



**TECNICHE DI  
LABORATORIO:  
Identificazione  
microrganismi**

*Prof.ssa Vivian Tullio*



# IDENTIFICAZIONE PRESUNTIVA

## PRELIMINARE

Si basa sulle caratteristiche principali del microrganismo:

❑ **Macroscopiche (colturali)**

Aspetto macroscopico delle colonie (batteri e miceti)

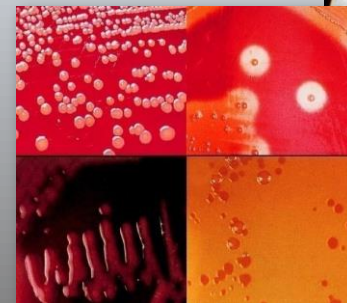
Crescita su terreni selettivi/differenziali

❑ **Microscopiche (morfologia, organizzazione batteri e miceti)**

Colorazione di Gram, ecc.



Candida in Culture Gram Stain



# IDENTIFICAZIONE FINALE

## CONFERMA DELLA ID PRESUNTIVA

Si basa su tests:

- Biochimici
- Sierologici
- Molecolari



# IDENTIFICAZIONE FINALE

## IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

La determinazione di specie si basa sul corredo enzimatico del microrganismo in esame. Si valuta la capacità di:

- ❑ **Metabolizzare** specifici carboidrati, per via ossidativa (aerobica) e/o per via fermentativa (via anaerobica)
- ❑ **Produrre** specifici enzimi: DNAsi (*Proteus, Serratia*), citocromo-ossidasi (*Pseudomonas*), ureasi (*Proteus, Klebsiella, Enterobacter*)
- ❑ **Produrre** specifici prodotti metabolici: H<sub>2</sub>S (*Salmonella, Proteus*), indolo (*E.coli, Proteus vulgaris*)

LA VALUTAZIONE DELLO SPETTRO BIOCHIMICO SI EFFETTUA TRAMITE SISTEMI MANUALI O AUTOMATIZZATI



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

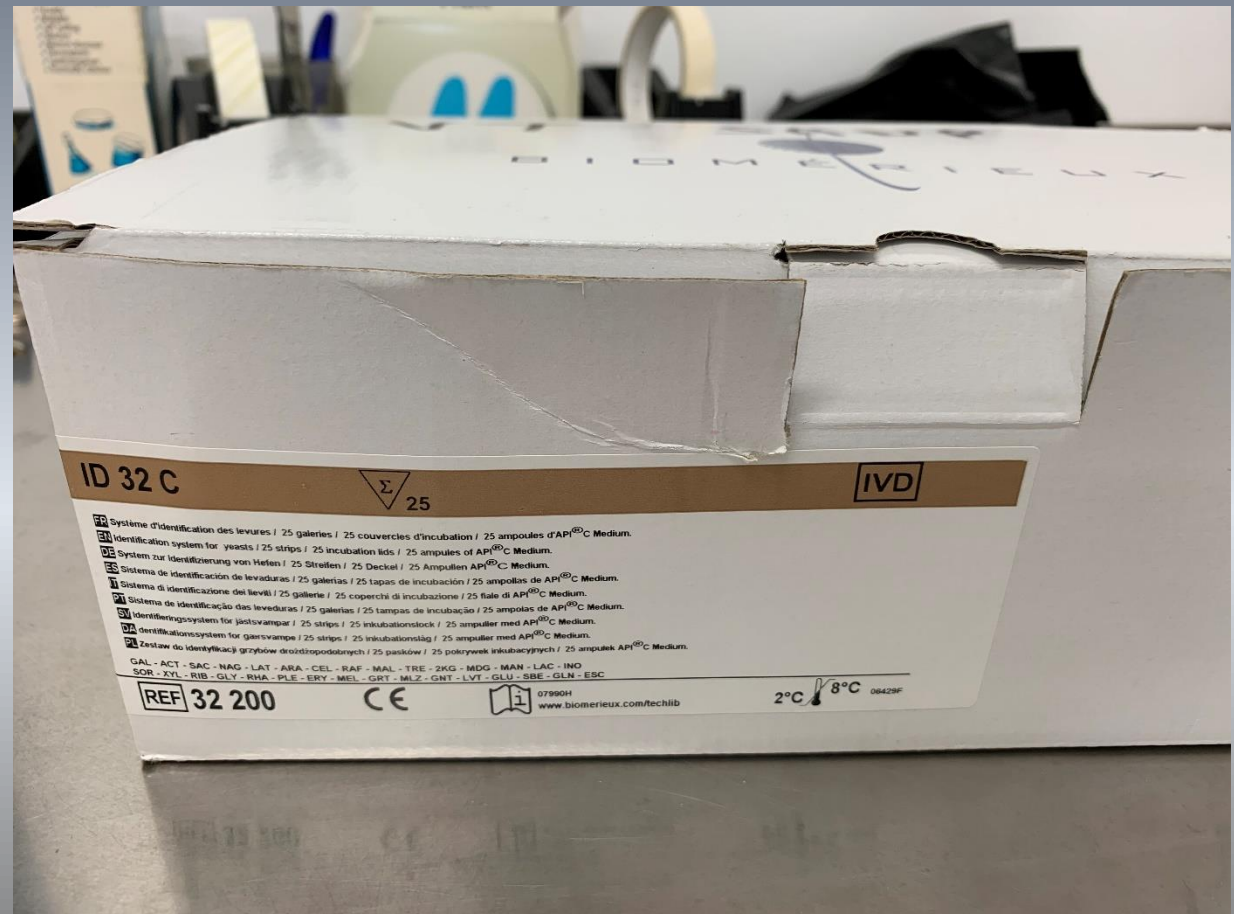
API 20 E	Gram-negative bacilli
API 10 S	Gram-negative bacilli
Rapid 20E	<i>Enterobacteriaceae</i>
API 20 NE	Gram-negative non- <i>Enterobacteriaceae</i>
API Staph	Staphylococci
API 20 Strep	Streptococci
API Candida	Yeasts
API 20 C AUX	Yeasts
API 20 A	Anaerobes
API Coryne	Corynebacteria
API Campy	<i>Campylobacter</i>
API Listeria	<i>Listeria</i>
API NH	<i>Neisseria, Haemophilus</i>
API 50 CHE	<i>Enterobacteriaceae</i>
API 50 CHL	Lactic bacteria
API 50 CHB	<i>Bacillus</i>



