Dal campione alla colonia: perché coltivare?

Il terreno non identifica da solo il microrganismo: seleziona, mette in evidenza e orienta il percorso diagnostico.

Campione clinico → **Crescita su terreno** → **Lettura delle colonie** → **Identificazione + AST**

Tre informazioni fondamentali

Quantità e morfologia di crescita; caratteristiche differenziali; isolamento di colonie pure per i test successivi.

Come si classificano i terreni?

Basali / non selettivi

Sostengono la crescita di batteri poco esigenti.

Nutrient agar, TSA

Arricchiti

Forniscono fattori nutritivi per microrganismi esigenti.

Agar sangue, agar cioccolato

Selettivi

Contengono componenti che inibiscono gruppi non bersaglio.

MacConkey, mannitolo salato

Differenziali

Rendono visibile una reazione metabolica o fenotipica.

MacConkey, XLD, TSI

Un terreno può essere contemporaneamente selettivo e differenziale.

Agar sangue



ARRICCHITO + DIFFERENZIALE

Principio

Il sangue sostiene la crescita di numerosi batteri e rende osservabile l'attività emolitica. Costituito da un terreno nutrizionale di base (peptoni, estratto di carne o lievito, cloruro di sodio e agar)

Vengono aggiunti in percentuale del 5%–10% globuli rossi defibrinati (solitamente di montone o di cavallo) dopo aver sterilizzato e raffreddato la base a circa 45–50 °C per evitare la lisi termica delle cellule

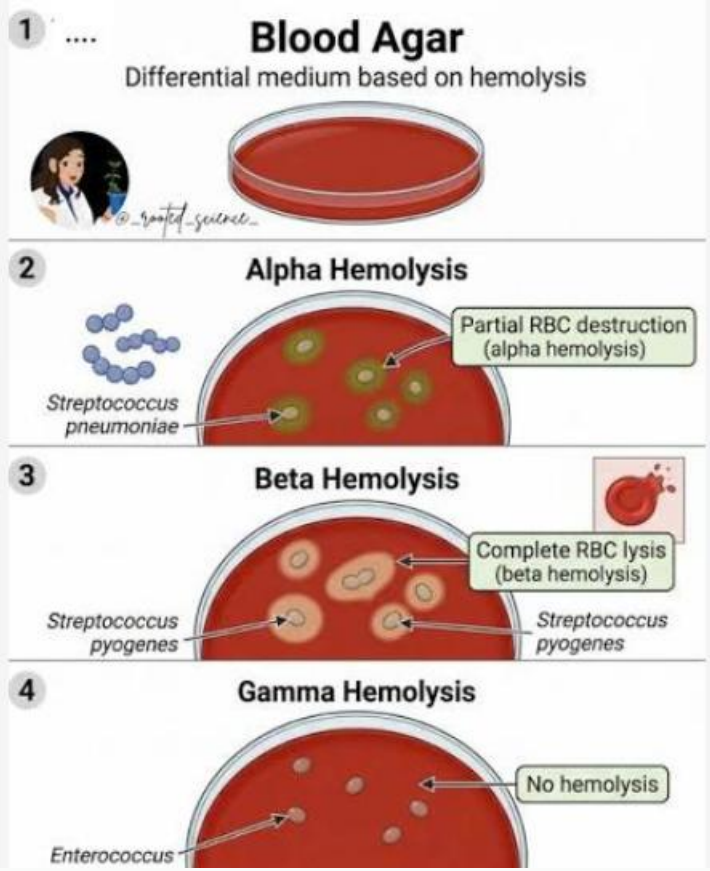
Che cosa osservare

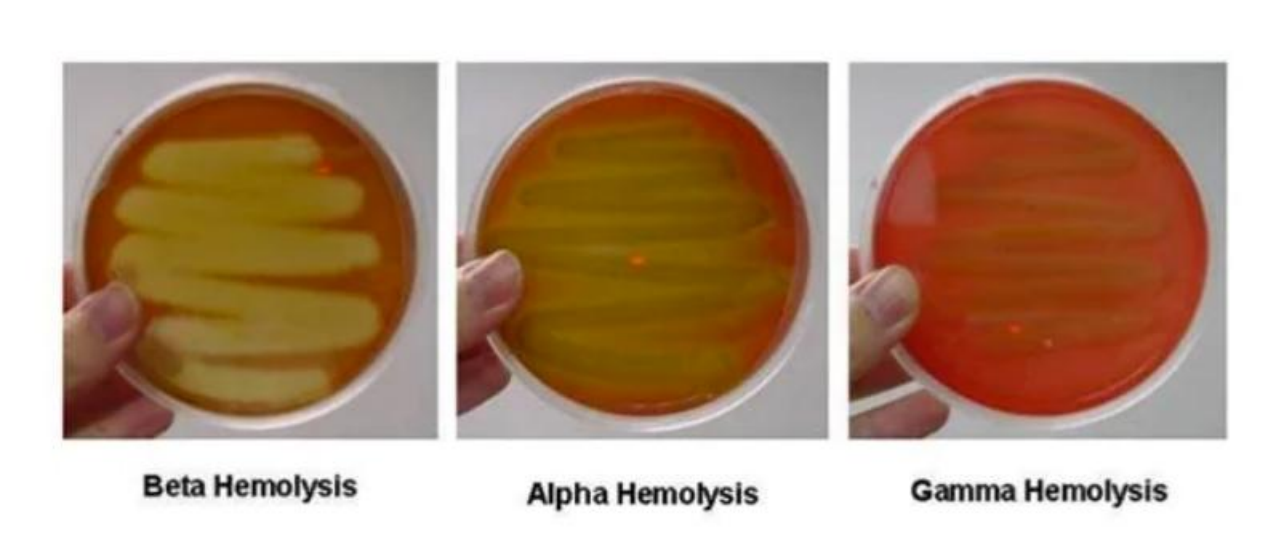
β: alone trasparente (lisi completa); α: alone verdastro/brunastro; γ: nessuna emolisi evidente.

