

METODI BIOCHIMICI

In microbiologia saggiando i prodotti chimici finali di processi enzimatici e rivelando la scomparsa di alcune sostanze dal terreno di coltura è possibile stabilire il profilo enzimatico di una specie microbica.

Usati per l'identificazione dei microrganismi dopo l'isolamento e per la loro differenziazione da specie affini;

- Misura di specifiche attività metaboliche del microrganismo ⇒ identificazione del microrganismo target.

- Tali caratteristiche possono riguardare:

- la determinazione delle sorgenti di energia, di carbonio e azoto;
- la determinazione dei prodotti derivanti dall'utilizzazione di composti azotati;
- la sensibilità a sostanze antimicrobiche;
- la capacità di fermentare i carboidrati.

Praticamente i microrganismi vengono differenziati in base ai prodotti finali che formano, come acidi organici (acido lattico, acetico, e butirrico), composti neutri (alcol etilico, acetone, alcol butilico) e diversi gas (metano, H₂, CO₂).

Le specie batteriche possono essere differenziate anche in base alle loro capacità proteolitiche, cioè in base alla capacità di degradare proteine, come ad esempio la gelatina, e di utilizzare amminoacidi e peptidi che ne derivano per produrre energia.

METODI BIOCHIMICI

Test biochimici convenzionali:

Si utilizzano terreni non selettivi differenziali, che contengono composti su cui agiscono gli enzimi implicati nello specifico processo metabolico. In genere, il risultato dell'attività enzimatica, è accompagnato da modificazioni cromatiche del substrato.

Colture in liquido o colonie isolate su substrati agarizzati mescolati con reagenti specifici in substrati adatti;



Incubazione della miscela di reazione



Produzione di specifici metaboliti messi in evidenza dalla loro reazione con i reagenti

Tabella 10. Saggi biochimici più comuni per l'identificazione batterica

1. Idrolisi degli zuccheri (glucosio, saccarosio, lattosio)
2. Produzione dell'enzima catalasi (scinde il perossido di idrogeno in ossigeno e acqua). Utile per la differenziazione degli stafilococchi (+) dagli streptococchi (-)
3. Utilizzazione del citrato come sola fonte di carbonio
4. Test per verificare la presenza di coagulasi (l'enzima trasforma il fibrinogeno in fibrina): gli stafilococchi patogeni sono positivi
5. Produzione di decarbossilasi e deaminasi (lisina, ornitina, arginina)
6. Produzione di idrogeno solforato H_2S
7. Produzione di indolo
8. Riduzione dei nitrati
9. Produzione di ossidasi
10. Produzione di proteinasi
11. Produzione di ureasi
12. Test di Voges-Proskauer (evidenzia l'acetil-metilcarbinolo prodotto durante la fermentazione del glucosio nella via del glicol butenico)

Test biochimici semplici

Test della catalasi, enzima che favorisce la scissione del perossido d'idrogeno in ossigeno e acqua.

Procedura:

Trasferimento di una porzione di colonia su un vetrino




Aggiunta di una goccia di perossido di idrogeno

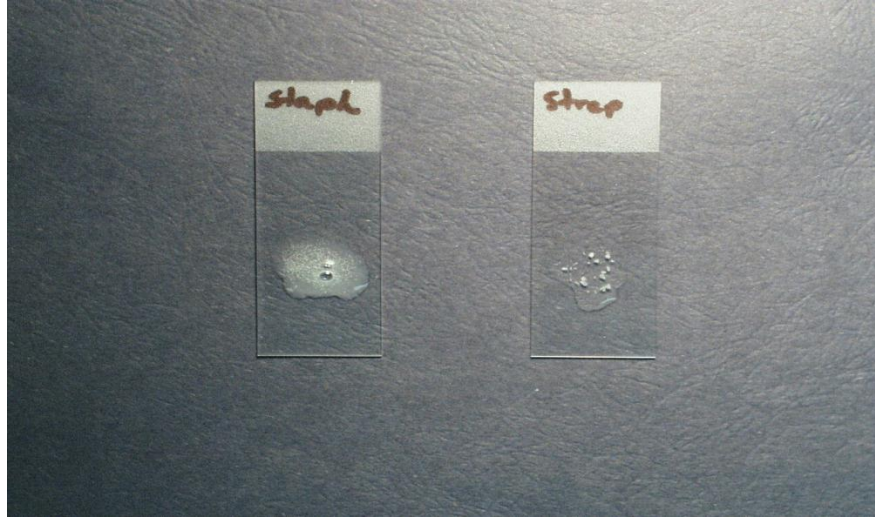


Osservazione della formazione di bolle di gas



Presenza di bolle di gas = ceppi catalasi-positivi

sospetta colonia
di *Stafilococco* + H₂O₂  catalasi → effervescenza



Il perossido di idrogeno è comunemente formato per via biochimica durante i processi respiratori. Quasi tutti i microrganismi che crescono aerobicamente producono piccole quantità di perossido. Essi sono però capaci di neutralizzarlo mediante l'intervento della catalasi.

Risposta di alcuni batteri:

Bacillus, *Micrococcus*/*Staphylococcus* = +;

Clostridium, *Streptococcus* = -

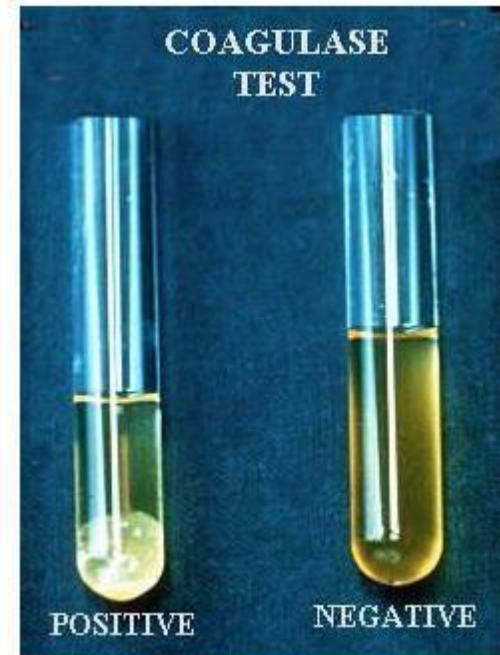
Test di attività della COAGULASI

Per l'identificazione di *S. aureus*

I batteri che producono questo enzima lo utilizzano come meccanismo di difesa.

In presenza di un fattore plasmatico le coagulasi convertono il fibrinogeno in fibrina, coagulano l'area di plasma intorno ad essi, proteggendo così il batterio dalla fagocitosi

Il test è effettuato inoculando i batteri, in presenza di plasma, a 37°C per qualche ora, la formazione di un coagulo indica la positività al test



A sin. *S. aureus*

A dx: Altre *Staphylococcus* spp.

Test biochimici semplici

Reazioni di fermentazione dei carboidrati

Le trasformazioni di determinati carboidrati in ambiente anaerobio \Rightarrow formazione finale di acido piruvico \Rightarrow abbassamento del pH.

Inoculo di un terreno che contiene uno zucchero e un indicatore di pH \Rightarrow capacità di riconoscere l'abilità fermentativa del microrganismo verso quello zucchero, caratteristica di ogni specie.

2° esempio

Inoculo di isolati da alimenti appartenenti al genere *Salmonella* su substrato TSI (triple sugar iron) per identificazione per via biochimica



Se si produce H_2S , si ha la reazione dell' H_2S con $\text{FeSO}_4 \Rightarrow$ formazione di precipitato nero



Produzione di un metabolita (H_2S) indice della presenza di un dato microrganismo (*Salmonella*)

Test di determinazione dell'attività β -galattosidasica

La β -galattosidasi è un enzima intracellulare che idrolizza il legame b-glicosidico del lattosio, il quale entra nella cellula ad opera della galattosio-permeasi.

L'attività b-galattosidasica è legata ad enzimi inducibili, cioè prodotti solo in presenza di un substrato specifico.

I batteri ***che fermentano*** il lattosio posseggono entrambi gli enzimi ed idrolizzano rapidamente il lattosio.

I batteri ***non fermentanti*** il lattosio ne sono sprovvisti.

I batteri ***tardo-fermentanti*** il lattosio mancano della permeasi, ma posseggono la b-galattosidasi, la cui presenza può essere determinata aggiungendo al terreno di coltura un substrato analogo al Lattosio, l'o-nitrofenil b-d-galattopiranoside (ONPG), un composto simile al lattosio che però entra nella cellula per diffusione osmotica. Se il batterio ha attività b-galattosidica, l'ONPG incolore verrà idrolizzato, producendo l'ONP di colore giallo

I batteri ***non fermentanti*** il lattosio sono privi di entrambi gli enzimi e non idrolizzano l'ONPG.

Test biochimici avanzati

Recentemente le caratteristiche biochimiche sono state sfruttate per la messa a punto di **sistemi miniaturizzati ed informatizzati di identificazione**, con sviluppo di tecniche biochimiche rapide ed elaborate, che presentano i seguenti vantaggi:

⇒ identificazione dei microrganismi senza necessità di avere conoscenze e attrezzature richieste per un'indagine tassonomica convenzionale;

⇒ identificazione in tempi più rapidi (2-3 giorni) di quelli richiesti dalle tecniche tassonomiche convenzionali.