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

### ID32C per lieviti





# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

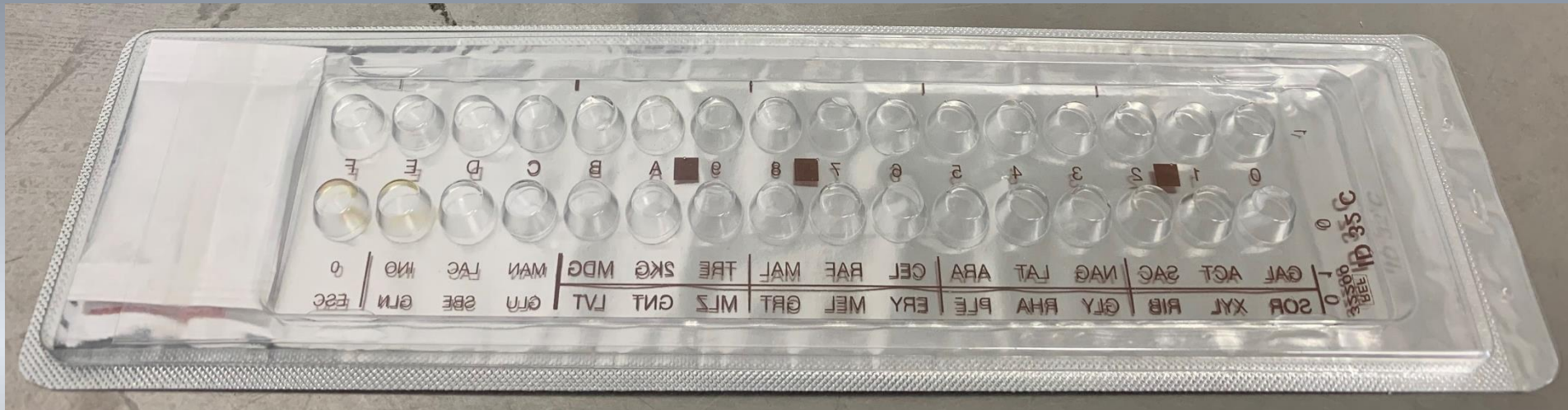
### ID32C per lieviti



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

ID32C per lieviti

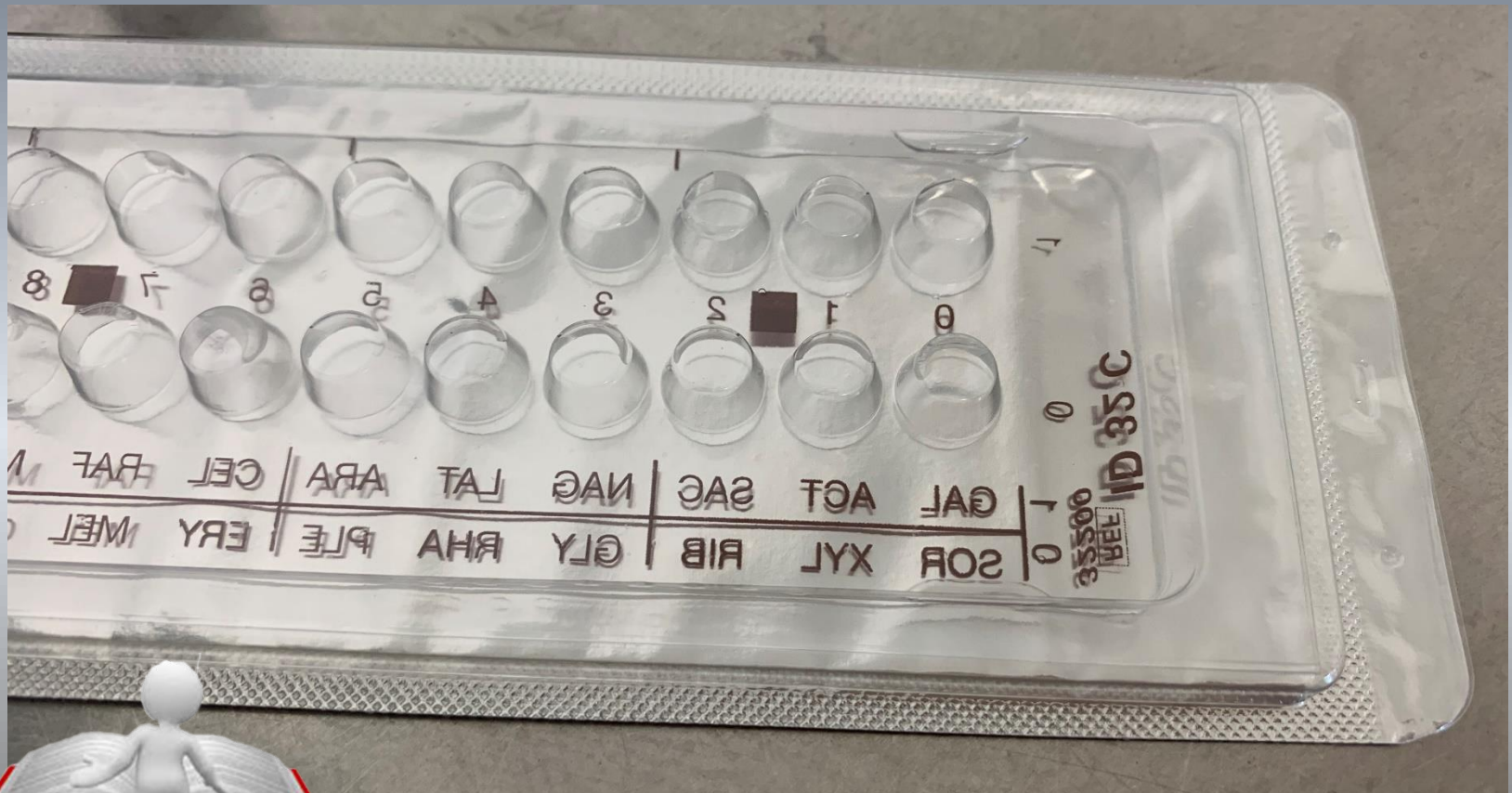




# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

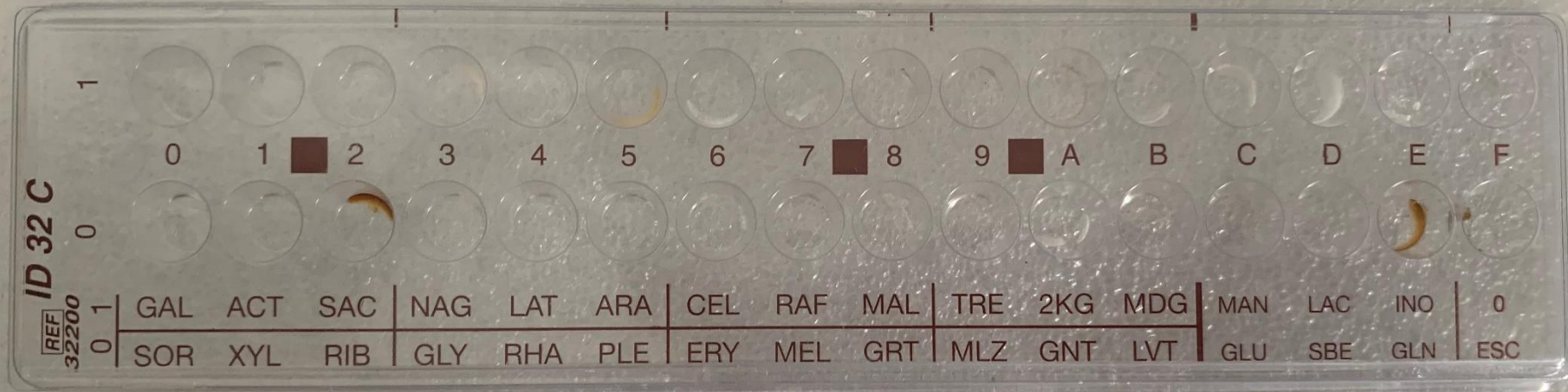
ID32C per lieviti



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

### ID32C per lieviti





# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

**ID 32 C**  
Sistema di identificazione dei lieviti

**INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST**  
ID 32 C è un sistema per l'identificazione automatica dei lieviti, che utilizza 32 test di assimilazione standardizzati e completa dei lieviti che possono essere identificati con questo sistema è riportata nella Tabella di identificazione La lettura e l'interpretazione dei risultati possono essere eseguite sia in automatico che manualmente.