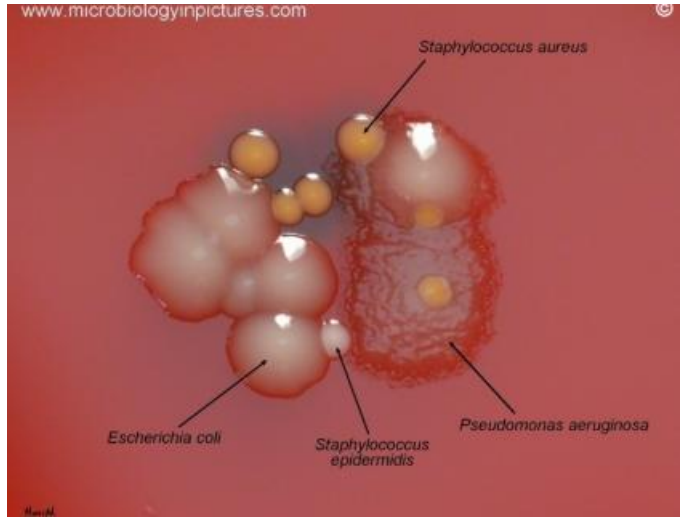
Da ricordare

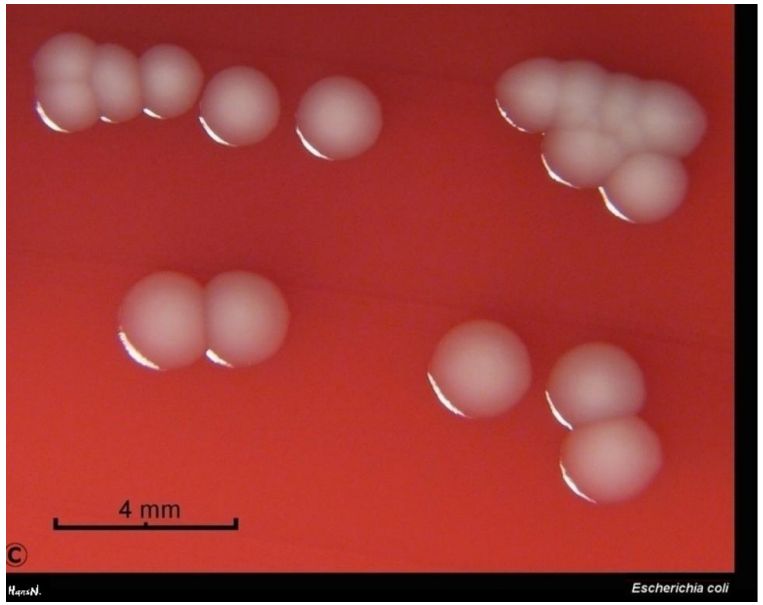
L'emolisi è un carattere orientativo, non una identificazione di specie.

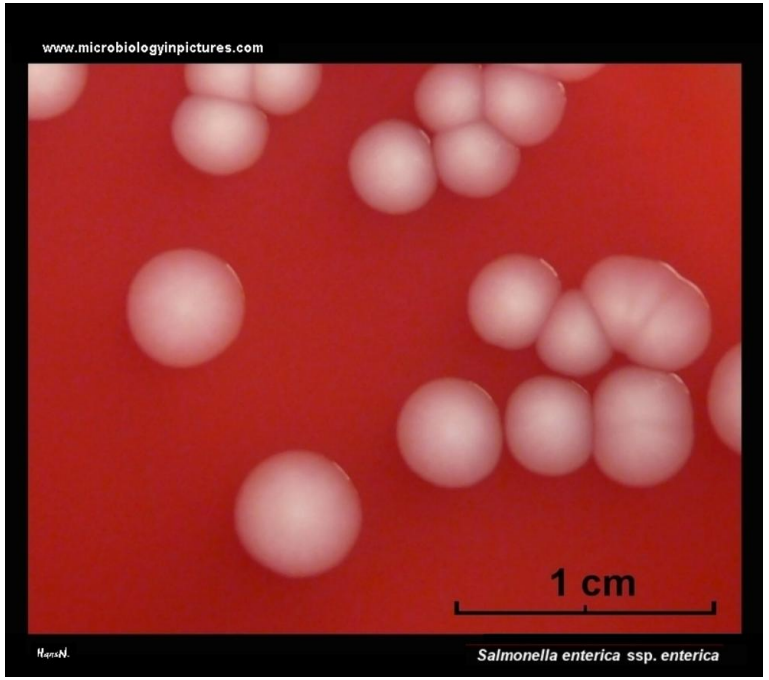
Agar sangue: leggere correttamente l'emolisi















https://www.microbiologyinpictures.com/bacteriainphotos/bacteria-photo-gallery.php

Agar cioccolato

ARRICCHITO (NON SELETTIVO DI PER SÉ)



Principio

Base nutritiva: Digerito enzimatico di caseina e/o tessuti animali (peptoni e triptone) come fonte di azoto, aminoacidi e peptidi.
Sangue defibrinato: Sangue di montone, cavallo o coniglio (generalmente al 5-10%), aggiunto e riscaldato (intorno a 56–80 °C). Il calore rompe (lisa) i globuli rossi e rilascia: Fattore X (emina), essenziale per la crescita, Fattore V (NAD - Nicotinamide Adenin Dinucleotide)
Il calore inattiva inoltre gli enzimi (NADasi) presenti nel sangue che degradano il fattore V.
Amido di mais: Funge da agente protettivo per neutralizzare i metaboliti tossici rilasciati dai batteri.
Sali e tamponi: Cloruro di sodio (NaCl) per mantenere il bilancio osmotico; Fosfato dipotassico (K_2HPO_4) e fosfato monopotassico (KH_2PO_4) come sistema tampone per stabilizzare il pH (generalmente intorno a 7,2).