Aziende specializzate hanno messo a punto una serie di sistemi che mirano ad identificare specifici Gruppi o specie microbici.

Ad esempio esistono sistemi per l'identificazione di:

- Gruppo dei Batteri lattici
- Famiglia delle *Enterobacteriaceae*
- Genere *Streptococcus*
- Genere *Staphylococcus*
- Altri

Sistemi miniaturizzati di identificazione

Esistono sistemi biochimici “multitest” per specifici gruppi di microrganismi e prodotti da aziende differenti

Esempio: “*API system*” (metodo manuale)

- Utilizzo di piastre costituite da pozzetti nei quali vengono inserite piccole quantità di substrati specifici
 - Aggiunta di una sospensione del microrganismo in esame nel substrato contenuto nei pozzetti
 - Incubazione delle piastre
 - Osservazione delle reazioni e registrazione dei risultati
 - Confronto dei risultati con tabelle
 - Analisi mediante programmi computerizzati
- } **Identificazione degli isolati**

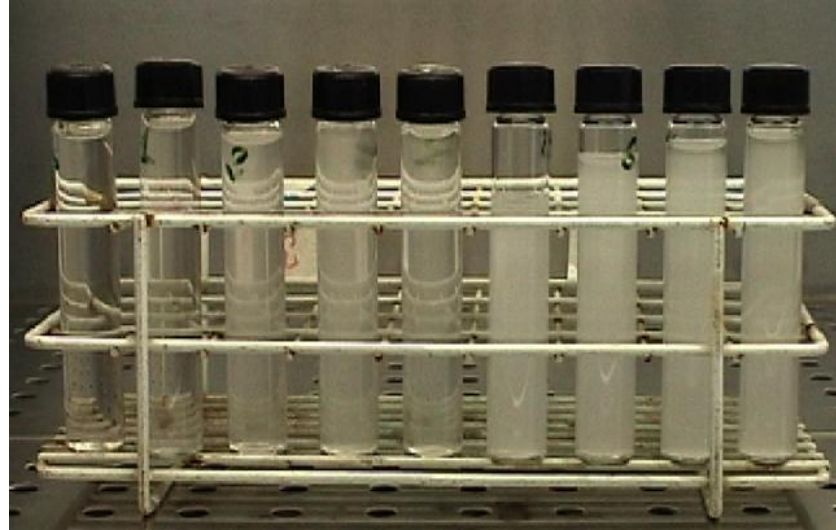
Preparazione della sospensione cellulare



Coltura pura



Sospensione cellulare



scala per apprezzare la torbidità di una coltura batterica



STANDARD McFARLAND

Usati per standardizzare il numero approssimativo di batteri in una sospensione liquida confrontando la torbidità della sospensione test con quella dello standard McFarland.

Costituito da una soluzione chimica di cloruro di bario e acido solforico, che reagendo tra loro originano un precipitato fine, solfato di bario.

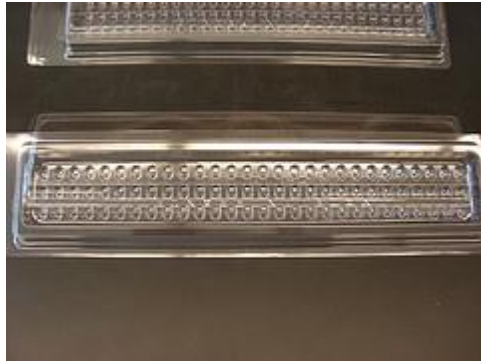
Quando shakerato bene, la torbidità di uno standard McFarland è visivamente paragonabile a una sospensione batterica a concentrazione nota, secondo i valori riportati in tabelle di riferimento.

Cat No.	McFarland Standard	1% BaCl ₂ (mL)	1% H ₂ SO ₄ (mL)	Approximate Bacterial Suspension / mL
TM50	0.5	0.05	9.95	1.5 x 10 ⁸
TM51	1.0	0.10	9.90	3.0 x 10 ⁸
TM52	2.0	0.20	9.80	6.0 x 10 ⁸
TM53	3.0	0.3	9.7	9.0 x 10 ⁸
TM54	4.0	0.4	9.6	1.2 x 10 ⁹
TM55	5.0	0.5	9.5	1.5 x 10 ⁹
TM56	6.0	0.6	9.4	1.8 x 10 ⁹
TM57	7.0	0.7	9.3	2.1 x 10 ⁹
TM58	8.0	0.8	9.2	2.4 x 10 ⁹
TM59	9.0	0.9	9.1	2.7 x 10 ⁹
TM60	10.0	1.0	9.0	3.0 x 10 ⁹



ASM MicrobeLibrary © Hudzicki

Preparazione della galleria



Incubazione della galleria a:
Temperatura ottimale del
microrganismo da identificare
(30-37°C)
Tempo: 48-72 ore

**Inoculo della coltura batterica
in pozzetti (minitubi)**

Il kit commerciale **API50CH** della BioMérieux (Francia) consente lo studio del metabolismo dei carboidrati nei batteri.

Questo kit è composto da 50 microtubi, ciascuno suddiviso in:

- 1. Zona anaerobica** (il tubo), per gli studi di **fermentazione**;
- 2. Zona aerobica** (la cupola) per gli studi di **assimilazione e ossidazione**.

Il 1° microtubo non contiene substrato (controllo negativo);

Gli altri contengono ognuno una quantità definita di una \neq fonte di carbonio sotto forma liofilizzata



La galleria può essere utilizzata per studiare una delle tre vie di utilizzazione del carbonio:

- **Assimilazione**, evidenziata dallo sviluppo in cupola;
- **Ossidazione** con produzione di acidi, evidenziata dal viraggio dell'indicatore in cupola;
- **Fermentazione** con produzione di acidi, evidenziata dal viraggio dell'indicatore nel tubo.

In funzione del tipo di metabolismo da rilevare e del gruppo di microrganismi in studio, la galleria API50CH deve essere inoculata con un idoneo terreno, fornito insieme alla galleria:

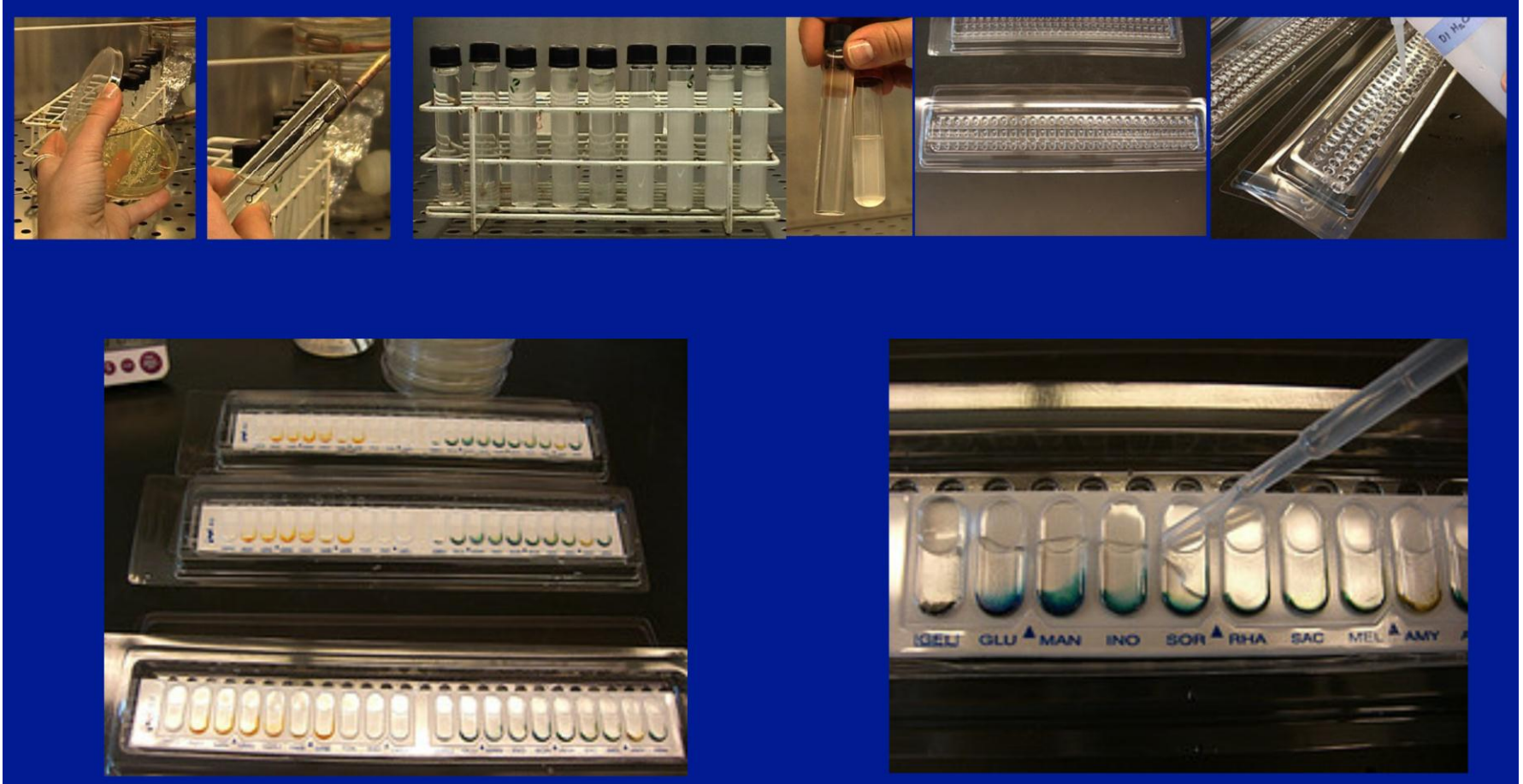
- API50CHL (per lattobacilli);
- API50CHS (per streptococchi);
- API50CHE (per enterobatteri e Gram-);
- API50CHB (per aerobi sporigeni).

