

Metodi e tecniche di microbiologia -Tafi.4°

sabato 14 marzo 2020 18:22

Isolamento ed identificazione dei batteri

Come avviene il trasferimento del campione sul terreno di coltura. Dopo avere trasferito al trasferimento del campione sul terreno , si procede all'incubazione delle piastre con una adeguata temperatura e atmosfera in modo tale da permettere ai batteri di crescere nella maniera migliore. Successivamente , finita l'incubazione dei batteri a 37° , si procede all'osservazione delle colonie cresciute .

Tecniche di **isolamento**:

- Se si utilizzano terreni solidi si trasferisce il campione sulla loro superficie , usando tecniche volte a separare le colonie e tra loro . l'isolamento si può svolgere :

- a) Isolamento per **strisciamento**= tecnica che prevede che si diminuiscano progressivamente le colonie , in modo da ottenere colonie separate . Prevede utilizzo di un'asta. Nella piastra n°1 dove in alto viene posizionato il campione e con una asta sterile si procede a effettuare delle anse ravvicinate. La 2° piastra verrà girata e si prosegue con il secondo settore dell'asta e così anche nella 3° piastra. Nella 4° piastra = nel quarto settore si formano delle anse ravvicinate.

(FIGURA A DESTRA--> come appaiono le colonie dopo l'incubazione) = in alto vi è il campione non diluito che in quanto nel settore 1 , in alto ,è stato messo il campione --> le colonie formano una patina. Nel 4 settore si vede che le colonie sono molto più separate tra di loro .

- b) Isolamento per **diluizione**= è un isolamento per espansione e disseminazione.

Prevede che il campione venga diluito--> si tratta di una diluizione 1:10 (si ha la provetta contenente il campione iniziale e una serie di provette contenute in terreni sterili o la soluzione fisiologica , in sterili in quantità di 9 ml. Le colonie della prima provetta sono dense e diminuiscono man mano che le provette vengono diluite in proporzione 1:10 , fino ad arrivare alla piastra dell'ultima diluizione dove le colonie sono ben separate tra di loro e se ne potrà osservare la morfologia. Lo spandimento deve avvenire in modo omogeneo , ruotando continuamente la piastra , in modo da distribuire il campione uniformemente su tutta la piastra (per evitare le colonie confluiscono a formare patine e per evitare che il materiale non siano distribuite in modo uniforme e che , pertanto , non saranno visibili colonie.

Dopo la procedura di isolamento si procede all'incubazione (delle piastre) che avviene mediante incubatori o camere calde per i batteri aerobi o si utilizzano giare o in cappe per aerobi , i batteri anaerobi.

Finita l'incubazione , si procede con l'esecuzione dell'esame per individuare i caratteri culturali .

Infatti , potranno essere osservate le piastre e le colonie che in esse sono cresciute. Osservando le colonie si potrà esprimere un giudizio presuntivo sul tipo di microrganismo presente , e che è cresciuto , e su come proseguire le indagini per giungere all'identificazione.

Se una volta osservata la piastra , si nota che è presente una sola specie batterica questa verrà definita una **coltura pura** --> se invece presenta più specie è detta **coltura mista** .

Coltura pura :

La coltura pura è costituita da cellule (popolazione di cellule) che derivano da una sola cellula. Quindi formano sul terreno colonie che hanno le stesse caratteristiche . Derivando da un'unica cellula progenitrice , tutte le cellule (10^6-10^7) hanno le medesime caratteristiche biologiche .

Quando una colonia batterica risulta costituita da milioni di cellule batteriche , derivate dalla medesima cellula progenitrice , e dotate di identiche proprietà morfologiche.

Per identificare (per procedere all'identificazione devo prima ottenere una coltura pura) microrganismi presenti nei campioni biologici , ambientali , alimentari da sottoporre a indagine microbiologica , è necessario coltivarli e isolarli e porli in incubatrice , fino ad ottenere una coltura pura.

PRINCIPI DI IDENTIFICAZIONE DEI BATTERI:

Dopo aver ottenuto una coltura pura , posso prendere una di queste colonie e procedere all'esame microscopico .

- Dopo che i batteri sono stati isolati sul terreno di coltura (isolamento avviene a seguito di incubazione) si procede all'esame microscopico (ci permette , colorando , di assegnare i batteri o al gruppo dei Gram positivi o al gruppo dei Gram negativi) ed a una prima identificazione.
- Come = si allestisce con una coltura pura , un vetrino colorato secondo la colorazione di Gram o (secondo altre colorazioni) e in questo modo si determina se si hanno batteri Gram positivi o batteri Gram negativi e le loro caratteristiche morfologiche.

Colorazione di Gram:

- ⇒ Gram positivi = assumono colore viola
- ⇒ Gram negativi = assumono colore rosso

Osservazione morfologica : è una osservazione basata sul fatto che i batteri siano cresciuti sui terreni liquidi (si osservano depositi sul fondo) o sui terreni solidi (i batteri , in questo caso , sono più facili da osservare , in quanto permette di osservarne più agevolmente la morfologia). Da punto di vista della morfologia , le colonie possono differenziarsi in base alla dimensione , alla forma , al margine , al colore , al rilievo , alla superficie , alla trasparenza e sulla base della consistenza e aderenza al terreno.

