



TECNICHE DI LABORATORIO: Colorazione di Gram

Prof.ssa Vivian Tullio



COLORAZIONE DI GRAM

fondamentale per l'analisi batteriologica

- ❑ **nella pratica clinica ha inoltre un'alta valenza prediagnostica**
- ❑ **Non è applicabile ad alcuni batteri, quali i bacilli acido resistenti (i Micobatteri necessitano infatti di una colorazione specifica)**
- ❑ **Inefficace su miceti filamentosi**
- ❑ **I lieviti si colorano di blu**





Che cos'è e come funziona



- ❑ Questa tecnica deve il suo nome al proprio inventore, il medico danese **Hans Christian Gram**, che fu direttore della Clinica di Copenaghen nella seconda metà dell'Ottocento e la mise a punto nel 1884.
- ❑ E' una colorazione cosiddetta **Differenziale o di contrasto**.



Che cos'è e come funziona

□ Si basa sulla diversa reattività tintoriale che le specie batteriche presentano quando sono trattate

➔ con il colorante primario, di natura basica, il **CRISTALVIOLETTO**

➔ e vengono successivamente sottoposte al **MORDENZANTE** (una sostanza che aumenta il fissaggio del colore), ovvero il **Reattivo di Lugol** (una soluzione acquosa iodo-iodurata).

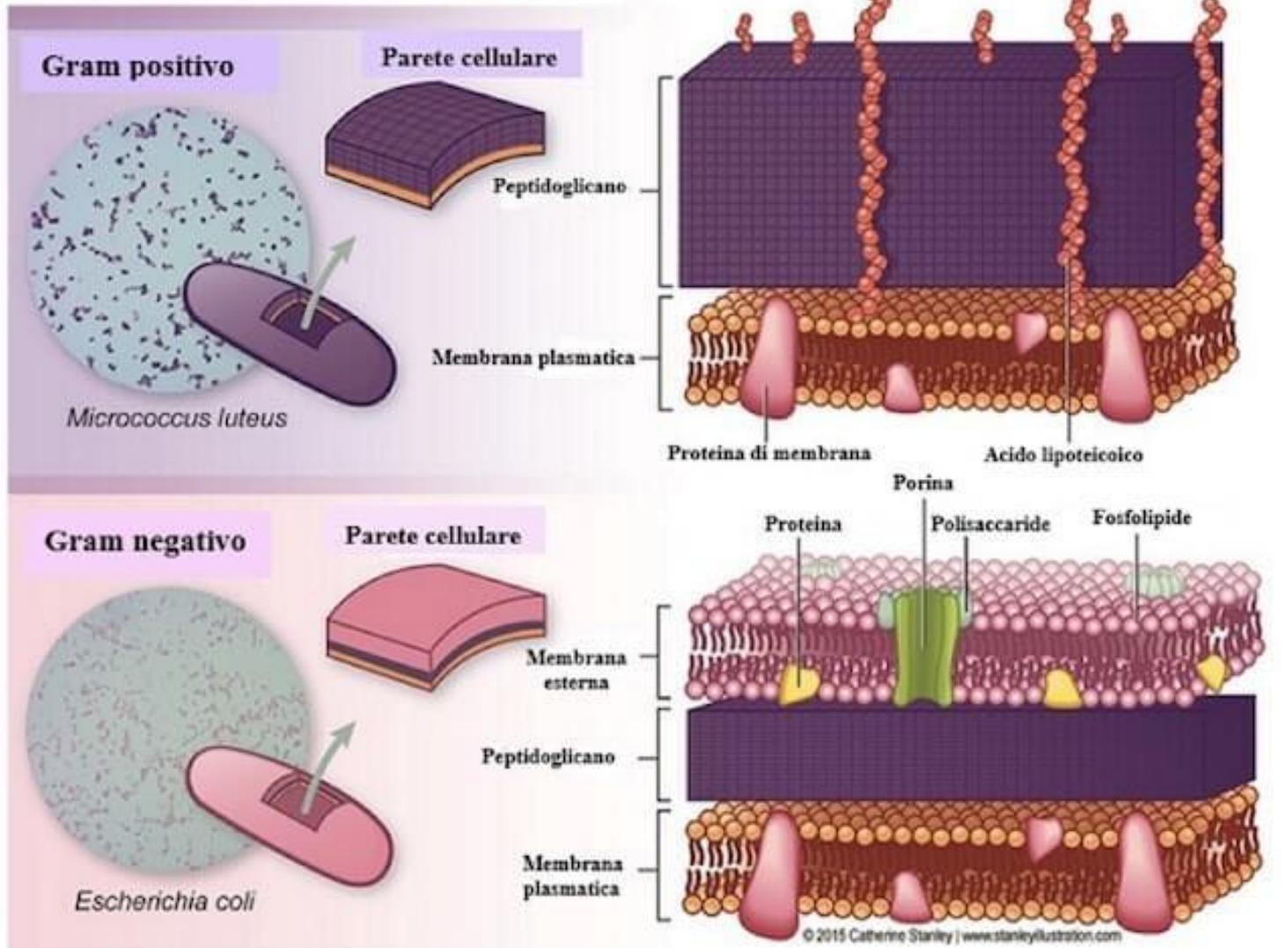
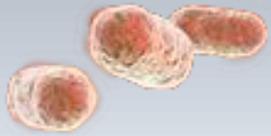
Come tutti i coloranti basici, il cristalvioletto ha molti gruppi cationici (carichi positivamente) ed ha elevata affinità con la superficie delle cellule batteriche, carica **negativamente**



Che cos'è e come funziona

- ❑ Quando il campione è trattato con il colorante primario, tutti i batteri si colorano di blu-viola.
- ❑ Per poter distinguere tra "Gram positivi" e "Gram negativi" occorre il Reattivo di Lugol.
 - ➔ Il cristalvioletto reagisce con lo iodio del mordenzante, formando un grosso complesso che precipita all'interno delle trabecolature della parete cellulare.
 - ➔ Più la parete è spessa e rigida, ricca in peptidoglicano (Gram positivi), più tratterrà il complesso Lugol-colorante

Che cos'è e come funziona





Che cos'è e come funziona

□ Particolare importanza ha il **DECOLORANTE** base di **ALCOL-ACETONE** (solventi organici), utilizzato per il lavaggio che rimuove l'eccesso di colorante.

→ Quando si rimuove l'eccesso di colorante e Lugol con il **DECOLORANTE**, il peptidoglicano si disidrata e condensa, trattenendo il complesso che conferisce il colore.



Che cos'è e come funziona

- ➔ I "Gram positivi" si colorano in blu-viola
- ➔ mentre i "Gram negativi", meno ricchi in peptidoglicano e con più composti lipidici, non trattengono il colorante.
Se trattati con alcol-acetone (che dissolve la componente lipidica più esterna della parete), rilasciano il colorante e risultano incolori.
- ➔ Per vederli, si utilizza un secondo colorante di contrasto, la FUXINA (che li colora in ROSA-LILLA).



ALLESTIMENTO PREPARATO BATTERICO

PROCEDIMENTO

- Depositare una goccia del campione da colorare su un vetrino **PORTAOGGETTO** e lasciare asciugare a lato della fiamma del bunsen
- Fissare alla fiamma per 3 secondi (contare dicendo 451-452-453)
- Con un contagocce, disporre il **CRISTALVIOLETTO** sul vetrino (coprire il campione) e lasciar agire 1 minuto
- **NON LAVARE** ma aggiungere il **REATTIVO DI LUGOL** per 30 secondi
- Lavare con acqua per rimuovere l'eccesso di colorante e mordenzante





ALLESTIMENTO PREPARATO BATTERICO

- Aggiungere alcune gocce di **DECOLORANTE** per 20 secondi
- Lavare con acqua
- Con un contagocce, aggiungere il **COLORANTE DI CONTRASTO** (la fuxina) (coprire il campione) e lasciar agire 1 minuto
- Lavare con acqua e asciugare il vetrino tamponando con carta bibula senza strisciare
- Aggiungere 1 goccia di **OLIO PER IMMERSIONE** e osservare a 100x (oculare 10x → 1000x)



