

ASL N. 4 L'Aquila Ospedale San Salvatore	Procedura Operativa Standard	Rev 1.0
Dip. Patologia Clinica U.O. Medicina di Laboratorio	Colorazioni generali in Batteriologia (Batterioscopia)	Ott. 2002
Settore Batteriologia tel 0862 368688		

1. Principio del test

Osservazione microscopica del vetrino colorato, preparato da un campione clinico.

2- Applicazione clinica

In generale , i batteri hanno una affinità per un grande numero di coloranti , principalmente si tratta dei derivati basici dell'anilina (blu di metilene, cristal violetto, fucsina basica, ecc.). Fra i metodi esistenti , quelli piu' importanti in un laboratorio di microbiologia sono il metodo di GRAM e il metodo di ZIEHL-NEELSEN.

Il metodo di Gram si basa nella fissazione per determinati batteri del composto iodio-pararosanilina formato dal cristal violetto (violetto genziana) e il lugol , quando non è rimuovibile dalla decolorazione con alcool etilico (o miscela , di una parte di 3 parti di etanolo e 1 parte di acetone). Questi batteri che fissano il composto sopracitato , vengono definiti "GRAM POSITIVI".

Al contrario, determinati batteri non fissano il composto e si lasciano decolorare facilmente dall'etanolo , ricevendo perciò il nome di "GRAM NEGATIVI". Per visualizzarli , trattiamo il preparato batterioscopico alla fine con safranina (o fucsina di Ziehl diluita 1:10). I batteri Gram positivi si presentano violetti e i Gram negativi rossi. E' risaputo , come regola generale, che i cocci con eccezione delle Neisserie, sono generalmente Gram (+), e i bastoncini , con eccezione dei Corinebatteri , *Listeria*, *Bacillus*, e Clostridi sono Gram (-).

3- Campione

Praticamente tutti i campioni provenienti da materiali clinici possono essere utilizzati per fare un vetrino con la finalità della osservazione microscopica.

4- Standard, Coltrolli, Reagenti

METODO DI GRAM :

➤ *Soluzione madre di cristal-violetto:*

Cristal violetto (20 g); Etanolo 96° GL (100 mL);

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

➤ *Soluzione madre di ossalato:*

Ossalato di ammonio (1 gr); acqua distillata 100 mL;

Soluzione di lavoro : diluire la soluzione madre di cristal violetto 1:10 con acqua distillata e mescolare con 4 volumi di soluzione madre di ossalato. Conservare in recipiente di vetro chiuso con coperchio a vite;

.

➤ *Soluzione di Lugol*

Cristalli di iodio (1 gr); ioduro di potassio (2 gr)

Dissolvere completamente in 5 mL di acqua distillata. Subito dopo aggiungere :acqua distillata (240 mL), soluzione di bicarbonato di sodio 5% (60 mL). Mescolare e conservare in recipiente di vetro chiuso.

➤ *Decolorante*

Etanolo 96° GL o Etanolo 96 ° GL (250 mL) + Acetone P.A. (250 mL) o 1 parte di acetone e 3 parti di etanolo.

Aumentando la percentuale di acetone si aumenta il potere decolorante della soluzione (velocità) che è più lenta se prevale la quantità relativa di etanolo.

➤ *Contro-colorante:*

Soluzione madre : Safranina O (2.5 mg); Etanolo 96° GL (100 mL)

Soluzione di lavoro: diluire la soluzione madre di safranina 1:5 o 1:10 con acqua distillata.

COLORAZIONE DI CONTRASTO CON FUCSINA FENICATA PER LA COLORAZIONE DI GRAM APPLICATA A BATTERI CON COLORAZIONE DEBOLE:

➤ Fucsina fenicata di Kinyoun:

Fucsina basica (4g); Fenolo (8mL); Etanolo 96° GL (20 mL); Acqua distillata (100 mL).

Dissolvere la fucsina basica nell'alcool e aggiungere l'acqua lentamente. Fondere il fenolo in bagno maria a 56°C e aggiungere 8 mL alla soluzione di fucsina , usando una pipetta di vetro munita di pipettatore automatico o dispositivo di sicurezza simile .

