

PRINCIPI DI DIAGNOSI DELLE MALATTIE BATTERICHE

**Diagnosi di laboratorio
di malattia infettiva**

→ **DIRETTA**

**mediante identificazione
dell'agente patogeno**

→ **INDIRETTA**

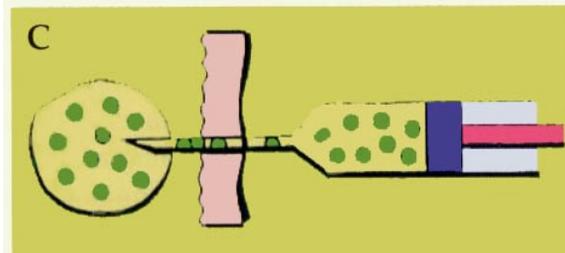
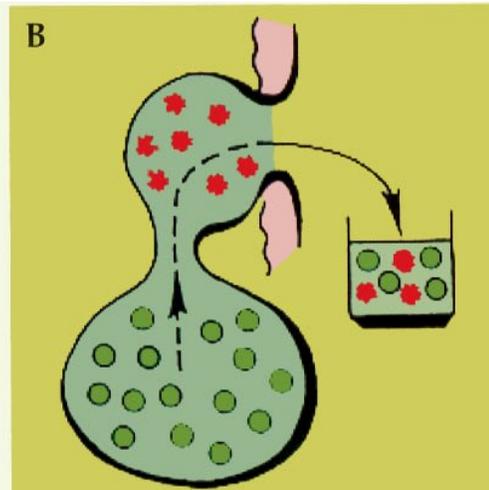
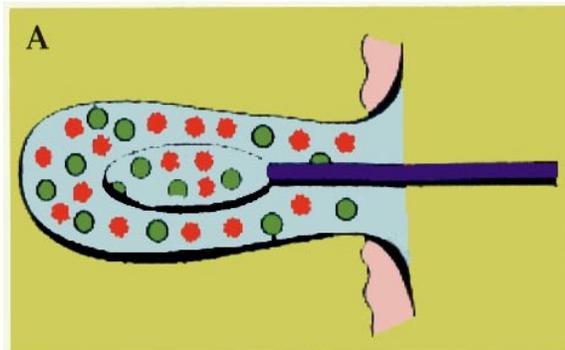
**mediante identificazione
di anticorpi (A_{tc}) specifici**

ACCERTAMENTO DIRETTO:

- 1. Esame microscopico**
- 2. Mediante tecniche immunologiche**
- 3. Ricerca colturale**
- 4. Mediante tecniche di biologia molecolare**

I campioni prelevati per la diagnosi batteriologica possono provenire da zone che sono solitamente sterili oppure da zone che possiedono una popolazione microbica residente. I campioni possono essere di tre tipi:

- A) quelli prelevati da zone con una popolazione microbica residente
- B) quelli prelevati in maniera indiretta, per cui sussiste una possibilità più o meno elevata di contaminazione con batteri residenti, come espettorato ed urina
- C) quelli provenienti da organi o tessuti prelevati direttamente con aspirazione mediante ago o con biopsia chirurgica.



in verde: batteri patogeni
in rosso: batteri residenti

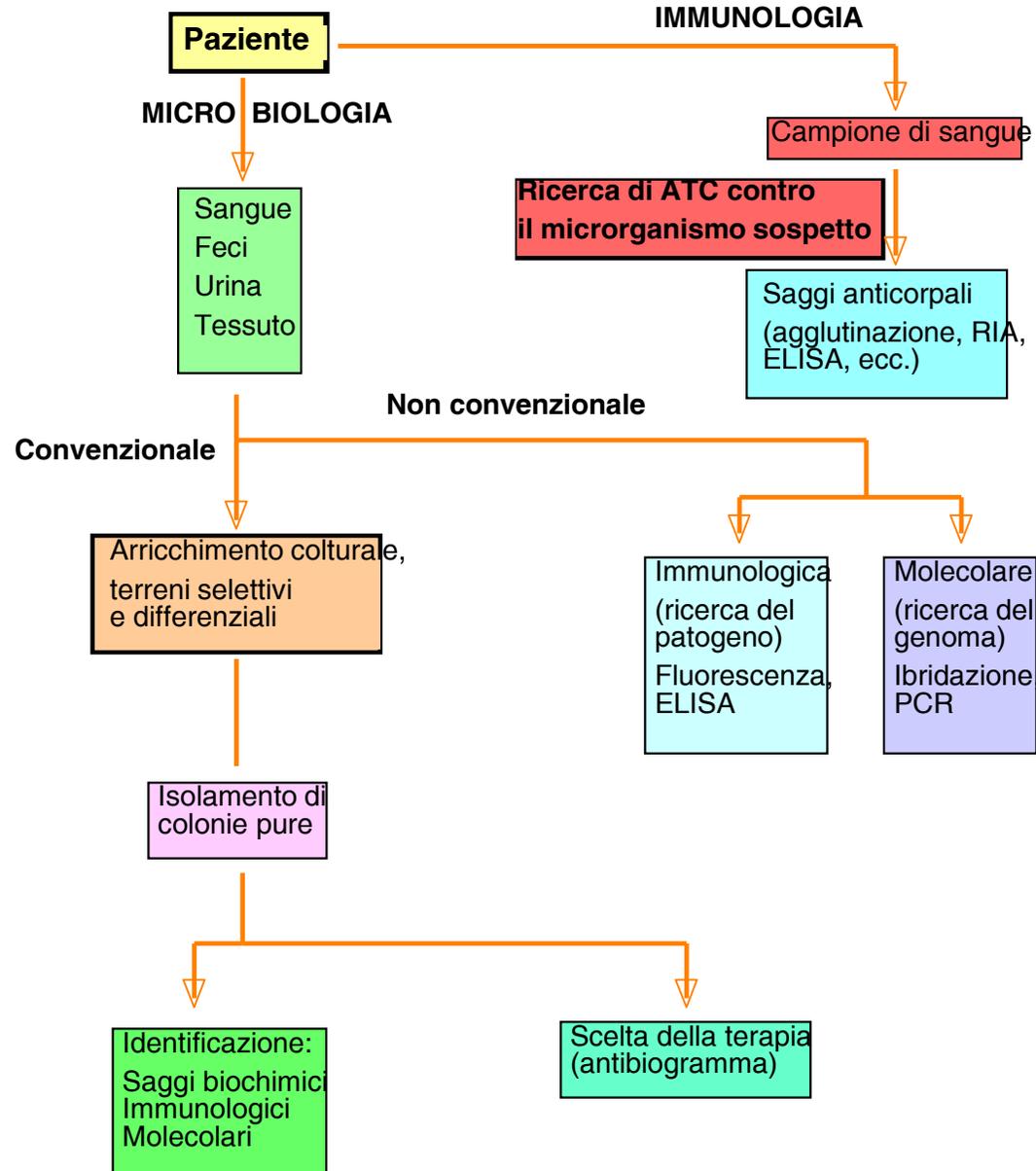
Zone normalmente sterili

Sangue e midollo
Liquor
Tessuti profondi
Vie respiratorie inferiori
Urine (se raccolte bene)

Zone con batteri residenti

Bocca, naso, vie respir. sup.
Cute
Tratto gastrointestinale
Tratto genitale femminile
uretra

Metodi per la diagnosi delle malattie infettive



Il materiale patologico necessario per l'accertamento diretto, varia secondo la malattia ed il decorso dell'infezione.

E' PERO' SEMPRE MOLTO IMPORTANTE COME SI ESEGUONO IL PRELIEVO, IL TRASPORTO E LA CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE DA ESAMINARE:

- 1) Il materiale prelevato deve essere rappresentativo dell'infezione (es. sangue in una setticemia, liquor in una meningite, urina in una cistite, feci in un'enterite) e se possibile eseguito prima dell'inizio della terapia antibiotica.**
- 2) Il prelievo deve sempre essere eseguito in condizioni di asepsi e conservato in contenitori sterili.**
- 3) Il momento del prelievo è critico per alcuni materiali patologici: es. il prelievo di sangue per un'emocoltura andrebbe eseguito durante gli accessi febbrili, mentre l'urina della prima minzione del mattino è la più indicata per un'urinocoltura.**
- 4) Il materiale prelevato deve essere trasportato al laboratorio nel più breve tempo possibile ed immediatamente esaminato. Se non è possibile, occorre mantenerlo a temperature adeguate (da +4°C a -70°C a seconda del patogeno ricercato).**

REQUISITI DI CRESCITA DEI BATTERI

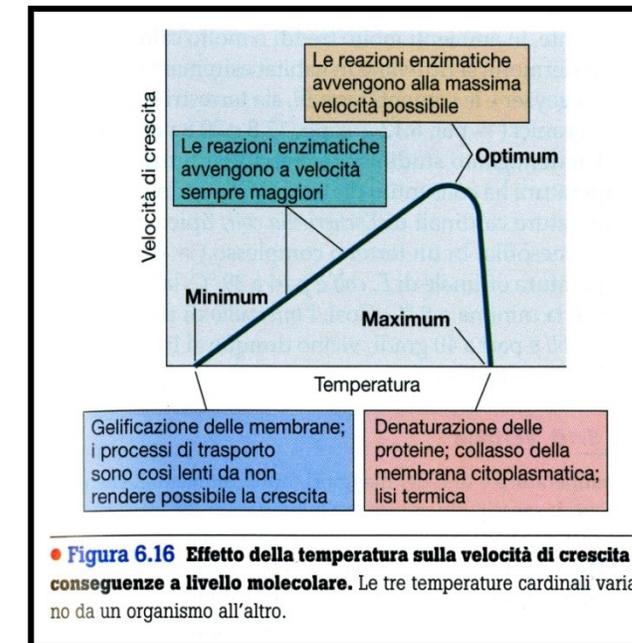
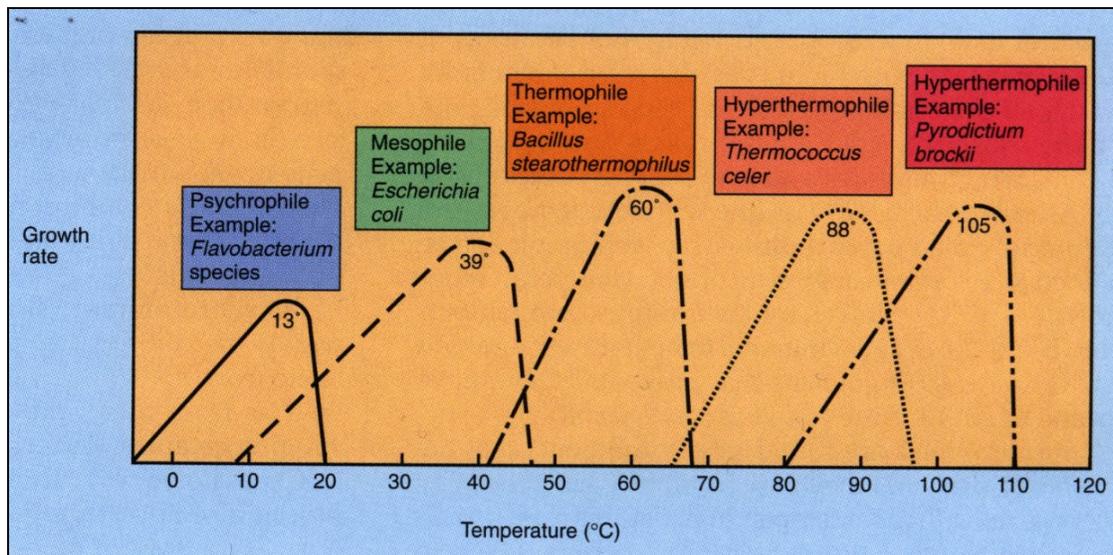
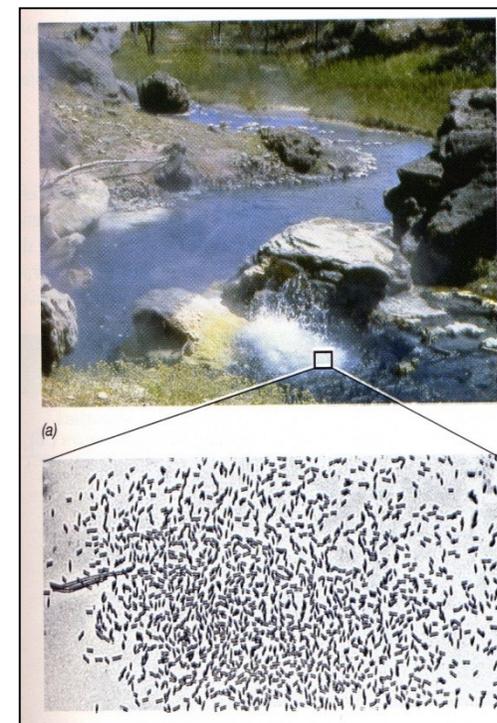
Sono variabili da specie a specie

Acqua = sempre necessario un certo grado di umidità

Temperatura = Mesofili (temp. ottimale di crescita tra i 30-35° C)

Psicrofili (basse temp, anche sotto 0°C)

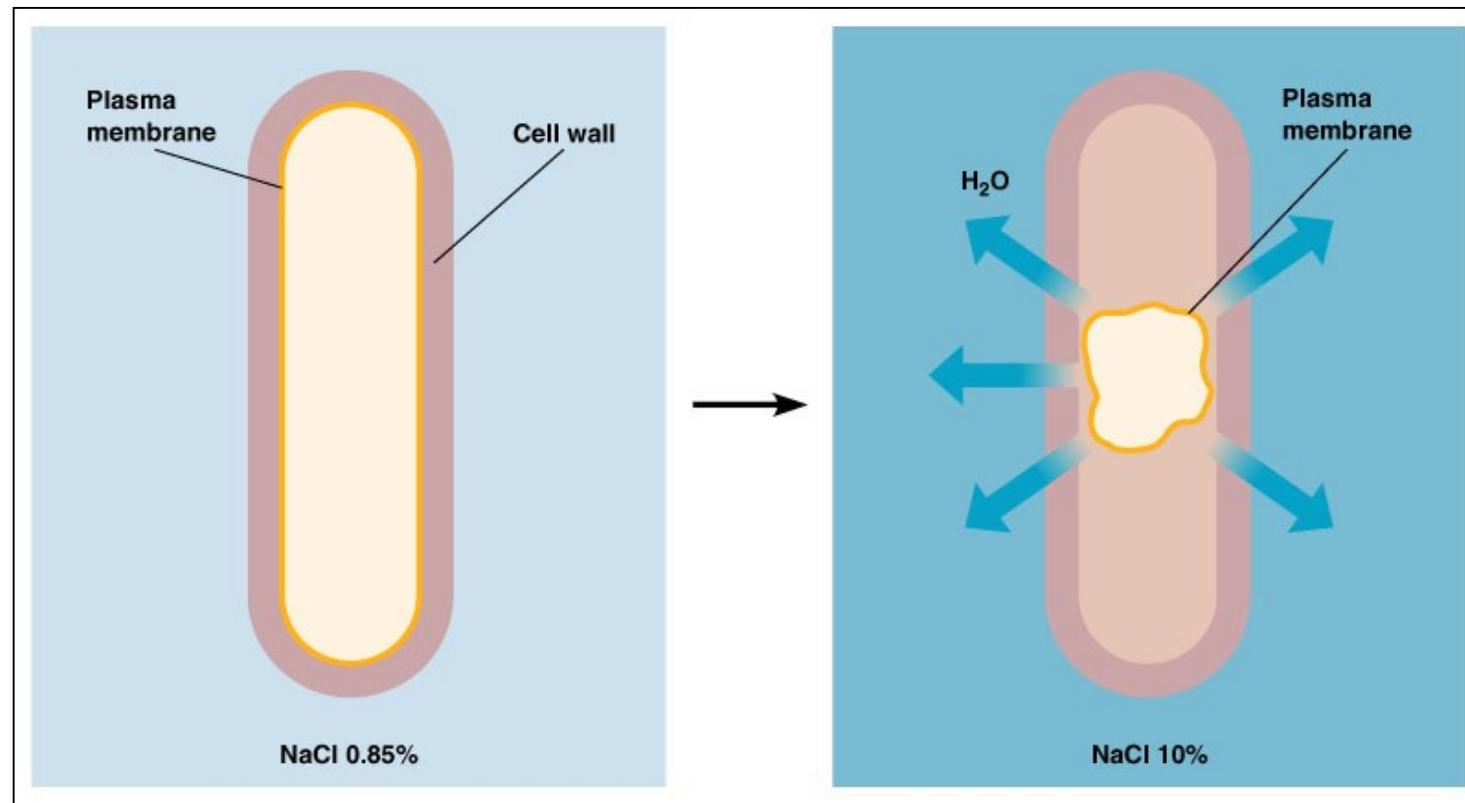
Termofili (50-60°C, anche a 100°C)



pH ottimale di crescita = in genere fra 6 e 8, ma alcuni crescono anche a pH < 1 ed altri > 9

Pressione osmotica = Se la pressione osmotica è troppo elevata, i batteri muoiono. Ma ci sono batteri osmofili che possono crescere anche in soluzioni molto concentrate (es. 20% saccarosio)

Concentrazione salina fisiologica = 0.85%, ma i batteri alofili possono crescere in presenza del 15-25% di sale