**PRINCIPIO**  
La galleria ID 32 C è composta da 32 cupole; ogni cupola contiene un substrato disidratato (carboidrato), il lievito da identificare è messo in sospensione in un terreno semi-solido. La lettura delle reazioni si effettua dopo 24-48 ore di incubazione, sia ad occhio nudo che utilizzando gli strumenti ATB™ Expression™ o mini API®.

**PRESENTAZIONE (Confezione da 25 test)**

- 25 gallerie ID 32 C
- 25 copertini di incubazione
- 25 file di API C Medium
- 1 scheda tecnica fornita nei kit o scaricabile da [www.biomérieux.com/techlib](http://www.biomérieux.com/techlib)

**COMPOSIZIONE**  
**Galleria**  
La composizione della galleria ID 32 C è riportata nella seguente tabella:

CUPOLA	TEST	SUBSTRATO	Q.T.A. (mg/cup.)
1.0	GAL	D-GALattosio	0,70
1.1	ACT	idrossiamile (ACT Idione)	0,214
1.2	SAC	D-SACCarosio	0,66
1.3	NAG	N-Acetil-Glucosamina	0,64
1.4	LAT	acido Lattico	0,64
1.5	ARA	L-ARAbinosio	0,70
1.6	CEL	D-CELLobiosio	0,66
1.7	RAF	D-RAFenosio	2,34
1.8	MAL	D-MALLosio	0,70
1.9	TRE	D-TREalosio	0,66
1.A	ZKG	potassio 2-Oxeto-Gluconato	1,09
1.B	MDG	Metil-D-Gluco-piranosio	1,92
1.C	MAN	D-MANNitolo	0,66
1.D	LAC	D-LATTosio (origine bovina)	0,70
1.E	INO	INOSitolo	0,70
1.F	0	Nessun substrato	-
0.0	SOR	D-SORbitolo	2,72
0.1	XYL	D-XYLosio	0,70
0.2	RIB	D-RIBosio	0,70
0.3	GLY	GLICerosio	0,82
0.4	RHA	L-RHAMmosio	0,66
0.5	PLE	Palattinosio	0,66
0.6	ERY	ERITritolo	1,44
0.7	MEL	D-MELLibrosio	0,66
0.8	GRT	sodio GlucoRonato	0,76
0.9	MLZ	D-MELZitosio	0,66
0.A	GNT	potassio GLUCONato	0,92
0.B	LVT	acido levulinico (LevValinato)	0,48
0.C	GLU	D-GLUCosio	0,78
0.D	SBE	L-SORBosio	0,70
0.E	GLN	GLUCOSAMINA	0,68
0.F	ESC	ESCulina citrato ferrico	0,069

**FORNITI**

- I numeri indicati corrispondono a quelli stampati sulla galleria.
- Le quantità indicate possono essere modificate in funzione delle materie prime.

**Terreno**

API C Medium	Componente	Quantità (g)
1	Solfato di ammonio	5,9
1	Fosfato monopotassico	0,31 g
1	Fosfato biphosforico	0,45 g
1	Fosfato bisodico	0,92 g
1	Cloruro di sodio	0,1 g
1	Cloruro di calcio	0,05 g
1	Solfato di magnesio	0,05 g
1	L-Triptofano	0,02 g
1	L-Metionina	0,02 g
1	Agente gelificante	0,5 g
1	Soluzione vitaminica	1 ml
1	Soluzione di oligo-elementi	10 ml
1	Acqua demineralizzata	esp 1000 ml
1	pH finale: 6,4-6,8 (a 25-25°C)	

**REATTIVI E MATERIALE NECESSARI MA NON FORNITI**

- Sebbene il terreno API® C Medium contenga agente gelificante, non è necessario pre-riscaldarlo e può essere pipettato come fosse un terreno liquido. Al fine di riportare i terreni a temperatura ambiente, è consigliabile estrarre le file dal frigorifero qualche ora prima dell'uso. Non agitare.
- Le quantità indicate possono essere modificate in funzione dei titoli delle materie prime.

**REATTIVI E MATERIALE NECESSARI MA NON FORNITI**

**Reattivi / Strumenti**

- API Suspension Medium, 2 ml (Cod. 70 700)
- DENSMAT (Cod. 99 234) o ATB Densitometro o McFarland Standard (Cod. 70 900), punto 2 della scala
- ATB Expression o mini API® software di identificazione **apiweb™** (Cod. 40 011) (contattare la bioMérieux)
- ATB Pipetta Elettronica (contattare la bioMérieux) o ATB Inoculatore e Puntali (Cod. 15 710)

**Materiali**

- Pipette o PSipette
- Proteggi-fala
- Porta-fala
- Contenitore a chiusura ermetica
- Materiale generico per laboratorio di batteriologia

**AVVERTENZE E PRECAUZIONI**

- Per diagnostica *in vitro* e controllo microbiologico.
- Esclusivamente per uso professionale.
- Questa confezione contiene dei componenti di origine animale. Poiché i controlli sull'origine e/o sullo stato sanitario degli animali non possono garantire in maniera assoluta che questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile, si raccomanda di manipolarli con le precauzioni d'uso relative ai prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare).

**ID 32 C**  
07900H - R - 2011/07  
IT  
IVD

**ID 32 C**  
07900H - R - 2011/07

• I prelievi, le colture di lieviti ed i prodotti seminati devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere manipolati in maniera appropriata. Le tecniche di asepsi e le precauzioni d'uso per il gruppo batterico studiato devono essere rispettate durante tutta la manipolazione; far riferimento a "CLSI® M29-A, Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guidelines - Revision in English". Per ulteriori informazioni sulle precauzioni di manipolazione, consultare "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Ultima edizione", oppure fare riferimento alla normativa vigente nel Paese.

