

Università degli Studi di Padova



Corso di Laurea in Biotecnologie

Insegnamento: Microbiologia

Laboratorio

Prof.ssa A. Calistri e Prof.ssa C. Del Vecchio

Collaboratori: Dott.ssa Sarah Di Sopra
Dott.ssa Ioannis Bekas

PROGRAMMA DELLE ESERCITAZIONI

PRIMA SETTIMANA

I GIORNO:

1. Introduzione alle Norme Generali di Comportamento nel Laboratorio
2. Preparazione di terreni batteriologici solidi e liquidi
3. Preparazione di piastre per la crescita batterica

II GIORNO

1. Semina su terreni generici, differenziali e selettivi di una coltura microbica mista
2. Semina su Chromagar di una coltura fungina mista
3. Allestimento di vetrini per la colorazione di Gram a partire dalle colture microbiche miste
4. Colorazione di Gram e osservazione dei vetrini

III GIORNO

1. Osservazione piastre seminate il giorno prima
2. Preparazione mediante semina in BHI di colture pure a partire da isolati batterici
3. Allestimento di nuovi vetrini per colorazione di Gram a partire dagli isolati
4. Colorazione di Gram e osservazione vetrini

IV GIORNO:

1. Osservazione delle piastre seminate i giorni precedenti
2. Allestimento e osservazione dei vetrini

SECONDA SETTIMANA

V GIORNO:

1. Allestimento di test biochimici per identificazione di specie batterica
2. Semina di 3 piastre di BHI con diluizioni scalari di una coltura pura di *Enterobacterales*

VI GIORNO

1. Valutazione dei risultati dei test biochimici
2. Allestimento di un antibiogramma
3. Allestimento della MIC
4. Determinazione del titolo batterico con il metodo delle UFC/ml

VII GIORNO

1. Lettura antibiogramma e MIC
2. Analisi del contenuto microbico di kefir: preparazione delle piastre per la valutazione del numero di microrganismi e delle caratteristiche delle colonie

VIII GIORNO:

1. Analisi del contenuto microbico di kefir: determinazione del titolo microbico con il metodo delle UFC/ml; osservazione delle caratteristiche delle colonie isolate
2. Allestimento di vetrini a partire dalle colonie isolate
3. Discussione dei dati e conclusioni

**ATTENZIONE: OGNI GRUPPO MARCHERA' IL MATERIALE PREPARATO CON IL
NUMERO DELLA PROPRIA POSTAZIONE, AULA E DATA**

Prima settimana

1° Giorno

Programma giornaliero:

- Preparazione di 10 piastre BHA che verranno utilizzate nel proseguo dell'esercitazione
- Preparazione di 100 ml di BHI liquido

Materiali e Metodi

Materiale messo a disposizione per gruppo di lavoro:

- ✓ 1 bottiglia contenente 200 ml di terreno solido BHA da sciogliere in microonde e da aliquotare in piastre Petri in un volume di circa 20 ml ciascuna, ottenendo in totale 10 piastre di BHA
- ✓ 10 piastre Petri
- ✓ 1 bottiglia da 250 ml nella quale preparare 100 ml di terreno liquido BHI
- ✓ terreno BHI liofilizzato da pesare e sciogliere con acqua distillata

Protocolli

1.1 Preparazione di terreni per colture batteriche

Avvertenze: per evitare la contaminazione accidentale dei terreni e delle piastre da utilizzare per le colture batteriche, è essenziale lavorare **in prossimità del becco bunsen acceso**; infatti, nel raggio di circa 30 cm dalla fiamma, l'aria è sterile, cioè libera da microrganismi vivi.

Preparazione di piastre contenenti terreno BHA

Il terreno solido BHA, contenuto nella bottiglia (200 ml) a disposizione, viene sciolto utilizzando un forno a microonde, dopo aver svitato leggermente il tappo: durante lo scioglimento, è necessario i) mescolare di tanto in tanto il terreno affinché diventi omogeneo (infatti, l'agar tende a depositarsi sul fondo della bottiglia), ii) evitare di bagnare il tappo della bottiglia con il terreno, iii) evitare di fare fuoriuscire il terreno dalla bottiglia stessa. Nel frattempo marcare il fondo delle piastre Petri (diametro di 90 mm) con il proprio nome e con quello del terreno (BHA).

Quando il terreno risulta sciolto ed omogeneo viene versato nelle piastre (circa 20 ml per piastra) e con un movimento rotatorio viene distribuito equamente su tutta la superficie; qualora si formassero bolle d'aria, si consiglia di spostarle verso il bordo della piastra mediante un leggero movimento rotatorio. Si lascia solidificare il terreno; successivamente le piastre si conservano a 4°C, dopo averle sigillate con il parafilm.

