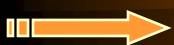


Le colorazioni in Microbiologia

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 (flagelli, capsule, endospore)

Le colorazioni in Microbiologia

I coloranti

- I coloranti constano di ioni (positivi o negativi).
Al riguardo, essi possono essere suddivisi in:
 - Coloranti **basici** (blu di metilene, fucsina basica, violetto di genziana, cristalvioletto, tionina):
 - Carica positiva ➤ Affinità per le strutture acide (superficie cellulare, proteine, acidi nucleici) ➤ colorazione diretta
 - Coloranti **acidi** (eosina, negrosina, rosso Congo):
 - Carica negativa ➤ Affinità per le strutture basiche, si depositano attorno al microrganismo ➤ colorazione indiretta o negativa

Le colorazioni in Microbiologia

Preparativa

- **Preparazione di soluzioni coloranti**

- Soluzione alcoolica (colorante come sale):

- 10 g sostanza colorante + 100 ml alcool assoluto

- Soluzione idroalcoolica 10% (colorante subisce dissociazione elettrolitica):

- 10 ml soluzione alcoolica madre colorante + 90 ml H₂O distillata

- **Reagenti per colorazioni**

- Mordenzanti, sostanze che fissano il colorante od amplificano l'ingombro del campione: fenolo, soluzione iodo-iodurata

- Differenziatori, sostanze decoloranti: alcool-acetone, acido solforico al 20%

Le colorazioni in Microbiologia

Tipologie di colorazione

- **Colorazioni PROGRESSIVE**: si esegue con soluzioni molto diluite di colorante, interrompendo tempestivamente la colorazione
- **Colorazioni REGRESSIVE**: si esegue una ipercolorazione e si usa poi un differenziatore la cui azione decolorante va interrotta tempestivamente

Le colorazioni in Microbiologia

Tecniche di colorazione

- **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 differenti tipologie di microrganismi o 2 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 (1 di 2)

- ❶ Porre un'ansata di colonia (o sospensione) batterica al centro di un vetrino pulito



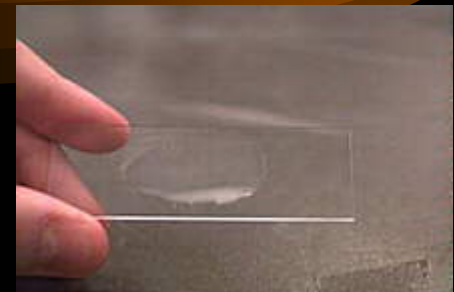
- ❷ Se si preleva il materiale da terreno agarizzato, aggiungere una goccia di acqua distillata al campione



Le colorazioni in microbiologia

Allestimento di un preparato (2 di 2)

③ Aiutandosi con un'ansa, stemperare il campione nell'acqua e stendere il preparato a coprire circa la metà della superficie del vetrino (preparazione dello smear)



④ Lasciare asciugare il preparato all'aria o tramite calore (Bunsen). Fissare il preparato passando il vetrino 4-5 volte direttamente sulla fiamma