**Annotazione dei risultati e
identificazione mediante software o
Bergey's**

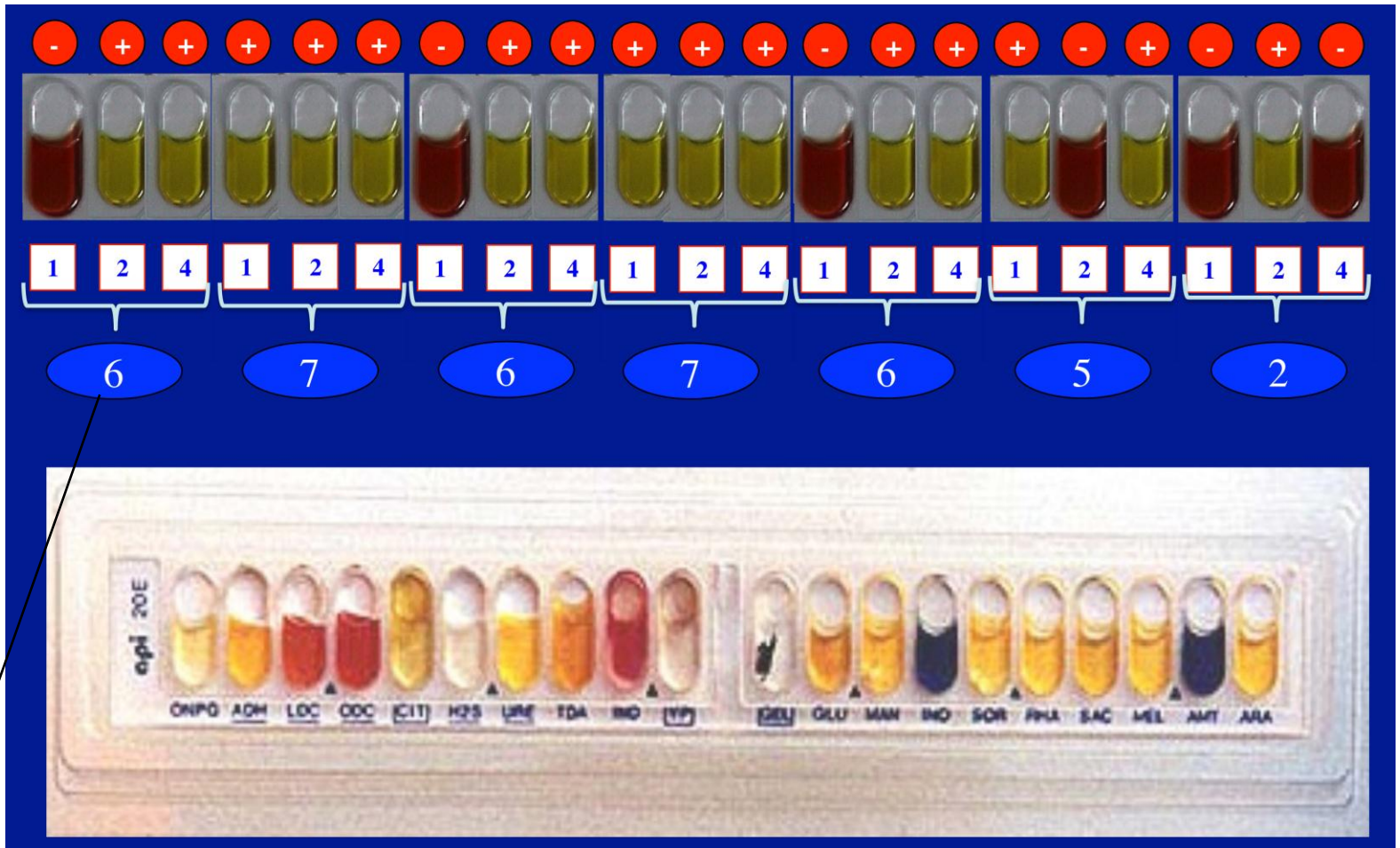


Esistono sistemi biochimici "multitest" per specifici gruppi di microrganismi

Enterobacteriaceae



I risultati dei 20 test vengono convertiti in un profilo di 7 cifre

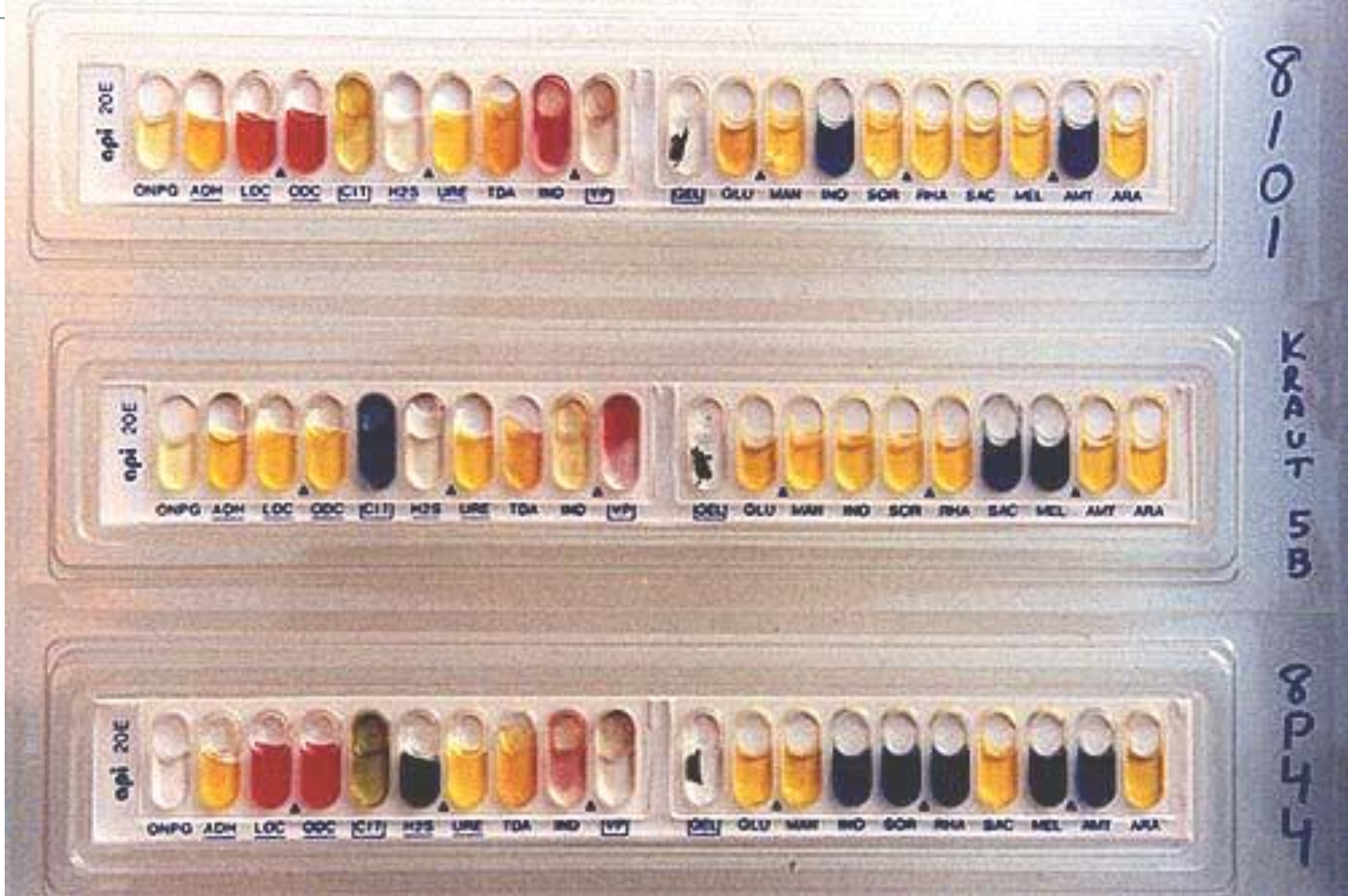


Somma dei numeri
corrispondenti ai pozzetti
positivi

Staphylococcus spp.

