

**Terreni di coltura:**

- **Definizione:** è un mezzo che consente la crescita ( e la moltiplicazione) in vitro dei microrganismi e quindi delle cellule batteriche.
- **Caratteristiche:** deve avere una concentrazione di sostanze nutritive, tale da consentire la crescita dei batteri. Deve contenere anche perché deve avere un adeguato grado di umidità. Inoltre, deve avere una reazione di PH adatta alla crescita dei batteri. Devono essere sterili e protetti da qualsiasi inquinamento.

Per soddisfare le caratteristiche elencate, il terreno di coltura deve contenere dei **peptoni** (insieme di composti idrosolubili, ottenuti per idrolisi delle proteine. Sono fonte di aminoacidi essenziali, di azoto e carbonio), cloruro di sodio ( sale = aggiunto in quantità ottimali per soddisfare le necessità osmotiche richieste dalle cellule batteriche), zuccheri (tra cui glucosio, lattosio e il mannosio // aggiunti per scopi specifici), estratti di lievito, d'organo o di carne (forniscono dei fattori che sono fondamentali ai batteri per la loro crescita come vitamine e Sali inorganici).

Contenuto qualitativo = Possono anche contenere degli arricchimenti ( necessari per la crescita di batteri esigenti dal punto di vista nutrizionale.), supplementi selettivi (come antibiotici, Sali biliari, cristalliolettivo...), indicatori (sostanze coloranti, permettono di seguire il metabolismo fermentativo dei batteri in esame perché il loro metabolismo fermentativo dei batteri fa in modo che si verifichi un abbassamento di PH, che viene messo in evidenza dai viraggio di colore del terreno, grazie all'indicatore che esso contiene).

La classificazione dei terreni di coltura avviene in base al loro stato fisico :

- **Terreni liquidi:** composti che prevedono che una polvere liofilizzata venga sciolta in acqua e che, successivamente, questi terreni vengano sterilizzati;
- **Terreni solidi:** prevedono che venga sciolta la polvere in acqua e che, poi, vengano resi solidi dall'aggiunta di un agente gelificante ("agar" ovvero un polisaccaride formato da molecole di galattosio che sono estratte dalle alghe e non possono essere metabolizzate dai batteri);

Possono essere classificati anche sulla base della loro costituzione chimica:

- ⇒ **Terreni minimi:** usati per la crescita della sola crescita dei batteri autotrofi = in grado di sintetizzare biomolecole come zuccheri, proteine, grassi a partire dagli elementi inorganici. Questi terreni contengono elementi essenziali come azoto, carbonio, fosforo e zolfo.
- ⇒ **Terreni sintetici (o "definiti"):** di questi terreni si conosce il quantitativo dei componenti presenti all'interno, a differenza dei terreni complessi.
- ⇒ **Terreni complessi:** non permettono di risalire alla quantità di tutte le sostanze presenti. È ignota la loro esatta composizione chimica, sono formati da estratti di carne di bue, di cuore e di cervello. Sono quelli maggiormente utilizzati in microbiologia.

Possono essere suddivisi secondo la loro funzione:

- \* **Terreni non selettivi** = permettono la crescita di quasi tutte le specie microbiche, tranne quelle che hanno specifiche esigenze specifiche.
- \* **Terreni di arricchimento ("elettivi")** = in questi terreni la specie di interesse cresce più velocemente rispetto ad altre specie microbiche.
- \* **Terreni selettivi:** contengono delle sostanze batteriostatiche, ad esempio i Sali biliari, il sale i quali inibiscono lo sviluppo di molte specie microbiche ma non di altre → favoriscono lo sviluppo di alcuni batteri e inibiscono la crescita di altri, per evidenziare i batteri che possono crescere su questo terreno.
- \* **Terreni differenziali:** contengono sostanze indicatrici di particolari reazioni biochimiche che avvengono nel terreno stesso. Sono usati per differenziare, dentro una stessa specie.
- \* **Terreni che consentono la crescita dei batteri anaerobi** (consentono delle sostanze riducenti).
- \* **Terreni di mantenimento:** consentono la conservazione e il mantenimento dei batteri per un periodo più lungo rispetto ai normali terreni di coltura.
- \* **Terreni di trasporto:** sono terreni semi-solidi, hanno lo scopo di rendere "più compatto" il trasporto di un campione biologico che contiene un agente microbico, in quanto inibiscono le attività enzimatiche e le reazioni di tipo ossidative che avvengono all'interno di un campione.

In commercio, si trovano dei terreni già pronti o in piastra o in provetta oppure si trovano sotto forma di polveri disidratate in contenitori ermetici.