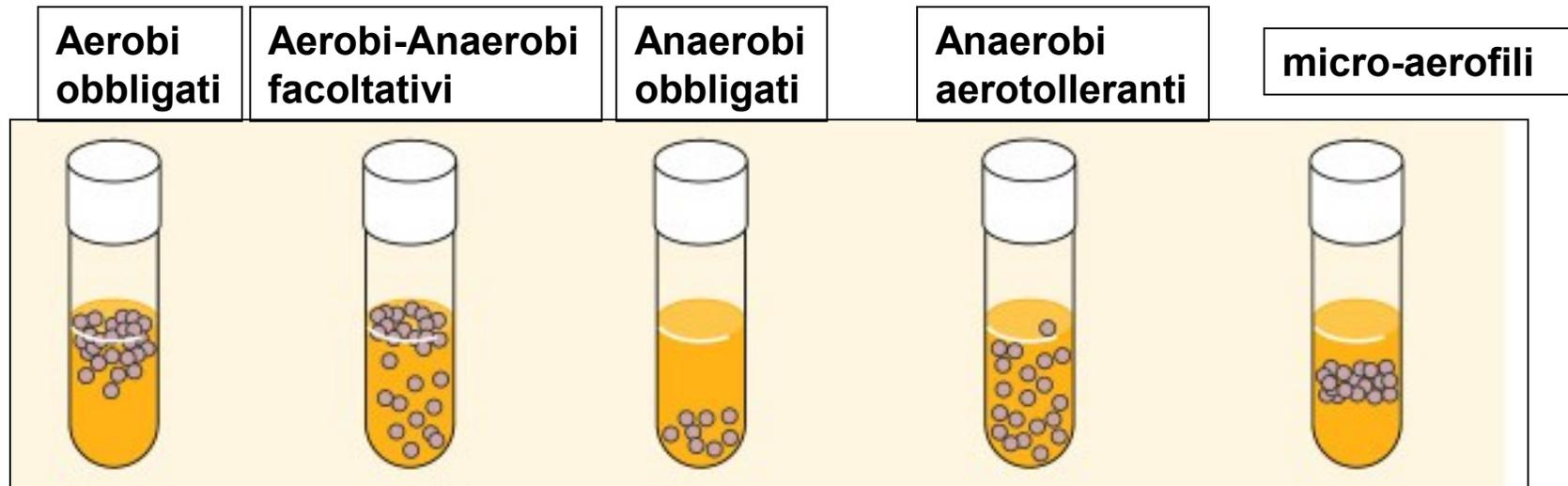


AEROBIOSI

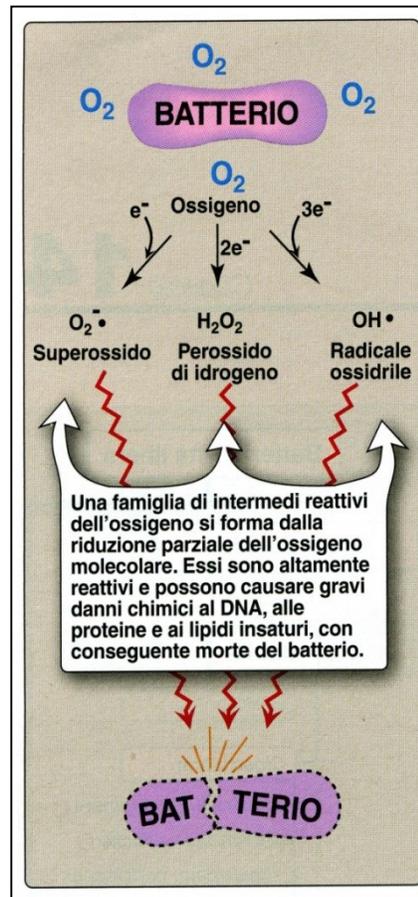
Batteri AEROBI OBBLIGATI = possono crescere solo in presenza di ossigeno → R. aerobia

Batteri AEROBI FACOLTATIVI = crescono sia in presenza che in assenza di ossigeno (possono avere R. anaerobia o fermentazione)

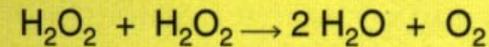
Batteri ANAEROBI = possono vivere solo in assenza di O_2 → R. anaerobia o fermentazione.



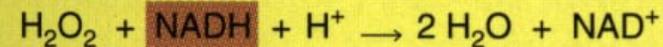
Il metabolismo dell'ossigeno porta alla formazione di *prodotti tossici*: H_2O_2 , O_2^- (forme molecolari di ossigeno altamente reattive, che reagiscono con le molecole vicine destabilizzandole e alterandole). I batteri aerobi producono enzimi che neutralizzano le forme tossiche: **CATALASI** ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), **superossido dismutasi** ($2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$), **perossidasi**.



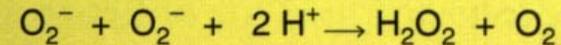
(a) Catalase:



(b) Peroxidase:



(c) Superoxide dismutase:



(d) Superoxide dismutase/catalase in combination:



COLTIVAZIONE DEI BATTERI

I batteri si coltivano “in vitro” mediante l’utilizzo di opportuni **TERRENI DI COLTURA**.

In base allo stato fisico i terreni si distinguono in **LIQUIDI** e in **SOLIDI**.

Il terreno liquido viene solidificato (“gelificato”) con l’aggiunta di 1-2% di agar (un polisaccaride estratto dalle alghe).

Vantaggi della coltura su terreno solido:

La superficie solida permette manipolazioni

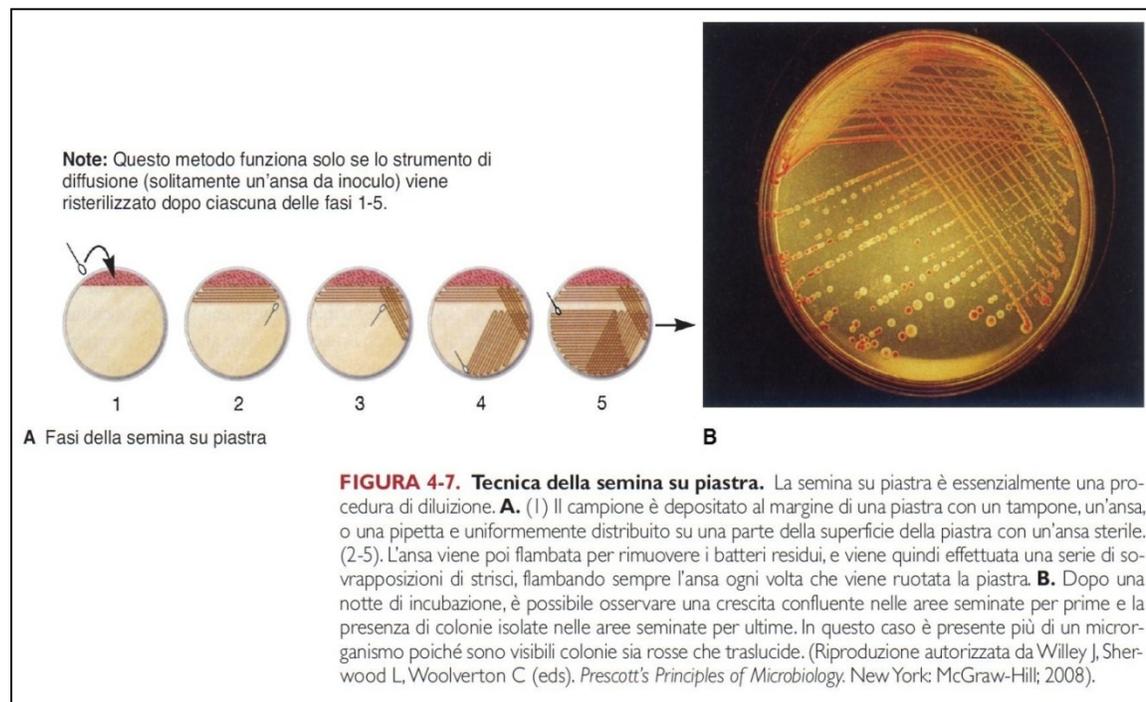
Umidità ideale per i batteri

consente la diffusione di sostanze,
nutrienti e farmaci

Consente la crescita di “colonie”



Tecnica di semina per isolamento



IN BASE ALLA COMPOSIZIONE CHIMICA i terreni di coltura si distinguono in:

Terreni **MINIMI** = in cui sono presenti solo i nutrienti essenziali.

Terreni **SINTETICI** = a composizione nota in cui i costituenti sono in quantità voluta.

Terreni **COMPLESSI** (o **EMPIRICI**) = ricchi di substrati organici, in cui non tutti i costituenti sono noti (con estratto di carne o lievito, con sangue o siero, ecc.).

Terreni di coltura-2

IN BASE ALLA PRESENZA DI PARTICOLARI COMPONENTI si distinguono:

Terreni SELETTIVI = permettono la crescita solo della specie che interessa (es terreno di Mannitolo per gli Stafilococchi, terreno con Ceftrimide per *Pseudomonas*, terreno di Mc Conkey per i batteri Gram negativi).

Terreni di ARRICCHIMENTO = sono ricchi di nutrienti e permettono la crescita di molte specie batteriche.

Terreni DIFFERENZIALI = permettono di distinguere batteri di specie diversa per la presenza di indicatori (es terreno di Hektoen distingue i batteri che fermentano il lattosio e quelli che producono acido solfidrilico).



MacConkey

L'agar MacConkey è un terreno di coltura solido differenziale, ideato da [Alfred Theodore MacConkey](#), selettivo per i [batteri Gram negativi](#).

In questo terreno, infatti, sono presenti sia il [cristalvioletto](#) che i [sali biliari](#) i quali sono in grado di inibire la crescita dei batteri [Gram positivi](#) (ed anche quella dei Gram negativi più esigenti dal punto di vista nutrizionale).

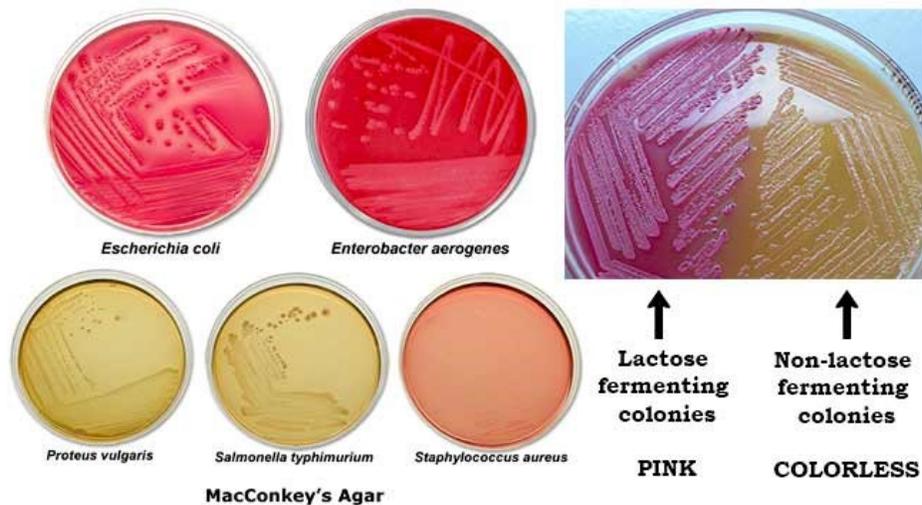
L'agar MacConkey contiene, inoltre, il [lattosio](#) come unica fonte di [carboidrati](#) ed il [rosso neutro](#) (un [colorante](#) che vira al rosso allorché il [pH](#) del mezzo scende al di sotto di 6,8).

I batteri che [fermentano](#) il lattosio si presentano sotto forma di colonie con varie sfumature di rosso poiché producono [acidi misti](#) che fanno scendere il pH.

I batteri che non fermentano il lattosio, invece, formano colonie trasparenti od incolori. A seconda dell'intensità della fermentazione si possono distinguere vari gruppi di batteri:

- batteri fortemente fermentanti il lattosio che producono colonie rosse con un'area circostante di precipitazione dei sali biliari (ad esempio [Escherichia](#)),
- batteri fermentanti il lattosio seguendo la via 2,3-butilenglicole producono colonie rosse senza la precipitazione dei sali biliari (ad esempio [Enterobacter](#), [Klebsiella](#))
- batteri debolmente fermentanti il lattosio che formano colonie che possono apparire, dopo 24 ore, incolore per poi diventare lievemente rosate tra le 24 e le 48 ore (ad esempio [Citrobacter](#), [Providencia](#), [Hafnia](#) e [Serratia](#)).

Batteri come [Pseudomonas aeruginosa](#) e dei generi, [Proteus](#), [Edwardsiella](#), [Shigella](#) e [Salmonella](#) danno colonie incolori o trasparenti (anche se raramente può non essere così).



Mannitol Salt Agar

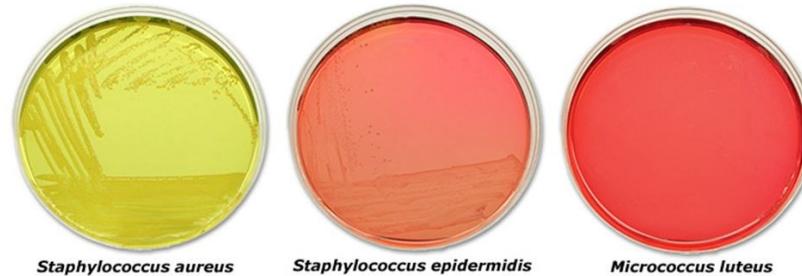
Inibisce la maggior parte dei [batteri](#) in quanto possiede percentuali di [cloruro di sodio](#) molto elevate (75-100 grammi per litro).

Tale terreno consente la crescita degli [Stafilococchi](#) che sono batteri [alofili](#).

La fermentazione del [mannitolo](#) produce acidi, questo provoca una modificazione del [pH](#) e quindi un viraggio dell'indicatore presente nel terreno ([rosso fenolo](#)) da rosso a giallo.

L'agar sale mannitolo è un terreno sia selettivo (cioè permette la crescita solo di alcune specie) che differenziale (permette la discriminazione di una specie dall'altra grazie ad indicatori).

MSA: Selective and Differential



Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Micrococcus luteus

MSA (Mannitol Salt Agar)

Selective
because of salt:
only Staph can
grow

Differential because *S. aureus* ferments mannitol sugar (turns it yellow) but *Staph epidermidis* does not ferment mannitol. Note there is no growth or fermentation from *M. luteus*.

TCBS

TCBS agar contains high concentrations of [sodium thiosulfate](#) and [sodium citrate](#) to inhibit the growth of [Enterobacteriaceae](#).

Inhibition of [Gram-positive bacteria](#) is achieved by the incorporation of [ox gall](#), which is a naturally occurring substance containing a mixture of bile salts and [sodium cholate](#), a pure [bile salt](#).

Sodium thiosulfate also serves as a [sulfur](#) source and its presence, in combination with ferric citrate, allows for the easy detection of [hydrogen sulfide](#) production.

Saccharose ([sucrose](#)) is included as a [fermentable carbohydrate](#) for metabolism by *Vibrio* species. The [alkaline pH](#) of the medium enhances the recovery of *V. cholerae* and inhibits the growth of others. [Thymol blue](#) and [bromothymol blue](#) are included as [indicators](#) of pH changes.

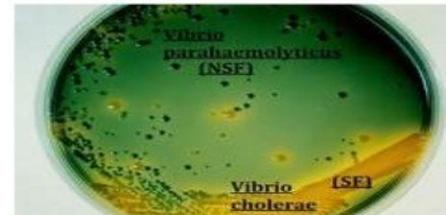
Choose the Selective Medium with caution (TCBS)

- TCBS is a selective isolation medium for culture of pathogenic *Vibrio* spp primarily from clinical samples. On this medium most Enterobacteriaceae in faeces are suppressed for at least 24 hours although slight growth of *Proteus* spp and *Streptococcus faecalis* may occur but they are readily distinguished from vibrio colonies



Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar(TCBS)

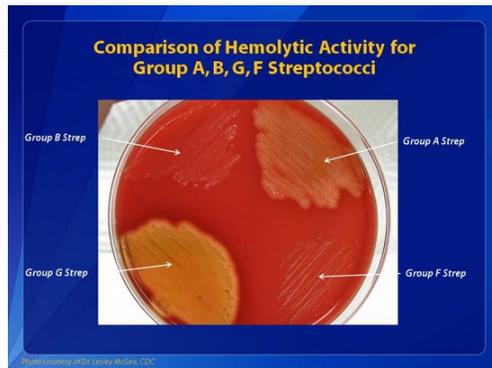
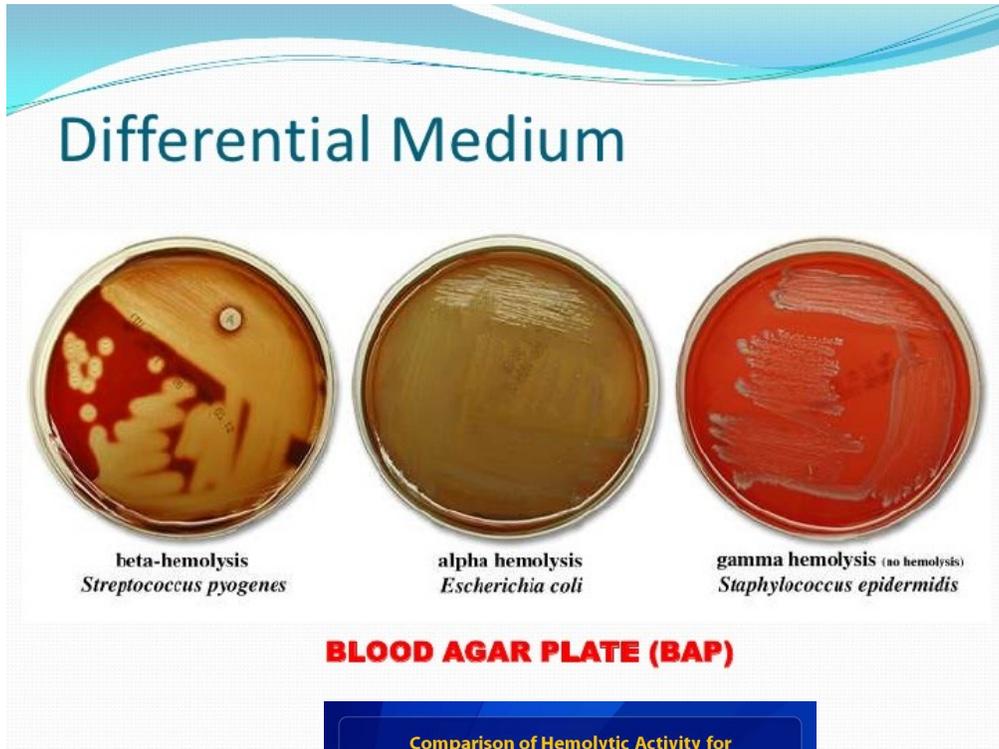
- highly selective for the isolation of [V. cholerae](#) and [V. parahaemolyticus](#)



Yellow coloured (sucrose fermenting) colonies of [Vibrio cholerae](#) on TCBS agar.