Diluire il colorante 1:20 con acqua distillata (5 mL di fucsina fenicata e 95 mL di acqua distillata) e usare al posto della safranina nella colorazione di Gram. I microorganismi che si colorano debolmente (*Legionella*, *Bordetella*, batteri anaerobi gram negativi, *Campylobacter*, *Brucella*) richiedono 3 minuti di colorazione con il colorante di fondo (controcolorante).

METODO DI COLORAZIONE DEI MICOBATTERI SECONDO ZIEHL-NEELSEN:

Preparazione del reattivo :

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Fucsina fenicata di Ziehl: Dissolvere 0.3 g di fucsina basica in 10 mL di etanolo 95%. Dissolvere 5.0 gr di fenolo cristallizzato in 100 mL di acqua distillata se necessario scaldare leggermente per aiutare la dissoluzione). Mescolare i 10 mL della soluzione di fucsina con 90 mL della soluzione di fenolo in acqua ;

Soluzione decolorante :Addizionare attentamente 3.0 mL di acido cloridrico concentrato (37%) a 97 mL di etanolo a 95% e agitare dolcemente;

Blu di metilene : Dissolvere 0.3 gr di blu di metilene in 100 mL di acqua distillata.

Fucsina fenicata pronta all'uso : FUCSINA ACCUSTAIN Sigma

Composizione:Pararosanilina 0.85%, fenolo 2.5%, glicerolo 5%, DMSO (5%), etanolo (5%)

METODO DI COLORAZIONE DEI MICOBATTERI CON FLUOROCROMO O FLUOROCROMO – AURAMINA O:

Auramina O: Dissolvere 0.1 g di Auramina O in 10 mL di etanolo al 95%.Dissolvere 3.0 gr di fenolo cristallizzato in 87 mL di acqua distillata .Mescolare le 2 soluzioni;

Soluzione decolorante : Addizionare attentamente 0.5 mL di acido cloridrico concentrato a 100 mL di etanolo al 70%;

Permanganato di potassio: Dissolvere 0.5 g di permanganato di potassio (KMnO₄) in 100 mL di acqua distillata.

5- Strumenti

Non Applicato

6- Procedimento Dettagliato

PREPARAZIONE DEL VETRINO:

La preparazione di uno striscioèrichiesto nella maggior parte dei procedimenti di laboratorio, prima della colorazione.Ha come finalità di fissare i batteri a un vetrino, evitando che esse siano perse durante il processo di colorazione propriamente detto.LO striscio puo' essere preparato a partire dalle colonie cresciute in mezzi solodi o a partire da un mezzo liquido.Sotto sono sottolineati i principali punti coinvolti nella preparazione di un buon striscio batterico:

Collocare una piccola parte di colonia batterica cresciuta in un mezzo solido (o il corrispondente di due ansate di un mezzo liquido) al centro di un vetrino previamente pulito e sgrassato con alcool e asciugato.;

Se si sta lavorando con colonie isolate a partire da un mezzo solido, aggiungere una goccia (e solamente una goccia) di acqua distillata sterile (o salina sterile) sopra il vetrino.Se si

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore:Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

stanno usando batteri inoculati in mezzo liquido , non c'è necessità di aggiungere acqua o soluzione salina;

Con l'ausilio di una ansa , mescolare il campione completamente con il diluente , allargando per circa 2/3 del vetrino (non dimenticare che deve superare almeno 1/3 del vetrino per identificare lo striscio);

Collocare il vetrino (che è ancora umido) in un supporto e attendere che si secchi completamente. Lo striscio così' è pronto per il procedimento di colorazione.

METODO DI GRAM

Procedimento:

Fissare il vetrino o con la fiamma del becco Bunsen oppure con lo stesso decolorante per 5 minuti. I vetrini che si lasciano asciugare al termostato il giorno prima sono già fissati e sono pronti alla colorazione.