**Conservazione** dei terreni liofilizzati → Sia che i terreni vengano acquistati o preparati, i polveri vanno tenuti in luoghi privi di umidità (sono sensibili all'umidità perché l'assorbono), devono essere riparati dalla luce e trovarsi a temperatura ambiente, tra i 15 ai 25 °C.

**Preparazione:** se i terreni vengono preparati dai tecnici, tale processo deve avvenire:

- 1) Si prende il contenitore ermetico che contiene la polvere liofilizzata, si guarda sul contenitore (sull'etichetta) dove vengono riportati i grammi di terreno che vanno pesati per litro.
- 2) Peso su una bilancia analitica, posta sotto una capsula chimica.
- 3) Trasferisco su un recipiente contenente un magnete e si aggiunge dell'acqua nelle proporzioni dovute. In genere l'acqua (distillata o ionizzata) messa è inferiore a quella richiesta poiché la polvere farà aumentare il volume → per cui si raggiungerà il litro quando la polvere sarà completamente disciolta.
- 4) Si pone su un agitatore magnetico e il magnete inizierà a girare, consentendo il completo discioglimento.
- 5) Distribuisco il terreno :
  - Se liquido = distribuito in bottiglie e poi posto in autoclave per la sterilizzazione.
  - Se solido : peso l'agar (in proporzione del 1,5-2%) e lo metto all'interno della bottiglia.
- 6) Sterilizzazione: una esposizione a 121° a 1 atm per 15-20 minuti consente la distruzione delle forme vegetative batteriche, delle spore e dei virus. Accorgimento = quando devo sterilizzare die terreni aventi alti quantitativi di zuccheri, per evitare la loro caramellizzazione (che avviene a 115°) devo impostare la T a non più di 11°, aumentando la pressione a 5 atm. → allungando però il tempo, 10 volte superiore il tempo normale.
- 7) Finita la sterilizzazione: il materiale va rimosso dall'autoclave (non la apro finché non raggiunge gli 80°) → ma se il terreno è stato arricchito devo aspettare che la temperatura scenda a circa 50-55°C perché altrimenti questi componenti si degradano. Le piastre vanno lasciate aperte mezz'ora per consentire l'evaporazione dell'acqua, poi le chiudo e riporto la data di preparazione. Poi pongo un campione del terreno in un termostato a 37° per il controllo della sterilità.
- 8) **Conservazione** (delle piastre): intorno ai 4°C. I terreni piastra hanno durata media di una settimana, mentre i terreni in provetta durano all'incirca 6 mesi.

Errori che possono verificarsi durante la preparazione:

- Formazione di zolle nei terreni liofilizzati= perché abbiamo un'umidità elevata che è penetrata nelle polveri, formando delle zolle, nonostante il contenitore ermetico
- Viraggio del PH= bisognerebbe dopo ogni ciclo di sterilizzazione, controllare il PH che non dovrebbe variare. Si può avere quando l'acqua non è neutra o il terreno è stato sovra esposto al calore.
- Crescita scarsa= dovuta ai residui di detergenti o di altre sostanze presenti nei contenitori di preparazione. Può anche essere dovuta a una pesata non effettuata correttamente
- **Crescita eccessiva**= una sovra esposizione al calore provoca la distruzione degli inibitori selettivi.

**Controllo di qualità dei terreni:** due provette o due piastre vengono messe in camera calda o in incubatrice a 37°C per 24h per controllare la sterilità.

- La **sterilità** va verificata prima di utilizzare tali terreni.
  - Dopo 24 h si verifica se vi è stata una crescita. Se ci sono formazioni di colonie sulla piastra, la sterilizzazione non è andata a buon fine e il lotto andrà gettato. Se on ci sono colonie, vengono incubate e se dopo 48 h non si ha un intorbidimento (nei terreni liquidi) o formazione di colonie (nei terreni solidi) il terreno è considerato sterile.
  - **Fertilità e efficienza:** si deve controllare la fertilità e l'efficienza, seminando sul terreno diversi ceppi batterici (ATCC). Si fa crescere ciascun ceppo su un terreno ricco a 37°C fino al raggiungimento di una fase logaritmica (finché i batteri stanno crescendo rapidamente per poi raggiungere una fase di stallo / stabilità) quando vengono diluiti con soluzione fisiologica fino al raggiungimento di un determinato grado di torbidità e sulla piastra ne semino 10 ml → se il terreno è fertile si assiste a una crescita dei microrganismi di cui mi aspettavo la crescita. È fertile perché crescono determinati microrganismi e sarà fertile perché non cresceranno microrganismi diversi da quelli di cui mi aspettavo la crescita.
- Se tali parametri non verranno rispettati, bisognerà gettare tutto il lotto del terreno.