Blood Agar

Blood agar is an **enriched**, bacterial growth **medium**. **Fastidious** organisms, such as streptococci, do not grow well on ordinary growth media. Blood agar is a type of growth medium (*trypticase soya agar enriched with 5% sheep blood*) that *encourages the* growth of bacteria, such as streptococci, that otherwise wouldn't grow.



Certain bacterial species produce extracellular enzymes that lyse red blood cells in the blood agar (hemolysis). These hemolysin (extotoxin) radially diffuses outwards from the colony (or colonies) causing complete or partial destruction of the red cells (RBC) in the medium and complete denaturation of hemoglobin within the cells to colorless products.

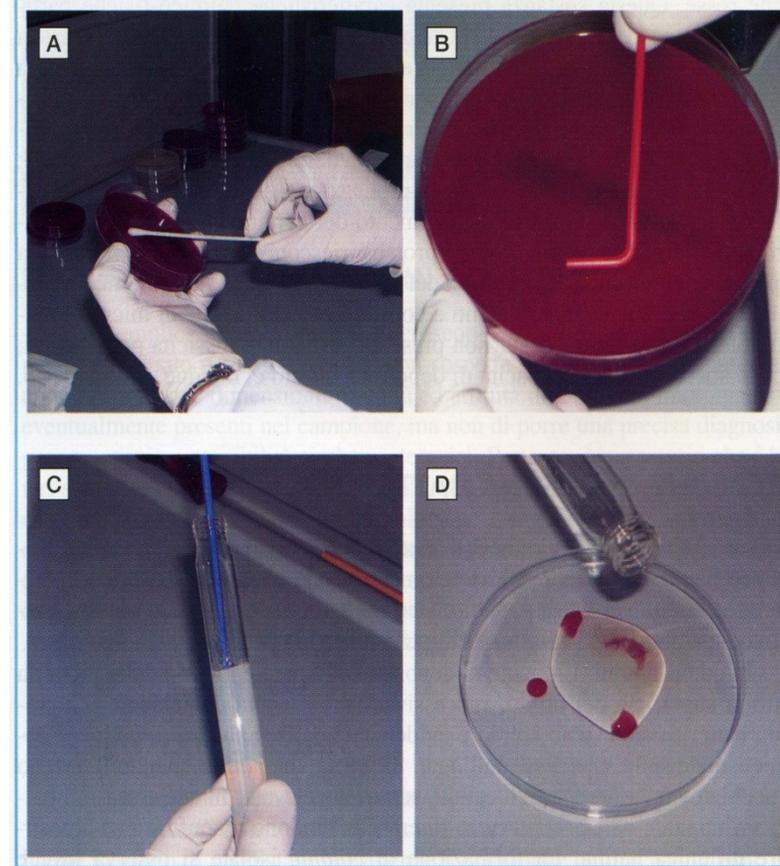
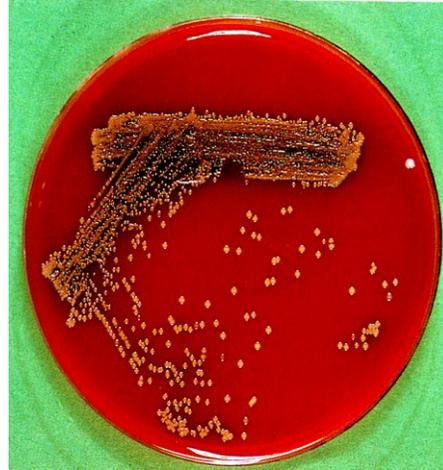
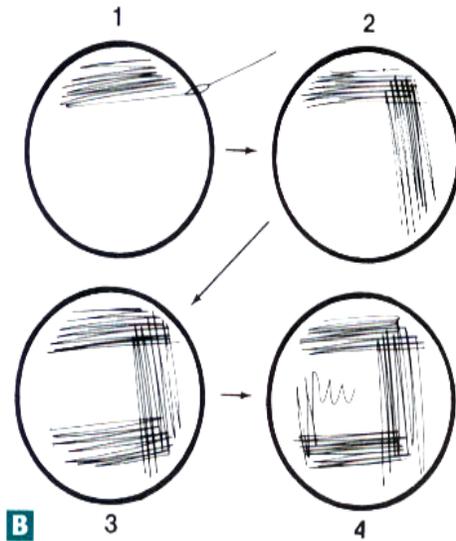
Four types of hemolysis are produced in Sheep blood agar by Streptococci namely; Alpha hemolysis, Beta hemolysis, gamma hemolysis and alpha prime or wide zone alpha hemolysis.

Alpha hemolysis: Partial lysis of the RBC to produce a greenish-gray or brownish discoloration around the colony. α hemolysis is due to the reduction of RBC hemoglobin to methemoglobin in the medium surrounding the colony. Many of the alpha hemolytic streptococci are part of the normal body flora. But *Streptococcus pneumoniae* which is also alpha hemolytic causes serious pneumonia and other deadly infectious disease.

Beta Hemolysis: Complete lysis of Red Blood Cells, causing a clearing of blood from the medium under and surrounding the colonies e.g. Group A beta hemolytic streptococci-*Streptococcus pyogenes* and Group B, beta hemolytic streptococci-*Streptococcus agalactiae*. For group A streptococci maximal activity of both the hemolysins; Oxygen labile SLO and oxygen stable SLS hemolysins is observed only in anaerobic conditions.

Gamma or non hemolysis: No hemolysis of RBC. No change of the medium under and surrounding the colonies.

3. Ricerca colturale



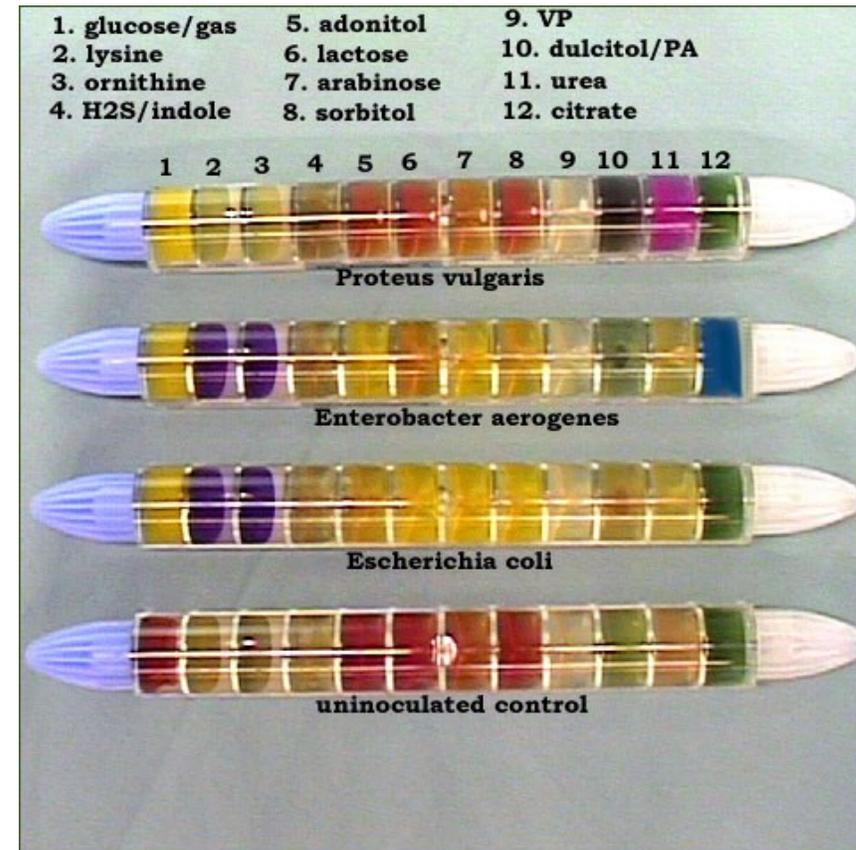
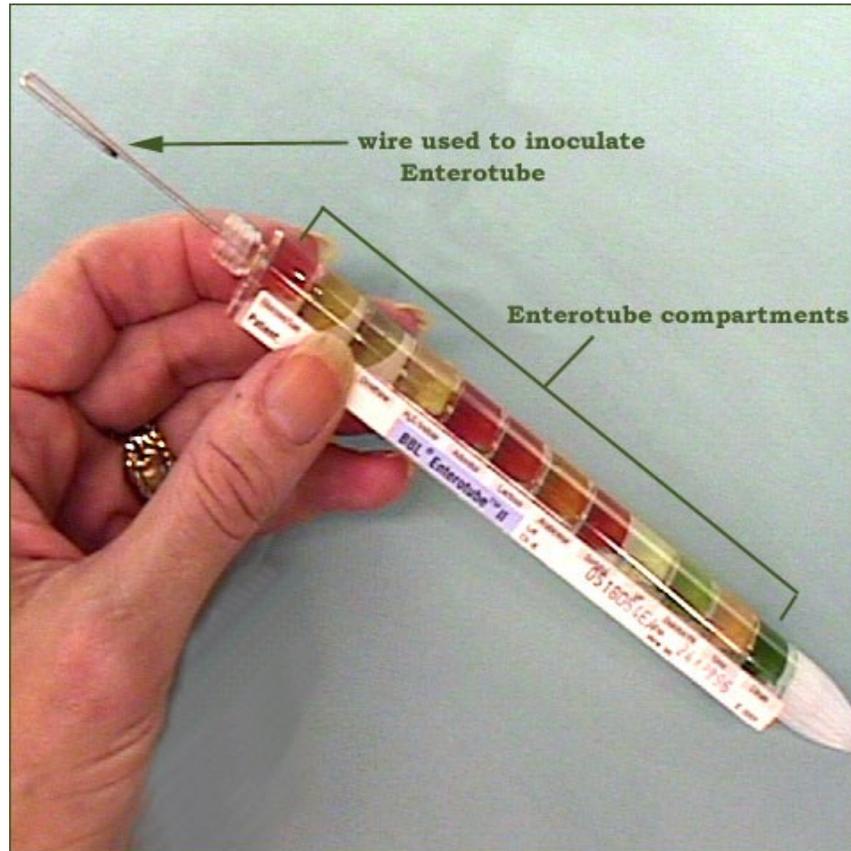
Tecniche di semina: A) strisciamento, B) spatolamento, C) Infissione, D) Inclusione

Lo scopo della ricerca colturale è l'isolamento del microrganismo patogeno in coltura pura. L'isolamento in coltura pura è il **REQUISITO INDISPENSABILE** per procedere all'identificazione dell'agente infettante.

Uso di terreni appropriati, generalmente solidi, insemenzati con la giusta concentrazione di inoculo → sviluppo di colonie separate. Prelevando le singole colonie, si possono allestire poi colture pure.

Prove di fermentazione e altre proprietà biochimiche:

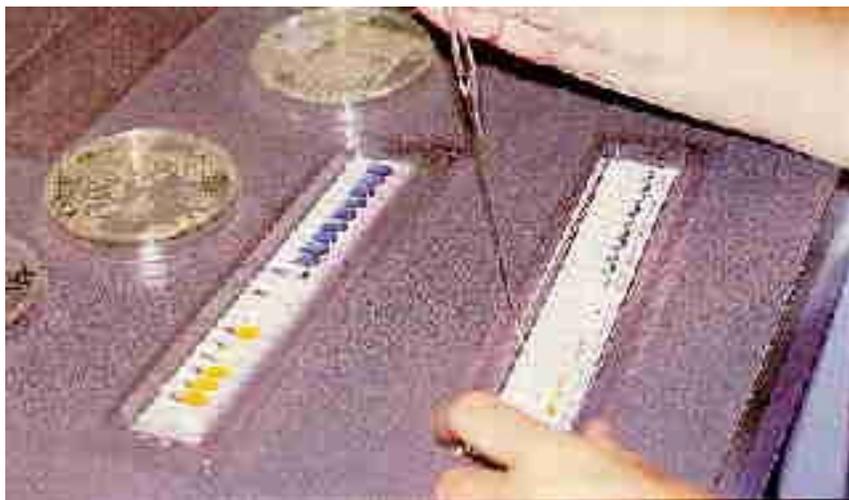
Enterotubo (identificazione batteri enterici)



Prove di fermentazione e altre proprietà biochimiche:

API E20 - sistema per identificare gli enterobatteri

Una striscia di plastica con 20 mini-provette viene inoculata con una sospensione batterica pura in soluzione tampone. Dopo incubazione (24 h 37°C) si leggono le reazioni colorimetriche. I risultati (+, -) sono convertiti in un numero, che identifica la specie batterica (tramite manuale e sistema computerizzato)



READING TABLE

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.223	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-βD-Galactopyranosidase)	colorless	yellow (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	yellow	red / orange (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
<u>ODC</u>	L-ornithine	1.9	Ornithine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
<u>CIT</u>	trisodium citrate	0.756	CITrate utilization	pale green / yellow	blue-green / blue (3)
<u>H₂S</u>	sodium thiosulfate	0.075	H ₂ S production	colorless / greyish	black deposit / thin line
<u>URE</u>	urea	0.76	UREase	yellow	red / orange (2)
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DeAminase	<u>TDA / immediate</u> yellow reddish brown	
IND	L-tryptophane	0.19	INDole production	<u>JAMES / immediate</u> colorless pink pale green / yellow	
<u>VP</u>	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u> colorless pink / red (5)	
<u>GEL</u>	Gelatin (bovine origin)	0.6	GELatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1.9	fermentation / oxidation (GLUcose) (4)	blue / blue-green	yellow / greyish yellow
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation / oxidation (MANnitol) (4)	blue / blue-green	yellow
INO	inositol	1.9	fermentation / oxidation (INOsitol) (4)	blue / blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation / oxidation (SORbitol) (4)	blue / blue-green	yellow
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation / oxidation (RHAmnose) (4)	blue / blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	1.9	fermentation / oxidation (SACcharose) (4)	blue / blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation / oxidation (MELibiose) (4)	blue / blue-green	yellow
AMY	amygdalin	0.57	fermentation / oxidation (AMYgdalin) (4)	blue / blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation / oxidation (ARAbinose) (4)	blue / blue-green	yellow
OX	(see oxidase test package insert)		cytochrome-OXidase	(see oxidase test package insert)	

(1) A very pale yellow should also be considered positive.

(2) An orange color after 36-48 hours incubation must be considered negative.

(3) Reading made in the cupule (aerobic).

UTI

Brilliance UTI Agar contains two specific chromogenic substrates which are cleaved by enzymes produced by *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* and coliforms.

In addition, it contains phenylalanine and tryptophan, which provide an indication of **tryptophan deaminase activity**, indicating the presence of *Proteus* spp., *Morganella* spp. and *Providencia* spp. It is based on electrolyte deficient CLED Medium which provides a valuable non-inhibitory diagnostic agar for plate culture of other urinary organisms, whilst preventing the swarming of *Proteus* spp.

One chromogen, **X-Gluc**, is targeted towards β -glucosidase, and allows the specific detection of **enterococci** through the formation of **blue colonies**.

The other chromogen, **Red-Gal**, is cleaved by the enzyme β -galactosidase which is produced by *Escherichia coli*, resulting in **pink colonies**.

Any uncertainty in identification may be resolved by removing suspect *Escherichia coli* colonies from the plate and performing an indole test using DMACA reagent.

Cleavage of both chromogens occurs in the presence of coliforms, resulting in purple colonies.

The medium also contains **tryptophan** which acts as an indicator of tryptophan deaminase activity, resulting in colonies of *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* spp. appearing brown.

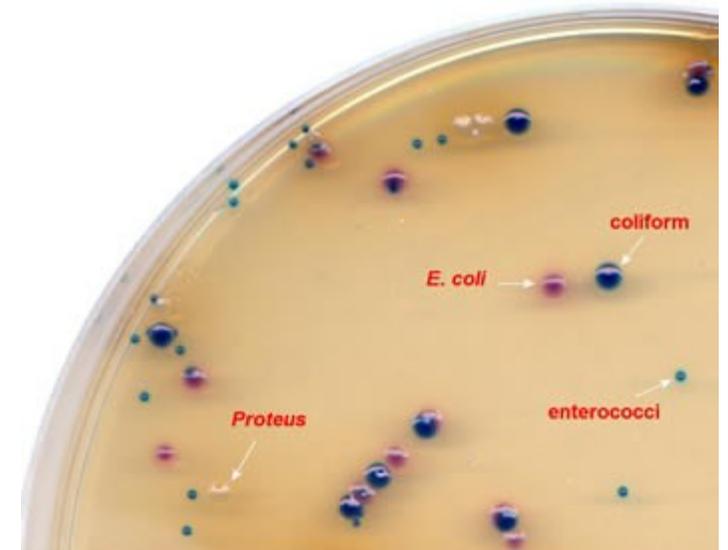
Interpretation

The expected colour reactions are laid out in table 1.

