

I Funghi:

Rilevanza in ambito medico trascurata fino a tempi recenti. Negli ultimi 30 anni hanno acquisito importanza in seguito all'aumento di pazienti immunocompromessi dovuti all'epidemia di HIV e all'aumento dei trapianti.

L'infezione fungina per eccellenza che indica lo stato di immunocompromissione è l'infezione da **candida albicans**, lievito che si trova normalmente su cute e mucose che può dare patologia se prolifera eccessivamente e si rompe l'equilibrio con la flora normale.

Il punto cruciale del medico non è la terapia ma fare diagnosi.

Se nel soggetto adulto si presenta il mugugno nel cavo orale (che di solito si presenta nel neonato, soprattutto prematuro) esso è indice di immunocompromissione, potrebbe essere AIDS, ovvero la patologia che deriva dall'infezione da HIV dopo che il numero di linfociti CD4+ scende sotto i 200 mm³.

I miceti in passato causavano tutt'al più infezioni cutanee e superficiali, con la comparsa delle categorie di pazienti immunocompromessi si è iniziato ad osservare anche infezioni sistemiche.

I miceti sono sempre stati parte della vita di tutti i giorni, ad esempio **S. Cerevisiae** consente la lievitazione del pane e la produzione di alcolici.

P. Infestans causò una carestia in Irlanda nel 1845 che causò la morte di milioni di persone.

Fleming nella ricerca sugli **S. aureus** osservò che sulle piastre contaminate da muffa rimaneva un alone attorno alla muffa nel quale non era cresciuto il batterio. Da lì isolò la penicillina.

Il mugugno fu descritto da Ippocrate, il kerion da Celso.

I miceti sono organismi eucarioti, chemiosintetici, eterotrofi che si distinguono in due categorie:

- Lieviti (unicellulari).
- Ifomiceti (pluricellulari).

Tutti si replicano per via asessuata, in alcuni è stata descritta anche la vita sessuata. Non è detto che non esista anche nelle specie in cui non è stata ancora osservata.

Esistono più di 100.000 specie di funghi, circa 100 rilevanti per le patologie nell'uomo.

Non si studiano qui le intossicazioni ma il parassitismo diretto o la introduzione di metaboliti tossici da parte di miceti unicellulari.

Il lievito è una cellula ovoidale molto più grande di un batterio, eucariotica, che ha la caratteristica di replicarsi per gemmazione.

Gli ifomiceti sono costituiti dall'ifa, una struttura pluricellulare costituita da molte cellule ma collegate tra loro con organizzazione a "canna di bambù". Esistono setti che separano le cellule in modo incompleto, in alcuni casi il nucleo può passare da una cellula alla successiva.

In due circostanze gli ifomiceti formano un setto completo:

- Quando una parte va in necrosi.
- Prima del ciclo di vita sessuato.

Si osservano vari tipi di micelio:

- Il micelio vegetativo che assorbe nutrimenti.
- Il micesio aereo che partecipa al ciclo di vita asessuato e sessuato.

Gli ifomiceti nei quali è stato osservato un ciclo sessuato assumono un nome di genere differente rispetto allo stesso fungo che ha ciclo di vita asessuato. (Molto simpatici i biologi).

Zigomiceti: aspetto morfologico nel ciclo di vita sessuato o asessuato è identico.

Sulla base della presenza o meno del ciclo di vita sessuato sia lieviti che ifomiceti si classificano i funghi in deuteromiceti quando non è stato descritto il ciclo sessuato. Quando è stato descritto si distinguono in ascomiceti, basidiomiceti e zigomiceti in base all'aspetto morfologico del ciclo sessuato.

Ascomiceti: La cellula maschile si chiama anteridio, la cellula femminile ascogonio, la cellula femminile riceve il nucleo maschile. Da essa si origina l'ifa ascogena che da luogo agli aschi. L'ifa ascogena viene circondata dall'ascocarpo, a scopo di difesa della progenie. Es. Aspergillus, che nel ciclo sessuato si chiama Emericella.

Basidiomiceti: danno luogo a basidiospore che si chiamano anche ballistospore, la singola basidiospora viene lanciata molto lontano, anche 6 cm. Es. Cryptococcus neoformans.