- 1) Sommergere il vetrino con **Cristal Violetto**. Attendere 30 secondi-1 minuto;
- 2) lavare con acqua di fonte;
- 3) aggiungere **Soluzione di Lugol**. Attendere 1 minuto;
- 4) lavare con acqua di fonte;
- 5) decolorare in più' passate non oltre i 10 secondi .Se il vetrino è carico (pus, espettorati) insistere con il **decolorante** ma non oltre i 20 secondi;
- 5) lavare con acqua di fonte;
- 6) contro colorare con **Safranina** (o fucsina Ziehl-Neelsen diluita 1:10) . Attendere 30 secondi-1 minuto;
- 7) asciugare su carta da filtro, osservare sotto obiettivo ad immersione.

METODO DI COLORAZIONE DEI MICOBATTERI:

Preparazione degli strisci;

Sputo: i vetrini utilizzati nel preparare gli strisci devono essere , puliti e sgrassati.

Il vetrino deve essere diviso in 3 parti , dato che in 1/3 si deve realizzare l'identificazione del paziente con un lapis comune (nel caso si stia utilizzando un vetrino con una parte smerigliata) o con un pennarello che non si scolora e gli altri 2/3 si lasciano per il preparato.

Per la realizzazione dello striscio si deve utilizzare un applicatore di legno che dovrà essere scartato dopo incenerimento o autoclavato. Nel caso sia utilizzata una ansa batteriologica, dopo la preparazione dello striscio , deve essere eliminata in un recipiente con sabbia e disinfettante (ipoclorito di sodio all'1% o fenolo al 5%) prima di flamarla nel becco Bunsen.

Una scelta particolarmente utile (porzione purulenta o con sangue) nel campione da esaminare è di fondamentale importanza. Prendere una piccola porzione utile e distendere sopra il vetrino con movimento destro-sinistro , in maniera da ottenere uno striscio omogeneo , né molto fino né molto spesso. Lo striscio fino può contenere pochi BAAR (che possono dare risultati

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

falsi negativi) e strisci grossi possono provocare accumuli di fucsina per la difficoltà di di scolorarsi con la soluzione alcool acido (cio' che rende impossibile la lettura microscopica).

Gli strisci devono essere asciugati a temperatura ambiente e fissati alla fiamma del becco Bunsen, prima che si realizzano le tecniche di colorazione.

Sputo concentrato: Quando utilizziamo sputo indotto o lavaggio broncoalveolare, gli strisci vanno realizzati dopo centrifugazione del campione clinico. La tecnica consiste nel mescolare in egual misura un volume di ipoclorito di sodio al 5% e dello sputo indotto in un provettone da centrifuga con capacità di 50 mL. Si agita nel vortex per liquefare il materiale e si incuba a temperatura ambiente per 15 minuti. Si aggiunge acqua distillata sterile fino al segno dei 50 mL. Si centrifugano i tubi a 3000-3500 per 15 minuti. Si decanta il sovrantante, si risospende il sedimento con alcune gocce di acqua distillata sterile e preparare lo striscio. Si asciuga a temperatura ambiente e si fissa al calore.

Altri campioni clinici:

In laboratori che realizzano di routine la cultura per rilevare i micobatteri, gli strisci possono essere realizzati a partire dalla digestione e concentrazione di questi campioni clinici. Nel caso della ricerca di BAAR in campioni clinici sterili (liquor, liquido pleurico, sangue) si può realizzare la ricerca diretta dei bastoncini nel sedimento dopo centrifugazione di questi materiali, non avendo la necessità di passare attraverso per il processo di decontaminazione.

➤ Metodi di colorazione:

Esistono due metodi standard utilizzati nella colorazione dei preparati per lo studio dei BAAR: il metodo di Ziehl-Neelsen (ZN) e la colorazione con fluorocromo (Auramina O). Attualmente esiste una tendenza dei laboratori a utilizzare l'ultima tecnica poiché è più rapida e sensibile della ZN classica.

Intanto, a causa della necessità di un microscopio con illuminazione ultravioletta (che rende la metodologia non sempre applicabile), viene usato come metodo di screening, quando si lavora con un numero di campioni superiore a 12. Sottolineiamo che in tutti i casi di positività e nei quali si abbiano dubbi, si deve ricolorare lo striscio con ZN, per determinarsi il risultato semi-quantitativo con + o confermare la presenza di BAAR..

