

Differenze principali tra cellula eucariotica e procariotica

CARATTERISTICHE	<u>EUCARIOTI</u>	<u>PROCARIOTI</u>
Gruppi principali	Alghe, funghi, protozoi, piante ed animali	Batteri
Dimensioni (approssimative)	$> 5 \mu\text{m}$	Da $0,5$ a $3,0 \mu\text{m}$
Strutture nucleari		
Nucleo	Classica membrana	Nessuna membrana nucleare
Cromosomi	Filamenti di DNA	Un solo DNA circolare
	Genoma diploide	Genoma aploide
Strutture citoplasmatiche		
Mitocondri	Presenti	Assenti
Corpi del Golgi	Presenti	Assenti
Reticolo endoplasmatico	Presente	Assente
Ribosomi (coefficiente di sedimentazione)	80S (60S + 40S)	70S (50S + 30S)
Membrana citoplasmatica	Contiene steroli	Non contiene steroli
Parete	<u>È assente o formata da chitina</u>	<u>È una struttura complessa</u> contenente proteine, lipidi e peptidoglicano
Riproduzione	<u>Sessuata ed asessuata</u>	<u>Asessuata</u> (scissione binaria)
Movimento	Flagello complesso, se presente	Flagello semplice, se presente
Respirazione	Per mezzo di mitocondri	Per mezzo di membrane citoplasmatiche

Analisi di un campione microbiologico

(schema generale applicabile a BATTERI e FUNGHI)

CAMPIONE IN ESAME



ESAME MICROSCOPICO



COLTURA (scelta terreni e condizioni di coltura)

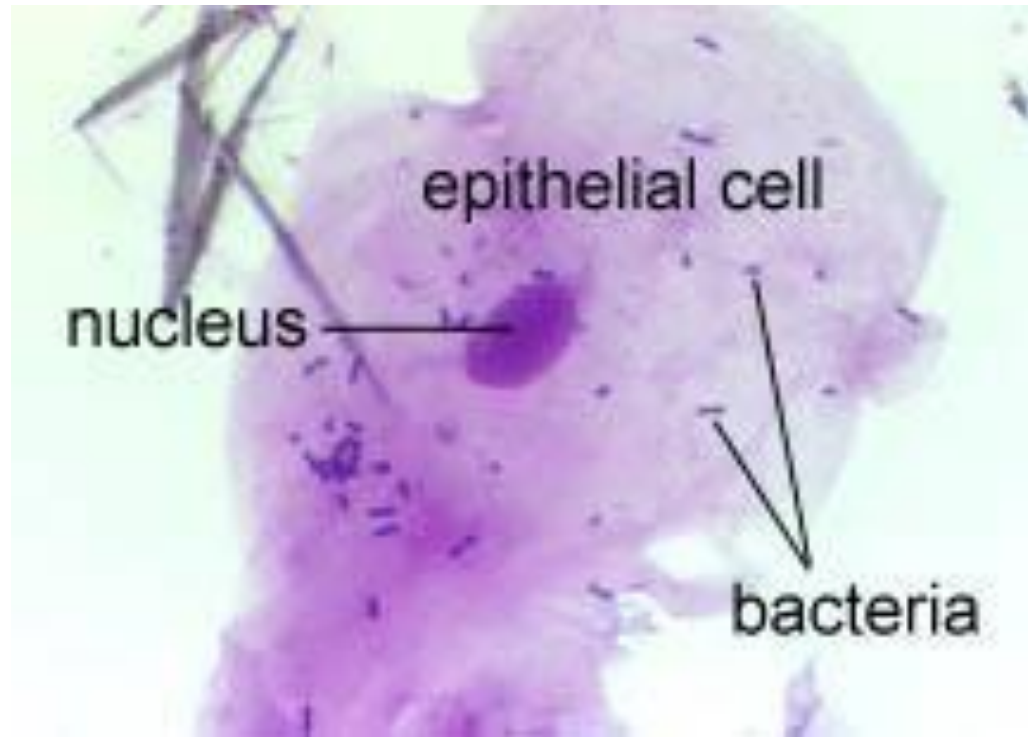
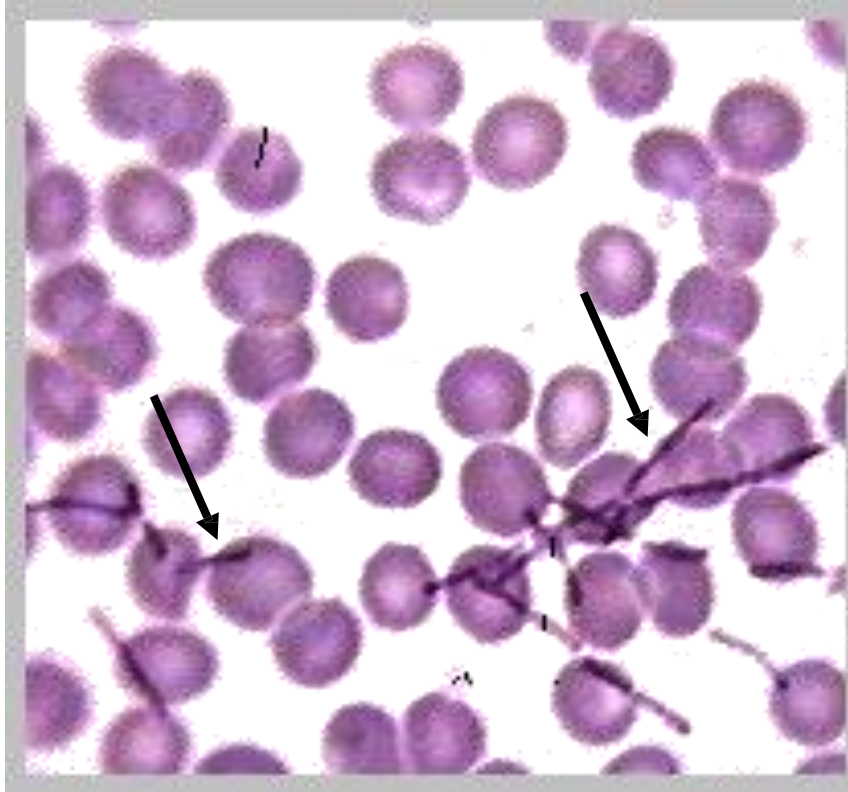


ISOLAMENTO (ottenimento colture pure)

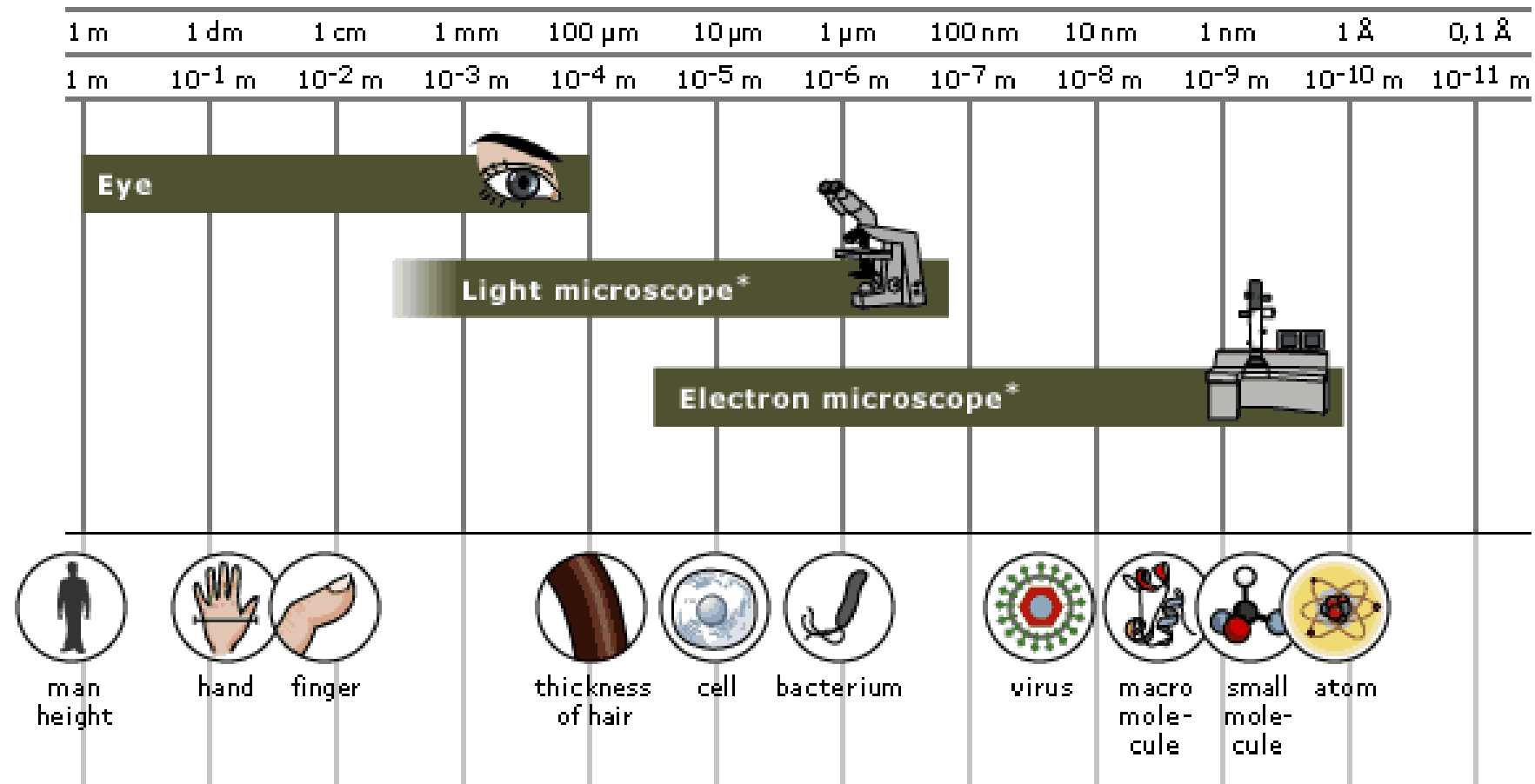


IDENTIFICAZIONE (morfologica, biochimica, sierologica, molecolare)

Dimensioni della cellula batterica



Capacità di risoluzione dell'occhio umano: 0.1 mm



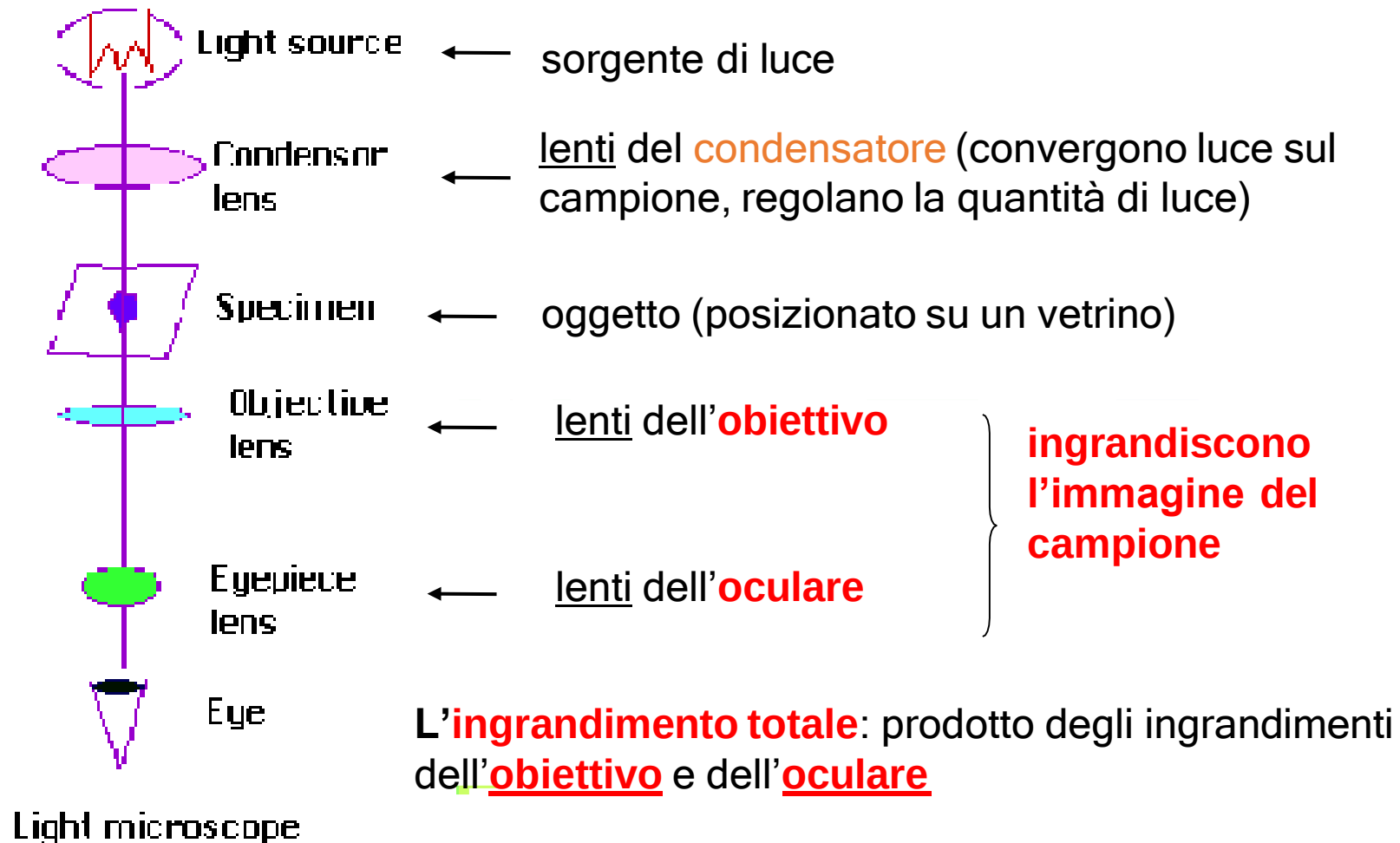
Analisi morfologica dei batteri: impiego del **microscopio**

morfologia “grossolana”: *microscopi ottici*

morfologia fine: *microscopi elettronici*

Studio microscopico dei microrganismi

Microscopia ottica



Microscopia ottica

Normalmente vengono usati 3 diversi obiettivi:

Basso ingrandimento (**x10**): per esaminare campione intero

Alto ingrandimento (**x40**): per osservare microbi di “grosse dimensioni”

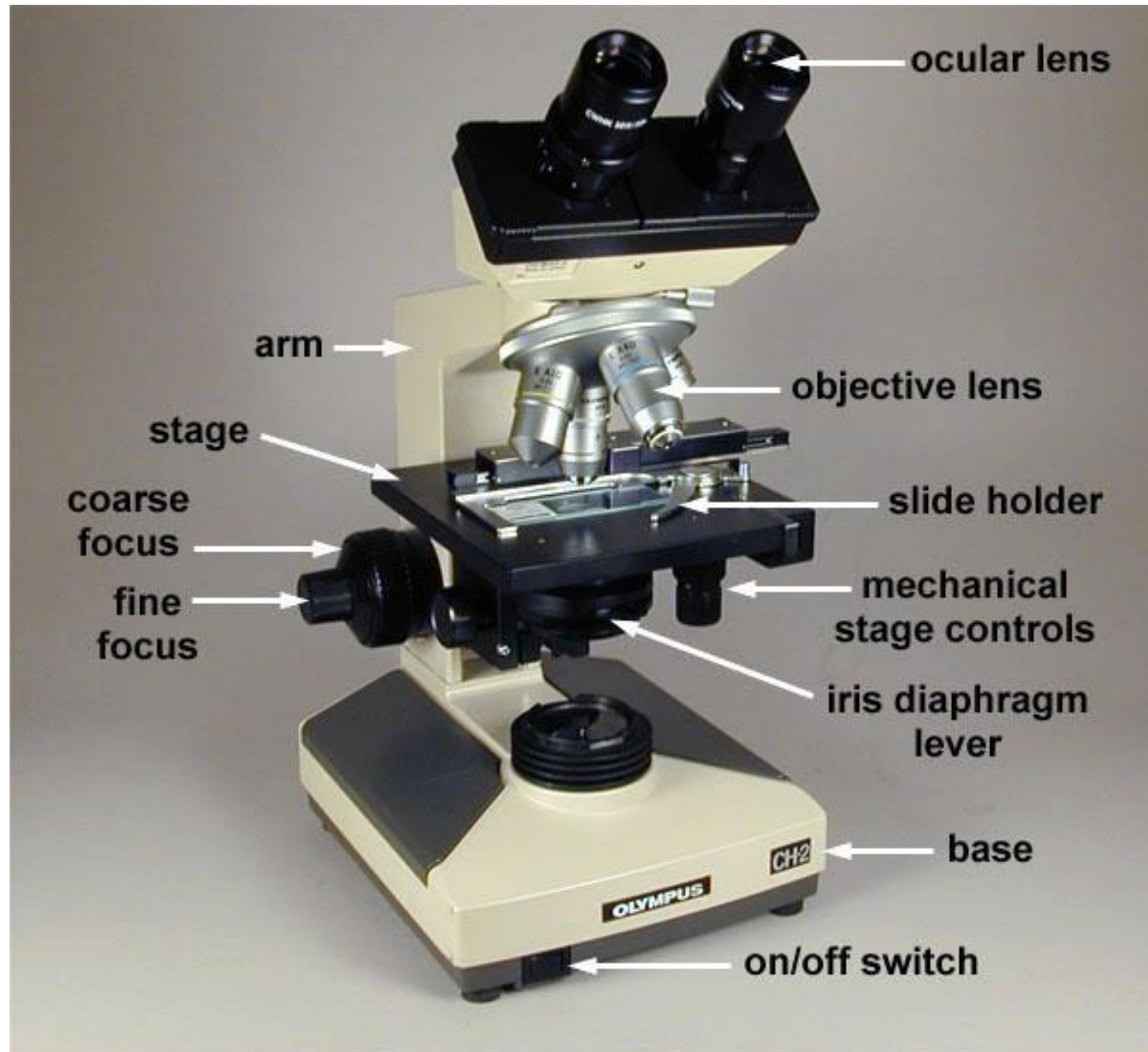
Ad immersione ad olio (**x100**): per osservare i lieviti ed i batteri (e dettagli morfologici di organismi più grandi e di cellule). L'olio è in grado di ridurre la dispersione della luce osservazione

Gli oculari possono ingrandire l'immagine (da **x10** a **x15**)

POTERE DI RISOLUZIONE: dipende

- 1) dalla **lunghezza d'onda** della luce
- 2) dall'**angolo di entrata** della luce **negli obiettivi**

Microscopio a campo chiaro: potere di risoluzione = **0.2 μm**



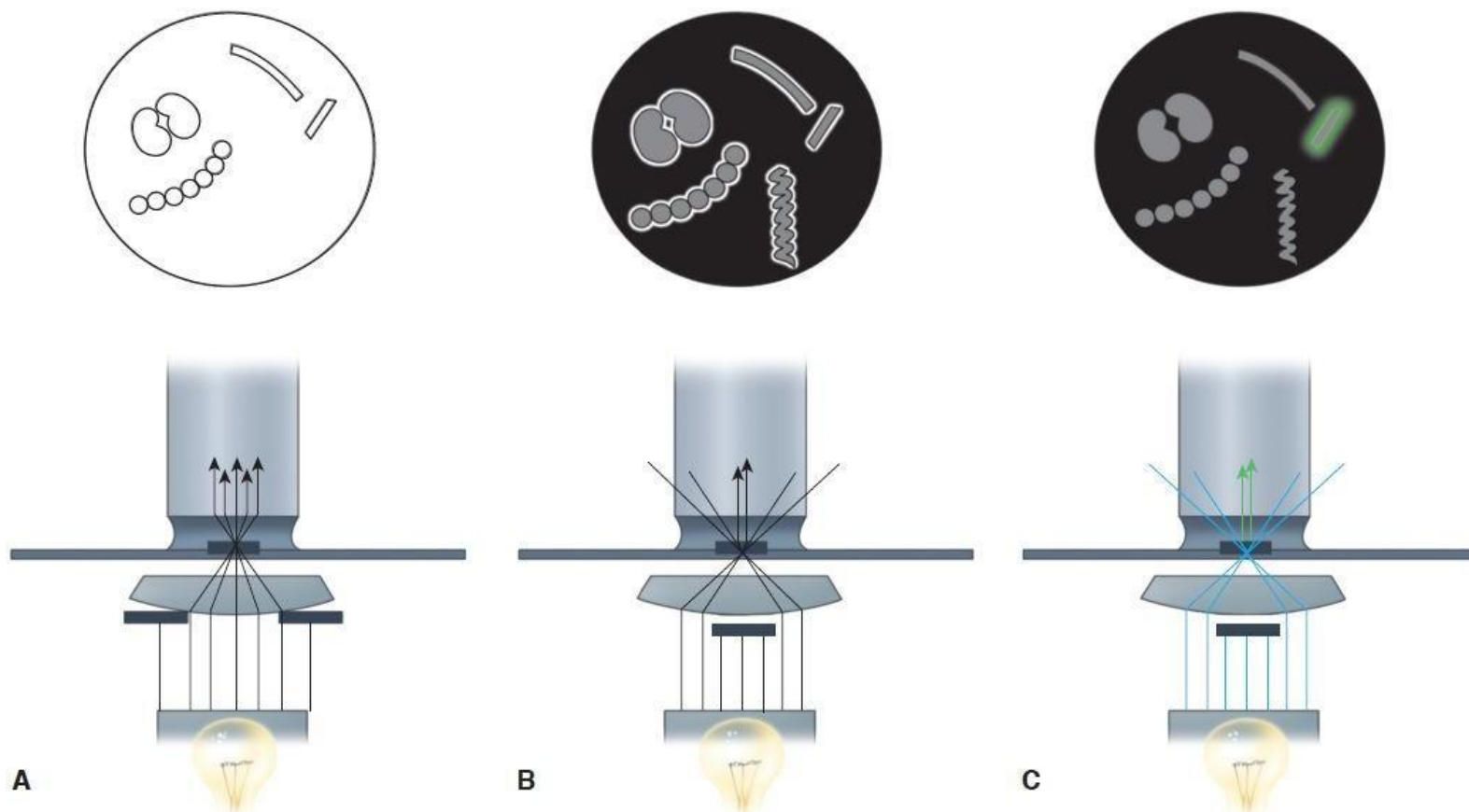


FIGURA 4-2. Microscopia in campo-chiaro, in campo-oscuro ed a fluorescenza. A. Illuminazione in campo-chiaro. Lo scopo è focalizzare la luce direttamente sulla preparazione per una visualizzazione ottimale contro uno sfondo chiaro. **B.** Nell'illuminazione in campo-oscuro, lo sfondo scuro è creato ostacolando il passaggio del fascio di luce centrale. La luce periferica è focalizzata in modo tale da essere convogliata dall'obiettivo solo quando è riflessa dalla superficie delle particelle (ad esempio i batteri). Il campo microscopico crea aloni di luce intorno ad alcuni batteri e permette di rivelare anche una spirocheta, di dimensioni troppo piccole per essere osservata con l'illuminazione in campo-chiaro. **C.** La microscopia a fluorescenza è più simile alla microscopia in campo-scuro, ad eccezione del fatto che la fonte luminosa è l'ultravioletto e che i microrganismi sono colorati con composti fluorescenti. La luce incidente genera una luce di lunghezza d'onda diversa, visibile come un alone (colorato, in questo tipo di illuminazione) che circonda solo i microrganismi marcati con i composti fluorescenti. Per la maggior parte dei composti fluorescenti la luce è verde.

