

3.4 Colorazione di gram

Questa tecnica è una colorazione differenziale che permette di distinguere i batteri Gram positivi da quelli Gram negativi e si basa sulla diversa organizzazione della loro parete.

Esistono molte varianti della colorazione di Gram, e ognuno usa una sua tecnica. Il principio sta nel colorare con un colorante primario basico tutti i batteri, e poi decolorarli e ricolorarli con un colorante di contrasto o secondario. Non tutti i batteri vengono decolorati: alla fine del processo i batteri che non si decolorano mantengono il colore del colorante primario (Gram +), mentre quelli che si decolorano assumono il colore del colorante di contrasto (Gram -). Il colorante primario usato ha colore viola, mentre il contrasto ha colore rosso o fucsia. Nel metodo sono riportati due metodi, ugualmente validi; il primo usa violetto di genziana e safranina, in secondo violetto di genziana e fucsina basica. Entrambi i metodi usano come colorante primario il violetto di genziana fenicato: il fenolo contenuto nella soluzione serve da mordenzante, cioè fa penetrare meglio il colorante all'interno della cellula e lo fissa ad essa. Il Lugol assolve sempre la funzione di mordenzante. La fase più critica della colorazione di Gram è la decolorazione, perché prolungandola troppo si rischia di decolorare anche le cellule Gram positive. Bisogna far attenzione a rispettare i tempi, soprattutto quelli della decolorazione. I batteri vecchi inoltre non hanno più la capacità di mantenere il colorante primario, e anche se Gram + appaiono Gram -.

La parete dei batteri Gram negativi ha, partendo dallo strato più vicino alla membrana cellulare, uno strato basso di peptidoglicano a cui sono legate lipoproteine, una membrana esterna (con proteine di trasporto e altre proteine chiamate porine) a cui sono legati lipopolisaccaridi. I lipopolisaccaridi rallentano l'entrata degli antibiotici, tanto che per uccidere una cellula Gram negativa è necessaria una quantità di antibiotico mille volte superiore rispetto a quella necessaria per uccidere una cellula Gram positiva. I Gram positivi sono privi della membrana esterna e hanno uno strato molto spesso di peptidoglicano, il quale comporta la mancata uscita del colorante dalla cellula batterica. Le cellule Gram negative hanno uno strato di peptidoglicano molto più basso, che permette alla cellula di essere decolorata.

Per esercitarsi nella colorazione di Gram, oltre che usare infusioni di fieno, si può prelevare del materiale direttamente dalla propria bocca, raschiando con la parte non tagliente di un coltello da cucina oppure un cucchiaino la superficie interna della guancia o la lingua, e stemperando il materiale raccolto con la soluzione fisiologica su un vetrino e strisciando con il metodo solito. Qui si possono trovare sia batteri Gram negativi che Gram positivi, e cellule epiteliali che vengono colorate con il colorante di contrasto. La procedura qui descritta è stata applicata a una sospensione batterica ricavata da materiale raccolto dalla propria bocca, ma ovviamente può essere applicata anche su altri campioni.

Tempo richiesto: 30 minuti

Difficoltà: media

Primo metodo:

Reagenti: violetto di Nicolle, reattivo di Lugol, soluzione decolorante (3 parti di alcool etilico 95° + 1 parte acetone), soluzione idroalcolica di safranina 1 %. Per l'osservazione con l'obiettivo ad immersione olio di cedro o equivalente sintetico e xilene

Procedura:

- Si faccia lo striscio su un vetrino pulitissimo e sgrassato in alcool etilico e fissato a calore come indicato nella prova 3.3. E' possibile fissare il vetrino anche chimicamente: si cosparga o striscio con alcool etilico 96° e lo si lasci per tre minuti circa. Questo è un metodo meno aggressivo rispetto alla fissazione a calore, e non si rischia di far alterare la morfologia cellulare dei batteri.
- Si cosparga lo striscio fissato con violetto di Nicolle, quanto basta per coprire lo striscio, e lo si lasci agire per 1 minuto.
- Si faccia scolare il colorante in eccesso inclinando il vetrino su un foglio di carta assorbente.
- Senza sciacquare si cosparga lo striscio con la soluzione di Lugol e la si lasci per 1 minuto.
- Si sciacqui brevemente sotto il getto non forte di un rubinetto.
- So proceda alla decolorazione cospargendo lo striscio con la soluzione decolorante e la si lasci per 30 secondi e non di più.
- Si sciacqui il vetrino sotto il rubinetto.

- Si copra il preparato con la soluzione di safranina e la si lasci agire per 1 minuto.
- Si sciacqui sotto il rubinetto e poi brevemente in acqua distillata, perché così il vetrino asciuga senza incrostazioni, le quali possono dar fastidio durante l'osservazione.
- Si lasci asciugare lo striscio all'aria o sopra ad un termosifone. Si può asciugare la faccia non impegnata dallo striscio con carta assorbente.
- Si osservi il preparato con l'obiettivo ad immersione.

E' indispensabile a colorazione terminata pulire la faccia del vetrino non impegnata dallo striscio con alcool etilico, acetone, oppure lo stesso decolorante. E' fondamentale inoltre osservare lo striscio asciutto a 1000 X per meglio apprezzare le differenze tra i due gruppi di batteri.

Risultati:

Batteri Gram positivi: viola

Batteri Gram negativi: rosa

Cellule epiteliali: rosa

Nucleo cellule epiteliali: rosa intenso

Le cellule epiteliali devono apparire colorate in rosa: ciò è un indicatore per la buona riuscita della colorazione di Gram. Se si vedono accanto alle cellule rosa batteri viola la colorazione è perfetta.

Per l'osservazione con obbiettivi a immersione si può direttamente mettere l'olio di cedro sullo striscio, senza coprioggetto, ma deve essere ben asciutto. L'osservazione è migliore facendo in questo modo. A fine lavoro si può recuperare lo striscio togliendo l'olio da immersione con carta assorbente imbevuta di xilene: i batteri non ne risentono e lo striscio può essere conservato per osservazioni successive.

Secondo metodo:

Reagenti: violetto di Nicolle, reattivo di Lugol, soluzione decolorante (3 parti di alcool etilico 95° + 1 parte acetone), fucsina fenicata secondo Ziehl-Neelsen. Per l'osservazione con l'obiettivo ad immersione olio di cedro o equivalente sintetico e xilene

Procedura: la base è quella indicata nel metodo precedente, ma al posto di colorare con la safranina si cosparga il lo striscio con una soluzione composta da una parte di fucsina fenicata di Ziehl-Neelsen e nove parti di acqua di fonte (soluzione da preparare al momento) e la si lasci agire per 1 minuto e 30 secondi.

Risultati:

Batteri Gram positivi: viola

Batteri Gram negativi: fucsia

Cellule epiteliali: fucsia

Nucleo cellule epiteliali: fucsia intenso