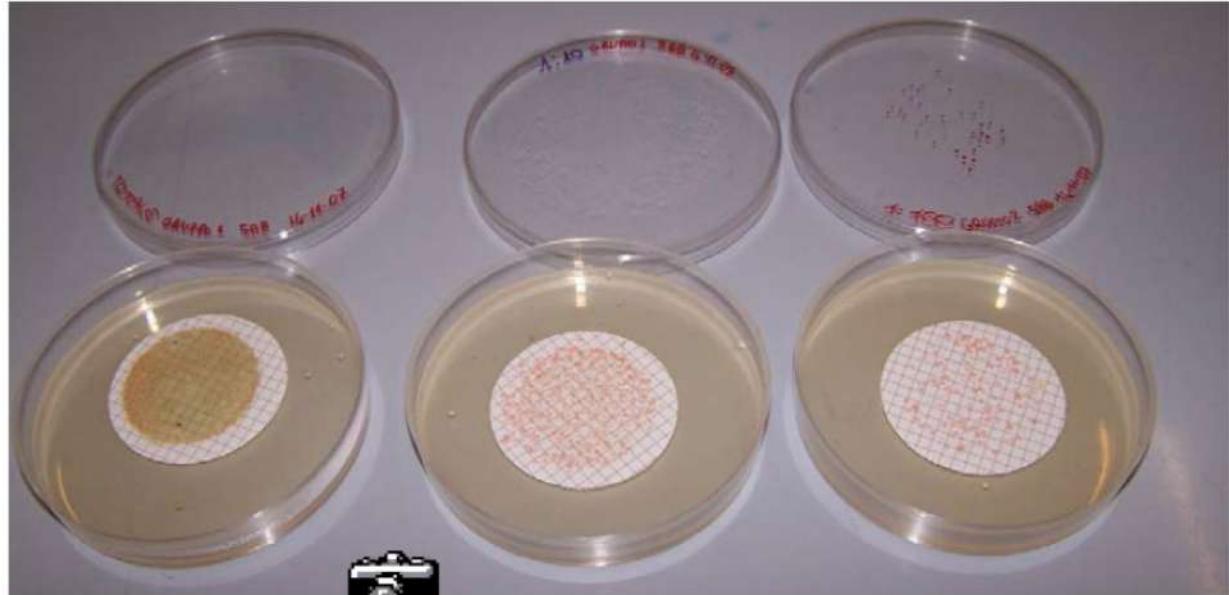
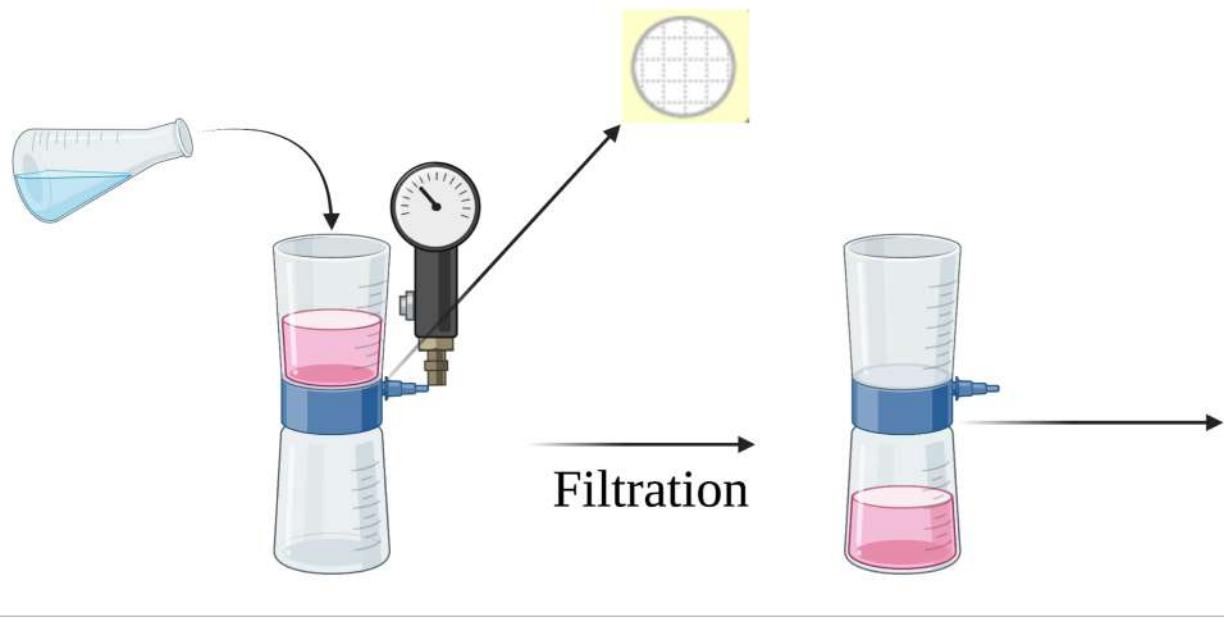
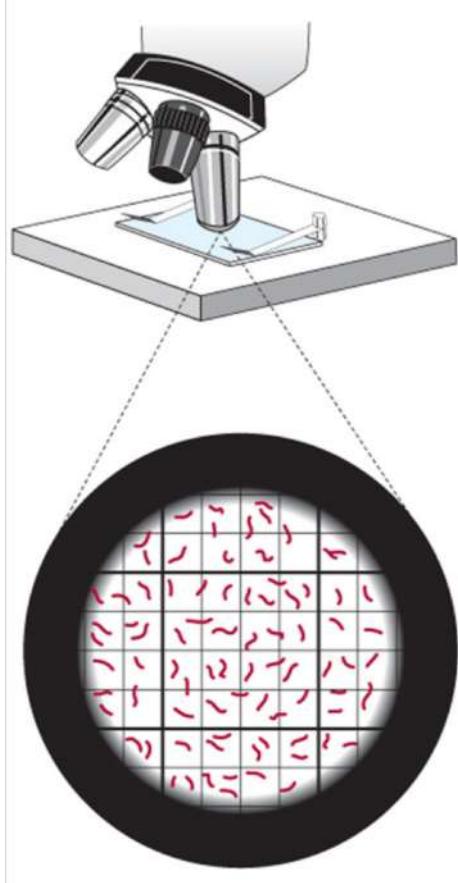