Dopo incubazione delle gallerie a temperature e per tempi caratteristici del microrganismo da identificare, si annotano i risultati su un'apposita scheda (in genere si tratta di rilevare, direttamente o dopo aggiunta di particolari reattivi, cambiamenti di colore del substrato come conseguenza dell'attività biochimica del microrganismo).





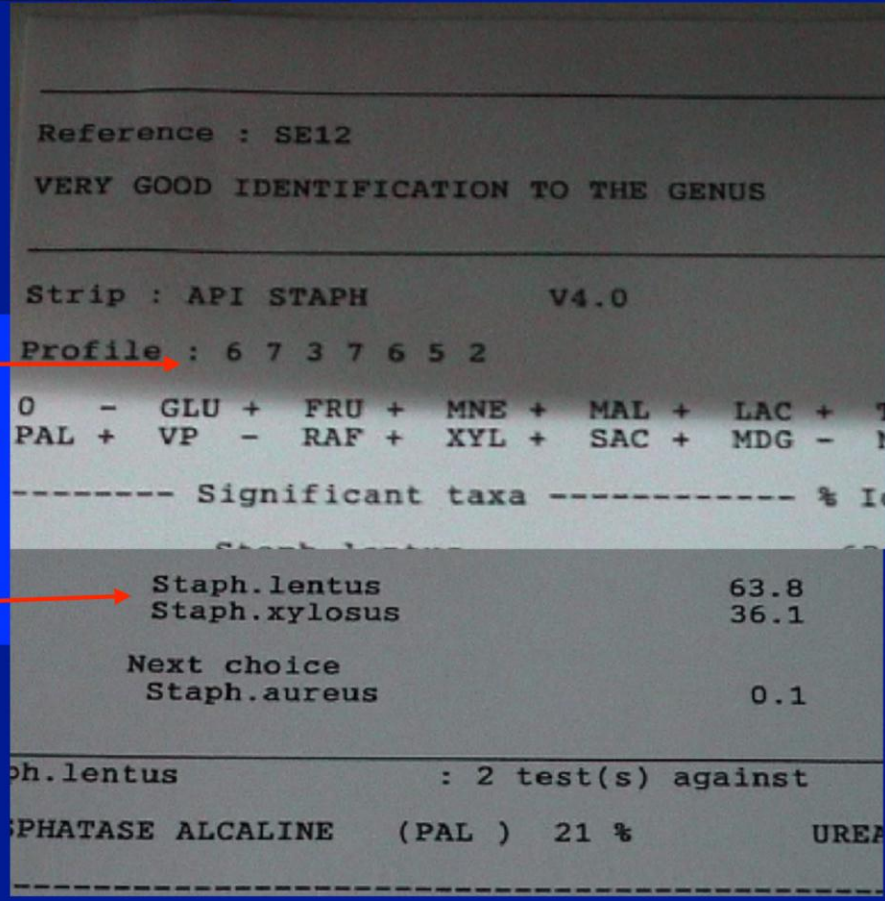
culture no.	O N P G	A D H	L D C	O D C	C I T	H 2 S	U R E	T D A	I N D	V P	G E L	G L U	M A N	I N O	S O R	R H A	S A C	M E L	A M Y	A R A	identification
8101	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
5B	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>Enterobacter agglomerans</i>
8P44	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	<i>Edwardsiella hoshinae</i>



Il profilo numerico ottenuto

viene confrontato con i profili numerici di specie note: in tal modo è possibile risalire

al nome del batterio in esame



ENTEROTUBE

Identificazione rapida delle *Enterobacteriaceae* mediante l'esame simultaneo di 15 differenti caratteristiche biochimiche:

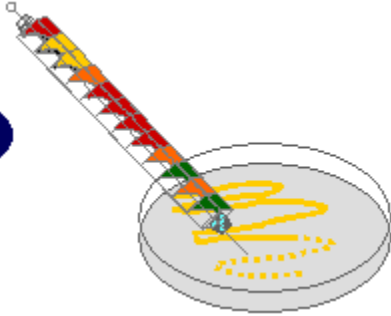
- fermentazione del destrosio e produzione di gas
- decarbossilazione della lisina
- decarbossilazione dell'ornitina
- fermentazione del triptofano e produzione di H₂S
- fermentazione dell'adonitolo
- fermentazione del lattosio
- fermentazione dell'arabinosio
- fermentazione del sorbitolo
- fermentazione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



I fase

Metodica

1



Accanto alla fiamma del bunsen svitare i cappucci dell'enterotube e con la punta dell'ago prelevare una colonia isolata.

2



Inoculare l'enterotube ruotando ed estraendo l'ago attraverso tutti gli scomparti del tubo.

3



Reinserire l'ago fino alla tacca e poi spezzarlo piegandolo. La parte di ago che rimane all'interno assicura l'anaerobiosi

4



Con lo spezzone dell'ago perforare la pellicola di plastica in corrispondenza dei fori degli ultimi 8 scomparti al fine di creare un ambiente aerobio. Riavvitare i tappi.

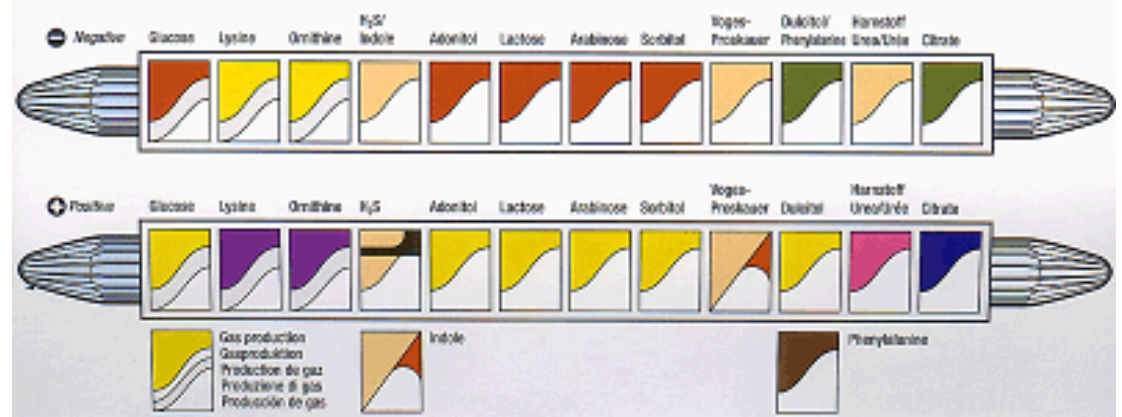
5



Incubare a 35-37°C per 20-24 h possibilmente in posizione verticale su un portaprovette con lo scomparto del destrosio rivolto verso l'alto.

II fase

1 Registrare le reazioni (+ o -)



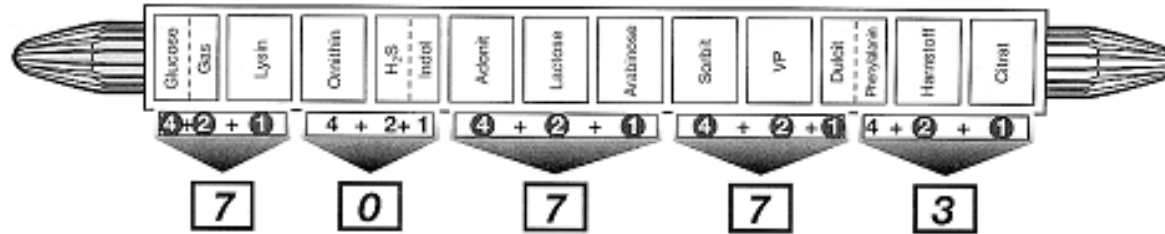
e riportarle nella tabella



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

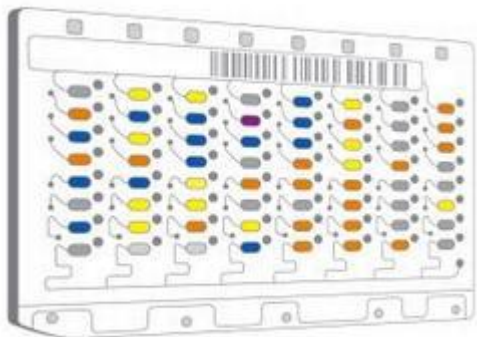
III fase

- 1 Per identificare il batterio in esame confrontare i dati ottenuti con la tabella per l'identificazione biochimica degli enterobatteri.
- 2 In alternativa, utilizzare i foglietti di identificazione allegati alla confezione di Enterotube, contrassegnando per ogni reazione positiva i numeri corrispondenti. Per esempio:



- 3 Sommare i numeri contrassegnati, come indicato sopra. Il numero a 5 cifre ottenuto (ID value), consente la rapida identificazione del batterio in esame utilizzando il sistema di identificazione con codifica computerizzata.

Metodo automatizzato: VITEK (BioMérieux)



Le card VITEK® 2 hanno la forma e le dimensioni di una carta da gioco e contiene **micropozzetti** con substrati per l'identificazione.

