


Colorazioni in Batteriologia

Giovanni Di Bonaventura

Università "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara

Le colorazioni in Microbiologia

Perché colorare ?

- La cellula batterica è trasparente  contrasto insufficiente tra cellula batterica ed ambiente circostante.
- I coloranti debbono consentire:
 - forte contrasto tra i microrganismi ed il fondo
 - differenziazione di vari tipi morfologici (forma, organizzazione, colorazione Gram)
 - evidenziazione di alcune strutture cellulari (flagelli, capsule, endospore)

Le colorazioni in Microbiologia

I coloranti

- I coloranti comunemente usati sono dei sali, quindi formati da ioni (positivi o negativi).
A tal riguardo, essi possono essere suddivisi in:
 - Coloranti **basici** (blu di metilene, fucsina basica, violetto di genziana, cristalvioletto, tionina):
 - carica positiva (cloruro⁻ di blu⁺ di metilene) ➤ affinità per le strutture acide (superficie cellulare, proteine, acidi nucleici) ➤ colorazione diretta
 - Coloranti **acidi** (eosina, negrosina, rosso Congo):
 - carica negativa (sodio⁺ eosinato⁻) ➤ affinità per le strutture basiche, non colorano il microrganismo ➤ colorazione indiretta o negativa

Le colorazioni in Microbiologia

Preparativa

● Preparazione di soluzioni coloranti

- Soluzione alcolica al 10% (colorante come sale):
 - 10 g sostanza colorante + 100 ml alcool assoluto
- Soluzione idroalcolica al 10% (colorante subisce dissociazione elettrolitica):
 - 10 ml soluzione madre alcolica colorante + 90 ml H₂O distillata

● Reagenti per colorazioni

- **Mordenzanti**: sostanze che fissano il colorante od amplificano l'ingombro del campione (fenolo, soluzione iodo-iodurata o liquido di Lugol)
- **Differenziatori**: sostanze decoloranti (alcool-acetone, acido solforico al 20%)



Le colorazioni in Microbiologia

Tipologie

- **Colorazioni progressive**: si eseguono con soluzioni molto diluite di colorante, interrompendo tempestivamente la colorazione
- **Colorazioni regressive**: si esegue una ipercolorazione, quindi un differenziatore la cui azione decolorante deve essere interrotta tempestivamente

Le colorazioni in Microbiologia

Tecniche

- **Colorazioni semplici:**

- un colorante basico (blu di metilene, fucsina fenicata) viene applicato al campione fissato per un tempo variabile. L'eccesso di colorante viene eliminato tramite risciacquo con acqua
- consente di rilevare la morfologia e l'organizzazione cellulare

- **Colorazioni differenziali:**

- due o più coloranti ed altri reagenti (mordenzanti, differenziatori)
- consente di distinguere due (o più) differenti tipologie di microrganismi, oppure due (o più) differenti strutture di un microrganismo

Tecniche di colorazione

Colorazioni differenziali

- Colorazione di Gram
- Colorazione per bacilli acido-resistenti:
 - Metodo di Ziehl-Neelsen
 - Metodo a freddo di Kinyoun
 - Metodo della fluorescenza con auramina
- Colorazione della capsula (inchiostro di china)
- Colorazione di flagelli (Leifson)
- Colorazione di spore
- Colorazione di lieviti e funghi
- Colorazione di spirochete

Le colorazioni in microbiologia

Allestimento di un preparato (fissazione) (1 di 2)

La fissazione garantisce che: i) il materiale venga disteso ed essiccato non venga allontanato dal vetrino nel corso dei successivi lavaggi; ii) le cellule vengano uccise per coagulazione (sicurezza biologica e maggiore penetrazione ai coloranti)