Microscopia elettronica

Al posto di luce visibile e lenti:

fascio di elettroni (emessi da filamento di tungsteno) e magneti (**potere di risoluzione $0.001 \mu\text{m}$**):

m. elettronico a trasmissione: gli elettroni passano attraverso il campione

m. elettronico a scansione: gli elettroni passano attraverso il campione con un certo angolo di incidenza

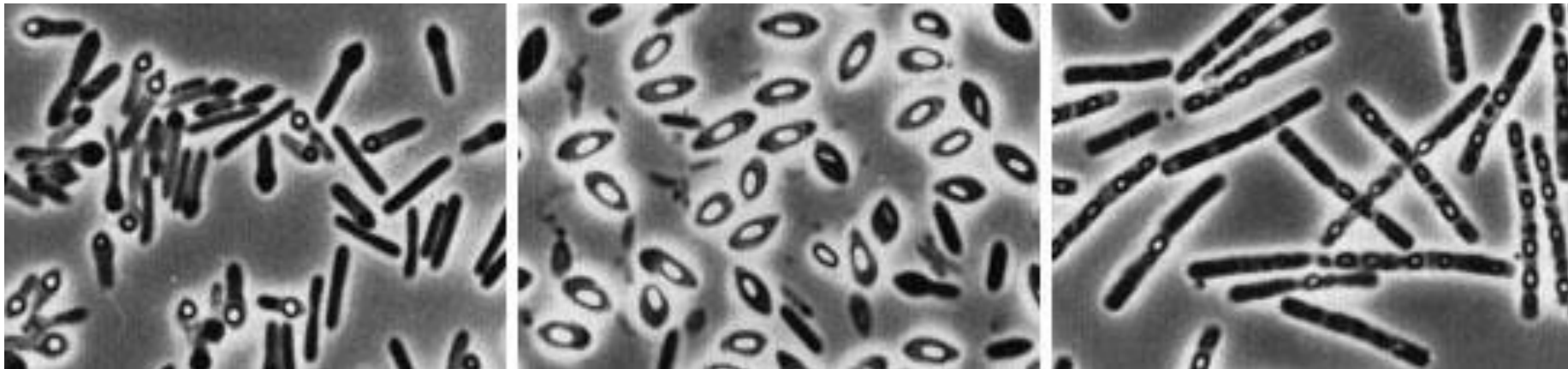
Studio microscopico dei microrganismi

- **Esame diretto, a fresco** (campo scuro/contrasto di fase): osservazione di cellule vive

Microscopia a campo scuro



Microscopia a contrasto di fase (dettagli interni)



Studio microscopico dei microrganismi

- Esame diretto, a fresco (contrasto di fase/campo scuro): osservazione di cellule vive
- Dopo **essiccamento e fissaggio del preparato**, **in seguito a colorazione**, in quanto i **batteri non sono visibili in campo chiaro** (indice di rifrazione protoplasma simile a quello del mezzo in cui sono presenti)

Colorazioni biologiche: per aumentare il contrasto.

Le *cellule batteriche* sono, a pH neutro, ***cariche negativamente***

L'allestimento di un preparato da sottoporre a colorazione prevede:

- 1) la **deposizione di una goccia di materiale** su un vetrino porta-oggetto
- 2) **l'evaporazione dell'acqua** attraverso debole riscaldamento fino a completo essiccamento
- 3) la **fissazione al calore o con metanolo**.

Colorazioni

Impiego di **coloranti**: soluzioni composte da **acqua** (o solventi organici) e da **una o più sostanze coloranti** con determinata affinità per i componenti cellulari:

c. **cationici (carica +)/ basici**: blu di metilene, cristalvioletto, safranina: si legano a strutture a carica negativa (**a. nucleico**)

c. **anionici (carica -)**: eosina, fucsina acida: si legano a strutture a carica positiva (**citoplasma**)

LE COLORAZIONI IN MICROBIOLOGIA

➤ Semplici

Soluzioni acquose o alcoliche di un singolo colorante basico.

Usate soltanto per evidenziare la presenza di batteri, la forma (blu di metilene, cristalvioletto, safranina) e la loro disposizione.

➤ Differenziali

Si utilizzano 2 coloranti diversi, mordenzanti (chimici) ed intensificanti (fisici)

Gram

Divide i batteri in 2 grandi gruppi (G+ e G-). I Gram- non trattengono il colorante primario ed assumono il secondario

Ziehl-Neelsen

Usata per distinguere i **Micobatteri** da altre specie. Possono essere acido-alcol resistenti anche **Nocardie** e **Actinomiceti**. I batteri appaiono di color rosso rubino su sfondo blu.

➤ Speciali

Negativa

per la dimostrazione della capsula batterica

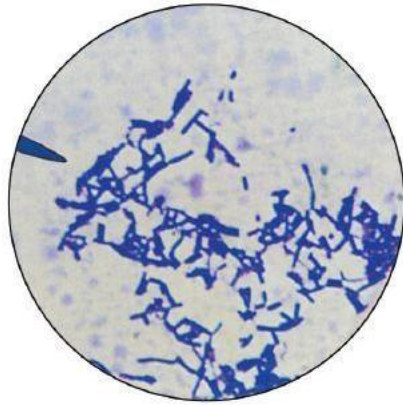
Spore

colorazione di Alessandrini, al verde malachite

Flagelli

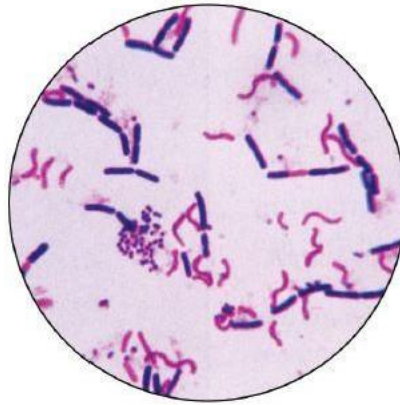
punta all'ispessimento del flagello con mordenti

Colorazioni semplici



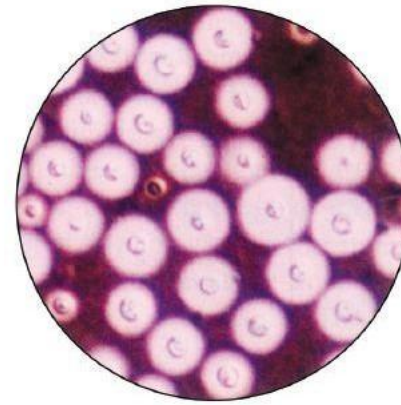
A Colorazione di *Escherichia coli* con cristalvioletto.

Colorazioni differenziali

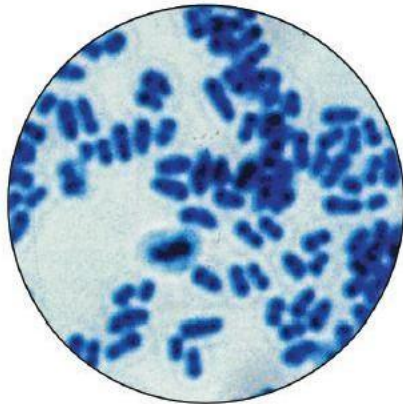


C Colorazione di Gram.
I batteri viola sono Gram positivi.
I batteri rossi sono Gram negativi.

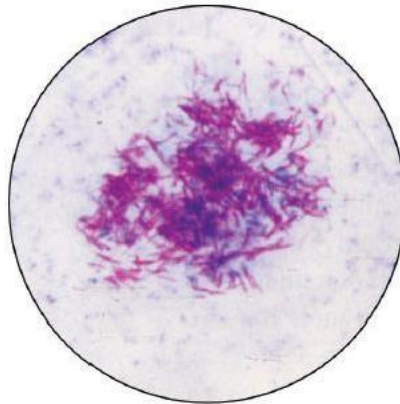
Colorazioni speciali



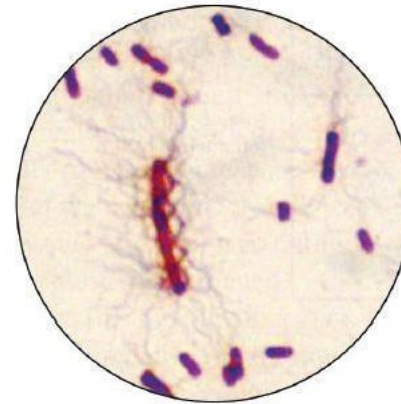
F Colorazione della capsula di *Cryptococcus neoformans* con inchiostro di china.



B Colorazione di *Corynebacterium* con blu di metilene.

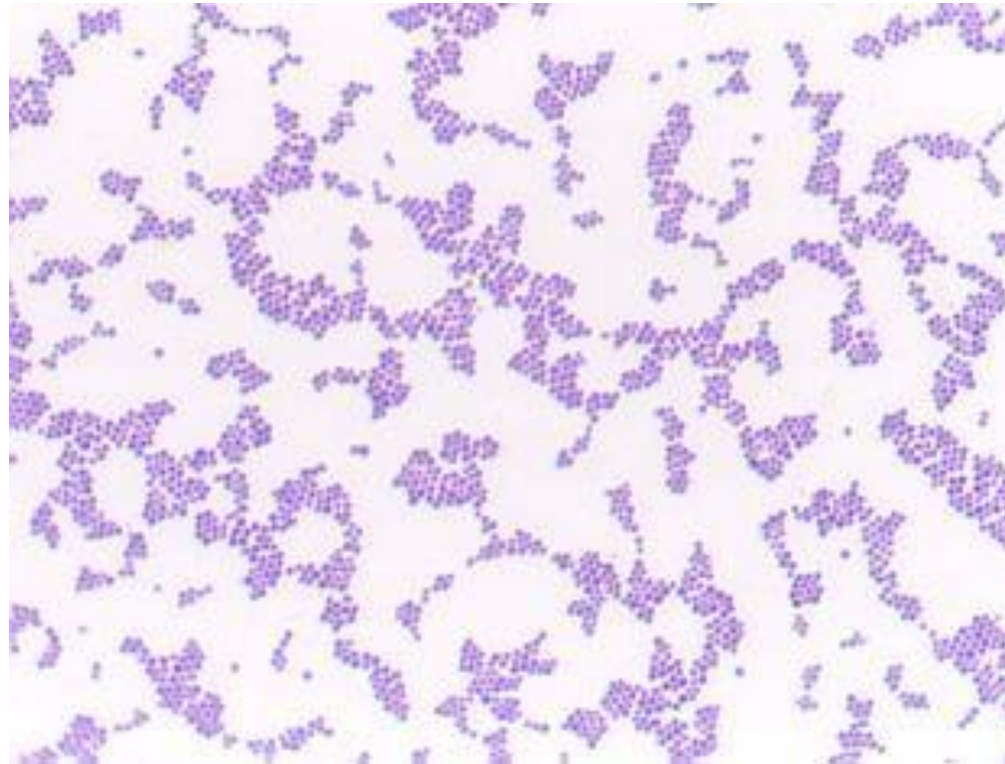


D Colorazioni dei batteri acido-resistenti.
I batteri rossi sono acido-resistenti.
I batteri blu non sono acido-resistenti.



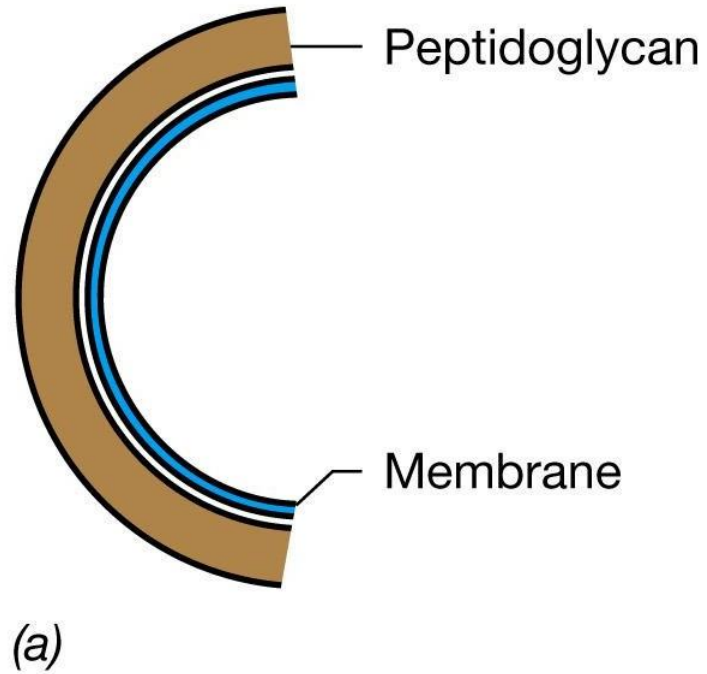
G Colorazione dei flagelli di *Proteus vulgaris*. È stata usata una colorazione di base per evidenziare i flagelli.

Microscopia ottica dopo colorazione di Gram

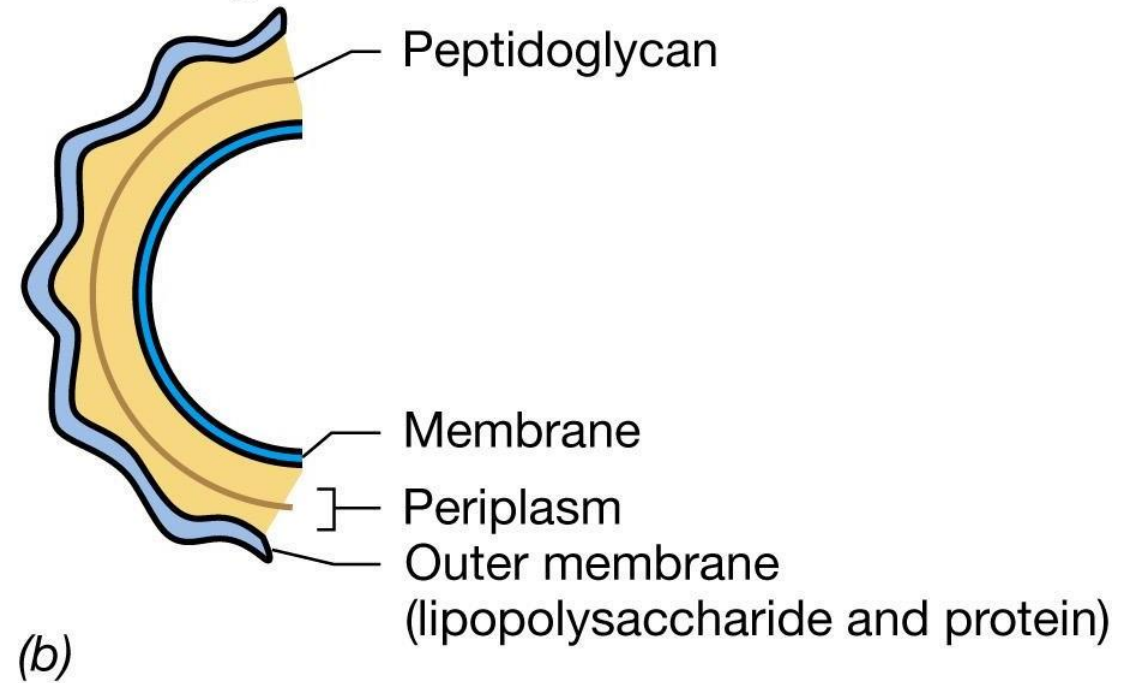


COLORAZIONE DI GRAM: DIFFERENTE COMPORTAMENTO

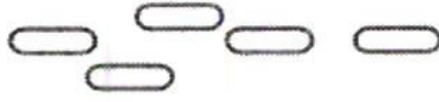
Gram-positive



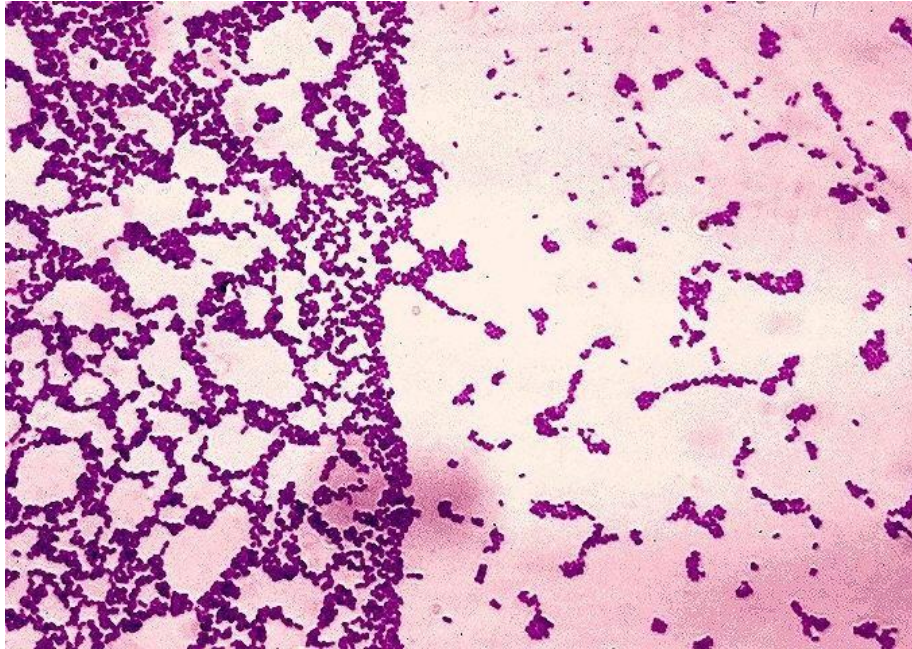
Gram-negative



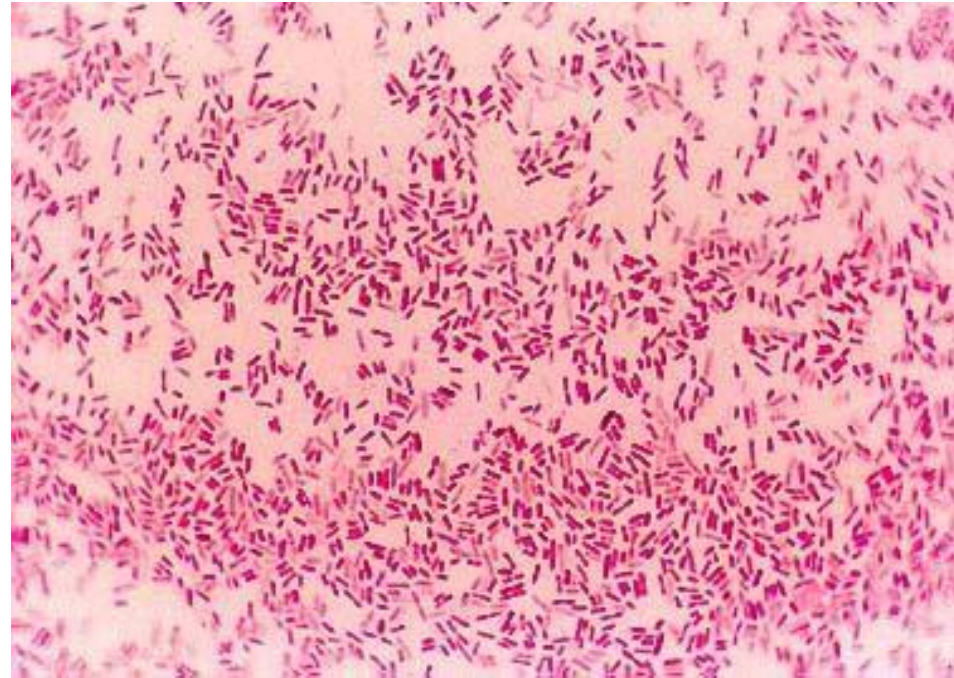
Colorazione di Gram

	Gram-positivo <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-negativo <i>Escherichia coli</i>	
1. colorante primario	1° stadio Cristal-violetto		
	2° stadio Soluzione iodurata di Gram		
	3° stadio Decolorante (alcool o acetone)		
2. colorante secondario	4° stadio Rosso safranina		