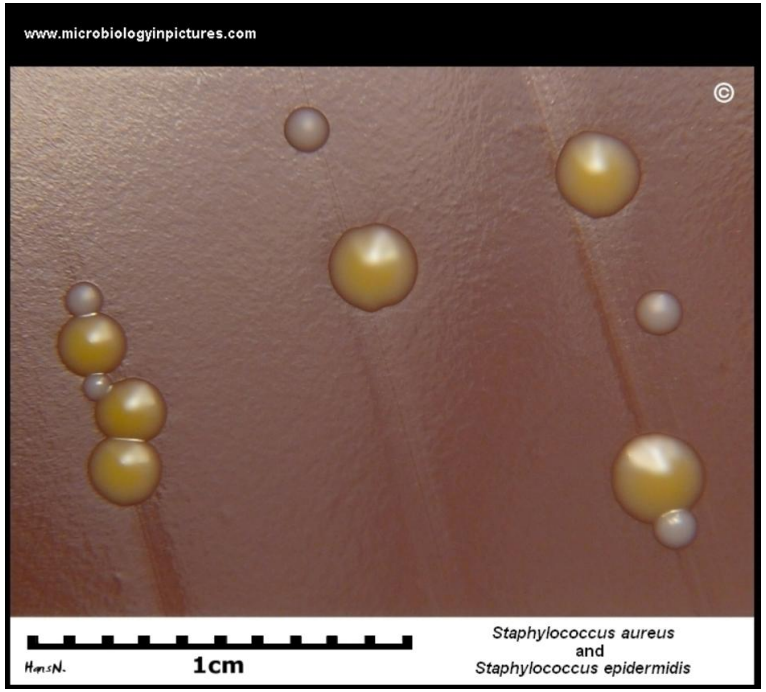
Che cosa osservare

Consente la crescita di microrganismi fastidiosi; non permette la lettura dell'emolisi come l'agar sangue.

Da ricordare

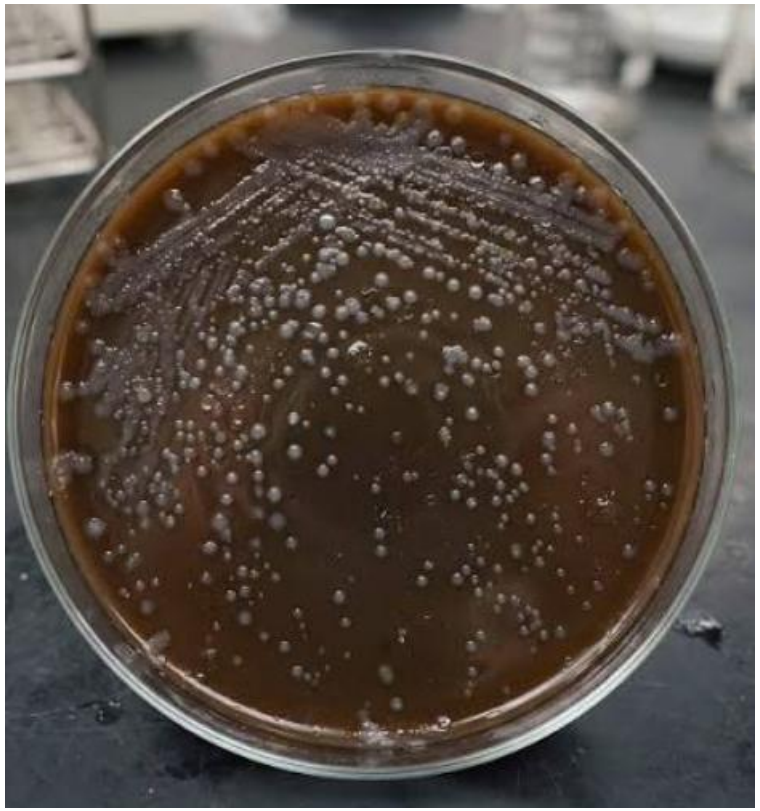
"Cioccolato" descrive l'aspetto del terreno; la selettività dipende da eventuali additivi.


www.microbiologyinpictures.com
Enterococcus faecalis


www.microbiologyinpictures.com
1cm
Staphylococcus aureus
and
Staphylococcus epidermidis


Haemophilus influenzae





MacConkey agar



SELETTIVO + DIFFERENZIALE

Principio

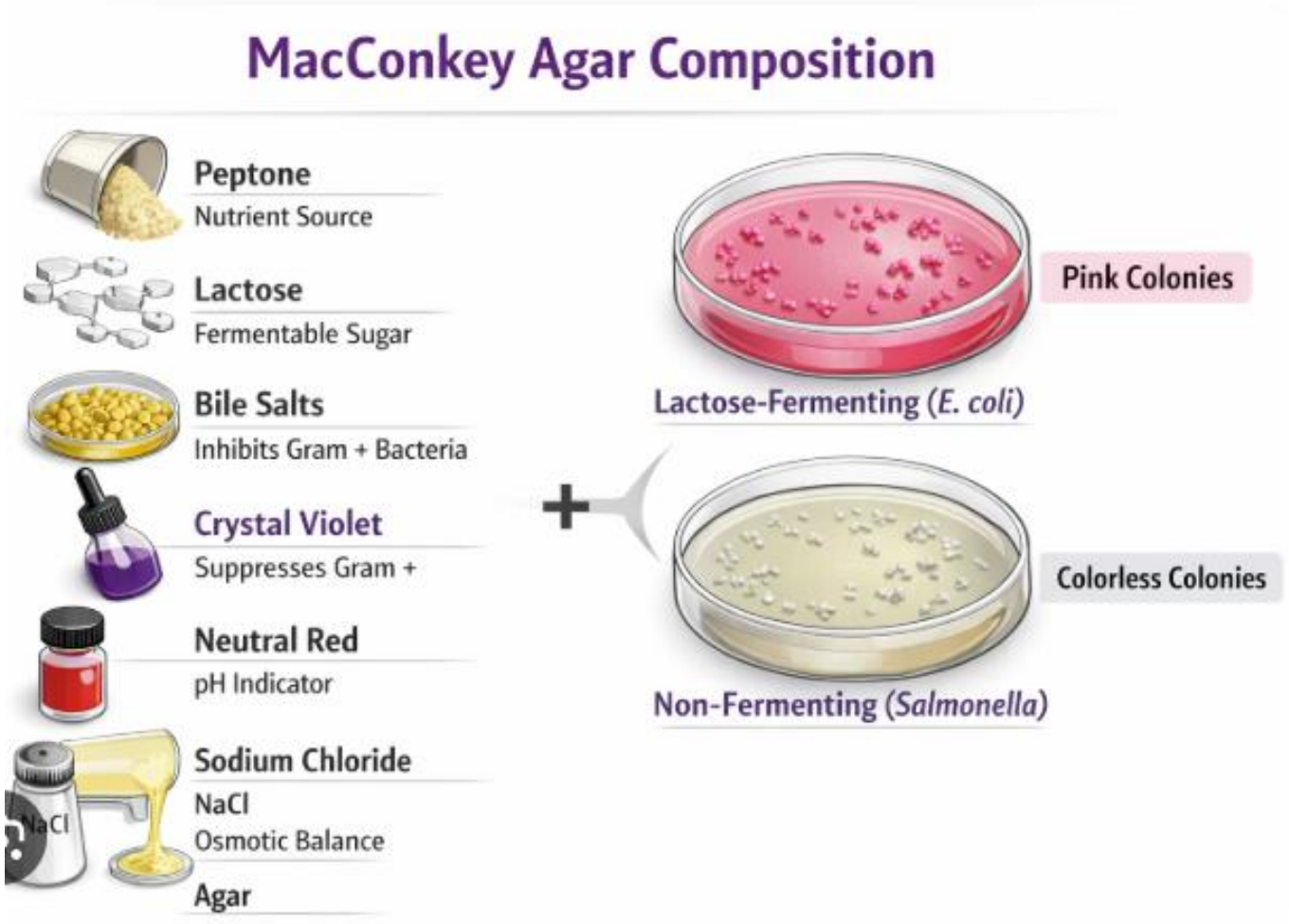
Sali biliari e violetto di cristallo limitano molti Gram-positivi; l’indicatore di pH evidenzia la fermentazione del lattosio.