Zigomiceti: sporogioforo e sporangiospora. Hanno ife cenocitiche, ovvero con pochi setti o addirittura nessuno.

I lieviti si replicano per gemmazione, talvolta la gemma non si stacca dalla cellula madre, nel complesso sembra quasi un'ifa ma i setti sono comunque completi (pseudoifa).

Candida albicans in talune circostanze, (a 37°C in terreno inducente, ad esempio in presenza di sieralbumina bovina) è stato osservato che dà origine ad un tubo germinativo ovvero una vera e propria ifa, quando cresce in forma ifale candida produce una citotossina, abbiamo un'infezione patologica.

Fungo dimorfo.

Generalmente i funghi dimorfi sono patogeni, C.albicans invece in condizioni normali è presente in equilibrio con la flora locale dei vari distretti corporei. Diventa patogeno quando forma il tubo germinativo.

Tipi di micosi:

- Superficiali
- Cutanee
- Subcutanee
- Profonde

Micosi superficiale: Interessano gli strati cornei della cute. Es. Malassezia furfur, si nutre di acidi grassi a catena lunga, la zona di cute infetta non si pigmenta quindi appaiono come chiazze bianche a seguito dell'abbronzatura. È stato identificato un caso di infezione sistemica in un neonato prematuro. Non è facile da trattare (chi ce l'ha se lo tiene).

Micosi cutanee: Es. C.albicans, di solito non danno importanti risposte immunitarie. Causate da funghi **dermatofiti**.

Micosi sottocutanee: Sostenute da funghi che possono anche sostenere micosi cutanee e micosi profonde, ialoifomiceti e feoifomiceti (tallo trasparente e tallo pigmentato). Praticamente mai visti in clinica.

Infezioni sistemiche/profonde: funghi dimorfi classici, C.albicans, no dermatofiti, criptococco (unico lievito capsulato di interesse medico).

Cryptococcus neoformans nei pazienti immunocompromessi può dare infezione.

Infezioni endogene: Infezioni opportunistiche, normalmente presenti ma possono dare infezioni sistemiche quando le condizioni sono favorevoli, ad esempio in terapia antibiotica i funghi già presenti trovano meno competizione da parte dei batteri (uccisi o rallentati dall'antibiotico) sia per quanto riguarda i nutrienti sia per il legame ai recettori cellulari.

Infezioni esogene: Infezioni indotte da microorganismi ambientali. Ad esempio a Cisanello ci sono tantissimi gonidi di aspergillus perché sono sollevati dai lavori del cantiere, i primi 5 trapiantati di fegato a Pisa sono morti di infezione da aspergillus, le contromisure prese sono:

- Finestre chiuse.
- Filtri nel sistema di areazione.
- Muri in superficie lavabile.
- Isolamento con l'esterno (niente visite).
- Il personale medico si deve cambiarsi e lavarsi le mani.
- Filtro pulito con flusso d'aria laminare.
- Tampone al paziente prima che sia indotta l'immunosoppressione.

Un altro microorganismo ambientale è il criptococco, sta nell'intestino dei volatili. È l'unico lievito capsulato di interesse medico. Se inalato viene fagocitato dai macrofagi alveolari e lì si replica, sviluppa infezione solo in caso di immunocompromissione importante. Il macrofago può essere riserva per l'infezione secondaria.

Le lesioni da funghi sono tonde perché la colonia si sviluppa in modo centrifugo dal punto di inizio della colonia.

Plot twist: i funghi disposti in cerchio nei boschi non sono un segno della presenza delle streghe.

Si usa il termine conidio per parlare del ciclo di vita asessuato, spora invece si riferisce al ciclo di vita sessuato. Negli zigomiceti si parla sempre di spore perché la morfologia non è distinguibile dal ciclo di vita sessuato a quello asessuato.

La membrana citoplasmatica dei miceti

Doppio strato fosfolipidico, le sostanze idrofile non passano, quelle lipofile sì. La membrana è costituita da **ergosterolo** importante perché le uniche due categorie di farmaci antimicotici (azoli e polieni) disponibili 30 anni fa (all'epoca dell'epidemia di AIDS) avevano l'ergosterolo come bersaglio, o si legano all'ergosterolo ed aprono pori nella membrana (polieni), oppure interferiscono con la sintesi dell'ergosterolo (azoli).

