



# 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).

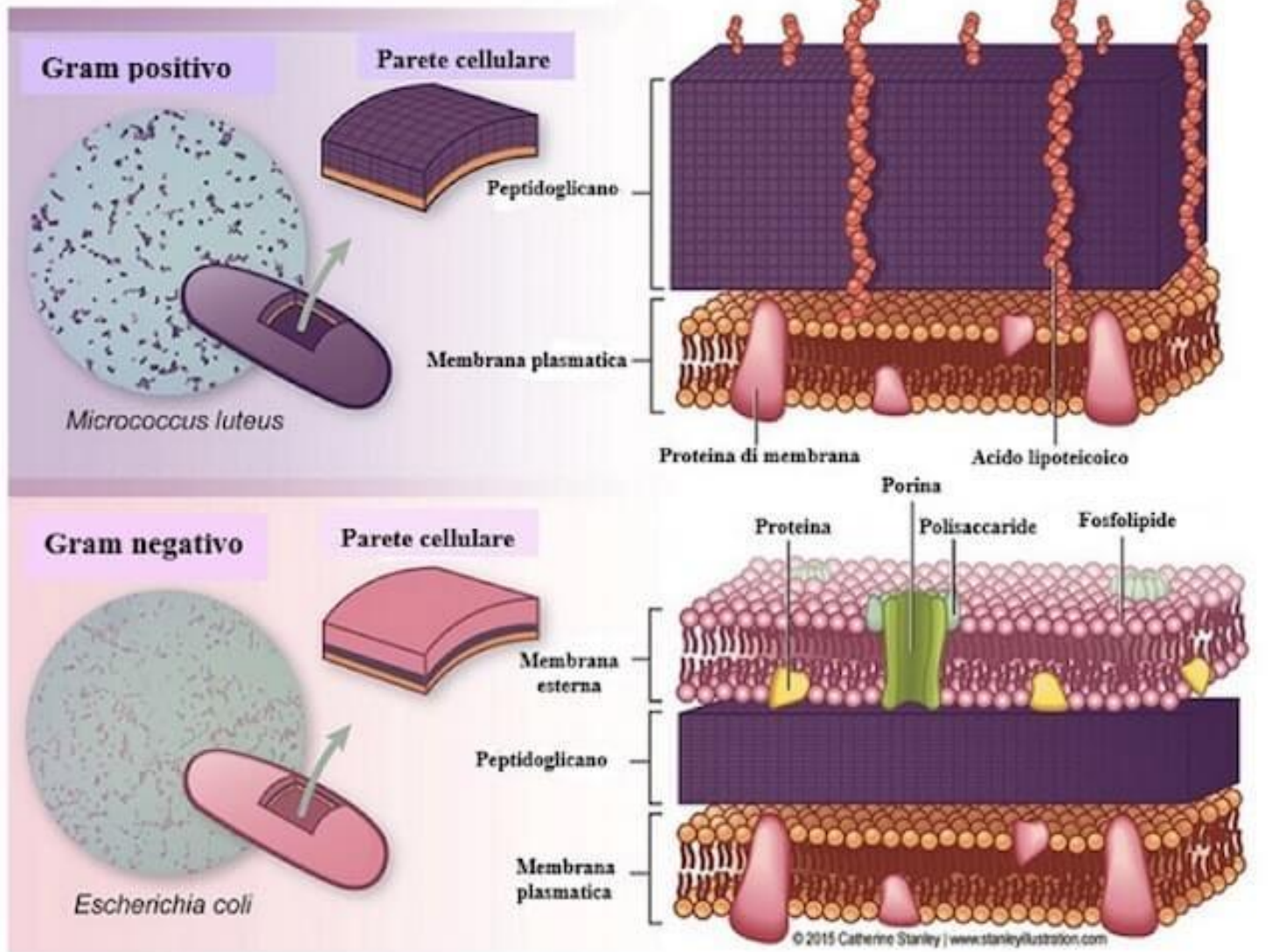
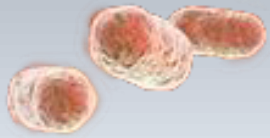
Come tutti i coloranti basici, il cristalvioletto ha molti gruppi cationici (carichi positivamente) ed ha elevata affinità con la superficie delle cellule batteriche, carica **negativamente**