Che cosa osservare

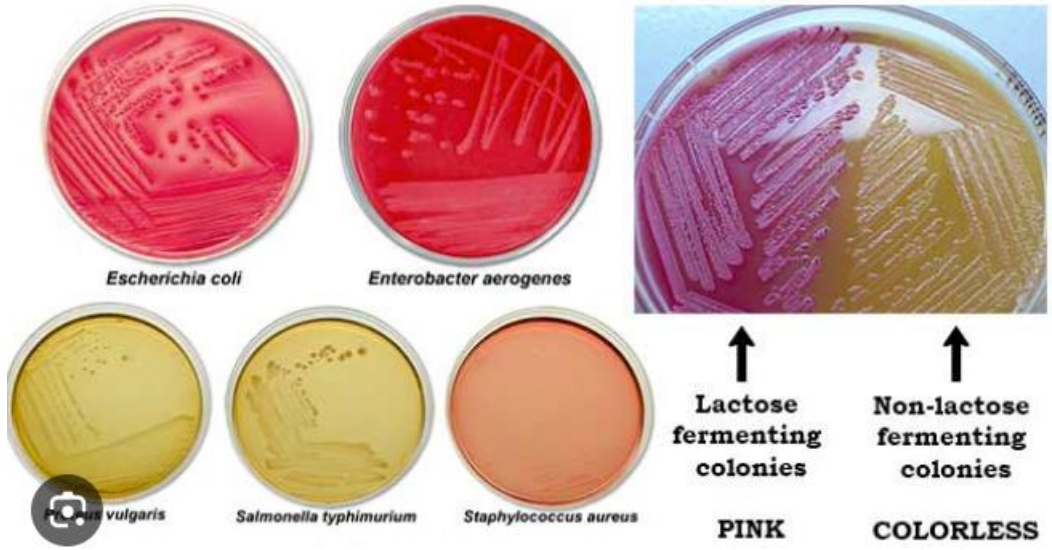
Fermentatori del lattosio: colonie rosa/rosse; non fermentatori: colonie pallide o incolori.

Da ricordare

Colonie rosa ≠ identificazione automatica di E. coli; servono ulteriori test.