Gli steroli interferiscono anche con le proteine di membrana, come la chitina sintetasi.

C'è un limite di concentrazione dell'ergosterolo sotto al quale non è più possibile la replicazione. Inibendo la sintesi di ergosterolo con azoli si accumula lanosterolo, instabile, che si può convertire in metil-3,6-diolo. Si sviluppò una mutazione di un enzima che convertiva il lanosterolo in 14alfa-metilfecosterolo che sostituendo l'ergosterolo consente la replicazione, in un colpo solo si sviluppano funghi resistenti ad entrambe le classi di farmaci.

I polieni potrebbero interferire anche con le cellule dell'ospite (legandosi al colesterolo invece che all'ergosterolo) però ciò richiede dosaggi 250 volte superiore ai livelli terapeutici.

La parete

Conferisce rigidità, è la struttura, normalmente più esterna, che conferisce la forma e consente la sopravvivenza in ambienti ad osmolarità diversa.

In ambiente naturale non possono sopravvivere senza parete, in condizioni sperimentali sì, si chiamano sferoplasti per via della loro forma.

Nella parete si distingue una parte rigida ed una parte plastica.

La parte rigida può essere costituita da cellulosa, glucano, chitina.

La parte plastica è costituita da glucano o mannano. Il mannano forma complessi con le proteine (formando le mannanoproteine).

Il glucano non è sempre presente in tutti i funghi ma è molto diffuso, tanto che la ricerca di beta-D-glucano si usa per sapere se il paziente presenta un'infezione fungina.

Le mannanoproteine hanno peso molecolare diverso tra i lieviti e gli ifomiceti, anche nelle due forme della stessa specie (ad esempio in *C. albicans*) ciò comporta proprietà adesive diverse.

Ad esempio *C. albicans* in forma ifale esprime una proteina di legame per C3d ed una proteina iC3d, omologa alla proteina CR3 che può legare la porzione cristallizzabile dell'anticorpo, può quindi bloccare la risposta indotta da anticorpo. La proteina CR3-simile si lega alla sequenza RGD (arginina, glicina, aspartato) presente in molte proteine di mammifero. Dato che la proteina iC3b è espressa solo nella forma ifale è necessaria la transizione per causare patologie.

L'**adesività** è un fattore essenziale per instaurare un processo infettivo, elimina o riduce la capacità di eliminare il patogeno. Quando *C. albicans* fa la transizione a forma ifale acquisisce la capacità di produrre una tossina, la **candidalisina**. La candidalisina sintetizzata viene tagliata in 8 frammenti e rilasciata, la candidalisina induce la formazione di pori nella membrana delle cellule ospiti che inducono l'ingresso di calcio il quale attiva metalloproteasi ed il rilascio di ligandi per EGFR, la candidalisina ed Als3 attivano EGFR ed impedisce la degradazione del complesso EGFR-EphA2, l'attivazione di EGFR induce una risposta di tipo infiammatorio.

Altro fattore di virulenza di *C. albicans* è **Als3**, che consente al microorganismo di aderire ed invadere la cellula ospite.

Per discriminare grossolanamente una infezione fungina da una batterica si usa la ricerca di beta-d-glucano, non è presente in tutti i funghi ma in tanti sì, la sua assenza permette quindi di escludere la maggior parte delle infezioni fungine.

Als3 induce la cellula ospite a fagocitare l'ifa, si forma quindi un vacuolo in cui si accumula candidalisina.

In condizioni normali *C. albicans* è un microorganismo commensale, in caso di aumento della proliferazione di *C. albicans* l'accumulo di candidalisina può danneggiare le cellule ospiti e dare patologia. L'aumento dei livelli di candidalisina portano all'attivazione dei neutrofili (attivazione tipo 17).

C. albicans è caratterizzata da idrofobicità della superficie, che aumenta durante la germinazione.

Altri fattori prodotti da *C. albicans* sono le aspartil proteasi che svolgono attività proteolitica importante per l'invasione tissutale e colonizzazione.

Antimicotici che agiscono sulla parete: **Echinocandine**: inibiscono la sintesi di beta-D-glucano, evidentemente non agisce su quei funghi che non presentano beta-D-glucano nella parete.