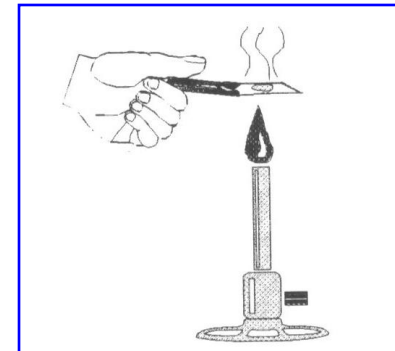
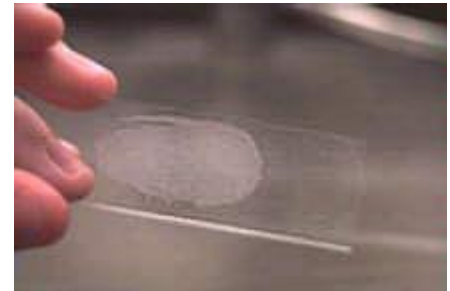
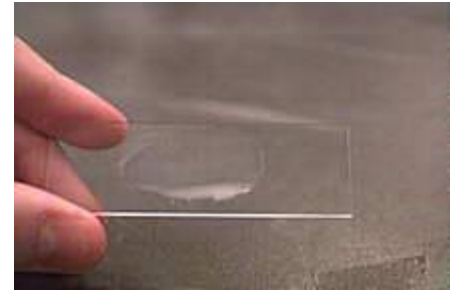
- 1 Partendo da una sospensione batterica (brodocoltura) centro di un vetrino pulito
- 2 Se si preleva il materiale (colonie) da terreno agarizzato, aggiungere una goccia di soluzione tampone (PBS) al campione



Le colorazioni in microbiologia

Allestimento di un preparato (fissazione) (2 di 2)

- 3 Aiutandosi con un'ansa, stemperare il campione nel tampone/brodo e stenderlo fino a coprire circa la metà della superficie del vetrino (preparazione dello smear)
- 4 Lasciare essiccare il preparato all'aria o forzatamente (bunsen).
- 5 Fissare il preparato esponendo il vetrino (lato non contenente il campione) per 4-5 volte direttamente alla fiamma



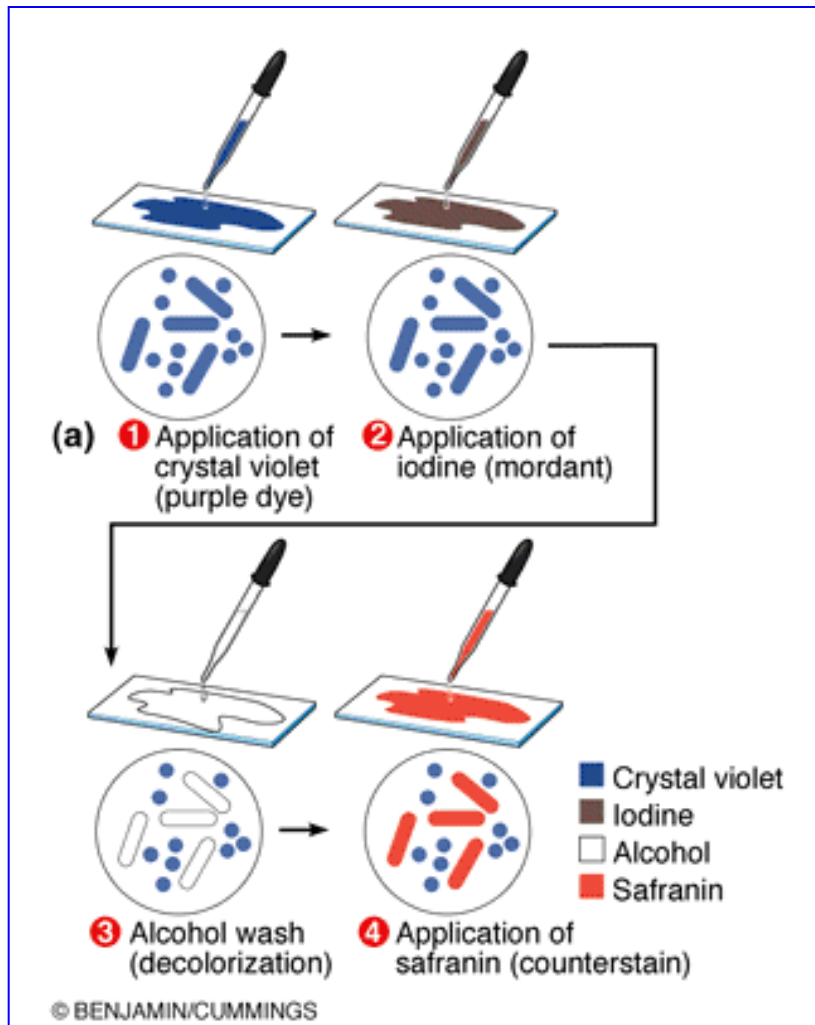
Hans Christian Joachim Gram



- Nato a Copenhagen il 13 Settembre 1853.
- Batteriologo danese. Inventò la colorazione omonima nel tentativo di differenziare *Klebsiella pneumoniae* dagli pneumococchi

