

METODI DI COLORAZIONE

Si utilizzano coloranti organici e generalmente con nucleo benzenico costituiti da un gruppo cromoforo, che determina il colore e da un gruppo auxocromo, che aumenta l'efficacia del cromoforo facendolo legare al substrato o assorbire. Per i coloranti vengono utilizzate soluzioni alcoliche, mediante diluizioni (1:10 o 1:100) si preparano le soluzioni acquose, in cui il colorante, subendo dissociazione elettrolitica, è in grado di colorare.

Finalità: permette una migliore valutazione della morfologia (forma e dimensione) batterica mediante osservazione con obiettivo ad immersione; si possono discriminare anche particolari strutture batteriche (granulazioni, spore, ecc.).

Tecnica generale

1. **Sterilizzazione** dell'ansa;
2. **raffreddamento** dell'ansa;
3. **prelievo** del materiale;
4. **preparazione** della sospensione microbica; la carica microbica non deve essere molto elevata per ottenere una buona osservazione del preparato (se necessario diluire la patina o la sospensione iniziale in 5ml di soluzione fisiologica sterile);
5. **deposizione** di una goccia della sospensione batterica sul vetrino portaoggetto (precedentemente pulito con alcool a 90°C);
6. **distensione** (in base alla densità della sospensione) della goccia sul vetrino portaoggetto; in alternativa si può distendere il preparato per strisciamento;
7. **essiccamento** del preparato sul vetrino lasciato ad asciugare all'aria (ma al riparo dalla polvere), oppure a blando calore su becco bunsen;
8. **fissazione** del preparato
 - **al calore**, facendo passare più volte il vetrino portaoggetto direttamente sulla fiamma di un becco bunsen dalla parte opposta a quella dove è stato disteso il preparato;
 - mediante l'impiego di **sostanze fissanti** (permettono una migliore conservazione delle forme microbiche da osservare) come alcool etilico per 20min., alcool metilico per 2-3min., o alcool-etero in parti uguali per 10min. La fissazione garantisce che il materiale disteso ed essiccato non venga allontanato dal vetrino durante i successivi passaggi e comporta inoltre la morte cellulare per coagulazione delle proteine batteriche. Le cellule, durante il trattamento, non perdono la loro morfologia ma possono diminuire di volume.
9. **Colorazione** vera e propria (semplice o differenziale a seconda che venga impiegato uno solo o più coloranti);
10. **asciugare** il preparato colorato con carta assorbente o blando calore;
11. **osservazione** microscopica con obiettivo ad immersione.

Colorazioni semplici

I coloranti più comunemente usati sono **blu di metilene**, **fucsina fenicata**, **violetto di genziana**. Possono trovarsi in soluzione acquosa ma anche in soluzioni mordenzate contenenti acido fenico; talora il mordente può essere rappresentato da una piccola quantità di KOH.

Tutti i batteri assumeranno lo stesso colore.

Colorazione semplice con blu di metilene (Loeffler)

Questa colorazione permette di individuare la morfologia microbica e viene impiegata, opportunamente modificata, anche per evidenziare la presenza e la disposizione dei granuli metacromatici.

Le cellule batteriche appariranno colorate in blu su fondo chiaro; i granuli metacromatici, se presenti, appariranno blu scuro (nella colorazione modificata).

Colorazioni combinate e differenziali

Le colorazioni combinate prevedono l'impiego di più coloranti; quelle differenziali, mediante l'impiego di due coloranti, talora uno acido e uno basico, permettono la discriminazione di differenze morfologiche e di composizione delle cellule.

Colorazione di Gram

Con tale colorazione si è potuto stabilire che i batteri hanno una diversa struttura e composizione della parete cellulare.

Con tale colorazione i batteri Gram positivi tratterranno in genere il primo colorante, anche dopo decolorazione blanda (con alcool etilico o acetone), mentre i batteri Gram negativi, provvisti di uno strato lipidico esterno, perderanno il primo colorante dopo trattamento con decolorante, assumendo il secondo. La colorazione si fa a freddo.