Gram positivi



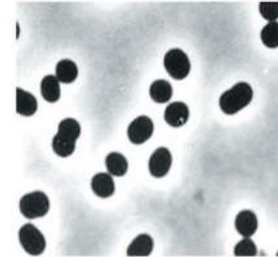
Gram negativi



Morfologia dei batteri



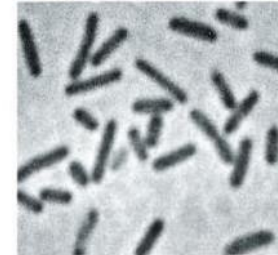
Cocco



Norbert Pfennig



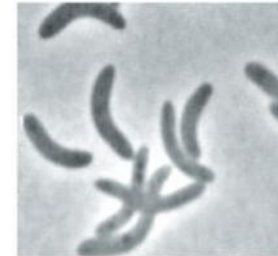
Bastoncello



Norbert Pfennig



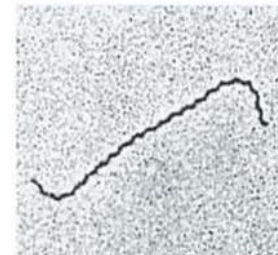
Spirillo



Norbert Pfennig

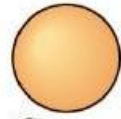


Spirocheta

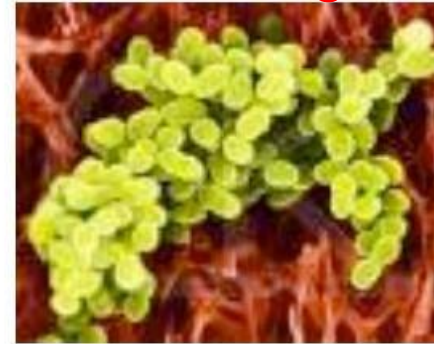


E. Canale-Parola

Al microscopio osserviamo la morfologia dei batteri



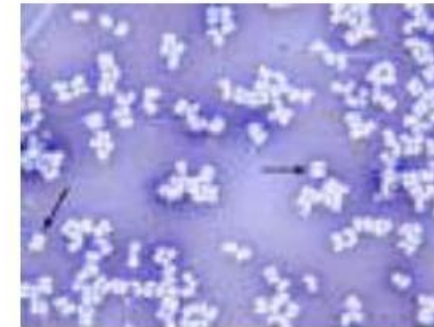
Coccus



grappoli



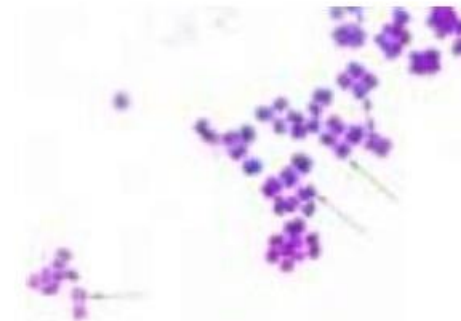
diplococchi



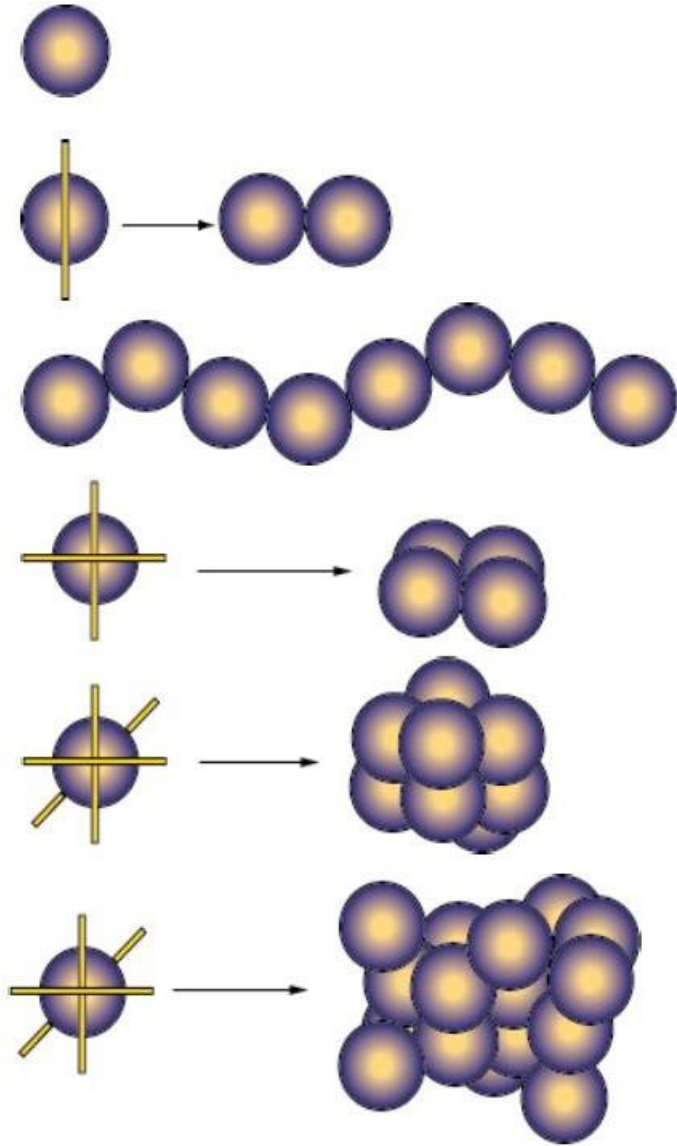
tetradi



streptococchi



sarcina



SEM 2 μm



SEM 3 μm



SEM 0,1 μm



SEM 2 μm



SEM 2 μm

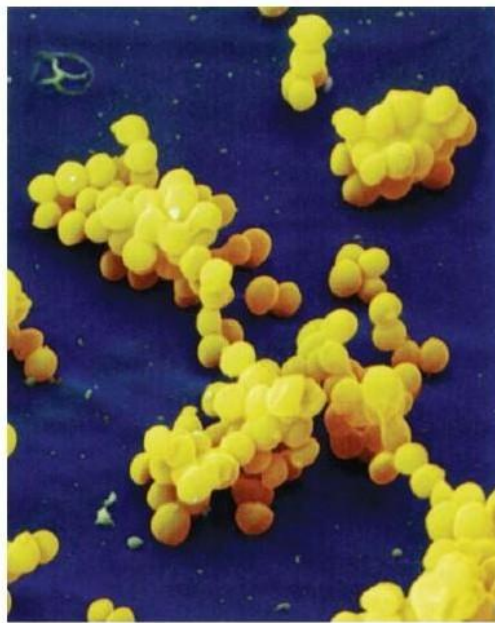
Batteri di forma sferica si dicono **COCCHI**

Divisioni su un unico asse formano catene di 2 cellule (**DIPLOCOCCHI**) o di più cellule (da 4 fino a 20) (**STREPTOCOCCHI**)

Divisioni secondo due piani differenti formano **TETRADI**

Divisioni secondo 3 piani differenti formano le **SARCINE**

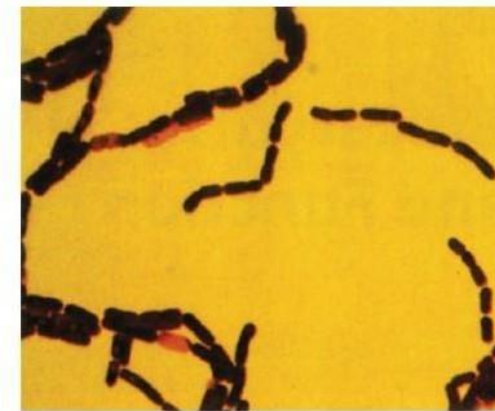
Divisioni secondo 3 piani differenti in modo irregolare sono tipiche degli **STAFILOCOCCI**



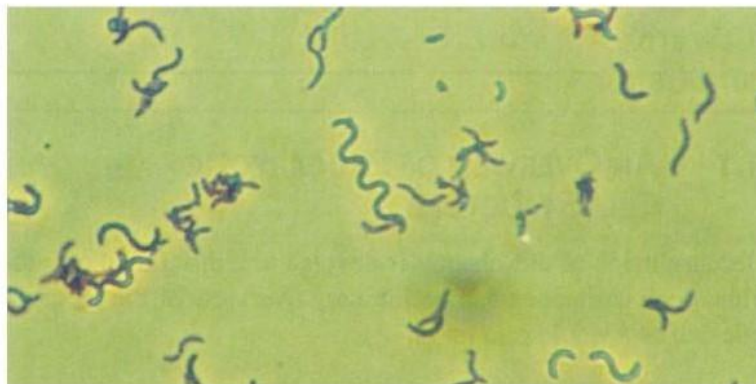
A



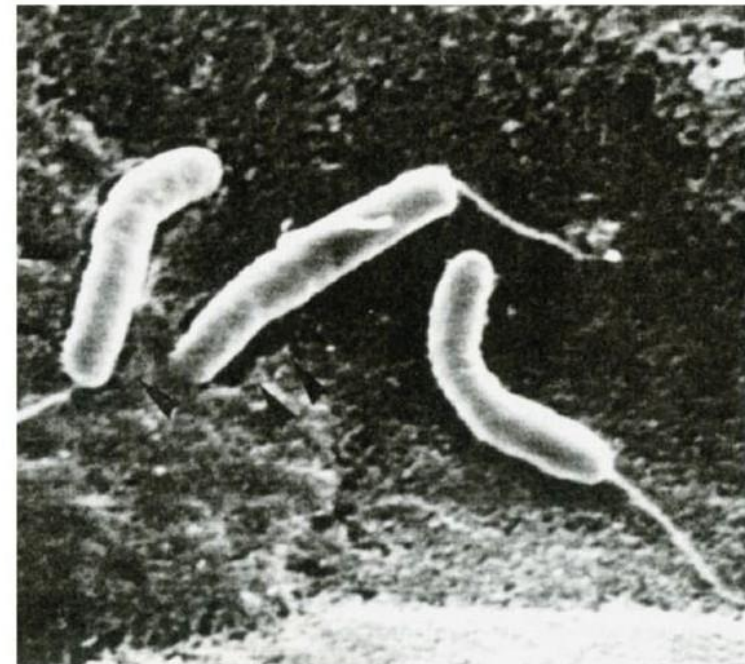
B



C



D



E

FIGURA 21-1. Morfologia della cellula batterica. **A.** *Staphylococcus aureus*, cocci disposti a grappolo: visti al microscopio elettronico a scansione (SEM). **B.** Streptococchi di Gruppo B, cocci disposti a catenella: SEM. **C.** *Bacillus* spp, bacillo: colorazione di Gram. **D.** Spirochete: contrasto di fase. **E.** *Vibrio*, bacillo ricurvo: SEM. (Riproduzione autorizzata da Willey J, Sherwood L, Woolverton C (eds). *Prescott's Principles of Microbiology*. New York: McGraw-Hill; 2008).

Morfologia: **cocchi** (bacca), a volte ovali

diametro: 0.5 μm

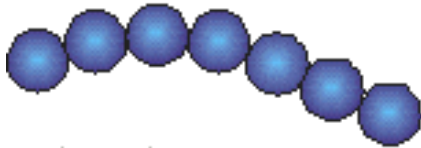
raggruppamenti: piani di divisione/tendenza a rimanere attaccati dopo divisione



coccus



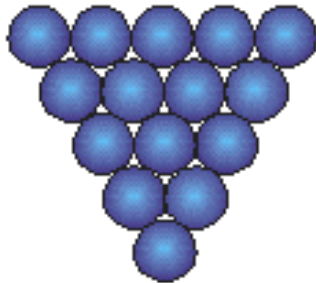
diplococcus



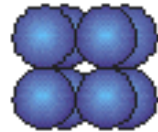
streptococcus



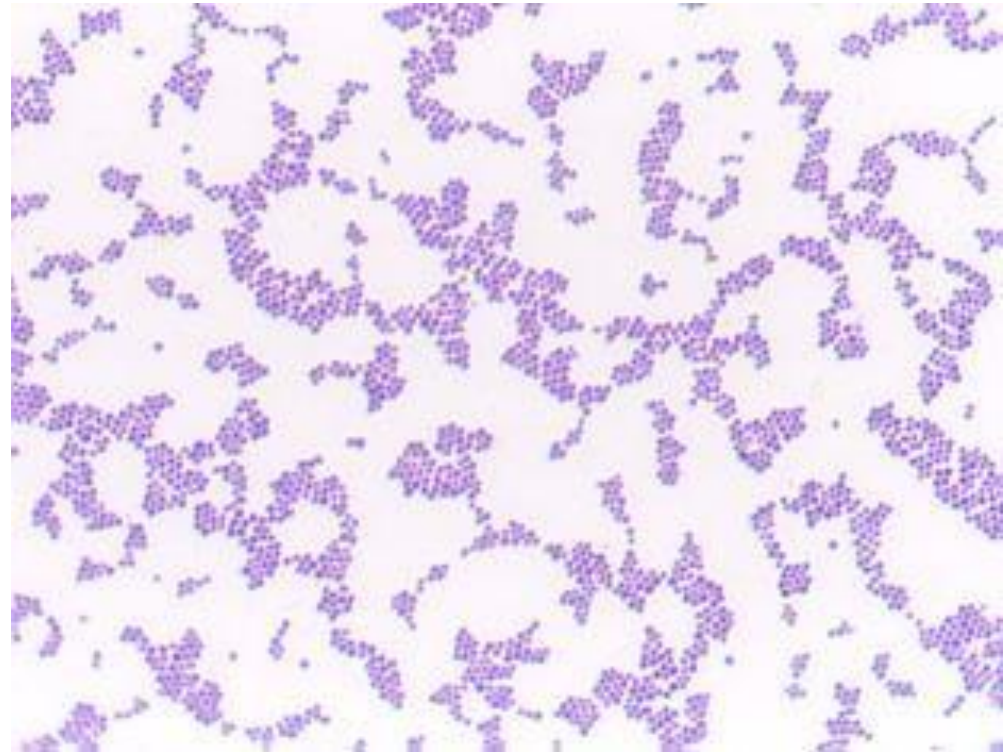
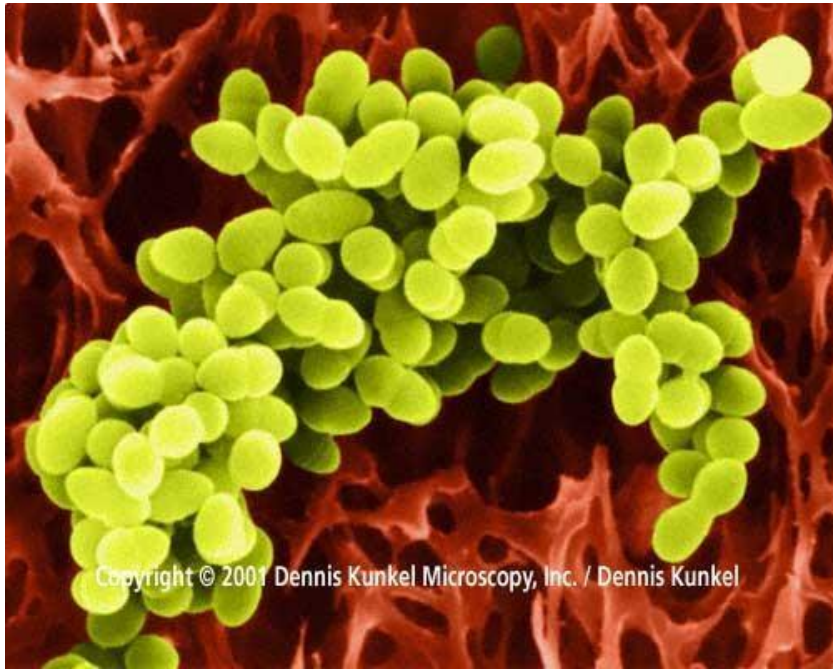
tetrad



staphylococcus

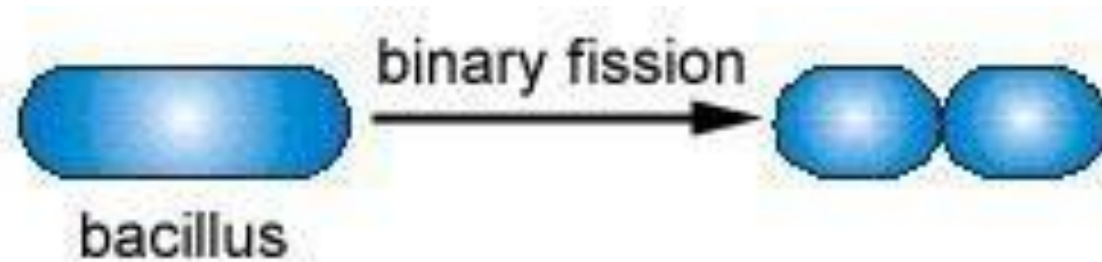


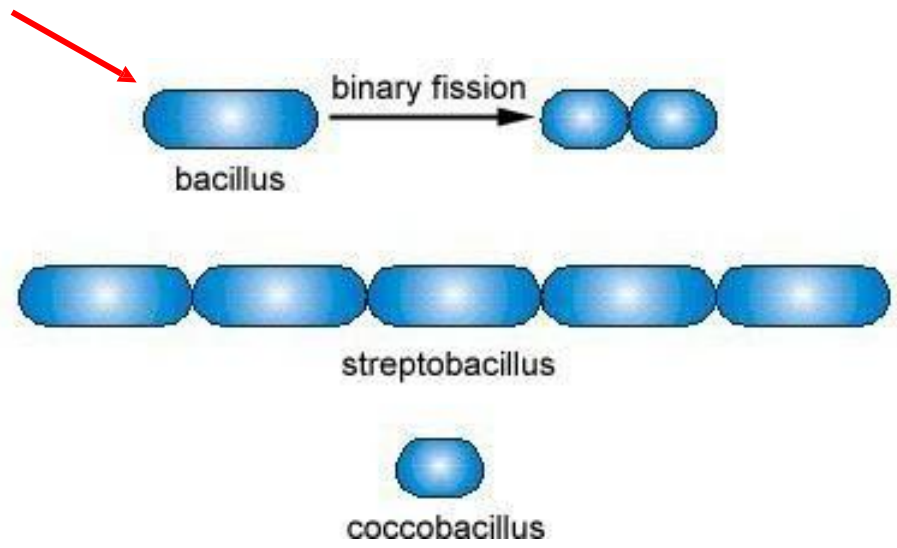
sarcina



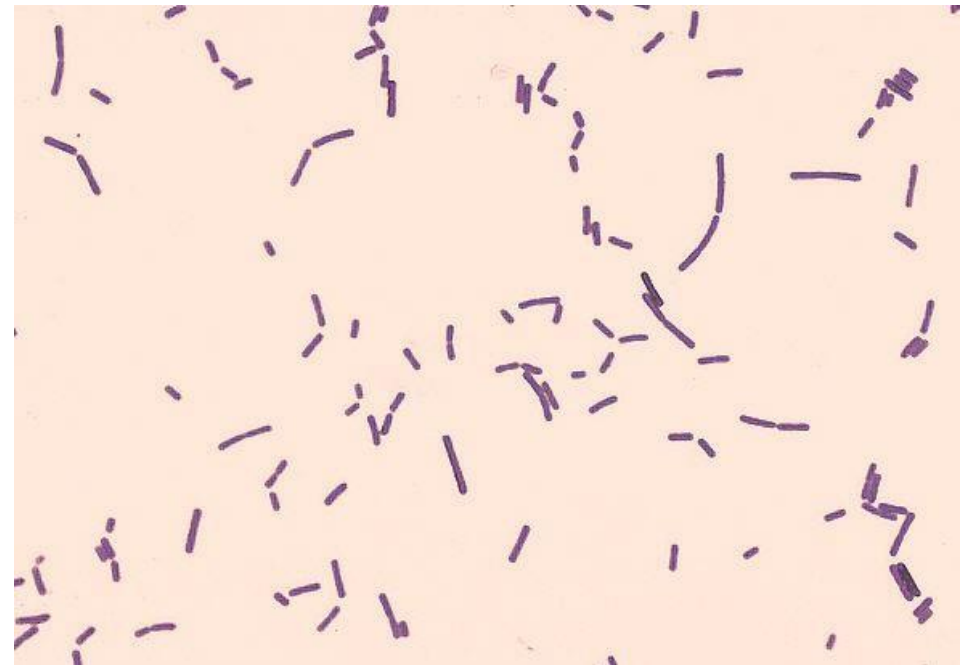
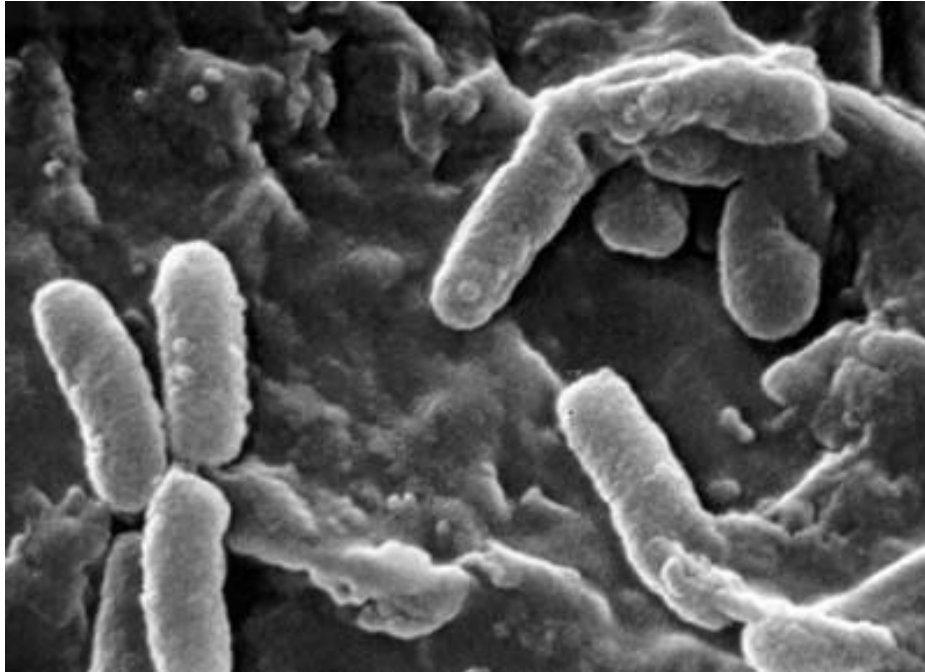
Morfologia: **bacilli** (bastone), a volte ovali

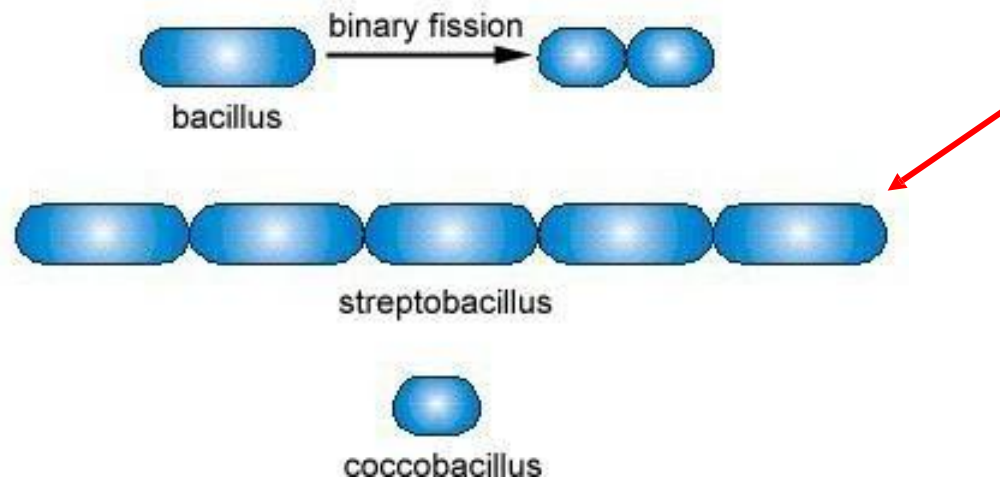
0.5-1.0 μm (larghezza) X 1-4 μm lunghezza