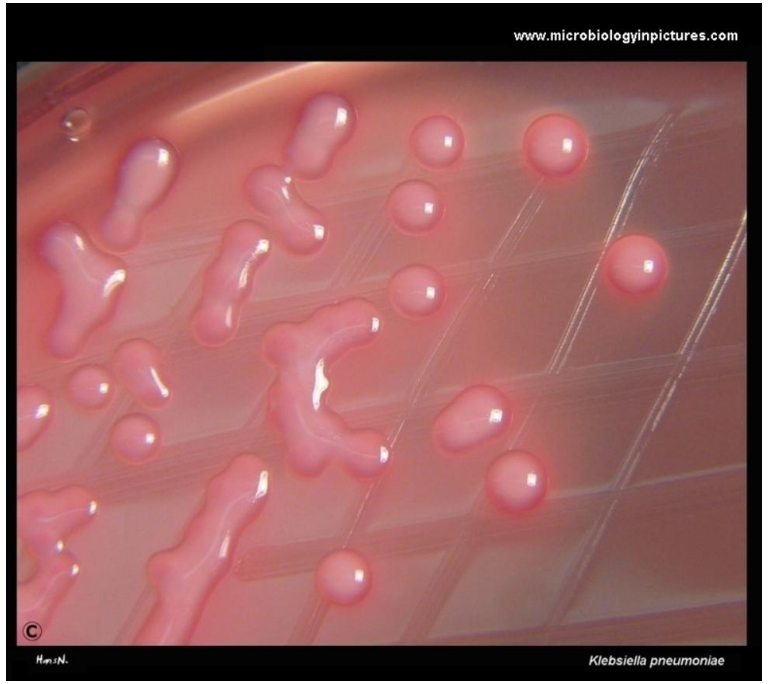


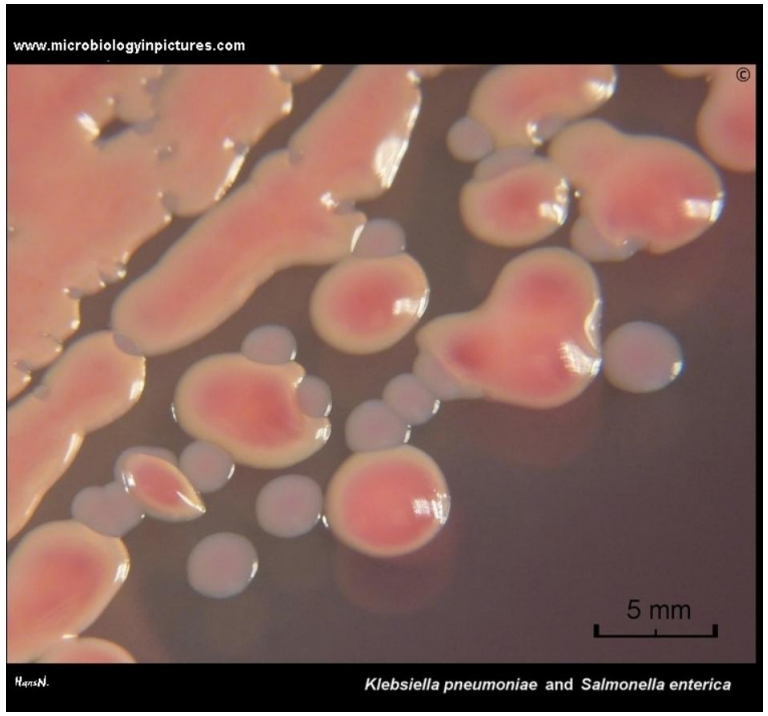
- Batteri lattosio-fermentanti (es. Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter) metabolizzano il lattosio producendo acidi (come l'acido lattico).
- La diminuzione del pH (sotto 6.8) fa virare l'indicatore rosso neutro, colorando le colonie di rosa o rosso (a volte circondate da un alone di sali biliari precipitati).
- Batteri non fermentanti il lattosio (es. Salmonella, Shigella, Proteus) non producono acidi; utilizzano i peptoni del terreno rilasciando ammoniaca (mantenendo o alzando il pH) e formano quindi colonie incolori o trasparenti.


Escherichia coli
Enterobacter aerogenes
vulgaris
Salmonella typhimurium
Staphylococcus aureus
Lactose fermenting colonies
PINK
Non-lactose fermenting colonies
COLORLESS


Proteus Vulgaris
S. typhimurium
E. coli


www.microbiologyinpictures.com
Escherichia coli


www.microbiologyinpictures.com
Klebsiella pneumoniae


www.microbiologyinpictures.com
5 mm
Klebsiella pneumoniae and Salmonella enterica

Mannitol Salt Agar (MSA)

SELETTIVO + DIFFERENZIALE



Principio

• Selettività (Cloruro di sodio al 7,5%): L'elevata concentrazione di NaCl inibisce la crescita della maggior parte dei batteri, permettendo quasi esclusivamente la proliferazione degli stafilococchi (che sono alofili).
• Differenziazione (Mannitolo e Rosso fenolo): Il terreno contiene lo zucchero alcolico mannitolo e l'indicatore di pH rosso fenolo.
• Gli organismi che fermentano il mannitolo producono acidi che fanno abbassare il pH, causando il viraggio del rosso fenolo da rosso a giallo (es. Staphylococcus aureus).
Gli stafilococchi che non fermentano il mannitolo lasciano il terreno rosso o rosa (es. Staphylococcus epidermidis).

Che cosa osservare

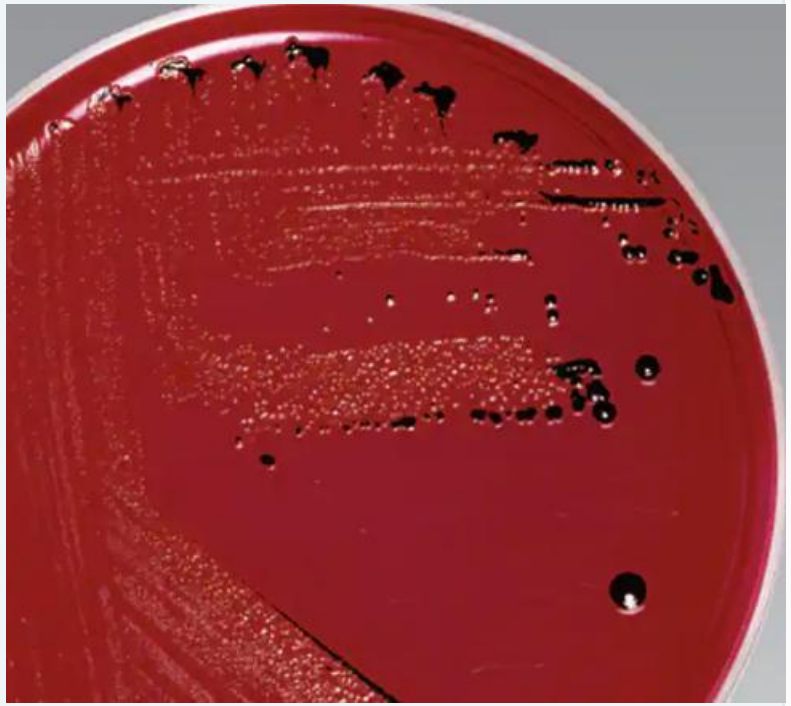
Viraggio giallo del terreno: fermentazione del mannitolo; crescita senza viraggio: mannitolo non fermentato.

Da ricordare

La fermentazione del mannitolo non è da sola sufficiente per identificare S. aureus.

XLD agar

SELETTIVO + DIFFERENZIALE



Principio

Lo XLD Agar (Xylose Lysine Desoxycholate Agar) è un terreno di coltura selettivo e differenziale utilizzato in microbiologia per l'isolamento e l'identificazione di batteri enterici Gram-negativi, in particolare dei generi Salmonella e Shigella, da campioni clinici, alimentari o ambientali.Funzione e Principio

- Selettività: contiene desossicolato di sodio, un sale biliare che inibisce la crescita dei batteri Gram-positivi, favorendo la proliferazione delle Enterobatteriacee.
- Differenziazione: sfrutta la combinazione di tre zuccheri (xilosio, lattosio, saccarosio), L-lisina, tiosolfato di sodio, un sale ferrico (citrato di ammonio ferrico) e l'indicatore di pH rosso fenolo.

Che cosa osservare

Possibili colonie rosse con centro nero in alcuni Salmonella; altri enterici possono apparire gialli.

Da ricordare

Pattern presuntivo: la conferma richiede identificazione appropriata.

Hektoen Enteric agar

SELETTIVO + DIFFERENZIALE



Principio

L'Hektoen Enteric Agar (noto anche come HEA o HE) è un terreno di coltura selettivo e differenziale ampiamente utilizzato in microbiologia per l'isolamento e la differenziazione dei batteri Gram-negativi enterici, in particolare Salmonella e Shigella, a partire da campioni clinici (feci), alimenti o acque.