Identificazione biochimica: vengono utilizzate delle prove biochimiche per identificare le specie . Esistono prove biochimiche e più rapide e prove più complesse che avvengono tramite l'ausilio di metodi industriali che prevedono più prove biochimiche da eseguire nello stesso momento. Comunque , tutte le prove sono caratterizzate dalla ricerca di una attività metabolica del microrganismo in esame , oppure

dalla ricerca di un enzima. *Quindi, si vanno a ricercare caratteristiche fermentative all'interno del microrganismo.* Talvolta queste tecniche non sono valide e ne sono utilizzate delle altre.

Tra le prove biochimiche rapide vi è :

Ossidasi = questo test permette di discriminare i batteri che possiedono l'enzima citocromossidasi (enzima contenuto nei citocromi) da quelli che non ce l'hanno. In genere viene applicato per discriminare il gruppo delle Enterobatteriacee (che sono ossidati negativi) da altri generi ossidativi positivi .

Come si effettua il test: viene fatto su un cartoncino , su cui si distribuisce una goccia di una sostanza e su questa si stempera (con un'ansa sterile) una colonia che è stata prelevata dalla piastra . Se è presente la citocromossidasi si svilupperà un colore viola . Il test sarà negativo se il microrganismo non presenta questo enzima .

Test della catalasi: la catalasi è un enzima presente in alcuni batteri e (ha la capacità di scindere) scinde il perossido di ossigeno in ossigeno molecolare e acqua. Il test permette di discriminare gli stafilococchi (catalasi positivi) dagli streptococchi (catalasi negativi). Come? Si mette una goccia di acqua ossigenata a 30 volumi ,su un vetrino, dopo si preleva con l'ansa una colonia e si stempera dentro l'acqua ossigenata. Se si svilupperanno delle bollicine il test sarà positivo . (si formano le bollicine in presenza di streptococco)

Test della coagulasi : la coagulasi è un enzima che determina la coagulazione del plasma , convertendo il fibrinogeno in fibrina quando nel plasma è presente un attivatore . È permette di distinguere lo stafilococco aureus (coagulasi positivo) da altri stafilococchi detti "coagulasi negativi".

Esistono due forme di coagulasi:

- Coagulasi libera : è un enzima extracellulare prodotto da stafilococchi in terreni liquidi .
- Coagulasi legata = è legato alla parete cellulare del microrganismo. Il test della coagulasi legata= prendo un cartoncino su cui viene stemperato un reagente , formato da palline di lattice e mescolato con una colonia prelevata. Se il test è positivo si formano dei granuli , altrimenti non si formeranno.

Test coagulasi libera= viene usato il plasma di coniglio che viene inoculato con le colonie da saggiare . Se si tratta di uno stafilococco aureus positivo , nel giro di 4h si formerà un coagulo --> non si formerà se abbiamo uno stafilococco coagulasi negativo.

Emolisi : l'emolisi è causata da una proteina batterica , detta emolisina in grado di produrre enzimi capaci di distruggere gli eritrociti . l'agar sangue è usato per evidenziare la produzione di emolisi . *Alcuni batteri producono l'emolisina , capaci di rompere gli eritrociti .* Per vedere quali sono i batteri che producono l'emolisina e quale tipo di emolisi producono , è indispensabile l'utilizzo dell'agar sangue .

Tipi di **emolisi** :

- a) Alfa emolisi = prevede la distruzione parziale dei globuli rossi. Dà un alone verdastro.
- b) Beta emolisi= consiste in una completa distruzione degli eritrociti . Dà un alone trasparente.
- c) Gamma emolisi= non produce variazioni sul terreno. Non dà alcuna variazione.

Gallerie Api:

- È un sistema biochimico prodotto industrialmente dove le reazioni tra substrato e miscela avvengono in delle cellette
- Ciò permette di analizzare 20 reazioni enzimatiche in poco spazio. Esistono diverse gallerie a seconda delle attività metaboliche ricercate . Attività che dipendono dalla famiglia di appartenenza del batterio che si vuole identificare. Ad esempio , la galleria 20 E è dedicata all'identificazione dell'enterobatteriacee, presenta 20 cupole con 20 substrati diversi . Finito con l'inoculazione , si procede con l'incubazione ma prima metto il coperchio.

Malditof :

Accurato metodo per classificare e identificare i microrganismi. È uno spettrometro di massa e permette di analizzare miscele di peptidi senza che vengano precedentemente separate.

Sequenziamento : permette di identificare i batteri , sequenziando l'RNA ribosomiale , il 16S. L'analisi della sequenza dell'RNA tramite un database che raccoglie le sequenze di tutti i microrganismi , permette di identificare il microrganismo con una percentuale.