Bacillus





Streptobacillus

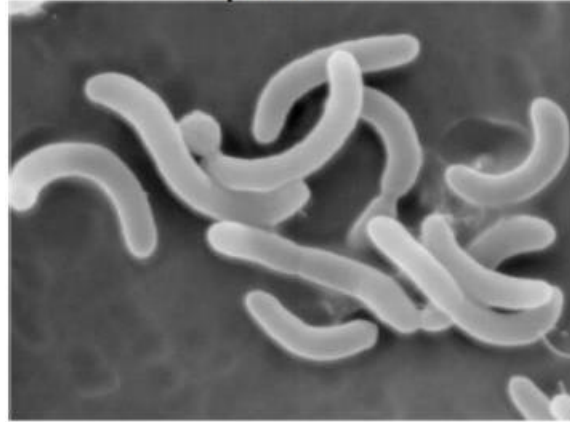


Morfologia: Vibrioni, spirilli e spirochete

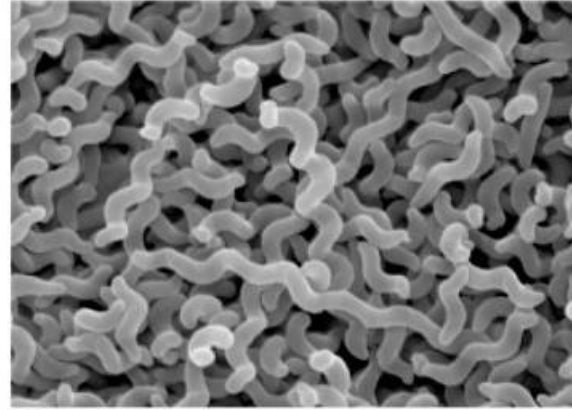
5-40 fino a 100 μm (lunghezza) X 0.25-0.5 μm larghezza



spirilli



(A)

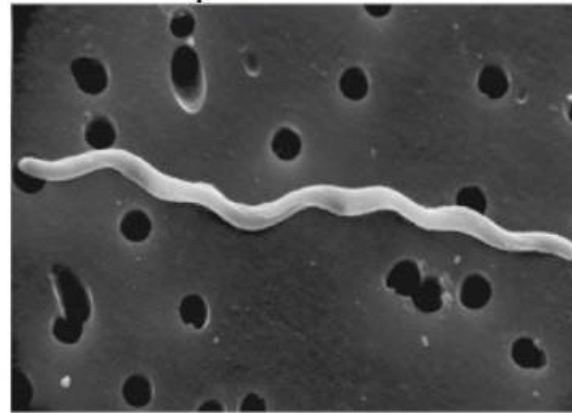


(B)

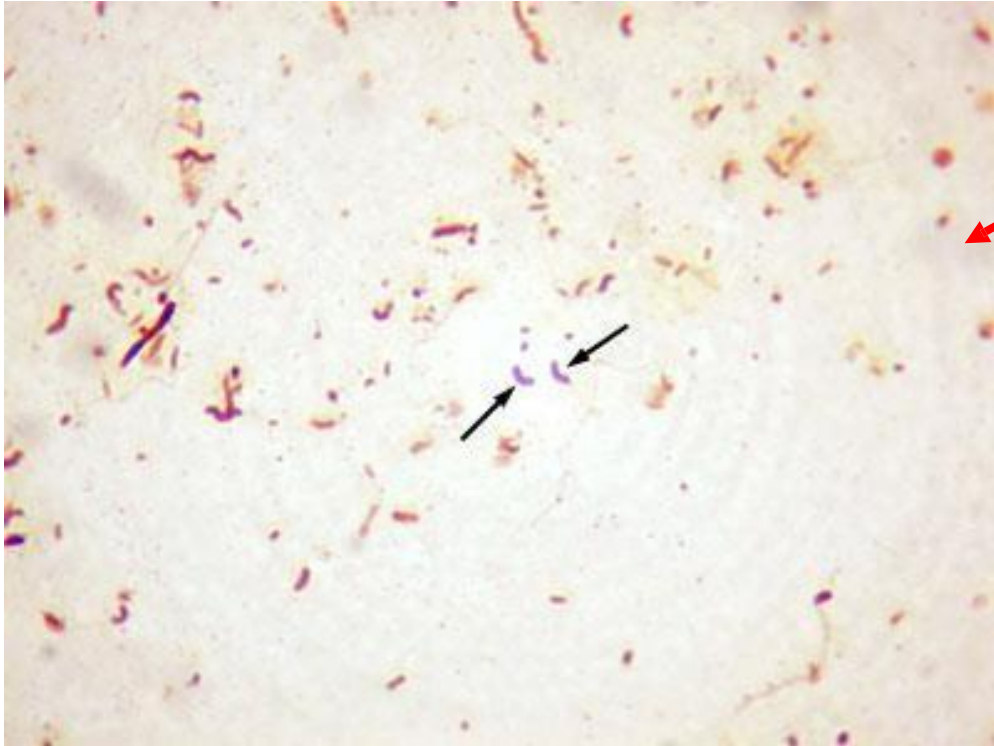
spirochete



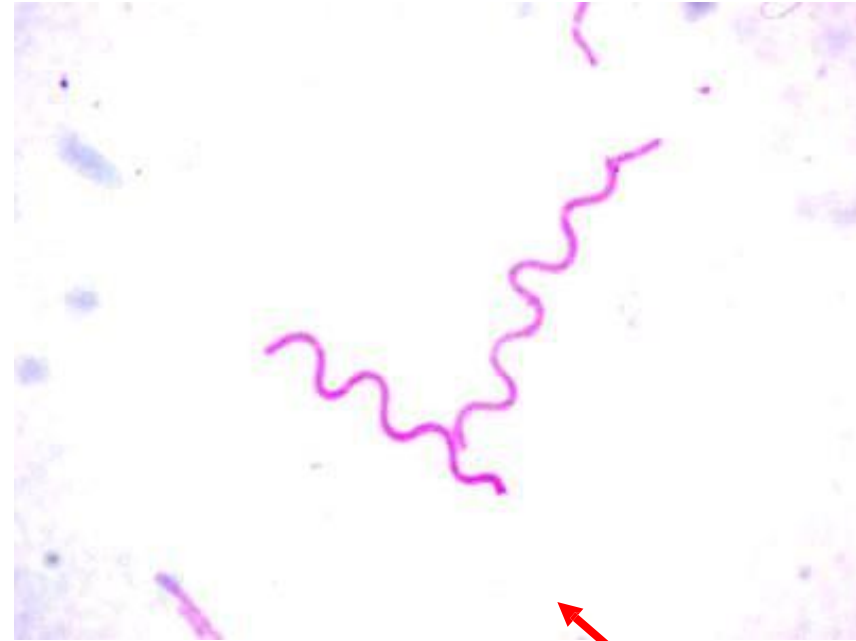
batteri prostecati



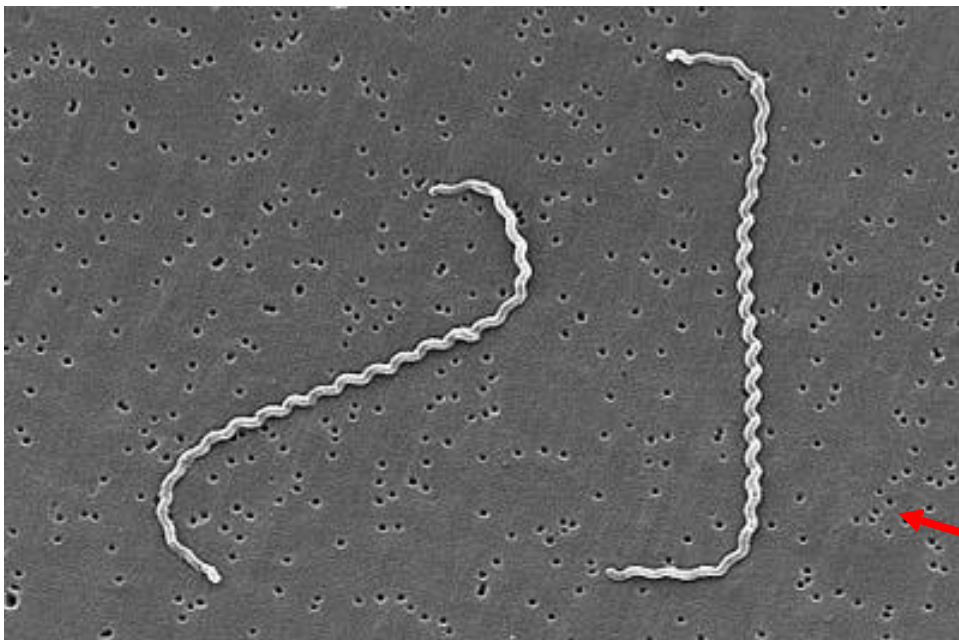
(C)



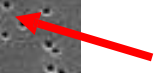
vibrio



spirillum



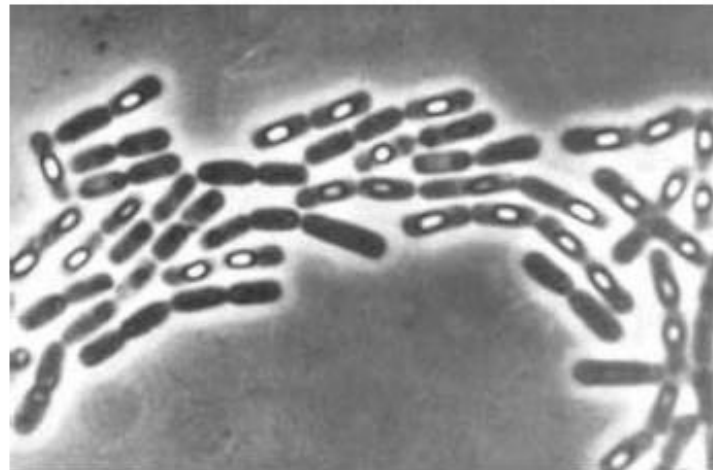
spirocheta



Batteri che differenziano

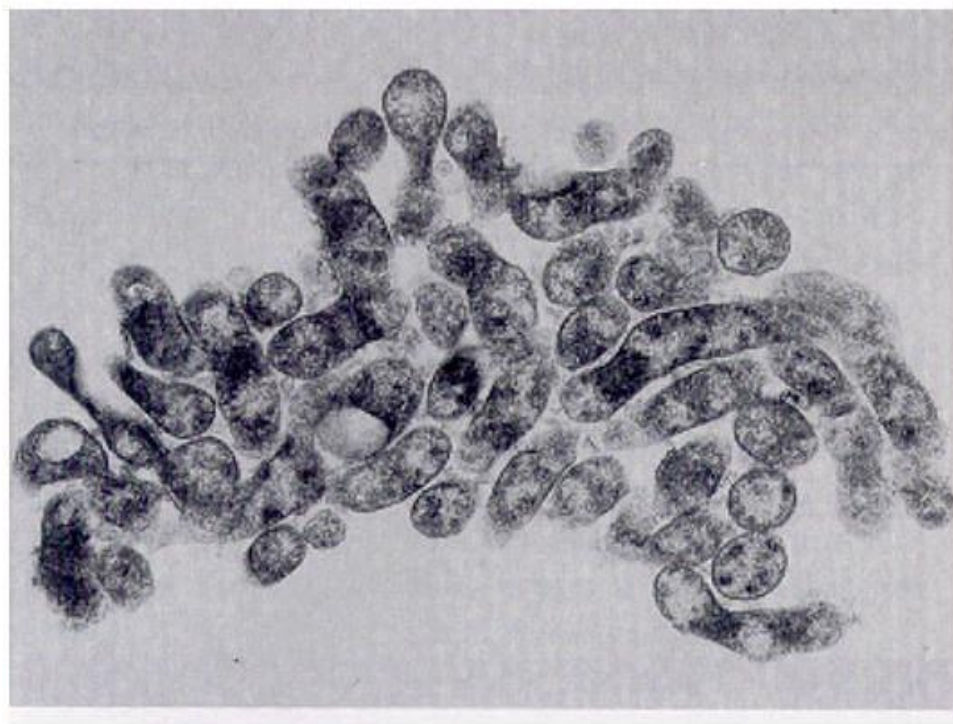


cianobatteri



batteri sporigeni

batteri pleiomorfi = a morfologia variabile



CAMPIONE IN ESAME



ESAME MICROSCOPICO



COLTURA (scelta terreni e condizioni di coltura)



ISOLAMENTO (ottenimento colture pure)



IDENTIFICAZIONE (morfologica, biochimica, sierologica, molecolare)

CARATTERI CULTURALI

- ➡ Uno dei principali caratteri dei microbi è l'**aspetto** (tipo di accrescimento) che assumono quando si accrescono su vari terreni

CARATTERI CULTURALI

- ➡ Uno dei principali caratteri dei microbi è l'**aspetto** (tipo di accrescimento) che assumono quando si accrescono su vari terreni
- ➡ I **caratteri colturali** forniscono informazioni **utili per l'identificazione**

CARATTERI COLTURALI

- ➡ Uno dei principali caratteri dei microbi è l'**aspetto** (tipo di accrescimento) che assumono quando si accrescono su vari terreni
- ➡ I **caratteri colturali** forniscono informazioni **utili per l'identificazione**
- ➡ Una condizione per poter studiare i microbi è poterli **coltivare nelle condizioni di laboratorio**

CARATTERI COLTURALI

- ➡ Uno dei principali caratteri dei microbi è l'**aspetto** (tipo di accrescimento) che assumono quando si accrescono su vari terreni
- ➡ I **caratteri colturali** forniscono informazioni **utili per l'identificazione**
- ➡ Una condizione per poter studiare i microbi è poterli **coltivare nelle condizioni di laboratorio**
- ➡ Per questo scopo si devono conoscere quali **sostanze nutritive** e quali **condizioni fisiche** essi richiedono

CARATTERI CULTURALI

(esigenze nutrizionali)

Fonte di **energia**

organismi foto-trofi (luce)

organismi chemio-trofi (composti chimici)

Fonte di **carbonio**

foto- e chemio-autotrofi (CO_2)

eterotrofi (composti organici)

Richiesta **azoto**

azoto atmosferico

composti inorganici dell'azoto

azoto proteico

CARATTERI COLTURALI

(esigenze nutrizionali)

Zolfo e **fosforo**

composti organici e inorganici dello zolfo
zolfo elementare
fosfati

Elementi **metallici**

sodio, ferro, potassio, zinco, rame, magnesio
fosforo, manganese, cobalto

Vitamine e composti vitamino-simili

tiamina (B1), riboflavina, niacina, piridossina (B6),
biotina, ac.pantotenico, ac.folico, cobalamina (B12),
vitamina K

**Elementi essenziali,
loro fonti e funzioni nei
procarioti**

MACRONUTRIENTI

**MiCRONUTRIENTI
ELEMENTI in
TRACCE**

ELEMENTO	FONTE	FUNZIONE NEL METABOLISMO
ELEMENTI ESSENZIALI PRINCIPALI		
C	Composti organici, CO ₂	Principali componenti del materiale cellulare
O	O ₂ , H ₂ O, composti organici	
H	H ₂ , H ₂ O, composti organici	
N	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , composti organici	
S	SO ₄ ²⁻ , HS ⁻ , S ⁰ , composti organici sulfurei	Costituente di amminoacidi contenenti zolfo, cisteina, metionina, tiammina, pirofosfato, coenzima A, biotina e acido alfa-lipoico
P	HPO ₄ ²⁻	Costituente di acidi nucleici, fosfolipidi, nucleotidi
K	K ⁺	Principale catione inorganico, cofattore (per esempio, piruvato chinasi)
Mg	Mg ²⁺	Cofattore di molti enzimi (per esempio, chinasi); componente delle pareti cellulari, membrane, ribosomi ed esteri fosforilati
Ca	Ca ²⁺	Componente di esoenzimi (amilasi, proteasi) e di pareti cellulari: componente principale di endospore come dipicolinato di Ca
Fe	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	Presente nei citocromi, ferredossine e altre proteine ferro-zolfo; cofattore (deidratasi)
Na	Na ⁺	Trasporto
Cl	Cl ⁻	Importante anione inorganico
ELEMENTI ESSENZIALI SECONDARI		
Zn	Zn ²⁺	Componente degli enzimi alcool deidrogenasi, fosfatasi alcalina, aldolasi, RNA e DNA polimerasi
Mn	Mn ²⁺	Presente nella superossido dismutasi; cofattore degli enzimi PEP carbossilasi, isocitrato sintasi
Mo	MoO ₄ ²⁻	Presente nella nitrato reductasi, nitrogenasi, xantina deidrogenasi e formiato deidrogenasi
Se	SeO ₃ ²⁻	Componente della glicina reductasi e formiato deidrogenasi
Co	Co ²⁺	Elemento richiesto in enzimi contenenti il coenzima B ₁₂ (glutammato mutasi, metilmalonil coenzima A mutasi)
Cu	Cu ²⁺	Presente in citocromo ossidasi e nitrito reductasi
Ni	Ni ²⁺	Presente in ureasi, idrogenasi e fattore F ₄₃₀
W	WO ₄ ²⁻	Presente in alcune formiato deidrogenasi

da P.R. Murray, K.S. Rosenthal, G.S. Kobayashi, M.A. Pfaller
Microbiologia
EDISES

I 6 elementi che costituiscono lo scheletro COVALENTE delle macromolecole biologiche (idrogeno, ossigeno, carbonio, azoto, fosforo e zolfo) costituiscono circa il 95% del peso secco della cellula

Col ferro, calcio, magnesio, sodio e potassio si raggiunge il 99.5%

Terreni colturali artificiali: devono soddisfare le esigenze nutrizionali ed energetiche dei microrganismi da coltivare (I)

Sono costituiti da una soluzione acquosa a cui sono aggiunti i nutrienti appropriati

- a **composizione chimicamente definita**
- a **composizione complessa** (o a **composizione chimica NON definita**) $\longrightarrow$ estratti di cellule animali, vegetali o microbiche
- **non selettivi**
- **selettivi**: contengono specifici composti che inibiscono selettivamente la crescita di alcuni microrganismi
- **differenziali**: contengono un indicatore (di solito un colorante) per la rilevazione di reazioni chimiche e attività metaboliche svolte dal microrganismo durante la crescita

Terreni colturali artificiali: devono soddisfare le esigenze nutrizionali ed energetiche dei microrganismi da coltivare (II)

Sostanze base: peptoni
 carboidrati
 sali

Peptoni: idrolizzati di proteine (carne, caseina, soia); fonte di aminoacidi
(**azoto**)

Carboidrati: glucosio, lattosio, mannitolo, saccarosio: fonte di **carbonio**

Sali: per osmolarità (**NaCl**); per tamponare il terreno (**tampone fosfato**);
per attività enzimi (**Manganese, Magnesio, Calcio, Ferro**)

Estratto di lievito: fonte di vitamine

Indicatori di pH: evidenziano la formazione di ACIDI a
partire da carboidrati e di BASI a partire da peptoni

Terreni utilizzati in microbiologia

- liquidi
- semisolidi (+ agar 0,5%)
- solidi (+ agar 1.5-2%)

Agar: estratto polisaccaridico (D-galattosio, L-galattosio, acido D-glucuronico di **alghe rosse marine**)

NON presenta alcuna **caratteristica nutritiva** per i microrganismi

Come si preparano i terreni in un laboratorio di microbiologia

- ➡ **allestimento**
- ➡ **sterilizzazione**
- ➡ **conservazione**

Allestimento

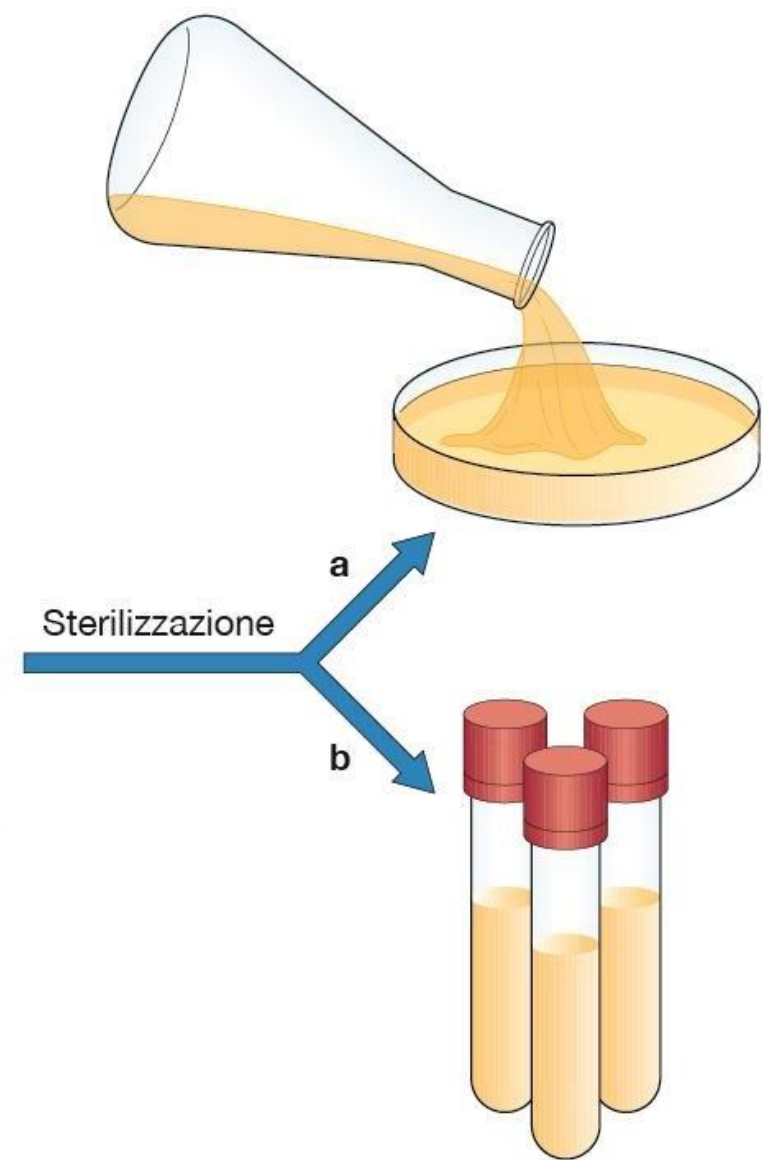
Dissoluzione ingredienti in acqua

Determinazione del pH ed eventuale correzione

Distribuzione in contenitori idonei



Terreno di coltura
contenente
2% di agar



Sterilizzazione

- ➡ terreni di coltura, soluzioni tampone, elementi di arricchimento e tutto quello con cui questi vengono a contatto deve essere **sterile**
- ➡ si deve escludere ogni possibilità di **contaminazione**
- ➡ **sterilizzazione** è la completa rimozione o distruzione di tutti i microrganismi
- ➡ sterilizzazione può essere ottenuta mediante
 - ✓ calore
 - ✓ radiazioni
 - ✓ sostanze chimiche
 - ✓ filtrazione

Scelta dei terreni di coltura

- Tipo di materiale in esame
- Tipo di ambiente di provenienza del campione
- Tipo di ricerca: mirata o globale?