Colorazione di Gram

Tecnica

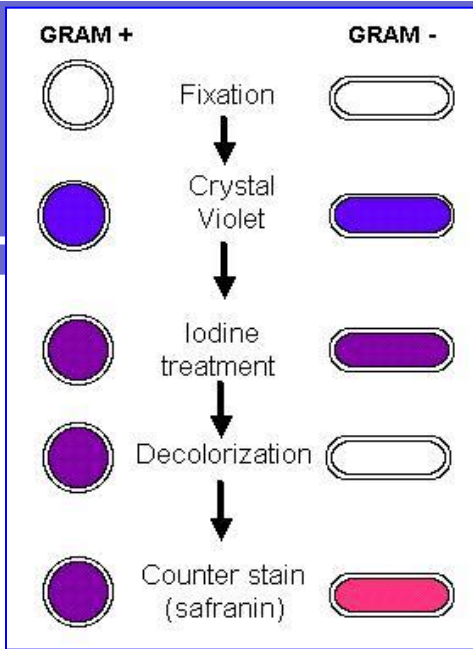


1. Fissare gli strisci al calore
2. Coprire con cristalvioletto per 1-2 min
3. Lavare con acqua. Non asciugare
4. Coprire con la soluzione iodio-iodurata di Lugol per 1-2 min
5. Lavare con acqua. Non asciugare
6. Decolorare per 10 sec con alcool-acetone
7. Lavare con acqua. Non asciugare
8. Coprire con safranina (2.5% in alcool 95%) per 1-2 min
9. Lavare con acqua e lasciare asciugare

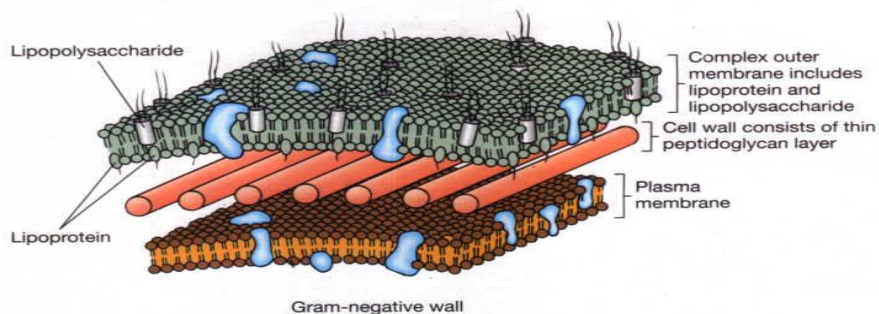
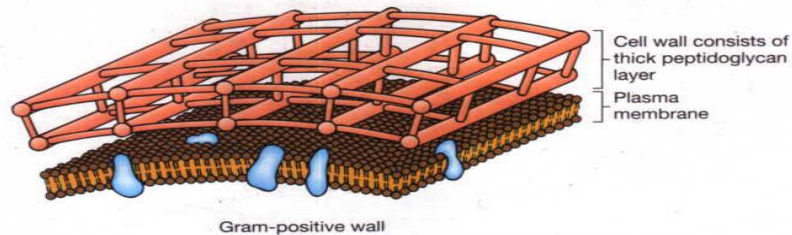
Colorazione di Gram: colorazione **regressiva** e **differenziale**

Colorazione di Gram

Principio



- Nei **batteri Gram+** il cristalvioletto e lo iodio si combinano a formare un complesso (CV-I) di grosse dimensioni che precipita all'interno della cellula. Il decolorante condensa, per disidratazione, la struttura peptidoglicanica. In questo modo, il complesso CV-I viene "catturato" dalla parete cellulare.
- Nei **batteri Gram-** il decolorante agisce come solvente lipidico, dissolvendo la membrana esterna della parete cellulare, permettendo così il rilascio del complesso CV-I e, quindi, la decolorazione della cellula batterica.