• Selettività: Contiene sali biliari e coloranti (come la fucsina acida) in concentrazioni elevate che inibiscono la crescita dei batteri Gram-positivi e di molti coliformi non patogeni.
• Differenziazione per fermentazione degli zuccheri: Il terreno contiene tre carboidrati fermentabili (lattosio, saccarosio e salicina) e indicatori di pH (blu di bromotimolo e fucsina acida).

• I batteri che fermentano i carboidrati rapidamente (come E. coli o altri coliformi) producono acidi che virano il colore delle colonie e del terreno in giallo o arancione/salmone.

Che cosa osservare

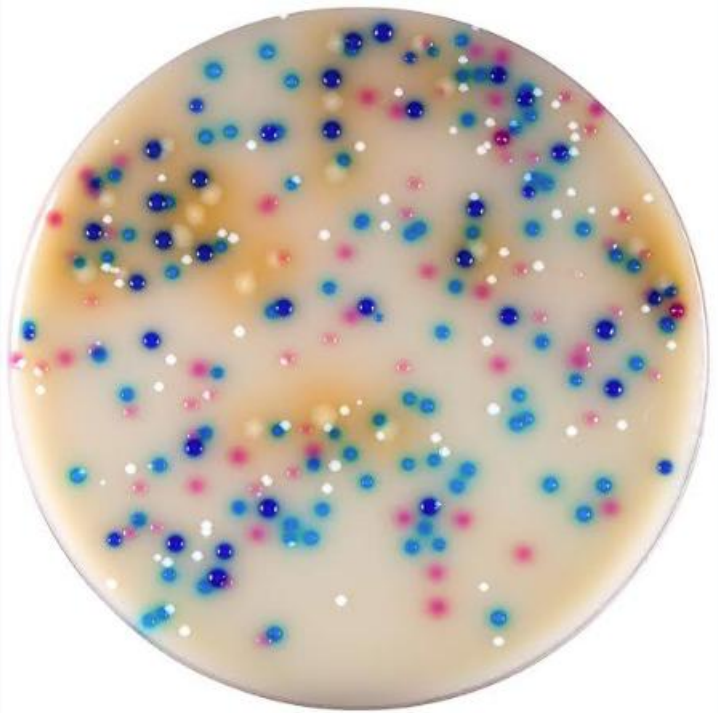
I patogeni come Salmonella e Shigella non fermentano questi zuccheri.
• Differenziazione per produzione di acido solfidrico (H_2S): Contiene tiosolfato di sodio e citrato ferrico d'ammonio.
• La Salmonella produce H_2S, generando colonie di colore blu-verde con il centro nero.
• La Shigella produce colonie di colore blu-verdastro senza il centro nero.
• I batteri lattosio-fermentanti crescono invece in giallo-arancio

Da ricordare

Aspetto dipendente da ceppo e condizioni: non è una conferma etiologica.

CLED agar e terreni cromogeni urinari

CLED: DIFFERENZIALE | CROMOGENI: REAZIONI ENZIMATICHE



Principio

CLED contiene poco elettrolita e limita lo swarming di Proteus; i terreni cromogeni evidenziano attività enzimatiche con colori diversi. Rappresentano l'evoluzione moderna dei terreni di coltura e sono oggi ampiamente raccomandati per la loro efficienza.• Composizione e principio: Contengono speciali substrati chimici (cromogeni) legati a specifici enzimi tipici di determinati gruppi batterici (come la β-galattosidasi o la β-glucuronidasi).• Come funziona: Quando il batterio cresce, metabolizza il substrato specifico liberando un colore netto e caratteristico per ogni specie, direttamente visibile sulla colonia (es. E. coli appare rosa/magenta, i batteri del gruppo KES appaiono blu/viola.

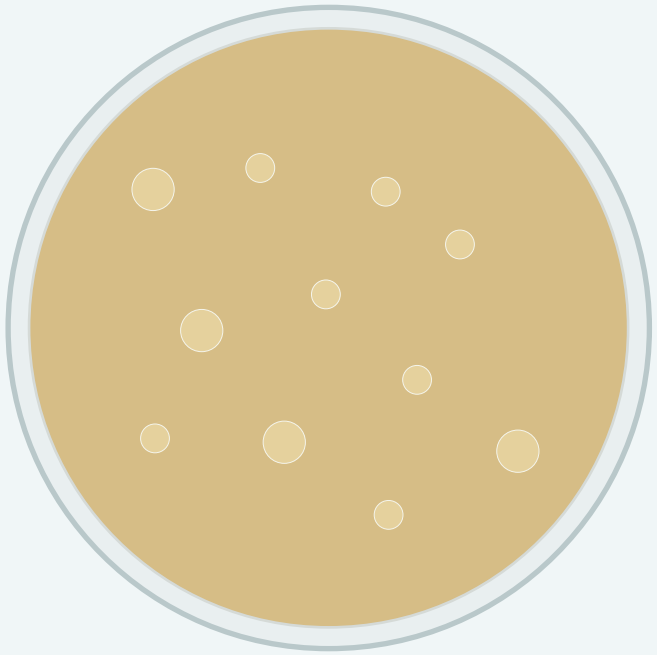
Che cosa osservare

CLED: distinzione orientativa fermentazione lattosio; cromogeni: colori caratteristici secondo formulazione commerciale.

Da ricordare

La lettura cromogenica è specifica del produttore e non sostituisce la conferma quando necessaria.

Sabouraud dextrose agar



TERRENO PER MICETI

Principio

Composizione ricca in destrosio e pH relativamente acido favoriscono la coltura di lieviti e muffe; formulazioni selettive possono avere antibiotici.

Che cosa osservare

Valutare morfologia, pigmentazione, consistenza e tempi di comparsa delle colonie nel contesto diagnostico.

Da ricordare

La morfologia macroscopica non è sufficiente per l'identificazione definitiva dei miceti.

Mueller–Hinton: un terreno con una funzione diversa

MH agar (standard)

Terreno standardizzato per diffusione da disco su numerosi batteri non esigenti: consente di misurare zone di inibizione interpretabili secondo EUCAST.