## 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)





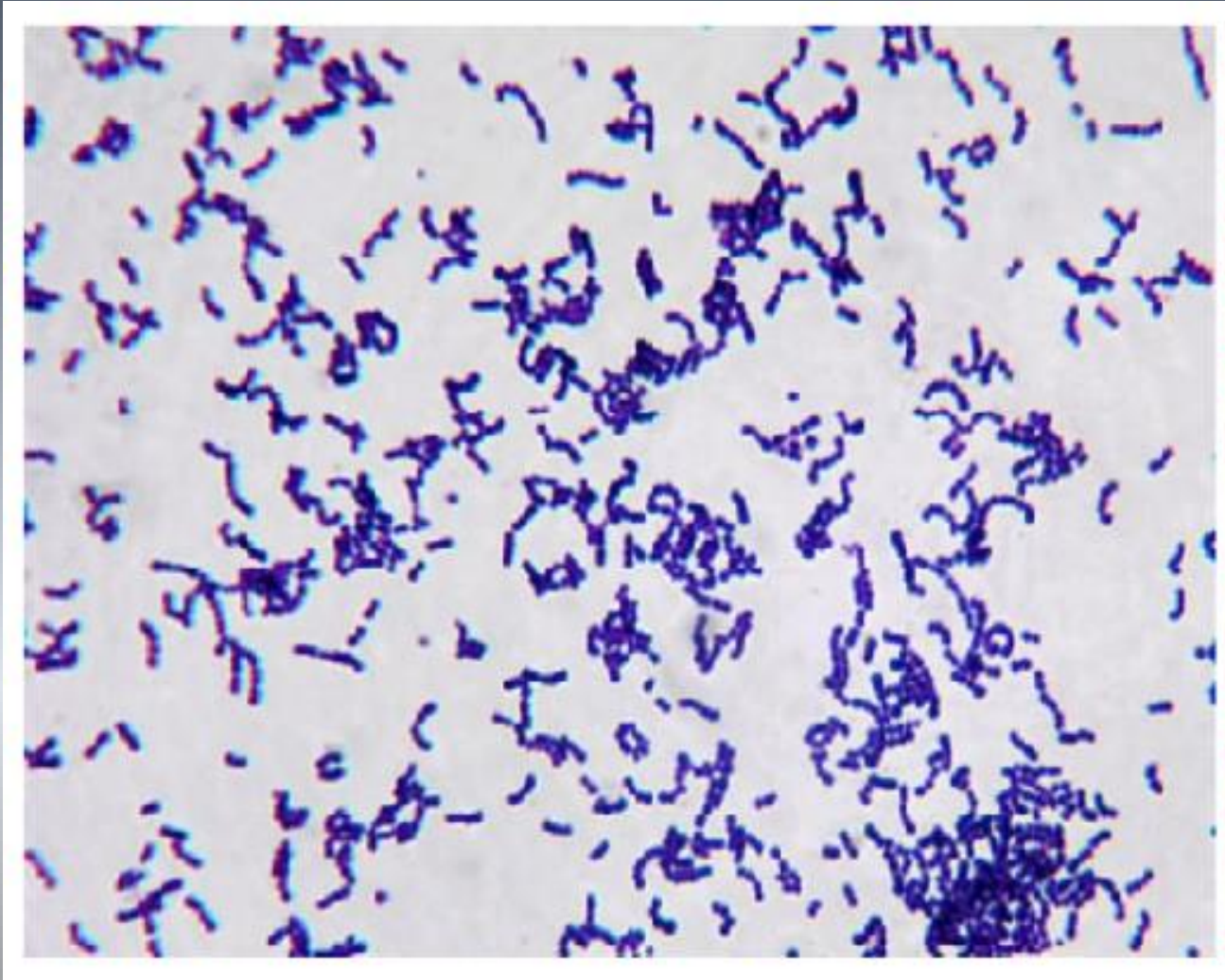


## Che cos'è e come funziona

→ 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



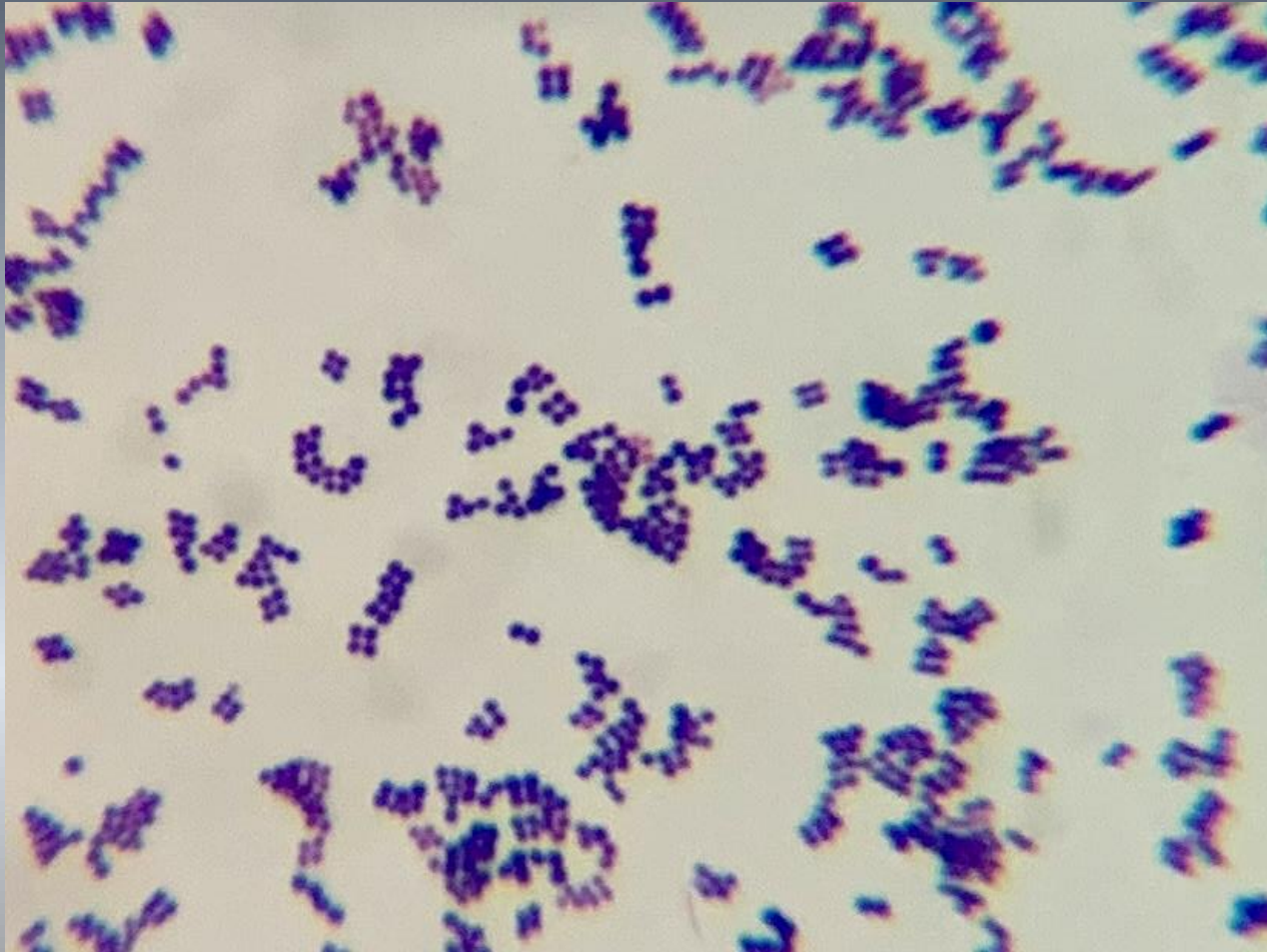
## Che cos'è e come funziona



**Cocchi Grampositivi**



## Che cos'è e come funziona

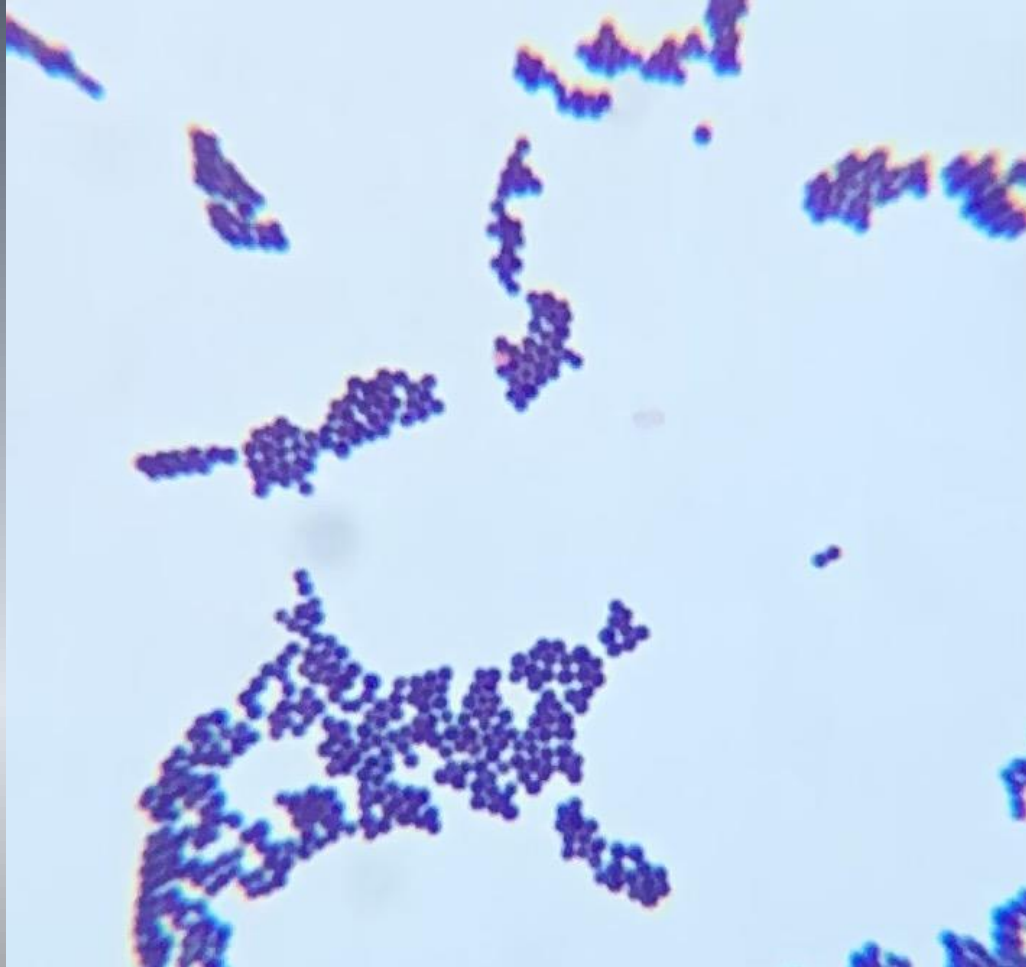