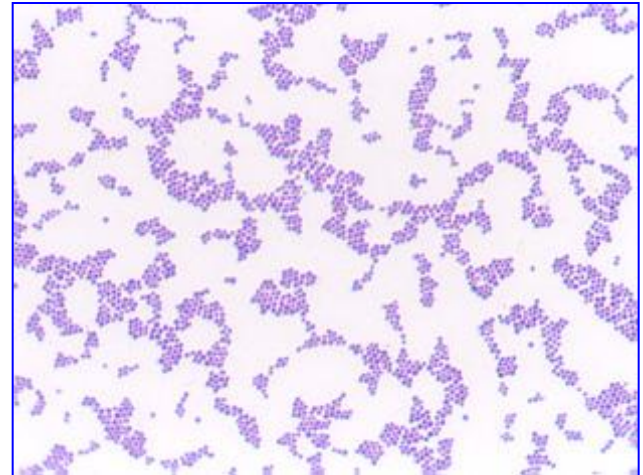


Colorazione di Gram

Osservazione microscopica

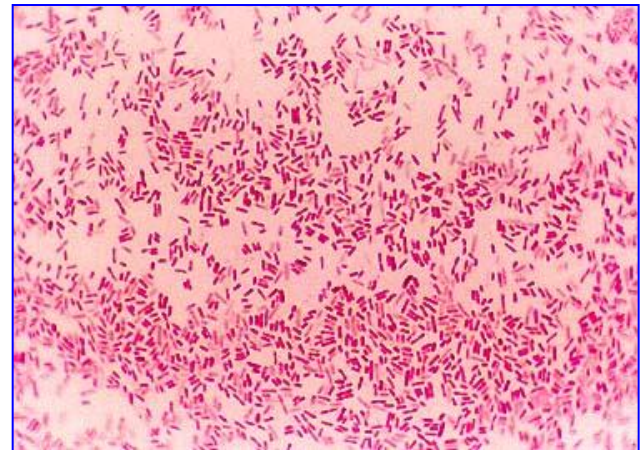
- I batteri **Gram+** (*Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, etc) appaiono colorati in **blu**

(*Staphylococcus epidermidis*)



- I batteri **Gram-** (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Neisseriaceae*, etc.) appaiono colorati in **rosso**

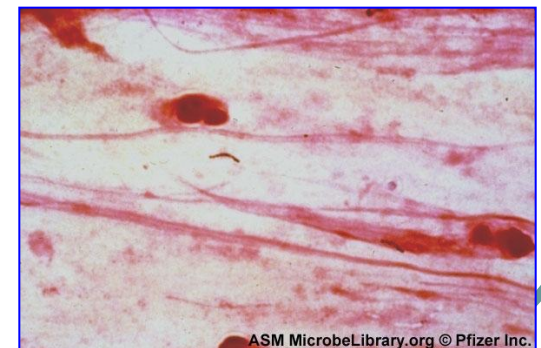
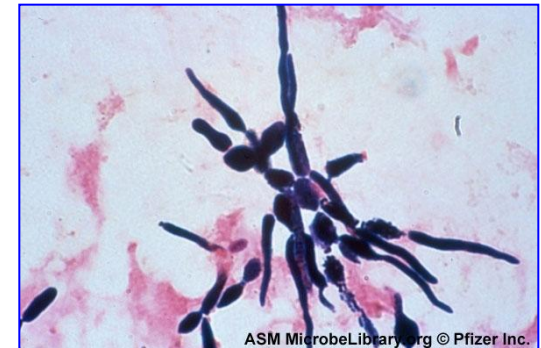
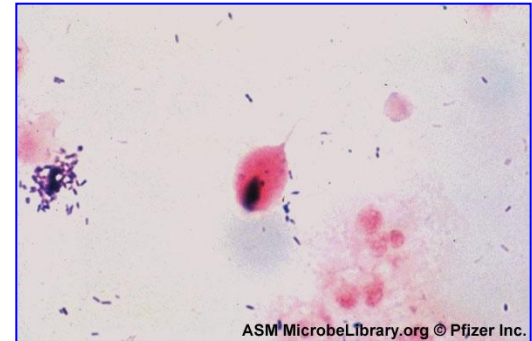
(*Escherichia coli*)



Colorazione di Gram

Casi particolari

- *Trichomonas vaginalis* (protozoo) è Gram+
- *Candida albicans* (lievito), *Aspergillus fumigatus* (muffa) sono Gram+
- Occasionalmente, anche *Mycobacterium tuberculosis* è Gram+ (oppure Gram-variabile)