Esistono anche **controlli di qualità esterni** che hanno lo scopo di valutare il livello di precisione e accuratezza analitica raggiunta in laboratorio, poiché permettono di confrontare i risultati ottenuti (su campioni a concentrazione ignota) con tutti i laboratori che partecipano al controllo stesso.

**UK NEQAS** invia campioni uguali a tutti i laboratori, che effettuano le analisi e inviano loro i risultati che vengono confrontati.

Gli **ATCC**: "American Type Culture Collection". Sono ceppi che provengono da collezioni nazionali di coltura. Sia di questo ceppo che degli altri, conosciamo caratteristiche come il MIC e il genoma.

Sono usati nei test di fertilità che di efficienza dei terreni di controllo, sia per il controllo dei sistemi di identificazione batterica.

**NORME DI SICUREZZA** applicate quando si manipolano i terreni di coltura :

- ✓ Bisogna tener presente che alcuni terreni contengono componenti tossici o cancerogeni.
- ✓ Per ogni prodotto, verifico gli eventuali dati di pericolosità forniti dalle aziende.
- ✓ Adotto precauzioni per evitare il contatto, l'inalazione e l'ingestione (cappe, mascherini, guanti)
- ✓ Controlla se il terreno contiene acido azido, azido con molti metalli e può formare delle zolle, che con gelosia

Per poter coltivare i batteri vivi in laboratorio occorre utilizzare degli idonei mezzi di coltura artificiali, comunemente detti terreni. Questi sono costituiti da materiali nutritivi in grado di riprodurre artificialmente, in laboratorio, l'ambiente che può soddisfare le esigenze metaboliche del batterio. Precondizione necessaria è che i terreni siano sterili (ovvero privi di microrganismi) prima della semina con uno specifico batterio. È indispensabile che tutte le operazioni che portano alla preparazione dei terreni siano condotte con tutte le accortezze in grado di evitare la contaminazione, da parte di germi estranei, del terreno che dovrà essere "seminato".

Sia i terreni culturali prima di essere seminati, sia i recipienti che li contengono devono essere sterili cioè privi di ogni forma di vita. A questo fine viene utilizzata l'autoclave, un apparecchio costituito da un grande recipiente metallico in cui viene fatto formare vapore sotto pressione in grado di determinare temperature sterilizzanti. La pressione di una atmosfera, la temperatura a 121°C sono sufficienti per sterilizzare in 15-20 minuti di provette contenenti il terreno, che permettono la permeazione del vapore, impedendo però la contaminazione.

Oppure, sempre per sterilizzare, si possono usare delle membrane filtranti in grado di far passare il terreno, ma al contempo di evitare il passaggio dei microbi.

Una volta che il terreno è sterilizzato, bisogna creare l'ambiente adatto alle esigenze del batterio, quindi va posta in incubazione instufe termostate, per un tot di tempo che in genere è di 48H (ogni specie ha un range di temperature (temperature ideali) che permette loro di moltiplicarsi). Si valuta la presenza o l'eventuale eliminazione di ossigeno (e l'aggiunta di CO2) a seconda che si tratti di microrganismi aerobi o anaerobi.

- Sviluppo in terreni liquidi: lo sviluppo di batteri in terreni liquidi viene evidenziato dall'intorbidimento del terreno.
- **Cultura di batteri anaerobi**= le colture devono essere poste in recipienti a tenuta (gas pack) in cui si può eliminare l'ossigeno e sostituirlo con un gas inerte (Azoto).
- **Cultura pura:** quando una specie batterica è seminata su un terreno solido, incubato; dopo tale periodo i batteri avranno consumato i substrati nutritivi, tenderanno all'estinzione perciò si effettua il trapianto in un altro terreno (con un ago di metallo si preleva una sospensione e la si inocula su un nuovo terreno). La tecnica del trapianto permette l'isolamento in coltura pura di una singola specie batterica.

Come si ottiene:

- Semina per disseminazione in superficie =ovvero per strisciamento su piastra, poi la pongo in termostato in questo modo i batteri si moltiplicheranno formando colonie distinte ma composte da una singola specie batterica.
- Semina per inclusione= ovvero per diluizione nella massa di un terreno solido liquefatto, consente invece la conta dei batteri vivi presenti in un dato materiale, servendosi di colture di agar batteri, nelle quali essi formano colonie. Vengono allestite per questo miscela di agar-batteri a varie diluizioni del materiale in esame, versando poi le miscele in piastre diverse, lasciate quindi a solidificare e a incubare per lo sviluppo delle colonie. La diluizione maggiore che permette la crescita di colonie sufficientemente distanziate da consentire la conta, permette di risalire, tenendo conto del fattore di diluizione, al numero dei batteri presenti nel materiale in esame(moltiplicando il numero delle colonie contate su una piastra, CFU, per il fattore di diluizione si risale al numero dei batteri vivi presenti in 1 ml della coltura di partenza).