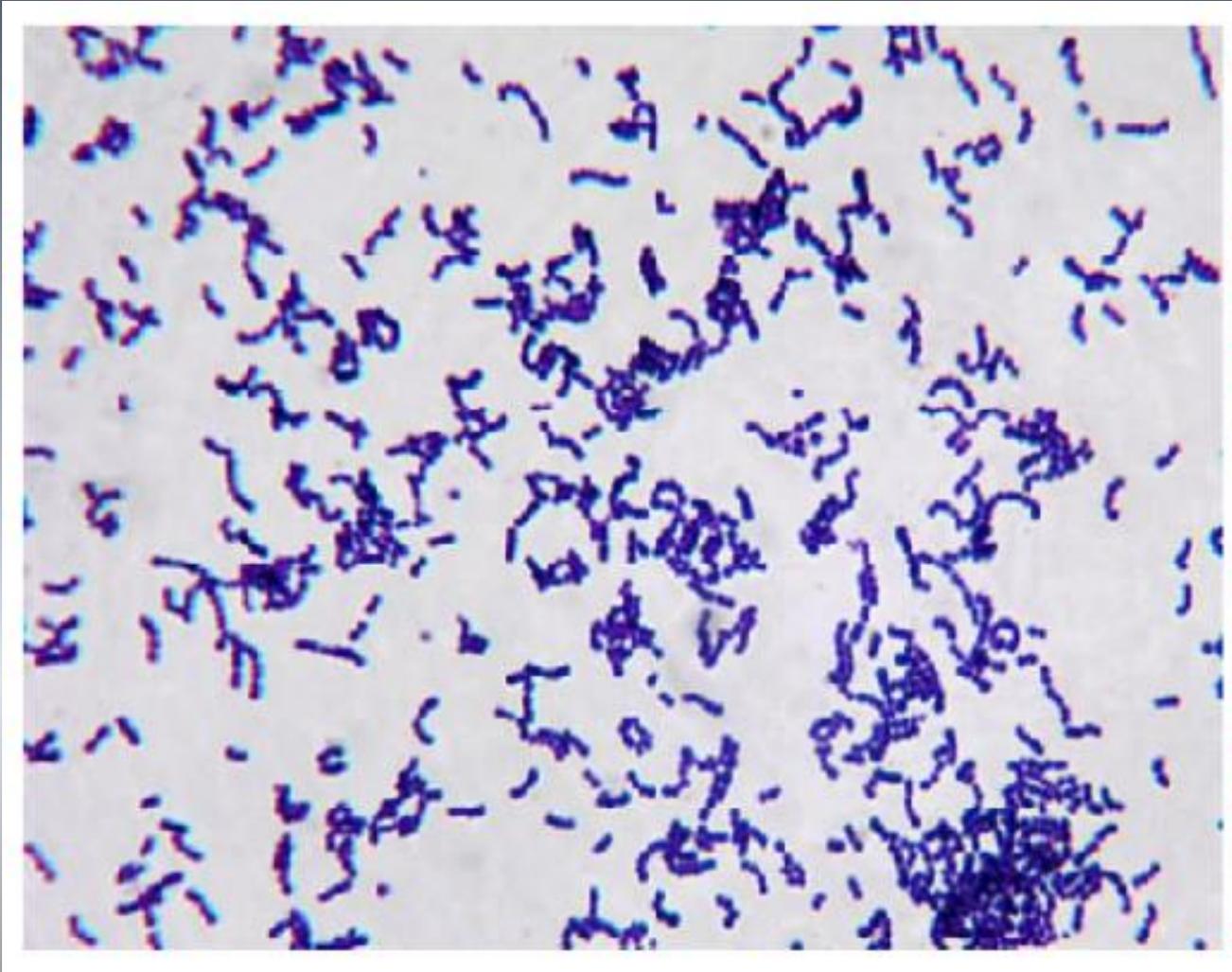


Che cos'è e come funziona

→ la colorazione di Gram viene utilizzata nella normale pratica clinica, come prima fase dello screening di un campione biologico per individuare ed identificare eventuali microrganismi patogeni presenti