In ogni caso lo scopo è creare le condizioni ottimali perché i microrganismi possano svilupparsi

CAMPIONE IN ESAME



ESAME MICROSCOPICO



COLTURA (scelta terreni e condizioni di coltura)



ISOLAMENTO (ottenimento colture pure)



IDENTIFICAZIONE (morfologica, biochimica, sierologica, molecolare)

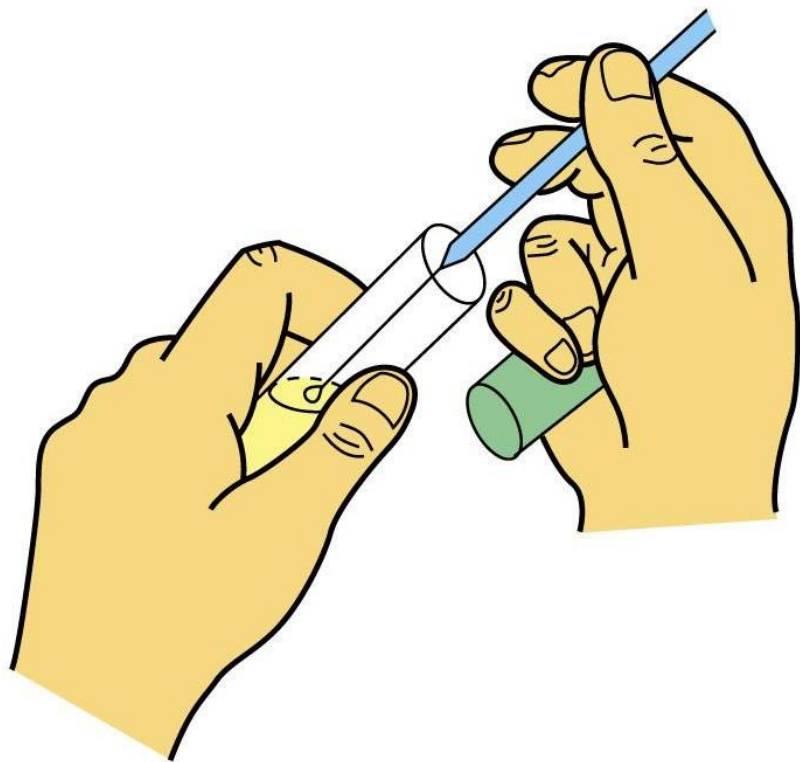
Isolamento: ottenimento di colture pure

Coltura $\Rightarrow$ crescita di un microrganismo in un terreno di laboratorio

Coltura mista $\Rightarrow$ la popolazione microbica presente nel nostro ambiente è enorme e complessa

Numerose specie microbiche sono presenti sia nell'ambiente (acqua, suolo, aria) che nel nostro organismo

Coltura pura $\Rightarrow$ è costituita da una **popolazione di cellule derivate tutte da un'unica cellula madre**. Rappresenta una condizione artificiale per l'accrescimento dei microbi imposta dalle manipolazioni di laboratorio



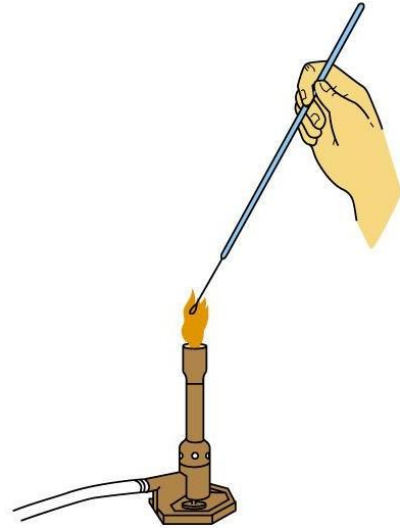
(a)



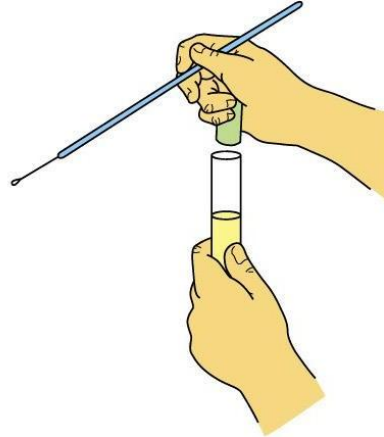
(b)

Metodi per ottenere colture pure: isolamento

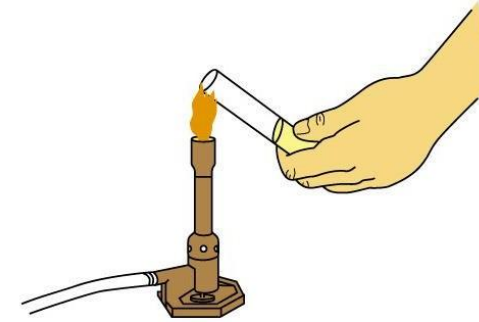
(tecnica di semina mediante l'utilizzo dell'ansa)



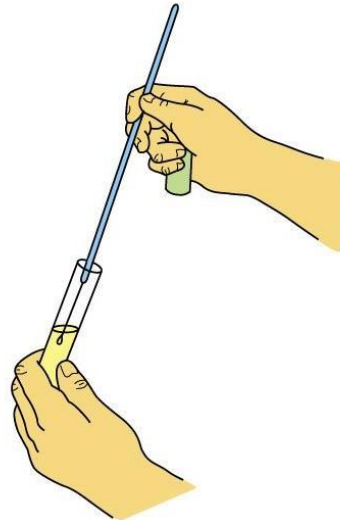
(a)



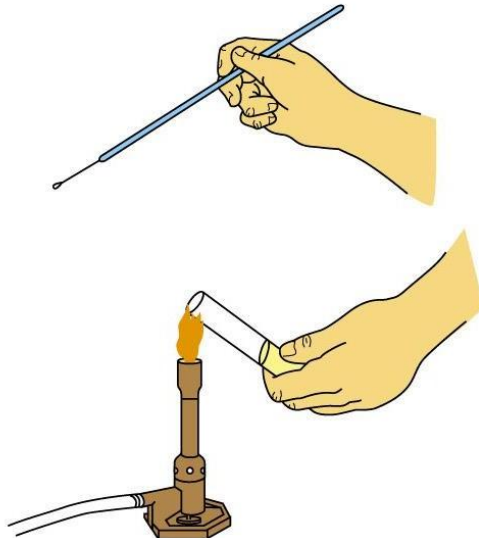
(b)



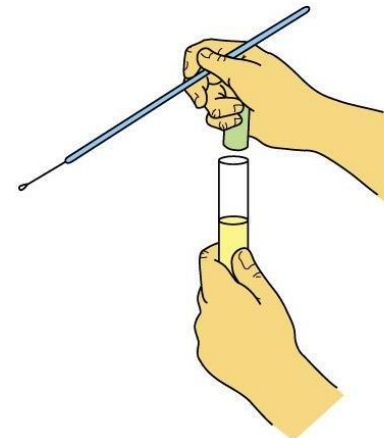
(c)



(d)



(e)



(f)

Metodi per ottenere colture pure: isolamento

semina: tecnica dello **striscio** e della distribuzione su piastre

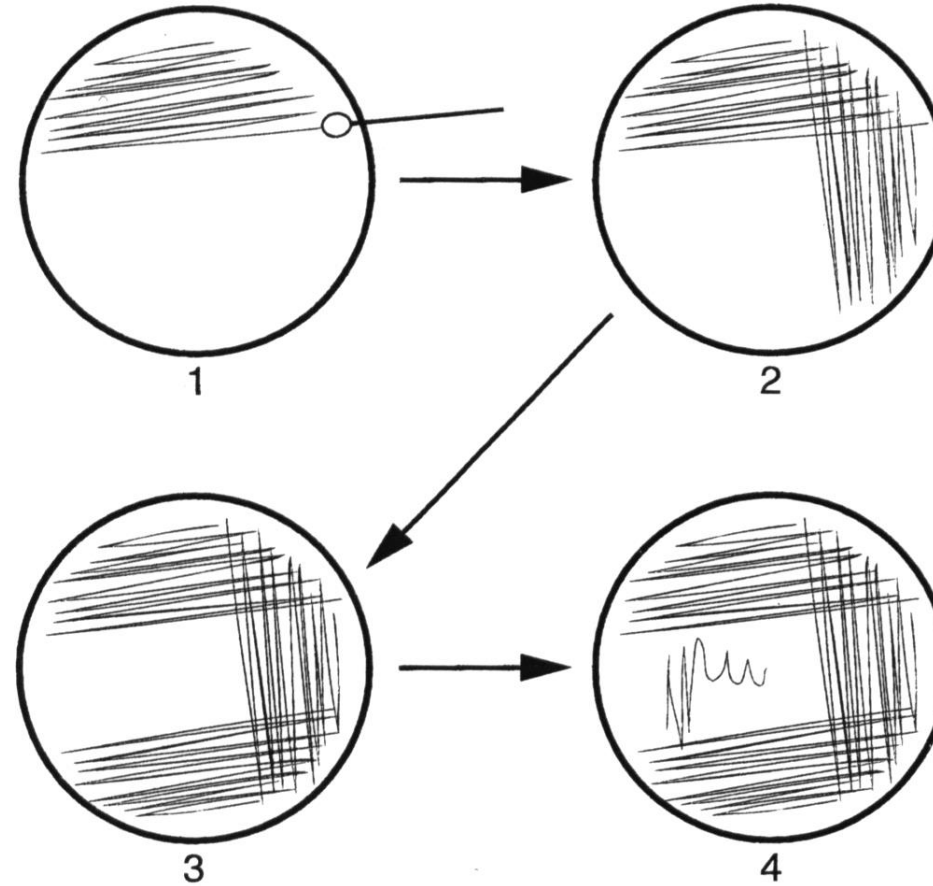


Figure 2-8.

Streaking patterns for the inoculation of specimens onto culture plates to obtain isolated bacterial colonies.

Sono disponibili diverse tecniche di semina:

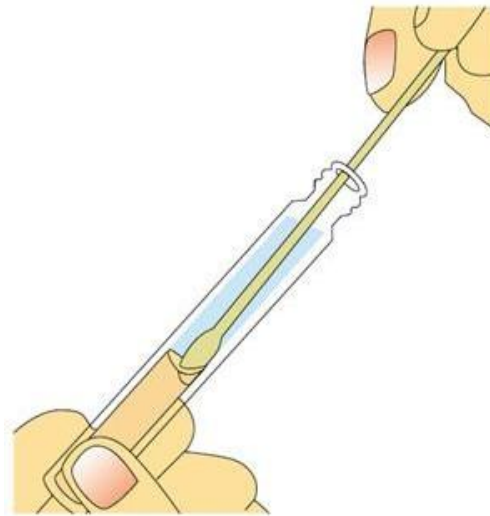
a) per isolamento in coltura pura



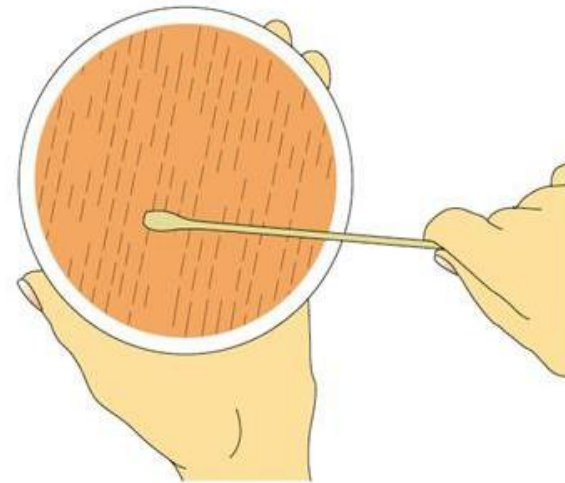
(a)

Sono disponibili diverse tecniche di semina:

*b-c) per allestimento dell'**antibiogramma***



(b)

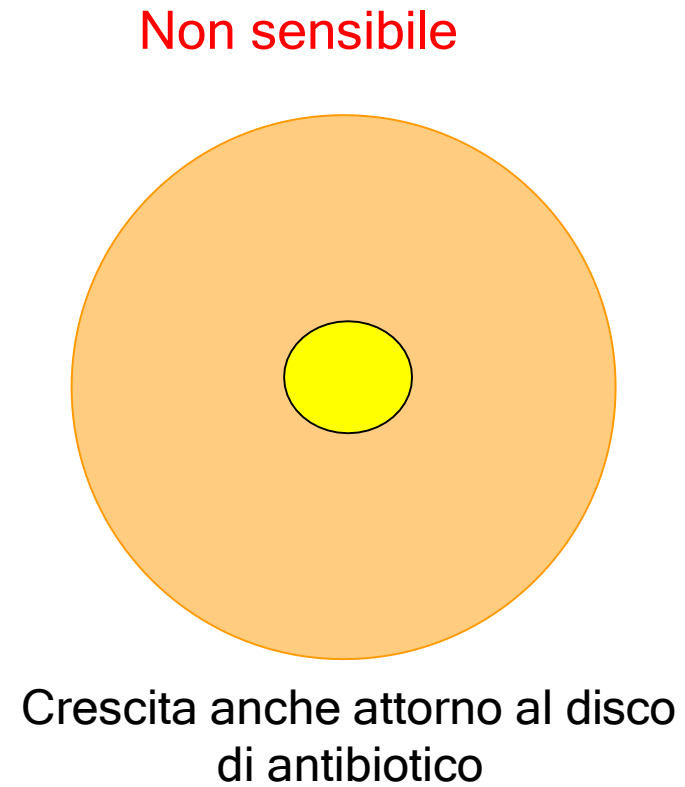
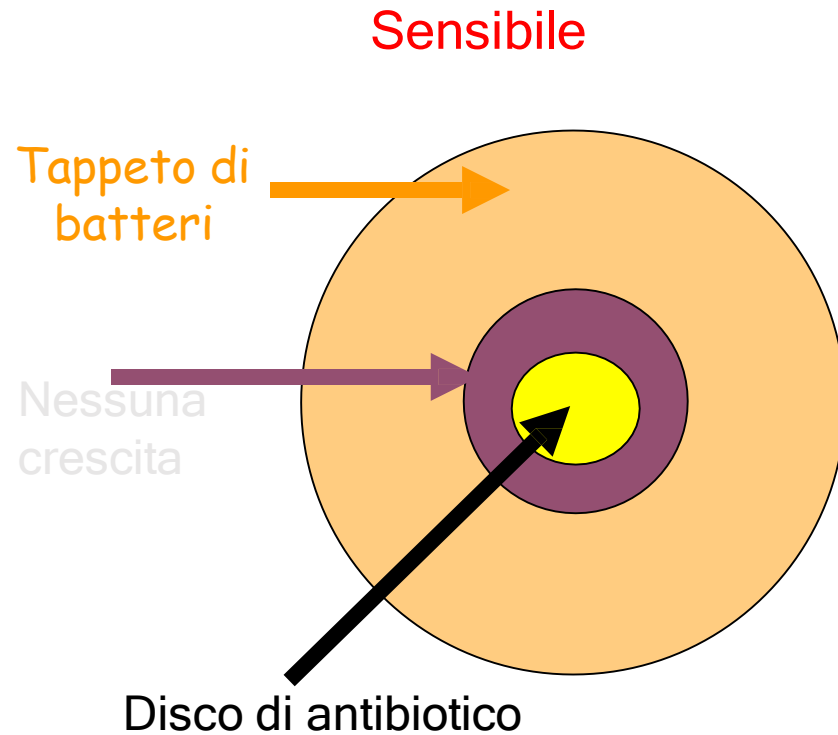


(c)

... per allestimento dell'**antibiogramma**

Saggio di sensibilità agli antibiotici

Test di Kirby-Bauer



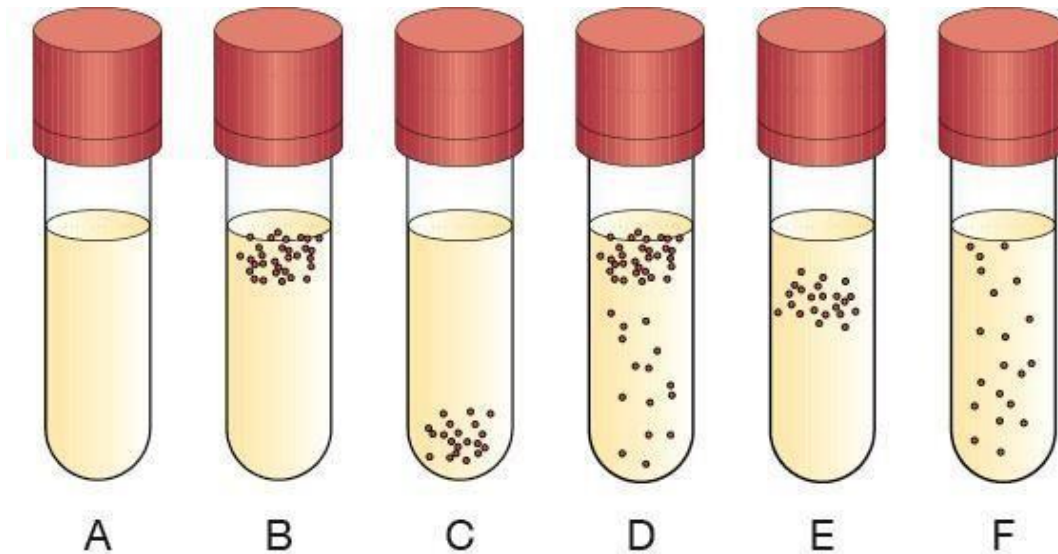
**CONDIZIONI
AMBIENTALI PER LA
CRESCITA
BATTERICA**

I batteri e l'ossigeno

- **Aerobi obbligati** (stretti): crescono solo in presenza di O_2
 - **Anaerobi obbligati** (stretti): crescono solo in assenza di O_2
 - **Microaerofili**: richiedono limitate quantità di O_2

 - **Anaerobi facoltativi**
 - **Anaerobi aerotolleranti**
- } tollerano O_2

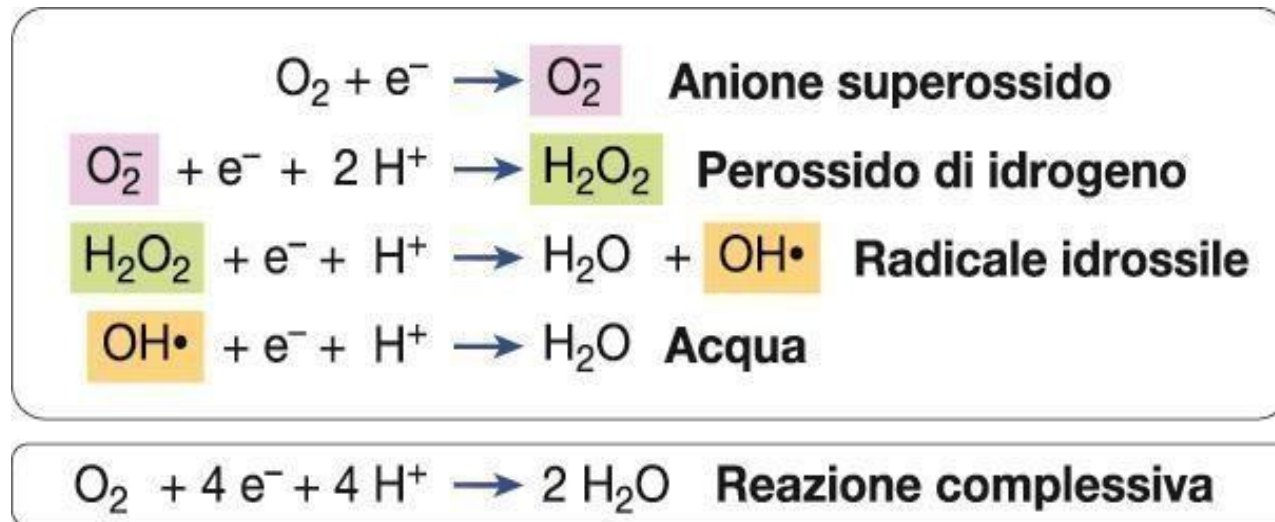
EFFETTO DELLA CONCENTRAZIONE DI O₂ SULLA CRESCITA BATTERICA



A: Terreno non inoculato
B: Aerobio obbligato
C: Anaerobio obbligato

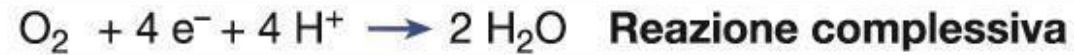
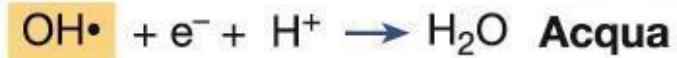
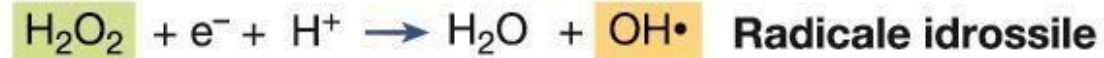
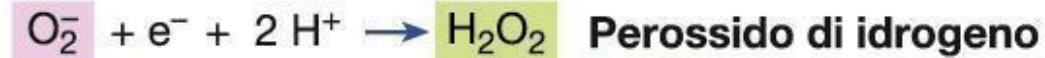
D: Anaerobio facoltativo
E: Microaerofilo
F: Anaerobio aerotollerante

- B) Crescono solo dove c'è abbastanza O₂ vicino alla superficie
- C) L'O₂ è tossico; non c'è crescita vicino alla superficie
- D) Migliore crescita vicino alla superficie, ma anche...
- E) I batteri non tollerano la concentrazione atmosferica di O₂; crescita ottimale a [pO₂] inferiori a quella atm.
- F) Crescita uniforme (indifferenza per O₂)

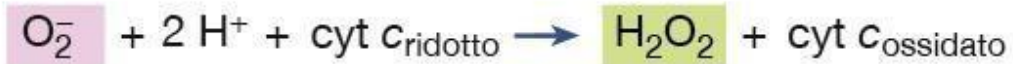


RIDUZIONE DELL'OSSIGENO MOLECOLARE

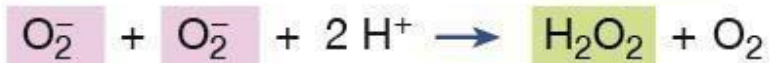
L'ossigeno è un **agente ossidante** (accettore di elettroni) piuttosto forte e quindi, durante il processo di riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua, si formano intermedi che possono risultare **TOSSICI**



RIDUZIONE DELL'OSSIGENO MOLECOLARE



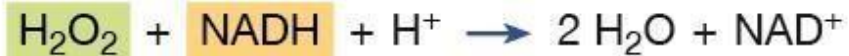
**Superossido
reduttasi**



**Superossido
dismutasi**



Catalasi



Perossidasi

ENZIMI CHE ELIMINANO GLI INTERMEDI TOSSICI DELLA RIDUZIONE DELL'OSSIGENO

ENZIMI BATTERICI CORRELATI ALL' O₂

Microrganismi	Catalasi	Superossido dismutasi	comportamento verso l'O ₂
Aerobi e anaerobi facoltativi	presente	presente	tollerano l' O ₂ (neutralizzano le forme tossiche)
Aerotolleranti Anaerobi	assente	presente	tollerano l' O ₂ (neutralizzano <u>in parte</u> le forme tossiche)
Anaerobi Obbligati (stretti)	assente	assente	l' O ₂ è tossico (incapaci di neutralizzare le forme tossiche)

TABELLA 21-2 Classificazione dei batteri in base alla richiesta di ossigeno					
CRESCITA IN					
BATTERI	PRESENZA DI O ₂	ASSENZA DI O ₂	PRODUZIONE DI CATALASI E SUPEROSSIDO DISMUTASI	COMMENTI	ESEMPI
Aerobi	+	–	+	Necessitano di O ₂ , non fermentano	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus anthracis</i>
Anaerobi	–	+	– ^a	Vengono uccisi dall'O ₂ , fermentano in assenza di O ₂	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Bacteroides melaninogenicus</i>
Facoltativi	+	+	+	Effettuano la respirazione in presenza di O ₂ , fermentano in assenza di O ₂ ^c	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Microaerofili	+ ^b	+ ^b	+	Crescono meglio in presenza di basse concentrazioni di O ₂ , possono crescere senza O ₂	<i>Campylobacter jejuni</i>

^a Molti batteri patogeni anaerobi producono catalasi e/o superossido dismutasi.