Preparazione di terreno liquido BHI

Le quantità indicate sono per 100 ml di terreno:

- Pesare 3.7 g di BHI liofilizzato
- Versare la polvere nella bottiglia da 250 ml
- Aggiungere 70 ml di acqua distillata utilizzando il cilindro graduato e agitare con movimento rotatorio finché la soluzione diventa limpida

- Trasferire il terreno nel cilindro graduato, portare a volume di 100 ml con H₂O distillata e trasferire nuovamente nella bottiglia
- Chiudere la bottiglia ed autoclavare (trattamento a 120°C per 20 minuti a 1 atm in atmosfera umida)
- Conservare a temperatura ambiente

Composizione terreni:

	<u>BHI (g/l)</u>	<u>BHA (g/l)</u>
Infuso di cuore e cervello di bue	6g	6g
Digestivo peptico di tessuto animale	6g	6g
Digestivo pancreatico di gelatina	14.5g	14.5g
NaCl	5g	5g
Destrosio	3g	3g
Fosfato disodico	2.5g	2.5g
Agar		13.5g

2° Giorno

Programma giornaliero:

- Semina su terreni generici, differenziali e selettivi di una coltura microbica mista
- Semina su Chromagar di una coltura fungina mista
- Allestimento di vetrini per la colorazione di Gram a partire dalle colture microbiche miste
- Colorazione di Gram e osservazione vetrini

Materiali e Metodi

Materiale messo a disposizione per postazione:

- 1 coltura microbica mista (**M**)
- 1 coltura fungina mista (**F**)
- 4 piastre contenenti differenti terreni solidi (BHA, MSA, McC, e Sabouraud)
- 1 piastra di Chromagar per l'isolamento a partire dalla coltura fungina mista
- vetrini per allestire la colorazione di Gram
- 1 ansa da batteriologia
- 1 alibox per lo scarto dei rifiuti
- 1 microscopio ottico

Protocolli

2.1 Esame culturale: semina della coltura mista su diversi terreni di crescita solidi

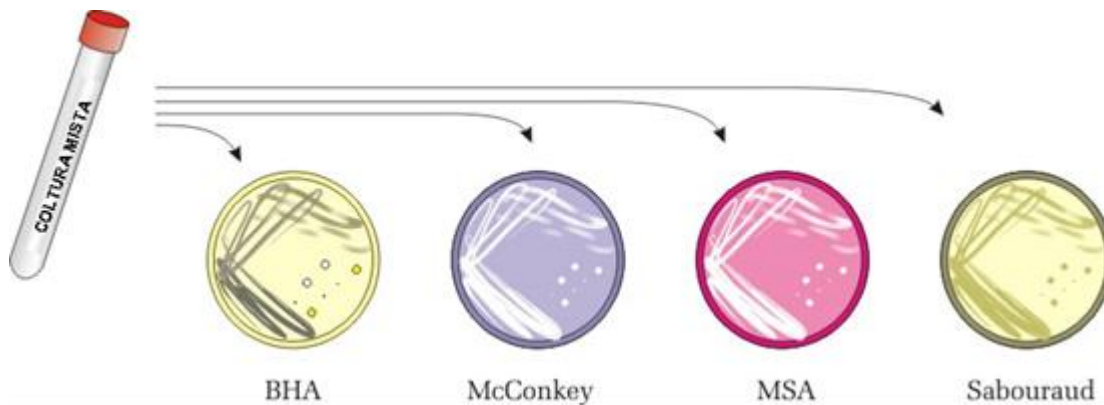
Tramite questa metodica vengono isolate le diverse specie di microrganismi presenti in una coltura mista (**M**). Attraverso l'utilizzo di un'ansa sterilizzata al bunsen (si veda il procedimento sotto riportato per maggiori dettagli), la sospensione microbica mista verrà seminata sui terreni di crescita solidi di seguito descritti:

BHA (Brain Heart Agar): terreno completo utilizzato per coltivare la maggior parte dei batteri. È costituito da infuso di cuore e di cervello di bue, peptone, destrosio, cloruro di sodio, fosfato disodico, agar, pH 7.4.

MSA (Mannitol Salt Agar): noto anche come terreno di Chapman, è un terreno selettivo (elevata concentrazione di NaCl) e differenziale (presenza di mannitolo), utilizzato per l'isolamento degli stafilococchi. Contiene peptone, mannitolo, cloruro di sodio, agar, rosso fenolo, pH 7.4.

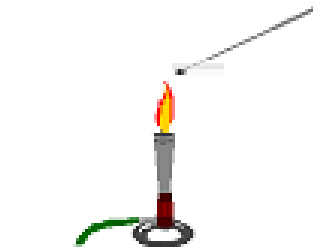
McC (MacConkey): terreno adatto all'isolamento (terreno selettivo: sali biliari) e alla differenziazione (terreno differenziale: lattosio) dei batteri enterici Gram-negativi lattosio fermentanti da quelli lattosio non fermentanti. È costituito da peptone, lattosio, sali biliari, cloruro di sodio, agar, rosso neutro, cristal violetto, pH 7.4.