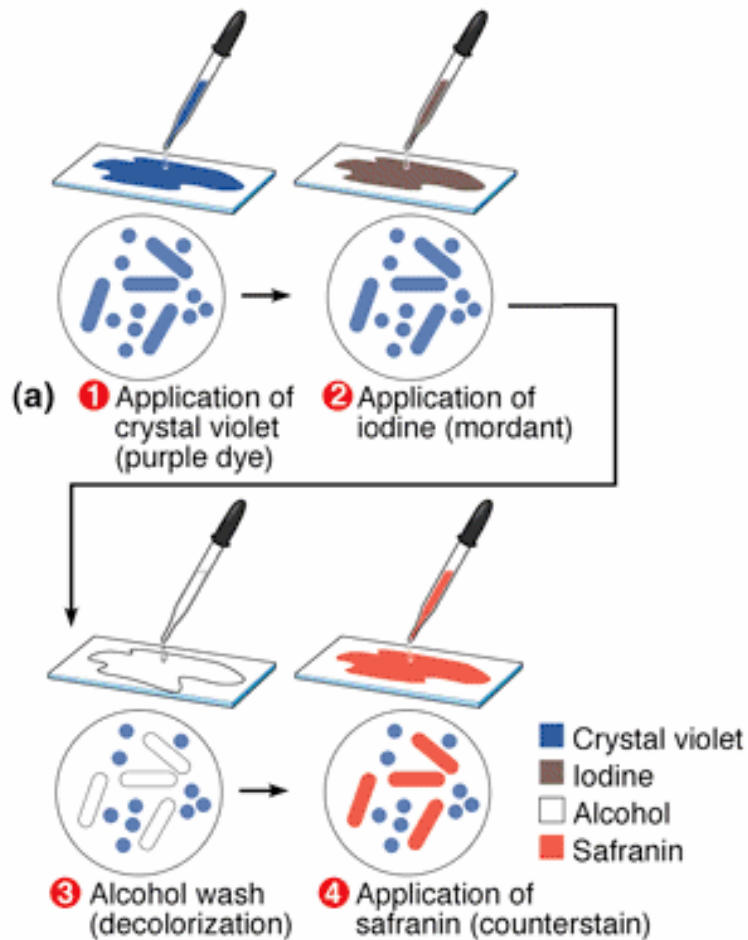
Hans Christian Joachim Gram



- Batteriologo danese ed inventore della colorazione di Gram (nel tentativo di differenziare *Klebsiella pneumoniae* dagli pneumococchi)
- Nato a Copenhagen il 13 Settembre 1853.

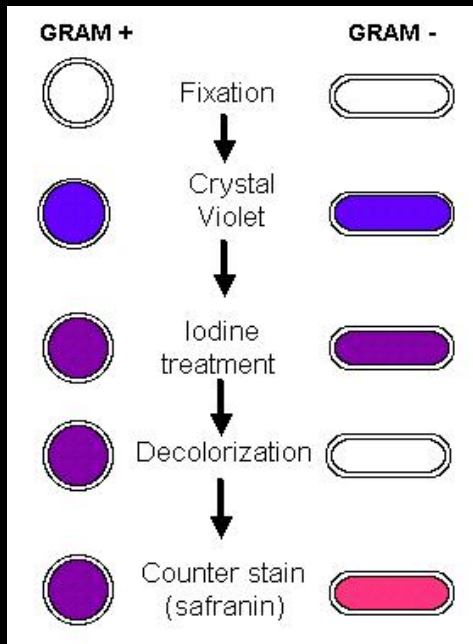
Colorazione di Gram

Tecnica

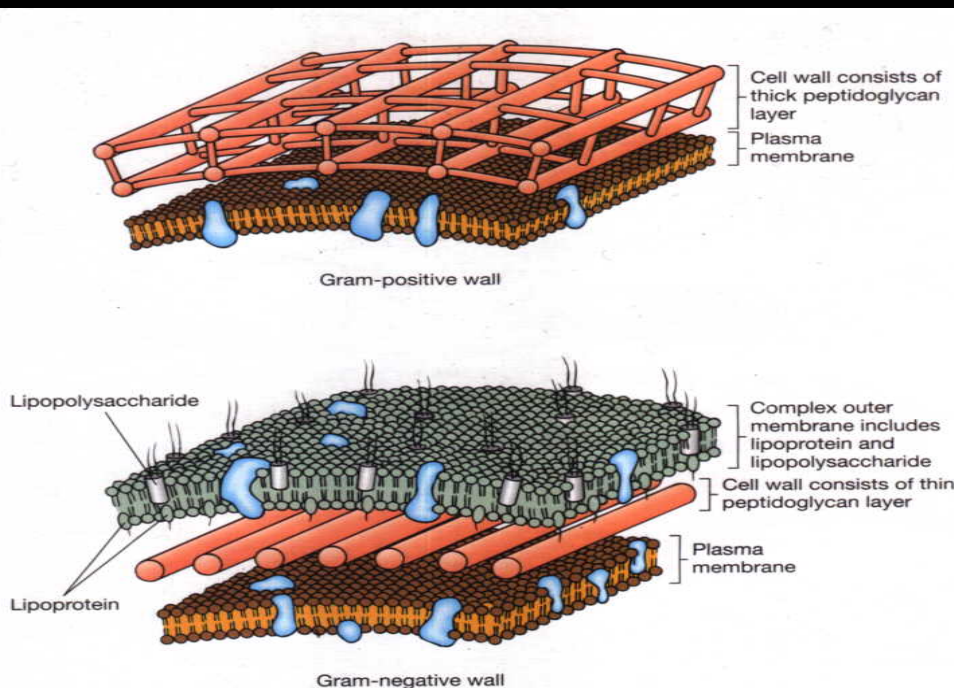


Colorazione di Gram

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, agendo come solvente lipidico, dissolve la membrana esterna della parete cellulare così permettendo il rilascio del complesso CV-I e, quindi, la decolorazione della cellula batterica.