- Distensione, essiccamento e fissazione;
- disporre sul preparato una soluzione colorante di **cristalvioletto** e lasciar agire per **1min.**;
- allontanare l'eccesso di colore;
- trattare con **liquido di Lugol** fresco (sciogliere 2gr di ioduro di potassio in 20ml di acqua distillata e aggiungere 1gr di iodio in cristalli, lasciare riposare per una notte; portare a 300ml con acqua distillata al momento dell'uso), che agisce da mordente, per **1min.**;
- aggiungere il decolorante, **alcool etilico al 95%** o **acetone** per circa **20sec.**;
- lavare abbondantemente con acqua per allontanare il decolorante;
- aggiungere **fucsina** diluita o **safranina** (1gr in 100ml di acqua distillata) per **1min.**;
- lavare con acqua corrente con getto non diretto sul preparato;
- asciugare con carta bibula;
- osservazione microscopica con obiettivo ad immersione.

NB: all'osservazione i batteri Gram positivi appariranno colorati in **blu-violetto**; i Gram negativi in **rosa-rosso**.

Colorazione per l'osservazione microscopica delle spore

Le spore batteriche, per la presenza di uno spesso involucro costituito da più strati, vengono difficilmente colorate, viceversa, una volta che hanno assunto la colorazione, si decolorano con estrema difficoltà. Le tecniche di colorazione prevedono un'energica fissazione, trattamenti preliminari del preparato che modifichino la permeabilità delle spore (cloroformio ed acido cromatico) e facilitino l'attraversamento del colorante, l'utilizzo di mordenzanti fisici (calore) e/o chimici e l'utilizzo di decoloranti (acidi, sostanze riducenti tipo solfito sodico, alcool assoluto) che evidenzino la resistenza della spora alla decolorazione.

Uno dei metodi è quello di Muzzarelli, col quale le forme sporali appariranno colorate in blu e le forme vegetative in rosa.

Colorazione di Ziehl Neelsen per batteri acido-resistenti

Alcune forme batteriche sono più resistenti alla penetrazione del colorante e si decolorano con difficoltà una volta che vengono trattati con acidi ed o alcoli; ciò rappresenta un carattere distintivo dalle altre forme microbiche.

La metodica prevede 1) l'utilizzo di coloranti molto concentrati, 2) l'utilizzo di mordenzanti, 3) l'esecuzione a caldo della colorazione.

- Distensione, essiccamento, fissazione della sospensione su vetrino portaoggetto;
- distribuire sul vetrino una soluzione di **carbolfucsina** (0,3gr in 10ml di etanolo 95% + 100ml di soluzione acquosa di fenolo 5%) e riscaldare delicatamente;
- allontanare il colore residuo e sciacquare bene con acqua;
- trattare per **20sec.** con **acido solforico 20%**;
- lavare con acqua;
- trattare con **alcool etilico 95%** per più volte, fino ad allontanare colore residuo;
- lavare e aggiungere come colorante di contrasto **blu di metilene** (0,3%) o verde malachite per **2-3min.**;
- allontanare il colore residuo con acqua, asciugare;
- osservare al microscopio con obiettivo ad immersione.

NB: I batteri acido resistenti tratterranno il primo colorante ed appariranno colorati in **rosso**, i restanti batteri appariranno **blu** o verdi.

Colorazione di Giemsa

Tale colorazione consente di colorare le cellule eucariotiche, differenziandone le strutture e permette di individuare anche microrganismi a localizzazione intracellulare.

Colorazioni particolari

Esame con inchiostro di china a fresco (Burri) o dopo colorazione

La tecnica è simile ad un esame a fresco, con la variante che la sospensione batterica viene mescolata con una soluzione diluita di **inchiostro di china**. La metodica è utile per evidenziare la **capsula** batterica presente in alcune specie microbiche. L'osservazione microscopica si può attuare con contrasto di fase e osservazione a fresco. Affinché il microrganismo possa produrre la capsula deve essere coltivato in terreno di coltura adatto.

L'esame può essere effettuato sia a fresco che dopo colorazione.

I batteri dotati di capsula presenteranno un alone negativo spiccando sul fondo nero.