Enumerazione per filtrazione su membrana



Metodi di conta diretti: le camere di conta

Conta diretta con microscopio delle cellule contenute in un volume noto di campione, attraverso l'impiego di CAMERE DI CONTA (camera di Thoma o di Burker o Neubauer)



Risultato (se D=1): $3,2 \times 10^6$ cellule/ml

1. ci sono 70 cellule in 56 quadratini: $N = 0,8$ cellule/ quadratino
2. ogni quadratino corrisponde ad un volume 0.00025 mm^3 ($1/4000$)
3. il numero di cellule per cm^3 o ml è dato da:
$$D \cdot 4000 \cdot 1000 \cdot N$$
 dove D è il fattore di diluizione e 1000 il fattore per convertire mm^3 in cm^3

Metodi di conta diretti: le camere di conta

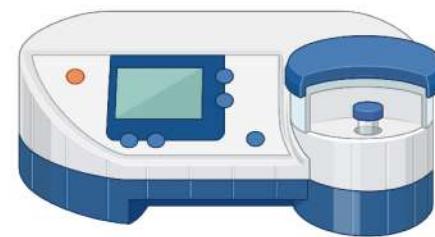
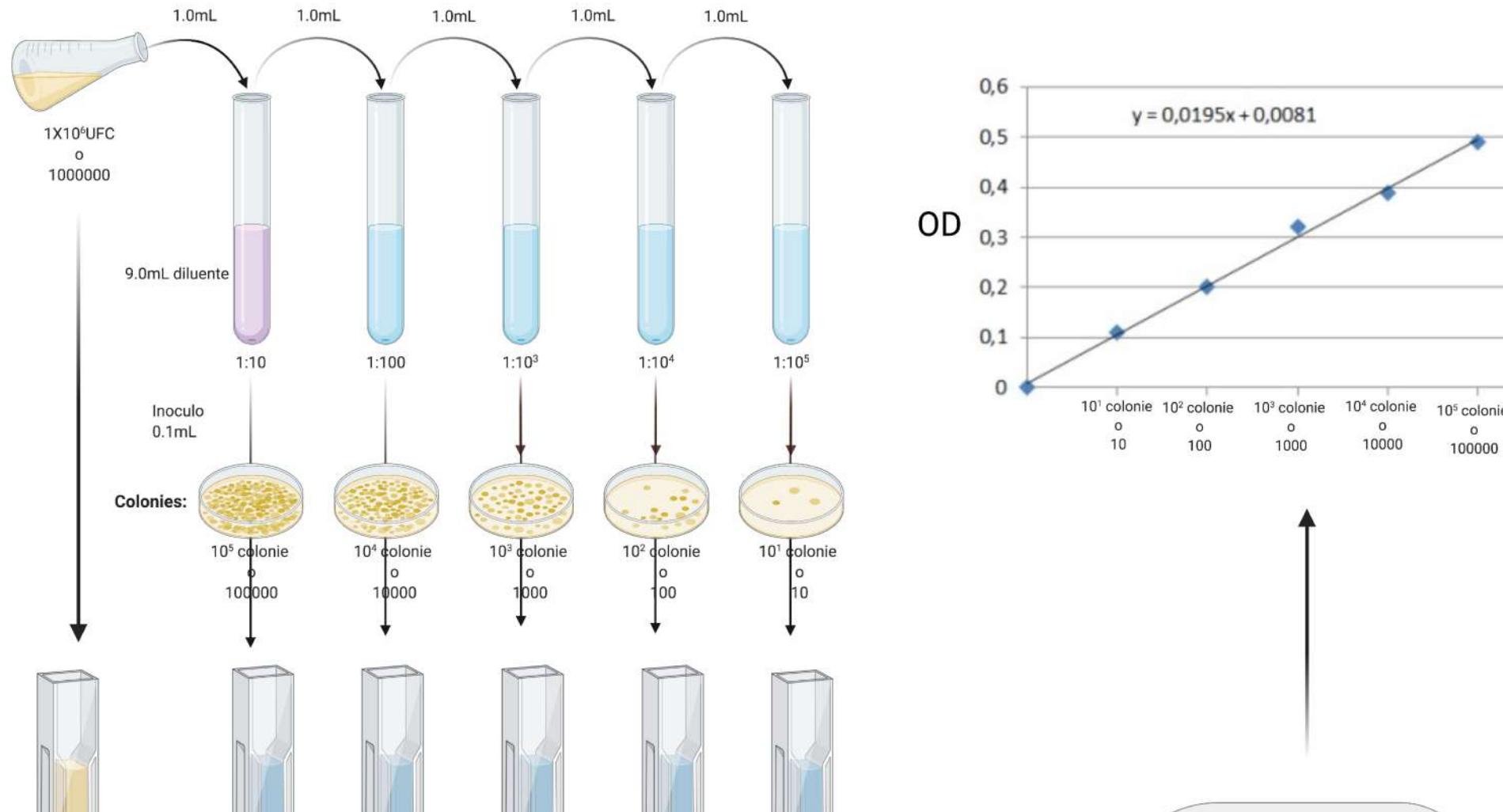
Vantaggi.