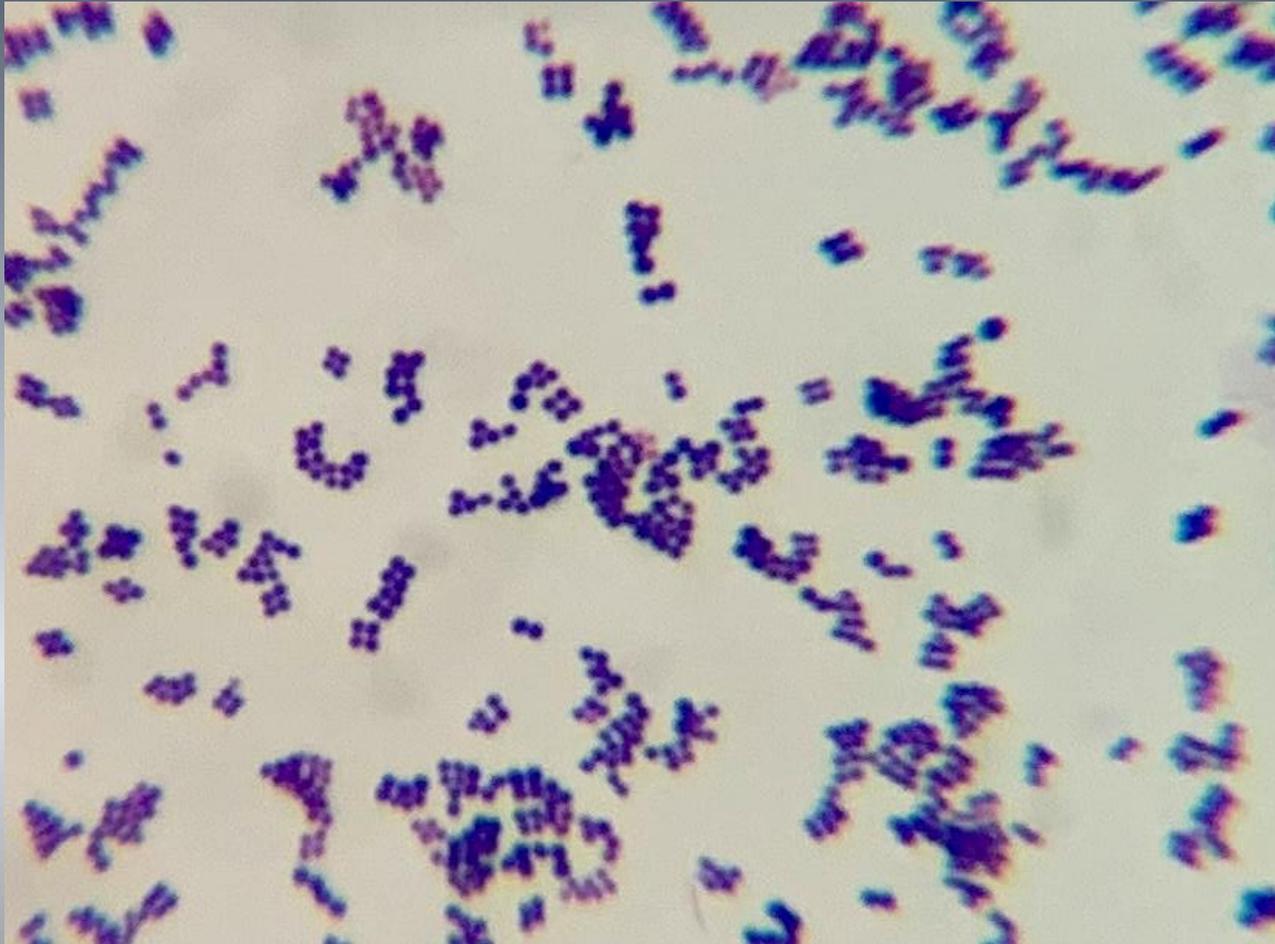
Che cos'è e come funziona



Cocchi Grampositivi



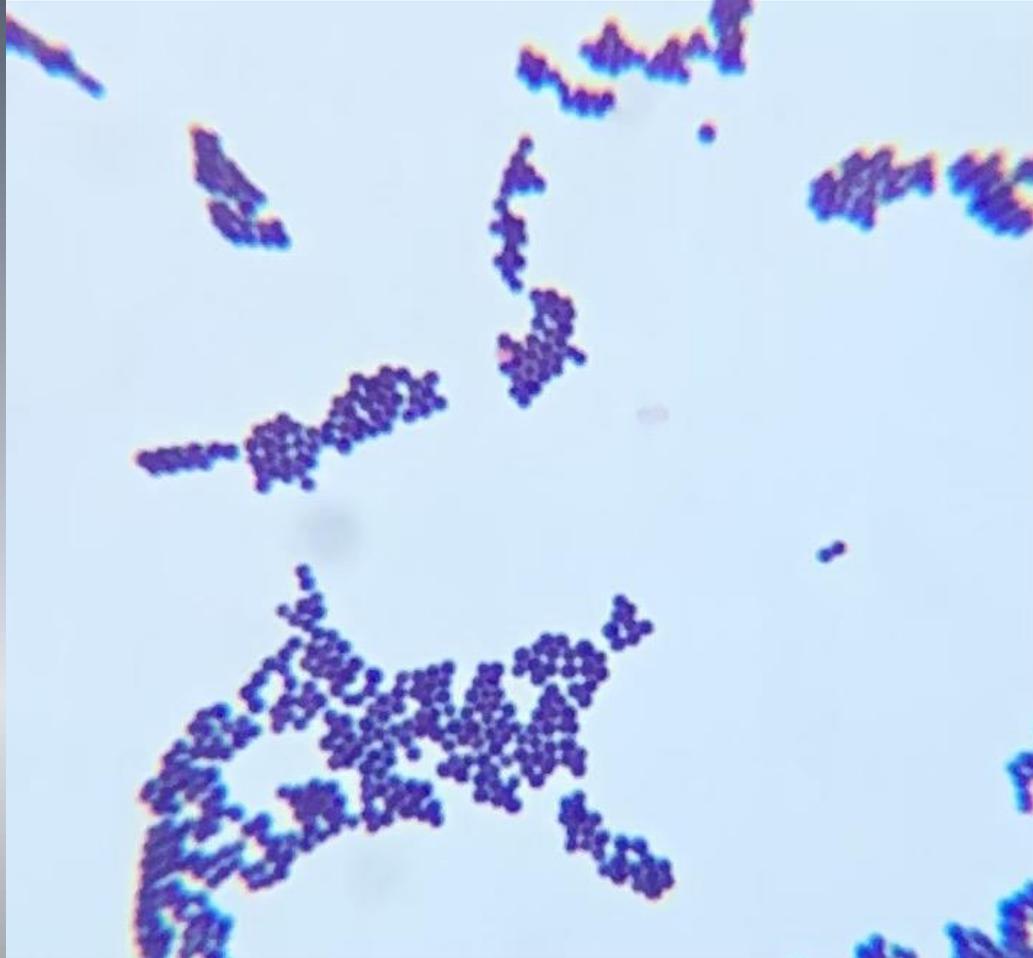
Che cos'è e come funziona



Cocchi Grampositivi -stafilococchi



Che cos'è e come funziona



Cocchi Grampositivi -stafilococchi



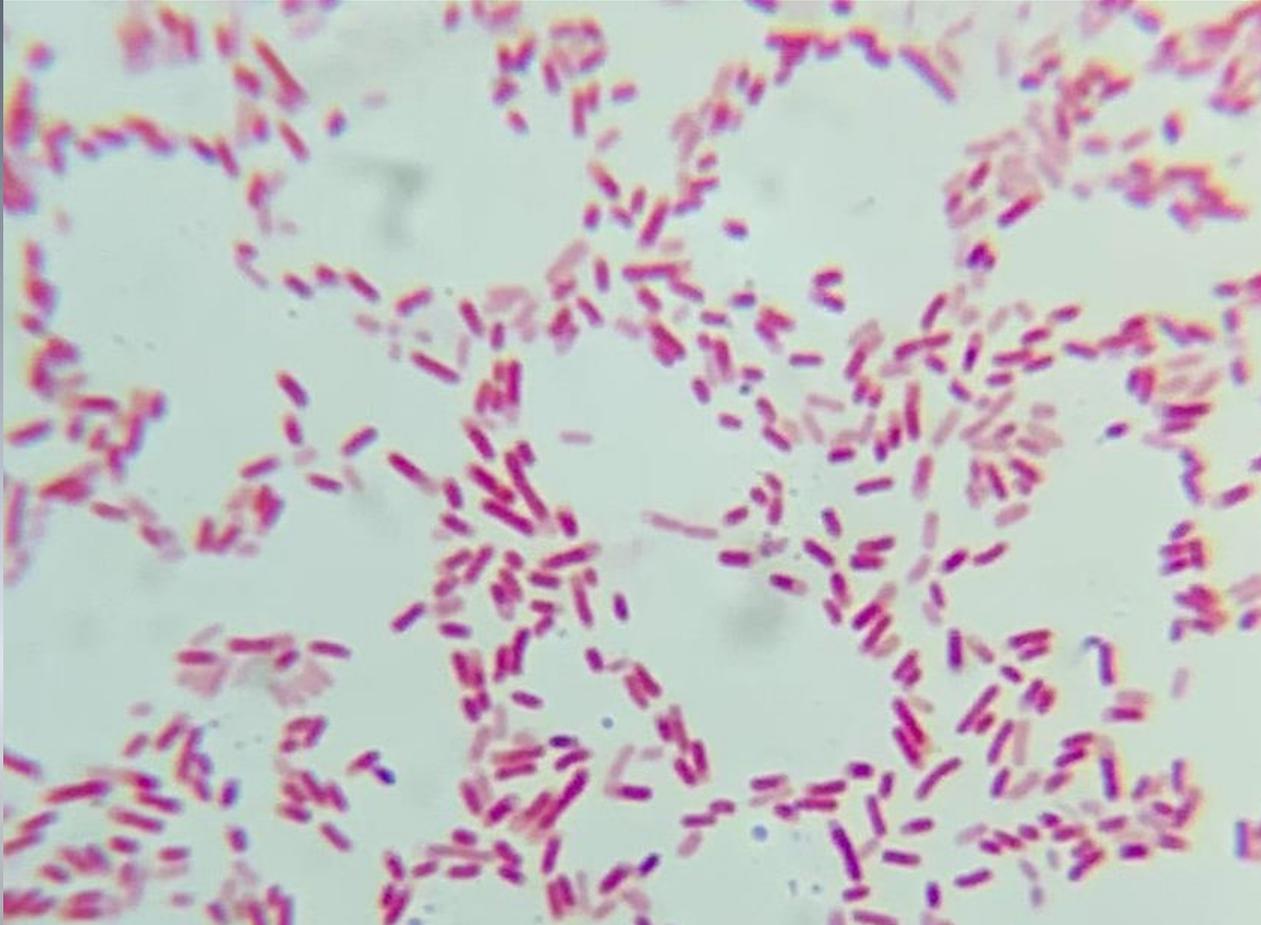
Che cos'è e come funziona



Cocchi Grampositivi a catenella



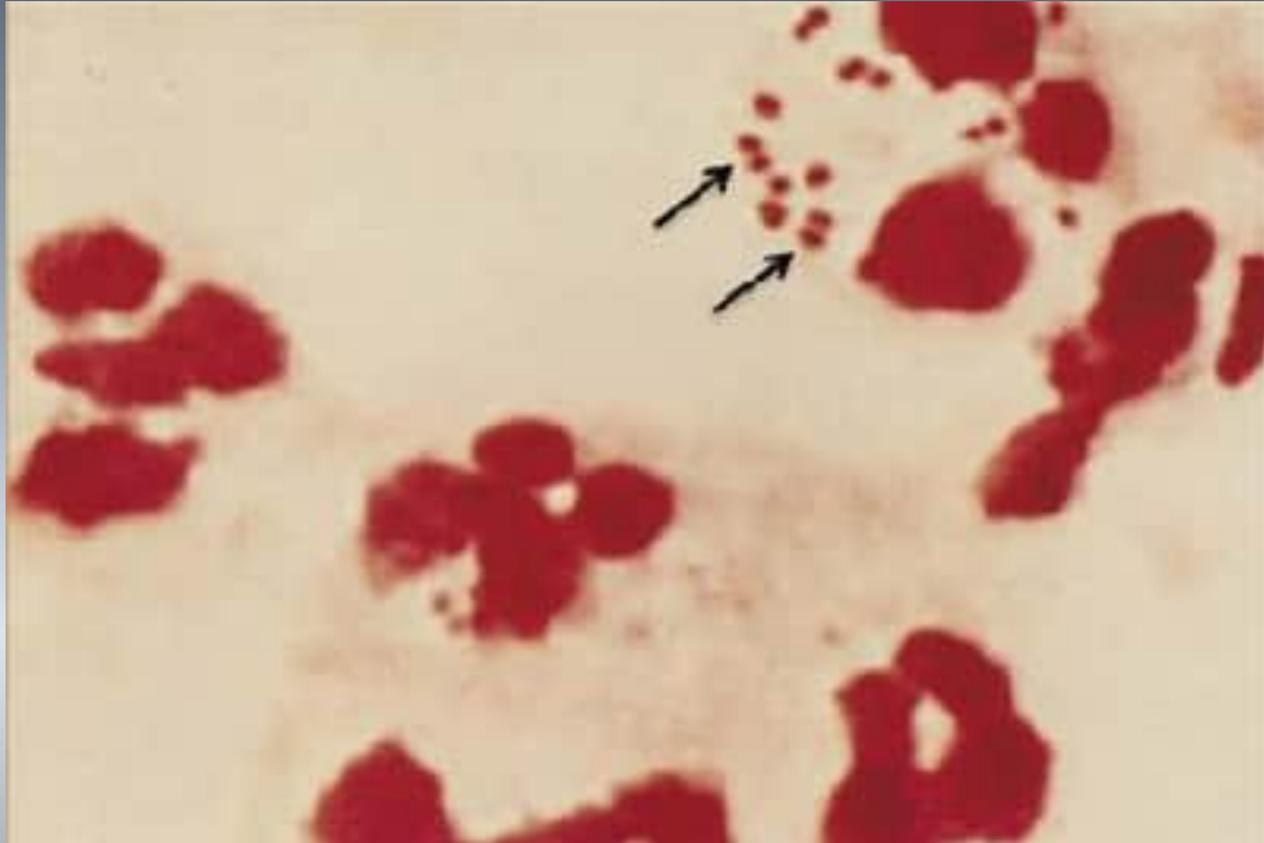
Che cos'è e come funziona



Bacilli Gramnegativi



Che cos'è e come funziona



Cocchi Gramnegativi- *Neisseria*



OSSERVAZIONE A FRESCO

PROCEDIMENTO

❖ Per preparato a fresco si intende un preparato che viene allestito per una singola osservazione o al massimo per osservazioni subito successive