MH-F (fastidious)

Mueller–Hinton integrato con 5% sangue di cavallo defibrinato e β-NAD per microrganismi esigenti, secondo indicazioni EUCAST.

Punto chiave

Mueller–Hinton serve principalmente per l’antibiogramma, non per l’identificazione primaria tramite colore delle colonie.

Riferimento: EUCAST Media Preparation v8.0 (gennaio 2026) e QC v16.0.

Il Triple Sugar Iron (TSI): quali reazioni misura?

- Tre zuccheri: glucosio (in quantità minore), lattosio e saccarosio.
- Rosso fenolo: giallo in ambiente acido (A); rosso/rosa in ambiente alcalino (K).
- Produzione di gas: fissurazioni, bolle o sollevamento del terreno.
- Produzione di H_2S: precipitati scuri dovuti alla formazione di solfuro di ferro.

La lettura convenzionale è slant/butt.

Geometria della provetta

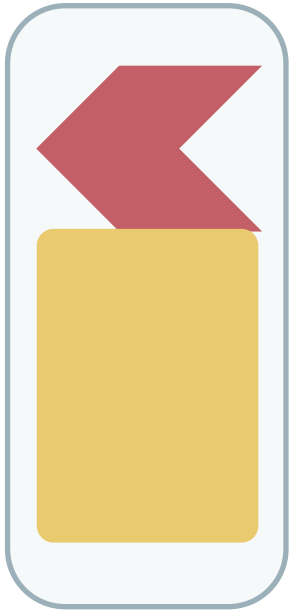
SLANT

superficie inclinata

BUTT

fondo in profondità

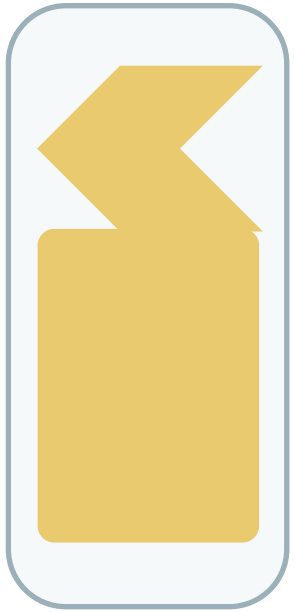
TSI: interpretazione delle combinazioni



K/A

Rosso / giallo

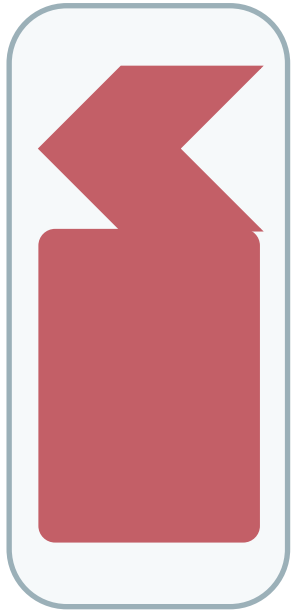
Solo glucosio fermentato



A/A

Giallo / giallo

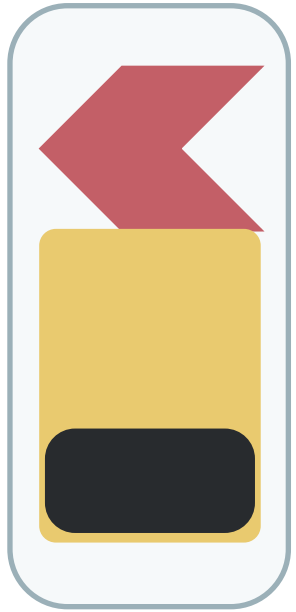
Glucosio + lattosio e/o saccarosio



K/K o K/NC

Rosso / rosso o invariato

Nessuna fermentazione rilevabile



K/A + H_2S

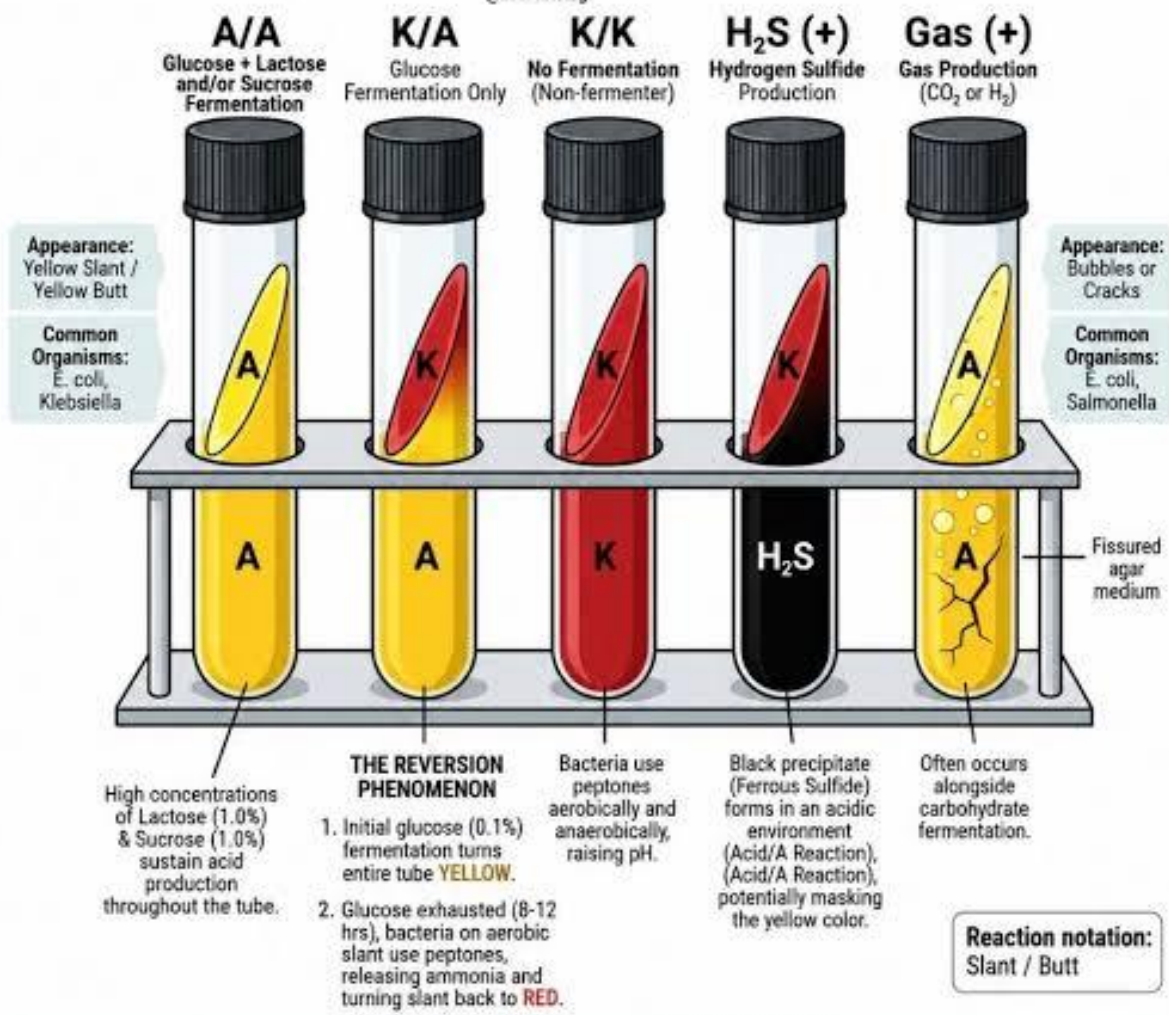
Rosso / fondo nero

Glucosio fermentato; H_2S positivo

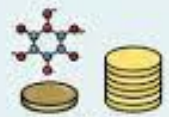
TRIPLE SUGAR IRON (TSI) AGAR:

A DIFFERENTIAL MEDIUM FOR ENTERIC BACTERIA

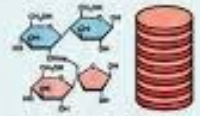
@Microbiolog



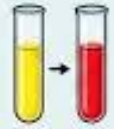
COMPOSITION & PRINCIPLE



GLUCOSE
Low concentration, quickly exhausted.



1.0% LACTOSE & 1.0% SUCROSE
High concentrations for



PHENOL RED
pH Indicator.
Yellow = Acid;



FERROUS SULFATE
Detects H_2S production.
Forms black precipitate.

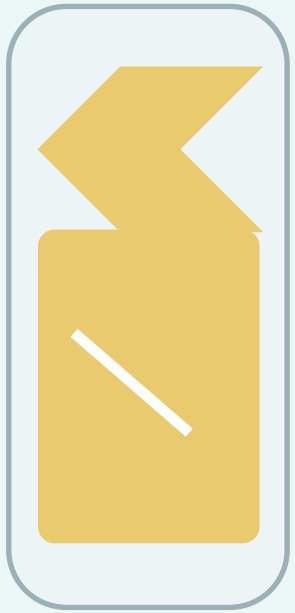
LAB MNEMONICS

A/A (Yellow/Yellow):
"All / All" (Ferments everything)

K/A (Red/Yellow):
"K"omes first (Glucose is primary)

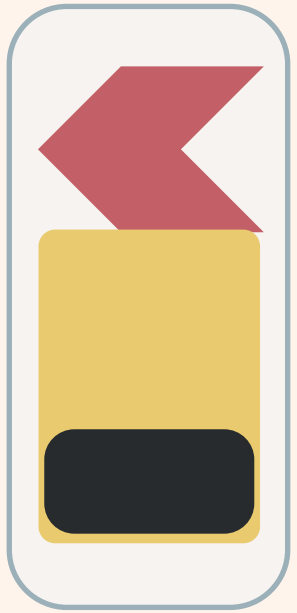
Black Butt
Think "S" for Sulfur – Salmonella & Should be H_2S+

TSI: gas e H_2S, due segnali aggiuntivi



GAS (+)

Bolle, crepe, sollevamento del mezzo



H_2S (+)