I terreni di coltura possono essere suddivisi in base allo stato fisico, chimico o in base alle informazioni che essi forniscono.

La base dello **stato fisico:**

- **Liquidi ("brodi"):** utilizzati nei casi di campioni per i quali si prevede una bassa carica microbica. Per far solidificare un terreno liquido occorre utilizzare l'agar (un polisaccaride acido estratto da alghe rosse, che non risulta tossico dai batteri).
- **Solidi ("agarizzati"):** in cui il brodo normale viene solidificato con agar.

Vantaggi:

- l'agar non viene metabolizzato dalla maggior parte dei batteri;
- liquidi a temperature 80 °C, vengono aliquotati in contenitori sterili (capsule Petri) dove gelificano a temperature di 42-47 °C;
- consentono un esame qualitativo (aspetti coloniali macroscopici) e quantitativo (stima della carica batterica) dell'isolamento.

Sulla base dello **stato chimico:**

- Terreni a **composizione chimicamente definita:** molto costosi, utilizzati esclusivamente per l'identificazione di batteri con particolari esigenze nutrizionali., dalla composizione chimica definita con precisione e provvisi delle sostanze di cui il batterio necessita nelle definite quantità
- Terreni a **composizione chimicamente indefinita:** di frequente utilizzo, contengono sostanze naturali (peptone, siero, sangue, estratto di lievito etc.).
- Terreni **minimi:** utilizzati di rado, contengono carbonio, azoto, zolfo e fosforo sotto forma di sali inorganici, aggiunti a concentrazione nota.
- Terreni di **arricchimento:** più frequentemente utilizzati, contengono sangue, siero, estratto di lievito, infuso di cuore e cervello, carboidrati e aminoacidi per facilitare la crescita di microrganismi patogeni particolarmente "esigenti" dal punto di vista nutritivo.
- Terreni complessi :molto ricchi di sostanze naturali chimicamente poco definite.
- Terreni di base: utili per coltivare batteri che non presentano particolari esigenze nutritive

Sulla base delle info che forniscono:

- Terreni **NON SELETTIVI:** consentono la crescita batterica di gran parte delle specie note.
- Terreni **SELETTIVI:** consentono la crescita di una (alcune) specie batteriche, inibendo la crescita delle rimanenti. *Vengono aggiunte delle sostanze che li rendono capaci di svolgere azione di batterio stasi verso tutti i batteri, fatta eccezionale per quelli che si desidera coltivare.*
- Terreni **ELETTIVI:** favoriscono la crescita di una o alcune specie batteriche, sebbene non inibiscano la crescita di altre.
- Terreni **DIFERENZIALI:** consentono di differenziare le specie batteriche sulla base delle loro caratteristiche biochimiche. Possono essere anche selettivi. *Si aggiungono sostanze e indicatori in grado di rilevare peculiari attività metaboliche che si verificano nel terreno in seguito alla crescita della specie studiata → permettono di differenziare le varie specie di appartenenza.*

TERRENI NON SELETTIVO :

Privi di inibitori, consentono la crescita della maggior parte delle specie microbiche. Tra i più frequentemente impiegati ricordiamo:

- **Agar sangue:** contiene il 5% sangue montone/cavallo, evidenzia la attività emolitica: - α-emolisi = emolisi parziale, dà luogo alla formazione di un alone verde intorno alla colonia per degradazione della bilirubina a biliverdina (streptococchi viridanti; S. pneumoniae, E. faecalis); - β-emolisi = emolisi completa, dà luogo alla formazione di un alone trasparente intorno alla colonia (S. pyogenes, S. agalactiae, S. aureus); - γ-emolisi = mancanza di emolisi (streptococchi viridanti, E. faecalis).
- **Agar cioccolato:** contiene emoglobina (emina o fattore X), NAD (fattore V) e vitamine, per l'isolamento di germi "esigenti" dal punto di vista nutritivo (Haemophilus spp., Neisseria spp., S. pneumoniae). Il caratteristico color cioccolato deriva dal trattamento termico del sangue che ne causa la emolisi e, quindi, il rilascio dei fattori di crescita.
- **Brodi nutrienti:** a composizione chimica ricca, consente la crescita della maggior parte dei batteri (es. brodo di soia-caseina, infusione cuore-cervello, etc.)