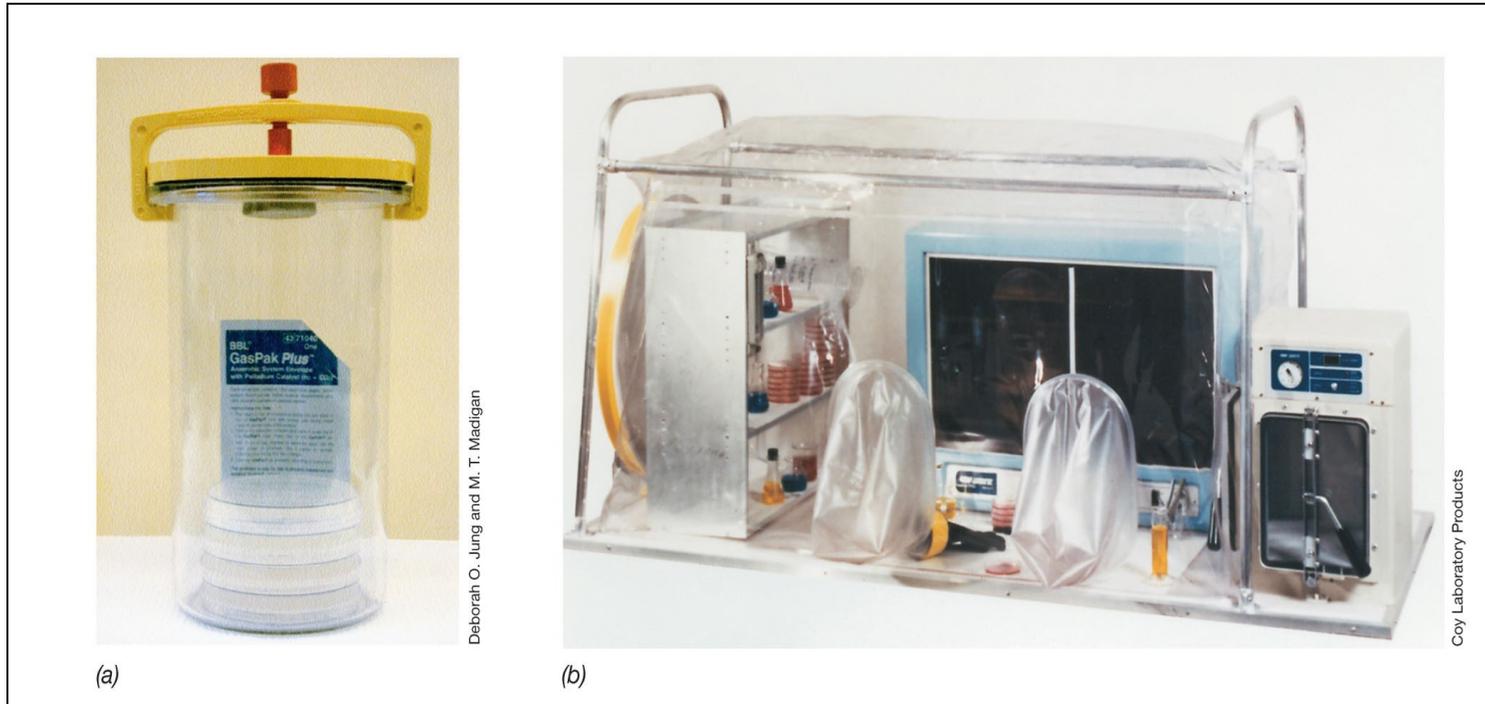
Table 1: Typical colour reactions on *Brilliance* UTI Clarity Agar

Organism	β -galactosidase	β -glucosidase	TDA	Colony colour
<i>E. coli</i>	+			Pink
enterococci		+		Blue / Turquoise
coliforms	+	+		Dark Blue / Purple
<i>Proteus/Morganella & Providencia</i> spp.			+	Brown halo
pseudomonads				Green or Brown Translucent
staphylococci				White / Cream
<i>S. saprophyticus</i>				Pale Pink / White
streptococci				White

Presumptive *E. coli* identification can be confirmed using DMAC reagent on filter paper.

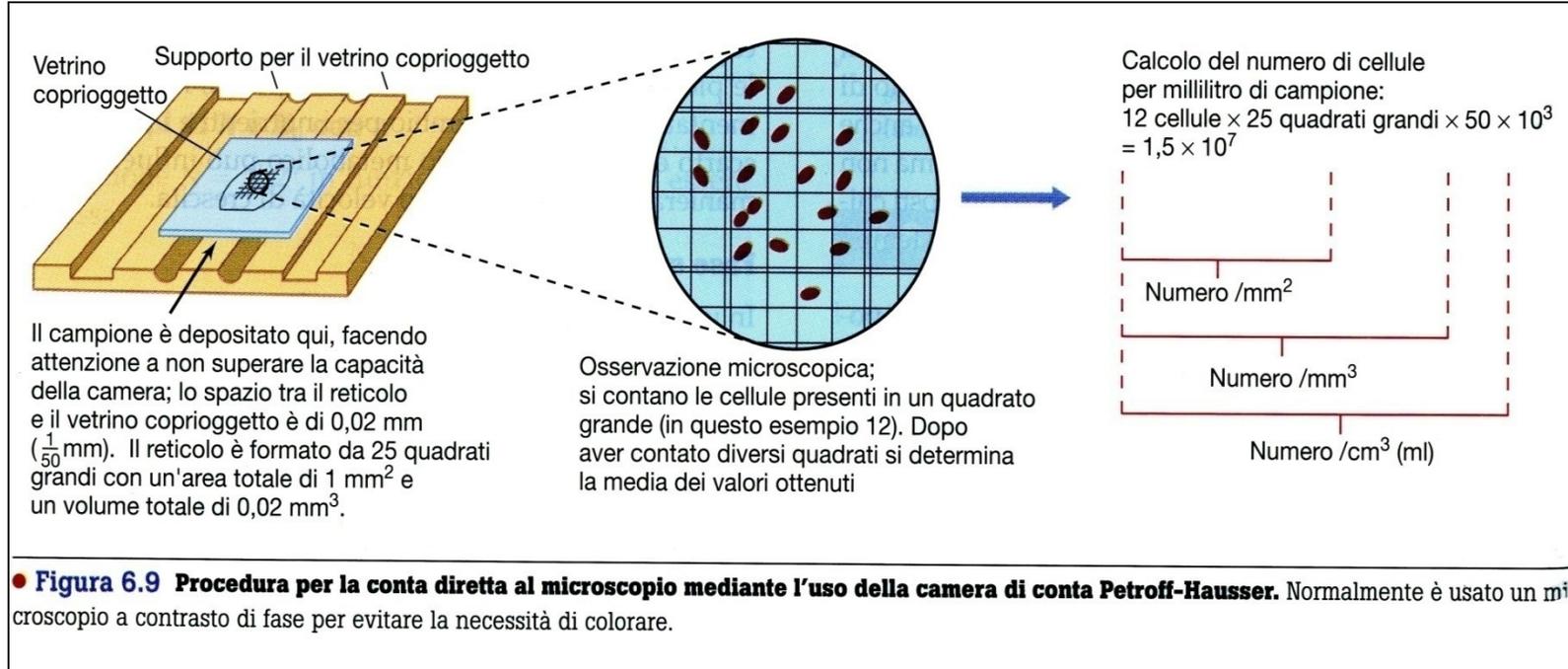


Coltura per batteri anaerobi



I batteri anaerobi devono essere coltivati in assenza di ossigeno. Si usano speciali contenitori, in cui mediante reazioni chimiche (catalizzate dal palladio) l'ossigeno atmosferico viene eliminato, in quanto si lega all'idrogeno formando acqua. All'interno c'è anche un indicatore (blu di metilene), che diventa incolore quando non c'è più ossigeno.

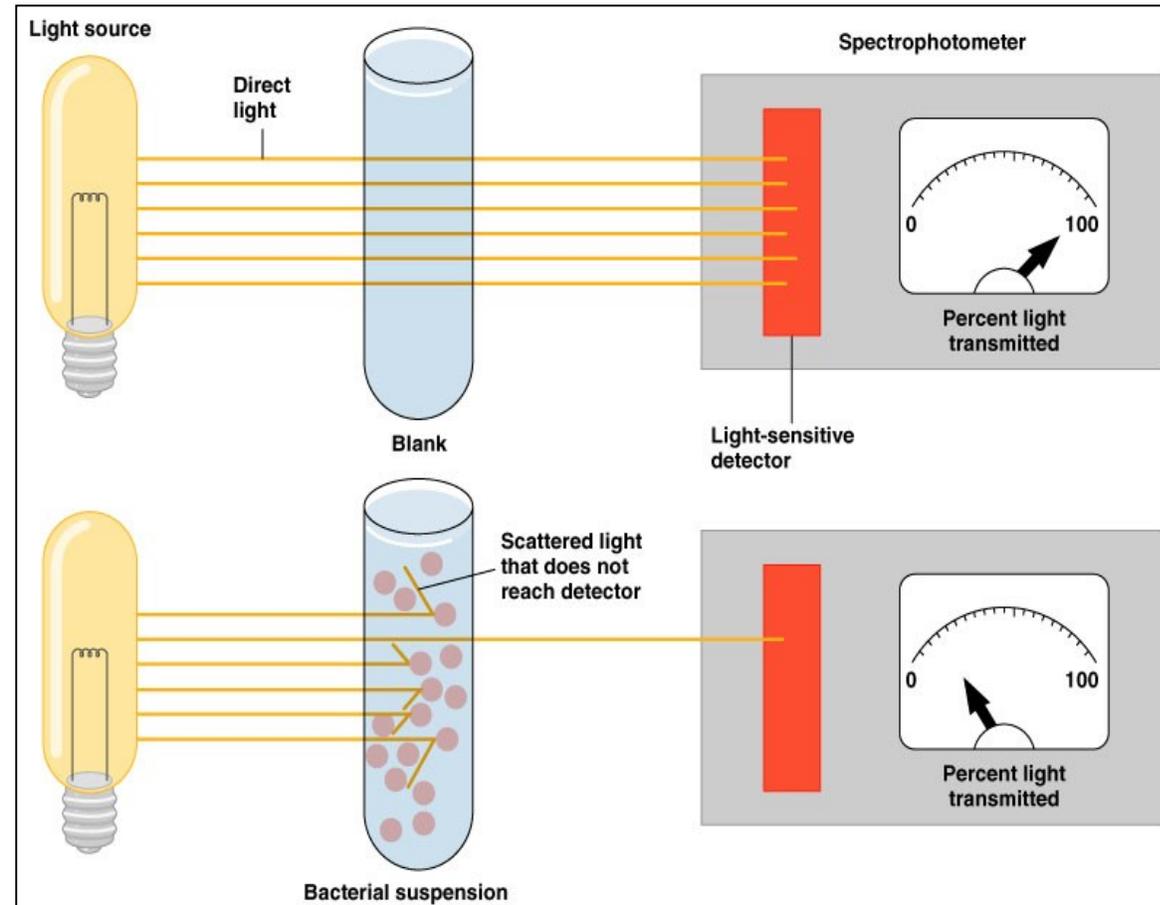
Per contare i batteri:



1. Conta diretta al microscopio mediante una camera conta cellule: si ottiene il **numero totale** di batteri presenti nella coltura (anche i batteri morti).

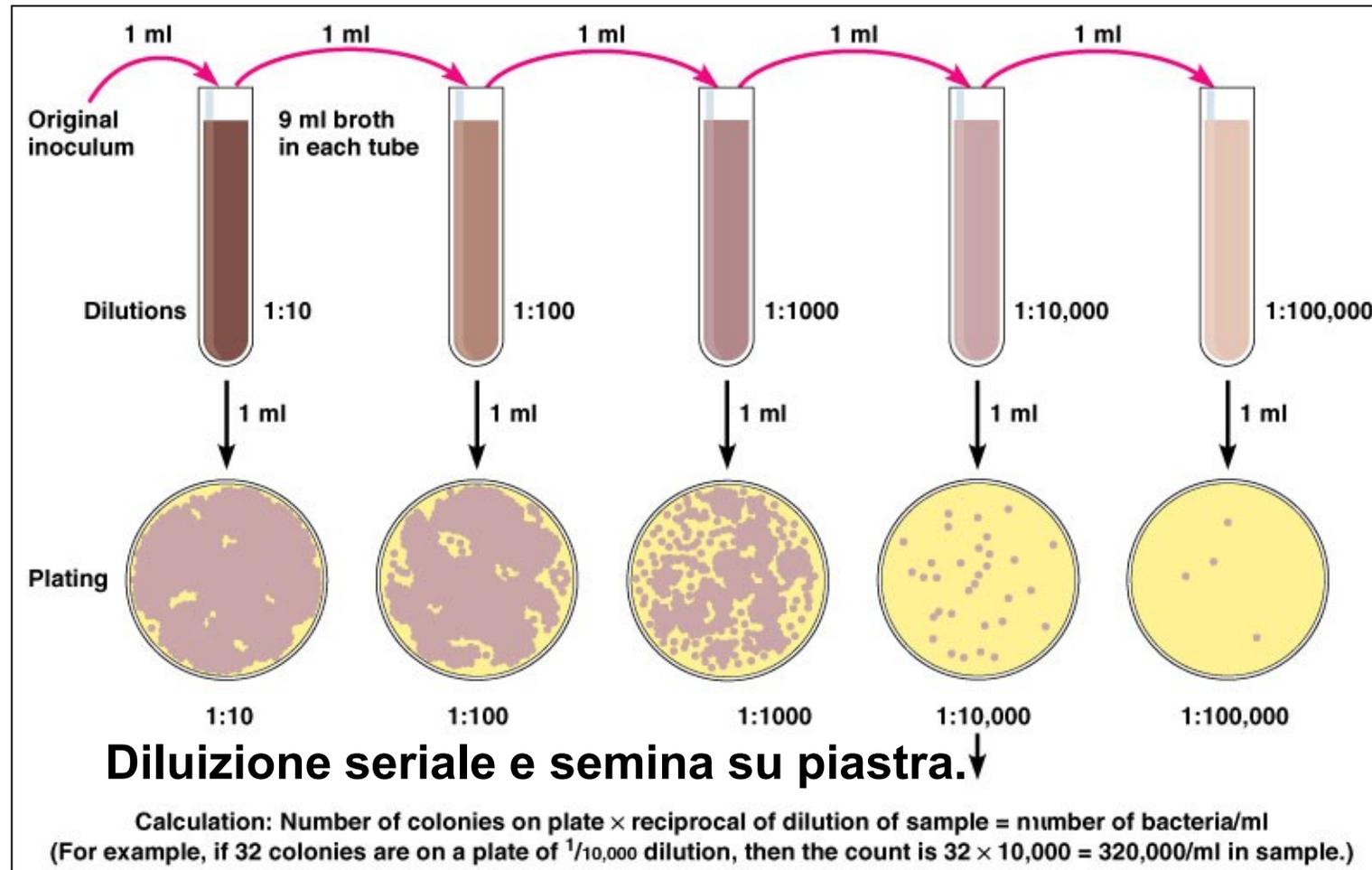
2. Conta mediante densità ottica (anche batteri morti):

la torbidità del terreno di coltura liquido dipende dal numero di batteri che vi sono cresciuti. Pertanto la percentuale di luce che riesce ad attraversare la coltura è indirettamente proporzionale al numero di batteri.



3. Conta mediante diluizione su piastra (batteri vivi)

È possibile determinare la curva di crescita di una coltura batterica insemenzando pochi batteri in terreno liquido e contando la popolazione viva ad intervalli regolari.



Per avere un conteggio preciso dei batteri vivi (con il metodo delle colonie non si tiene conto dei batteri che crescono aggregati come gli stafilococchi e gli streptococchi) si colora un preparato fresco senza inattivare al calore e si contano le cellule che non si sono colorate.