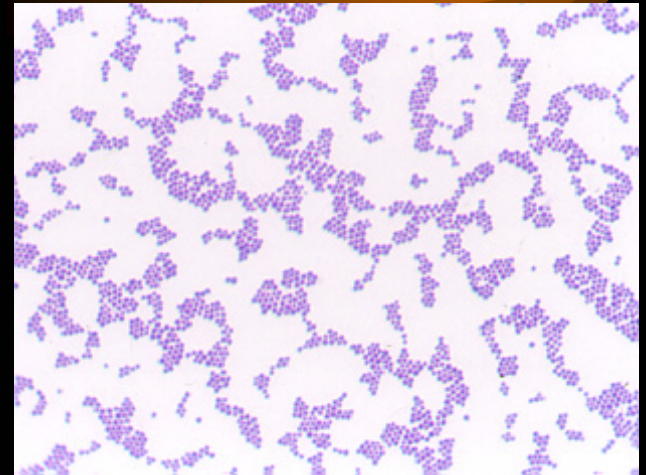


Colorazione di Gram

Osservazione microscopica

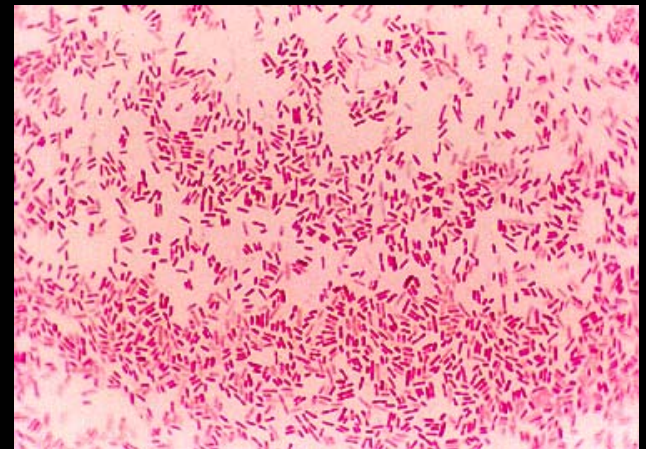
- I batteri **Gram+** appaiono blu

(Staphylococcus epidermidis)



- I batteri **Gram-** appaiono rossi

(Escherichia coli)



Colorazione di Gram

Utilità clinica (1 di 2)