Due tipologie di card: per la identificazione (30 pozzetti/card contenenti dei substrati biochimici in forma disidratata) e l'antibiogramma.

Le card VITEK® 2 offrono un'importante innovazione che è poco costosa, facile da utilizzare e flessibile.

Non sono richiesti reagenti addizionali, riducendo così il rischio di omissione o di errore.

Possibilità di generare reports statistici epidemiologici (es. frequenza di antibiotico-resistenze)

Identificazione rapida e accurata a livello di specie di oltre 350 batteri e lieviti clinicamente rilevanti tramite card monouso e indipendenti, da utilizzare con gli strumenti VITEK® 2.

Accuratezza comprovata

Identificazione a partire da **2 ore**

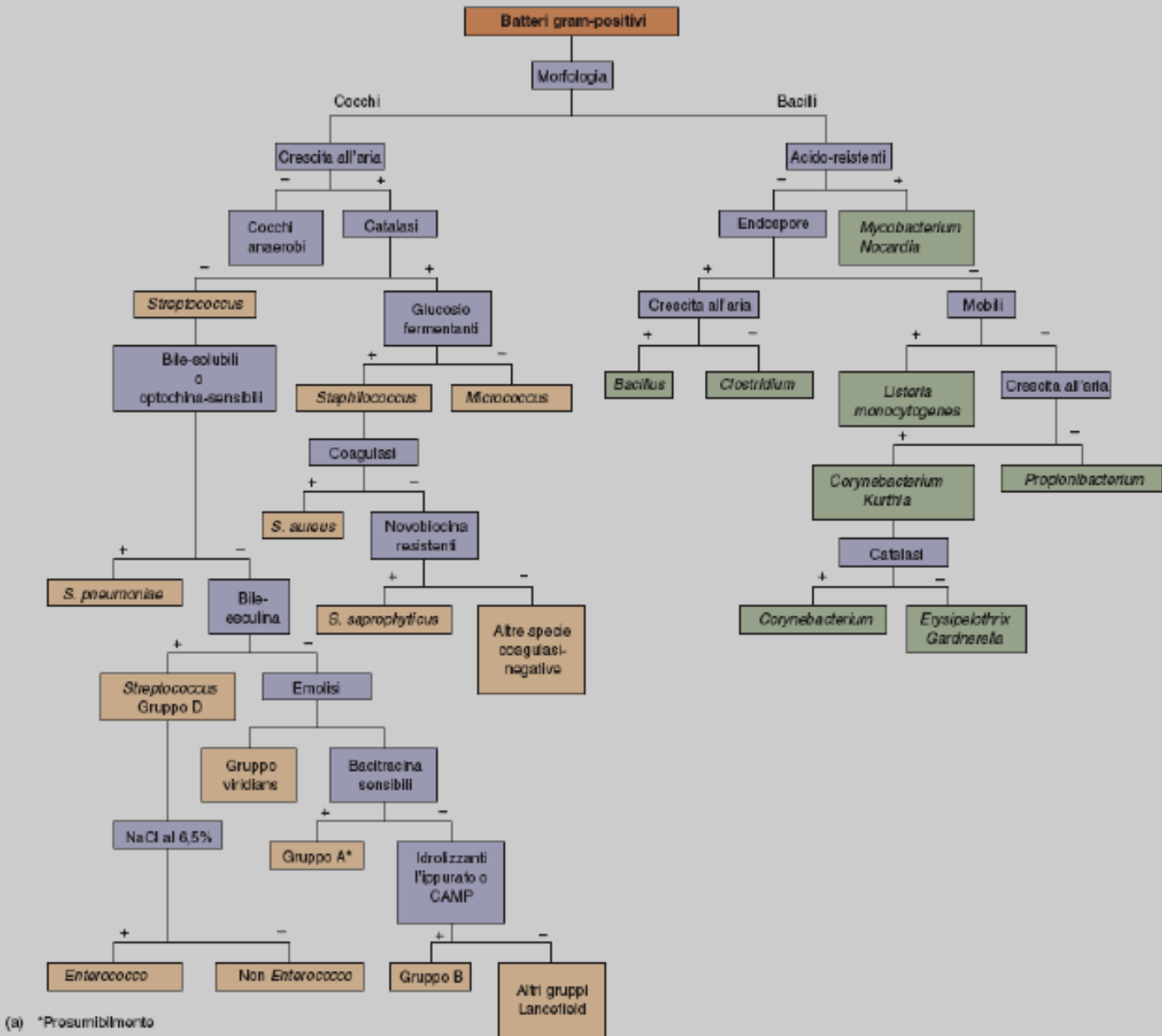
Sicuro: sistema chiuso, monouso e pronto all'uso, senza necessità di aggiungere reagenti

Codici a barre pre-applicati per garantire la massima tracciabilità

Card VITEK® 2 finora disponibili:

- Gram-positivi (GP)
- Gram-negativi fermentanti e non fermentanti (GN)
- Lieviti e microrganismi simili (YST)
- *Bacillus spp.*(BCL)
- batteri anaerobi e corineformi (ANC)
- *Neisseria*, *Haemophilus* e altri batteri Gram-negativi esigenti (NH)





Batteri Gram negativi

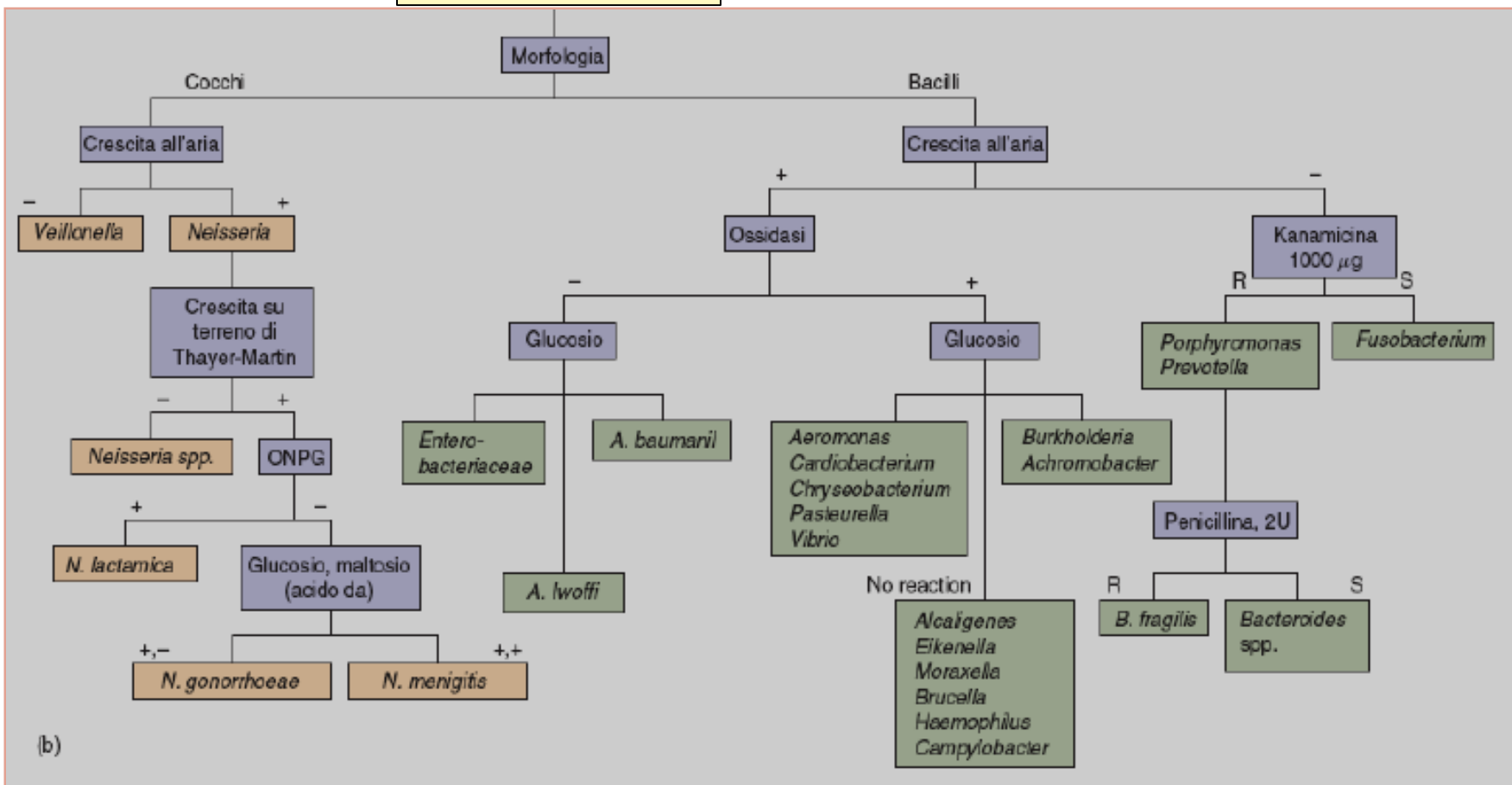


Table 37
Key characters of species of the genus *Saccharomyces*

Species	Fermentation ^a			Assimilation ^a									Growth ^a			Fre ^b	
	Su	Raf	Tr	Carboun source					N source			Cychx 1000	30°C	37°C	Vit- free		
				Su	Ma	Raf	DRi	Eth	DM	Cad	Ety						Lys
<i>Saccharomyces barnettii</i>	+	+	s	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n
<i>S. bayanus</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	v	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>S. castelli</i>	-	-	-	-	-	-	+v	-	-	-	-	-	-	+	v	-	n
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	v	-	-
<i>S. dairensis</i>	-	-	-	-	-	-	v	v	-	-	-	-	-	+	v	-	n
<i>S. exiguus</i>	+	s	+	+	-	+	-	s	-	-	-	-	v	+	-	-	n
<i>S. kluyveri</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	n
<i>S. paradoxus</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>S. pastorianus</i>	v	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>S. rosinii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n
<i>S. servazzii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	n
<i>S. spencerorum</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	n
<i>S. transvaalensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-	+	+	-	n
<i>S. unisporus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	v	-	n