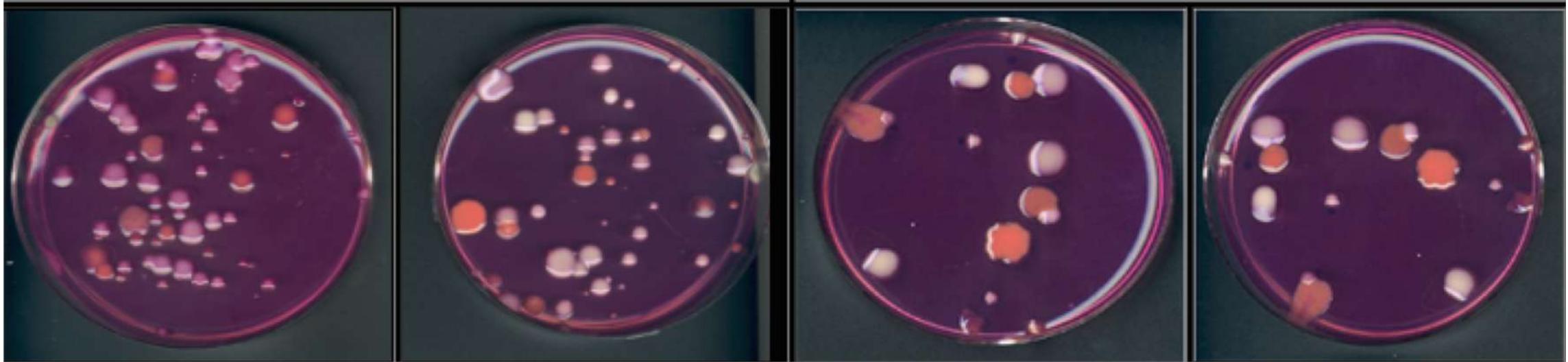
- è un metodo rapido e poco costoso

Svantaggi.

- è un metodo poco sensibile
- non è possibile distinguere cellule vive da cellule morte
- l'affaticamento degli operatori può causare errori
- è difficile da automatizzare
- è praticamente impossibile contare selettivamente determinati gruppi di microrganismi

Enumerazione tramite la misurazione della densità ottica





Tecniche di identificazione dei microrganismi

Conteggi (UFC/ml o gr) su terreni di crescita selettivi e non selettivi

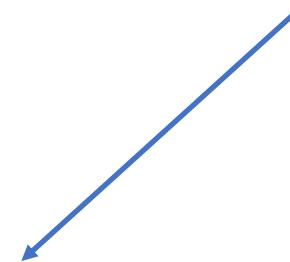
↓
Isolamento in purezza

Saggio catalasi
String test (KOH)



Colorazione di Gram

Arricchimenti selettivi ed isolamenti selettivi



Colonia pura da identificare



Osservazione al Microscopio

Altri test di identificazione su base metabolica/fenotipica:
- motilità, emolisi, coagulasi
- consumo di determinati substrati (zuccheri, proteine)

Tecniche di caratterizzazione e identificazione dei microrganismi

DILUIZIONI SERIALI DECIMALI

STRISCI SUCCESSIVI

OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO

COLORAZIONE DI GRAM

CATALASI, OSSIDASI, EMOLISI, COAGULASI, MOTILITÀ

PRODUZIONE METABOLITI BIOATTIVI

CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE



Confermare l'identità di un isolato

1. Dopo l'isolamento da piastre di conta o per arricchimento
2. Dopo screening rapidi (KOH, catalasi) ed osservazione al microscopio

Possono essere necessari ulteriori test per arrivare ad una identificazione effettiva del microrganismo, in particolare nel caso di ricerca di patogeni negli alimenti.

Ad esempio:

Table 1 — Confirmation tests for *L. monocytogenes*

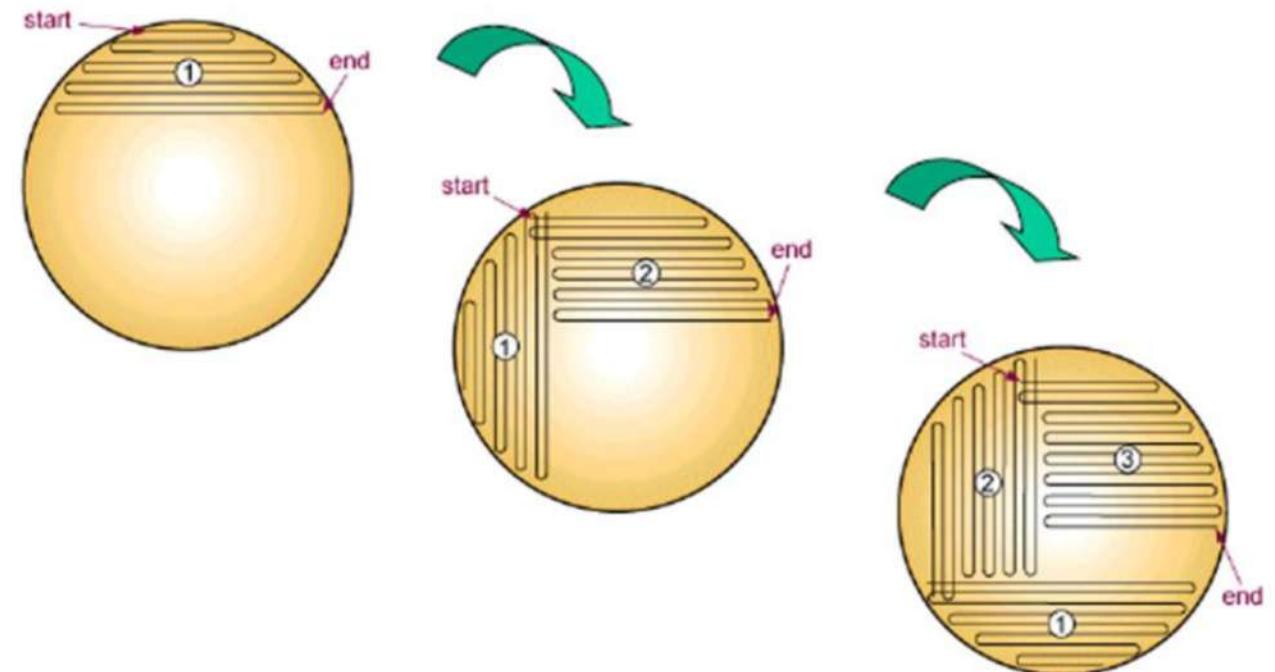
Tests	<i>L. monocytogenes</i> confirmation tests	Results
Mandatory	Microscopic aspect ^a (9.5.2.4) Beta-haemolysis (9.5.2.5) L-Rhamnose (9.5.2.7) D-Xylose (9.5.2.7)	Slim short rods or coccobacilli + + -
Optional	Catalase (9.5.2.2) Motility at 25°C (9.5.2.3) CAMP test (9.5.2.5)	+ + +

^a Microscopic aspect is optional for Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti and for the second medium if it allows distinction between pathogenic and non-pathogenic *Listeria* spp.

Coltura pura

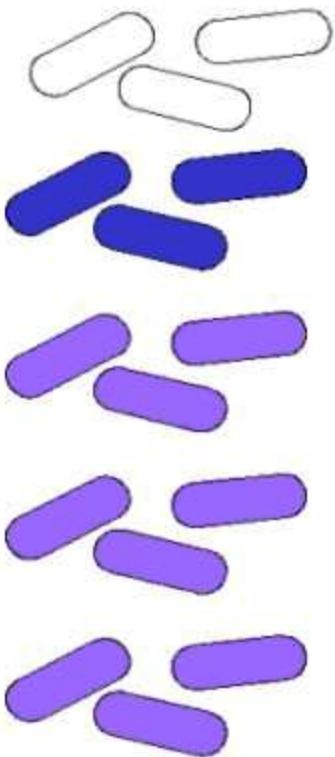
Qualsiasi microrganismo che cresce dando origine a colonie visibili su un terreno nutritivo, sia selettivo che non, prima di essere identificato a livello di specie deve essere isolato in coltura pura.

Colture pure possono essere ottenute mediante la tecnica dello striscio su piastre contenenti un adatto terreno nutritivo non selettivo. Vicino alla fiamma di un becco bunsen, aprire il coperchio della piastra quel tanto necessario ad inserire l'ansa batteriologica per prelevare una colonia isolata da isolare in coltura pura. L'obiettivo dello striscio in piastra è di ottenere colonie isolate su una larga parte della superficie del terreno nutritivo in piastra



