e caratterizza i ceppi tramite i loro profili allelici unici. Il principio di MLST è semplice: la tecnica comporta la 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 differenziazione desiderato. Grazie alla conservazione della sequenza dei geni strutturali, MLST a volte perde il potere discriminante per differenziare i ceppi batterici, ciò ne limita l'uso nelle indagini epidemiologiche. I suoi vantaggi sono che è a risposta univoca e facilmente trasferibile e dati di sequenza possono essere confrontati facilmente tra laboratori e memorizzati in un database centrale facilmente accessibile via Internet.

Questa tecnica è stata utilizzata da Maiden ed altri per caratterizzare le *N. meningitidis* usando sei loci. L'applicazione di MLST ha chiaramente risolto i principali lignaggi del meningococco noto per essere responsabile della malattia invasiva. Per migliorare il livello di potere discriminatorio tra le principali caratteristiche invasive, sono ora utilizzati sette loci e sono stati accettati da molti laboratori come metodo di scelta per la caratterizzazione degli isolati meningococcici.

Differenziazione di *N. meningitidis* di fenotipi simili

N. meningitidis possono essere identificate dalla produzione di acido dal glucosio e maltosio ma non da lattosio e saccarosio, e la produzione di gamma-glutamylaminotransferase. Sono stati descritti ceppi maltosio negativi di *N. meningitidis* e possono essere differenziati da *N. gonorrhoeae* per la loro capacità di produrre gamma-glutamyl aminotransferasi. Possono essere osservate anche varianti di *N. meningitidis* glucosio negative.

3.5.3 Altre specie *Neisseria*

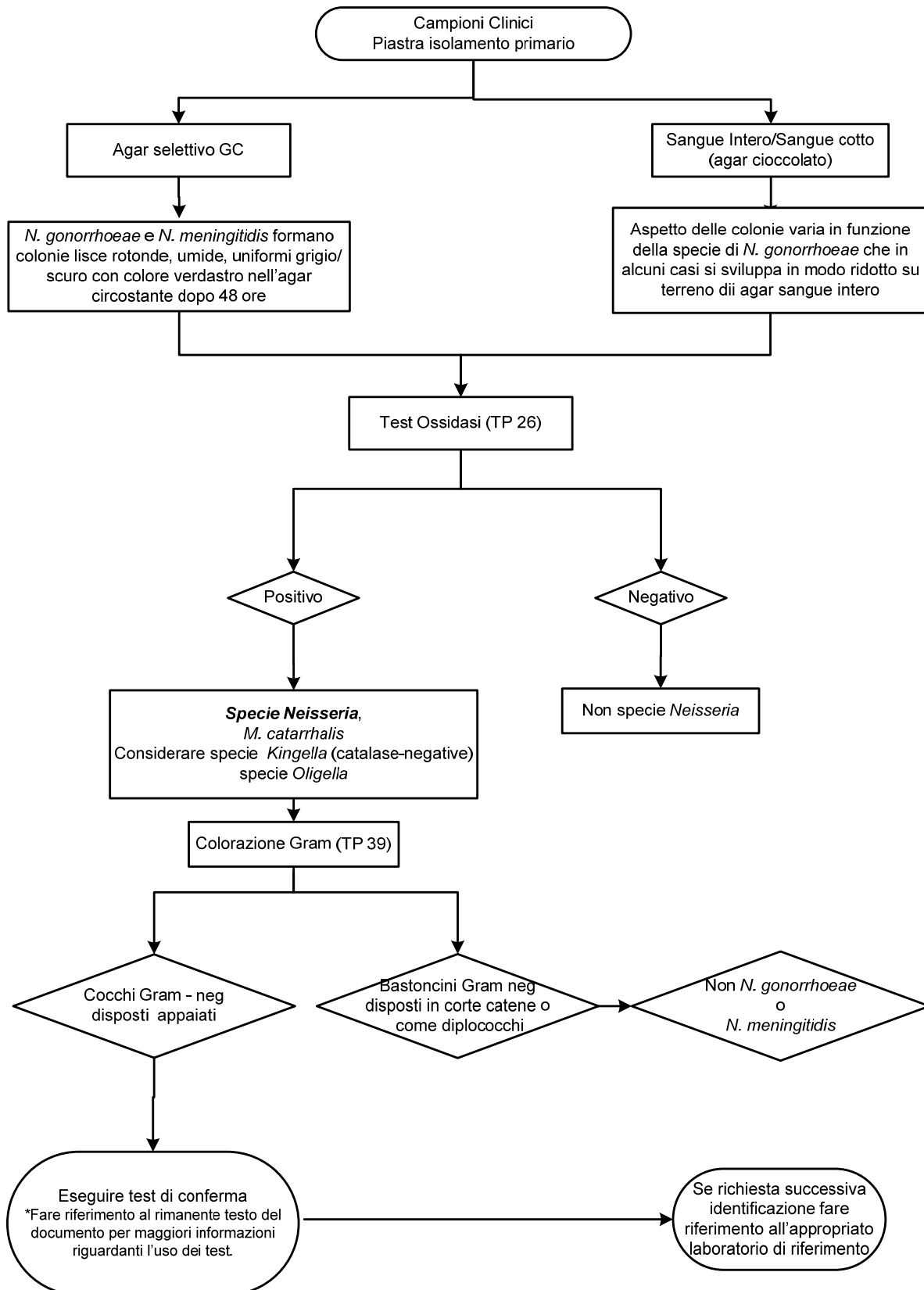
Queste possono essere identificate con l'uso di confezioni disponibili in commercio che sono state validate. L'accuratezza di queste non è stata completamente definita per altre specie diverse da *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* e pertanto tutti i risultati ottenuti devono essere trattati con cautela.