Switching fenotipico: è un diverso aspetto morfologico della colonia in condizioni di crescita differenti, ad esempio con l'esposizione a raggi UV.

Produzione di biofilm: comunità di microorganismi adesi ad una superficie solida, i microorganismi crescono in più strati di cui il più superficiale protegge quelli sottostanti dall'azione dei farmaci. Le cellule alla base sono dette **persistenti** e sono quiescenti. Prima si pensava che lo facesse solo *C. albicans*, adesso si pensa che lo facciano praticamente tutti. Il biofilm può aderire sia a superfici biotiche che a superfici abiotiche. Le cellule quiescenti alla base sono immuni ai farmaci perché non sintetizzando membrana e non essendo metabolicamente attivi non risentono degli antagonisti dei processi metabolici.

Si possono avere biofilm misti costituiti da più specie di microorganismi.

Le cellule del biofilm sono immerse in una matrice costituita da proteine sintetizzate da loro e proteine dell'ospite.

Le cellule del biofilm mostrano un fenotipo differente dalle stesse cellule in forma planctonica.

In realtà il biofilm non è una lamina compatta ma "a fungo" quindi alcune parti si possono staccare ed invadere altre sedi.

Enzimi:

- **Fosfolipasi**: idrolizzano i fosfolipidi di membrana dell'ospite.
- **Aspartil proteinasi extracellulari**

Mughetto: infezione tipica del neonato prematuro sostenuta da *C. albicans*. Nell'adulto immunodepresso forma infezioni orali, è uno dei primi segni di AIDS, quindi è il caso di fare un test per HIV.

Candida Auris

[nota di servizio: *C. auris* è stata inserita nel programma di esame].

È un microorganismo emergente, scoperta in Giappone, isolata dal condotto uditivo di un soggetto nel 2019, casi in Corea, India, Kuwait, Kenya, Sudafrica, Norvegia, Regno Unito, Germania, Italia, ecc...

CDC e WHO hanno inserito *C. auris* nella categoria "gravi minacce in ambiente ospedaliero".

C. auris è stata trovata in ceppoteche già del 1996, solo che i metodi discriminatori del 1996 si basavano su caratteristiche fenotipiche che portavano a classificarlo erroneamente. *C. auris* vive sulla cute dei portatori, ha una grandissima capacità di diffondersi e una buona resistenza ai disinfettanti.

Sono molto resistenti ai farmaci, es. il 93% sono resistenti al fluconazolo.

Disinfettanti a base di cloro e perossido di idrogeno hanno una buona efficacia.

L'infezione nosocomiale si manifesta tra 10 e 50 giorni dopo l'infezione sistemica ha mortalità tra il 30 e il 60%.

Candida auris rimane vitale a 42°C, incubando a 40°C si isola rispetto agli altri microorganismi. È tollerante a NaCl, si aggrega in cluster cellulari difficili da disperdere.

Cryptococcus neoformans

(per convenzione i miceti che hanno entrambi i cicli riproduttivi si indicano con il nome del ciclo asessuato, però da ora in avanti si parla del ciclo sessuato. Non ci hai capito niente? Neanche noi).

È un microorganismo che vive nell'intestino, si trasmette per essiccazione delle feci nell'ambiente e dispersione delle particelle. È capsulato (unico fungo capsulato di interesse medico) quindi resiste all'essiccazione meglio degli altri microorganismi, inoltre essiccandosi si riduce di dimensioni e scende sotto ai 6 microni, a questo livello il sistema di protezione muco-ciliare delle vie respiratorie non è più efficace. I macrofagi li fagocitano ma non riescono a degradarli. I macrofagi sono quindi la riserva di infezione in attesa che le condizioni diventino favorevoli all'infezione sistemica (immunodepressione).

Il cryptococco ha un particolare tropismo per il sistema nervoso centrale, induce quindi meningoencefalite, letale nella maggior parte dei casi.

Essendo capsulato per avere la fagocitosi servirebbero anticorpi anti-capsula ma essi non esistono, quindi per fagocitare servono fattori complementari. Nel sistema nervoso centrale ci sono meno fattori complementari, inoltre probabilmente la presenza di creatinina ed asparagina sono fattori di crescita.