Colorazione di Gram

Utilità clinica

(1 di 2)

- Idoneità del campione da sottoporre a coltura
- Diagnosi eziologica presuntiva (suggestiva)
 - meningiti e polmoniti batteriche, batteriuria, gonorrea ed infezioni piogene
- Suggestire la necessità di attuare tecniche di coltivazione “non routinarie”
 - anaerobi, funghi
- Ausilio nella interpretazione dell'esame colturale
 - angina di Vincent (spirochete, fusobatteri)
 - paziente antibiotizzato
- Informazioni sulla natura dell'infezione
 - infezioni poli/mono-microbiche

Colorazione di Gram

Utilità clinica

(2 di 2)

Quindi:

- **La conoscenza del risultato di una colorazione di Gram può salvare una vita !**

Tuttavia:

- La colorazione di Gram **non deve** essere effettuata su campioni clinici (feci, escreato) in cui la flora patogena non può essere differenziata da quella commensale
- La colorazione di Gram non è utile per la rilevazione di:
 - *Legionella spp.* (immunofluorescenza)
 - bacilli acido-resistenti (micobatteri, *Nocardia spp.*) (Ziehl-Neelsen)

Colorazione di Gram

L'eccezione

- La colorazione di Gram non è applicabile a tutti i batteri.
- *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*
 - incapacità di colorare la cellula per la natura “cerosa” dell’involucro esterno, altamente impermeabile ai coloranti
 - colorazione di Ziehl-Nielsen

Mycobacterium spp.

Parete cellulare

- **Composizione:**

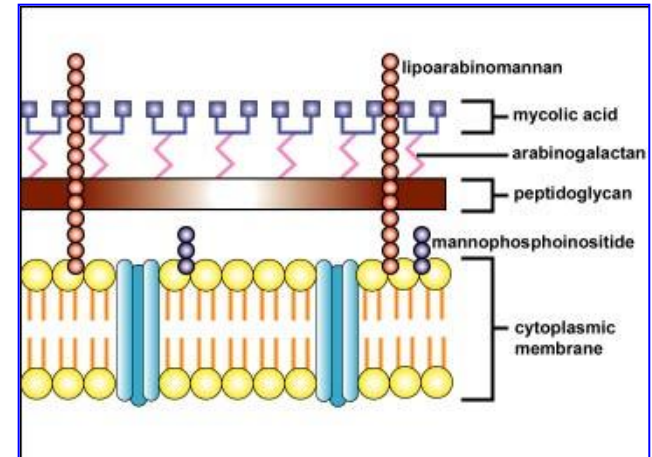
- Grosse quantità di glicolipidi:
 - acido micolico (60%)
 - complessi lipidi-arabinogalattani
 - lipoarabinomannani
- Scarso peptidoglicano

- **Funzioni:**

- Condiziona la forma e previene la lisi osmotica (peptidoglicano)
- Inibisce ingresso composti chimici
 - crescita lenta
 - maggiore resistenza agli agenti chimici
 - maggiore resistenza alla fagocitosi
- Mediante l'acido micolico, induce la sintesi di citochine (TNF- α)

- **Colorazioni:**

- Ziehl-Neelsen, Kinyoun



Colorazione di Ziehl-Neelsen

Tecnica

(1 di 2)

Step 1:

- versare la **fucsina fenicata** (fucsina basica in acqua, alcool e fenolo)



Step 2:

- fare **evaporare il colorante** alla fiamma per 5 min
- **lavare** con acqua



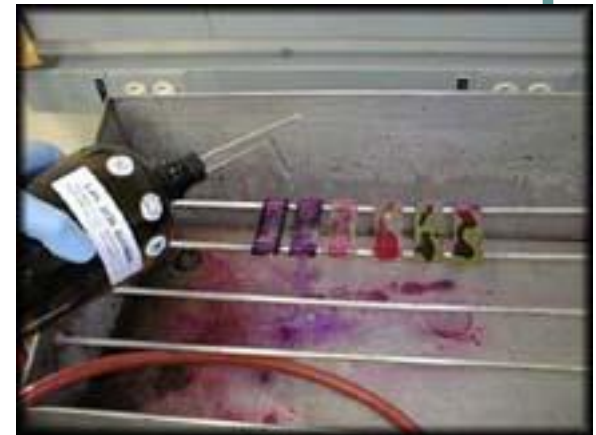
Colorazione di Ziehl-Neelsen

Tecnica

(2 di 2)