3.6 Conservazione e invio

Stoccaggio a breve termine – gli isolati devono essere mantenuti vitali su becchi di clarino di sangue riscaldato (cioccolato).

Conservazione a lungo termine – gli isolati devono essere congelati da -20°C a -80°C.

4 Identificazione di specie *Neisseria*



Il diagramma di flusso è solo indicativo.

5 Refertazione

5.1 Identificazione preliminare

N. gonorrhoeae

Se rilevate appropriate caratteristiche di crescita, aspetto delle colonie, colorazione Gram della coltura e prova dell'ossidasi.

N. meningitidis

Se sono dimostrate appropriate caratteristiche di crescita, aspetto delle colonie, colorazione Gram della coltura, prova dell'ossidasi e risultati sierologici.

Devono essere soddisfatte almeno quattro condizioni per tutti gli isolati di *Neisseria*:

1. sviluppo su terreni selettivi per le specie patogene di *Neisseria*.

Nota: Se il ceppo di *Neisseria gonorrhoeae* in accertamento è sensibile alla vancomicina non si svilupperà su questo terreno.

- 2 morfologia della colonia appropriata su questo terreno
- 3 presenza della morfologia tipica alla colorazione Gram (diplococchi Gram negativi)
- 4 ossidasi positiva

5.2 Conferma identificazione

Utilizzare i risultati delle procedure di identificazione biochimica/immunologica/molecolare come specificato in questo documento (usando 2 o 3 test di conferma) e/o il referto del Laboratorio di Riferimento.

5.3 Medico microbiologo

Informare il medico microbiologo di tutti gli isolamenti presunti o confermati di *N. meningitidis* e di tutte le specie *Neisseria* isolate da sedi normalmente sterili o da casi di infezione invasiva.

Il medico microbiologo deve essere informato se il documento di richiesta contiene informazioni quali:

- casi di meningite, setticemia (specialmente con esantema color porpora)
- ricerche di *N. meningitidis* in corso di epidemia o per stato di portatore

Informare il medico microbiologo di tutti gli isolamenti presunti o confermati di *N. gonorrhoeae*, e di tutte le *Neisseria* da campioni di:

- minori
- casi di violenza sessuale, stupro o abuso
- tutte le persone non in cura presso una Genitourinary Medicine clinic
- sedi extragenitali (es. gola, anorettale, per la particolare attenzione richiesta nelle procedure di identificazione)

Fare riferimento ai protocolli locali per la refertazione al clinico.

5.4 CCDC

Fare riferimento al Memorandum locale di Informazione

E' responsabilità legale del clinico informare il laboratorio che riceverà i campioni e allo stesso modo di tutti i laboratori diagnostici, notificare tutti gli isolati clinicamente significativi per garantire l'inizio urgente di procedure corrette

5.5 Public Health England³³

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

5.6 Gruppo Controllo Infezione

Informare il gruppo di controllo delle infezioni degli isolati sospetti e confermati di *N. meningitidis*

6 Invii

6.1 Laboratorio di Riferimento

Contattare gli appropriati laboratori di riferimento designati per informazioni sugli accertamenti disponibili, tempi di risposta, procedure di trasporto ed altre informazioni riguardanti l'invio di campioni