- Non utilizzare i reattivi dopo la data di scadenza.
- Prima dell'uso, controllare l'integrità dell'imballaggio e dei componenti.
- Non utilizzare gallerie che abbiano subito una alterazione fisica: cupole deformate, sacchetto del disidratante aperto, ...
- Aprire le file delicatamente come indicato di seguito:
  - Inserire la fiala nel proteggi-fala.
  - Impugnare la fiala in posizione verticale (cappuccio bianco rivolto verso l'alto).
  - Spingere bene in fondo il cappuccio.
  - Premere orizzontalmente con il pollice sulla parte stitata del cappuccio fino a rompere l'estremità della fiala.
  - Estrarre la fiala dal proteggi-fala e conservare il proteggi-fala per una successiva utilizzazione.
  - Togliere delicatamente il cappuccio.
- Le performance riportate di seguito sono state ottenute seguendo il procedimento indicato in questa scheda tecnica. Qualsiasi deviazione dal procedimento indicato può alterare i risultati.
- L'interpretazione dei risultati del test deve tener conto del contesto clinico o di altra natura, dell'origine del campione, degli aspetti macro e microscopici del ceppo ed, eventualmente, dei risultati di altri esami, in particolare dell'antibiogramma.

**CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE**  
Le gallerie ed i terreni si conservano a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata sulla confezione.

**CAMPIONI (PRELIEVO E PREPARAZIONE)**  
I campioni clinici o di altra natura non possono essere utilizzati direttamente con la galleria ID 32 C. I microrganismi da identificare devono essere prima isolati su un terreno di coltura adatto, secondo le normali tecniche batteriologiche.

**PRELIEVO**  
Preparazione della galleria  
Estrarre la galleria dal suo involucro.  
Celtare il sacchetto del disidratante.  
Mettere il coperchio sul contenitore.  
Annotare il riferimento del ceppo sulla linguetta laterale della galleria. (Non annotare il riferimento sul coperchio in quanto potrebbe essere spostato durante la manipolazione).

**Preparazione dell'inoculo**  
Aprire una fiala di API® Suspension Medium (2 ml) come indicato nel paragrafo "Avvertenze e Precauzioni" o usare una provetta contenente 2 ml della stessa soluzione, senza additivi.  
Prelevare una o più colonie identiche dal terreno di coltura. Si raccomanda di utilizzare di colture giovanili (24-48 ore).

- Preparare una sospensione batterica con una capacità pari al punto 2 di McFarland - misurare con il densitometro ATB™ o con il DENSMAT™ o valutare batterico in confronto ad un controllo di opacità (McFarland Standard).
- NOTA: in caso di lettura AUTOMATICA della galleria, utilizzare obbligatoriamente il Densitometro ATB o il DENSMAT per aggiustare l'opacità della sospensione batterica.
- Aprire una fiala di API C Medium come indicato nel paragrafo "Avvertenze e Precauzioni" e trasferirvi 250 µl della sospensione precedentemente preparata. Questa sospensione deve essere utilizzata immediatamente dopo la preparazione.

**Inoculo della galleria**

- Inoculo AUTOMATICO:
  - Disporre su un vassoio dell'inoculatore ATB la galleria, la fiala di API C Medium inocolata ed il puntale.
  - L'inoculatore eseguirà automaticamente l'omogeneizzazione della fiala ed il riempimento delle cupole (135 µl / cupola).
  - Omogeneizzare la fiala di API C Medium inocolata e, servendosi della ATB Pipetta Elettronica, distribuire 135 µl di sospensione in ogni cupola.
  - Mettere il coperchio sulla galleria.
  - Incubare a 29°C ± 2°C per 24-48 ore.
- Inoculo MANUALE:
  - NOTE: Alcuni termostati ventilati provocano una disidratazione considerevole del terreno all'interno delle cupole. In questo caso, porre la galleria in un contenitore a chiusura ermetica contenente una piccola quantità di acqua, per creare un ambiente umido in modo da evitare la disidratazione dei test.

**LETTURA E INTERPRETAZIONE**  
**Letture della galleria**

- Lettura AUTOMATICA con gli strumenti ATB Expression™ o mini API®
  - verificare che la parte centrale della galleria sia pulita, per permettere che il lettore riconosca il codice della galleria.
  - verificare che il nome stampato sulla galleria corrisponda al nome della galleria visualizzato dal software.
- Lettura MANUALE
  - Il lettore ricerca in ogni cupola una crescita significativa e trasmette i dati all'elaboratore.
  - Lettura VISIVA:
    - Confermare ogni cupola al controllo (0) e considerare positive quelle più torbide.

**Interpretazione**  
L'identificazione si ottiene partendo dalla base dei dati (V3.0):

- DOPO LA LETTURA AUTOMATICA
  - I risultati trasmessi al computer vengono interpretati dal software di identificazione dell'ATB Expression o del mini API.

11

# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

La composizione della galleria ID 32 C è riportata nella seguente tabella :

CUPOLA	TEST	SUBSTRATO	Q.TA (mg/cup.)
1.0	GAL	D-GALtossio	0,70
1.1	ACT	cicloesamide (ACTidione)	0,014
1.2	SAC	D-SACcarosio	0,66
1.3	NAG	N-Acetil-Glucosamina	0,64
1.4	LAT	acido LaTtico	0,64
1.5	ARA	L-ARAbinosio	0,70
1.6	CEL	D-CELlobiosio	0,66
1.7	RAF	D-RAFfinosio	2,34
1.8	MAL	D-MALtossio	0,70
1.9	TRE	D-TREalosio	0,66
1.A	2KG	potassio 2-ChetoGluconato	1,09
1.B	MDG	Metil- $\alpha$ D-Glucopiranoside	1,92
1.C	MAN	D-MANnitolo	0,68
1.D	LAC	D-Lattossio (origine bovina)	0,70
1.E	INO	INOsitolo	0,70
1.F	0	Nessun substrato	-
0.0	SOR	D-SORbitolo	2,72
0.1	XYL	D-Xilosio	0,70
0.2	RIB	D-RIBosio	0,70
0.3	GLY	GLIcerolo	0,82
0.4	RHA	L-Ramnosio	0,68
0.5	PLE	PaLatinosio	0,66
0.6	ERY	Eritritolo	1,44
0.7	MEL	D-MELibiosio	0,66
0.8	GRT	sodio GlucuRonaTo	0,76
0.9	MLZ	D-MeLeZitosio	0,66
0.A	GNT	potassio GlucoNaTo	0,92
0.B	LVT	acido levulinico (LeVulinaTo)	0,48
0.C	GLU	D-GLUcosio	0,78
0.D	SBE	L-SorBosio	0,70
0.E	GLN	GlucosamiNa	0,68
0.F	ESC	ESCulina citrato ferrico	0,28 0,069

bioMérieux SA





# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)



Temps d'incubation

Incubation Time

24 H/ St

Inkubationszeit

48 H/ St

REF. : .....

\_\_\_ / \_\_\_

Origine/ Source/ **Herkunft**/ Origen/ Prelievo

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B
GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	2KG	MDG
SOR	XYL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LVT
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B
GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	2KG	MDG
SOR	XYL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LVT
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4

C	D	E	C	D	E	F
MAN	LAC	INO	MAN	LAC	INO	0
GLU	SBE	GLN	GLU	SBE	GLN	ESC
1	2	4	1	2	4	

Autres tests/ Other tests/ **Weitere Tests**/ Altri tests/ Otros tests

Ident.