Colorazione di Gram

Gram positivi



processo
di fissazione
chimica

Fissazione al calore

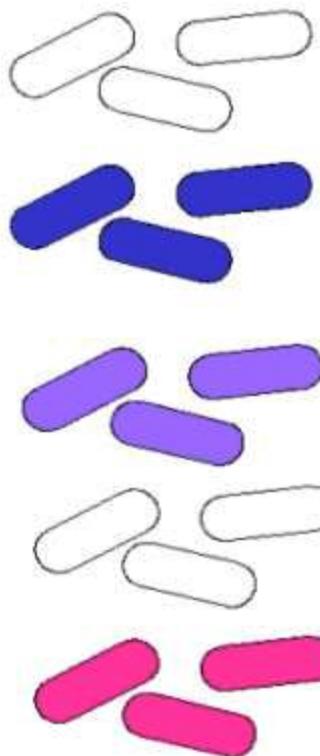
Cristal violetto

Trattamento con iodio

Decolorazione

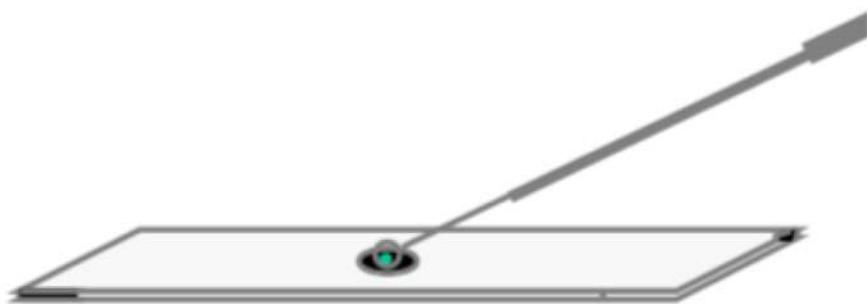
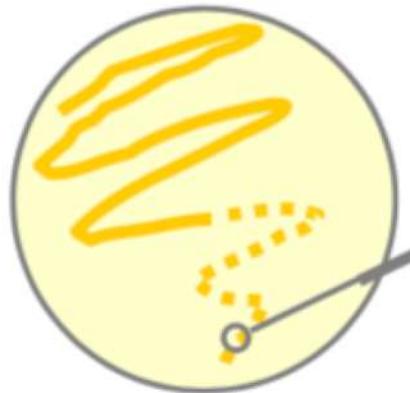
Colorante di contrasto
(safranina)

Gram negativi



Il cristal-violetto è carico positivamente (si lega alle cellule che sono negative) Lo iodio è un mordenzante, forma dei cristalli con il cristal-violetto. Serve a fissare il colorante. Quando si decolora con una soluzione di alcool/acetone: cellule G+ (hanno circa 90% di peptidoglicano): le maglie del peptidoglicano si stringono e il colorante resta intrappolato -cellule G- (hanno circa 10% di peptidoglicano): la membrana esterna (lipidica) viene sciolta dal decolorante e quando si sciacqua con acqua, il colorante viene lavato via L'applicazione del colorante di contrasto (rosso safranina), porta le cellule **G- a colorarsi di rosso**, mentre **le G+ restano viola**.

MICROSCOPE OBSERVATION



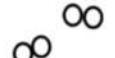
cocchi



streptococchi



stafilococchi



diplococchi



bastianelli



vibroni



spirilli

Saggio della catalasi

Molti microrganismi possiedono l'enzima catalasi e sono in grado di scindere l' H_2O_2 nel seguente modo: $2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{catalasi} = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

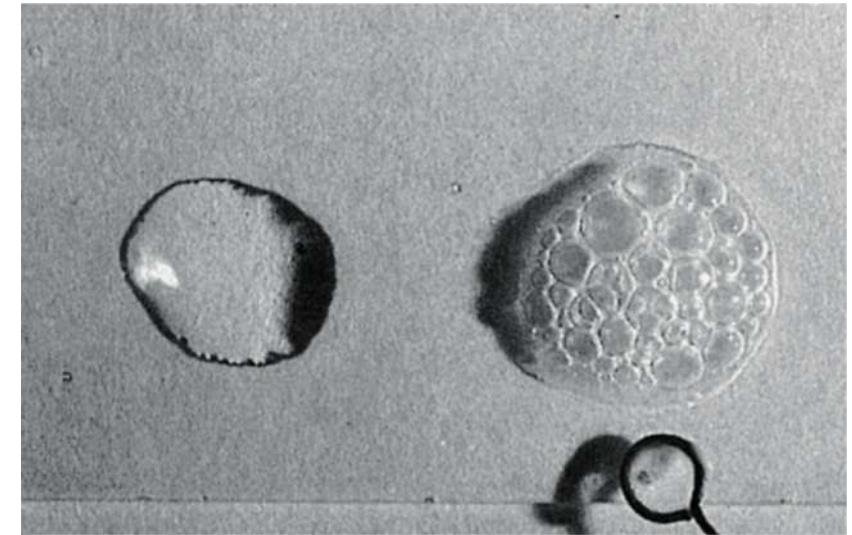
- pulire e sgrassare un vetrino portaoggetti;
- depositare sul vetrino una goccia di H_2O_2 al 3%;
- stemperare il materiale microbico nella goccia di H_2O_2 .

Lettura e interpretazione dei risultati

La positività del saggio è evidenziata dalla formazione di un'effervescenza dovuta alla liberazione di ossigeno che indica la presenza della catalasi nella coltura saggiata.

I batteri catalasi positivi comprendono aerobi obbligati e anaerobi facoltativi, i quali hanno la capacità di utilizzare l'ossigeno come un accettore finale di elettroni.

I batteri catalasi negativi possono essere anaerobi obbligati o anaerobi facoltativi che fermentano non utilizzando ossigeno come accettore finale di elettroni (es. Streptococchi).