Sabouraud: terreno adatto all'isolamento dei funghi (pH acido, 2 piastre distinte, una con e una senza antibiotici)



Procedimento:

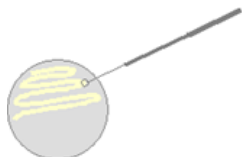
La metodica va applicata per ogni tipo di terreno di crescita solido:



- 1) Flambare l'ansa, riscaldandola sulla fiamma del becco bunsen e lasciarla raffreddare all'aria



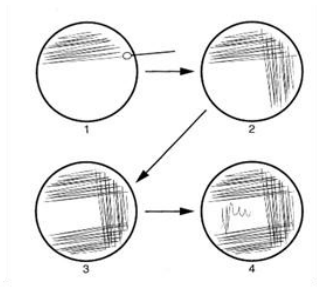
- 2) Immergere l'ansa sterilizzata nella sospensione di coltura mista (siglata con **M**) e prelevarne un'ansata dalla coltura, come di seguito descritto:
 - ◆ Rimuovere il tappo dalla provetta contenente la coltura MISTA
 - ◆ Prendere un'ansata del campione
 - ◆ Rimettere il tappo alla provetta



- 3) Togliere il coperchio dalla piastra e strisciare, con movimento orizzontale, una parte della superficie del terreno solido



- 4) Flambare l'ansa riscaldandola sulla fiamma del becco bunsen e lasciarla raffreddare all'aria



5) Strisciare una nuova sezione della piastra, come sopra descritto

6) Ripetere le operazioni 4 e 5 fino a completare la distribuzione della coltura batterica in 3 quadranti e nella strisciata finale, come spiegato dagli esercitatori e riportato a fianco

2.2 Esame microscopico

Poiché la cellula microbica ha dimensioni di norma assai modeste (da frazioni di micrometri a pochi micrometri), l'osservazione al microscopio ottico (potere di risoluzione di $0,15\ \mu\text{m}$) offre informazioni generiche sulla morfologia batterica, limitate alle dimensioni, alla forma e al raggruppamento delle singole cellule. Normalmente, l'osservazione al microscopio di cellule batteriche/lieviti/funghi viene condotta utilizzando coloranti, allo scopo di aumentare il contrasto con il mezzo circostante e rendere più facile lo studio morfologico. Nel nostro caso, utilizzeremo la colorazione di Gram.

Il procedimento è il seguente:

il preparato microbico viene trattato con una soluzione di cristal violetto per 1 minuto; si allontana quindi il colorante lavando con acqua e si mordenzia la colorazione (mordenti sono dette quelle sostanze che formano complessi insolubili con un colorante rendendone più stabile l'unione con il substrato) mediante un trattamento di 30 secondi con una soluzione di iodio e ioduro di potassio in acqua (liquido di Lugol); segue un trattamento con un decolorante (a base di alcool etilico, acetone) per 30 secondi ed infine un trattamento con il secondo colorante (fuxina, safranina) di colore facilmente differenziabile (rosso) da quello del primo colorante usato (violetto).

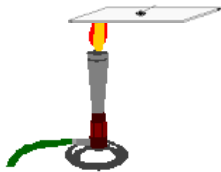
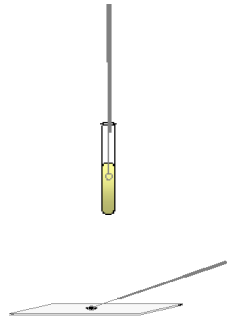
La diversa colorazione (rosso o violetto) che assumono i batteri con questa tecnica dipende dalle differenze strutturali presenti nella parete cellulare.

La parete dei batteri **Gram+** è costituita in gran parte da uno spesso strato di peptidoglicano che non permette la decolorazione della cellula batterica (colorata precedentemente con il colorante basico cristal violetto) da parte del decolorante. I Gram+ rimangono pertanto colorati in violetto.

I **Gram-** hanno una parete multistratificata che, per la sua composizione chimica, risulta permeabile all'agente decolorante. Questi batteri dunque si colorano con il colorante di contrasto, la safranina, assumendo una colorazione rossa.

I lieviti assumono una colorazione violacea e appaiono di dimensioni più grandi rispetto ai batteri dai quali sono facilmente distinguibili. In alcuni preparati potrebbero presentarsi muffe con caratteristiche ife.