BIO MÉRIEUX SA / 69280 Marcy-l'Etoile / France

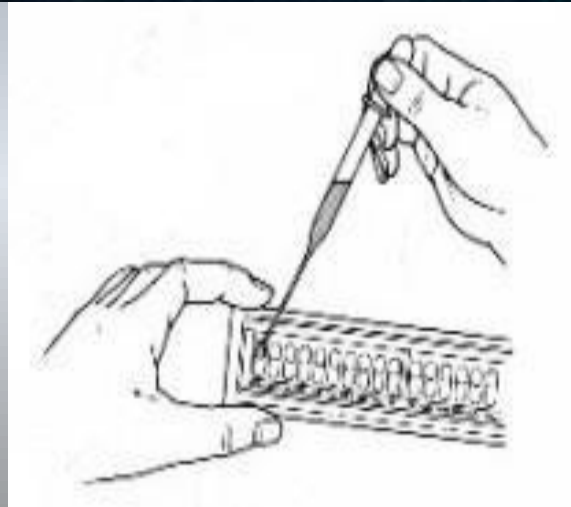




# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

20E per bacilli Gram negativi



**Semina**



**Incubazione**



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

La avvenuta fermentazione degli zuccheri (glucosio, sorbitolo, mannitolo, saccarosio, ecc.) e/o l'utilizzazione di altri substrati (urea, indolo, gelatina, citocromo-ox, ecc.) viene rivelata dal viraggio di un indicatore di pH.



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)



Lettura risultati



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

L'interpretazione «integrata» dei tests genera un codice numerico (biotipo) che verrà inserito in un database per ottenere una identificazione a livello di specie corredata con il relativo livello di accuratezza.



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

**api® 20 E**

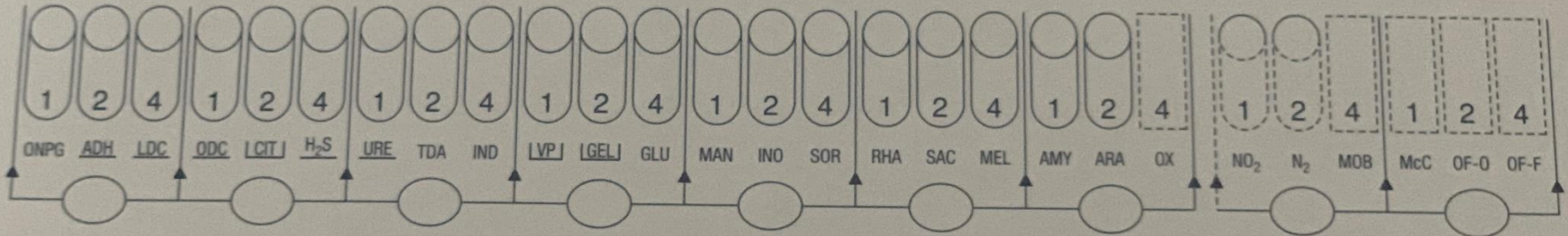


07223 C

REF. :

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_

Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origem / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :



Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Imprimé en France / Printed in France







# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

20NE per batteri NON *Enterobacteriaceae*



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)

**api<sup>®</sup> Staph**

CE 0722 B

REF : \_\_\_\_\_

Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Imprimé en France / Printed in France



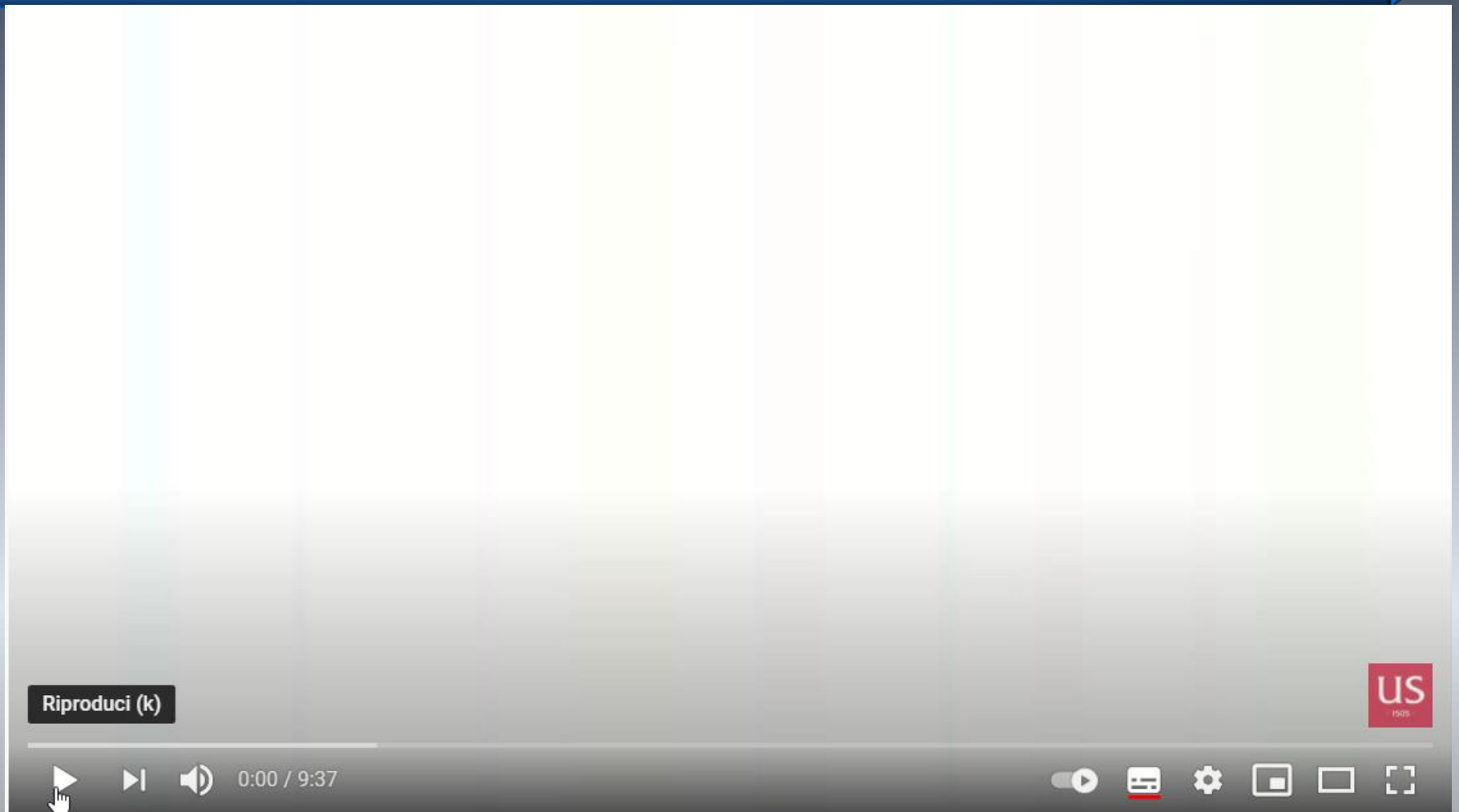


# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO MANUALE – API Identification System (bioMérieux)