In presenza di composti fenolici cryptococcus produce pigmenti (che rappresentano anche fattori di virulenza) tramite un enzima di membrana, nel tessuto nervoso trova substrati fenolici rappresentati dalle catecolamine.

Si distinguono 5 fenotipi:

A: grubii

B e C: gattii

D: neoformans

AD: lieviti derivati dalla fusione dei ceppi A e D

Il principale fattore di rischio è la linfocitopenia CD4+ (es. AIDS). È molto diffusa in africa per la diffusione dell'HIV e per la mancanza di cure che invece sono disponibili in occidente.

Vettori di infezione sono ad esempio le feci di piccione, si può avere infezione anche tramite cibi non lavati.

Ci può essere una fase in cui l'infezione è cutanea, si può quindi fare una diagnosi precoce ed iniziare una terapia prima che l'infezione raggiunga il sistema nervoso centrale.

La riserva sono i macrofagi polmonari all'interno dei quali non può essere raggiunto da farmaci e cellule dell'immunità, viene rilasciato tramite esocitosi o lisi.

Il lievito produce melanina che lo protegge dai raggi UV.

In ambiente arido la capsula essicca e collassa proteggendo il lievito dalla disidratazione e riducendone le dimensioni in modo da rendere possibile l'infezione tramite inalazione.

Struttura della capsula di C. neoformans: glucoronozil-mannano, polimero formato da una struttura di mannosio sostituita con acido glucuronico e xilosio, il rapporto xilosio, glucuronato, mannosio varia da 1:1:3 a 4:1:3 nei vari sierotipi.

La principale opsonina che agisce contro C. neoformans è la proteina complementare C3, in caso di sepsi si ha notevole deplezione di quest'ultima, il che fa diminuire ulteriormente la sua concentrazione a livello del SNC.

La capsula permette al lievito di non essere ucciso una volta fagocitato dal macrofago respiratorio, inibisce le citochine, inibisce il recruitment dei leucociti, induce le cellule T soppressorie, inibisce la presenza dell'antigene ed inibisce la proliferazione linfocitaria.

Sono in studio vaccini in cui si prova a stimolare risposta immunitaria contro componenti capsulari coniugando questi ultimi con componenti proteiche.

È un microorganismo non esigente, cresce bene in un ampio range di condizioni, lega molto bene il ferro (importante fattore di crescita ma nell'ospite è legato a proteine).

Aspergillus

Microorganismo ubiquitario, presente in suolo, vegetazione, detriti organici, polvere delle costruzioni, medicazioni aperte, borse da dialisi rotte, sistemi di ventilazione.

Le patologie causate possono essere dovute a:

- Intossicazione (aflatossina prodotta dal lievito).
- Allergia.
- Aspergillosi disseminata.

Asma estrinseca.

Alveolite allergica estrinseca: es. fenomeno di Arthus: formazione di complessi solubili, induce danno tissutale che può portare a fibrosi polmonare irreversibile.

Aspergillosi broncopolmonare allergica: fibrosi polmonare irreversibile, IgG, IgE.

Aspergillosi colonizzante (aspergilloma): secondario ad aspergillosi allergica cronica, sarcoidosi, TBC, istoplasmosi. De novo in paziente con malattia invasiva ed immunocompromesso. Il nome che ricorda un tumore deriva dall'aspetto sferoidale della colonia dovuta alla crescita centrifuga.

La diagnosi di aspergillo si fa facendo crescere il microorganismo nel suo ciclo di vita asessuato ed osservando i corpi di fruttificazione. C'è una finestra temporale per osservarli, se si aspetta troppo il preparato si riempie di conidi e non si vede più niente.

La presenza dell'aspergillus può significare che il paziente è colonizzato, è infetto oppure il tampone è stato contaminato. La distinzione tra paziente colonizzato e paziente infetto si fa in base alla condizione clinica del paziente.

Il tempo di incubazione varia in base al tipo di microorganismo, gli ifomiceti sono molto più lenti dei lieviti, in alcuni casi per i dermatofiti sono necessari anche 15-21 giorni.