Procedimento:

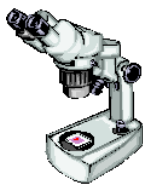


- 1) Sterilizzare l'ansa riscaldandola al becco bunsen e lasciarla raffreddare all'aria
Prelevare alcune ansate dalla sospensione contenente la flora mista oggetto di studio, dopo averla agitata leggermente per renderla omogenea
- 2) Stendere sul vetrino, con movimento rotatorio, alcune ansate (**almeno quattro**) del materiale e risterilizzare l'ansa, come precedentemente descritto
- 3) Essiccare il preparato, lasciandolo asciugare a temperatura ambiente fino a completa evaporazione dell'acqua. Segnare il vetrino con la penna a punta di diamante, sul lato dove è deposto il materiale
- 4) Fissare il preparato, passando velocemente il vetrino sulla zona più calda della fiamma del becco bunsen, per almeno tre volte
- 5) Procedere alla colorazione del preparato, secondo il metodo di Gram di seguito descritto:

Colorazione di Gram:

- 1) Immergere il vetrino con il preparato nel colorante Cristal violetto per 60 secondi.
- 2) Lavare con acqua (di rubinetto).
- 3) Immergere il vetrino nella soluzione iodurata di Lugol (mordenzante) per 30 secondi. Tutte le cellule batteriche del preparato si colorano di blu.
- 4) Lavare con acqua (di rubinetto).
- 5) Trattare il vetrino con il decolorante costituito da alcool etilico (95-100°) per 30 secondi.
- 6) Lavare con acqua (di rubinetto). I batteri Gram- verranno in questo modo decolorati.
- 7) Immergere il vetrino nel secondo colorante (Fucsina, colorante di contrasto) per 60 secondi. I batteri Gram- si colorano in rosso.
- 8) Lavare con acqua (di rubinetto). Lasciare essiccare il vetrino.

- 6) Osservare al microscopio ottico il preparato.



- 7) Al termine dell'osservazione pulire accuratamente gli oculari del microscopio con il disinfettante consigliato dagli esercitatori

2.3 Isolamento di diverse specie di Candida a partire da una coltura fungina mista e allestimento di un vetrino per la colorazione di Gram

In questo caso ripeteremo la stessa procedura descritte ai punti 2.1 e 2.2 a partire dalla coltura mista fungina marcata F

3° Giorno

Programma giornaliero:

- Osservazione piastre seminate il primo giorno
- Allestimento di nuovi vetrini per colorazione di Gram a partire dagli isolati
- Semina di 2 piastre di BHA per l'isolamento di eventuali Enterobatteriacee

Materiali e Metodi

Materiale messo a disposizione per studente:

- 2 piastre BHA da utilizzare per l'isolamento delle enterobatteriacee
- 1 ansa da batteriologia
- vetrini per allestire la colorazione di Gram
- pipette pasteur di vetro per depositare una piccola goccia di acqua (del rubinetto) sul vetrino

Protocolli

3.1 Interpretazione dell'esame colturale e della semina delle diverse specie di microrganismi presenti nelle colture

Osservazione delle piastre seminate il giorno precedente (BHA, MSA, McC, Sabouraud e Chromagar), considerando sia la morfologia delle colonie e l'aspetto del terreno.

3.2 Isolamento di diverse specie di microrganismi presenti nella coltura mista ed osservazione al microscopio ottico

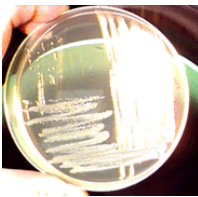
Il fine dell'isolamento è l'ottenimento di colture pure delle specie di microrganismi presenti nella coltura mista, seminata il giorno precedente in terreno solido BHA. Nel caso non fossero presenti colonie isolate, è possibile effettuare l'isolamento utilizzando i batteri seminati nei terreni selettivi/differenziali.

Procedimento:

Osservando la coltura mista seminata il giorno precedente su terreno BHA, si potrebbero evidenziare colonie con caratteristiche diverse. A partire da alcune colonie identificate con l'aiuto degli esercitatori eseguire la procedure riportata in seguito



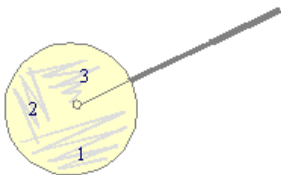
- 1) Sterilizzare l'ansa, flambandola sulla fiamma del becco bunsen e lasciarla raffreddare all'aria



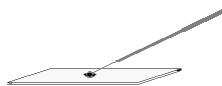
- 2) Individuare una colonia isolata nella piastra selezionata (BHA o altre, secondo le indicazioni degli esercitatori)



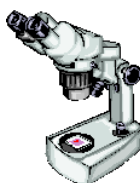
- 3) Toccare la colonia prescelta con l'ansa sterile



- 4) Strisciare una nuova piastra di terreno BHA, utilizzando la stessa metodica impiegata il giorno precedente per l'esame colturale (strisciare, con movimento orizzontale, una parte della superficie del terreno solido). Mettere ad incubare a 37°C.