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA



Riproduci (k)



0:00 / 9:37





# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

METODO AUTOMATIZZATO – VITEK (bioMérieux)

Gram-positivi (GP)  
Gram-negativi (GN)  
Lieviti (YST)  
Bacillus spp. (BCL)  
Anaerobi, *Corynebacterium* (ANC)  
*Neisseria*, *Haemophilus* (NH)



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO AUTOMATIZZATO – VITEK (bioMérieux)

- ❑ Il sistema prevede l'utilizzo di una **card** su cui si trova una serie di **pozzetti** (30, circa) contenenti dei substrati biochimici (ID) od antibiotizzati (AST) in forma disidratata.
- ❑ Due tipologie di **card**: una per la **identificazione** (ID), l'altra per l'esecuzione dell'**antibiogramma** (AST).
- ❑ Non sono richiesti reagenti addizionali, riducendo così il rischio di errore.
- ❑ Il database del VITEK copre **oltre 300 specie**, di rilevanza sia clinica che industriale/alimentare.
- ❑ Possibilità di generare reports epidemiologici per monitorare trends relativi ad antibiotico-R ed eziologia.

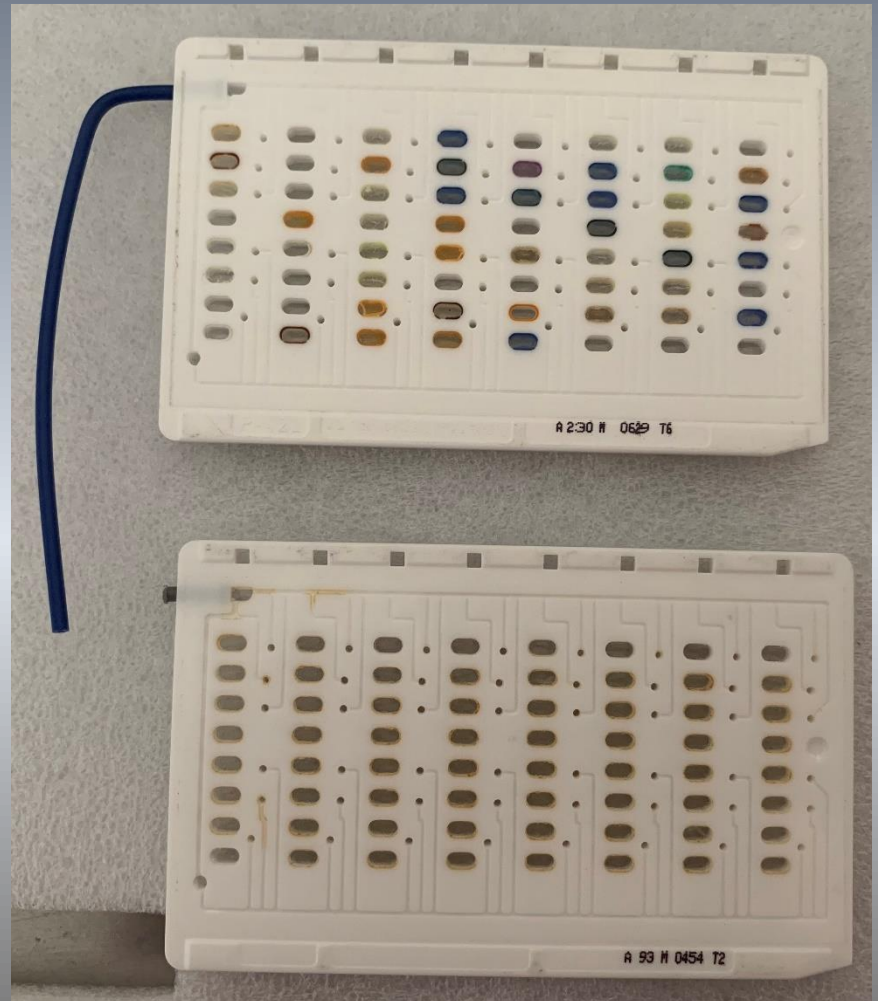


# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO AUTOMATIZZATO – VITEK (bioMérieux)