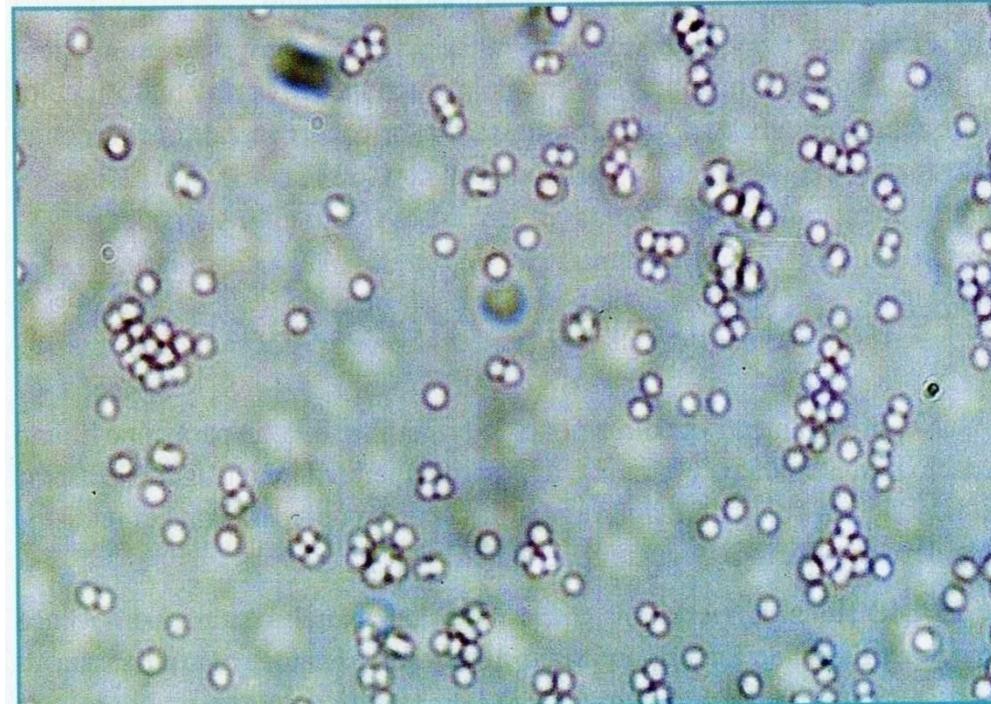
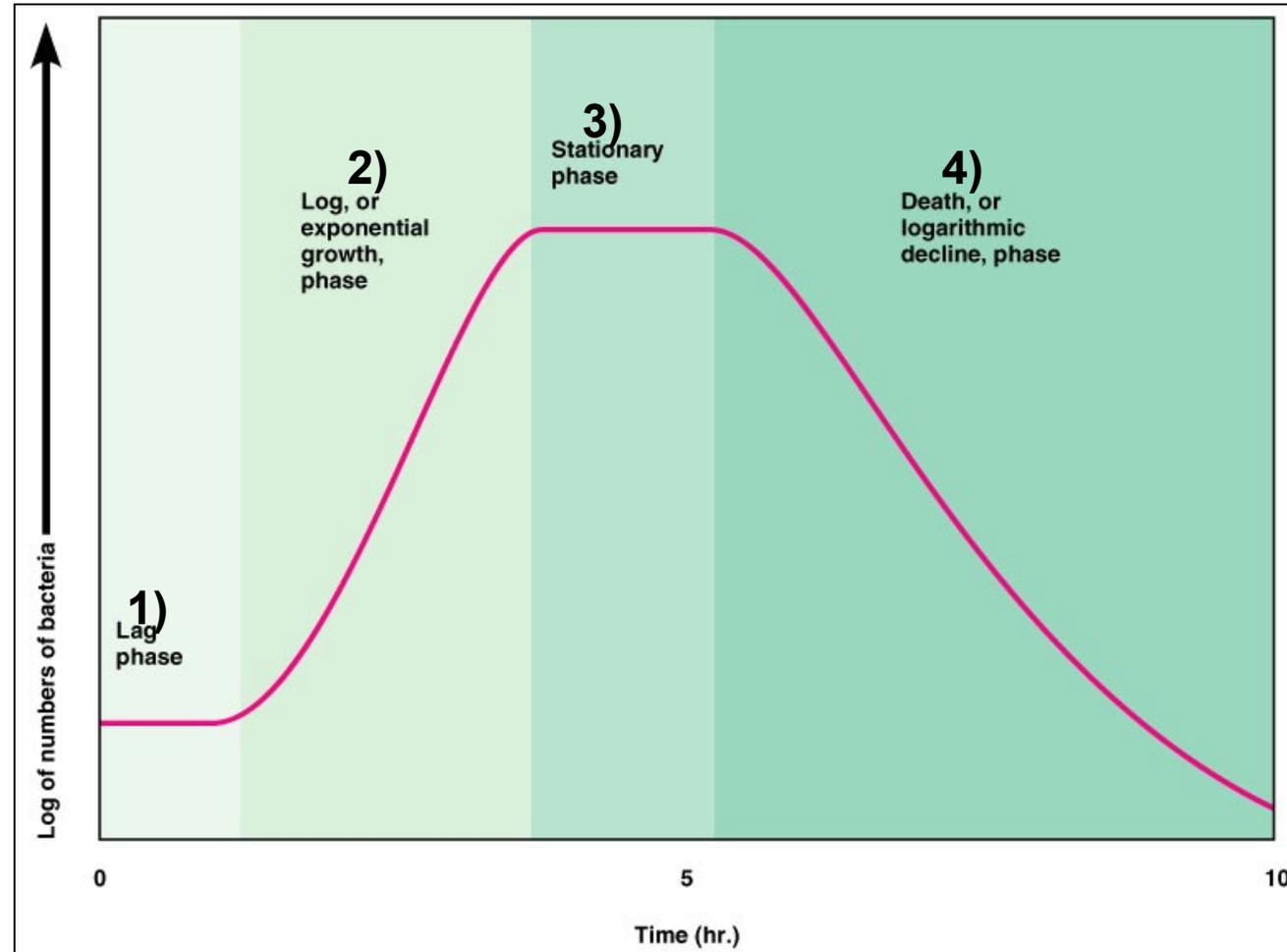


FIGURA 2.7 - Osservazione diretta di un campione di emocultura: stafilococco.

Curva di crescita di una coltura batterica

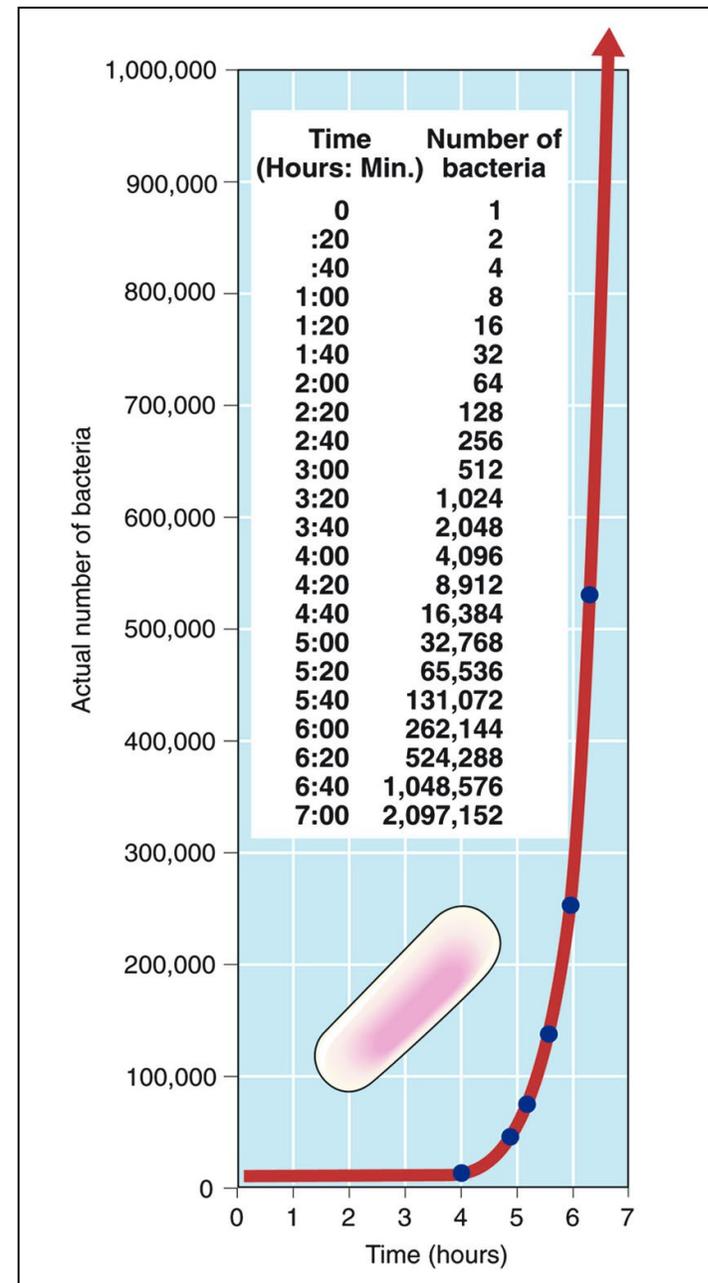


1) Fase di LATENZA = non c'è aumento del n° di batteri. Le cellule hanno però una forte attività metabolica e sintetizzano enzimi e sostanze necessarie alla crescita. Fase di adattamento metabolico.

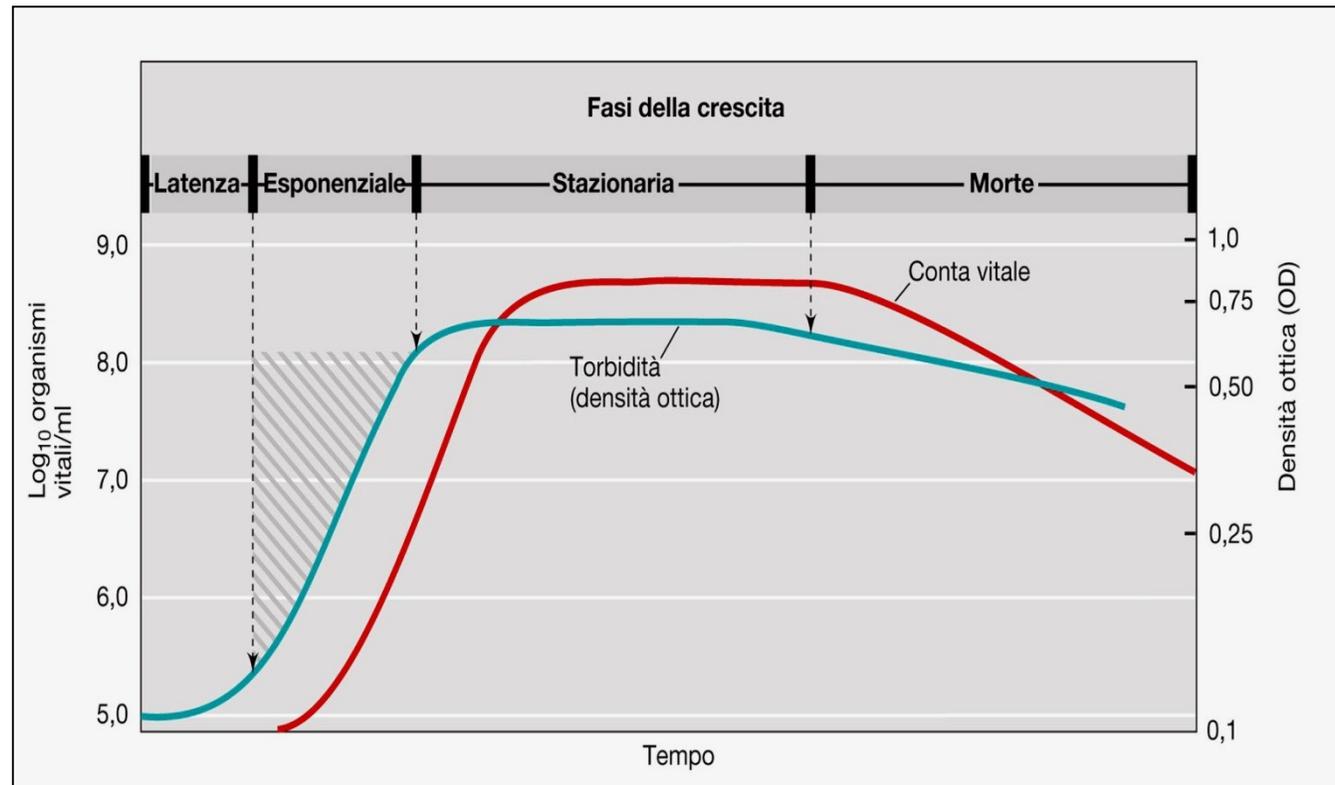
2) Fase ESPONENZIALE o **logaritmica** = cominciano le duplicazioni cellulari e ben presto tutte le cellule si moltiplicano: dopo ogni generazione si ha un numero di batteri doppio rispetto a quello precedente ed il n° totale cresce col passare del tempo.

3) Fase STAZIONARIA = il progressivo esaurimento delle sostanze nutritive e l'accumulo di scorie metaboliche tossiche allungano il tempo di moltiplicazione; il n° di batteri vivi rimane costante perché il n° di cellule neoformate è controbilanciato dal n° di cellule che muoiono.

4) Fase di DECLINO = il n° di batteri vivi cala progressivamente tendendo a zero.



La curva di crescita ottenuta con il numero di batteri totali (misurabili per esempio con la densità ottica) è diversa da quella ottenuta contando i soli batteri vivi



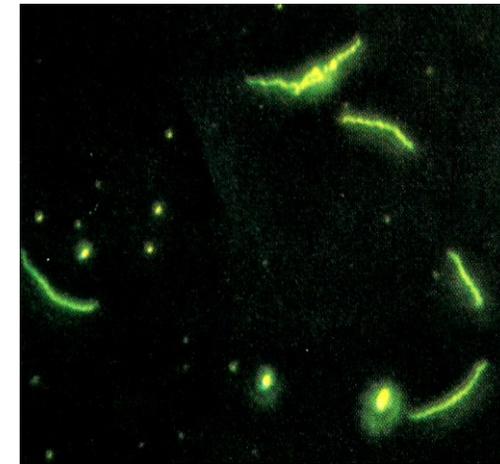
1. Esame microscopico

→ Con microscopio ottico dopo COLORAZIONE. Ad es. la colorazione di Gram serve per orientare la prosecuzione delle analisi.

Per certi campioni già la presenza di batteri nel campione indica la patologia in atto (es. batteri nel sangue o nel liquido cefalorachidiano, in quanto normalmente sono sterili).

Dopo colorazione di Ziel Nielsen in caso di sospetta tubercolosi polmonare (la colorazione è diagnostica per i micobatteri).

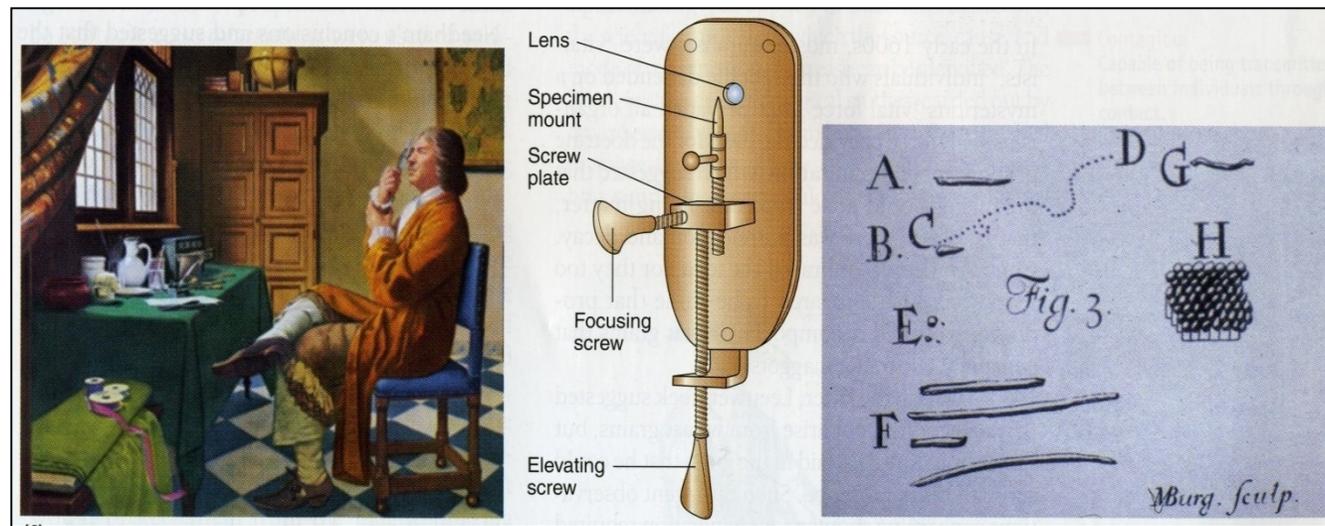
→ Con microscopio ottico dopo IMMUNOFLUORESCENZA utilizzando anticorpi monoclonali marcati con fluoresceina.



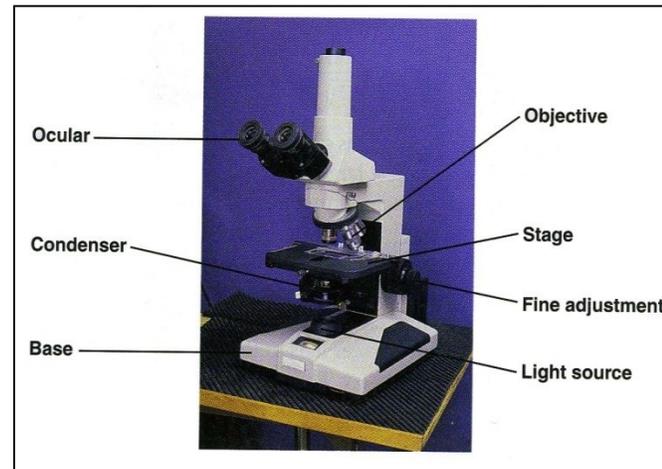
Treponema pallidum evidenziato mediante Atb monoclonali marcati con isotiocianato di fluoresceina

Tecniche di Microscopia

Primo microscopio: inventato dall'olandese Leeuwenhoek nel 1670 circa, microscopio semplice con un unico sistema di lente.

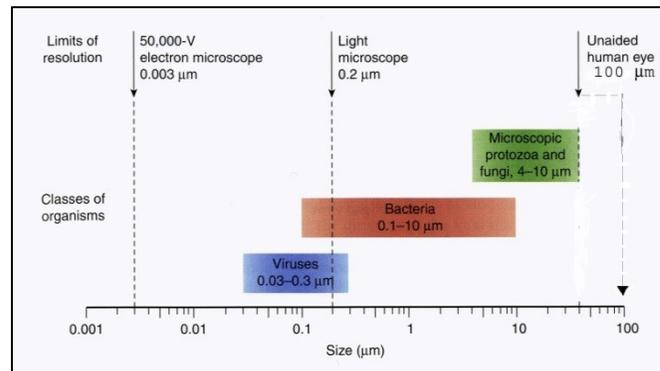


I moderni strumenti per la microscopia sono microscopi composti cioè dotati di almeno due lenti: un obiettivo ed un oculare.