❖ MATERIALE OCCORRENTE

- Vetrino portaoggetti
- Acqua distillata sterile
- Campione (una piccola porzione di colonia o brodocoltura, ecc.)
- Ansa o pipetta Pasteur
- Vetrino coprioggetto 24x24mm



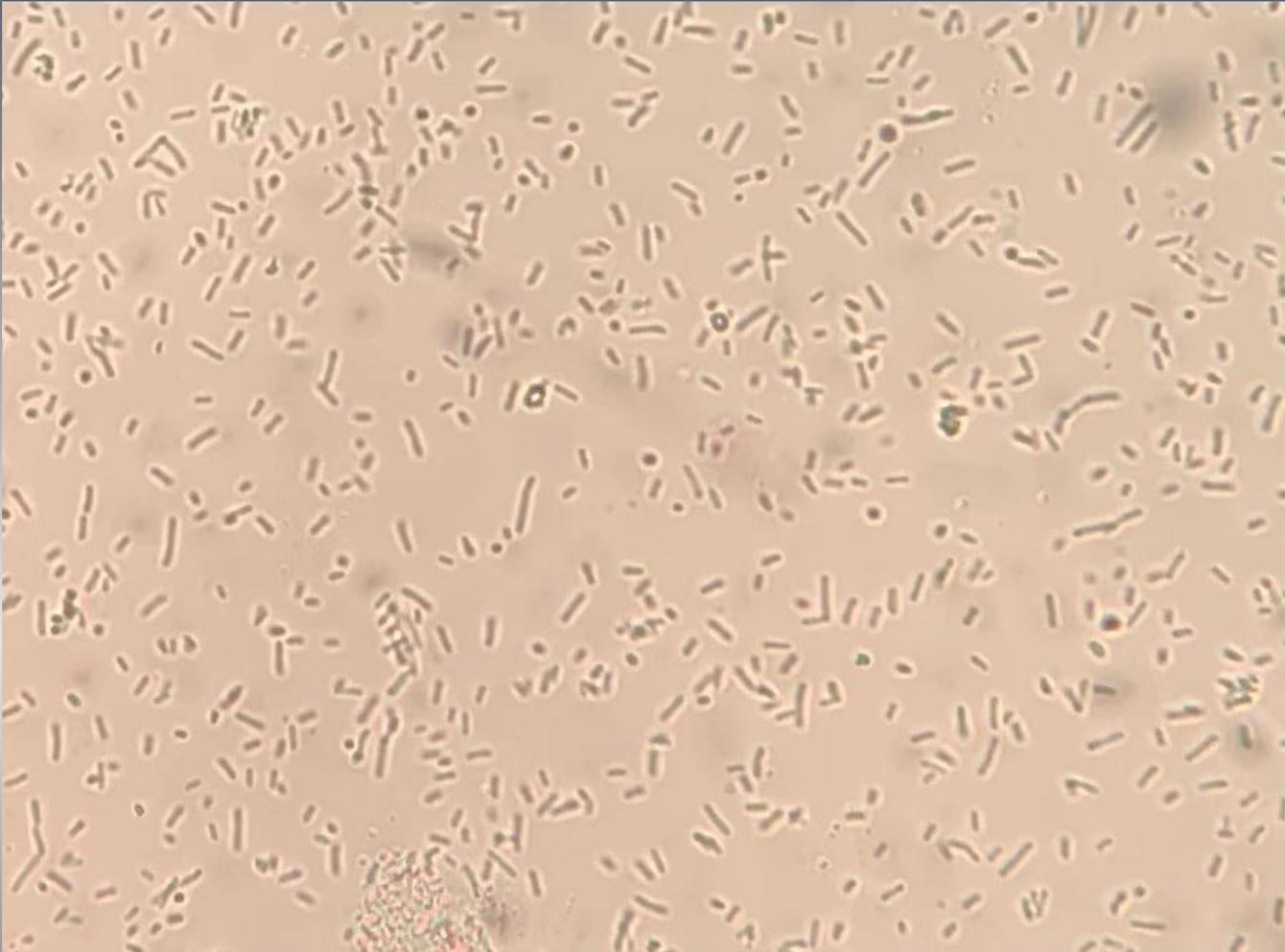
OSSERVAZIONE A FRESCO

PROCEDIMENTO

- ❖ Si prepara ponendo il campione su una goccia d'acqua preventivamente posizionata su di un vetrino portaoggetti e ricoperto con un vetrino coprioggetti.
- ❖ Un preparato a fresco non viene fissato, quindi non può essere conservato per lunghi periodi.
- ❖ I preparati a fresco possono essere colorati (es. blu di lattofenolo) o trattati con KOH per sciogliere materiale proteico (es. unghie) e vedere miceti



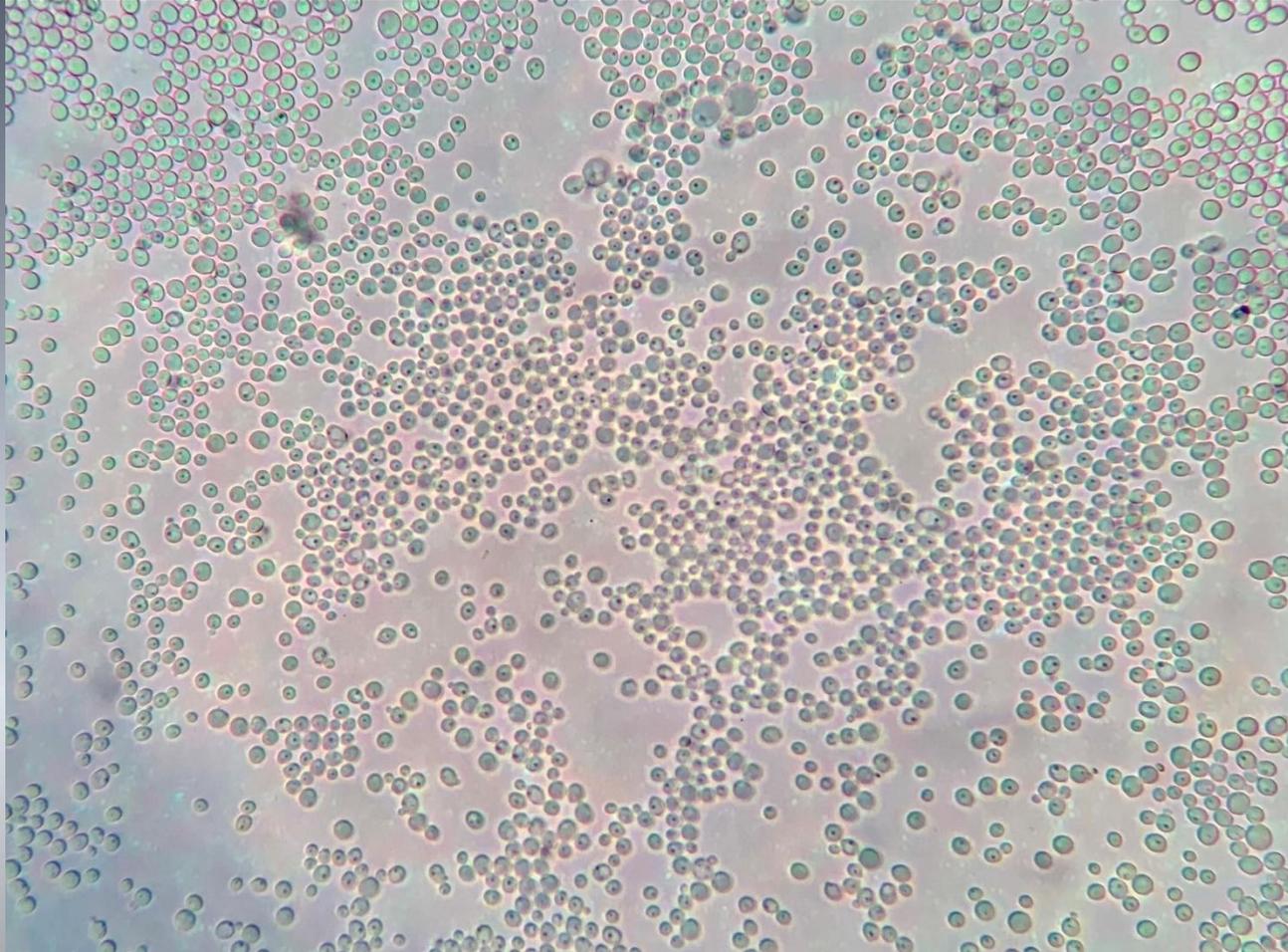
OSSERVAZIONE A FRESCO



Batteri a fresco



OSSERVAZIONE A FRESCO



Lieviti a fresco



EFFICACIA ANTIMICROBICI

METODI PER DETERMINARE L'EFFICACIA ANTIMICROBICA DI UN PRINCIPIO ATTIVO

(es. antibiotici, estratti vegetali, oli essenziali, ecc.)