Card identificazione

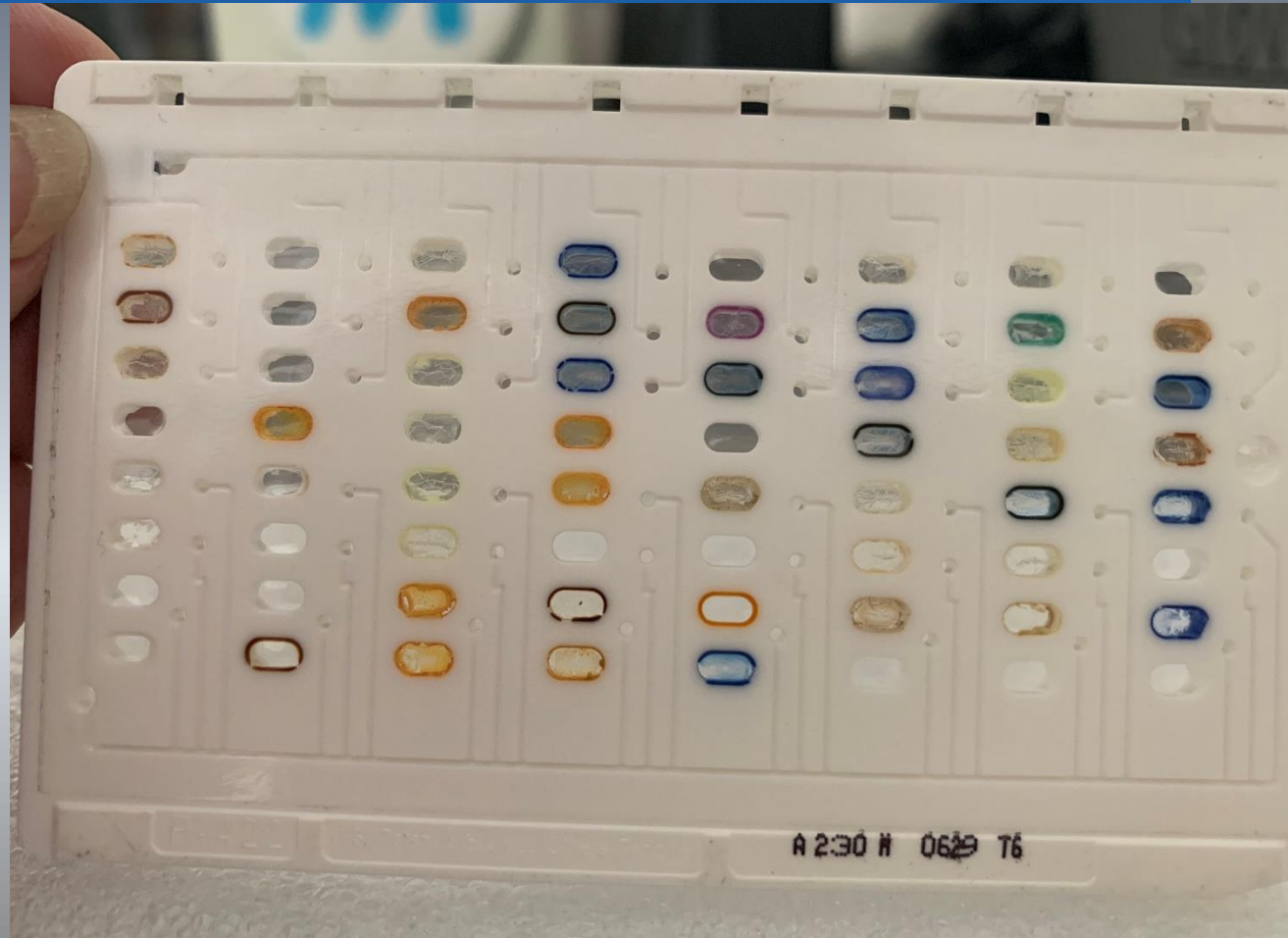
Card antibiogramma



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

METODO AUTOMATIZZATO – VITEK (bioMérieux)

Card identificazione



A 230 H 0629 T6



# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO AUTOMATIZZATO – VITEK (bioMérieux)



The screenshot shows the Vitek 2 software interface. The main window displays a table with columns for 'Sample ID', 'Species', 'Confidence', 'Quality', 'Control', and 'Status'. The table contains several rows of data, including sample IDs like 'VITK\_001' and 'VITK\_002', and species names like 'Staphylococcus aureus' and 'Escherichia coli'. The interface also includes a sidebar on the left with a tree view and a top menu bar.

Sample ID	Species	Confidence	Quality	Control	Status
VITK_001	Staphylococcus aureus	99.9%	High	Pass	Identified
VITK_002	Escherichia coli	99.9%	High	Pass	Identified
VITK_003	Streptococcus pneumoniae	99.9%	High	Pass	Identified
VITK_004	Pseudomonas aeruginosa	99.9%	High	Pass	Identified
VITK_005	Enterobacteriaceae	99.9%	High	Pass	Identified
VITK_006	Enterobacteriaceae	99.9%	High	Pass	Identified
VITK_007	Enterobacteriaceae	99.9%	High	Pass	Identified
VITK_008	Enterobacteriaceae	99.9%	High	Pass	Identified
VITK_009	Enterobacteriaceae	99.9%	High	Pass	Identified
VITK_010	Enterobacteriaceae	99.9%	High	Pass	Identified



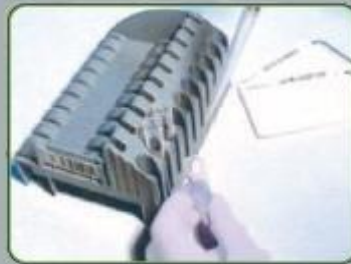


# IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

## METODO AUTOMATIZZATO – VITEK (bioMérieux)



Navigate to “virtual cassette” workspace.



Inoculate tubes and place in cassette.



Scan the appropriate card and place it in the cassette.



Scan in the isolate identification number, or use the keyboard to type it in.



Place cassette in filler.



Place cassette in reader.



Results print automatically when card is complete.



Finished cards are automatically sent to waste bin for safe disposal.



# IDENTIFICAZIONE FINALE

## IDENTIFICAZIONE SIEROLOGICA

Ricerca di **ANTIGENI** specie-specifici direttamente nel campione biologico o da coltura pura (previo isolamento) tramite l'uso di anticorpi complementari:

- Reazione di agglutinazione, reazione di rigonfiamento capsulare**
- Reazione di immunofluorescenza**
- Saggio immunoenzimatico (ELISA)**
- Saggio di immunocromatografia su membrana**
- Western blot**



# IDENTIFICAZIONE FINALE

## IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE

**Il patogeno si identifica cercando caratteristiche sequenze di DNA o RNA mediante:**

- Amplificazione genica**
- Ibridazione con una sonda**

**Consentono ricerca e identificazione rapida dei patogeni**

**Ricerca MCO a lenta crescita, difficilmente coltivabili o non coltivabili**

**Ricerca di geni per la resistenza agli antibiotici**



# IDENTIFICAZIONE FINALE

## IDENTIFICAZIONE con MALDI-TOF

- ❑ Introduzione della Spettrometria di Massa nella routine del Laboratorio di Microbiologia
- ❑ La tecnologia MALDI-TOF è stata recentemente introdotta come metodo rapido, accurato ed economico per l'identificazione di batteri, micobatteri, lieviti e funghi. E' un'alternativa valida ai metodi di microbiologia classica e di biologia molecolare.
- ❑ Il MALDI-TOF MS identifica il MCO entro pochi minuti dal riscontro colturale, con un anticipo di 24 ore rispetto **ai test biochimici tradizionali.**





# IDENTIFICAZIONE FINALE

## IDENTIFICAZIONE con MALDI-TOF

- Consente di misurare in maniera estremamente accurata il peso molecolare di macromolecole di interesse biologico e di determinare la loro identità in base al rapporto massa/carica.