Potere di ingrandimento totale: ingrandimento dell'obiettivo x ingrandimento dell'oculare. Il massimo ingrandimento di un microscopio ottico è di 1000-1500X.

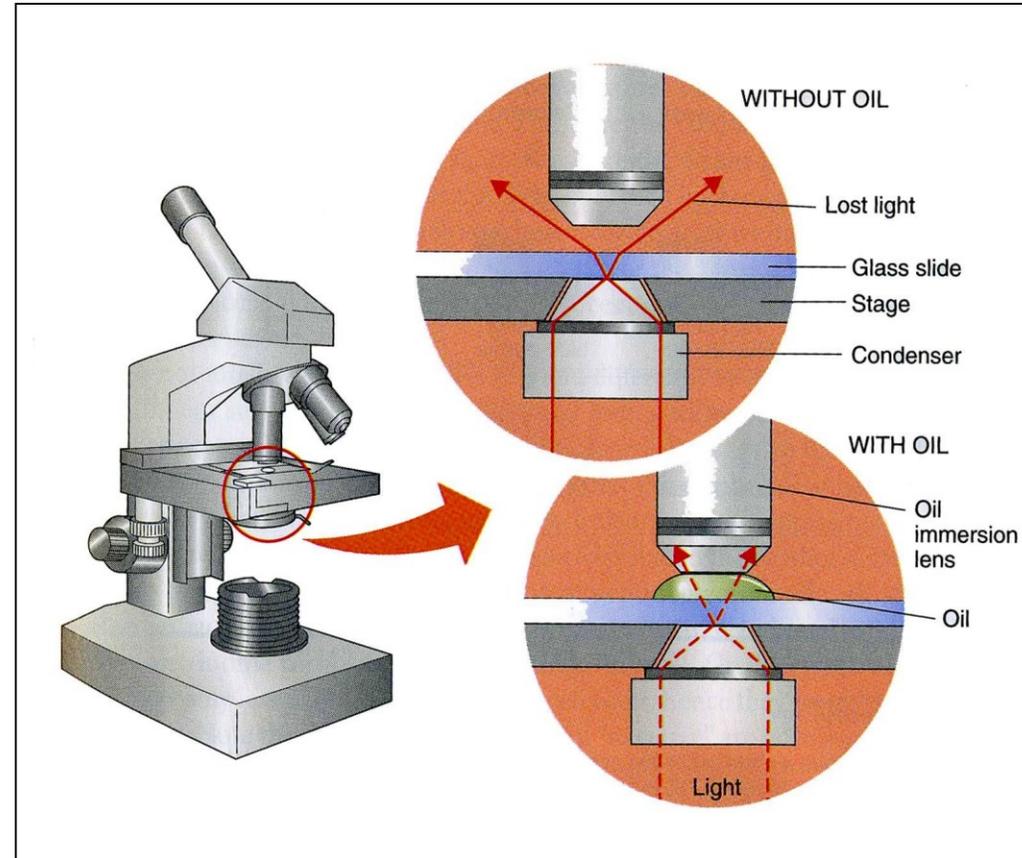
Capacità di risoluzione: facoltà di risolvere cioè vedere separati due oggetti molto vicini fra loro. La capacità di risoluzione dell'occhio umano è 0.1 mm; con il microscopio ottico composto il potere di risoluzione scende a 0,2 μm .



10X: basso ingrandimento: viene utilizzato per esaminare un intero campione (ad es. un tappeto di cellule cresciute in monostrato)

40X: alto ingrandimento: viene usato per osservare microbi di grosse dimensioni quali parassiti e funghi filamentosi.

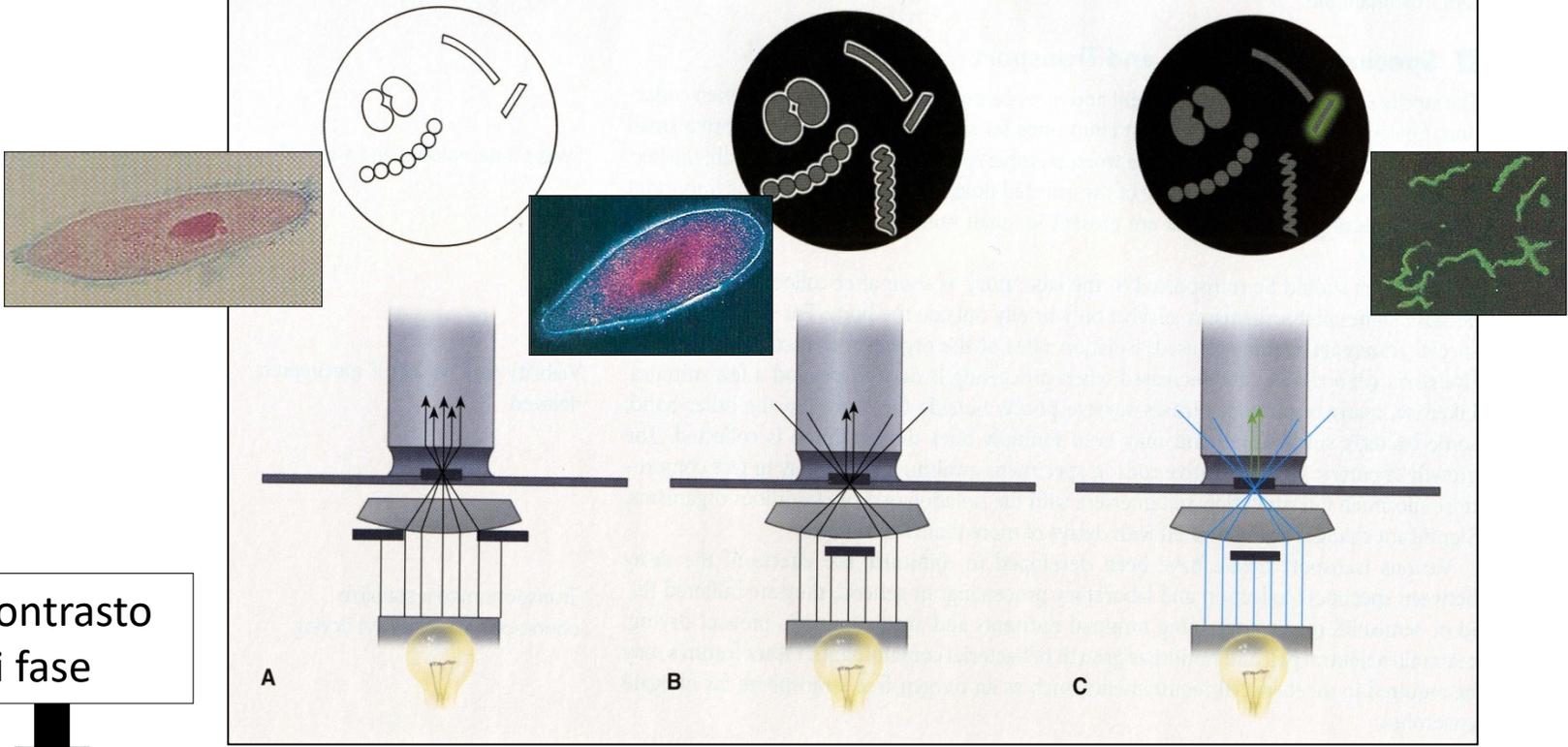
100X: è detto "ad immersione" in quanto l'osservazione viene effettuata ponendo una goccia di olio di cedro sul preparato ed immergendo l'obiettivo nell'olio. In questo modo la luce che passa attraverso il vetrino su cui è posto il campione penetra nell'obiettivo in modo rettilineo (in quanto l'olio ha lo stesso indice di rifrazione del vetro) aumentando il potere di risoluzione del microscopio e consentendo una visione più nitida. E' usato per osservare batteri ed i dettagli morfologici di organismi più grandi e di cellule.



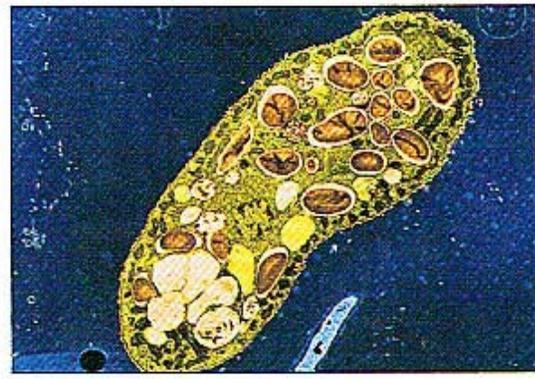
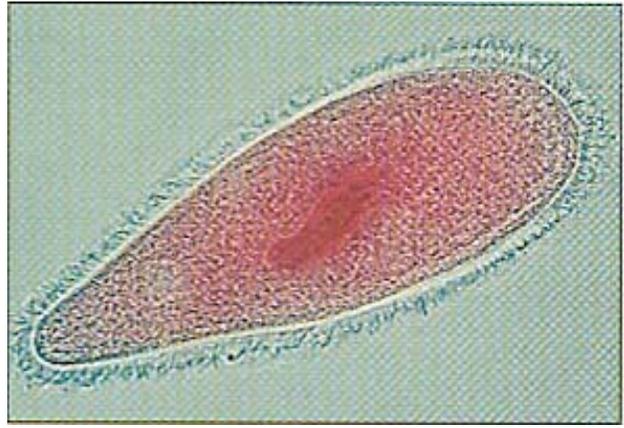
Microscopia in campo chiaro

Microscopia in campo oscuro

Microscopia a fluorescenza

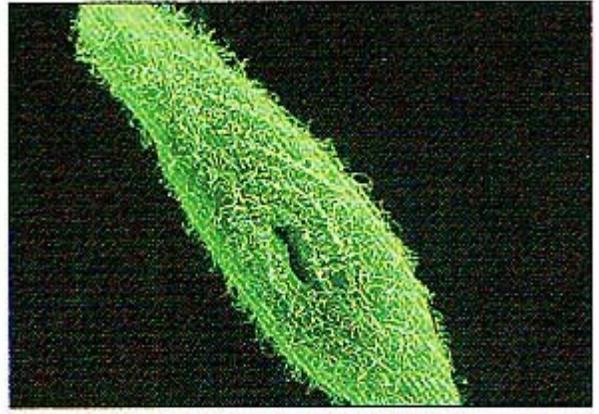


Contrasto di fase



trasmissione

Microscopio elettronico



scansione

E' difficile vedere i microrganismi al microscopio se prima non vengono colorati.

Colorazione = aumenta il contrasto con lo sfondo, enfatizza strutture specifiche.

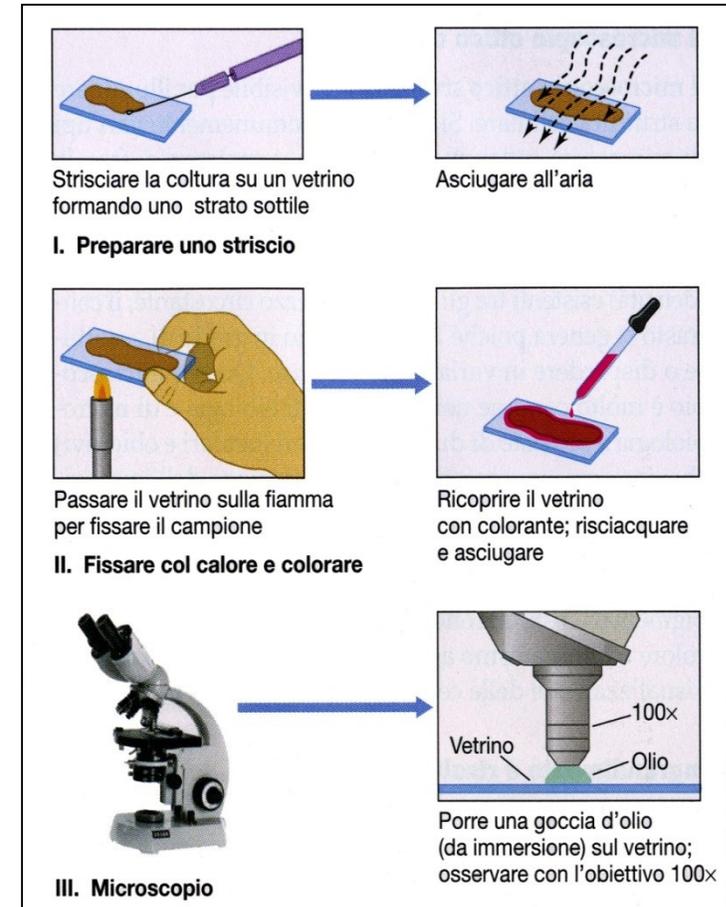
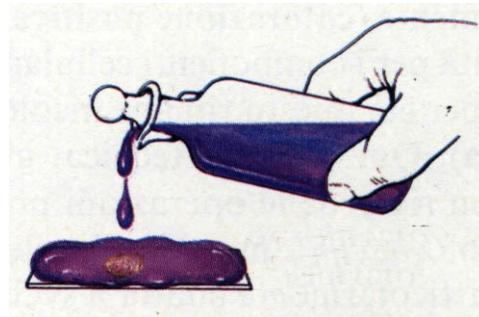
Una colorazione molto usata in batteriologia è la

COLORAZIONE DI GRAM

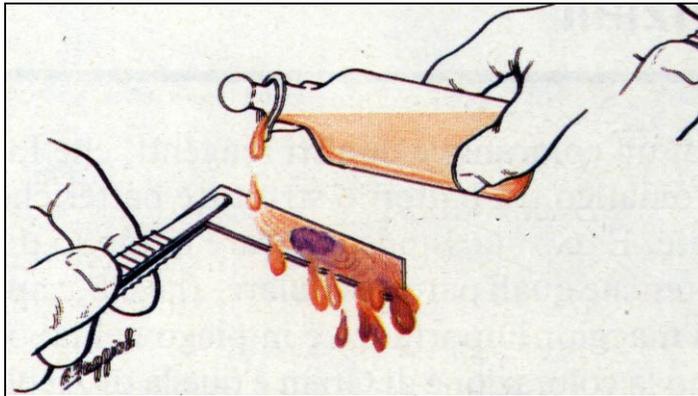
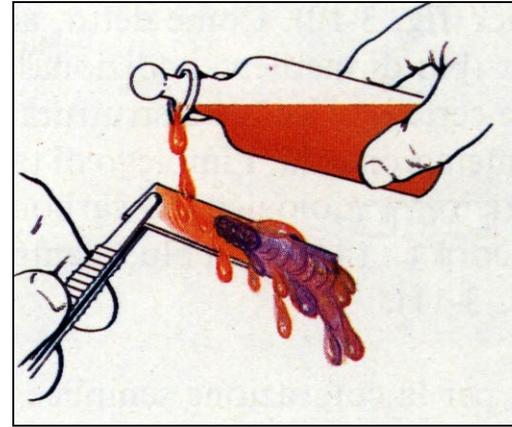
A) FISSAZIONE = uccisione delle cellule mediante calore o fissatori chimici (altrimenti i coloranti non penetrano)

B) TRATTAMENTO CON:

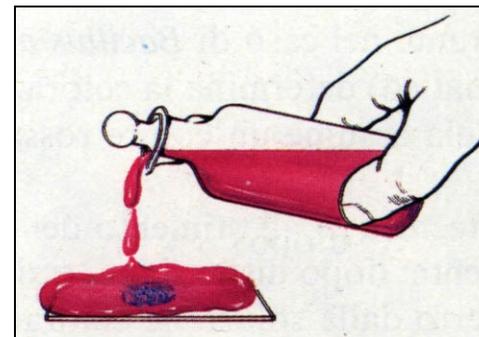
1) cristalvioletto = (colorante basico, penetra e colora i batteri)



2) liquido di Lugol = (a base di iodio) mordenzante (forma un composto insolubile col colorante, rendendone più stabile l'unione al substrato).