TERRENI SELETTIVI:

- \* Questi terreni consentono la crescita di particolari specie microbiche grazie alla presenza di agenti selettivi, tra cui: coloranti: cristalliolettivo, verde brillante, fucsina basica
  - \* Antibiotici: con attività batteriostatica/battericida vs "contaminanti"
- Vengono utilizzati per l'isolamento di microrganismi patogeni presenti in campioni prelevati da siti caratterizzati da una flora microbica residente (ossia «contaminati»: cute, faringe, naso, intestino, vagina). Tra i più frequentemente utilizzati:

- **Cetrimideagar:** contiene cetrimide, composto dell'ammonio quaternario, che inibisce la crescita di tutti i microrganismi eccetto P. aeruginosa.
- **Thayer-Martinagar** (agar cioccolato addizionato di vancomicina, colistina, trimetoprim lattato e nistatina): selettivo per Neisseriaceae patogene.
- **MacConkeyagar:** contiene sali biliari e cristalliolettivo, che inibiscono la crescita dei Grampositivi; selettivo per Enterobacteriaceae.
- **MannitolSalt agar:** elevata concentrazione NaCl (7.5%), selettivo per stafilococchi.
- **SS agar** (sodio citrato, sali biliari, verde brillante): selettivo per Salmonella e Shigella spp.
- **Terreni riducenti:** solidi o liquidi, contengono composti chimici che si combinano chimicamente con O2 atmosferico fino ad esaurirlo (agenti riducenti: tioglicolato di sodio, acido ascorbico, etc.). Selettivi per gli anaerobi.

TERRENI DIFERENZIALI:

NORME DI SICUREZZA applicate quando si manipolano i terreni di coltura :

- ✓ Bisogna tener presente che alcuni terreni contengono componenti tossici o cancerogeni .
- ✓ Per ogni prodotto, verifico gli eventuali dati di pericolosità forniti dalle aziende.
- ✓ Adotto precauzioni per evitare il contatto, l'inhalazione e l'ingestione (cappe, mascherini, guanti)
- ✓ Controllo se il terreno contiene sodio azide reagisce con molti metalli e può formare delle azidi, che sono esplosive . Va fatta scorrere accuratamente l'acqua .
- ✓ Nel prelevare i terreni dall'autoclave, faccio attenzione a non esporre il viso , mettendomi di lato.

Fattori che influenzano la crescita nei terreni di coltura :

1. Temperatura
2. Ossigeno : i batteri aerobi si sviluppano solo in presenza di ossigeno gli anaerobi non ne necessitano .
3. CO<sub>2</sub> : possono necessitarla per la sintesi di acidi grassi o di fattori di virulenza o per la costruzione della loro capsula. Necessitano il 5-10% ed è ottenibili in termostati di anidride carbonica o tramite la produzione in Gas pack mettendo dentro dei sacchetti che la liberano.
4. Fattori di accrescimento (siero, sangue) : vanno aggiunti dopo la sterilizzazione in quanto sono termolabili e vanno messi in terreno quando ha raggiunto i 50-55°C

**I gas pack** : sono contenitori cilindrici in plastica . Al momento dell'uso al suo interno viene inserita una bustina contenente boriciduro di sodio, acido tartarico, bicarbonato di sodio, a cui si aggiunge acqua --> in questo modo, dalla bustina si libera idrogeno e anidride carbonica ( intorno al 7-10% ). L'idrogeno permette di consumare ossigeno, perché si ha la formazione di acqua . ( l'idrogeno si lega all'ossigeno presente nell'aria, formando acqua)

**INCUBAZIONE DEI BATTERI:**

- a) Incubazione di tipo aerobio = i microrganismi aerobio non presentano difficoltà d'incubazione poiché la presenza di ossigeno non condiziona il loro sviluppo.
- b) Incubazione di tipo anaerobio = per quanto riguarda i microrganismi anaerobi obbligati e i microaerofili dove l'incubazione deve essere attuata con una serie di procedure atte ad allontanare o ridurre la presenza dell'aria. L'allontanamento dell'aria può essere effettuato modificando l'ambiente o modificando il terreno di coltura (aggiungendo sostanze riducendo o facendo bollire il terreno e aggiungere sopra della vasellina).

Per i batteri anaerobi si ha la possibilità di usare la **cappa per anaerobi** che è costruita da un sistema atto a garantire l'ermeticità --> che impedisce all'aria di fluire al suo interno. È formata da due scomparti:

- Una precamera= viene immerso il materiale da isolare, identificare e sviluppato ( crescono anche qui i batteri). È presente una atmosfera di azoto, idrogeno e anidride carbonica ( è rimosso l'ossigeno).
- Una camera da lavoro = vi si accede mediante dei guanti montati sulla cappa e anche qua, l'atmosfera non preclude la presenza dell'ossigeno ( perché i batteri anaerobi sono sensibili all'ossigeno e muoiono in presenza di quest'ultimo).