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

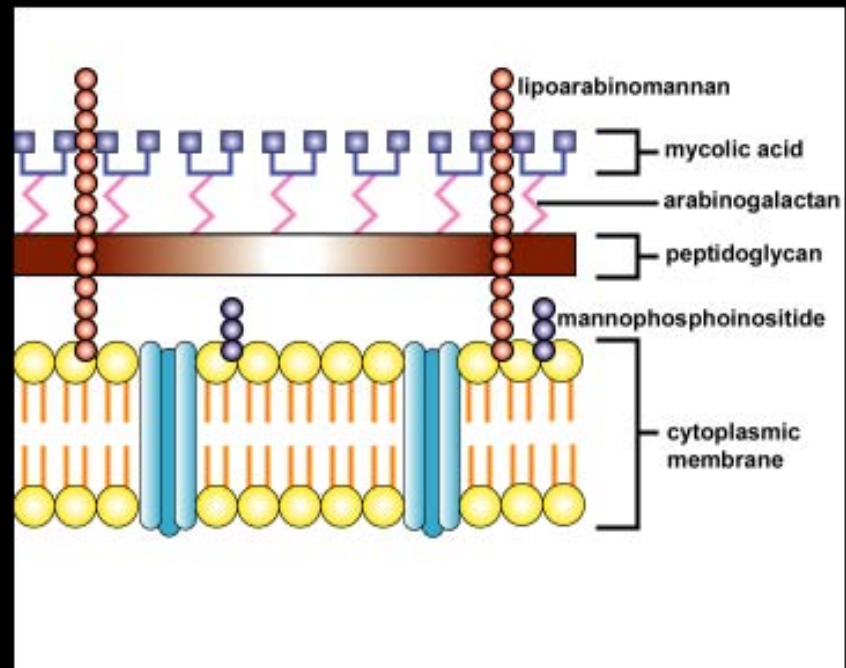
Colorazione di Gram: l'eccezione

- La colorazione di Gram non è applicabile a tutti i batteri.
- Esempi consistono nel *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*
- Incapacità di colorare per la natura “cerosa” dell’involucro esterno, altamente impermeabile ai coloranti
- Colorazione di Ziehl-Nielsen

Mycobacterium spp.

Parete cellulare

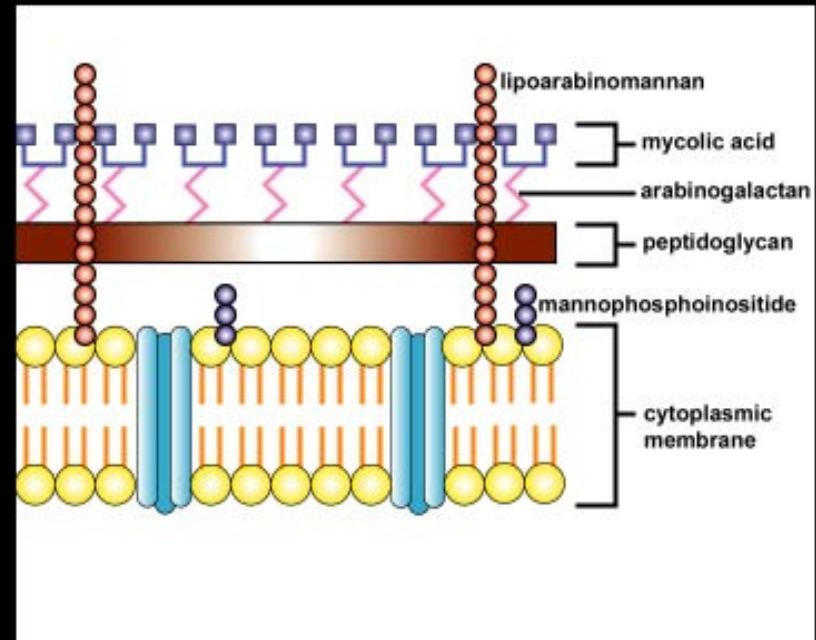
- **Composizione:**
 - Grosse quantità di glicolipidi:
 - acido micolico (60%)
 - complessi lipidi-arabinogalattani
 - lipoarabinomannani
 - Scarso petidoglicano



Mycobacterium spp.

Parete cellulare

- Funzioni:
 - Forma e prevenzione lisi osmotica (peptidoglicano)
 - Inibizione ingresso composti chimici
 - Crescita lenta
 - Maggiore resistenza agli agenti chimici
 - Maggiore resistenza alla fagocitosi
 - Induzione sintesi citochine (TNF- α) da parte dell'acido micolico



Le colorazioni in microbiologia

Colorazione di Ziehl-Neelsen

- Presenza caratteristica di **ceramidi** e **fosfolipidi** alla superficie cellulare di *Mycobacterium spp.* e *Nocardia spp.*
- I coloranti ordinari non possono superare lo strato cerato.
- Colorazioni con la tecnica per l'acido-resistenza:
 - Kinyoun
 - Ziehl-Neelsen

Colorazione di Ziehl-Neelsen

Tecnica (1 di 2)

Step 1:

- Versare la **fucsina basica**



Step 2:

- Fare evaporare scaldando il colorante alla fiamma per 5 min
- Lavare con acqua



Colorazione di Ziehl-Neelsen

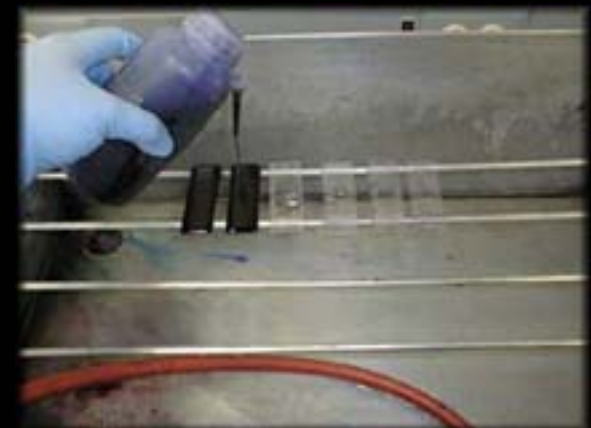
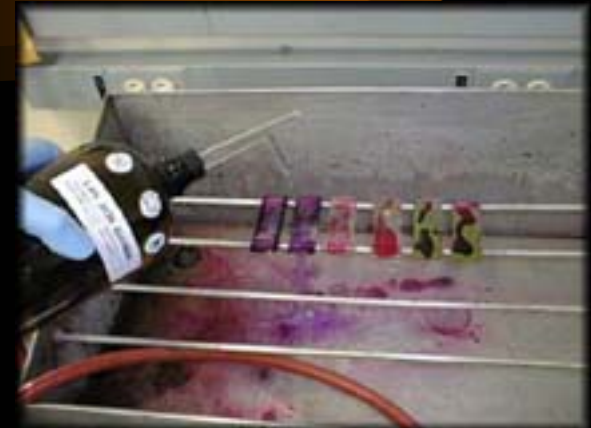
Tecnica (2 di 2)

Step 3:

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

Step 4:

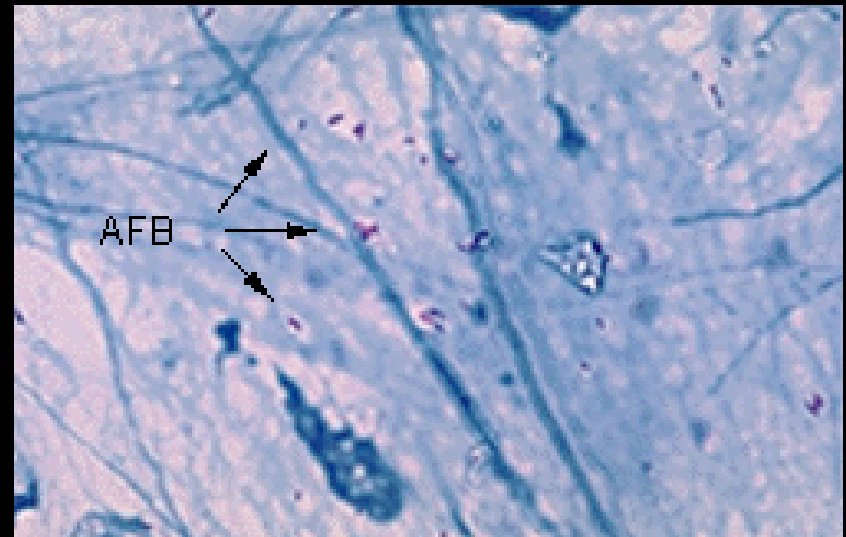
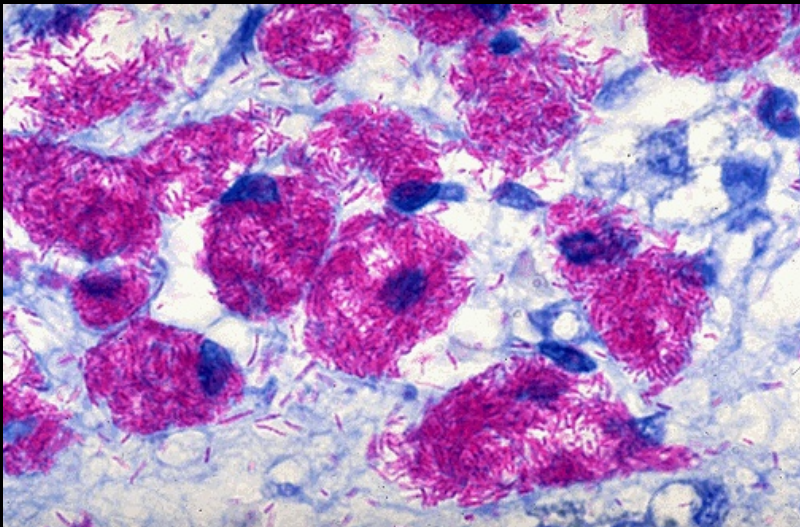
- Contrastare con **blu di metilene** per 1-2 min
- Lavare con acqua