3) decolorazione con alcol o acetone

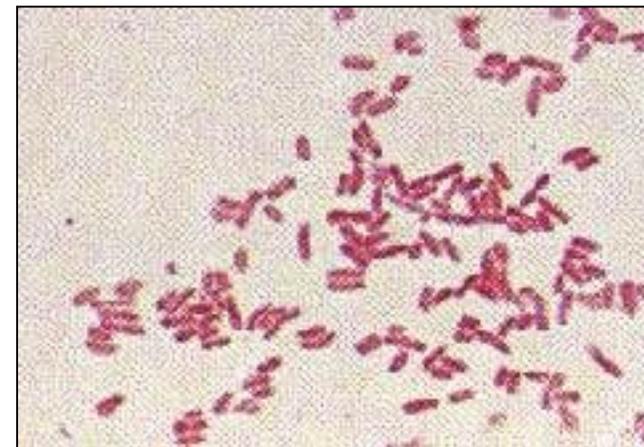
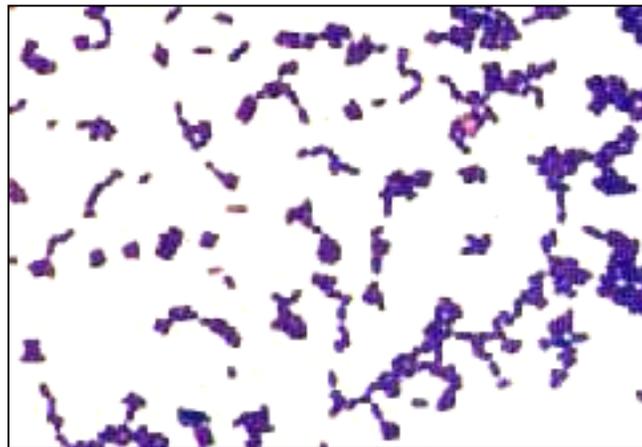
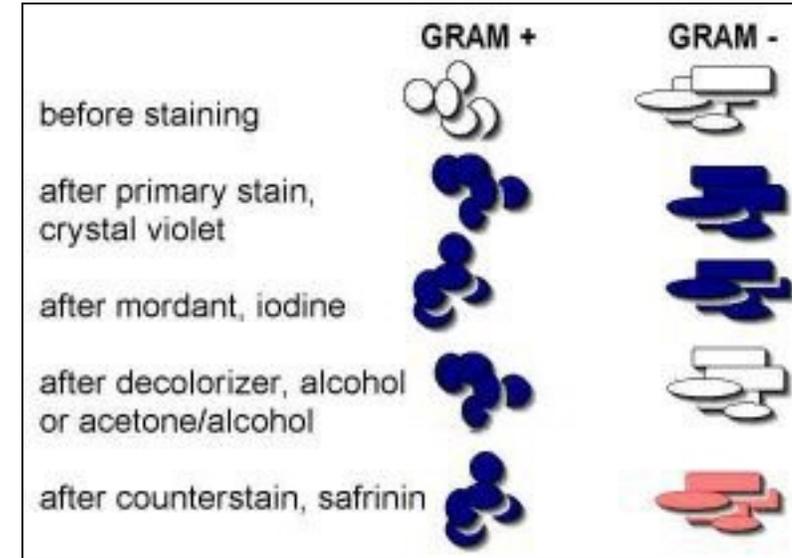


4) Fucsina basica o Safranina = rosso; si colorano solo i batteri che sono stati decolorati

COLORAZIONE DI GRAM-3

Il diverso comportamento dei batteri è dovuto ad una diversa composizione della parete batterica: maggiore permeabilità nei Gram- (l'alcol li decolora → batteri rossi), minore permeabilità nei Gram+ (l'alcol non li decolora → batteri blu).

cristalvioletto e iodio sono idrofili, e quindi penetrano nel batterio Gram + ma anche nei Gram- perché la membrana esterna non è una barriera sufficiente ad impedirlo. Il complesso cristalvioletto/iodio è idrofobico e non può attraversare la parete dei Gram+ ma attraversa bene quella dei Gram-.



COLORAZIONE DI ZIEHL-NEELEN

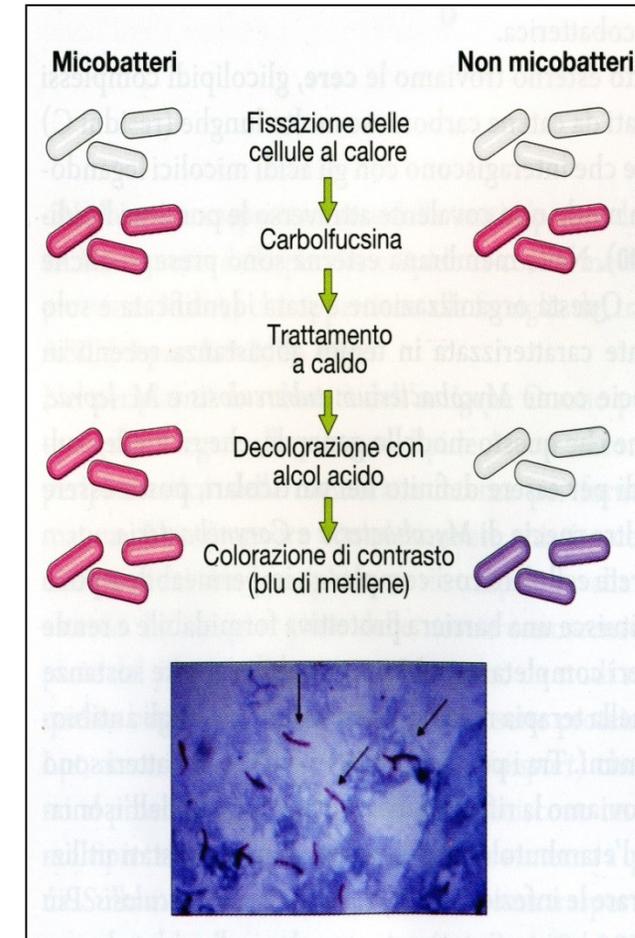
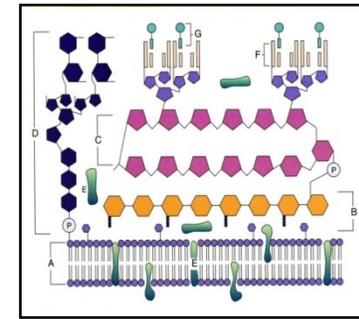
Specifica per evidenziare i MICOBATTERI

1. Il preparato essiccato e fissato viene trattato con fucsina (= rossa) + acido fenico a caldo per 5 minuti.
1. Si decolora con acido solforico ed alcol etilico.
2. Si lava e si controcolora con blu di metilene.

I batteri acido-resistenti (Micobatteri) si colorano in rosso, gli altri in blu.

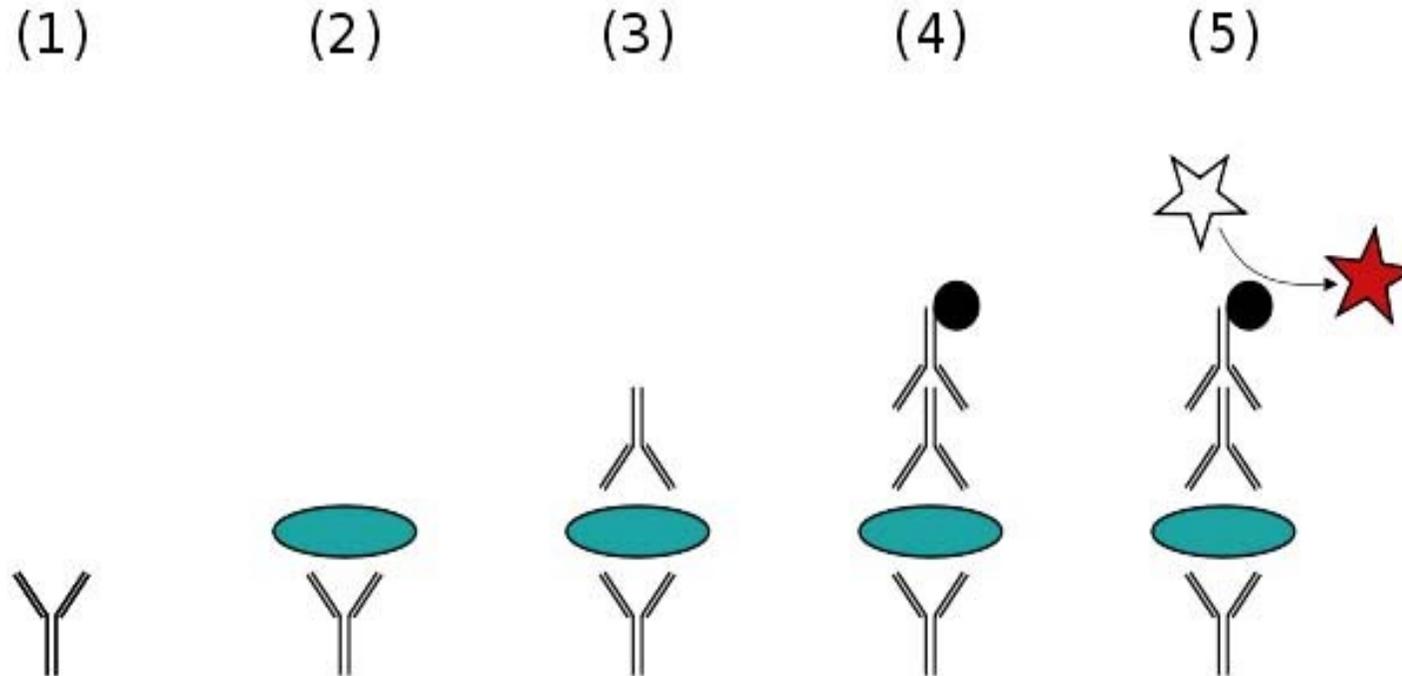
La parete dei micobatteri è ricca di CERE: il primo colorante riesce ad entrare nel citoplasma a causa del trattamento molto energetico (acido + calore), ma poi né l'acido né l'alcol riescono a portarlo via, per la resistenza opposta dalle cere.

I batteri non acido resistenti, invece, perdono il primo colore ed acquisiscono il secondo (blu).



2. Tecniche immunologiche:

→ abbinando l'impiego di anticorpi monoclonali a tecniche immunoenzimatiche (ELISA) o radioimmunologiche (RIA).



Esempio di ELISA (a sandwich) per la ricerca di ATG. Il legame dell'ATG nel siero del paziente all'ATC specifico legato alla piastra è rivelato mediante il legame di un ATC secondario specifico e di un anti-IgG (o IgM) marcato con un enzima. La formazione del complesso viene evidenziata tramite l'aggiunta del substrato cromogeno

REAZIONI IMMUNOENZIMATICHE (ELISA): gli Atc possono essere coniugati con alcuni enzimi (es.:perossidasi, fosfatasi alcalina) senza alterarne la capacità di combinazione con gli Atg corrispondenti. La formazione dell'immunocomplesso viene rivelata aggiungendo il substrato ed i reattivi necessari ad evidenziare l'attività dell'enzima, il quale deve essere in grado di catalizzare una reazione il cui composto terminale sia colorato. Si possono evidenziare sia Atg che Atc

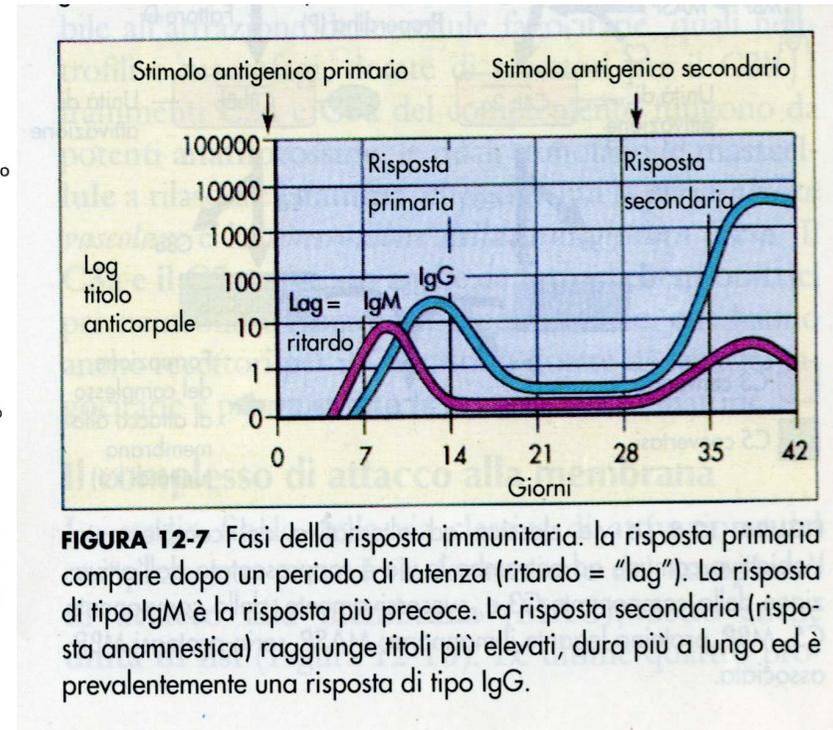
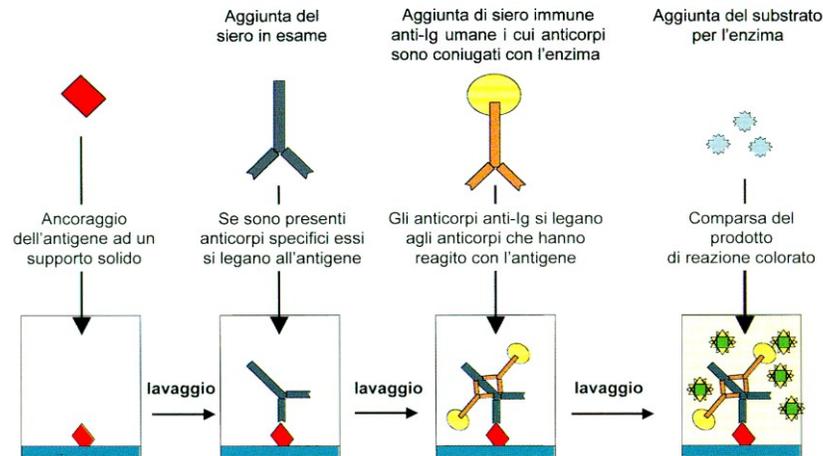
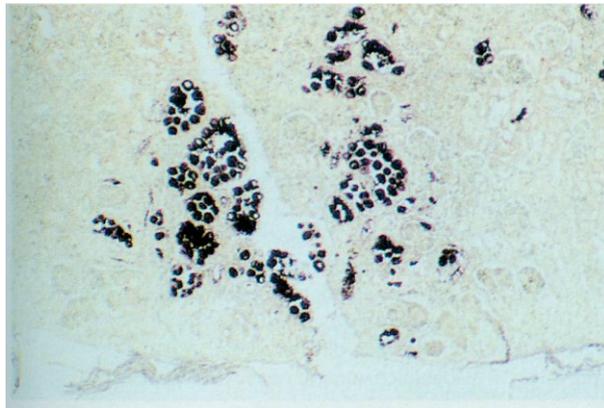


FIGURA 12-7 Fasi della risposta immunitaria. la risposta primaria compare dopo un periodo di latenza (ritardo = "lag"). La risposta di tipo IgM è la risposta più precoce. La risposta secondaria (risposta anamnestica) raggiunge titoli più elevati, dura più a lungo ed è prevalentemente una risposta di tipo IgG.

4. Mediante tecniche di biologia molecolare

Le tecniche di biologia molecolare applicate alla diagnostica microbiologica permettono di identificare un agente patogeno, direttamente nel campione clinico, mediante la rivelazione del suo acido nucleico. Le tecniche utilizzate a questo scopo prevedono essenzialmente reazioni di:

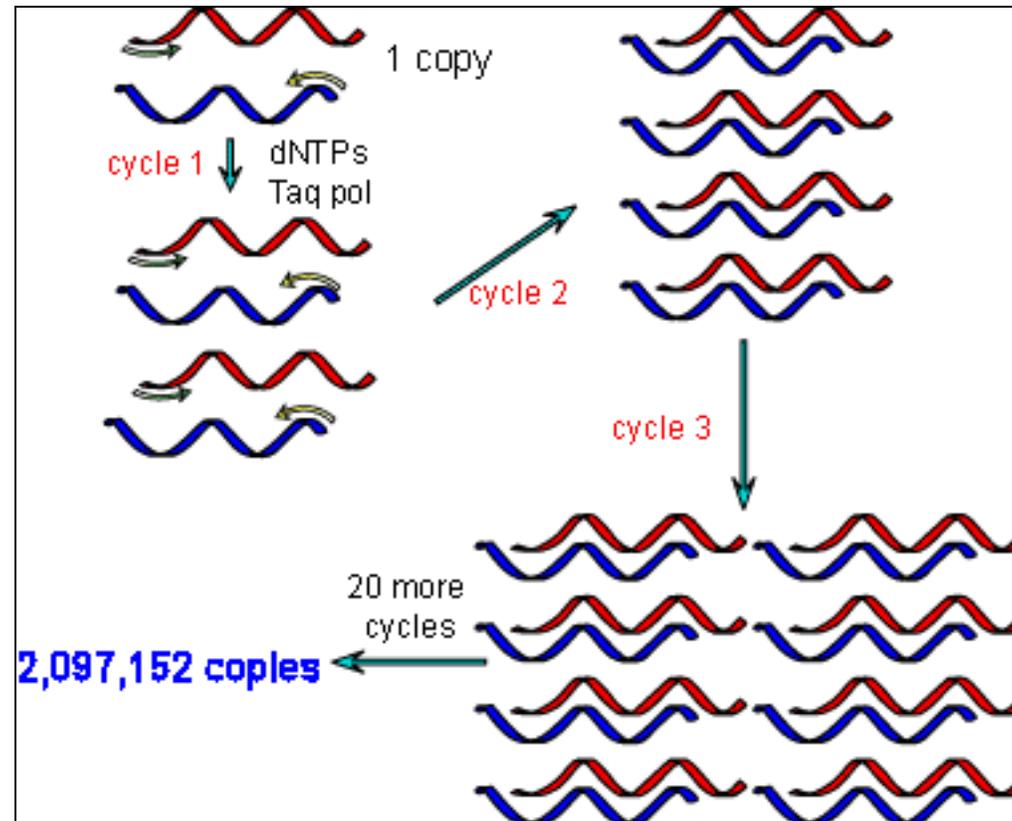
→ **IBRIDAZIONE** del genoma con sonde nucleotidiche DNA o RNA, marcate (con sostanze radioattive, o chemiluminescenti o coniugate a gruppi evidenziabili mediante saggi enzimatici).