Sexually Transmitted Bacteria Reference Laboratory
Microbiology Services
Public Health England
61 Colindale Avenue
London
NW9 5EQ
Tel. +44 (0) 20 8327 6464
<https://www.gov.uk/stbru-reference-and-diagnostic-services>

Meningococcal Reference Unit (MRU)
Manchester Medical Microbiology Partnership
PO Box 209
Clinical Sciences Building 2
Manchester Royal Infirmary
Oxford Road
MANCHESTER
M13 9WZ
Tel. +44 (0) 0161 276 6757

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

Inghilterra e Galles

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

Scozia

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

Irlanda del Nord

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

7 Notifica al PHE⁴⁷⁻⁵⁷⁻ o Equivalente⁵⁸⁻⁶¹⁻

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'.

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

Esistono accordi diversi in [Scotland](#)^{58,59}, [Wales](#)⁶⁰ e [Northern Ireland](#)⁶¹.

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

Collaboratori: Roberto Rossetti, già Primario del Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Civile di Pistoia ASL 3
Monica Raggi, Dirigente di primo livello del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori di Monza
I testi originali e le traduzioni sono disponibili sul Web APSI - www.apsi.it - Webmaster Sergio Malandrini, Dirigente di primo livello del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori di Monza

Bibliografia

1. Euzeby,JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Neisseria*. 2013.
2. Tonjum T. Genus I. *Neisseria*. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Garrity GM: New York: Springer-Verlag; 2005. p. 777-98.
3. Knapp JS. Historical perspectives and identification of *Neisseria* and related species. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:415-31.
4. Holt JG. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. In: Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST, editors. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994. p. 34-540.
5. Han XY, Hong T, Falsen E. *Neisseria bacilliformis* sp. nov. isolated from human infections. *J Clin Microbiol* 2006;44:474-9.
6. Andersen BM, Steigerwalt AG, O'Connor SP, Hollis DG, Weyant RS, Weaver RE, et al. *Neisseria weaveri* sp. nov., formerly CDC group M-5, a gram-negative bacterium associated with dog bite wounds. *J Clin Microbiol* 1993;31:2456-66.
7. Kochi CV, Guibourdenche M, Lemeland JF, Riou JY. *Neisseria cinerea*, a bacterium whose bacteriological identification is difficult. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:647-50.
8. Bovre K, Holten E. *Neisseria elongata* sp.nov., a rod-shaped member of the genus *Neisseria*. Re-evaluation of cell shape as a criterion in classification. *J Gen Microbiol* 1970;60:67-75.
9. Grant PE, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Hollis DG, Weaver RE. *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens* subsp. nov., formerly CDC group M-6, a gram-negative bacterium associated with endocarditis. *J Clin Microbiol* 1990;28:2591-6.
10. Apisarnthanarak A, Dunagan WC, Dunne WM. *Neisseria elongata* subsp. *elongata*, as a cause of human endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;39:265-6.
11. Henriksen SD, Holten E. *Neisseria elongata* subsp. *glycolytica* subsp.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1976;26:478-81.
12. Hombrouck-Alet C, Poilane I, Janoir-Jouvessomme C, Fain O, Cruaud P, Thomas M, et al. Utilization of 16S ribosomal DNA sequencing for diagnosis of septicemia due to *Neisseria elongata* subsp. *glycolytica* in a neutropenic patient. *J Clin Microbiol* 2003;41:3436-7.
13. Andersen BM, Weyant RS, Steigerwalt AG, Moss CW, Hollis DG, Weaver RE, et al. Characterization of *Neisseria elongata* subsp. *glycolytica* isolates obtained from human wound specimens and blood cultures. *J Clin Microbiol* 1995;33:76-8.
14. Querido NB, De Araujo WC. Selective isolation of *Neisseria sicca* from the human oral cavity on eosin methylene blue agar. *Appl Environ Microbiol* 1976;31:612-4.
15. Carpenter CM. Isolation of *Neisseria flava* from the Genitourinary Tract of Three Patients. *Am J Public Health Nations Health* 1943;33:135-6.
16. Veron M, Lenvoise-Furet A, Coustere C, Ged C, Grimont F. Relatedness of three species of "false neisseriae," *Neisseria caviae*, *Neisseria cuniculi*, and *Neisseria ovis*, by DNA-DNA hybridizations and fatty acid analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:210-20.
17. Wolfgang WJ, Passaretti TV, Jose R, Cole J, Coorevits A, Carpenter AN, et al. *Neisseria oralis* sp. nov., isolated from healthy gingival plaque and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:1323-8.