Dermatofiti

Infezioni cutanee, normalmente si contraggono dagli animali (zoofili). Ne esistono però anche di antropofili e di geofili.

Hanno necessità di nutrirsi di cheratina, possono quindi colonizzare tutto ciò che contiene cheratina (cute, capelli, unghie, ecc...). Rompono i ponti disolfuro tra le molecole di cheratina.

Si può avere parassitismo di vario tipo:

Ectothrix: invade l'interno del capello, gli artroconidi formano una guaina all'esterno.

Endothrix: Sia le ife che gli artroconidi sono localizzati all'interno.

Favoso: All'interno del capello si trovano un miscuglio di filamenti miceliali e globuli di grasso.

Nei dermatofiti si possono avere **microconidi** (singoli conidi unicellulari) o **macroconidi** (multicellulari = cocomero).

Diagnosi Microbiologica

ha lo scopo di identificare l'agente eziologico che sostiene la malattia infettiva.

Si può realizzare tramite strumenti di diagnosi diretta oppure indiretta.

Diagnosi diretta: Isolamento dell'agente patogeno in coltura.

Diagnosi indiretta: identificazione della risposta immunitaria dell'ospite

Cosa si intende per germi comuni? Germi la cui coltura si realizza sui comuni terreni di coltura (elencati nel corso di batteriologia).

Agar-sabaurot specifico per i lieviti perché contiene antibiotici che inibiscono i batteri.

Il terreno **agar MacConkey** è selettivo per i Gram- e permette di discriminare i microorganismi che fermentano il lattosio grazie ai pigmenti pH-sensibili.

Agar sale-mannite: Selettivo per gli stafilococchi, ala concentrazione di sale, è discriminativo grazie alla presenza del mannitolo, permettendo di identificare *S. aureus*.

La ricerca di germi comuni comprende anche i lieviti, per la ricerca di ifomiceti servono tecniche specifiche, anche a causa della loro lenta crescita. A seconda del quadro clinico si sceglie la tipologia di campione da inviare in laboratorio.

L'identificazione si fa in coltura pura, ad esempio una subcoltura prendendo una singola colonia.

Diluizione limite:

Prima dei terreni solidi per isolare una coltura pura si faceva una diluizione progressiva fino a che solo una parte delle provette si intorbidiva, non si aveva la certezza che l'intorbidimento fosse dovuto ad una singola specie.

Una colonia è (teoricamente, in realtà esistono le mutazioni) prodotta da una singola cellula che ha proliferato generando un insieme macroscopicamente visibile di cellule uguali a se stessa.

La forma del rilievo formato dalla colonia dipende dalla specie microbica. Es. la colonia vecchia di *S. pneumoniae* assume aspetto ombelicato.

Il margine è un'altra caratteristica distintiva.

Nel terreno liquido si inclina la provetta per liberare una parte di vetro prima coperto dal terreno, poi si depositano i microorganismi e si riporta la provetta in verticale sommergendo i microorganismi.

Esistono i terreni **a becco di clarino**, terreni solidi fatti solidificare in una provetta in posizione obliqua. Viene seminato con un ago da infissione, mentre si estrae l'ago si semina anche in superficie. Nel corpo del tessuto non si ha presenza di ossigeno in superficie sì, si evidenziano le differenti vie metaboliche (eventualmente) messe in atto dal batterio a seconda dell'esposizione all'ossigeno.

Agar sangue: Permette di far crescere microorganismi catalasi-negativi: se il microorganismo produce perossido di idrogeno e non esprime catalasi (perossidasi) il microorganismo uccide se stesso. Per far crescere questi microorganismi è necessario fornire catalasi. Nel terreno agar sangue (ma anche agar cioccolato) ciò avviene grazie al fatto che nella membrana dei globuli rossi è presente catalasi. Agar sangue permette di distinguere gli stafilococchi in base alle proprietà emolitiche.

Alfa-emolitici: fanno virare il terreno dal rosso al verde a causa della produzione di biliverdina (viridanti).

Beta-emolitici: emolisi completa.

Gamma-emolitici: attorno alla colonia non è osservabile un alone di emolisi.

Ad esempio per identificare *S. pyogenes* (colonie piccolissime, beta-emolitico) si osserva la piastra in controluce alla ricerca dell'alone di emolisi.