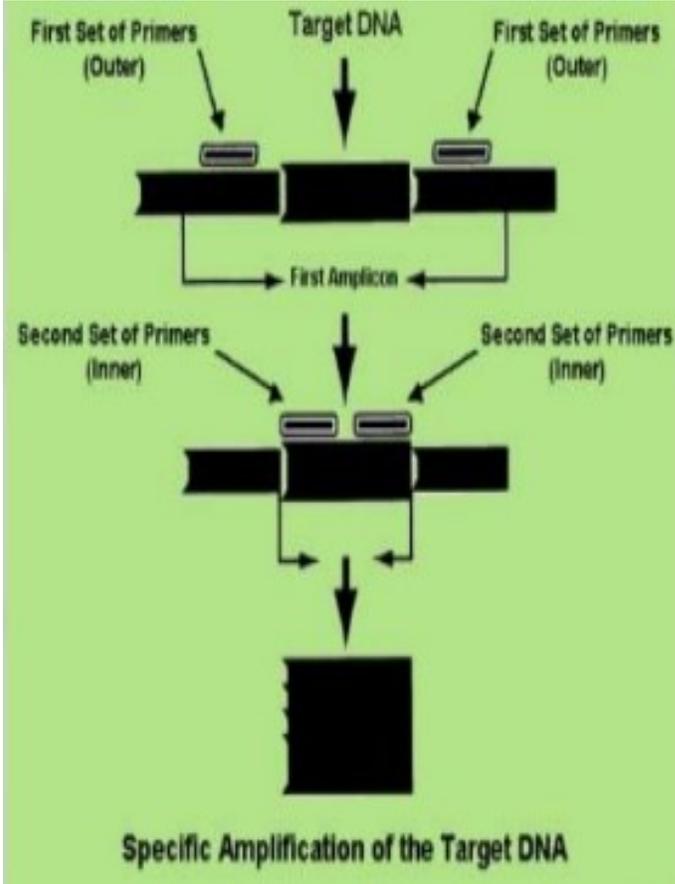
Ibridazione “in situ”: cellule dei tubuli renali vengono ibridate direttamente su vetrino con una sonda di DNA specifica per il CMV, opportunamente marcata.

→ **PCR AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI = reazione di polimerizzazione a catena. Consente di sintetizzare sequenze di DNA in vitro.**

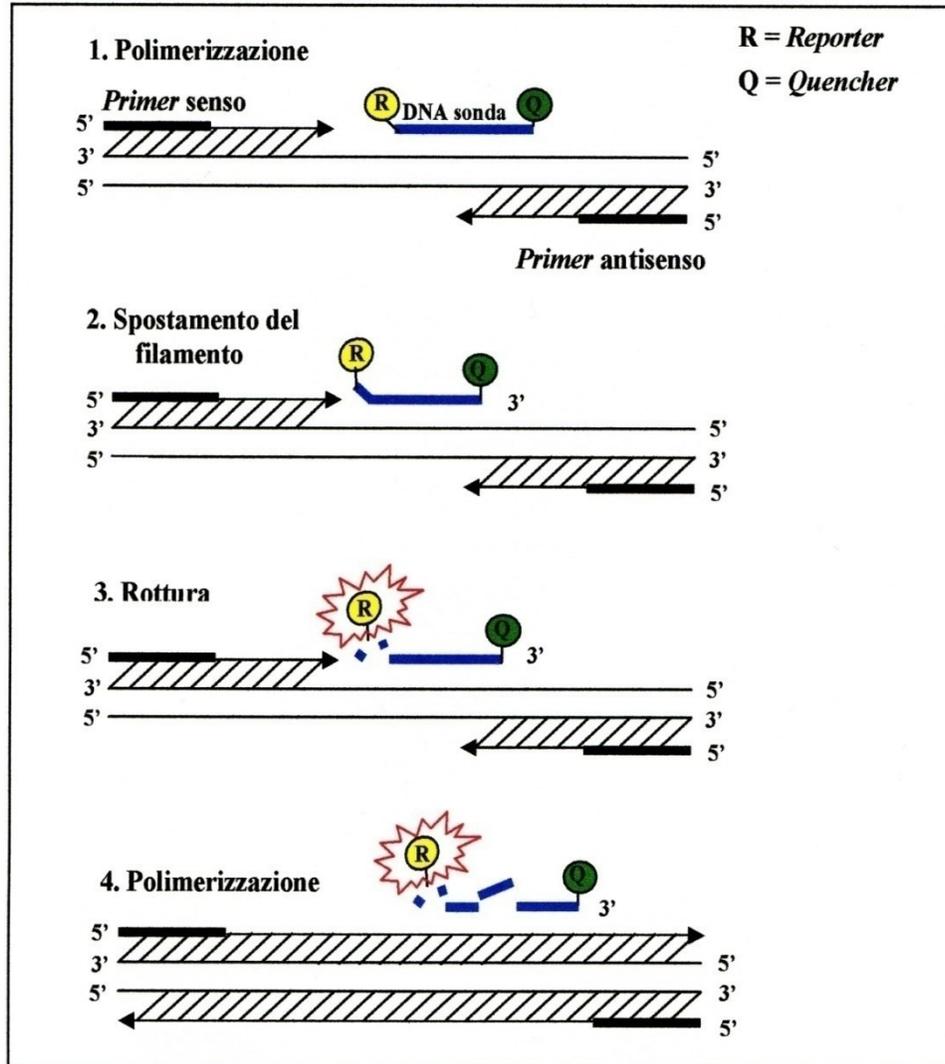
Si utilizzano corte sequenze di oligonucleotidi (primers) che ibridano con l'inizio e la fine del frammento di DNA che si vuole amplificare. Le due eliche di DNA vengono separate mediante calore. Ogni elica costituisce il bersaglio per un primer. La Taq polimerasi (una DNA polimerasi che funziona ad alte temperature) riconosce il primer ibridato al bersaglio e sintetizza un filamento di DNA complementare alla sequenza bersaglio, così si sintetizza un nuovo filamento di DNA, che viene a sua volta amplificato



NESTED PCR



PCR quantitativa: real time PCR



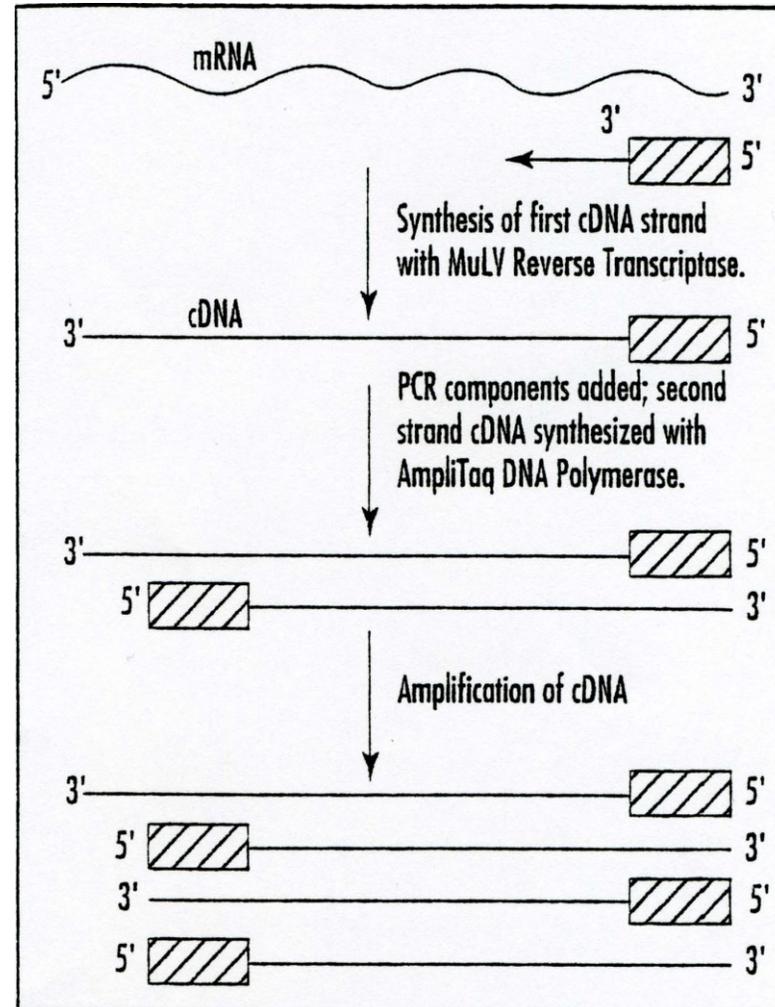
Si utilizza una sonda, legata a 2 coloranti fluorescenti: reporter e quencher. L'estremità 3' è bloccata, così non può estendersi durante la PCR. Quando la sonda è ibridata al bersaglio, l'emissione del reporter è bloccata dal quencher.

Si esegue una normale reazione di PCR, con primers specifici. Durante l'estensione, la sonda viene spiazzata dalla Taq polimerasi

La Taq polimerasi ha anche attività esonucleasica, e taglia il colorante reporter dalla sonda

Separato dal quencher, il reporter emette fluorescenza in quantità proporzionale all'amplificato che viene prodotto. La lettura della fluorescenza è immediata.

PCR su RNA: REVERSE TRANSCRIPTION PCR



Schema della reazione di rtPCR

ACCERTAMENTO INDIRECTO

Mettendo a contatto un siero immune contro un antigene (Atg) con opportune diluizioni dell'Atg stesso, si ottiene la formazione di un immunocomplesso formato da Atg+anticorpo (Atc) specifico. Per “reazioni sierologiche” si intendono tutte quelle tecniche che evidenziano la formazione di immunocomplessi specifici. La valutazione delle reazioni sierologiche è in alcuni casi prevalentemente qualitativa, in altri casi il criterio utilizzato è semiquantitativo, e permette di valutare la concentrazione degli Atc presenti nel siero in esame. Tale concentrazione viene espressa come titolo della reazione, definito come la massima diluizione del siero alla quale sia ancora apprezzabile la formazione dell'immunocomplesso.

LE PRINCIPALI REAZIONI SIEROLOGICHE SONO:

precipitazione
agglutinazione
fissazione del complemento
neutralizzazione
immunofluorescenza
RIA
ELISA

Le classi di immunoglobuline

IgG



IgE



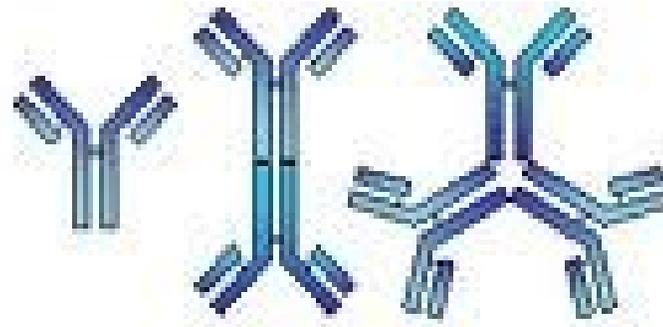
IgD



IgM



IgA



E' necessario analizzare 2 prelievi: uno all'inizio della malattia, uno dopo circa 15 giorni. Si hanno indicazioni diagnostiche se il titolo di anticorpi è aumentato significativamente.

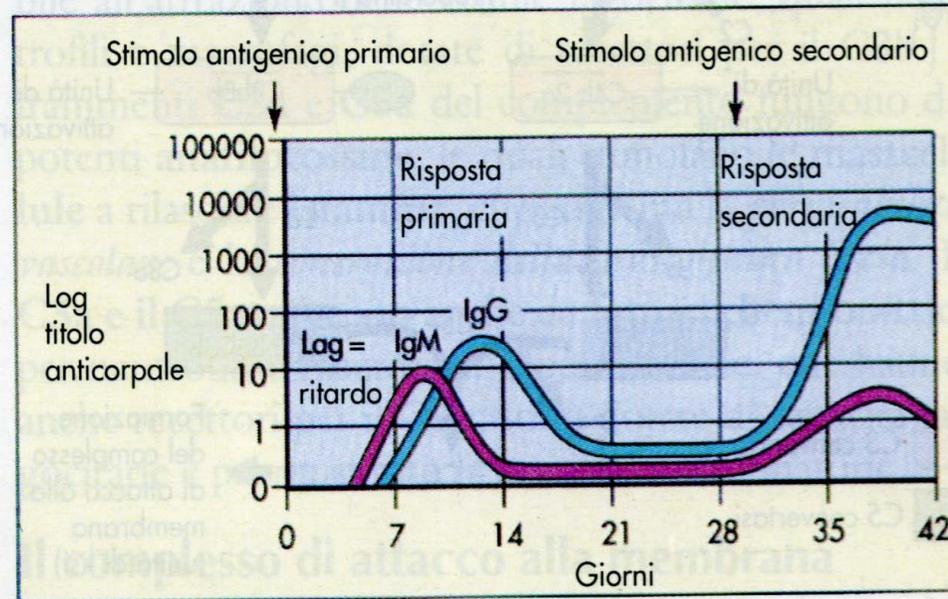
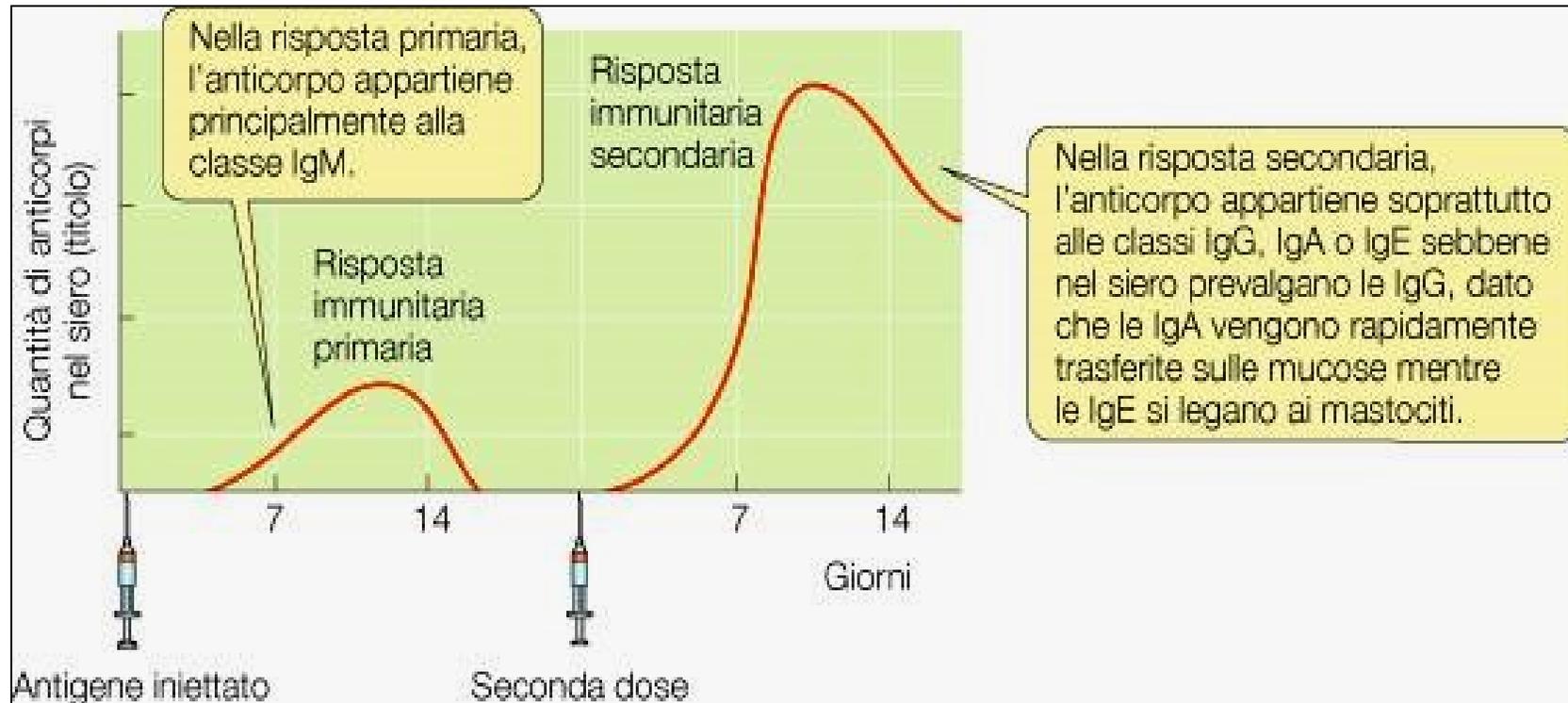


FIGURA 12-7 Fasi della risposta immunitaria. la risposta primaria compare dopo un periodo di latenza (ritardo = "lag"). La risposta di tipo IgM è la risposta più precoce. La risposta secondaria (risposta anamnestic) raggiunge titoli più elevati, dura più a lungo ed è prevalentemente una risposta di tipo IgG.

Tipico profilo sierologico dopo una infezione acuta



Criteri per diagnosticare una infezione primaria:

- Aumento di almeno 4 volte del titolo di IgG
- Presenza di IgM
- Sieroconversione

Criteri per diagnosticare una reinfezione:

- Aumento di almeno 1 volta delle IgG fra siero acuto e siero convalescente
- Assenza o lieve aumento di IgM

Problemi della sierologia

- Tempo necessario per avere siero acuto e siero convalescente.
- Infezioni subcliniche o lievi non sempre danno risposte umorali rilevabili.
- Microrganismi fra loro correlati possono dare reazioni crociate dando falsi risultati positivi.
- Pazienti immunocompromessi spesso hanno risposte assenti o ridotte.
- Pazienti che hanno ricevuto di recente trasfusioni possono dare false risposte positive, per il trasferimento passivo di anticorpi.

Utilità dei risultati sierologici

L'utilità e la significatività dipendono dall'agente infettante in questione:

In alcuni casi, la comparsa di sintomi coincide con lo sviluppo di anticorpi verso quel determinato agente infettivo. La presenza di IgM o un aumento delle IgG indicano infezione attiva.

Altri danno malattia prima della comparsa di anticorpi. In questi casi la diagnosi è retrospettiva e quindi non utile clinicamente.

Ci sono virus che danno malattia mesi/anni dopo la sieroconversione (HIV, virus della rabbia). In questi casi la presenza di anticorpi è sufficiente per fare diagnosi definitiva.