^b Optimum di crescita tra il 5% e il 10% di CO₂.

^c Alcuni effettuano la via fermentativa in assenza o in presenza di O₂.

INCUBAZIONE DEI BATTERI

AEROBIOSI E ANAEROBIOSI

Microrganismi aerobi: microrganismo seminato su terreno di coltura viene incubato in termostato (camera ad aria calda), normalmente alla temperatura di 37°C per il tempo necessario allo sviluppo microbico

L'afflusso di ossigeno nelle colture può essere aumentato mediante agitazione (“colture agitate”) oppure insufflando aria o ossigeno (“colture aerate”)

INCUBAZIONE DEI BATTERI

AEROBIOSI E ANAEROBIOSI

Microrganismi aerobi: microrganismo seminato su terreno di coltura viene incubato in termostato (camera ad aria calda), normalmente alla temperatura di 37°C per il tempo necessario allo sviluppo microbico

L'afflusso di ossigeno nelle colture può essere aumentato mediante agitazione ("colture agitate") oppure insufflando aria o ossigeno ("colture aerate")

Microrganismi anaerobi:

- microrganismo seminato su terreno di coltura viene incubato **modificando l'ambiente** senza influire sul terreno di coltura (giare o cappe di anaerobiosi)

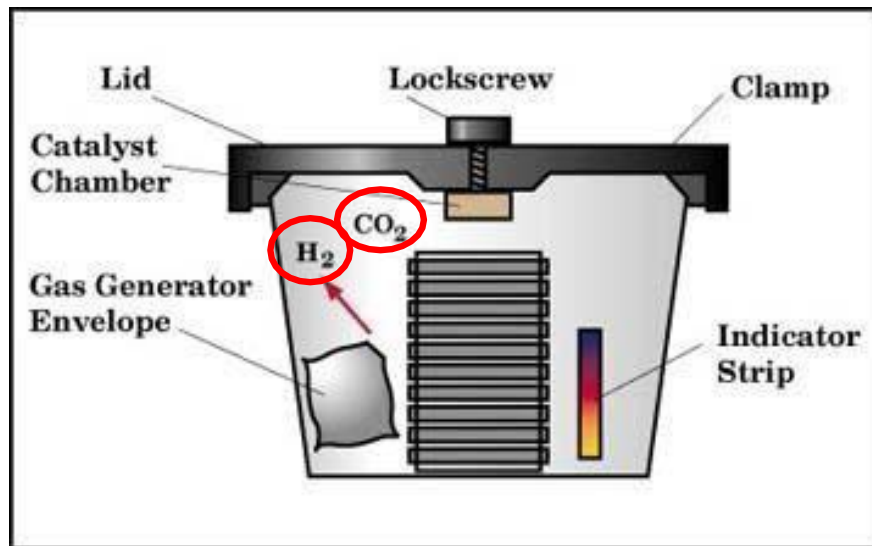
BATTERI IN ANAEROBIOSI



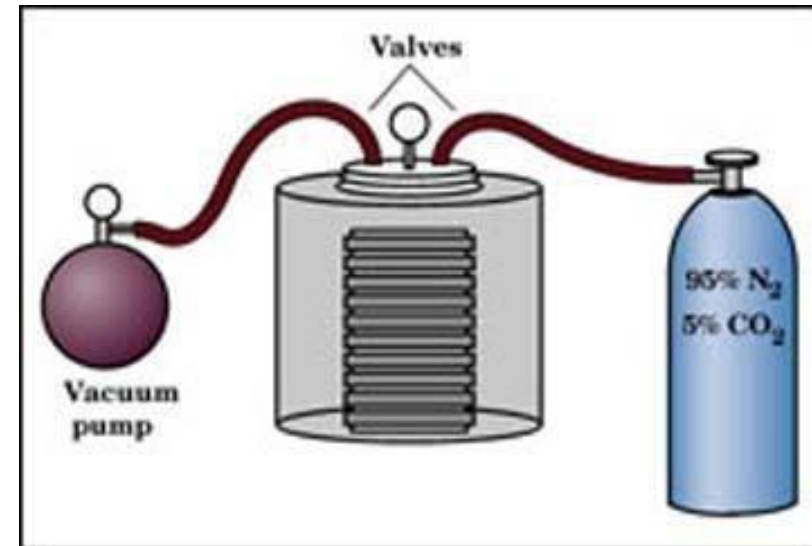
GIARA PER ANAEROBIOSI

INCUBAZIONE DEI BATTERI IN ANAEROBIOSI

Gas pack: al momento dell'uso, viene introdotta una bustina contenente boroidruro di sodio e **bicarbonato di sodio**, a cui si aggiunge acqua: **si libera CO₂** e H₂: si consuma ossigeno



Giara di Brewer: fornita di 2 valvole: una per allontanare l'aria con una pompa da vuoto, l'altra per insufflare una miscela gassosa (azoto molecolare, 95%, e anidride carbonica, 5%)

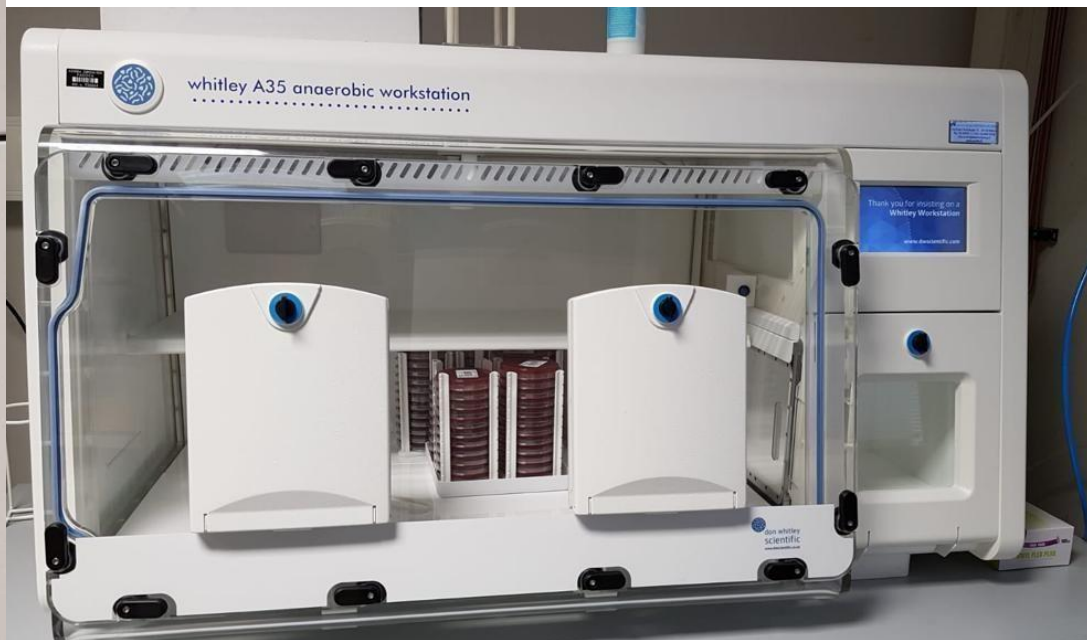


CABINA PER ANAEROBIOSI



2 scomparti: una **precamera** dove viene immesso il materiale da isolare: una volta chiusa, l'ossigeno viene sostituito da miscela di idrogeno-anidride carbonica; una **camera di lavoro** (si accede tramite «guanti esterni»)

**Cabina per anaerobioti UOC
Microbiologia e Virologia, Azienda
Ospedaliera di Padova**



INCUBAZIONE DEI BATTERI IN ANAEROBIOSI

Microrganismi anaerobi:

• microrganismo seminato su terreno di coltura viene incubato modificando l'ambiente senza influire sul terreno di coltura (giare o cappe di anaerobiosi)

- modificando il terreno di coltura :

1) Nei terreni solidi e liquidi: aggiunta di sostanze riducenti quali cisteina, acido ascorbico, acido tio-glicolico. È opportuno aggiungere al terreno un indicatore di ossidoriduzione

2) Nei terreni liquidi si porta ad **ebollizione**. L'aggiunta di uno strato di olio di vaselina garantisce le condizioni di anaerobiosi

I batteri e la CO₂

Una adeguata tensione di CO₂ è necessaria per alcune specie microbiche. Molti batteri (*Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*) si sviluppano se all'atto del primo isolamento è presente una tensione di CO₂ del 3-10%. La CO₂ può essere utilizzata per la sintesi di alcuni componenti cellulari (acidi grassi), favorisce la sintesi di fattori di virulenza (tossine) e la formazione della capsula nei batteri che la presentano.

Si può ottenere utilizzando:

- 1) Gas pack
- 2) Termostati ad anidride carbonica

I batteri e la temperatura

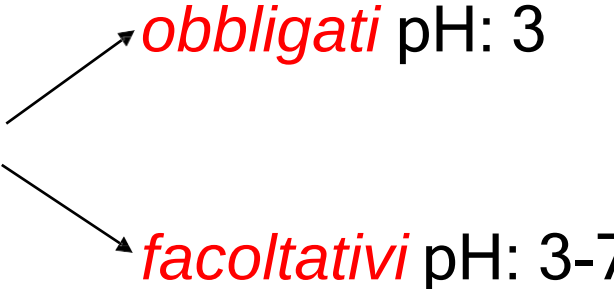
Temperatura ottimale: permette il massimo tasso di crescita (tempo di duplicazione minore)

	<u>minima</u> *	<u>ottimale</u> *	<u>massima</u> *
psicrofili	-5	10-20	20-30
mesofili	10	30-40	40-50
termofili	40	50-70	70-90

*gradi centigradi

I batteri e il pH (concentrazione ioni idrogeno)

neutrofili: pH 4-9

acidofili: 
 obbligati pH: 3
 facoltativi pH: 3-7

basofili: pH 7-11

(alcalofili)

Gli enzimi di tutti i gruppi batterici hanno un pH ottimale prossimo alla neutralità (la pompa protonica mantiene costante il pH intracellulare)

I batteri e la salinità

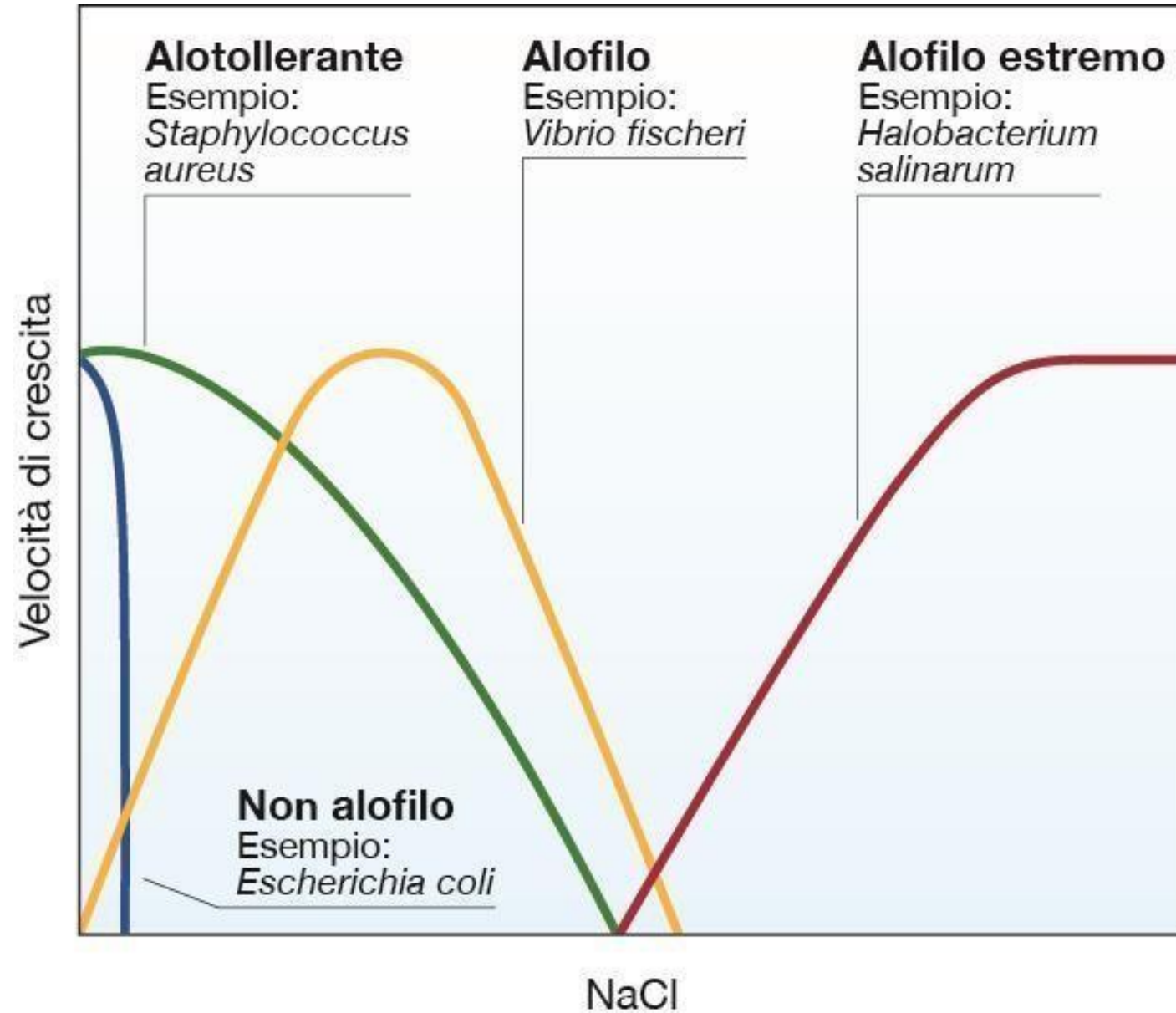


Figura 3.25 **EFFETTO DELLA CONCENTRAZIONE DI Na^+ SULLA CRESCITA MICROBICA**

I batteri e l'H₂O (idratazione)

L'acqua è il componente principale del terreno (sia solido che liquido).

Quando il terreno è incubato alla temperatura utilizzata per la coltivazione dei batteri, una elevata quantità di acqua può essere persa in seguito ad evaporazione.

La perdita di acqua può essere deleteria per la crescita batterica:

- 1) una minore quantità di acqua è disponibile per processi metabolici essenziali
- 2) la perdita di acqua induce un relativo aumento della concentrazione dei soluti del terreno può indurre shock osmotico alla cellula batterica e conseguente lisi cellulare

Quantificazione dell'accrescimento

Metodi per la misurazione quantitativa dell'accrescimento batterico:

si effettua un inoculo in terreno di coltura liquido prelievo ad intervalli di tempo e conteggio

Metodi per la misurazione quantitativa dell'accrescimento batterico:

1. Misurazione del **numero** delle cellule:

a) contatore di cellule elettronico:

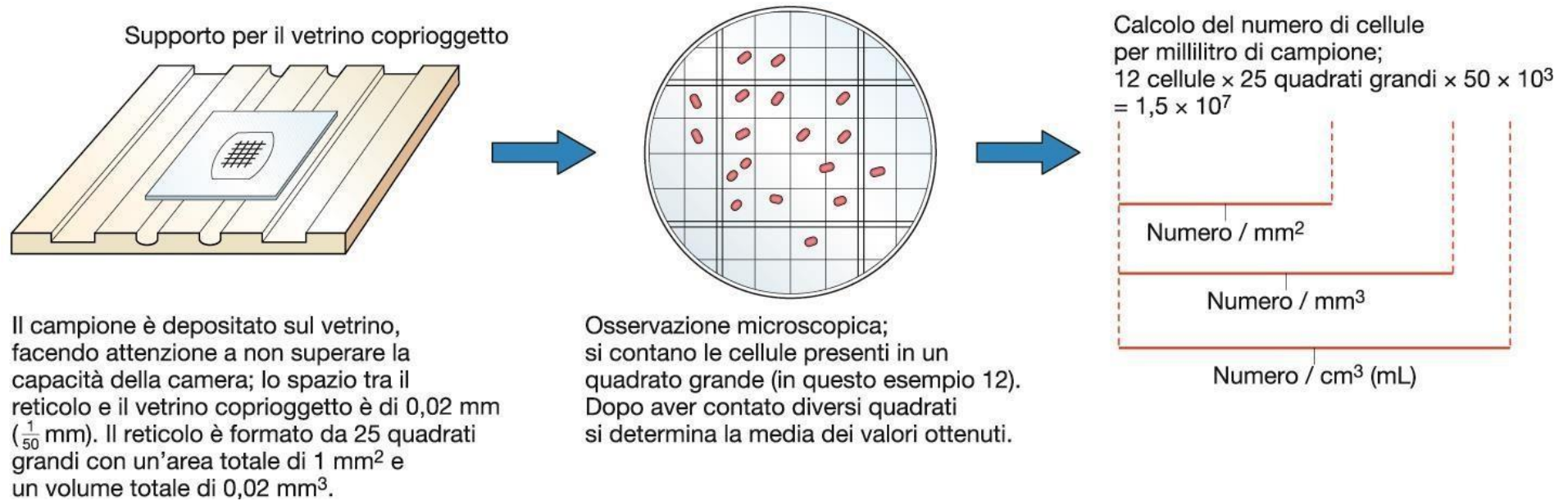
Si effettua in uno strumento dotato di 2 compartimenti *ad alta conducibilità elettrica* connessi da un orifizio (10-30 μm diametro); il passaggio dei batteri nell'orifizio fa aumentare la resistenza elettrica tra i 2 compartimenti registrazione del segnale elettrico: molto preciso

Metodi per la misurazione quantitativa dell'accrescimento batterico:

1. Misurazione del **numero** delle cellule:

b) direttamente con il microscopio (camera contacellule di Petroff-Hausser)

METODO DI CONTA TOTALE AL MICROSCOPIO MEDIANTE CAMERA DI CONTA



Pro: rapidità

Contro: •conta anche le cellule morte

•non adatto a campioni diluiti (o a batteri di piccole dimensioni)

Metodi per la misurazione quantitativa dell'accrescimento batterico:

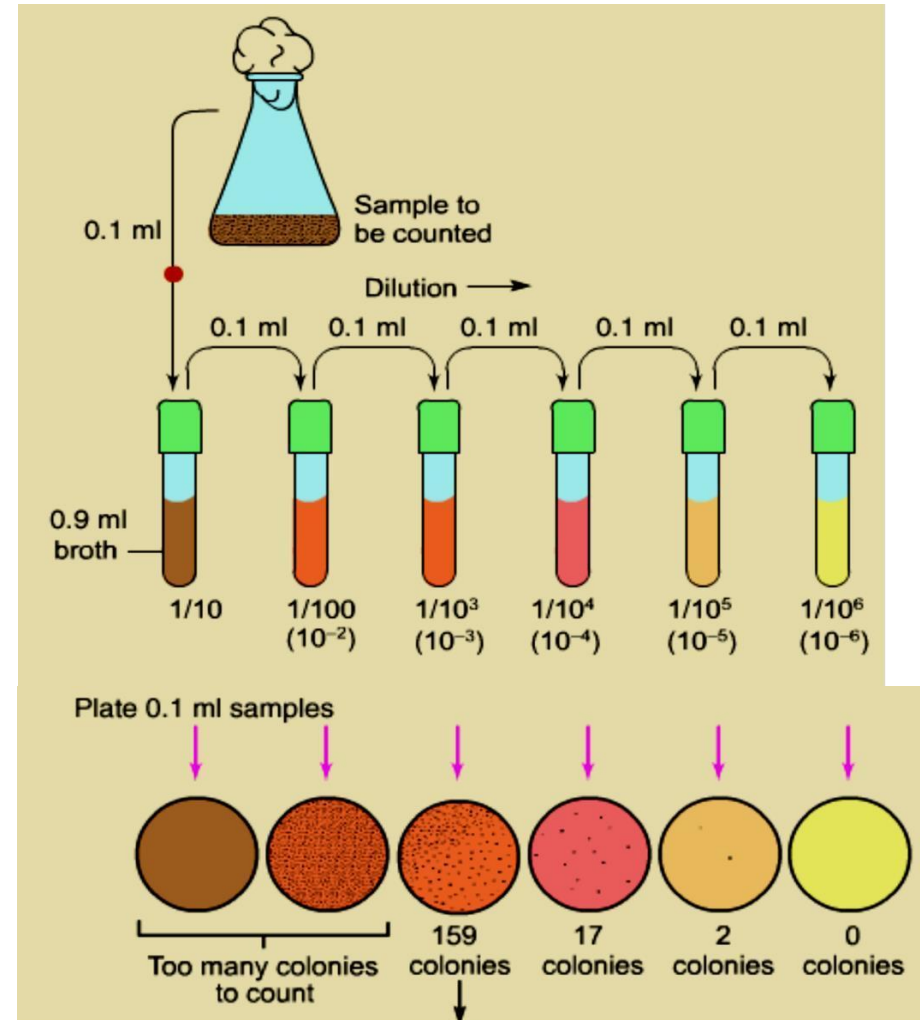
- c) Misurazione delle colonie (unità formanti colonia) su piastra da coltura