- 5) Dopo aver flambato l'ansa, toccare una nuova colonia, con le medesime caratteristiche morfologiche di quella impiegata nel punto precedente; stemperarla su un vetrino in cui PRECEDENTEMENTE è stata depositata, con l'aiuto di una pipetta pasteur, una goccia di acqua del rubinetto (**NON la soluzione fisiologica**).



- 6) In questo caso la procedura verrà eseguita per tutte le colonie di microrganismi diversi identificabili nei terreni piastrati il giorno precedente.
- 7) Procedere con la fissazione dei preparati al calore e con la colorazione di Gram

4° Giorno

Programma giornaliero:

- Osservazione delle piastre seminate il giorno precedente
- Allestimento di vetrini per la colorazione di Gram a partire dalle colonie
- Osservazione dei vetrini

Materiali e Metodi

Materiale messo a disposizione per postazione

Piastre e vetrini allestiti il giorno precedente

Protocolli

4.1 Procedimento

Osserveremo le caratteristiche morfologiche delle colonie cresciute nei diversi terreni e procederemo come descritto al punto 2.2 della dispensa.

Seconda settimana

5° Giorno

Programma giornaliero:

- Allestimento di test biochimici per identificazione di specie batterica
- Semina di 3 piastre di BHI con diluizioni scalari di una coltura pura di *Enterobacteriales*

Materiali e Metodi

Materiale messo a disposizione per postazione:

- 2 enteropluri-test
- 1 provetta sterile contenente una coltura batterica pura di *Enterobacteriales* (siglata con **P**) (1 rack porta provette)
- 3 piastre BHA da utilizzare per la titolazione della coltura pura
- 3 pasteur di vetro per la semina in terreno solido BHA delle diluizioni (per la titolazione)
- 6 provette tappo blu sterili per allestire le diluizioni delle titolazioni (1 rack porta provette)
- Tubo (tappo blu) 30 ml di soluzione fisiologica (SF), da impiegare nelle diluizioni seriali della titolazione della coltura pura
- pipette da 5 ml sterili
- propipettatore
- puntali sterili
- pipette Gilson da 1000 e 200 µl (per effettuare le diluizioni seriali e per la semina)
- alibox per l'eliminazione dei rifiuti biologici
- 1 pennarello

Protocolli

5.1 Saggio di identificazione biochimica della coltura pura (Enteropluri-test)

L'enteropluri-test è un sistema per l'identificazione biochimica rapida delle *Enterobacteriaceae* che consente l'analisi simultanea di 15 differenti caratteristiche biochimiche delle specie batteriche.

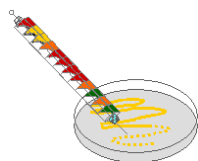
PRINCIPIO:

Gli enterobatteri possono essere identificati grazie a diverse prove biochimiche:

- fermentazione del destrosio e produzione di gas
- decarbossilazione della lisina
- decarbossilazione dell'ornitina
- fermentazione del triptofano e produzione di H₂S
- fermentazione dell'adonitolo
- fermentazione del lattosio
- fermentazione dell'arabinosio
- fermentazione del sorbitolo
- fermentazione del glucosio (Voges-Proskauer)
- fermentazione del dulcitol e della fenilalanina

- idrolisi dell'urea
- utilizzazione del citrato

Procedimento:



Nel raggio di circa 30 cm dalla fiamma del becco bunsen, svitare i cappucci dell'enteropluritest e con la punta dell'ago prelevare, dalla piastra BHA, una colonia isolata per ciascuna specie batterica Gram-



- 1) Inoculare i 2 enteropluritest, tirando e ruotando l'ago attraverso tutti gli scomparti del tubo.

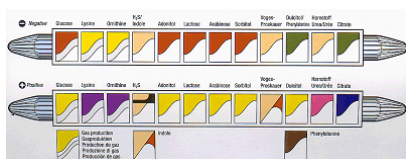


- 2) Reinscrivere l'ago fino alla "tacca" e poi spezzarlo piegandolo. La parte dell'ago che rimane all'interno assicura l'anaerobiosi.



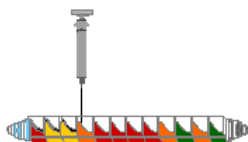
- 3) Con il pezzo di ago rotto, perforare la pellicola di plastica in corrispondenza dei fori degli ultimi 8 scomparti al fine di creare un ambiente aerobio. Riavvitare i tappi.

- 4) Incubare a 37°C per 20-24 ore, possibilmente in posizione verticale su un portaprovette **con lo scomparto del destrosio rivolto verso l'alto**.