18. Wolfgang WJ, Carpenter AN, Cole JA, Gronow S, Habura A, Jose S, et al. *Neisseria wadsworthii* sp. nov. and *Neisseria shayeganii* sp. nov., isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61:91-8.
19. Vandamme P, Holmes B, Bercovier H, Coenye T. Classification of Centers for Disease Control Group Eugonic Fermenter (EF)-4a and EF-4b as *Neisseria animaloris* sp. nov. and *Neisseria zoodegmatis* sp. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:1801-5.
20. Heydecke A, Andersson B, Holmdahl T, Melhus A. Human wound infections caused by *Neisseria animaloris* and *Neisseria zoodegmatis*, former CDC Group EF-4a and EF-4b. *Infect Ecol Epidemiol* 2013;3.
21. Alexander S, Ison C. Evaluation of commercial kits for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Med Microbiol* 2005;54:827-31.
22. Alexander S, Martin IM, Fenton K, Ison CA. The prevalence of proline iminopeptidase negative *Neisseria gonorrhoeae* throughout England and Wales. *Sex Transm Infect* 2006;82:280-2.
23. 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".
24. 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.
25. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
26. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
27. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
28. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
29. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
30. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
31. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
32. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological Agents: Managing the Risks in Laboratories and Healthcare Premises. Appendix 1.2 Transport of Infectious Substances - Revision. Health and Safety Executive. 2008.
33. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. *MMWR Surveill Summ* 2012;61:1-102.
34. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed. HSE Books; 2002.

35. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
36. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
37. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
38. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
39. British Standards Institution (BSI). BS 5726:2005 - Microbiological safety cabinets. Information to be supplied by the purchaser and to the vendor and to the installer, and siting and use of cabinets. Recommendations and guidance. 24-3-2005. p. 1-14
40. Sejvar JJ, Johnson D, Popovic T, Miller JM, Downes F, Somsel P, et al. Assessing the risk of laboratory-acquired meningococcal disease. *J Clin Microbiol* 2005;43:4811-4.
41. Bhatti AR, DiNinno VL, Ashton FE, White LA. A laboratory-acquired infection with *Neisseria meningitidis*. *J Infect* 1982;4:247-52.
42. Tronel H, Chaudemanche H, Pechier N, Doutrelant L, Hoen B. Endocarditis due to *Neisseria mucosa* after tongue piercing. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:275-6.
43. Wakui D, Nagashima G, Otsuka Y, Takada T, Ueda T, Tanaka Y, et al. A case of meningitis due to *Neisseria subflava* after ventriculostomy. *J Infect Chemother* 2012;18:115-8.
44. Ison CA. Laboratory methods in genitourinary medicine - Methods of diagnosing gonorrhoea. *Genitourin Med* 1990;453-9.
45. Bignell C, Ison CA, Jungmann E. Gonorrhoea. *Sex Transm Infect* 2006;82 Suppl 4:iv6-iv9.
46. D'Amato RF, Eriquez LA, Tomfohrde KM, Singerman E. Rapid identification of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* by using enzymatic profiles. *J Clin Microbiol* 1978;7:77-81.
47. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.
48. Royal College of Pathologists. Guidelines for handling medicolegal specimens and preserving the chain of evidence. 2008.
49. British Association for Sexual Health and HIV. UK National Guidelines on the Management of Adult and Adolescent Complainants of Sexual Assault. 2011.
50. British Association for Sexual Health and HIV. UK National Guideline for the Management of Gonorrhoea in Adults. 2011.
51. Ison CA, Golparian D, Saunders P, Chisholm S, Unemo M. Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: false negative gonococcal porA mutants are spreading internationally. *Sex Transm Infect* 2013;89:197-201.
52. Whiley DM, Sloots TP. Comparison of three in-house multiplex PCR assays for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* using real-time and conventional detection methodologies. *Pathology* 2005;37:364-70.

53. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:547-603.
54. Iliina EN, Borovskaya AD, Malakhova MM, Vereshchagin VA, Kubanova AA, Kruglov AN, et al. Direct Bacterial Profiling by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Identification of Pathogenic *Neisseria*. *Journal of Molecular diagnostics* 2009;11:75-86.
55. Tabrizi SN, Chen S, Tapsall J, Garland SM. Evaluation of opa-based real-time PCR for detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis* 2005;32:199-202.
56. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3140-5.
57. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
58. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
59. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
60. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
61. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).