Cocchi Grampositivi -stafilococchi





## Che cos'è e come funziona

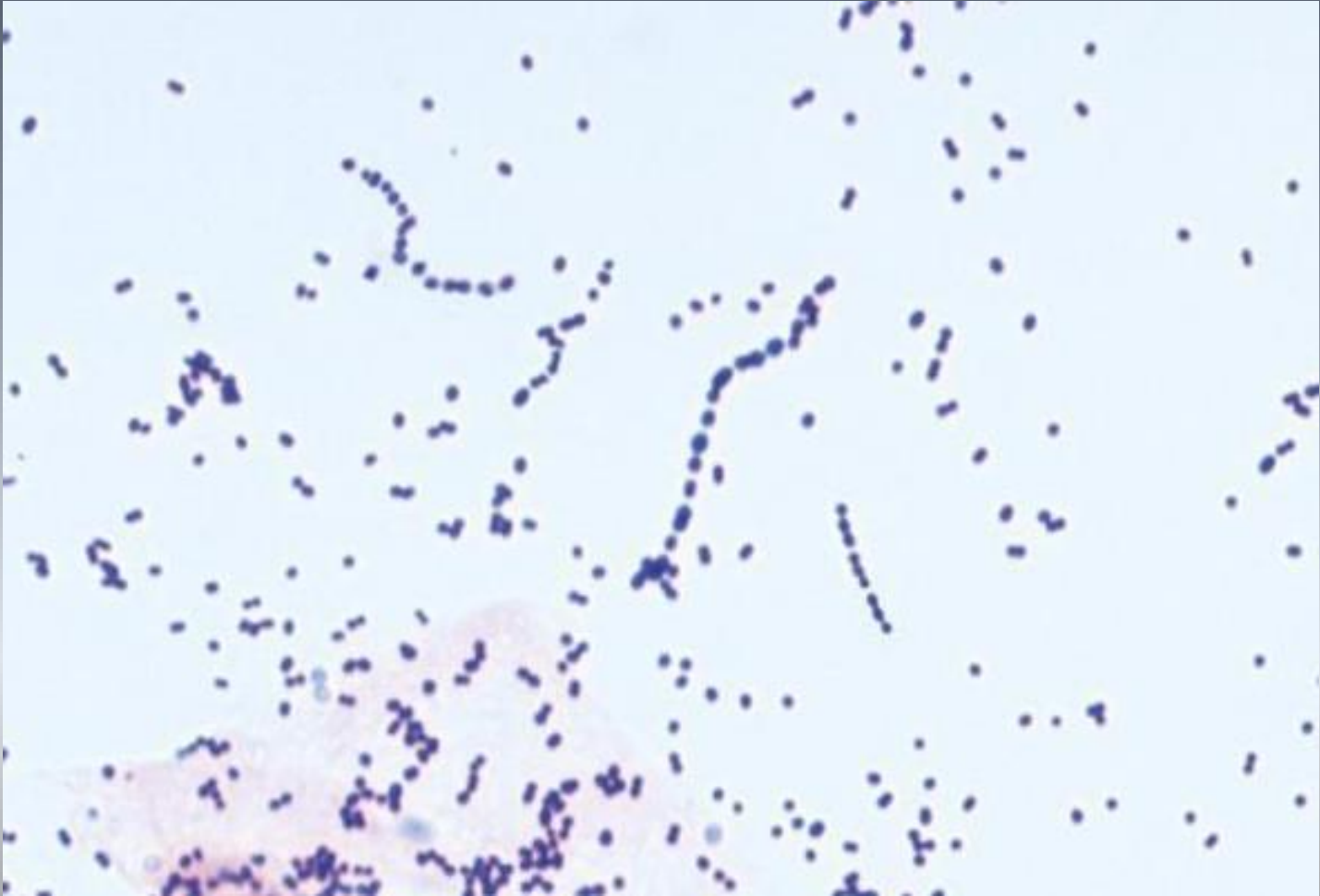


Cocchi Grampositivi -stafilococchi





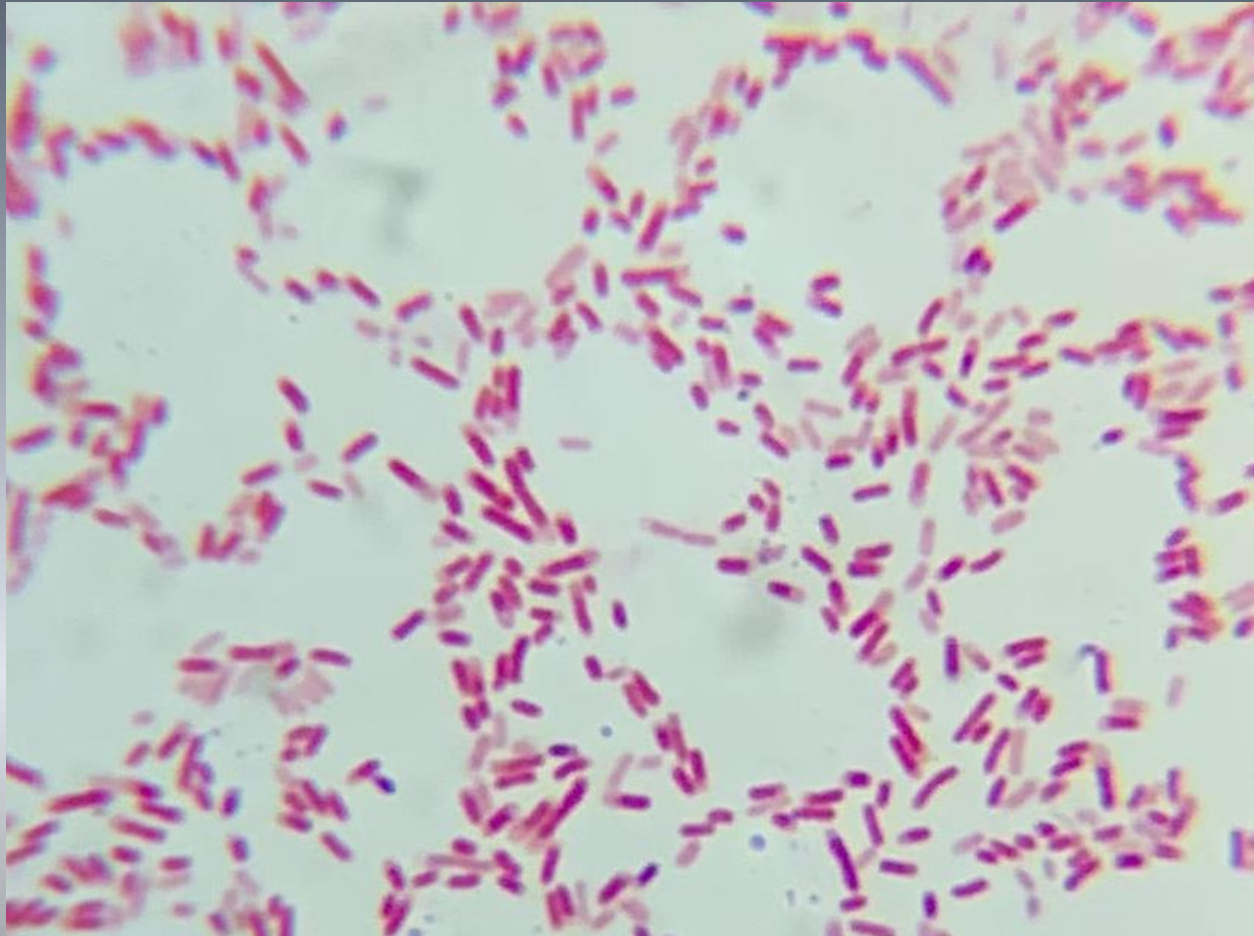
## Che cos'è e come funziona



Cocchi Grampositivi a catenella



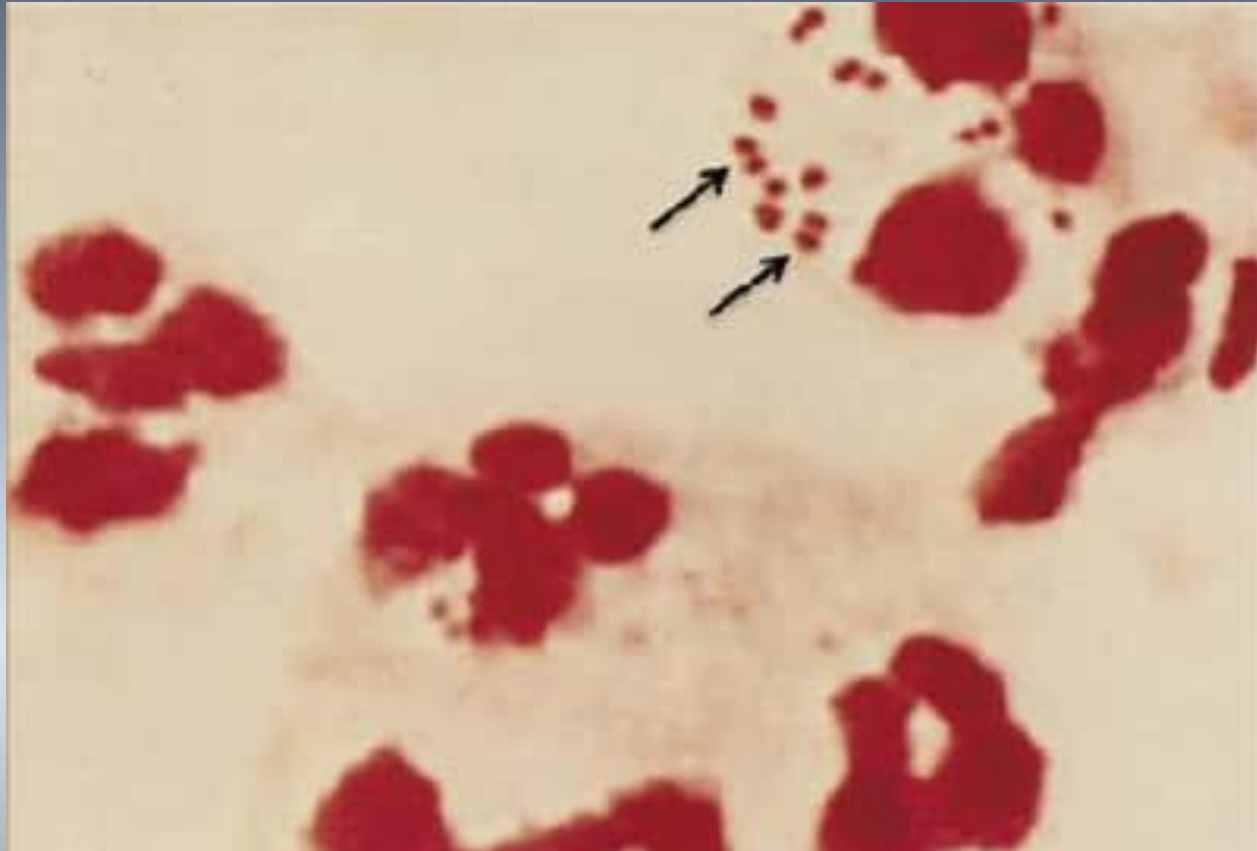
## Che cos'è e come funziona



**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



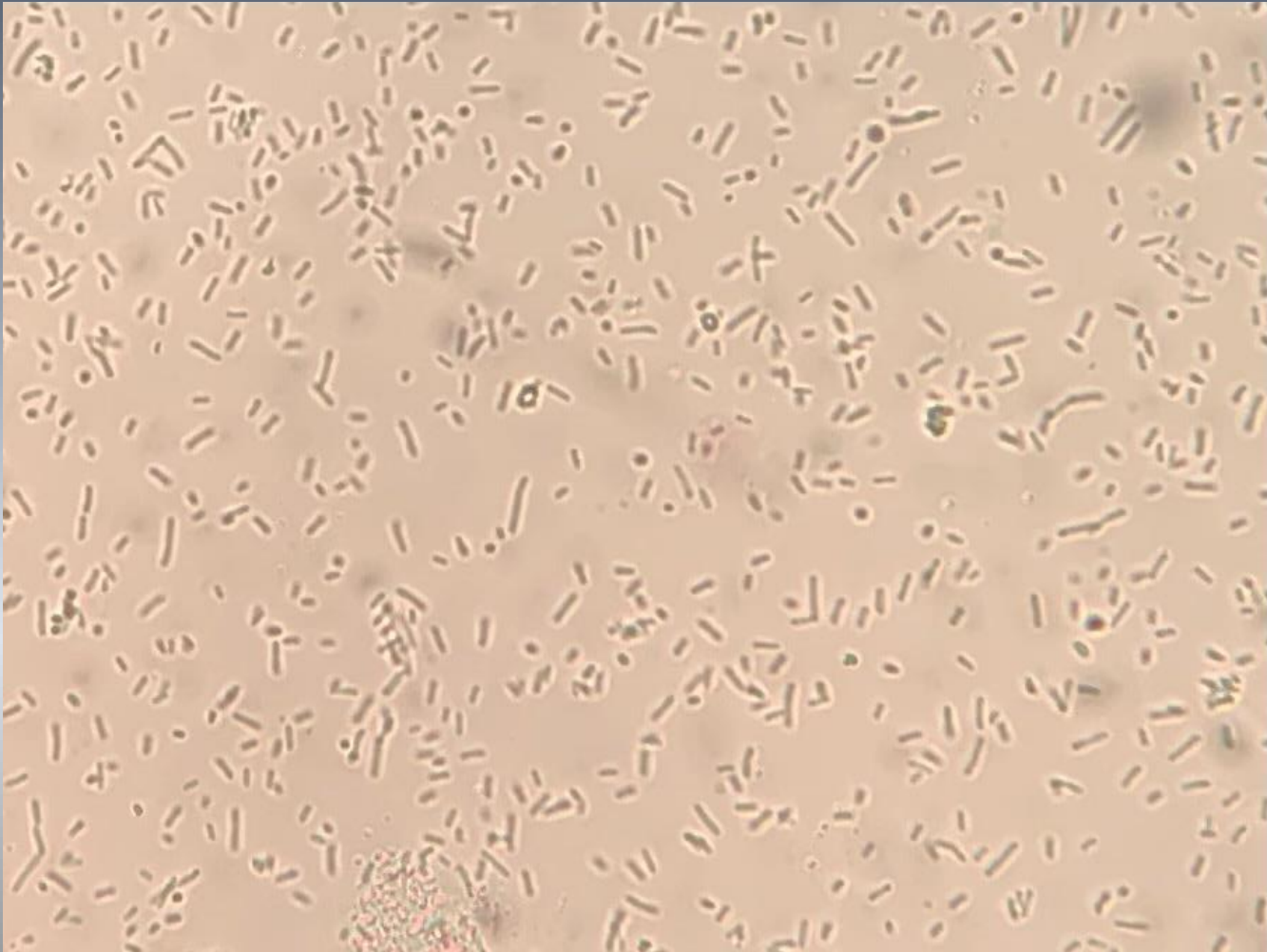