- 5) **Il giorno seguente** valutare quali reazioni sono positive e quali negative e riportarle nella tabella:

	destrosio	gas	lisina	ornitina	indolo	H ₂ S	adonitolo	lattosio	arabinosio	sorbitolo	Voges-P	dulcitolio	fenilalanina	urea	citrato
reazione															



- 6) Eseguire il test dell'indolo, iniettando con una siringa 4 gocce di reattivo di Kovacs, direttamente sotto la pellicola di plastica dello scomparto H₂S/indolo (il reattivo vira al rosso se la reazione è positiva).

- 7) Utilizzare i foglietti di identificazione allegati alla confezione di Enteropluritest, contrassegnando per ogni reazione positiva i numeri corrispondenti.

Aggiungere tutti i numeri cerchiati che si riscontrano in ciascun gruppo di sezioni ed inserire la somma nello spazio presente sotto la freccia nel foglietto. Il numero a 5 cifre ottenuto (ID value), consente la rapida identificazione del batterio in esame utilizzando il manuale dei codici.

EnteroPluri-Test with VP

REF 78618 / 78619

DATE	SAMPLE														
	GROUP 1			GROUP 2			GROUP 3			GROUP 4			GROUP 5		
Test	Glucose	Gas	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Indole	Adonitol	Lactose	Arabinose	Sorbitol	VP	Dulcitol	PA	Urea	Citrate
Positivity code	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Results															
Code sum															
NUMERICAL CODE			MICROORGANISM												

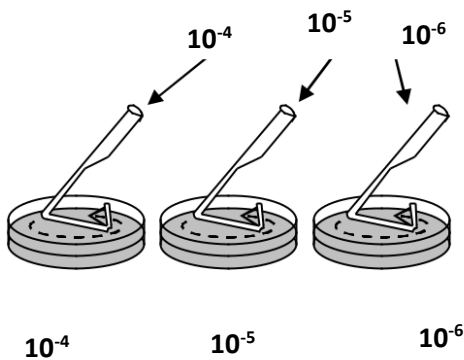
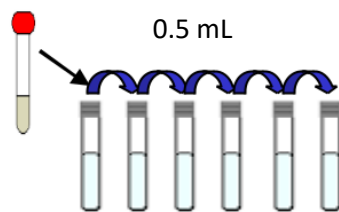
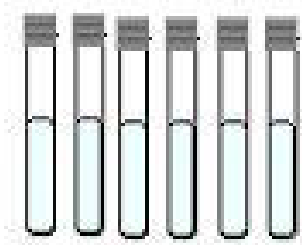
5.2 Titolazione di una coltura pura di *Enterobacterales*

Lo scopo di questo saggio è la determinazione del numero di cellule batteriche vive, presenti nella sospensione batterica fornita (U.F.C./mL, unità formanti colonia per mL), mediante semina di alcune diluizioni scalari (a fattore 10) del campione in esame.

Principio:

Ogni cellula batterica viva, seminata in piastra contenente terreno solido ed incubata per 12 ore a 37°C, si duplica, formando una colonia isolata. Contando il numero di colonie cresciute nel terreno solido, si può risalire al numero di microrganismi presenti in un volume noto della sospensione batterica di partenza.

Procedimento



1) Preparare in sterilità 6 provette (con il tappo rosso), contenenti ciascuna **4.5 ml** di soluzione fisiologica

2) Introdurre sterilmente nella prima provetta **0.5 ml** della sospensione batterica PURA (utilizzare le pipette Gilson). Miscelare bene tramite agitazione

3) Trasferire **0.5 ml** della prima diluizione nella seconda provetta e continuare così fino alla sesta provetta (diluizione 10^{-6}) cambiando il puntale ad ogni diluizione

4) Costruire con una pipetta pasteur un rastrello. Seminare su piastre BHA 0.1 ml delle ULTIME tre diluizioni (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) partendo dalla più diluita, utilizzando la pipetta Gilson da 200 microlitri

5) Incubare a 37°C le piastre BHA seminate con le diluizioni scalari della coltura pura per 12 ore

6) Il giorno seguente, contare dove possibile le colonie ottenute nelle diverse diluizioni.