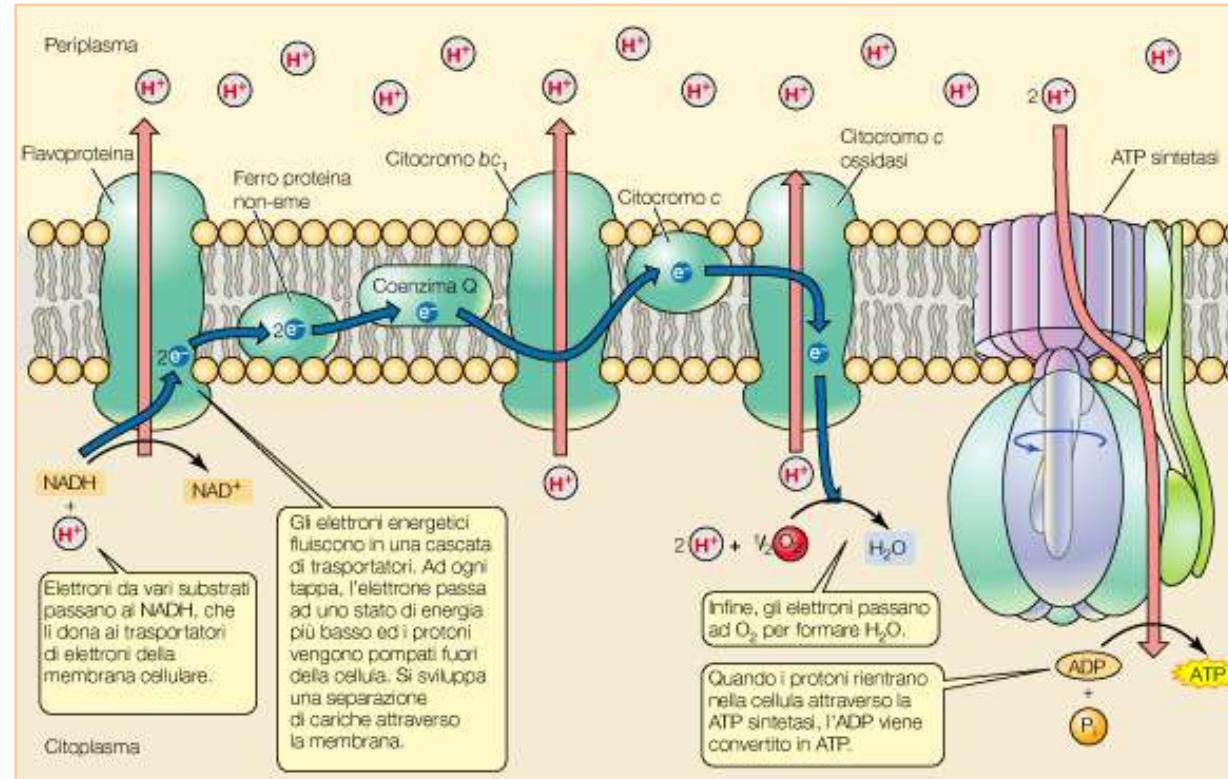
Test dell'ossidasi

Principio:

È un test che serve a rilevare la presenza dell'enzima citocromo c ossidasi nei batteri. Questo enzima fa parte della catena respiratoria e partecipa al trasferimento di elettroni all'ossigeno, permettendo la respirazione aerobica.

I batteri con metabolismo aerobico hanno un sistema di membrana per il trasporto degli elettroni simile a quello dei mitocondri (Eucarioti).

Questa catena di trasporto contiene un enzima di membrana per il trasporto degli elettroni chiamato citocromo C ossidasi.



Test dell'ossidasi

SCOPO DEL TEST

Distinguere batteri **ossidasi positivi** (es. *Pseudomonas*, *Neisseria*) da quelli **ossidasi negativi** (es. *Enterobacteriaceae* come *E. coli*).

Aiuta nell'identificazione di **gram negativi non fermentanti**.

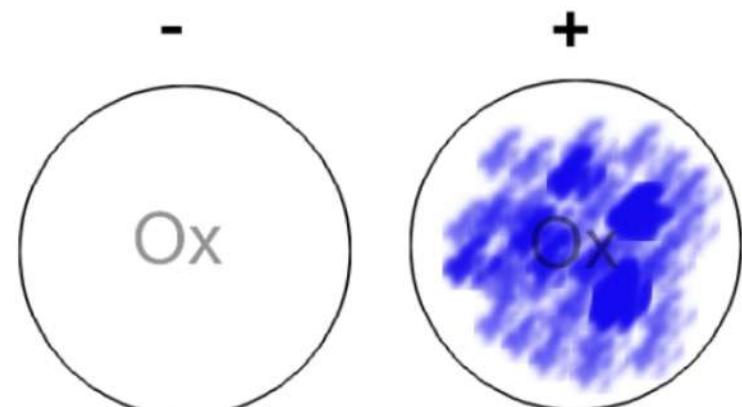
PROCEDURA Si prende una **striscia di carta assorbente** impregnata con un reagente (es. **reagente di Kovács**: tetrametil-p-fenilendiammina).

Si deposita una **colonia batterica fresca** sulla carta usando un bastoncino sterile

Si osserva la **comparsa del colore blu/viola** entro 10-30 secondi.

PRINCIPIO

l'*N,N*-dimetil-p-fenilendiamina ossalato (**INDICATORE**), cede elettroni alla citocromo ossidasi e ossidandosi forma un composto di colore blu scuro (indofenolo).



Saggio dell'emolisi

Il saggio dell'emolisi è molto importante in microbiologia clinica e diagnostica perché fornisce informazioni fondamentali sulla capacità patogena di un microrganismo e aiuta nell'identificazione di batteri Gram-positivi, in particolare quelli del genere *Streptococcus* e *Staphylococcus*.

rottura dei globuli rossi (eritrociti), con rilascio dell'**emoglobina** nel mezzo circostante.

Verificare se un batterio è capace di produrre **emolisine** (tossine che distruggono i globuli rossi)

Si semina il batterio su una **piastra di agar sangue**.