# OSSERVAZIONE A FRESCO

## 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

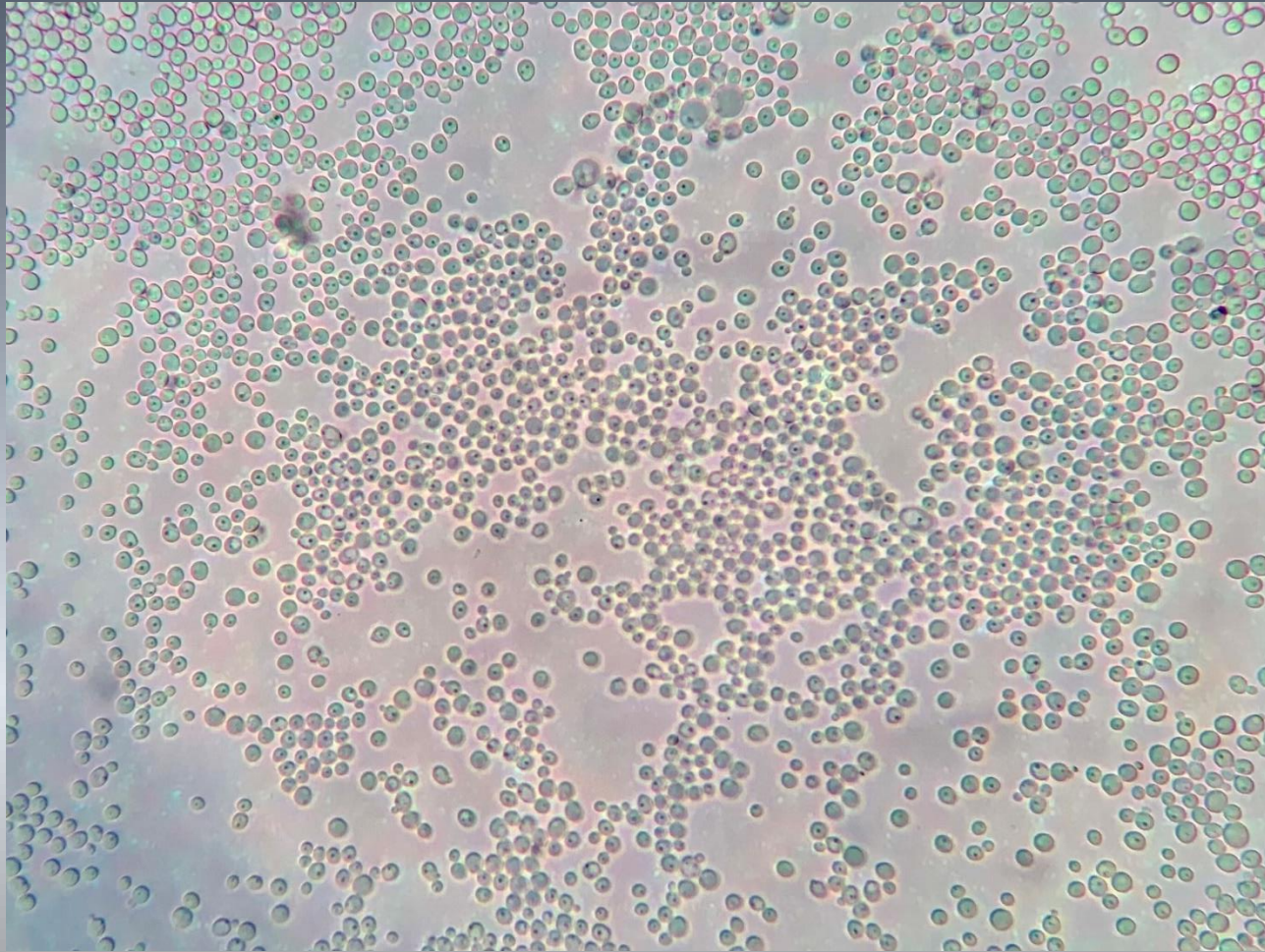


Batteri a fresco





# 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)

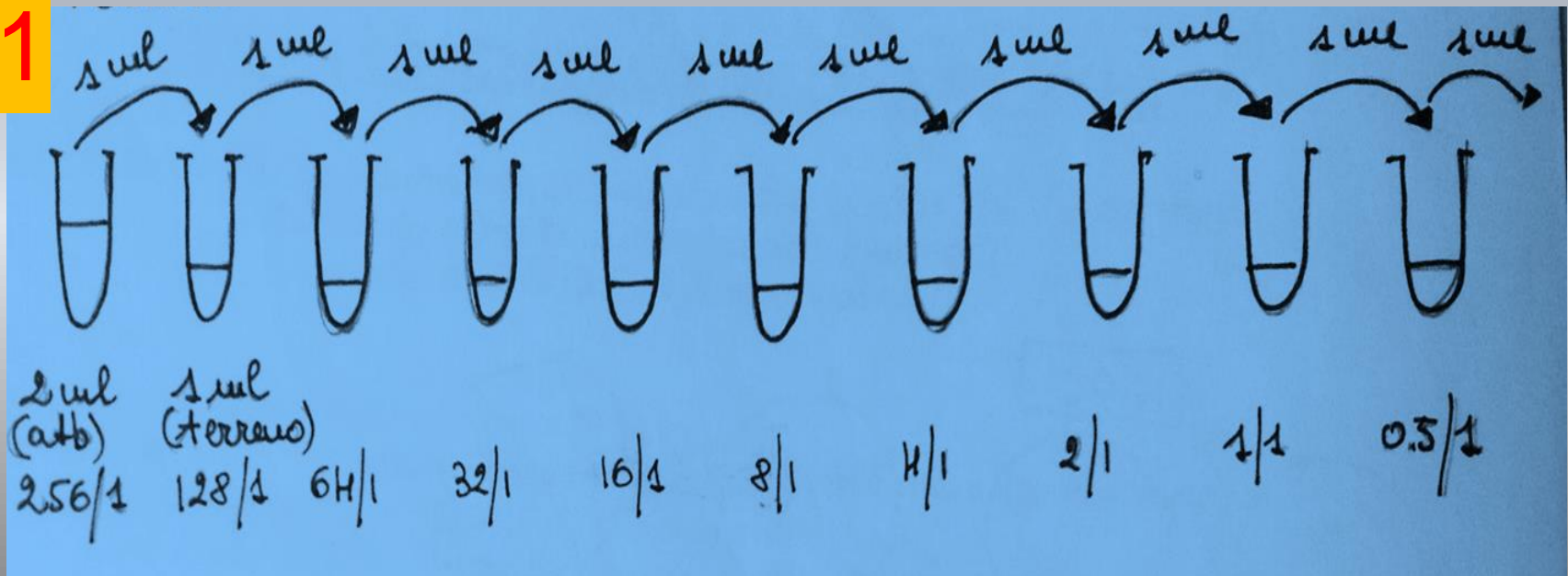
## Tecnica delle diluizioni scalari

- 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