EFFICACIA ANTIMICROBICI

METODI PER DETERMINARE LA SENSIBILITÀ DEI MICRORGANISMI AI FARMACI

1) METODI BASATI SULLA DILUIZIONE
DELL'ANTIBIOTICO (terreno liquido)

determinazione della

Minima Concentrazione Inibente

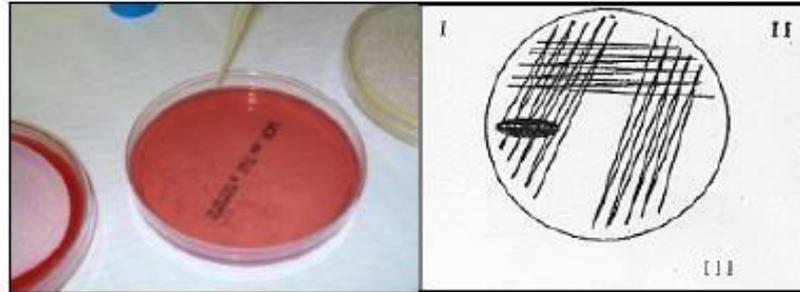
(MIC)

2) METODI BASATI SULLA DIFFUSIONE IN AGAR
(terreno solido)

Kirby-Bauer

CAMPIONE BIOLOGICO

SEMINA



IDENTIFICAZIONE MACROSCOPICA
PRESUNTIVA DELL' AGENTE ETIOLOGICO
E SUO ISOLAMENTO



Esame della purezza delle colonie



MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC)

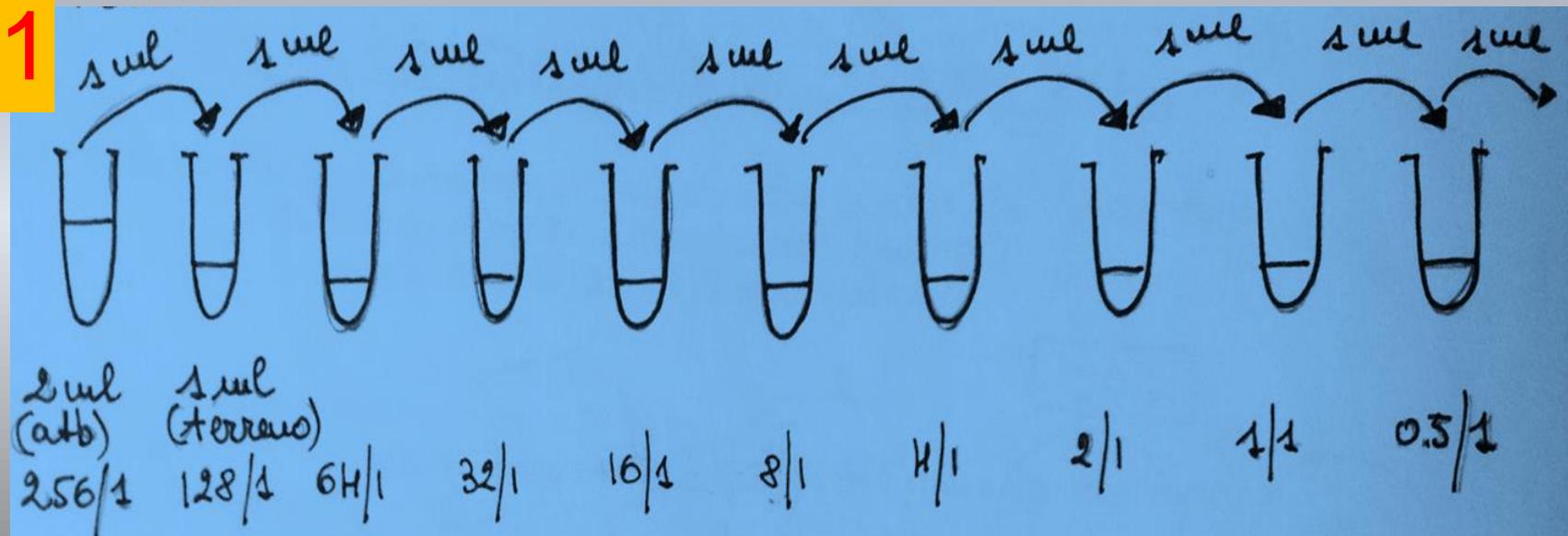
Tecnica delle diluizioni scalari

- La sensibilità del microrganismo viene valutata in base alla sua crescita o meno in un terreno di coltura con diverse concentrazioni di antibiotico.
- Pesare il farmaco (circa 20-30 mg)
- Aggiungere diluente (10 ml soluz fisiologica, NaOH) per sciogliere la polvere
- Aggiungere brodo colturale e diluire fino ad avere una concentrazione pari a 256 mcg/ml (soluzione madre)
- Parallelamente allestire una serie di provette (almeno 10) contenente ognuna, eccetto la prima, 1 ml di brodo colturale
- Nella 1 provetta aggiungere 2ml della soluzione madre di farmaco (256/1)

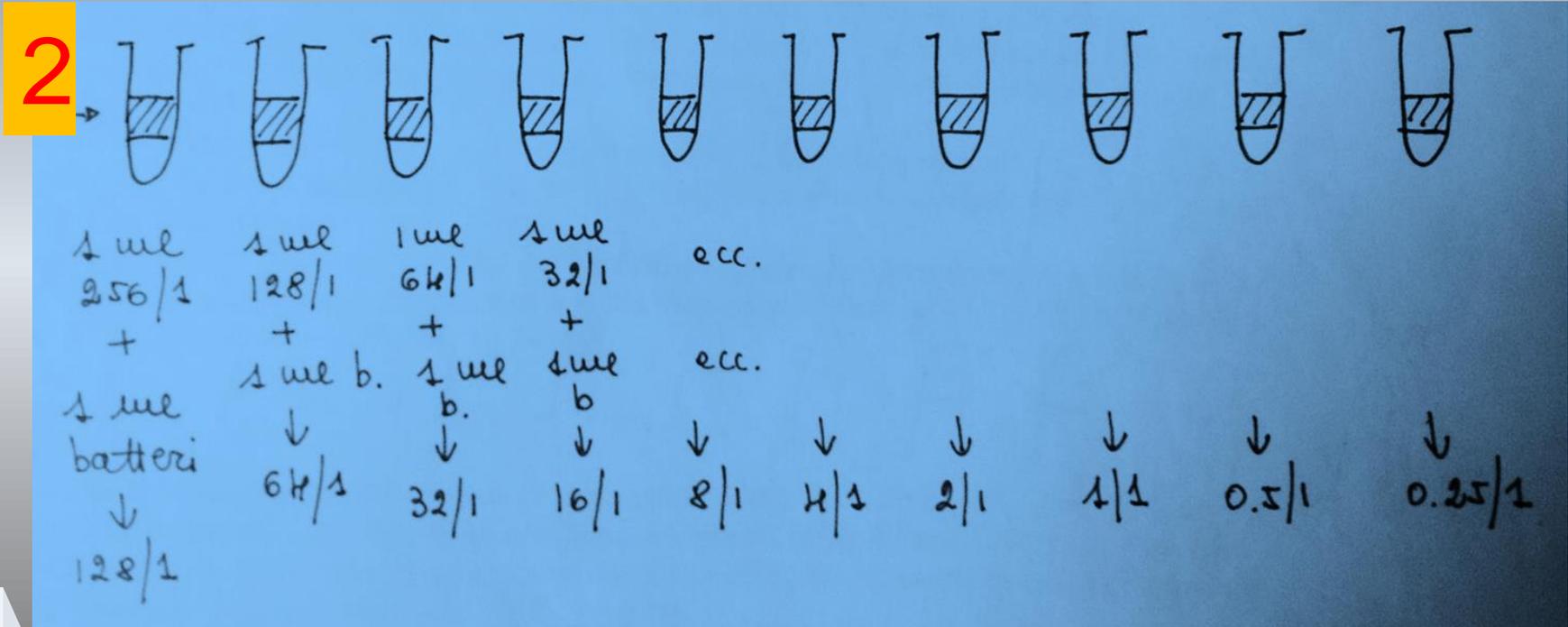
Tecnica delle diluizioni scalari

- Eseguire diluizioni scalari del farmaco (diluizioni al «raddoppio» perché in ogni provetta avremo metà concentrazione rispetto alla precedente o il doppio rispetto alla successiva).
- Prelevare 1 ml dalla 1° provetta e metterlo nella 2°, mescolare agitando; dalla 2° provetta prelevare 1 ml e metterlo nella 3° e così via fino all'ultima. Dall'ultima provetta si preleva 1 ml e lo si elimina [1]

1



- Insemenzare ogni provetta con 1 ml della sospensione batterica in esame alla concentrazione standard di 10^5 batteri/ml (aggiungendo 1 ml di batteri il farmaco sarà ulteriormente diluito 1:1)[2]. Agitare