Colorazione di Ziehl-Neelsen

Osservazione microscopica

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



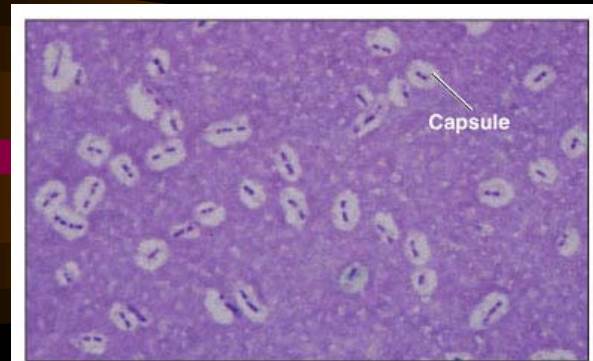
Le colorazioni in Microbiologia

Colorazioni speciali

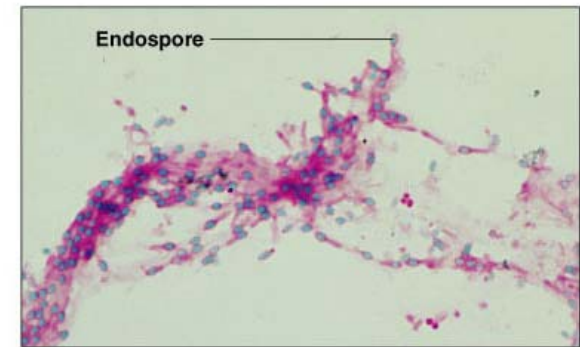
La **colorazione negativa** viene usata quando un organismo od una sua struttura non viene colorata facilmente come, ad esempio, in presenza di capsula.

La **colorazione delle spore** richiede calore per facilitare la penetrazione del colorante

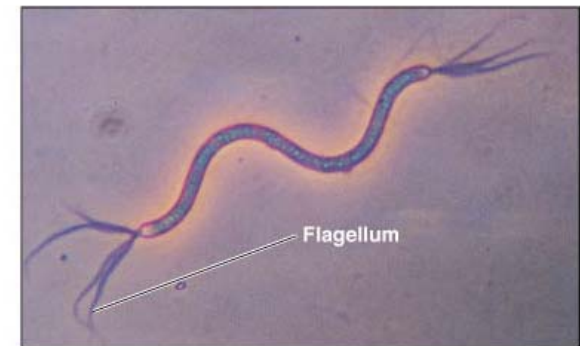
La **colorazione dei flagelli** richiede un mordenzante per ispessire la struttura flagellare



(a) Negative staining.



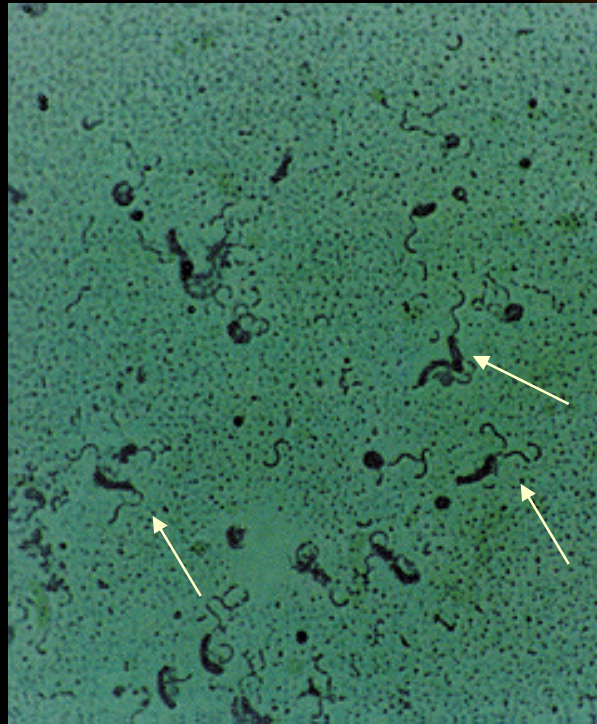
(b) Endospore staining.



(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)