Gli **agenti riducenti** si aggiungono al terreno di coltura come cisteina, acido ascorbico, glutadiene, acido tioglicolico.

I principali terreni di coltura utilizzati in microbiologia:

**Agar sangue** = che contiene peptone + cloruro di sodio + 5% sangue di pecora defibrinato (elemento caratterizzante). È un terreno definito ricco, non è selettivo . È utile per lo sviluppo di molti microrganismi, tranne quelli particolarmente esigenti. Inoltre, è usato per evidenziare i batteri che producono emolisine ( distruggono i globuli rossi, provocando la formazione di aloni sul terreno di Agar sangue).

**CNA** contiene peptone, estratto di lievito e il 5% di sangue di pecora. È un terreno selettivo per i cocci Gram positivi, quali gli stafilococchi e i streptococchi . È selettivo perché contiene acido nalidixico e colistina che impediscono ai batteri Gram negativi di crescere su questo terreno. Il sangue permette di evidenziare le caratteristiche di emolisi dei batteri Gram positivi .

**Agar cioccolato**= ottenuto con il riscaldamento dell'agar a 80°C per 10 minuti . È un terreno ricco che permette lo sviluppo di batteri esigenti in quanto la cottura libera fattori di accrescimento che nell'agar sangue non sono presenti. Si riconosce dal colore simile a quello del cioccolato.

**Schaendler agar**= il KKV è uno Schaendler modificato e specifico per l'isolamento dei batteri Gram positivi anaerobi. Contiene sangue defibrinato di montone + vitamina K + L-cistina, emina ed altri supplementi selettivi . È raccomandato per l'isolamento dei batteri anaerobi.

**MacConkey**= terreno selettivo e differenziale.

La selezione è data dal cristalliolettio e dei Sali biliari . È usato per crescita degli enterobatteri ( che sono batteri Gram positivi).

È differenziale per la presenza del lattosio che evidenzia la capacità fermentante questo zucchero. --> Le colonie di batteri fermentanti il lattosio appariranno di colore rosa acceso.

Quindi, i batteri crescono sul terreno MacConkey e fermentano il lattosio secondo alcune modalità, perché si hanno:

- Batteri che lo fermentano in maniera molto forte . Producono colonie rosse e i Sali biliari precipitano.
- Batteri che fermentano il lattosio, come? Seguendo la via 2,3-butilenglicole . Anche questi producono delle colonie rosse ma non si ha la precipitazione dei Sali biliari.
- Batteri che fermentano debolmente il lattosio. Formano colonie che appaiono dopo circa 24 h in maniera in colore per poi diventare, pian piano, rosate dopo le 24/48 ore.
- Batteri che non fermentano il lattosio. Producono colonie incolore o trasparenti.

**Mannitol Salt Agar** : è un terreno selettivo per l'isolamento di stafilococchi presunti patogeni . l'azione selettiva è dovuta all'elevata concentrazione di NaCl. È differenziale perché permette di differenziare la crescita dell'Aureus .

**Sabouraud**: terreno per i funghi e i miceti. È un terreno acido usato per l'isolamento dei miceti : infatti, il PH acido inibisce la crescita (in parte) dei batteri, mentre l'elevata concentrazione di zuccheri .

È un terreno caratterizzato da un'alta percentuale di zuccheri e da un PH basso (5,6), pertanto il PH acido sfavorisce la crescita dei batteri mentre l'alta concentrazione di zuccheri favorisce la crescita dei miceti .

**Tioglicolato**: l'uso dei terreni tioglicolati è raccomandato nell'isolamento e nella coltivazione dei microrganismi anaerobi obbligati a crescita lenta o di microrganismi esigenti presenti nei materiali clinici. Viene spesso supplementato dalla resazurina ovvero un indicatore di ossido riduzione --> la resazurina si presenta di colore rosa se viene ossidata, mentre è incolore se viene ridotta.

**Hektoen Enteric Agar** : è un terreno differenziale e selettivo per l'isolamento dei batteri patogeni della flora intestinale da campioni enterici. La presenza del tio-fosfato e dei Sali di ferro in questo terreno permettono di evidenziare la produzione di acido solfidrico. l'acido solfidrico causa la precipitazione del solfuro di ferro, con la formazione di colonie con il centro nero.

**Salmonella Shigella Agar** : è un terreno differenziale e selettivo per l'isolamento di enterobatteri patogeni, in particolare quelli appartenenti al genere Salmonella.