CONTA VITALE SU PIASTRA

Una cellula vitale è capace di dividersi e formare progenie (colonie)

Pro: molto sensibile

calcolo del titolo in cfu (**C**olony **F**orming **U**nits) / ml



Metodi per la misurazione quantitativa dell'accrescimento batterico:

2. Misurazione della massa cellulare:

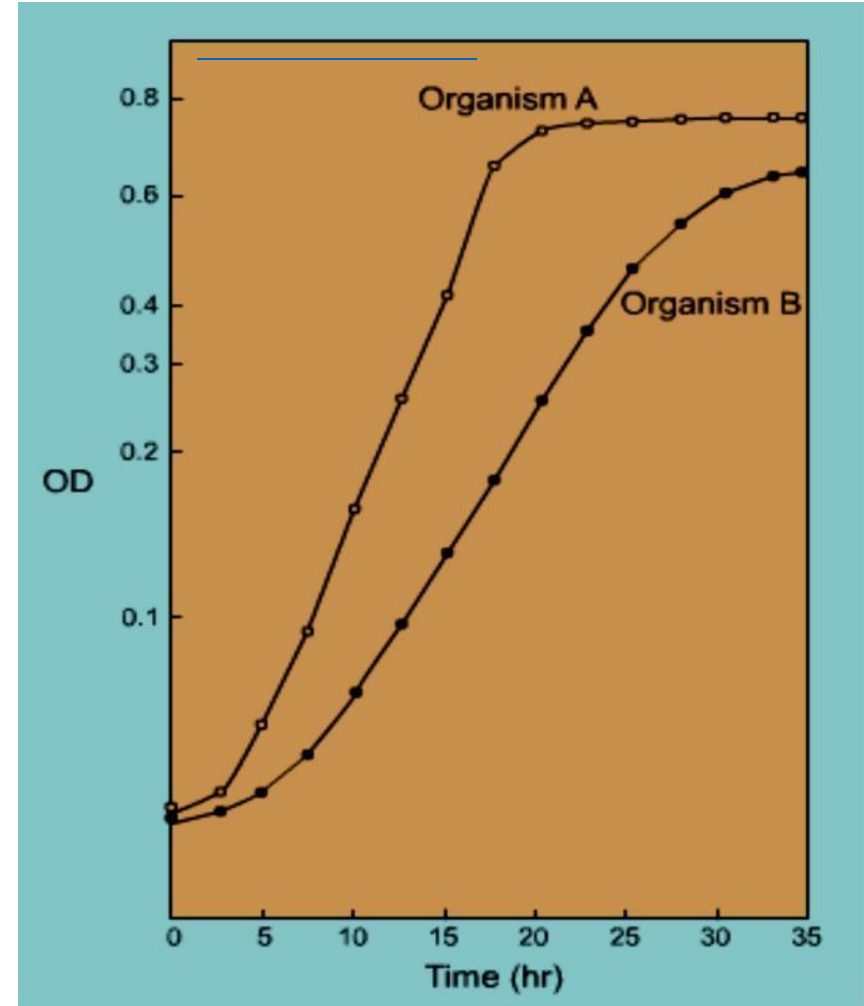
metodi diretti

- peso secco cellulare (proporzionale alla massa)
- componenti cellulari (DNA, RNA, proteine)
- torbidità di una coltura liquida (spettrofotometro: misurazione della densità ottica (O.D.))

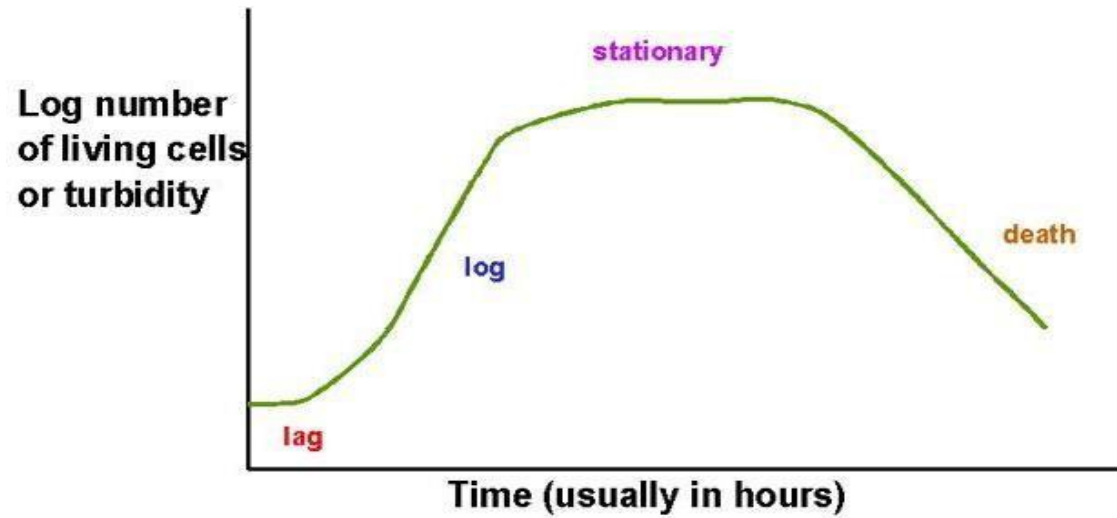
MISURAZIONE DELLA TORBIDITA' IN COLTURA LIQUIDA

La torbidità è dovuta alla rifrazione della luce da parte delle cellule presenti nella sospensione.

La **densità ottica (DO)** misurata a 600 nm con uno spettrofotometro è proporzionale al numero totale di cellule (vive e morte)



Curva di crescita batterica



Fase di latenza (lag): le cellule aumentano di volume ma non di numero: i batteri si adattano al nuovo ambiente.

Fase esponenziale o logaritmica (log): i batteri si moltiplicano con un tempo di duplicazione che dipende dal ceppo e dall'ambiente.

Fase stazionaria (stationary): i batteri smettono di crescere per la mancanza di metaboliti e l'accumulo di sostanze tossiche.

Fase di morte cellulare (death): la fase di declino o morte cellulare è una funzione esponenziale e si manifesta come riduzione lineare del numero di cellule vitali nel tempo. Il tasso di mortalità aumenta fino a raggiungere un livello costante.

Metodi per la misurazione quantitativa dell'accrescimento batterico:

2. Misurazione della massa cellulare:

metodi indiretti

- Consumo di nutrienti dal mezzo di coltura
- Formazione di specifici prodotti metabolici
- **ATP** (concentrazione di ATP/unità di massa è una costante)

IDENTIFICAZIONE

La determinazione delle proprietà nutrizionali e metaboliche del batterio isolato rappresenta l'approccio più comune utilizzato per individuare il genere e la specie del microrganismo

IDENTIFICAZIONE

La determinazione delle proprietà nutrizionali e metaboliche del batterio isolato rappresenta l'approccio più comune utilizzato per individuare il genere e la specie del microrganismo

In genere tutte le metodiche impiegano una **combinazione di test per determinare le proprietà enzimatiche di un batterio isolato**, così come la capacità dell'isolato di crescere o sopravvivere in presenza di certi inibitori (sali, antibiotici, etc)

IDENTIFICAZIONE

La determinazione delle proprietà nutrizionali e metaboliche del batterio isolato rappresenta l'approccio più comune utilizzato per individuare il genere e la specie del microrganismo

In genere tutte le metodiche impiegano una combinazione di test per determinare le proprietà enzimatiche di un batterio isolato, così come la capacità dell'isolato di crescere o sopravvivere in presenza di certi inibitori (sali, antibiotici, etc)

Test enzimatici: per misurare la presenza di 1 singolo enzima specifico o del completo ciclo metabolico (che può prevedere numerosi enzimi)

IDENTIFICAZIONE

La determinazione delle proprietà nutrizionali e metaboliche del batterio isolato rappresenta l'annuncio più

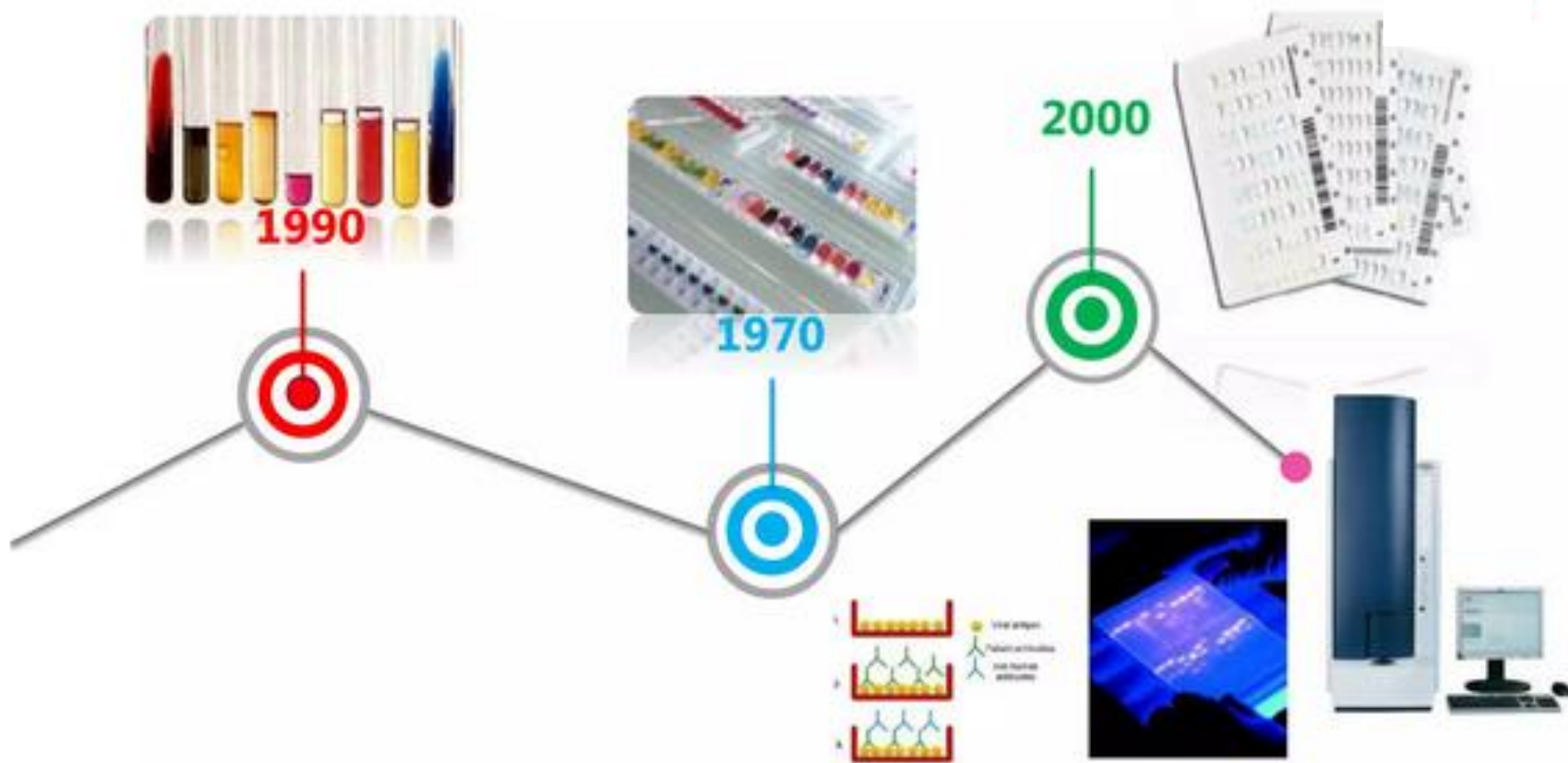


Numerosi sono i test utilizzati per determinare la presenza di un singolo enzima. Facili da eseguire e da interpretare, **svolgono un ruolo chiave nello schema di identificazione**. Infatti, sebbene non forniscano sufficienti informazioni per l'identificazione, sono utilizzati per determinare lo step successivo.

Principali tecniche di identificazione di specie batteriche

- **Caratteristiche colturali**
- **Metodi biochimici (gallerie)**
- **MALDI**
- **T2**

Evoluzione identificazione microbica



Diagnostica molecolare in microbiologia clinica

Metodiche
tradizionali



Metodiche innovative

- Esame diretto dopo colorazione di Gram/ Ziehl Neelsen → sensibilità 60-80% →
- Test antigenici → sensibilità 60-90%
- Esame colturale
sensibilità 90-100%

NATs (Nucleic Acid Amplification Technology)

- Nested-PCR
- Real-Time PCR
- MLST (multilocus sequence typing)
- Sequencing

Saggi basati su spettrometria di massa

Saggi basati sulle nanotecnologie

Sensibilità e specificità > 90%



Advanced methods of bacteriological identification in a clinical microbiology laboratory

Magdalena Elwira Żukowska^{1,A-B,D,F} 

VIEWPOINT

SCIENTIFIC DISCOVERY AND THE FUTURE OF MEDICINE

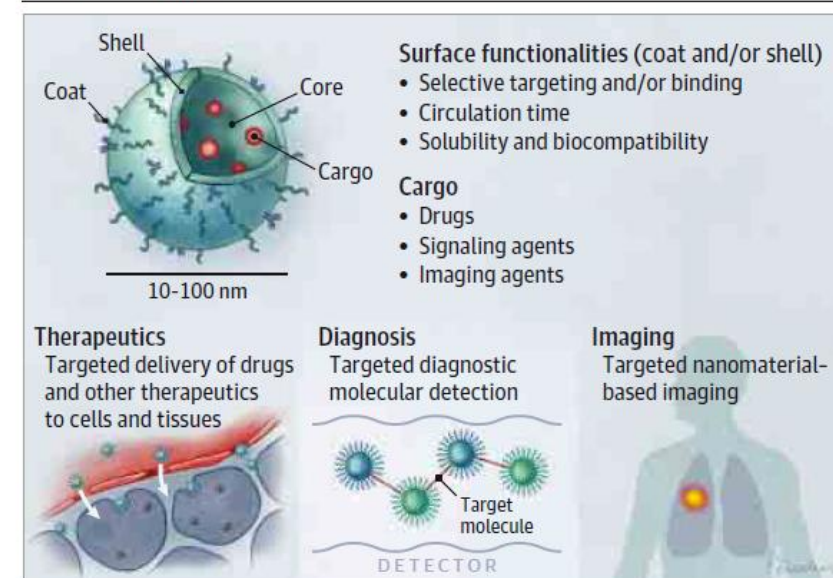
Nanotechnology

Robert Langer, ScD
Massachusetts Institute of Technology,
Cambridge,
Massachusetts.

Ralph Weissleder, MD, PhD
Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School,
Boston, Massachusetts.

Nanotechnology involves systems on the order of one-thousandth the thickness of a human hair. Generally, a nanoparticle or nanosystem has an outer shell that protects an inner core of therapeutic molecule or diagnostic substance. Either the shell or core can be made up of polymers or metals (**Figure**). The small size and enormous surface area:volume ratio create uniquely advantageous abilities to enter cells, release drugs slowly over time, modulate small-molecule payload toxic effects, and, in some cases, amplify a signal that depends on surface contacts. Nanotechnology currently affects 3 distinct areas of medicine: therapeutics, diagnostics, and imaging. The potential in each of these areas is enormous.

Figure. Typical Nanoparticle Features and Medical Applications of Nanotechnology



Diagnostica molecolare in microbiologia clinica

Possibilità di identificare un microorganismo in base ad una o più sequenze geniche specifiche

La diagnostica molecolare presenta una maggiore **sensibilità** e **specificità** dei metodi tradizionali e si ricorre sempre più ad essa quando:

- ✓ Il microorganismo sia difficilmente coltivabile
- ✓ presenta una crescita lenta *in vitro*
- ✓ la manipolazione risulti pericolosa
- ✓ il costo della diagnosi tradizionale sia più elevato di quella di una diagnosi molecolare

MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research

Dandan Li, Jia Yi, Guobin Han, and Liang Qiao*



Cite This: *ACS Meas. Sci. Au* 2022, 2, 385–404



Read Online

ACCESS |



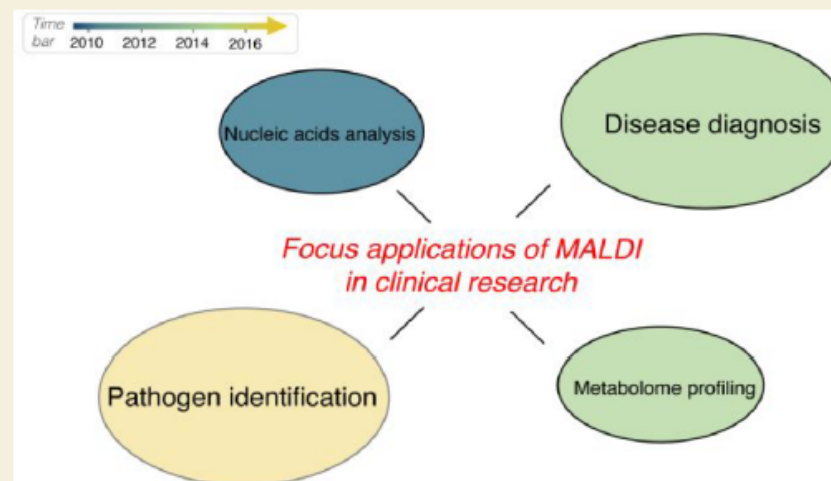
Metrics & More



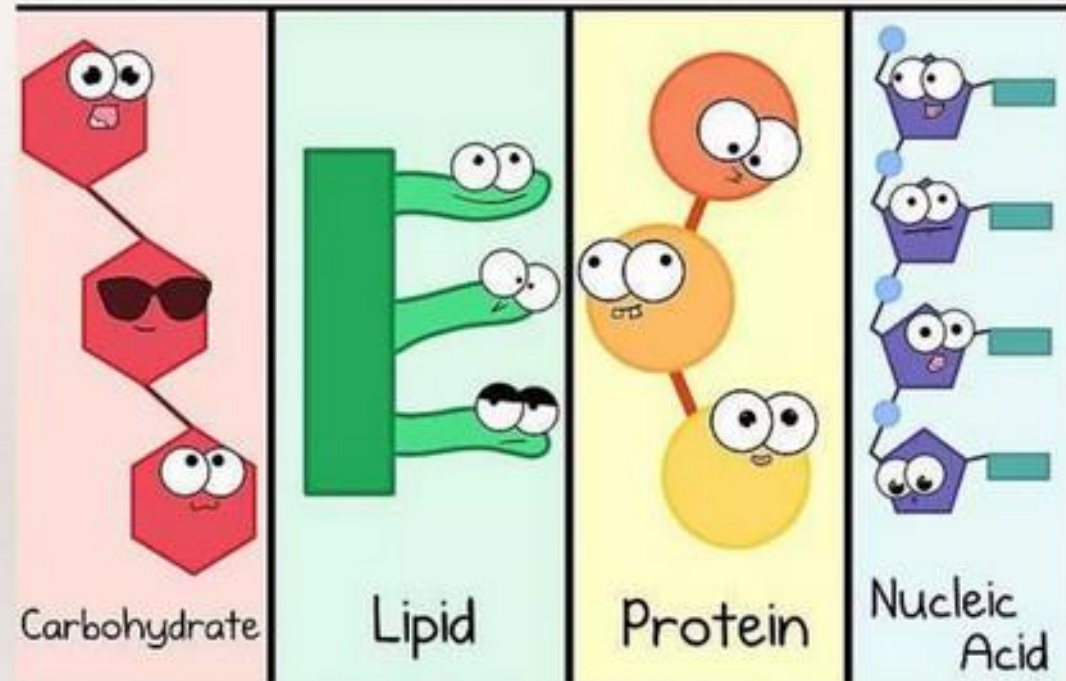
Article Recommendations

ABSTRACT: In the decade after being awarded the Nobel Prize in Chemistry in 2002, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been widely used as an analytical chemistry tool for the detection of large and small molecules (e.g., polymers, proteins, peptides, nucleic acids, amino acids, lipids, etc.) and for clinical analysis and research (e.g., pathogen identification, genetic disorders screening, cancer diagnosis, etc.). In view of the fast development of MALDI-TOF MS in clinical usage, this review systematically summarizes the most important applications of MALDI-TOF MS in clinical analysis and research by analyzing MALDI TOF MS-related reviews collected in the Web of Science database. On the basis of the analysis of keyword co-occurrence of over 2000 review articles, four themes consisting of “pathogen identification”, “disease diagnosis”, “nucleic acids analysis”, and “small molecules analysis” were found. For each theme, the review further outlined their application implications, analytical methods, and systems as well as limitations that need to be addressed. Overall, the review summarizes and elaborates on the clinical applications of MALDI-TOF MS, providing a comprehensive picture for researchers embarking on MALDI TOF MS-related clinical analysis and research.

KEYWORDS: matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), time-of-flight (TOF), mass spectrometry (MS), clinical application, pathogen identification, disease diagnosis



- ❖ MALDI is the abbreviation for "Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization."
- ❖ MALDI is appropriate to analyze biomolecules like peptides, lipids, saccharides, or other organic macromolecules.
- ❖ TOF stands for "Time of Flight".
- ❖ This generates characteristic mass spectral fingerprints which is compared with large library of mass spectra.
- ❖ A versatile analytical technique to detect and characterize mixtures of organic molecules.



Spettrometria di massa

La **spettrometria di massa (MS)** è una tecnica di chimica analitica che permette di identificare la quantità e il tipo di sostanze chimiche presenti in un campione mediante misura del rapporto massa/carica e dell'abbondanza degli ioni in fase gassosa.