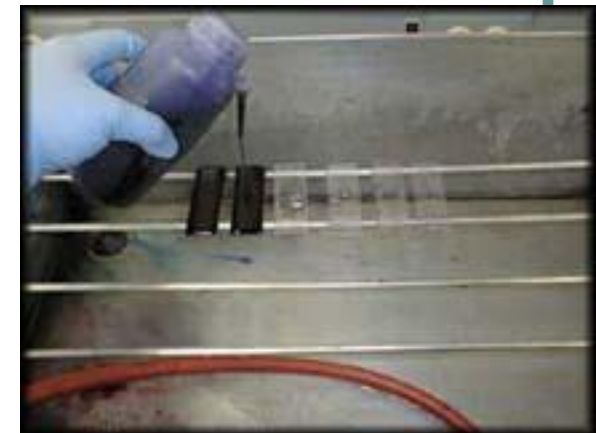
Step 3:

- Decolorare (2 min, circa) con alcool-acido fino alla scomparsa del colorante
- Lavare con acqua



Step 4:

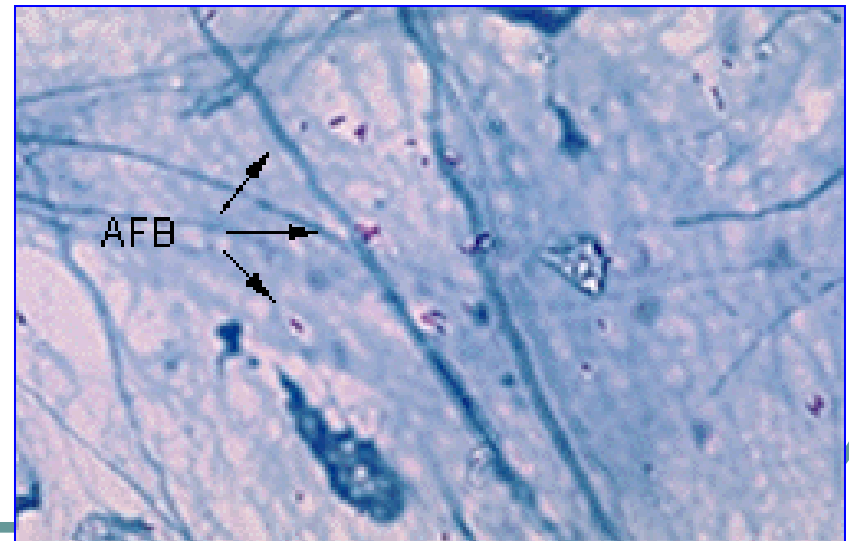
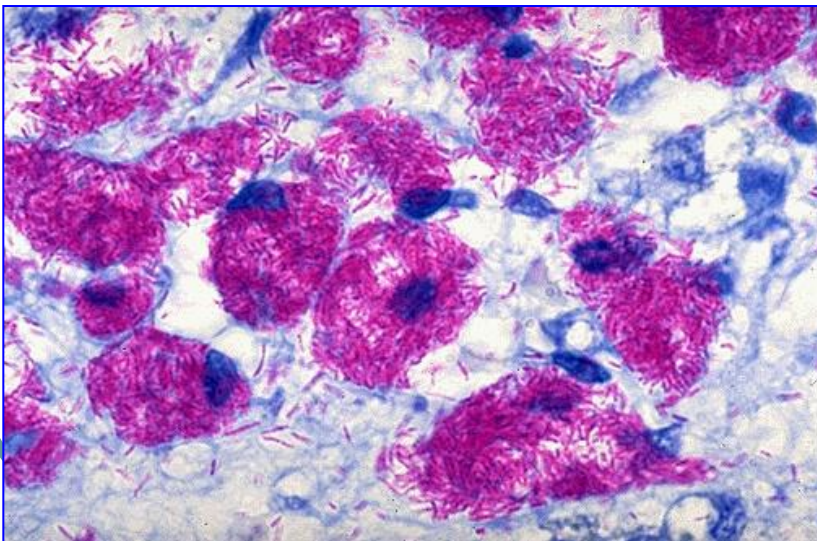
- Contrastare con **blu di metilene** per 1-2 min
- Lavare con acqua