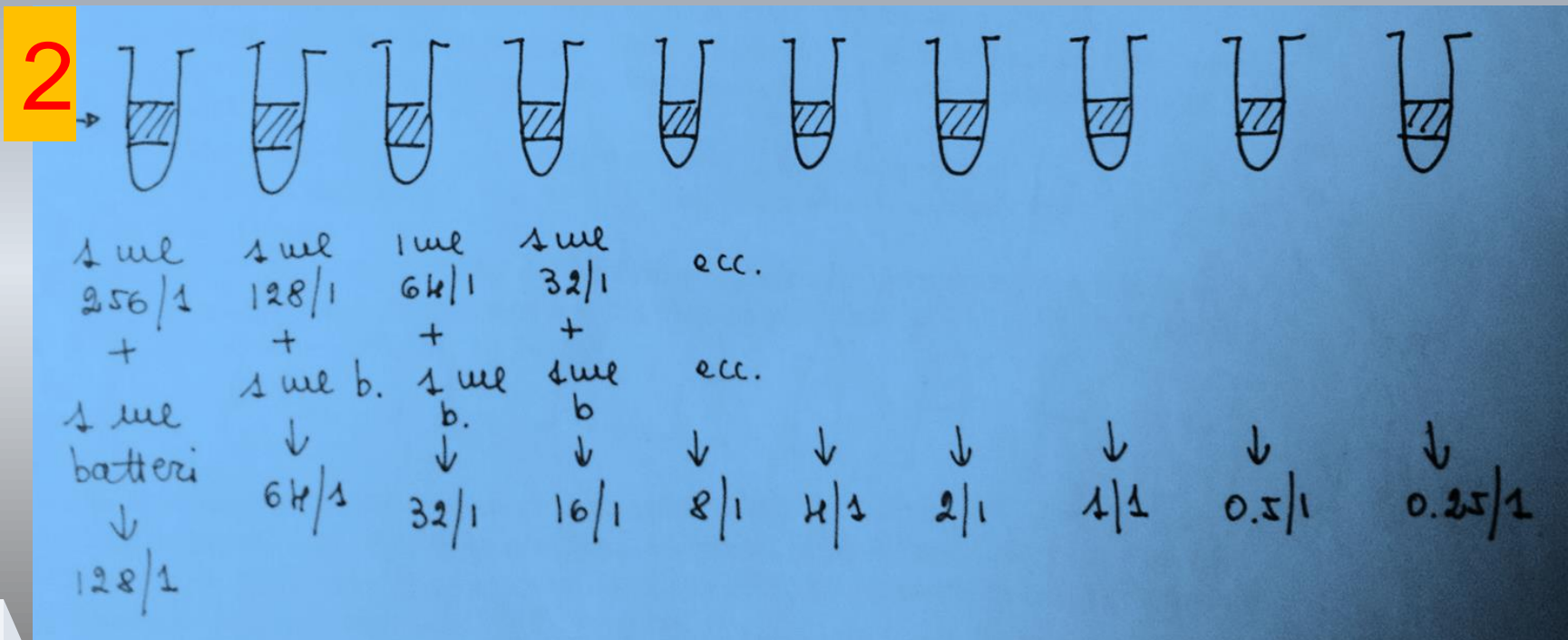
- Eseguire diluizioni scalari del farmaco (diluizioni al «raddoppio» perché in ogni provetta avremo metà concentrazione rispetto alla precedente o il doppio rispetto alla successiva).
- Prelevare 1 ml dalla 1° provetta e metterlo nella 2°, mescolare agitando; dalla 2° provetta prelevare 1 ml e metterlo 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