Agar sale-mannite: Permette di selezionare organismi alofili (grazie al sale) e di discriminare quelli che acidificano il terreno.

Agar MacConkey: Contiene sali biliari che impediscono la crescita dei Gram- e lattosio che permette di discriminare gli organismi lattosio-fermentanti.

Agar Salmonella-Shigella: Contiene sali biliari a concentrazioni molto più elevate, seleziona gli enterobatteri che proliferano nella colecisti.

Arricchito anche da una sorgente di zolfo e ferro ferrico perché *Salmonella* producendo H₂S (partendo dallo zolfo) e questo reagendo con il ferro precipita al centro della colonia sottoforma di FeS formando un "puntino" visibile.

Oltre alle esigenze **organiche** (nutrienti) si devono soddisfare le esigenze **inorganiche** della specie batterica (es. presenza di ossigeno, condizioni di microaerofilia condizioni di bassa concentrazione di ossigeno). (Per realizzare la microaerofilia si usano bustine che rilasciano agenti riducenti che consumano l'ossigeno oppure accendendo una candela nella giara ermetica in cui si trovano le piastre).

Per lavorare con microorganismi anaerobi stretti (sono distrutti dalle specie reattive che si formano in presenza di ossigeno perché non hanno meccanismi di difesa oppure l'ossigeno danneggia particolari specie chimiche necessarie alla vita del batterio) si deve usare una cappa specifica, completamente sigillata (glovebox) riempita con gas inerte (es. azoto).

Alcuni microorganismi necessitano di ioni particolari (fosfato, potassio, magnesio, rame, ecc...).

Condizioni fisiche: Temperatura, pH, osmolarità del terreno. Da considerare anche in caso di risultato negativo: il patogeno che sostiene l'infezione potrebbe non essersi riprodotto perché l'esame per germi comuni non soddisfaceva le condizioni adatte alla proliferazione (es. colera).

S. pyogenes esprime due emolisine: una ossigeno-stabile ed una ossigeno-labile deve quindi essere coltivato sia in condizioni normali che in atmosfera microaerofila per osservare l'azione di entrambe.

Test Primari

Permettono di distinguere le specie batteriche anche in base alle proprietà tintoriali.

Es. colorazione di Gram, acido-resistenza, forma, spore, mobilità (semina per infissione in terreno semisolido a bassa concentrazione di agar, si osserva se il germe è cresciuto solo nel sito di infissione oppure si è diffuso), crescita in aria (permette di determinare se il microorganismo è aerobio oppure anaerobio facoltativo o obbligato), catalasi (si deposita sopra la colonia una goccia di perossido di idrogeno, se il microorganismo contiene catalasi si osserva la formazione di bolle. I germi che non presentano catalasi sono uccisi velocemente dal perossido di idrogeno prodotto da loro stessi a meno che non sia presente catalasi nel terreno, esempio sangue o cioccolato), ossidasi, glucosio, test O/F (ossidazione/fermentazione, test metabolico complesso e ormai superato).

Dopo aver seminato il campione sui terreni comuni si incuba per 48, con osservazione intermedia a 24 ore. Per procedere all'identificazione delle colonie eventualmente presenti si eseguono i test primari.

Prima si usavano le "tabelle di diagnosi". Adesso sono usate le "gallerie" in cui si inserisce la sospensione microbica a concentrazione specificata dalla casa produttrice (la concentrazione della sospensione si misura al densitometro ottico). La galleria contiene substrati liofilizzati che vanno in soluzione nella sospensione realizzando in differenti pozzetti test che prima richiedevano provette separate. Dal profilo risultante si realizza l'identificazione microbica. Nel frattempo i pozzetti sono passati da circa una decina a 64, che vengono lavorati tramite uno strumento apposito che provvede a riempire i pozzetti con la sospensione microbica e a sigillare la cannuccia di riempimento, a cui segue l'incubazione ed il confronto tra i dati rilevati ed il database. Occasionalmente si riscontrano identificazione incerte tra più specie, molto spesso in questi casi il problema è che la sospensione iniziale non deriva da una coltura pura.

Un setup simile si usa per l'antibiogramma con pozzetti contenenti antibiotici diversi.