Si incuba la piastra a 35-37°C per 24-48 ore.

Si osserva l'aspetto della **zona attorno alla colonia**.

Emolisi su Agar-sangue



α emolisi: la colonia è circondata da una zona di eritrociti intatti ma decolorati, di colore verdognolo. Questo aspetto è generalmente dovuto all'azione dei perossidi prodotti dai batteri. E' caratteristica di *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus viridans*.

β emolisi: è la completa rottura dell'emoglobina dei globuli rossi nelle vicinanze della colonia batterica. Attorno alla colonia compare un alone trasparente. E' caratteristica di *Streptococcus pyogenes* e di alcuni ceppi di *Staphylococcus aureus*.

γ emolisi: è l'assenza di emolisi nell'area attorno alla colonia. La piastra di agar sangue con gamma emolisi appare brunastra. Questa è la normale reazione del sangue alle condizioni di crescita utilizzate 37° C in presenza di anidride carbonica. E' caratteristica di *Enterococcus faecalis*.

Test della Coagulasi

Scopo: discriminare *Staphylococcus aureus* (cocco coagulasi positivo) da stafilococchi negativo alla coagulasi ed in generale da cocchi Coagulasi Negativi (CCN).

Coagulasi: enzima prodotto che converte il fibrinogeno (fattore di coagulazione del sangue) solubile nel plasma in fibrina, che è invece insolubile.

Due tipologie di coagulasi in *S. aureus*:

Coagulasi legata (fattore di aggregazione): legata alla parete cellulare batterica e reagisce direttamente con il fibrinogeno, che quindi precipita sulla cellula stafilococcica. Quando una sospensione di cellule batterica con fattore di aggregazione viene miscelata con il plasma queste si raggruppano

Coagulasi libera: comporta l'attivazione del fattore di reazione della coagulasi plasmatica (CRP), che è una molecola modificata o derivata da un complesso di coagulasi-CRP. Questo complesso a sua volta reagisce con il fibrinogeno per produrre il coagulo di fibrina.

Test della Coagulasi: agglutinazione su vetrino

Identificazione della **Coagulasi legata (fattore di aggregazione)**

1. Emulsionare una colonia stafilococcica in una goccia d'acqua su un vetrino pulito e privo di grasso con un minimo di diffusione (se l'isolato non forma una sospensione liscia e lattiginosa, non procedere con il test);
2. Effettuare sospensioni simili di controllo dei ceppi positivi e negativi per confermare la corretta reattività del plasma;
3. Immergere un inoculo dritto fiammato e raffreddato nel plasma non diluito a temperatura ambiente, estrarre e mescolare le tracce aderenti del plasma nella sospensione stafilococcica sul vetrino;

Positivo= ammasso grossolano di cocchi visibili ad occhio nudo entro 1 minuto.

Negativo= assenza di formazione di grumi o qualsiasi reazione che richieda più di 1 minuto per svilupparsi.

Riesaminare tutti i ceppi a reazione lenta mediante il test della coagulasi in provetta



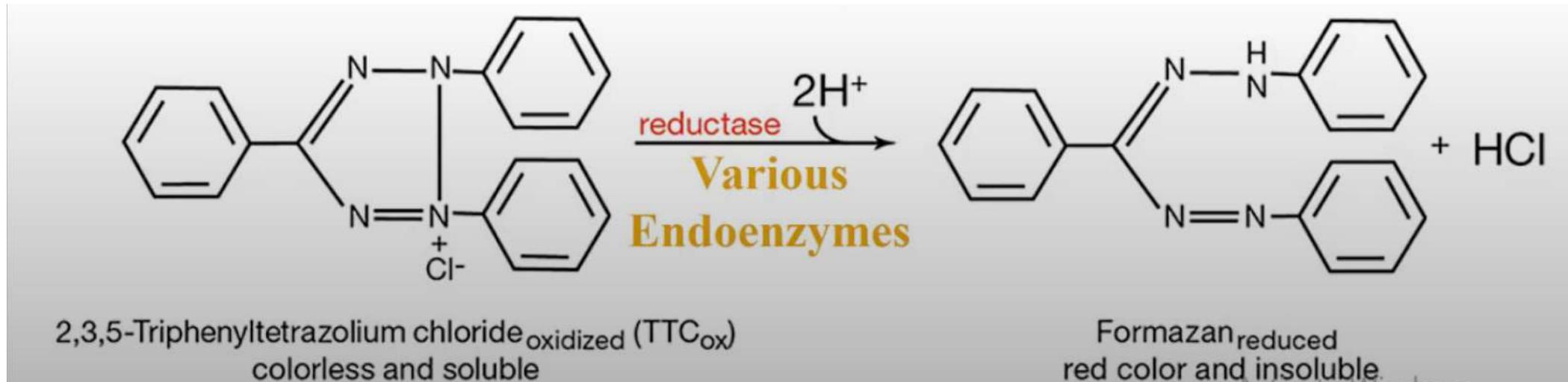
Test della motilità

Scopo: determinare se i batteri presentano motilità o no

Motilità: movimento dei batteri tramite flagelli

Il test si esegue in tubi riempiti di terreno di coltura agarizzato contenenti:

- Bassa percentuale di Agar: **0,4 % p/v**
- Fattori di crescita generici (estratto di carne, peptone)
- *Triphenyl tetrazolium chloride* (denominato TTC): sale utilizzato in microbiologia come indicatore di attività metabolica (indicatore che vira in presenza di reazioni di ossido-riduzione); in questo saggio serve per capire dove il batterio sta crescendo all'interno del *soft agar*.