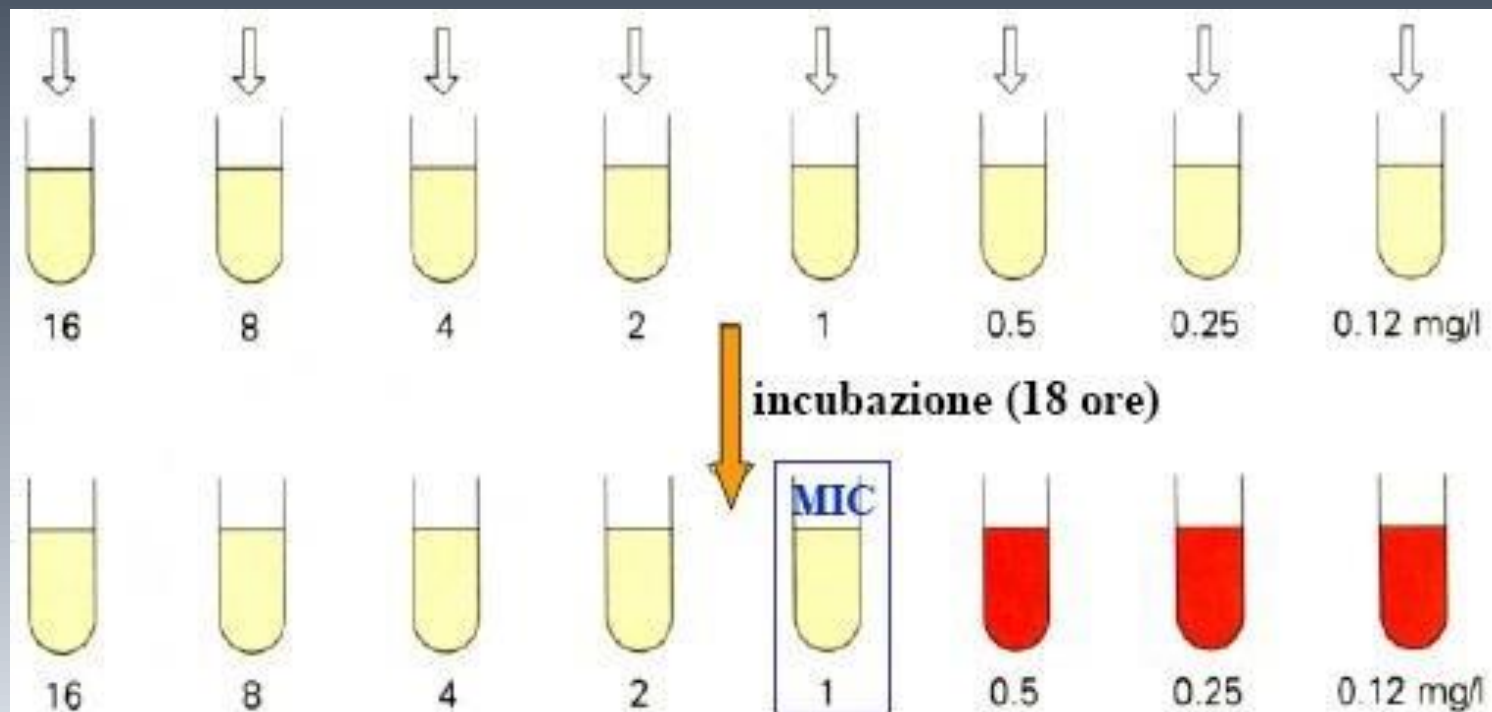




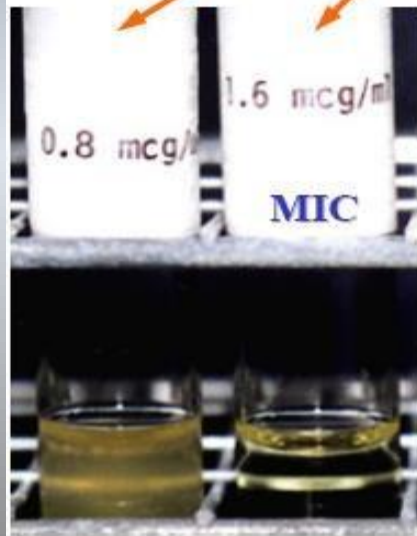
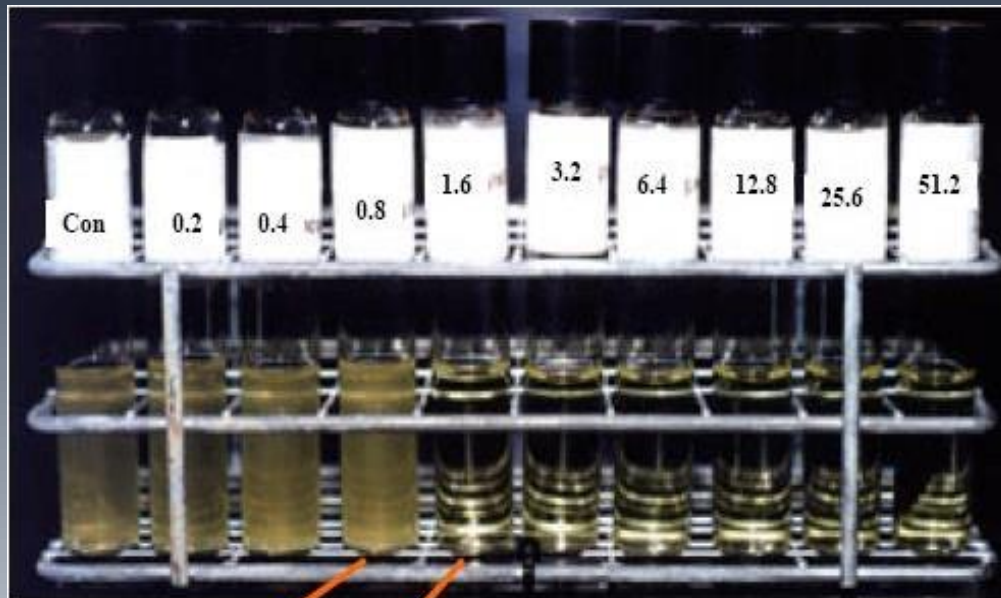
# EFFICACIA ANTIMICROBICI

## 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.**

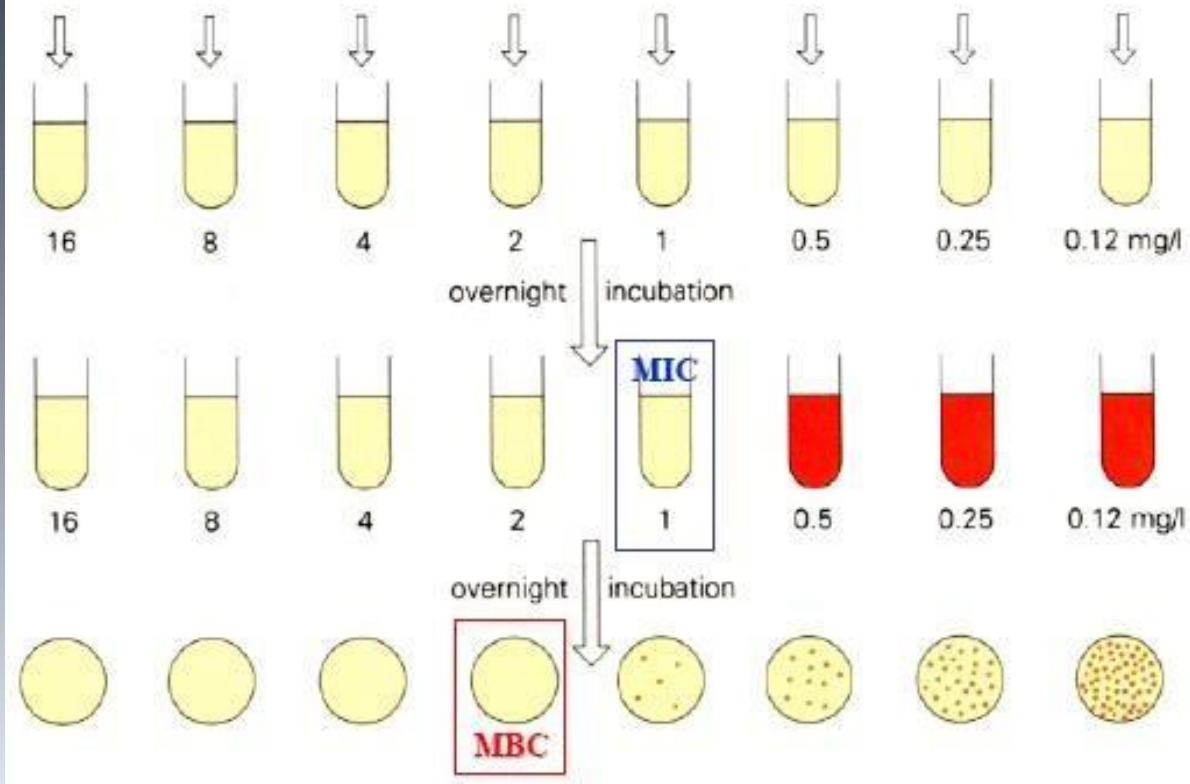


**Dopo 18 ore di incubazione, le provette vengono controllate per la presenza di una crescita batterica visibile (torbidità): l'assenza di torbidità visibile del terreno di coltura denota un'inibizione completa della crescita microbica.**