Determinare il titolo ed esprimerlo in UFC/mL

6° Giorno

Programma giornaliero:

- Valutazione dei risultati dei test biochimici
- Allestimento di un antibiogramma
- Allestimento della MIC
- Determinazione del titolo batterico con il metodo delle UFC/ml

Materiali e metodi

Materiale messo a disposizione per postazione:

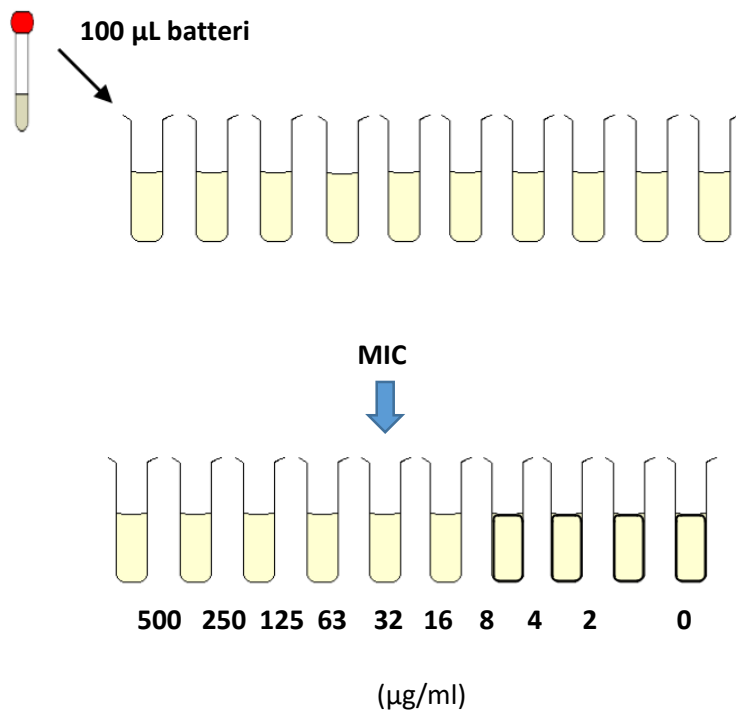
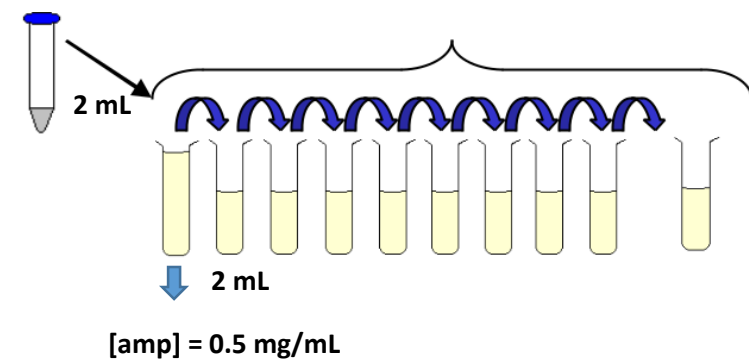
- 1 provetta sterile contenente una coltura batterica pura di Gram- (siglata con **P**) (1 rack porta provette)
- 1 tampone sterile per l'antibiogramma
- 10 provette (tappo rosso) dove allestire le diluizioni seriali dell'antibatterico per la MIC (n.2 rack porta provette: uno verrà utilizzato per l'incubazione in termostato per 12 ore)
- 1 bottiglia contenente BHI per la preparazione delle diluizioni
- 1 piastra BHA per allestire l'antibiogramma
- Ampicillina (**AMP**) (10 mg/ml)
- 5 pipette da 5 ml sterili
- propipettatore
- puntali sterili
- pipette Gilson da 1000 e 200 µl (per effettuare le diluizioni seriali e per la semina)
- alibox per l'eliminazione dei rifiuti biologici
- 1 pennarello

Protocollo

6.1 Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)

Quando l'esame batteriologico identifica un batterio patogeno, è essenziale individuare un antibiotico con azione antibatterica, in grado di interferire con la crescita del microorganismo. Si definisce **MIC** (minima concentrazione inibente) di un antibiotico la più bassa concentrazione in grado di inibire la crescita e **MCB** (minima concentrazione battericida) la più bassa concentrazione di un antibiotico capace di uccidere il batterio. Se queste concentrazioni possono essere applicate *in vivo*, l'antibiotico è efficace (quindi il batterio è sensibile ad un determinato antibiotico) con azione rispettivamente batteriostatica (MIC) o battericida (MCB).

Procedimento



1) Introdurre sterilmente nella PRIMA provetta un certo volume di terreno BHI e del farmaco ampicillina (stock=10 mg/ml) in modo tale da avere una concentrazione finale pari a 0.5 mg/ml in un volume finale pari a 4 ml. Miscelare bene.

2) Preparare 10 provette sterili, tutte contenenti 2 ml di terreno di coltura BHI

3) Trasferire, in sterilità, 2 ml dalla prima alla seconda provetta (utilizzando la pipetta da 5 ml) e miscelare bene. Procedere con le diluizioni in base 2 fino alla penultima provetta.