^a Abbreviations: Su, sucrose; Raf: Raffinose; Tr: trehalose; Ma: maltose; D-Ri, D-Ribose; Eth, ethanol;DM, D-mannitol, cad, cadaverine 2HCl; Ety, ethylamine HCl; Lys, L-lysine; Cychx 1000, indicates resistance to 1000 ppm cycloheximide in the medium; Vit-free, growth in vitamin-free medium.

^b Presence of a fructose transport system; n, not determined.

Table 25
Key characters of species of the genus *Hanseniaspora*

Species	Assimilation		Growth		Ascospores	
	Sucrose	Maltose	at 34°C	at 37°C	Shape	Number ^a
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	-	-	-	-	hat	1-4(2)
<i>H. guilliermondii</i>	-	-	+	+	hat	1-4(2)
<i>H. uvarum</i>	-	-	n	-	spherical, warty + equatorial ledge	1-2
<i>H. occidentalis</i>	+	+	n	-	spherical, smooth + equatorial ledge	1-2
<i>H. osmophila</i>	v	+	-	-	spherical, warty	1-2
<i>H. vineae</i>	v	-	+	-	spherical, warty	1-2

^a The numbers in the parentheses refer to the number of spores per ascus most frequently observed

ANTIBIOGRAMMA: cos'è?

Test in vitro eseguito per rilevare la presenza o l'assenza di resistenza di un isolato batterico ad una serie di antibiotici, criterio utile per l'identificazione e la caratterizzazione di isolati batterici.

ANTIBIOGRAMMA: come si fa

- Metodi genotipici : rilevano i geni di resistenza (es.: KPC, *mecA*, *vanA*)
- Metodi fenotipici
 - Qualitativi: “Sensibile”, “Resistente”, “Intermedio”
 - Quantitativi: “MIC”

Si parte sempre da una coltura pura o da una colonia isolata

MIC

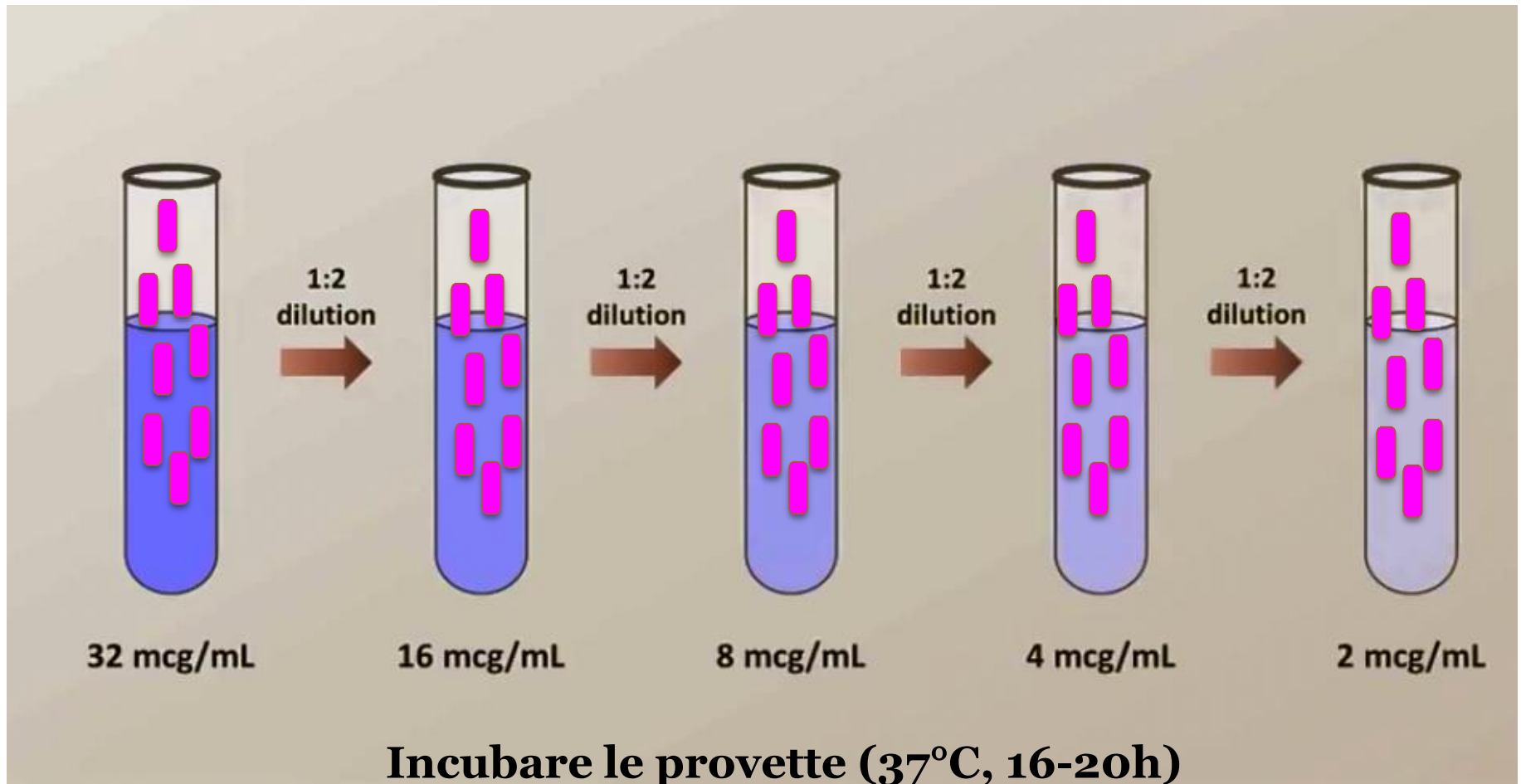
MIC (Minimal Inhibitory Concentration): è una misura quantitativa dell'attività di un antibiotico verso un determinato batterio. Definita come Concentrazione Minima di Antibiotico in grado di inibire, **in condizioni sperimentali prefissate**, ogni segno visibile di crescita del microorganismo

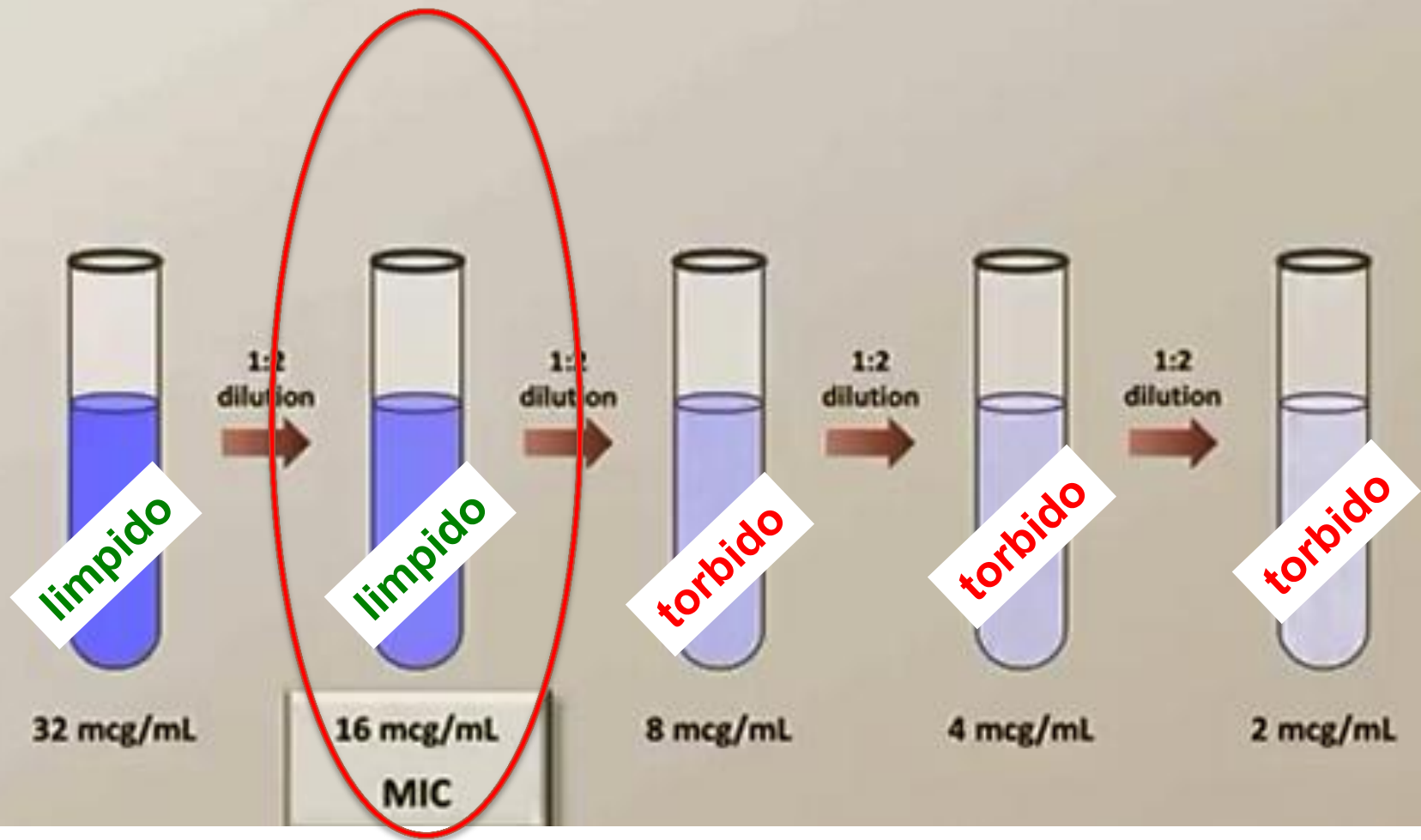
Come si determina:

- Diluizione in brodo – Macrometodo
- Diluizione in brodo - Micrometodo
- E-test (gradient-diffusion)
- Strumenti automatici

Diluizione in brodo – macrometodo

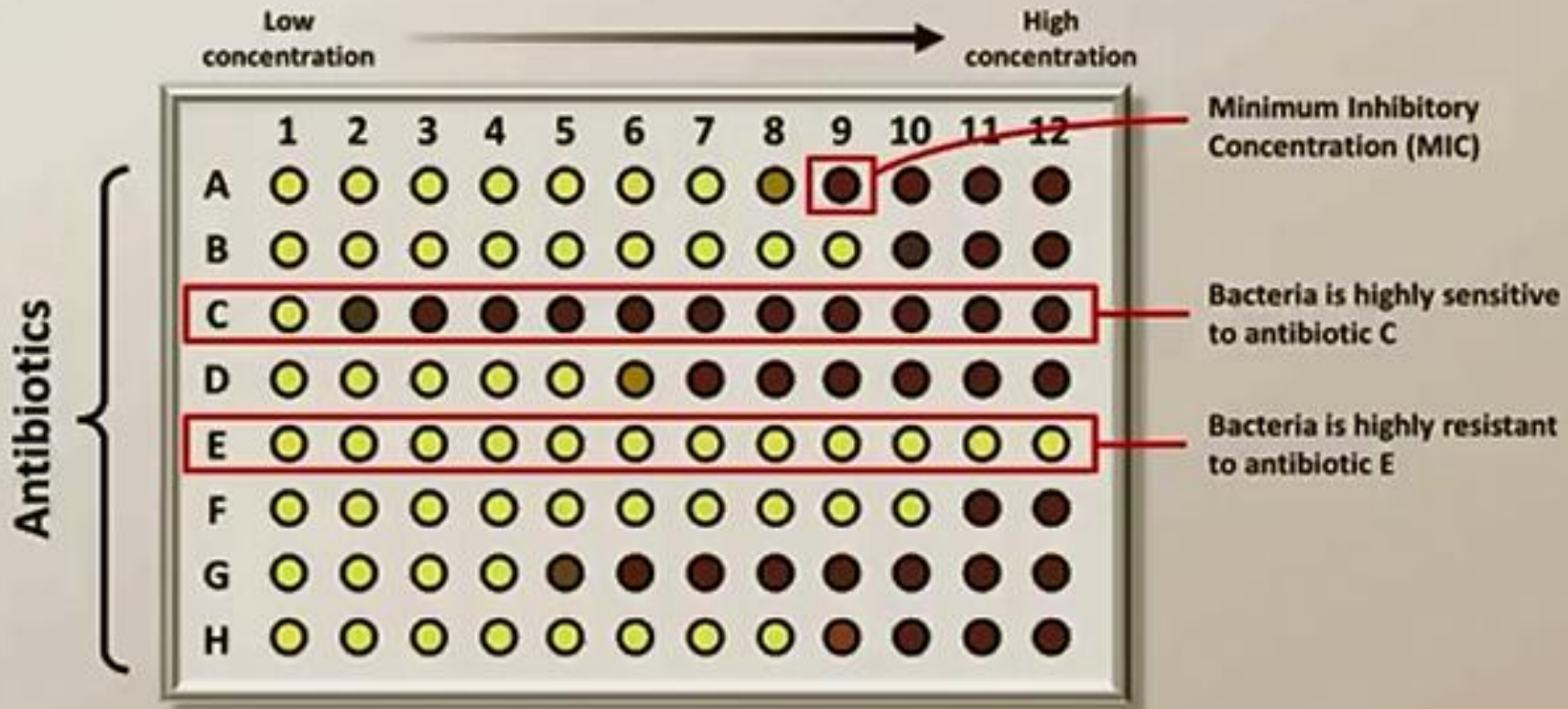
Preparare una serie di provette contenenti terreno con diverse concentrazioni di antibiotico, ed inocularle con quantità convenzionali (5×10^5 cfu/ml) dell'organismo da testare.





La MIC è data dalla concentrazione più bassa di antibiotico che porta ad assenza di crescita dopo 16-20 ore di incubazione.

Diluizione in brodo – micrometodo antibiotici A, B, ... H vs *Staphylococcus aureus*



Antibiogramma per diffusione (Kirby-Bauer)

È un metodo quali-quantitativo, semplice, rapido ed economico, valido per microrganismi aerobi a crescita rapida.

Attualmente il test di diffusione su dischetto più utilizzato è il metodo di Kirby-Bauer, sviluppato agli inizi degli anni '60.

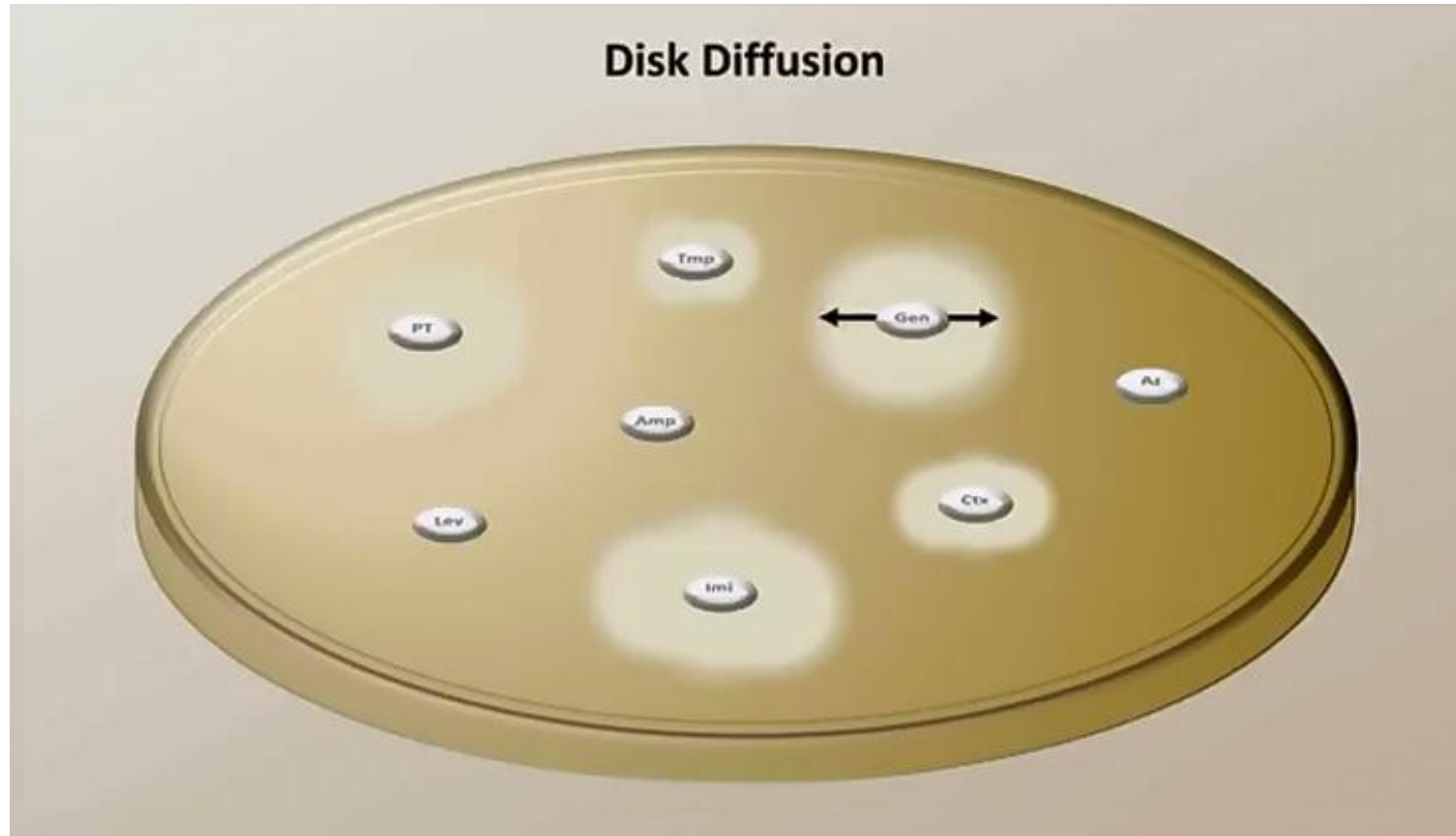
1. Allestire piastre con idoneo terreno solido le quali vengono successivamente inoculate con una quantità di batteri sufficiente a dare uno sviluppo confluyente generando una patina uniforme sul terreno