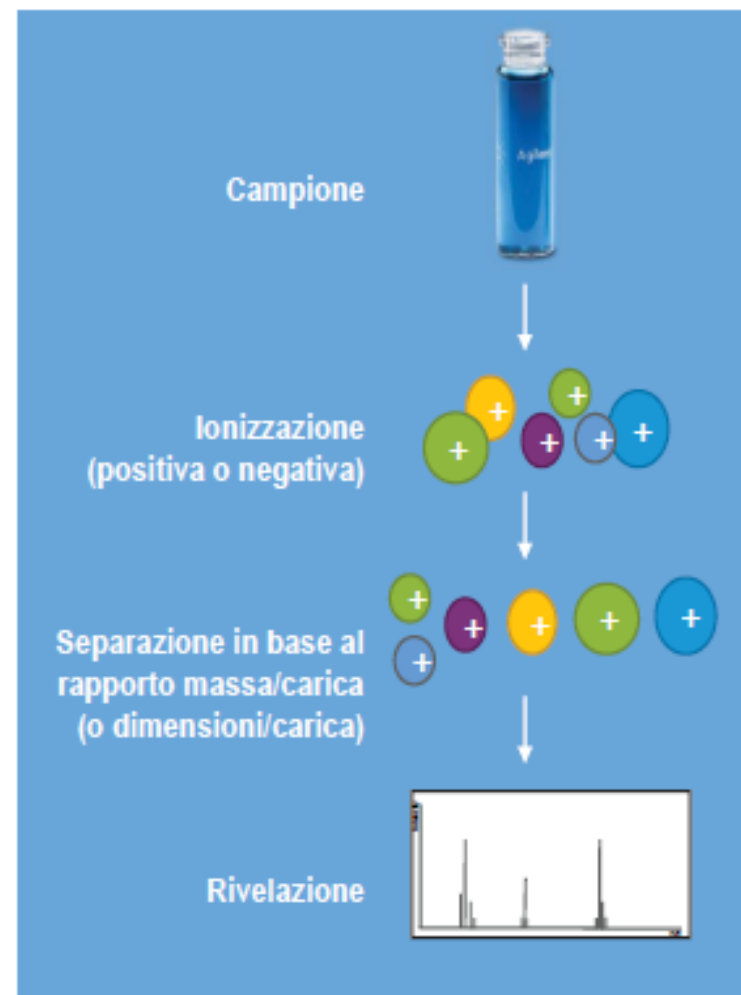
Il diagramma dello spettro di massa generato riporta il segnale degli ioni in funzione del rapporto massa/carica. La massa dello ione molecolare e dei frammenti ricavata dagli spettri viene utilizzata per determinare la composizione elementare o firma isotopica di un composto. Queste informazioni sono impiegate per identificare le strutture chimiche di varie molecole, per esempio pesticidi o peptidi.

La spettrometria di massa opera ionizzando i composti chimici per generare molecole o frammenti di molecole carichi e quindi misurandone i rapporti massa/carica.

Spettrometria di massa (II)

Procedura di MS standard

- Il campione (solido, liquido, gassoso) viene ionizzato
- Durante la ionizzazione le molecole del campione possono rompersi generando frammenti carichi
- Gli ioni vengono separati in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z)
- Gli ioni vengono rivelati da un meccanismo in grado di identificare le particelle cariche (per es., un elettromoltiplicatore)
- I risultati sono visualizzati sotto forma di spettri con l'abbondanza relativa in funzione del rapporto m/z
- L'identificazione viene eseguita correlando masse note alle masse identificate o tramite un pattern di frammentazione caratteristico



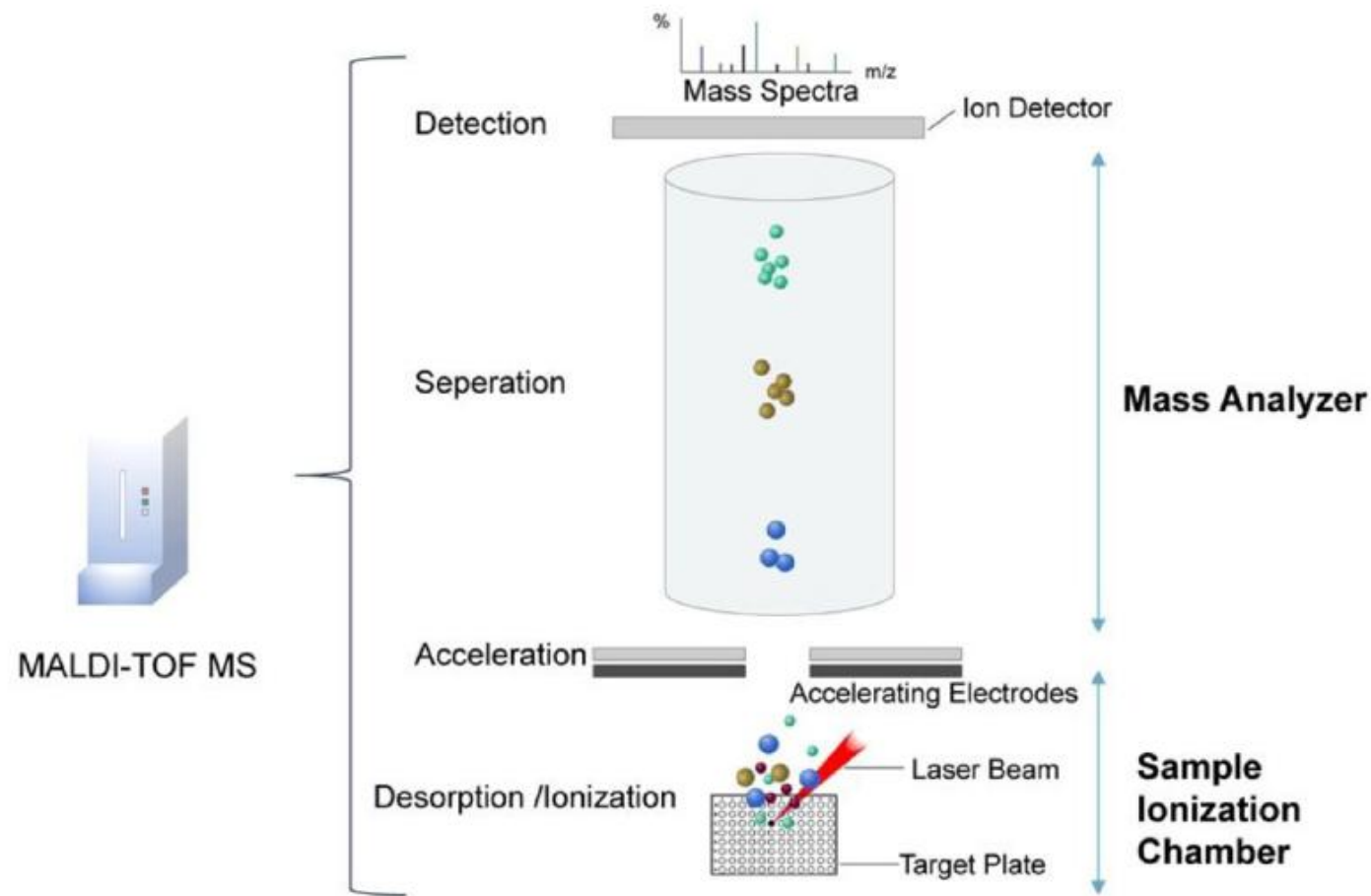
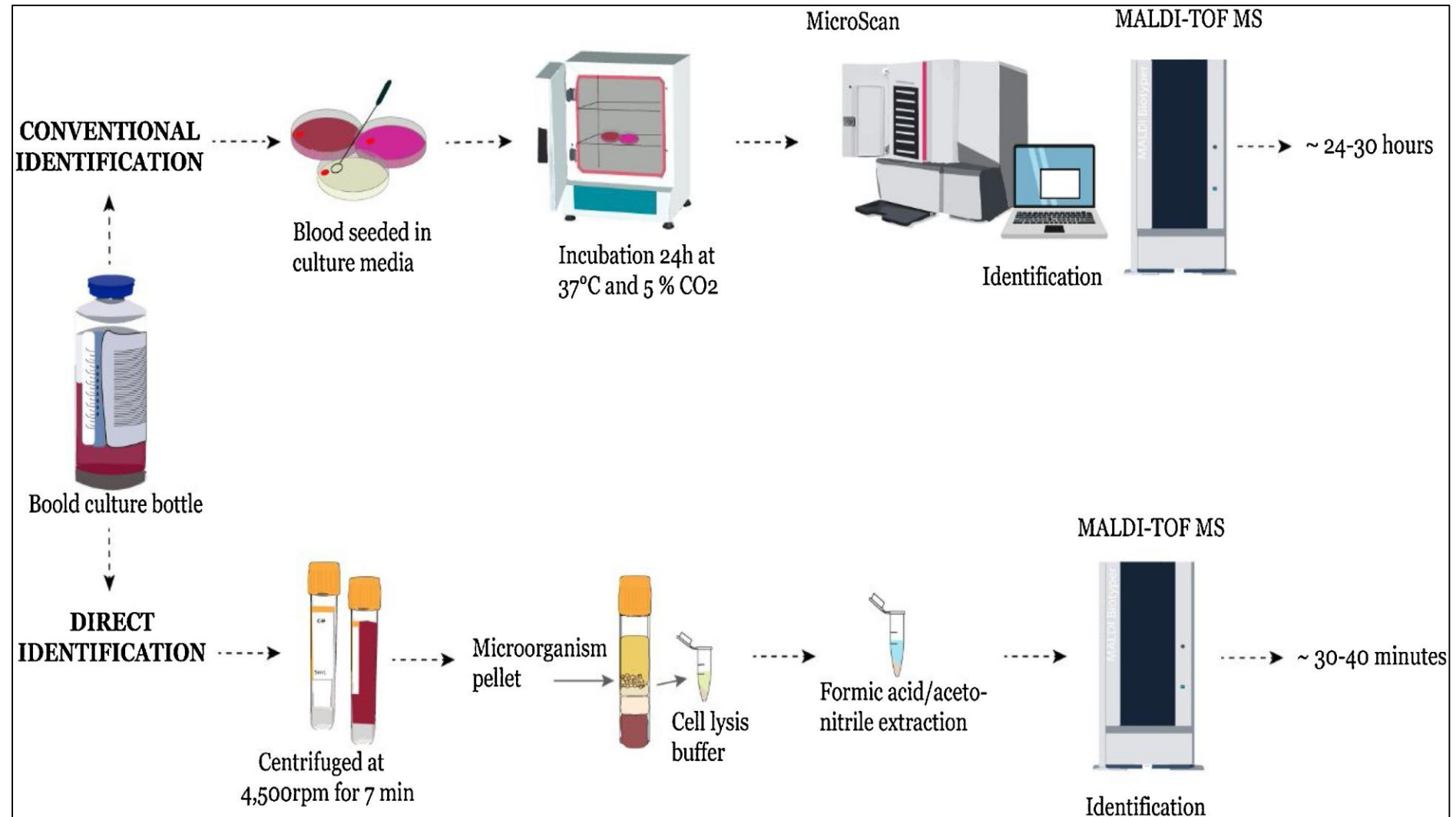


Figure 1. MALDI-TOF mass spectrometer. Target plate is placed in the vacuum chamber of a mass spectrometer. Spots to be analyzed are shot by a laser to desorb and ionize the sample and matrix molecules from the target plate. Cloud of ionized molecules is accelerated into the TOF mass analyzer, toward the detector. Lighter molecules travel faster, followed by progressively heavier analytes. Mass spectrum is generated, representing the number of ions hitting the detector over time. Separation is by the mass-to-charge ratio, but because the charge is typically single, separation is effectively by molecular weight.



VITEK® MS Da rivedere
VITEK® MS Dettaglio da rivedere

Informazione isolato

ID Campione: 00028004492141-1

Tipo campione: Sangue

Livello di confidenza:

Numero di identificazioni: 1

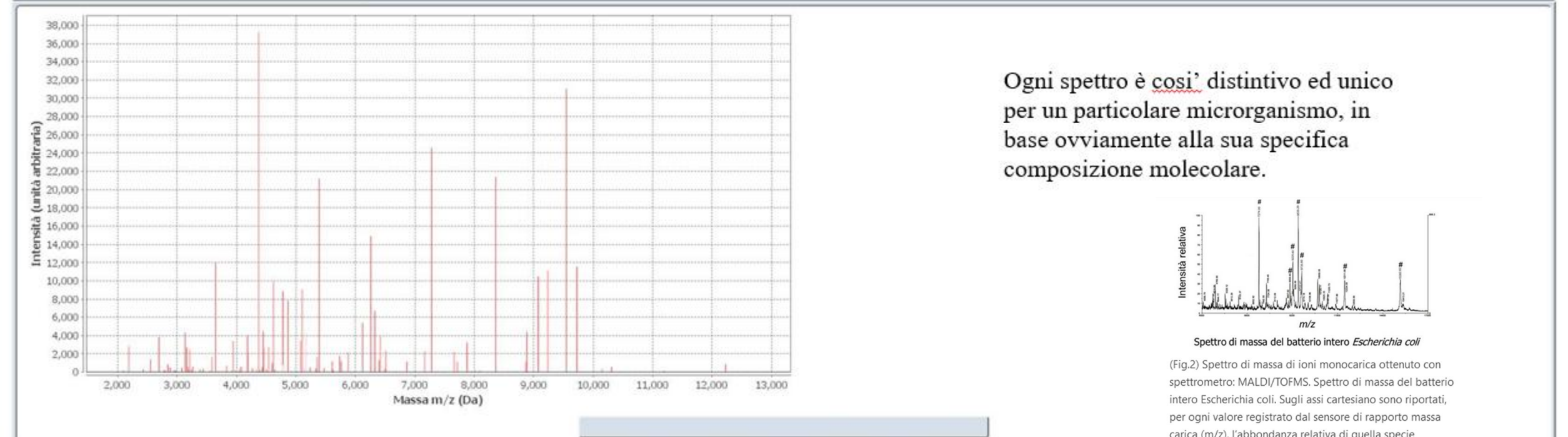
Lista delle identificazioni

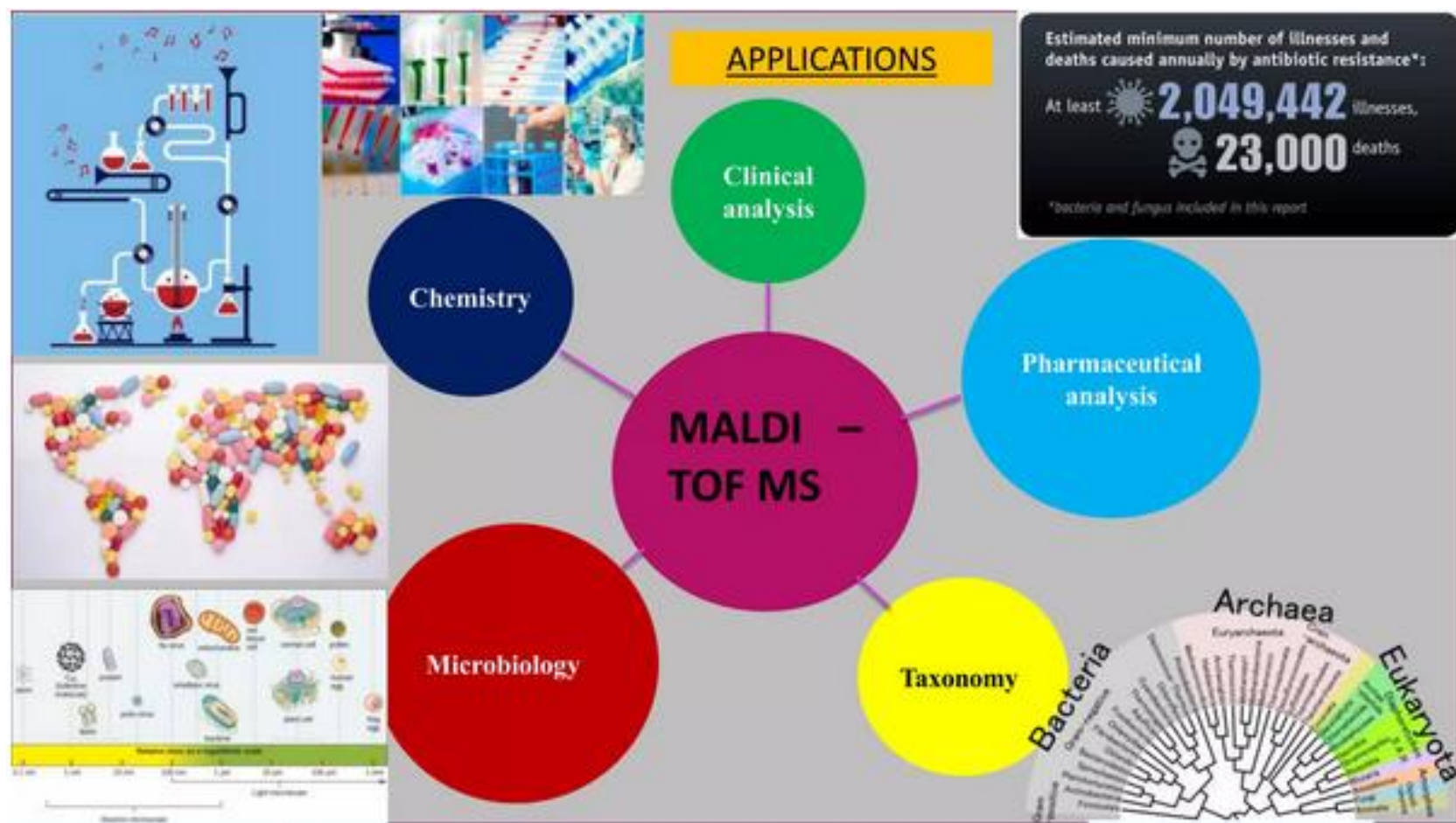
✓

+

	Posizione	Data analisi	Nome germe	Patogenicità	Valore di confidenza	Livello di confidenza	Messaggio(i) di acquisizione/calcolo
	F2	19/01/22 9:28	Escherichia coli		99.9		

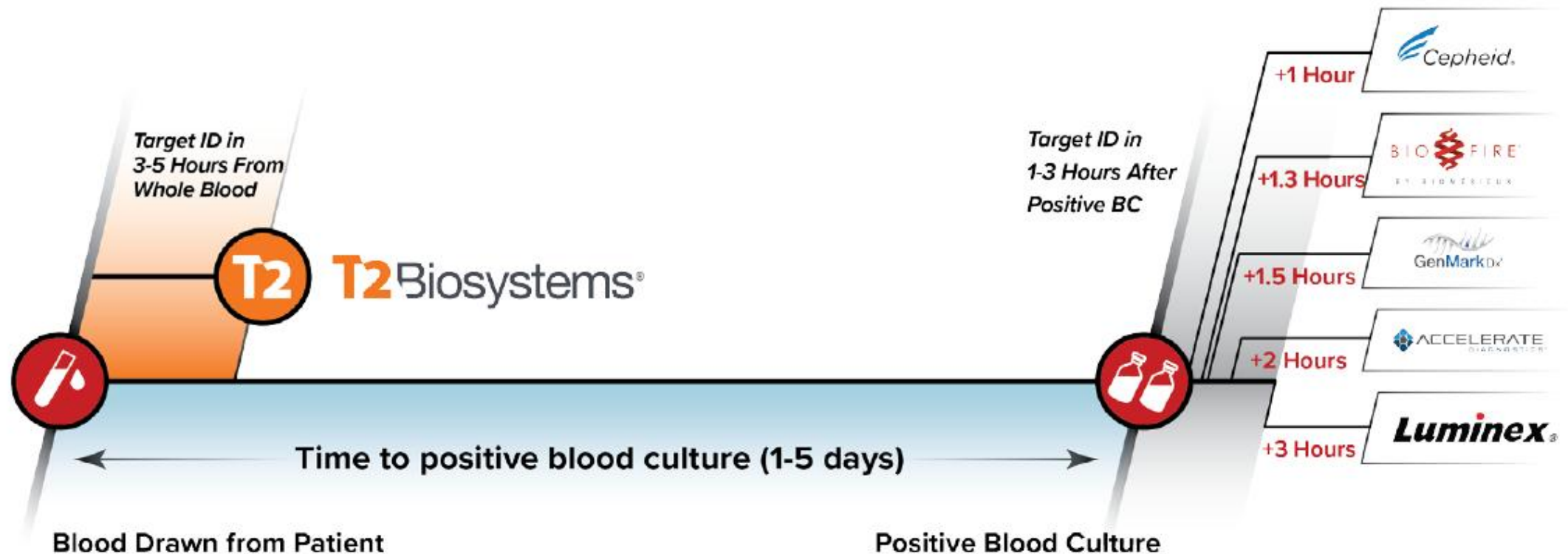
Legenda:
Validare la selezione
Aggiungi commento





DIAGNOSTICA DELLE SEPSI

- Come inserire il sistema nel percorso diagnostico tradizionale



The Facts About Sepsis



Most expensive hospital-treated condition in the U.S.



Contributes to 1 in 2-3 hospital deaths¹



Representing \$27B in U.S. healthcare costs^{2,3}



Claims more lives annually than breast cancer, prostate cancer and AIDS, combined⁴



More than 1 in 5 surviving patients die within 2 years as a consequence of sepsis⁵



More than 1.6M diagnosed annually in the U.S. and ~500,000 die⁶



Sepsis is the most prevalent and costly cause of hospital readmissions⁷

1. Liu, V., Escobar, G. J., Greene, J. D., Soule, J., Whippy, A., Angus, D. C., & Ivashyna, T. J. (2014). Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *Jama*, 312(1), 90-92.
2. Torio, C. M., Moore, B. J. (2016). Statistical Brief# 204. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP). May.
3. McDermott, K. W., Elixhauser, A., Sun, R. (2017). Statistical Brief# 225. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP). June.
4. National Institute of General Medical Sciences. National Institutes of Health. Sepsis fact sheet. 2014.
5. Prescott, H. C., Osterholzer, J. J., Langa, K. M., Angus, D. C., & Ivashyna, T. J. (2016). Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ*, 353, i2375.
6. Elixhauser, A., Friedman, B., Stranges, E. (2011). Statistical Brief# 122. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP). October.
7. Mayr, F. B., Talisa, V. B., Balakumar, V., Chang, C. C. H., Fine, M., & Yende, S. (2017). Proportion and cost of unplanned 30-day readmissions after sepsis compared with other medical conditions. *Jama*, 317(5), 530-531.