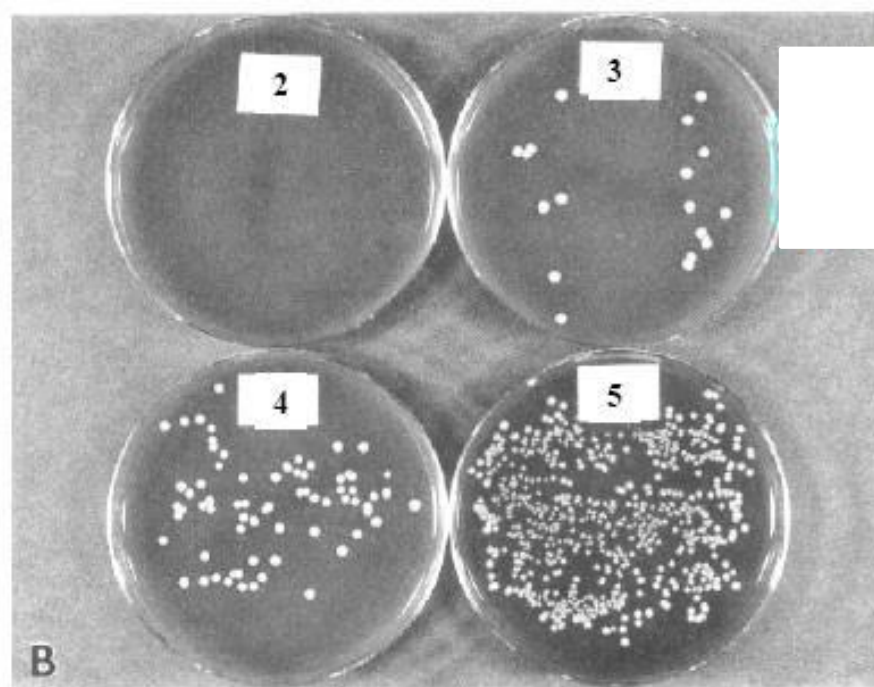
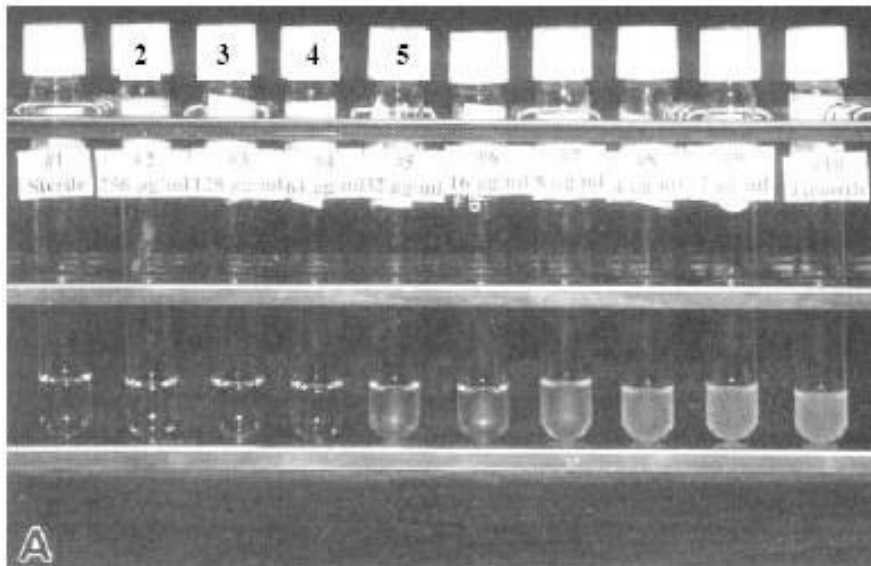
**MIC** (Minimum Inhibiting Concentration; minima concentrazione inibente) La concentrazione più bassa del composto in esame necessaria per inibire la crescita di un dato organismo.

# 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)



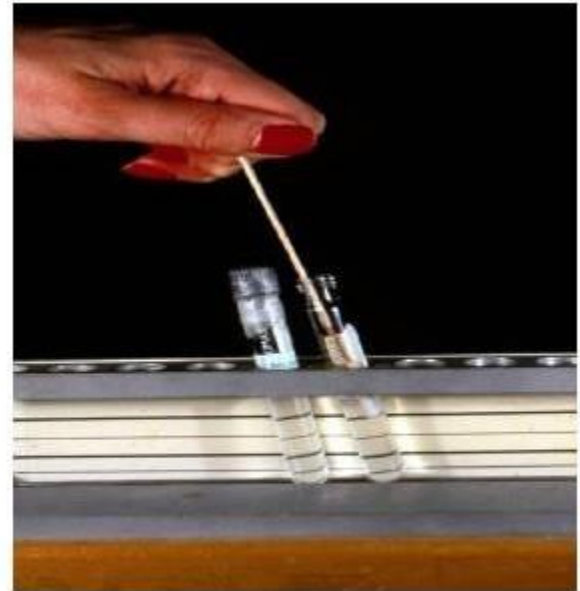


# TEST DI DISCO DIFFUSIONE SU AGAR

## 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**

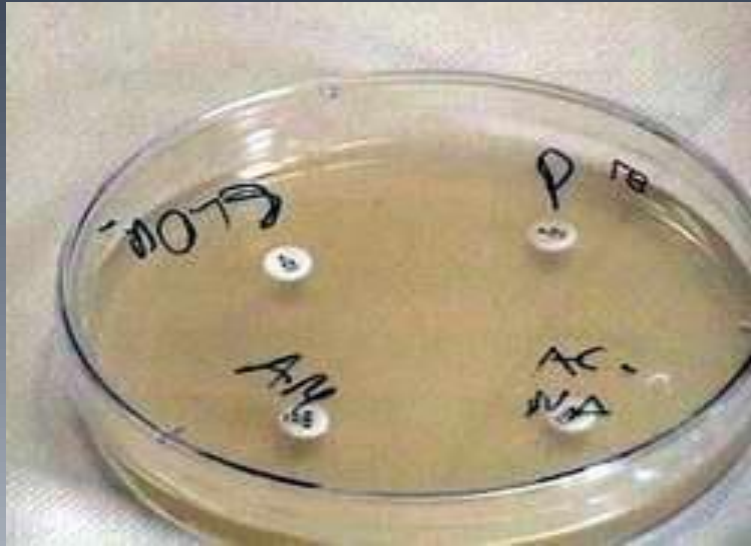
Terreno agarizzato = **Mueller Hinton agar**, terreno standard



Immergi il tampone

Striscia sulla piastra



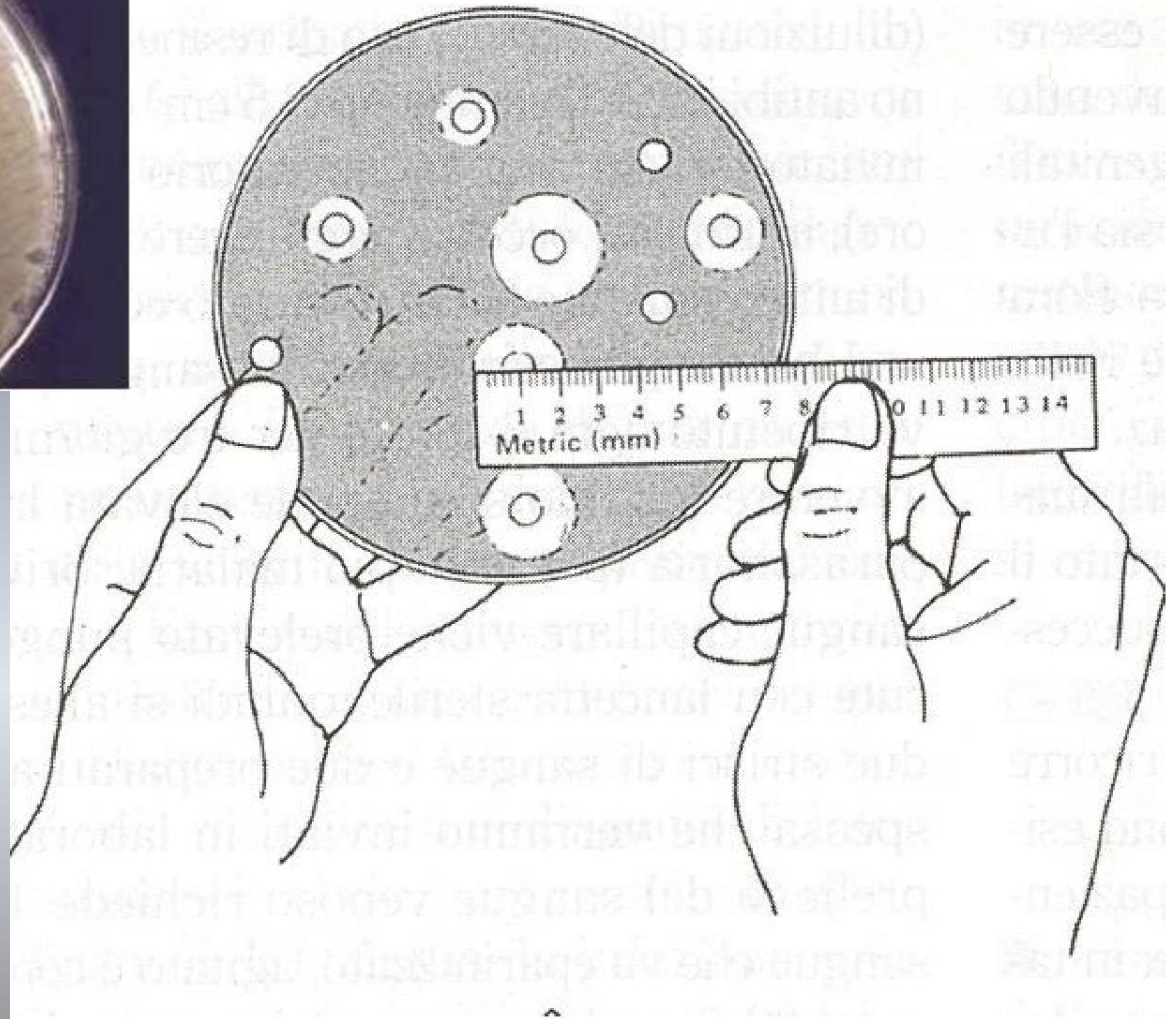
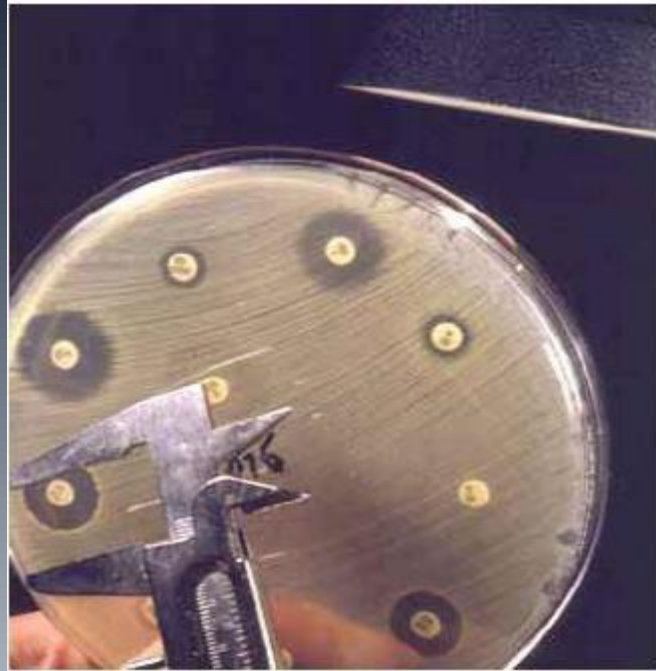