2. Deposare sulla superficie della piastra, con l'aiuto di una pinzetta sterile, una serie di dischetti di carta assorbente imbevuti con adatte concentrazioni degli antibiotici che si desidera testare. L'antibiotico presente sul disco diffonde in rapporto alla diffusibilità in terreno di coltura

3. Incubare le piastre a 37°C per 18-24 ore.

4. Misurare il diametro degli aloni di inibizione formati per ogni antibiotico.

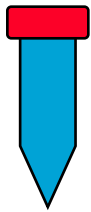
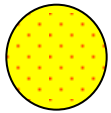
Antibiogramma per diffusione



Misura dell'alone di inibizione

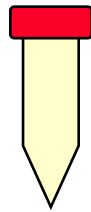
Antibiogramma per diffusione

3-4 COLONIE
IN BRODO

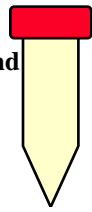


37°C

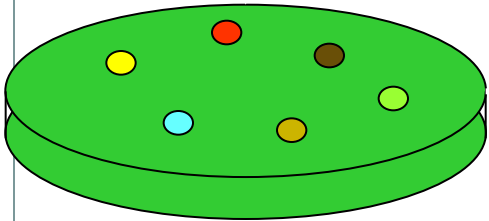
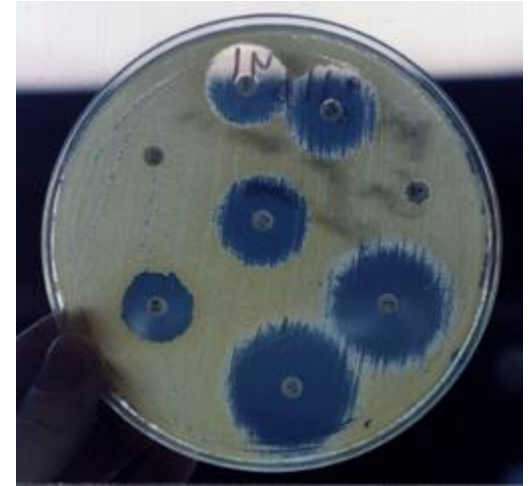
2-3 h



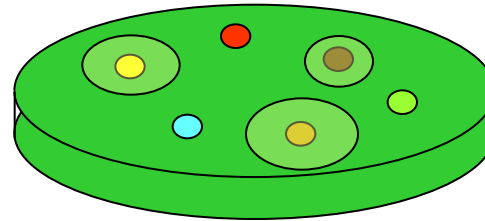
0,5 McFarland



0,1 ml spatolati



37°C 18h



LETTURA ALONI DI
INIBIZIONE ED
INTERPRETAZIONE
DEI RISULTATI

E-test

L'E-test o epsilon test dalla forma dell'alone di inibizione, è un metodo quantitativo per la determinazione della MIC.

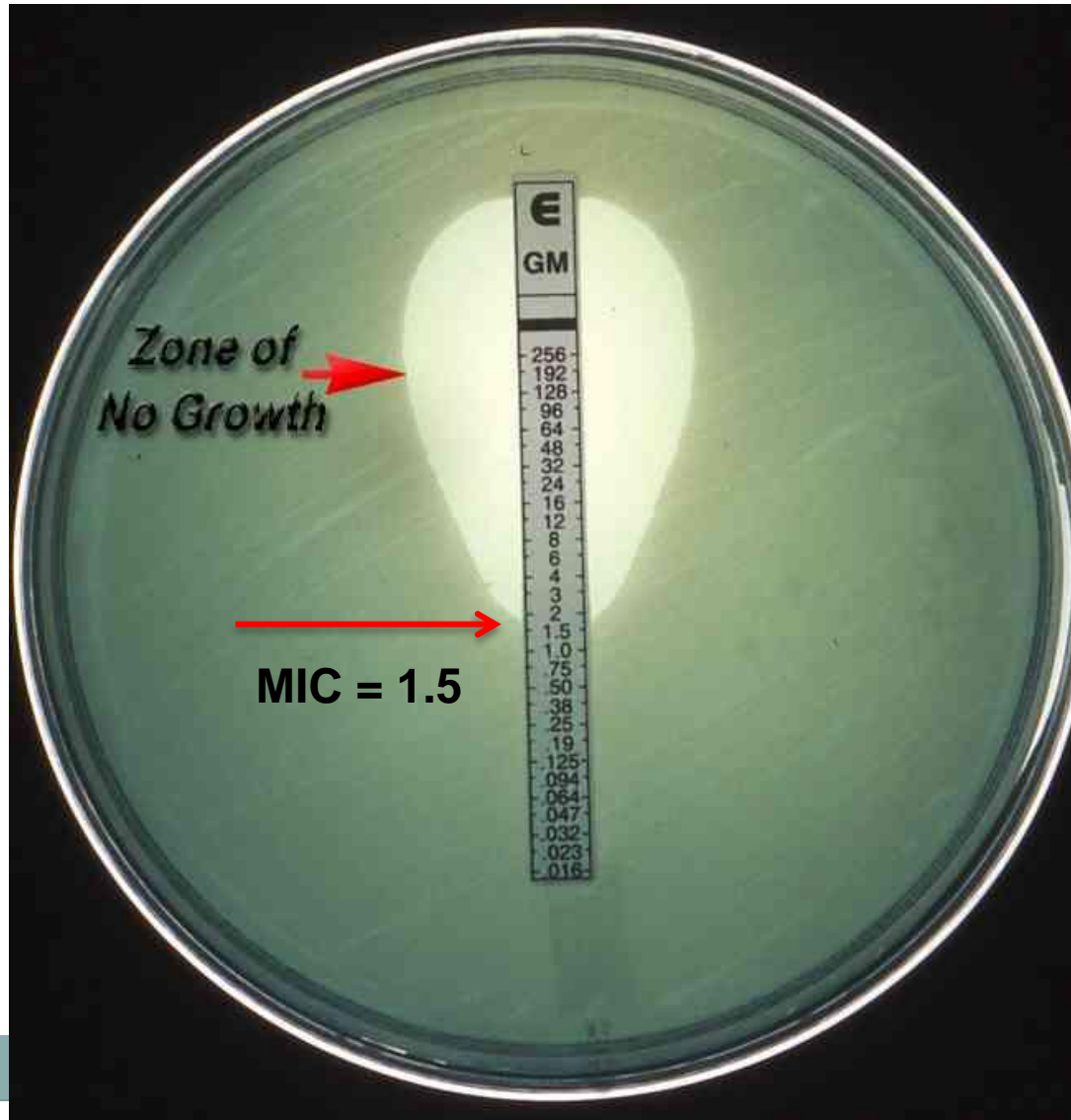
E-test è costituito da strisce di plastica di 5 x 50 mm contenenti un gradiente corrispondente a 15 concentrazioni a raddoppio di antibiotico (in mg/ml). Queste sono variabili a seconda dei diversi antibiotici utilizzati

La tecnica di semina a tutta piastra è analoga a quella dell'antibiogramma per diffusione secondo Kirby-Bauer.

- Deposizione delle strisce antibiotizzate sulla superficie della piastra inoculata
- Incubazione a **37°C per 18-24 ore**. La lettura della MIC si effettua dove la crescita batterica interseca la striscia.
- La lettura della MIC si effettua dove la crescita batterica interseca la striscia.

E-test

ad esempio: gentamicina vs *Pseudomonas* spp



Metodi automatici

Oggi i test di sensibilità agli antibiotici possono essere eseguiti con apparecchiature semi-automatiche in cui i batteri vengono fatti crescere in terreno liquido, in presenza di dosi prefissate degli antibiotici e la lettura dei risultati, eseguita da un fotometro registratore, viene interpretata da un elaboratore elettronico, che fornisce in tal modo il risultato finale.

Ad esempio:

sistema PHOENIX[®] (Becton Dickinson); VITEK2[®] (bioMérieux)