Precipitato nero; il fondo va interpretato come acido

TSI: collegare il profilo alla diagnosi

E. coli	A/A, gas spesso +; H_2S −
Salmonella spp.	Spesso K/A, H_2S frequentemente +; variabilità tra sierotipi
Shigella spp.	Tipicamente K/A, gas −, H_2S − (con eccezioni)
Proteus spp.	Spesso K/A, H_2S spesso +; variabilità di specie

Il TSI non identifica una specie

Il pattern deve essere integrato con altri test biochimici, MALDI-TOF, metodiche molecolari o conferme sierologiche quando indicate.

Controlli di qualità: ciò che rende affidabile la lettura

- Controllare il lotto e l’aspetto del terreno prima dell’uso: integrità, colore e assenza di contaminazione.
- Usare ceppi di controllo con fenotipi attesi per verificare reazioni positive e negative.
- Valutare crescita, selettività e reazioni differenziali: sono parametri distinti.
- Per l’antibiogramma consultare i criteri EUCAST aggiornati (QC, mezzo e lettura).
- Registrare controlli e non interpretare risultati se le prestazioni del mezzo non sono accettabili.

Esempio TSI

Un controllo fermentante e uno H_2S-positivo illustrano reazioni distinte; i ceppi specifici seguono le procedure validate del laboratorio.

Caso guidato: dal terreno alla decisione diagnostica

Campione clinico → colonie pallide su MacConkey → TSI K/A con fondo annerito.

1. Che informazione aggiunge MacConkey?
2. Che cosa significano K/A e fondo nero?
3. Si può già concludere che sia Salmonella?
4. Quale sarebbe il passaggio successivo di identificazione e controllo?

Fonti e documenti di riferimento

EUCAST	Media Preparation, v8.0 (gennaio 2026); Disk Diffusion & QC 2026	https://www.eucast.org/bacteria/methodology-and-instructions/
ASM	Triple Sugar Iron Agar Protocols; Clinical Microbiology Procedures Handbook	https://asm.org/
CDC	Laboratory Methods in Clinical Bacteriology	https://stacks.cdc.gov/view/cdc/23251
WHO	Manuali di microbiologia di laboratorio e quality assurance	https://www.who.int/
ATCC	Introduction to Microbiology: interpretazione del TSI	https://www.atcc.org/resources/culture-guides/introduction-to-microbiology

Schemi di piastre e provette: illustrazioni didattiche, non fotografie di colture reali.