Colorazione di Ziehl-Neelsen

Osservazione microscopica

- Gli organismi acido-resistenti (AFB) appaiono colorati in **rosso**
- Gli organismi non acido-resistenti risulteranno colorati in **blu**



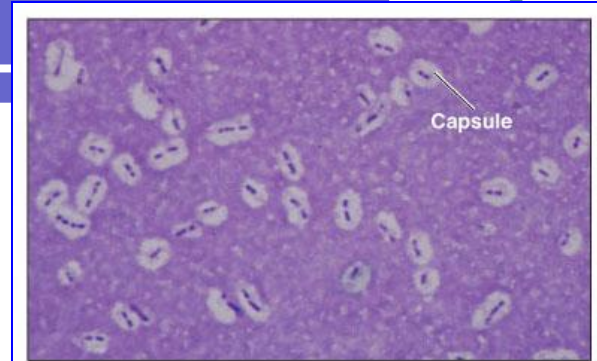
Le colorazioni in Microbiologia

Colorazioni speciali

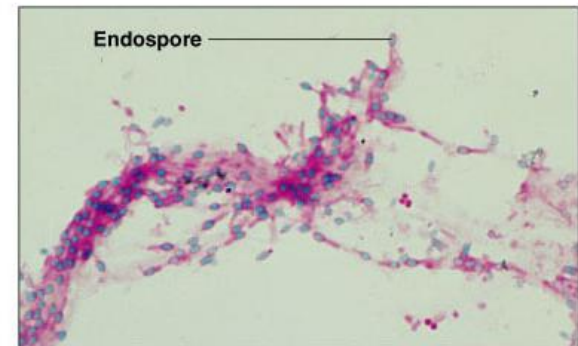
La **colorazione negativa** consiste nella colorazione di sottofondo con un colorante acido (nero nigrosina). Viene usata quando un organismo od una sua struttura non viene colorata facilmente (esempio, la capsula).

La **colorazione delle spore** richiede calore per facilitare la penetrazione del colorante (verde di malachite, fucsina fenicata) attraverso gli involucri sporiali.

La **colorazione dei flagelli** impiega un mordenzante (precipitazione dei sali dell'acido tannico) per evidenziare la struttura flagellare altrimenti invisibile (d: 12-30 nm)



(a) Negative staining.



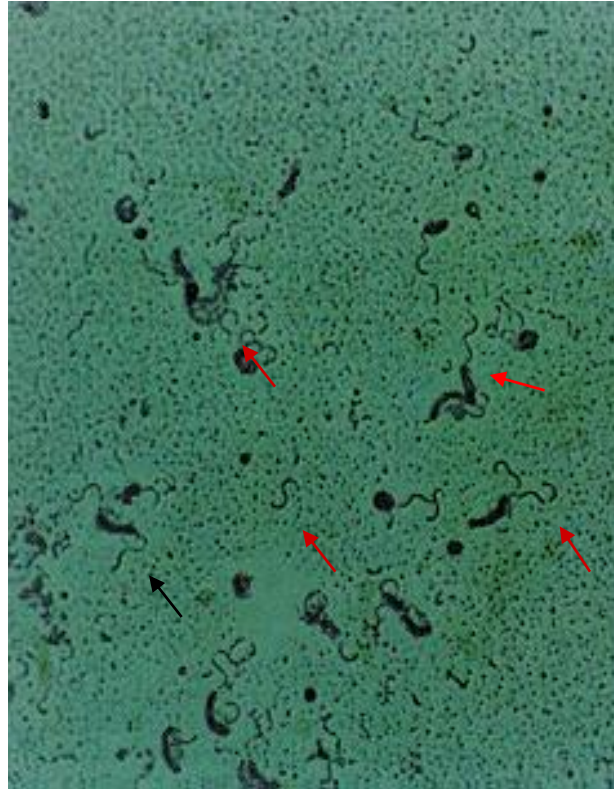
(b) Endospore staining.



(c) Flagella staining.

Le colorazioni in Microbiologia

Colorazione di flagelli



Colorazione di Leifson. Cellule **politriche** di *Helicobacter pylori*
(da: Di Bonaventura et al., *J. Clin. Microbiol.*, 1997)