Antibiogramma

Valutazione della suscettibilità microbica verso un certo numero di composti (farmaci) ad azione antimicrobica.

MIC: Concentrazione minima inibente.

MBC: Concentrazione minima battericida. Riduce di almeno 3 unità logaritmiche la concentrazione batterica rispetto all'inoculo iniziale.

Metodi in terreno solido:

- Kirby-Bauer:** Usa dischetti di carta che contengono concentrazione nota di un antibiotico (scritto sul dischetto). Si fa una sospensione microbica alla concentrazione specificata. Si preleva tramite un tampone la sospensione e si semina su una piastra (con terreno Mueller-Hinton)(prima si sprema per evitare che sgoccioli). Si semina a tutto campo in modo uniforme ruotandola due volte di 60°. Si mette il dischetto sulla piastra (con la scritta verso l'alto! Non si sposta il dischetto dopo che ha toccato il terreno!) si mette la piastra in termostato e si incuba per 18 ore. Il composto antibiotico si sparge in modo centrifugo. A partire da una certa distanza fino al dischetto non si ha crescita batterica (**alone di inibizione della crescita**), nell'anello esterno si osserva crescita confluyente in cui le colonie seminate in modo uniforme coprono il terreno. Viene valutata l'efficacia del composto in base al diametro dell'alone di inibizione di crescita. Si confrontano questi valori con quelli standard

per determinare se il microorganismo è suscettibile o meno. Si determina la **MIC approssimata**.

Anche in questo caso non sono attendibili i dati ottenuti da una coltura mista.

- **Tecnica delle diluizioni scalari:** Stesso terreno (Mueller-Hinton) ma senza agar (terreno liquido). Si realizza una diluizione scalare dell'antibiotico (umerose provette con concentrazione sempre minore di antibiotico). Ad esempio si preleva metà contenuto della soluzione precedente e si diluisce al volume doppio ottenendo così concentrazione dimezzata. Si inocula poi un volume costante di sospensione microbica a concentrazione sempre uguale e, dopo l'incubazione (di nuovo per 18 ore), si valuta la crescita tramite la densità ottica. La concentrazione inibente è l'ultima provetta in cui non si osserva crescita ovvero **la più bassa concentrazione di antibiotico capace di sopprimere la crescita batterica**.

Il batterio non è cresciuto perché è morto o perché è inibito? Si fa il test della battericidia: si preleva un volume noto di sospensione da una provetta senza crescita evidente e si semina su un terreno solido osservando l'eventuale formazione di colonie. Si determina la **MBC** misurando **la minima concentrazione di antibiotico che impedisce la formazione di colonie**. Correntemente questo test si fa in maniera automatizzata, le piastre usate in questo caso (dette piastre di microtitolazione) hanno già l'antibiotico liofilizzato sul fondo dei pozzetti (è importante non toccare il fondo quando si aggiunge l'acqua!).

Permette di identificare condizioni di tolleranza, che si dichiara presente quando la MBC è almeno 32 volte più elevata della MIC.

In caso di discrepanza tra i risultati ottenuti con il test in terreno solido o in terreno liquido si considera come più attendibile quello in terreno liquido.

- **E-Test:** Si usano strisce di materiale proprietario (brevettato) in cui sono presenti concentrazioni scalari di antibiotico. Sulla striscia è riportata una scala che permette di determinare, osservando il punto di intersezione tra la striscia stessa e l'alone di inibizione. Metodo molto rapido che richiede poca manualità. Su piastre grandi si possono usare più strisce contemporaneamente disponendole "a raggiera" oppure "testa-coda" (tecnicamente antiparallelo) in modo da distanziare il più possibile le teste, che sono a concentrazione più elevata quindi generano un alone più ampio.

Il valore di MIC da solo non è sufficiente a scegliere l'antibiotico, indica solo la sensibilità in vitro. Spesso la decisione tra antibiotici per cui il microorganismo è sensibile si effettua in base al costo. L'unico caso che indica certamente l'efficacia è quando prima del valore di MIC è riportato un segno "minore" (<), ciò sta a significare che la concentrazione inibente è minore del minimo valore a cui è stato fatto il test. È da considerare anche il quadro clinico del paziente, ad esempio la funzionalità epatica e renale.