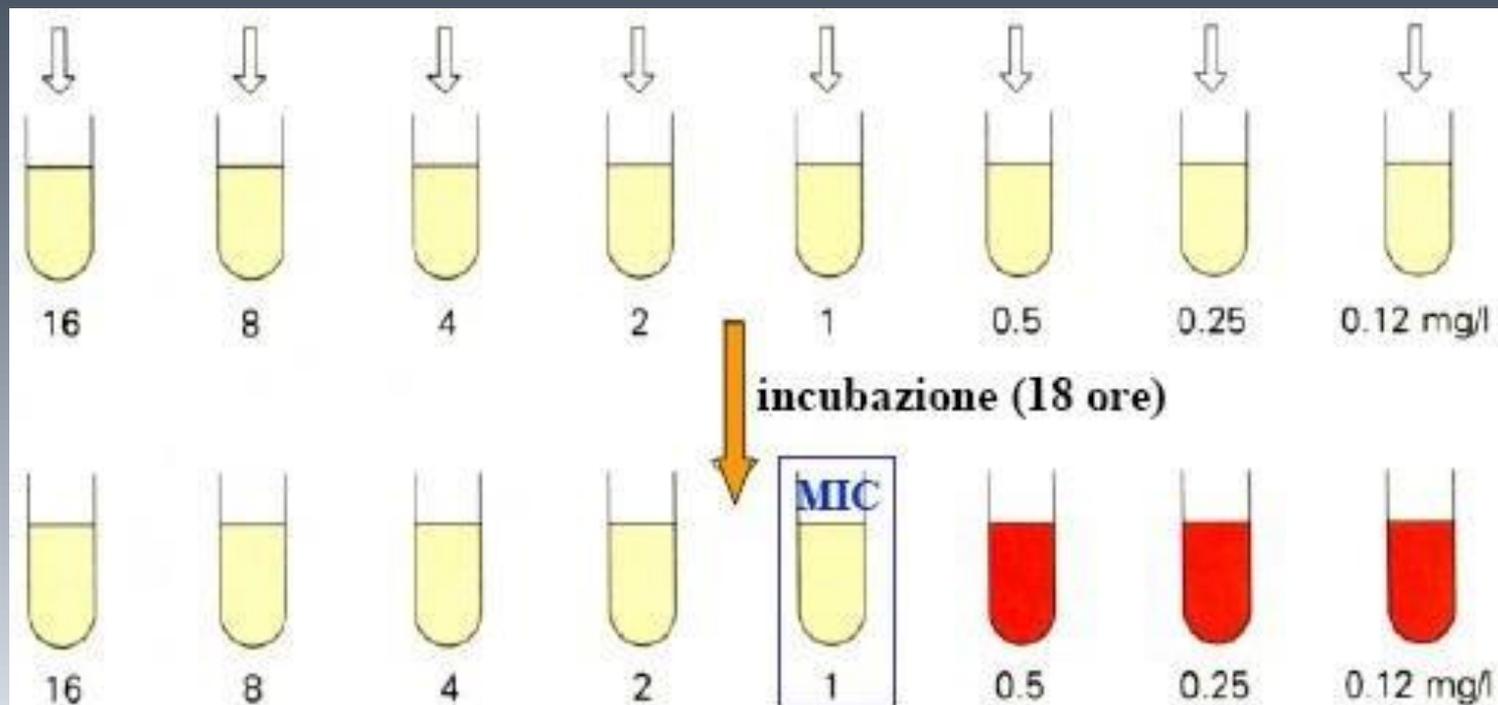




EFFICACIA ANTIMICROBICI

MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC)

- **Lettura.** Le provette con concentrazione bassa di antibiotico sono torbide per avvenuta crescita batterica, quelle a concentrazione più elevata sono limpide
- **La concentrazione più bassa di antibiotico che porta ad assenza di crescita visiva dopo 18-24 ore di incubazione è la MIC.**

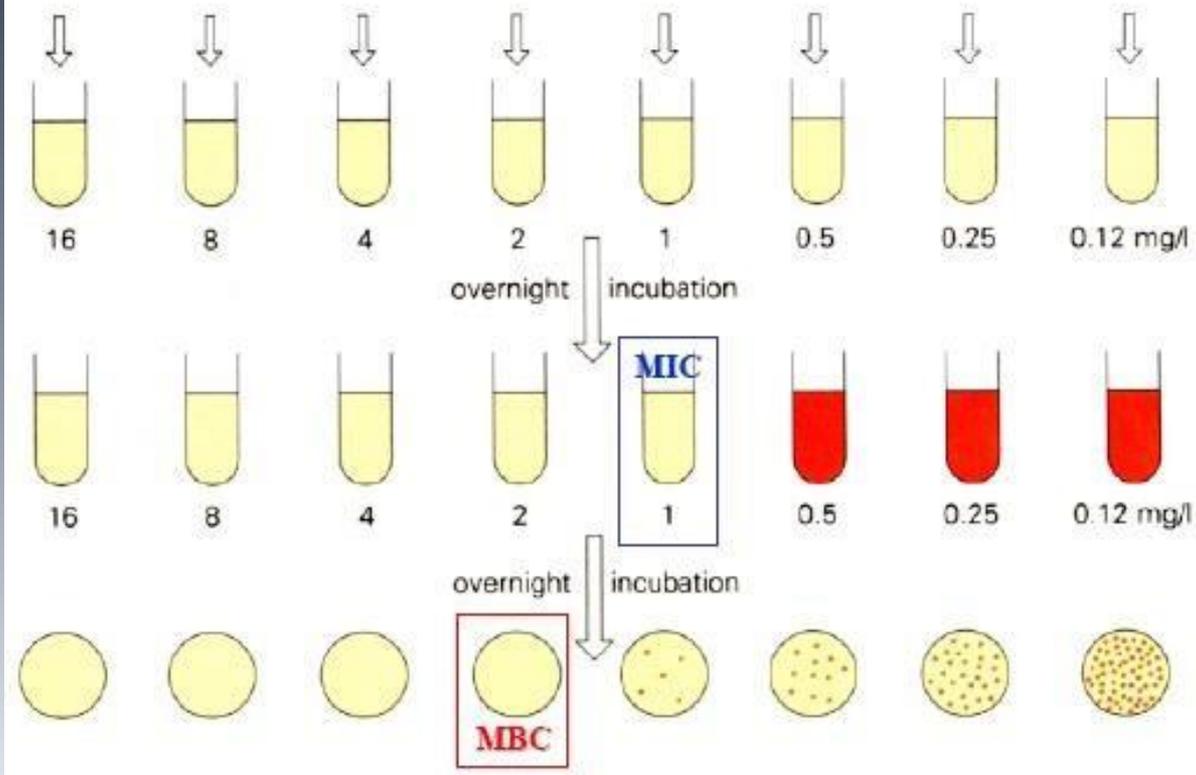


Dopo 18 ore di incubazione, le provette vengono controllate per la presenza di una crescita batterica visibile (torbidità): l'assenza di torbidità visibile del terreno di coltura denota un'inibizione completa della crescita microbica.



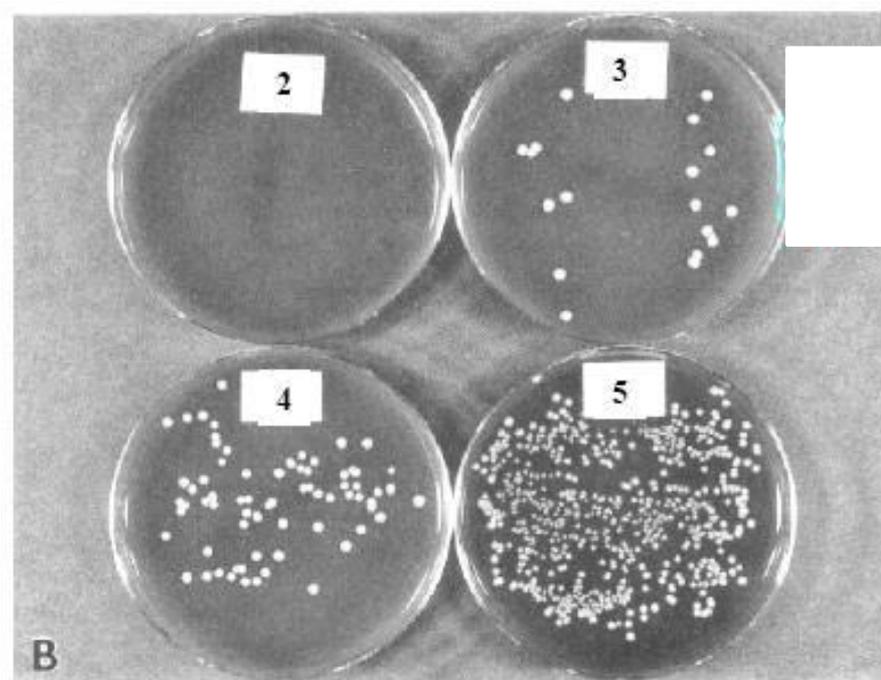
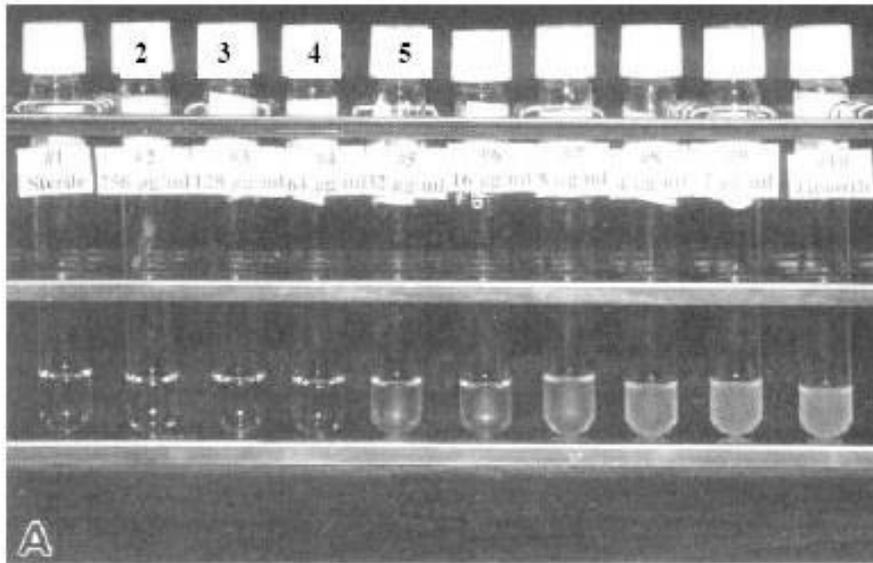
MIC (Minimum Inhibiting Concentration; minima concentrazione inibente) La concentrazione più bassa del composto in esame necessaria per inibire la crescita di un dato organismo.