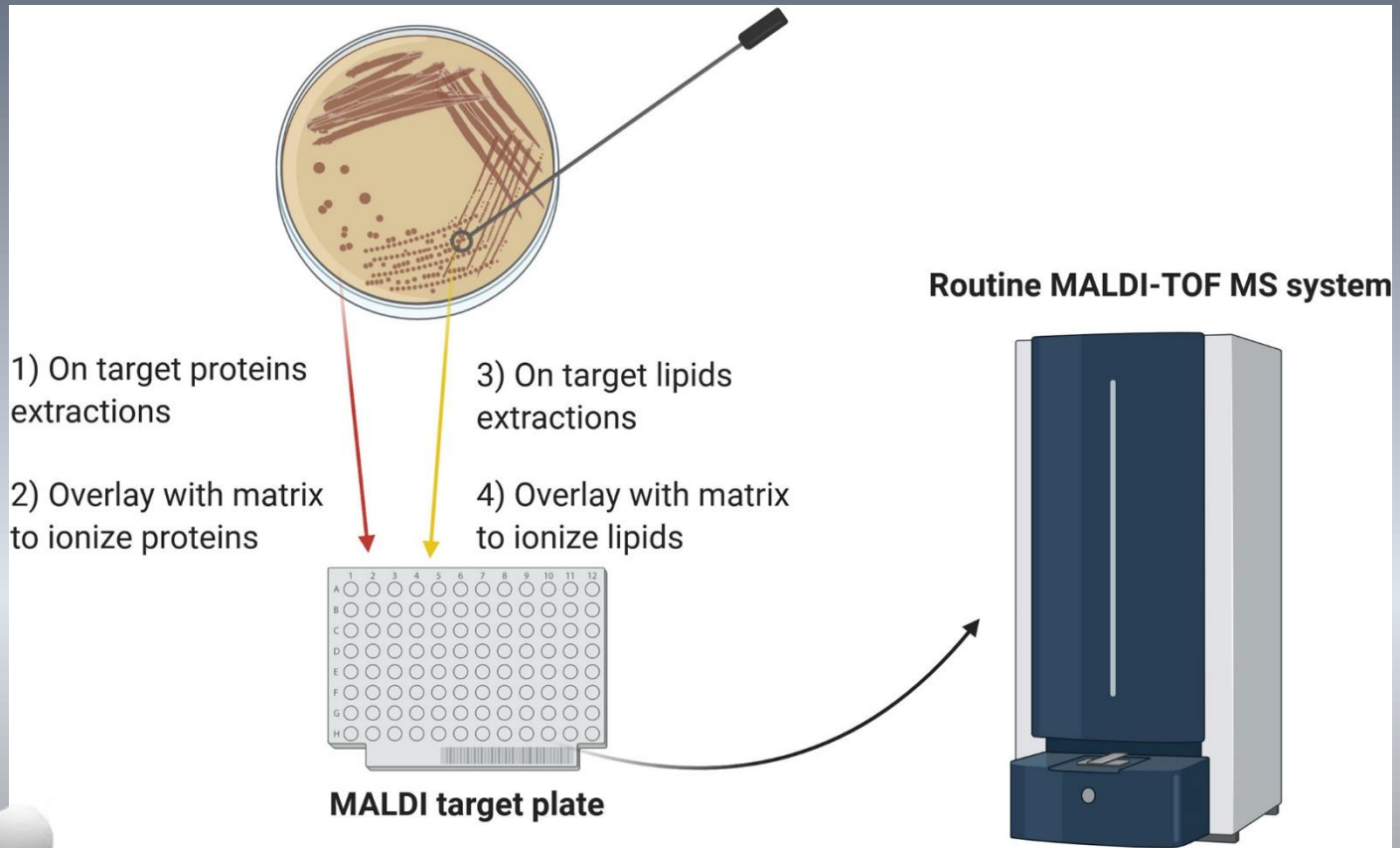
- **CAMPIONE**

La tecnica prevede che un campione batterico costituito da  $10^4$ - $10^6$  cellule (brodocoltura o singola colonia), possa essere analizzato ottenendo in qualche minuto uno spettro di massa i cui segnali sono originati da componenti proteiche ribosomiali o loro frammenti rilasciate in seguito a lisi della parete batterica.



# IDENTIFICAZIONE FINALE

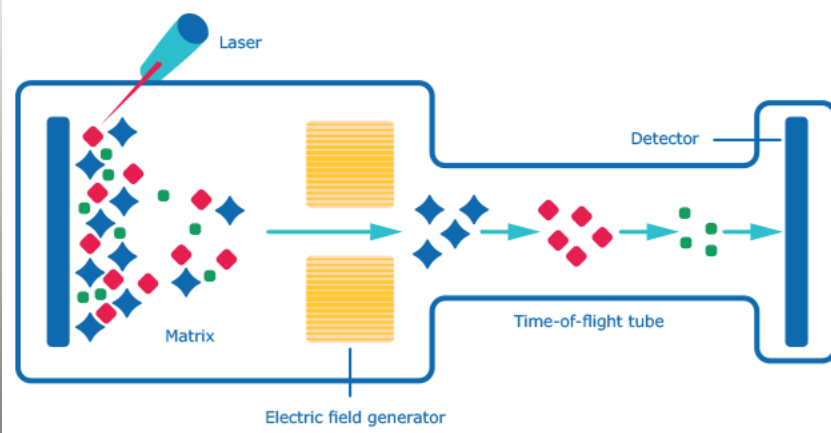
## IDENTIFICAZIONE con MALDI-TOF



# IDENTIFICAZIONE FINALE

## IDENTIFICAZIONE con MALDI-TOF

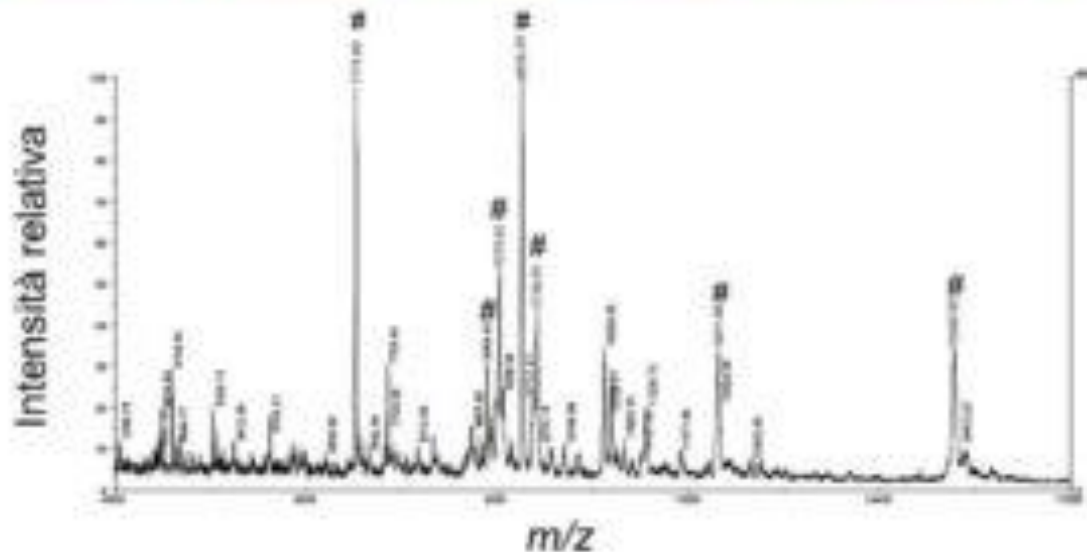
- ❑ Il campione è colpito da un fascio laser pulsato con frequenza nell'UV che lo disgrega e ionizza. I frammenti ottenuti sono dei cationi monovalenti che vengono accelerati da un campo elettromagnetico e migrano in senso lineare attraverso il "**tubo di volo**" per colpire una membrana che registrerà le masse ionizzate impattanti in tempi differenti in base alla massa stessa degli ioni.
- ❑ Gli ioni impattanti su di essa vengono misurati nel loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ) potendo così risalire al peso molecolare della molecola analizzata.



# IDENTIFICAZIONE FINALE

## IDENTIFICAZIONE con MALDI-TOF

### Spettro di massa di ioni monocarica (MALDI/TOFMS)



Spettro di massa del batterio intero *Escherichia coli*







*Grazie*

*Per qualunque domanda o problema  
puoi contattarmi al*

- Tel: **3386428032**
- e-mail: [vivian.tullio@unito.it](mailto:vivian.tullio@unito.it)