Lasciare l'ultima provetta senza farmaco (costituirà il controllo di crescita)

4) Aggiungere a TUTTE le provette 0.1 ml della sospensione batterica Gram-fornita

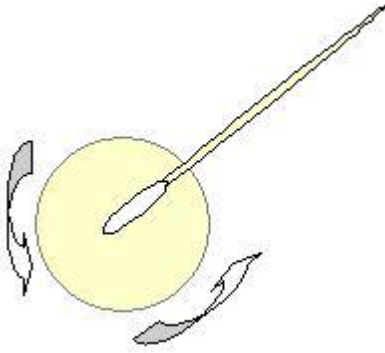
5) Incubare a 37°C per 12 ore

6) **Il giorno seguente**, leggere la MIC analizzando visivamente la torbidità di ciascuna provetta

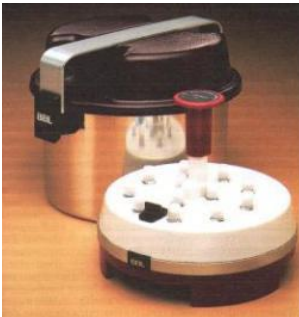
6.2 Saggio di sensibilità ad antibatterici di una coltura pura (antibiogramma)

La valutazione della sensibilità di un ceppo batterico a diversi antibatterici, si effettua misurando il diametro dell'alone di inibizione che si forma intorno a dischetti, imbevuti di quantità prestabilite e controllate di antibatterico (tecnica di Kirby-Bauer). L'interpretazione dei risultati si ottiene consultando apposite tabelle che permettono di stabilire, in base al diametro di inibizione, se il ceppo microbico è *resistente*, *intermedio* o *sensibile* ad un determinato antibatterico.

Procedimento



- 1) Immergere un tampone sterile nella sospensione batterica Gram- fornita
- 2) Seminare sulla superficie della piastra BHA, in maniera uniforme, ruotando il tampone al fine di depositare tutta la sospensione batterica. Ripetere l'operazione più volte ruotando la piastra



- 3) Utilizzando l'apposito distributore di dischetti depositare sulla superficie della piastra seminata una serie di dischetti di carta bibula, impregnati con quantità note di diversi antibiotici



- 4) Incubare a 37°C per 20-24 ore
- 5) Il giorno seguente, si misurano gli aloni di inibizione della crescita attorno a ciascun dischetto di antibiotico. Interpretare i risultati in base allo schema di lettura fornito (Tabella in cartellone)

7° giorno

Programma giornaliero:

- Lettura antibiogramma e MIC
- Analisi del contenuto microbico di kefir: preparazione delle piastre per la valutazione del numero di microrganismi e delle caratteristiche delle colonie

Materiali e metodi

Materiale messo a disposizione per gruppo di lavoro:

- 10 piastre BHI agar preparate il primo giorno di esercitazioni
- 1 provetta sterile contenente kefir (K)
- 1 piastra da 24 pozzetti
- 1 provetta sterile contenente soluzione fisiologica (SF)

Protocollo

7.1 Analisi del contenuto microbico di kefir: preparazione delle piastre per la valutazione del numero di microrganismi e delle caratteristiche delle colonie

Prelevare 200µl di kefir e allestire diluizioni scalari in base 10 (10^{-1} - 10^{-8}).

Allestimento diluizioni in una piastra da 24 pozzetti:

Utilizzare 200µl di campione (K) e aggiungere 1,8 ml di soluzione fisiologica (SF), e proseguire **come nella tabella 1** avendo l'accortezza di cambiare puntale ad ogni diluizione.

Tabella 1.

Non diluito					
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
10^{-7}	10^{-8}				

Piastrare su terreno BHA 100µl (**diluizioni evidenziate nella tabella 1**) utilizzando la pasteur di vetro allestita a rastrellino (stesso protocollo spiegato al punto 5.2 della dispensa):

Incubare le piastre a 37°C O/N

7.2 Interpretazione dell'antibiogramma

Interpretare i risultati del test di Kirby-Bauer andando a misurare il diametro di inibizione e confrontandolo con i dati riportati nella **Tabella 2** (da EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, v.15).

Tabella 2.

Antibiotico	Diametro	
	S_≤	R_{>}
Ampicillina	14	14
Ceftazidime	22	19
Meropenem	22	22
Levofloxacin	23	19
Gentamicina	17	17
Vancomicina	/	/

8° Giorno

Programma giornaliero:

- Analisi del contenuto microbico di kefir: determinazione del titolo microbico con il metodo delle UFC/ml; osservazione delle caratteristiche delle colonie isolate.
- Allestimento di vetrini a partire dalle colonie isolate
- Discussione dei dati e conclusioni

Materiali e metodi

Materiale messo a disposizione per studente:

- Piastre allestite il giorno precedente

Protocolli

8.1 Analisi del contenuto microbico di yogurt e latte: determinazione del titolo microbico con il metodo delle UFC/ml; osservazione delle caratteristiche delle colonie isolate

Si procede come precedentemente spiegato.