Test della motilità

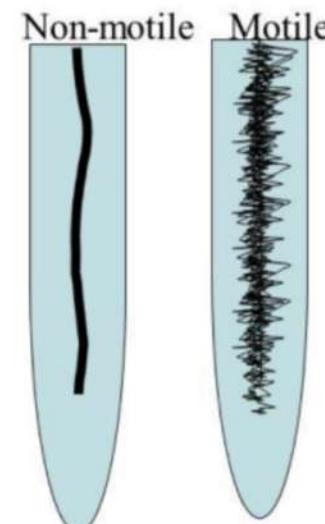
Scopo: determinare se i batteri presentano motilità o no

Motilità: movimento dei batteri tramite flagelli

Modalità:

Una coltura ben cresciuta del microrganismo da testare viene seminata per infissione dentro il soft-agar in tubo e lasciato crescere per tempi e temperature ottimali.

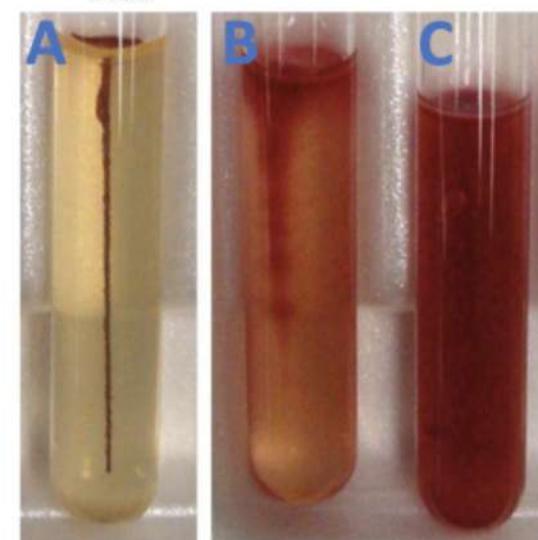
Lo spazio di crescita nell'intorno dell'infissione, marcato dal viraggio dell'indicatore TTC, determinerà l'eventuale motilità del microrganismo testato.



Motility test medium using tetrazolium salt (TTC)

Not

Motile



Tube A = *Staph. aureus*

Tube B = *Pseudomonas aeruginosa*

Tube C = *E. coli*

ATTIVITA' PROTEOLITICA

Le proteasi batteriche sono in genere extracellulari e prodotte quando generalmente la cellula è in fase di crescita. Sono enzimi che vengono stabilizzati dalla presenza degli ioni Ca in grado di idrolizzare tutte le frazioni delle caseina. Molte proteasi sono termostabili.



Biochemical Assay

The biochemical assay allow to evaluate: fermentation, metabolic activities or presence of specific enzymes

Miniaturized systems based on a series of microtubes containing dehydrated medium that are inoculated with a microbial suspension.

The reactions produced after incubation involved a medium color changes, optionally following by the addition of reagents. Positive or negative reactions are codified in number.

The numerical profile allows the identification of the species through comparison with an identification software.



API GALLERY

The well-established method for manual microorganism identification to the species level, bioMérieux's API identification products are test kits for identification of Gram positive and Gram negative bacteria and yeast.

TESTS	SUBSTRATI	Q.TA'	REAZIONI/ENZIMI	RISULTATI	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	orto-nitro-fenil-β-D-galattopyranoside (ONPG) isopropiltiogalattopyranoside (IPTG)	0,23 mg 7,6 µg	beta-galattosidasi	incolore	giallo (1)
ADH	arginina	1,9 mg	arginina deidrolasi	giallo	rosso / arancio (2)
LDC	lisina	1,9 mg	lisina decarbossilasi	giallo	rosso / arancio (2)
OOG	ornitina	1,9 mg	ornitina decarbrossilasi	giallo	rosso / arancio (2)
CIT	citato di sodio	0,83 mg	utilizzazione del citato	verde chiaro / giallo	blu-verde / blu (3)
H2S	tiosolfato di sodio	76,0 µg	produzione di H2S	incolore / grigiestro	deposito nero / orlo sottile
URE	urea	0,76 mg	ureasi	giallo	rosso / arancio (2)
TDA	triplofano	0,38 mg	triplofano deaminasi	TDA / immediato	
				giallo	marrone-rossastro
IND	triplofano	0,19 mg	produzione di indolo	JAMES / immediato	
				incolore verde chiaro / giallo	rosa
VP	creatina piruvato di sodio	0,38 mg 1,9 mg	produzione di acetoina	VP 1 + VP 2 / 10 min.	
				incolore	rosa / rosso (5)
GEL	gelatina di Kohn	0,17 mg	gelatinasi	non diffusione	diffusione del pigmento nero
GLU	glucosio	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo / giallo grigio
MAN	mannitolio	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
INO	inositolio	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
SOR	sorbitolo	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
RHA	ramnosio	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
SAC	saccarosio	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
MEL	melibiosio	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
AMY	amigdalina	0,57 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
ARA	arabinosio	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo

positive for all the tests



negative for all the tests