La composizione di questo terreno (SS) : Sali biliari, verdi brillante e citrati --> inibiscono i Gram positivi e gli entero batteriacee diverse da salmonelle e shighele .

**Centrimide agar**: il terreno è utilizzato per l'isolamento di Pseudomonas aeruginosa. Infatti, il centrimide inibisce la formazione di numerosi batteri tra i quali le altre Pseudomonas (mentre la Pseudomonas aeruginosa continua a crescere) . È composto da cloruro di magnesio e solfato di potassio che stimolano la produzione di piocianina ( caratteristica di questo microrganismo ovvero un pigmento= che conferisce un colore verde alle colonie).

- **MannitolSalt agar**: elevata concentrazione NaCl (7.5%), selettivo per stafilococchi.
- **SS agar** (sodio citrato, sali biliari, verde brillante): selettivo per Salmonella e Shigella spp.
- **Terreni riducenti**: solidi o liquidi, contengono composti chimici che si combinano chimicamente con O<sub>2</sub> atmosferico fino ad esaurirlo (agenti riducenti: tioglicolato di sodio, acido ascorbico, etc.). Selettivi per gli anaerobi.

**TERRENI DIFFERENZIALI:**

Contengono ingredienti in grado di differenziare particolari specie (o gruppi) microbiche sulla base della capacità di fermentare specifici carboidrati:

- carboidrati (zuccheri);
- indicatori di pH (rosso fenolo, rosso neutro, blu di bromofenolo). La fermentazione del carboidrato causa il rilascio di prodotti acidi della via fermentativa causando una acidificazione del terreno, prontamente indicata dal viraggio dell'indicatore di pH (e della colorazione delle colonie).

Esempi:

- **Agar sangue** (5% di montone oppure cavallo) per evidenziare la capacità di emolisi dei batteri: α-emolisi, β-emolisi, γ-emolisi.
- **MacConkeyagar** (cristalliolettio, lattosio, rosso neutro), differenzia specie lattosiofermentanti (E. coli) da quelle non fermentanti (P. mirabilis, Salmonella spp, Shigella spp.).
- **MannitolSalt agar** (mannitolo, rosso fenolo), differenzia specie mannitolo-fermentanti (S. aureus) dalle non fermentanti (stafilococchi coagulanti-negativi). ▪ **SS agar**: il tiosolfato di sodio e citrato ferrico consentono di evidenziare la produzione di solfuro di idrogeno da parte delle colonie di Salmonella con aree centrali nere; il lattosio, per evidenziare capacità fermentanti.

La **semina del campione** è finalizzata all'ottenimento di colonie isolate, ossia sufficientemente distinguibili, necessarie per la successiva caratterizzazione del ceppo (es. identificazione, antibiogramma). Pertanto, soltanto i terreni agarizzati possono essere utilizzati a tal fine. Il terreno da impiegare viene adeguatamente scelto sulla base della tipologia del campione prelevato e del sospetto diagnostico.

Tecnica di semina per isolamento:

1. deporre una piccola quantità di materiale patologico da esaminare al margine della piastra (se il materiale è molto denso, prima stemperarlo con soluzione fisiologica o brodo sterile).
2. mediante l'utilizzo di una spatola o di un'ansa, distribuire il materiale sulla superficie del terreno in modo da avere la formazione di colonie ravvicinate nel primo tratto di semina e colonie isolate nell'ultimo tratto. Al fine di ulteriormente caratterizzare l'isolato (identificazione, tests antibiotico-sensibilità), una singola colonia verrà prelevata in sterilità, quindi coltivata nuovamente (sub-coltura) in adeguato terreno al fine di ottenere una coltura pura del microrganismo, ossia formata da cellule "clonali" (derivanti tutte dalla stessa cellula madre "progenitrice").

A seguito della semina del campione su opportuno terreno, esso verrà posto in un **incubatore**, in condizioni ottimali - in termini di temperatura, tensione di O<sub>2</sub> e tempo - per la crescita del microrganismo.

**OSSIGENO**

- ▶ Aerobi obbligati: crescono solo in presenza di O<sub>2</sub> atmosferico
- ▶ Aerobi facoltativi: crescono meglio in condizioni aerobiche che anaerobi
- ▶ Anaerobi obbligati: crescono solo in assenza di O<sub>2</sub> atmosferico
- ▶ Anaerobi facoltativi: crescono meglio in condizioni anaerobiche che aerobiche
- ▶ Microaerofili: crescono in ambienti con ridotta tensione di O<sub>2</sub>, in atmosfera addizionata di CO<sub>2</sub>

Ogni terreno di coltura è caratterizzato da un adeguato valore di **pH**. In alcuni casi è presente anche un "sistema tampone" atto a contenere eventuali variazioni di pH.