Saggio di MIC e MBC



MBC (Minimum Bactericidal Concentration; minima concentrazione battericida) La concentrazione più bassa del composto in esame necessaria per provocare la morte di più del 99.9% di un dato organismo.

Concentrazione minima battericida (MBC)

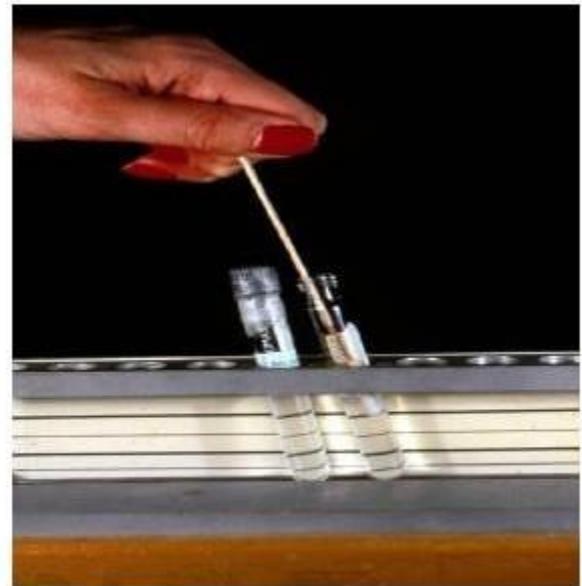


TEST DI DISCO DIFFUSIONE SU AGAR

TEST DI KIRBY-BAUER



Seleziona le colonie



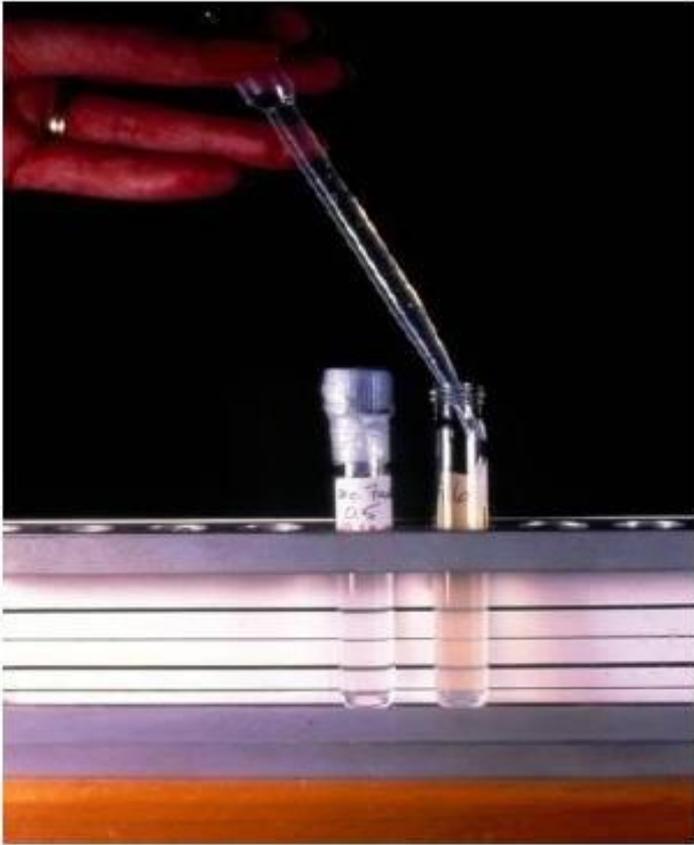
Prepara l'inoculo

PROCEDIMENTO

Test di sensibilità agli antibiotici

- Preparazione dell'inoculo
- Standard di McFarland (torbidità)

Standard 0,5 (99,5 ml di ac solforico 1%+ 0,5 ml di cloruro di bario 1,175%) ha una torbidità corrispondente a sospensione batterica $1,5 \times 10^8$ CFU/ml



Standardizza l'inoculo

Preparare la sospensione del batterio in esame confrontando la torbidità con quella di una sospensione standard (0.5 gradi della scala McFarland) che = 10^8 cellule/ml **INOCULO STANDARD**

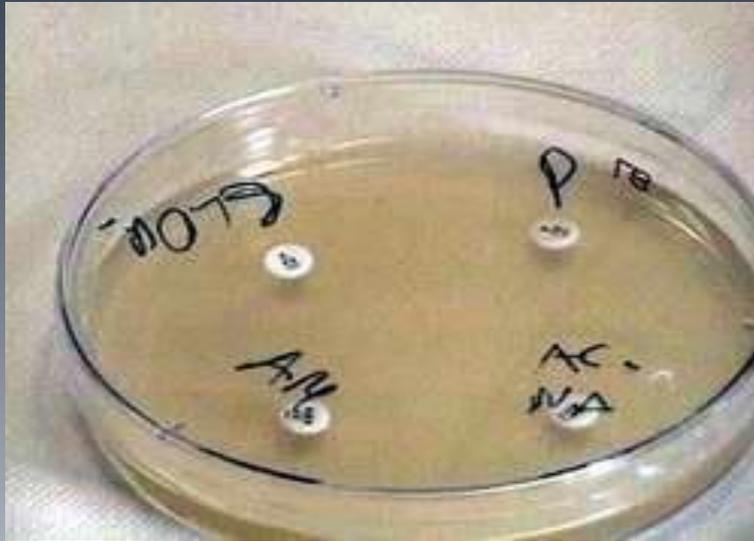
Terreno agarizzato = **Mueller Hinton agar**, terreno standard