4. Filtri di carta a forma di disco (carta bibula -assorbente-) contenenti concentrazioni note di diversi agenti antimicrobici vengono posti sulla piastra.



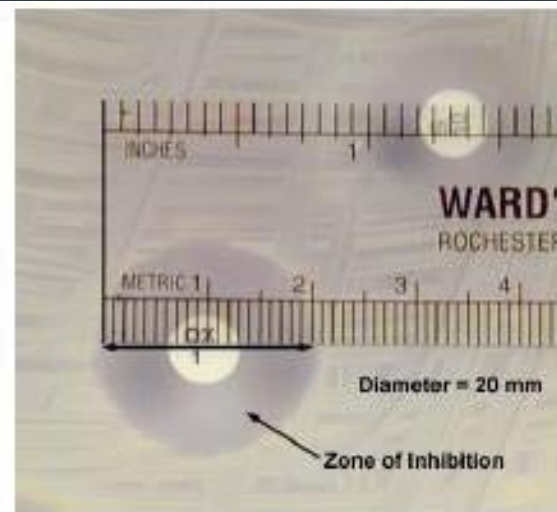
**Incubazione in  
termostato a  
35-37°C per  
18-24h**

# Misura gli aloni

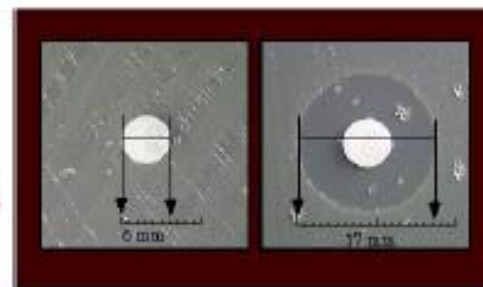




Il diametro degli aloni di inibizione osservati sulla piastra viene misurato (in mm) ed i valori ottenuti paragonati a quelli standard per il ceppo batterico, in modo da stabilire se l'isolato è sensibile o meno ad un dato antibiotico (**Sensibile**, **Intermedio**, **Resistente**).

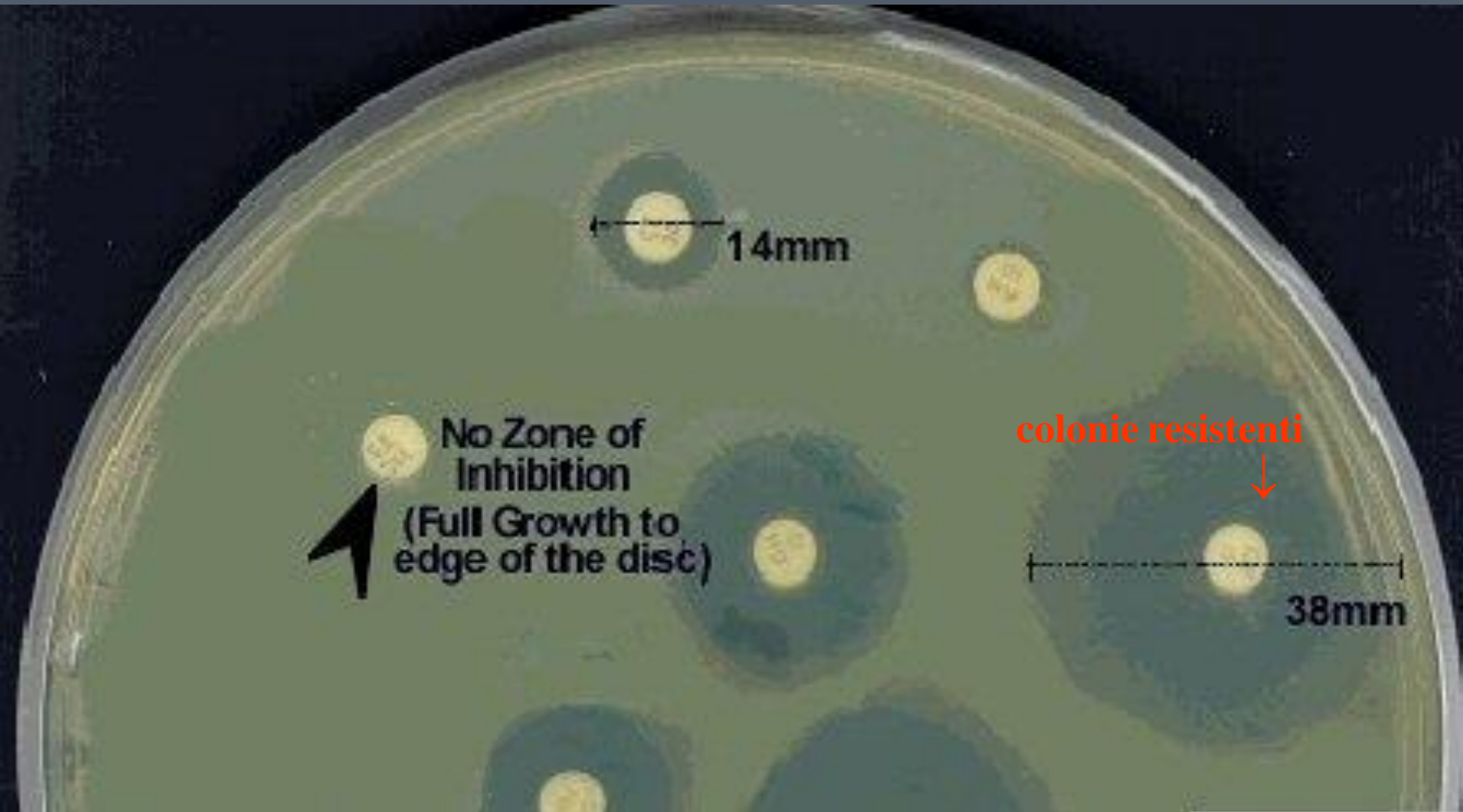


## Il metodo di Kirby-Bauer: interpretazione dei risultati



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](mailto:vivian.tullio@unito.it)