La **velocità** di crescita media è una caratteristica peculiare della specie batterica considerata.

I batteri possono essere caratterizzati e identificati mediante:

- \* Tecniche di microscopia: per la visualizzazione diretta del microrganismo .
- \* Isolamento in coltura e identificazione del microrganismo patogeno.
- \* Diagnostica molecolare: per l'individuazione di DNA o RNA microbico.
- \* Diagnostica sierologica.

→ Tecnica di microscopia: consente una prima osservazione dei microbi e la loro identificazione.

Microscopia in campo chiaro = tecnica che si avvale di un microscopio ottico provvisto di una fonte luminosa che illumina il campione posto sul vetrino, di un condensatore che fa convergere la luce sul campione e di un sistema di lenti (lenti dell'obiettivo e lenti dell'oculare). l'ingrandimento totale dell'immagine è il prodotto degli ingrandimenti dell'obiettivo e degli oculari.

Microscopia in campo oscuro= l'unica differenza è l'utilizzo di un condensatore che impedisce l'illuminazione diretta del campione da parte della luce trasmessa . Tale tecnica fa passare la luce intorno ai microrganismi e non attraverso .

Microscopia a contrasto di fase= consente una analisi dettagliata delle strutture interne dei microrganismi .

Si avvale di fasci di luce paralleli che vengono fatti passare attraverso il campione costituito da materiale di diversa intensità --> per cui la lunghezza d'onda che colpisce un dato materiale a minor intensità, si muoverà sfasata rispetto a un altro fascio che colpisce un corpo con maggior densità.

Microscopia a fluorescenza= sfrutta composti detti fluorocromi ovvero molecole in grado di assorbire lunghezze d'onda corte e di emettere energia a lunghezze d'onda più elevate.

**MICROSCOPIA ELETTRONICA:**

Impiega magneti al posto di lenti, ciò per far sì che un fascio di elettroni emessi da una fonte possa attraversare il campione e raggiungere uno schermo che permetterà la visione del processo. Esistono la microscopia a trasmissione ( il fascio di elettroni passa attraverso il campione) e la microscopia a scansione ( il fascio di elettroni attraversa il campione con un certo angolo di incidenza) .

- Tecniche per lo studio microscopico:

Ri ricorre all'esame a fresco per l'osservazione microscopica di microrganismi abbastanza grandi, mentre si usano tinteggiature per osservare al microscopio ottico i dettagli interni dei microrganismi.

**ESAME DIRETTO DA FRESCO**: nell'esame a fresco i campioni clinici e le sospensioni di microrganismi possono essere fissati su un vetrino ed esaminati direttamente con la microscopia in campo chiaro, in campo oscuro o a contrasto di fase . La preparazione = il campione viene sospeso in acqua o in soluzione salina, mescolato con gli alcali . Oppure si può utilizzare l'inchiostro di china ( che si mescola al campione sul vetrino), sostanza in grado di oscurare lo sfondo piuttosto che la cellula e viene utilizzata per individuare particolari microrganismi forniti di capsula. Sono impiegate colorazioni per colorare microrganismi o componenti cellulari, al più nota è la colorazione di Gram --> i batteri + appaiono blu-viola mentre i batteri - appaiono rossi. La colorazione di Ziehl-Neelsen è una colorazione acido resistente e viene utilizzata per colorare altri microrganismi acido resistenti ovvero caratterizzati da una parete a elevato contenuto di acidi grassi -->vi è l'esigenza di riscaldare il campione durante la colorazione e i batteri appaiono rossi su sfondo blu.

**INDAGINE CULTURALE**: l'isolamento in coltura dei microrganismi può portare alla loro identificazione. In base alle caratteristiche del campione clinico orientano la scelta del tipo di terreno : infatti si usano i terreni solidi per isolare un batterio mentre quello liquido lo si usa quando si vuole far crescere più colture di batteri già isolati in coltura pura.

- Terreni di arricchimento, "nutritivi" = sono costituiti da un terreno di base integrato con sangue, infusi di cuore o cervello, estratti di lievito, nutrienti in grado di stimolare la crescita di microrganismi particolarmente esigenti.
- Terreni selettivi= il terreno selettivo più comune è l'agar MacConkey, usato per individuare i microrganismi in grado di metabolizzare il lattosio. Un altro è l'Hektoen agr usato per differenziare i batteri che fermentano il lattosio/saccarosio da quelli non fermentanti . l'agar Thayer-Martin è un terreno selettivo composto da agar cioccolato integrato con vari antibiotici