Immergi il tampone

Striscia sulla piastra



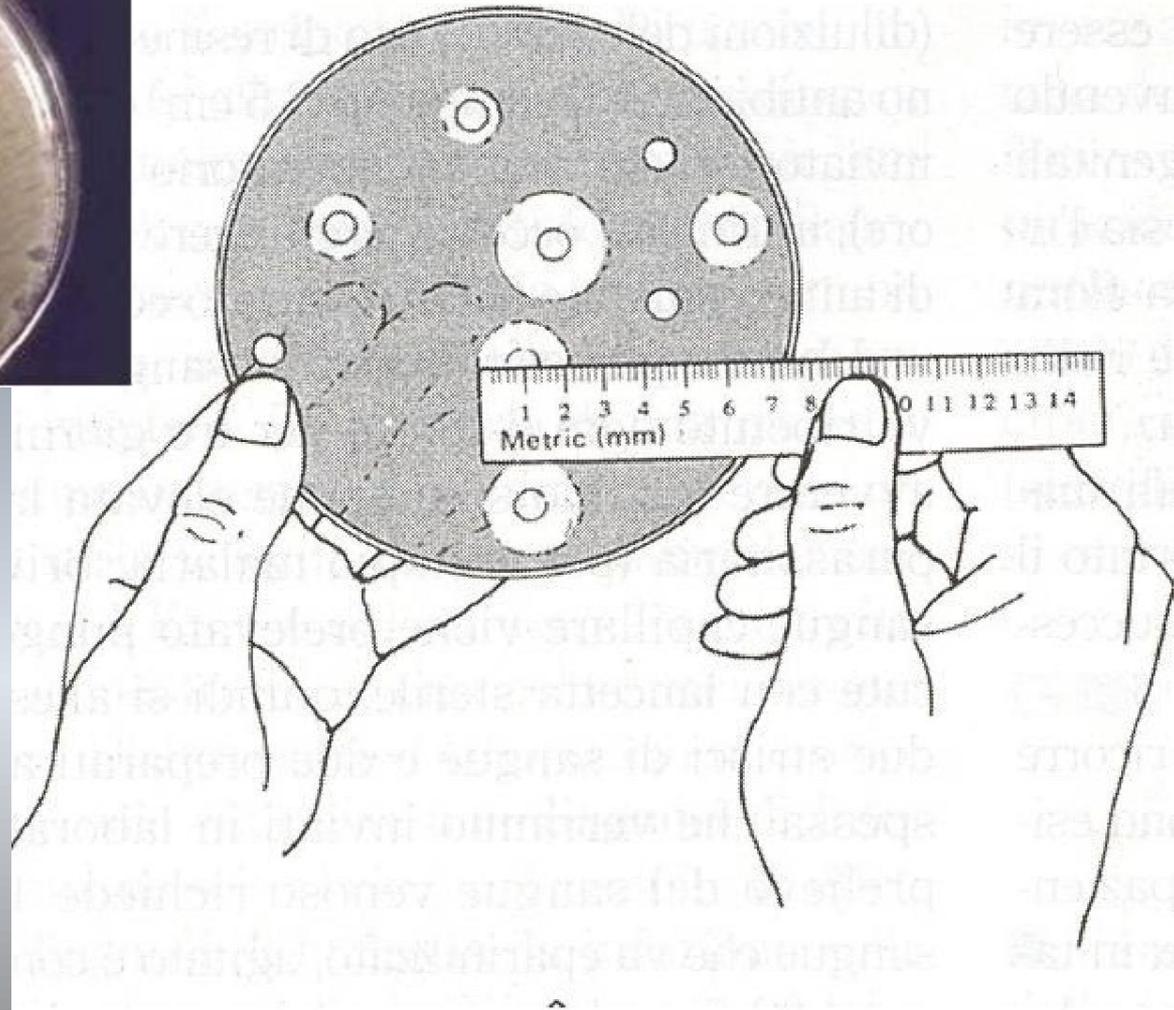
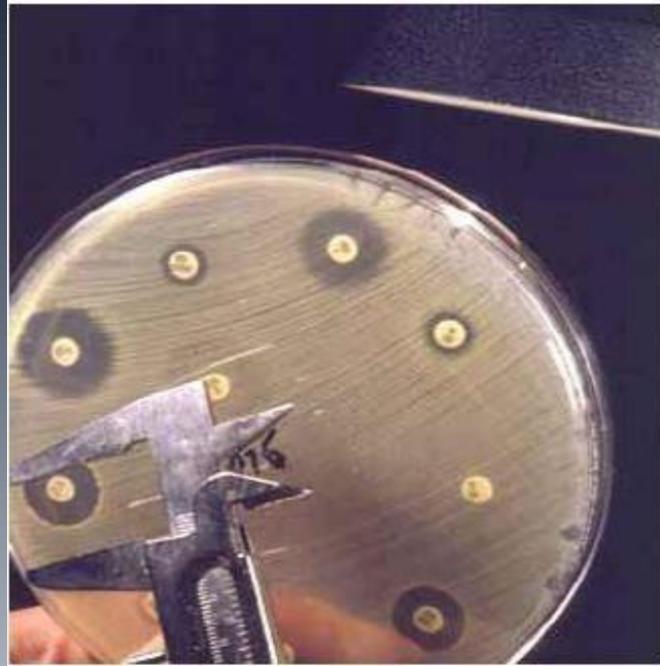


4. Filtri di carta a forma di disco (carta bibula -assorbente-) contenenti concentrazioni note di diversi agenti antimicrobici vengono posti sulla piastra.

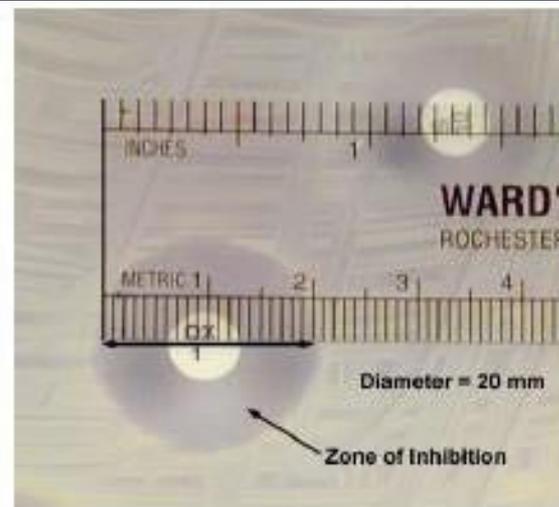


**Incubazione in
termostato a
35-37°C per
18-24h**

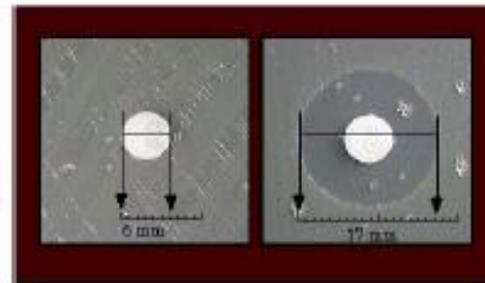
Misura gli aloni



Il diametro degli aloni di inibizione osservati sulla piastra viene misurato (in mm) ed i valori ottenuti paragonati a quelli standard per il ceppo batterico, in modo da stabilire se l'isolato è sensibile o meno ad un dato antibiotico (**Sensibile**, **Intermedio**, **Resistente**).

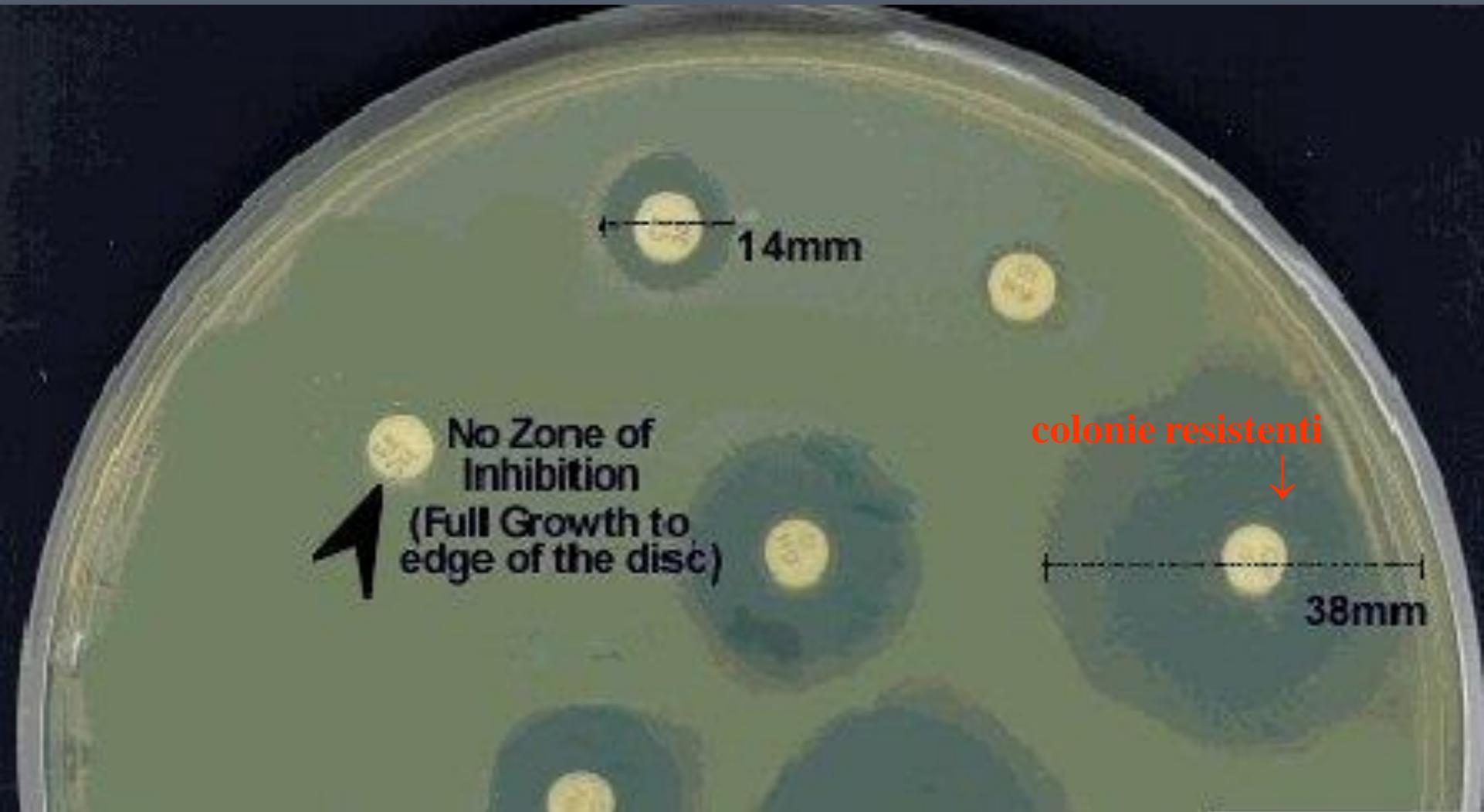


Il metodo di Kirby-Bauer: interpretazione dei risultati



ANTIMICROBIAL AGENT	R = mm or less	I = mm range	S = mm or more
carbenicillin CB	17	18-22	23
cephalothin CF	14	15-17	18
gentamycin GM	12	13-14	15

Antibiogramma





Grazie

*Per qualunque domanda o problema
puoi contattarmi al*

- Tel: **3386428032**
- e-mail: vivian.tullio@unito.it