1) METODO DI ZIEHL-NEESEN:

Il metodo di ZIEHL-NEESEN si basa sulla caratteristica di alcool acido resistenza di determinati batteri (per esempio *Mycobacterium tuberculosis*) che permette di trattarli con una soluzione di fucsina fenicata a caldo o a freddo. Tali batteri resistono al trattamento posteriore con una soluzione di alcool-acido cloridrico (HCl 3% in etanolo) e ritengono la colorazione iniziale rossa (BAAR), mentre altri si decolorano e assumono la colorazione di fondo, normalmente fatta con blu di metilene 0,3% o verde malachite.

N:B:

I vetrini vanno ben fissati, preferibilmente alla fiamma del becco Bunsen o lasciati in termostato overnight.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

COLORAZIONE A CALDO DI ZIEHL NEELSEN

Procedimento:

- 1-Diluire la Carbol fucsina 1:10 con acqua ;
- 2-sommergere i vetrini con questo colorante .E' consigliabile filtrare la soluzione per evitare i cristalli di fenolo che si osserverebbero nel vetrino;
- 2) scaldare il preparato fino ai primi vapori. I colorante non deve bollire né seccare sopra il vetrino;
- 3) attendere 5 minuti;
- 4) lavare con acqua di fonte;
- 5) decolorare con HCl al 3% in etanolo i vetrini preparati dopo fluidificazione e con acido solforico al 20% in acqua distillata i campioni preparati direttamente senza decontaminazione e fluidificazione fino a quando il colore rosso scompare;
- 6) lavare con acqua di fonte;
- 7) contro-colorare con blu di metilene allo 0.3% o verde malachite allo 0.3% per 3 minuti;
- 8) lavare con acqua di fonte;
- 9) asciugare e osservare al microscopio ottico con obiettivo a immersione.

COLORAZIONE DI ZIEHL NEELSEN A FREDDO

Procedimento:

- 1) Sommergere i preparati con carbol-fucsina senza diluirla;
- 2) lasciare almeno mezz'ora;
- 3) lavare con acqua di fonte;
- 4) decolorare con HCl 3% in etanolo i vetrini preparati dopo decontaminazione e fluidificazione o con acido solforico al 20% in acqua distillata i vetrini preparati senza nessun trattamento;
- 5) lavare con acqua di fonte;
- 6) contro-colorare con verde malachite o blu di metilene allo 0.3%.
- 7) asciugare e osservare al microscopio ottico con obiettivo a immersione.

I micobatteri appaiono come bastoncelli rosso acceso, colorati in maniera non uniforme, su uno sfondo blu o verde .Osservare per primo il vetrino di controllo positivo per giudicare la qualità della colorazione.

2) COLORAZIONE CON FLUOROCROMO –AURAMINA-O:

Procedimento:

- 1) Coprire i preparati con una soluzione di Auramina O e lasciare agire per 15 minuti a temperatura ambiente;
- 2) lavare i vetrini in acqua corrente;
- 3) coprire i vetrini con soluzione decolorante per 2 minuti;
- 4) lavare i vetrini in acqua corrente;
- 5) coprire i vetrini con una soluzione di permanganato di potassio e lasciare agire per 3 minuti;
- 6) lavare i vetrini in acqua corrente;
- 7) lasciare seccare a temperatura ambiente;

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

- 8) osservare i preparati al microscopio a fluorescenza, con un obiettivo di 40x , al piu' presto possibile. I micobatteri appaiono colorati in verde fluorescente, contro un fondo castano.

7- Calcoli

Non applicati

8- Controllo di Qualità interno

Ad ogni seduta di colorazione ,si colora un vetrino positivo simulato, ottenuto stemperando una colonia di bastoncini alcool-acido positivi in uno sputo normale.

9- Valori di Riferimento, Interpretazione, Valori critici

COLORAZIONE DI GRAM

Non applicato

COLORAZIONE DI MICOBATTERI:

Risultati semi quantitativi:

Il numero di BAAR varia considerevolmente in campioni di sputo, raccolti in differenti momenti da uno stesso paziente .Pero' un risultato semi-quantitativo dà una indicazione anche se grossolana , della severità della infezione e del grado di infettività, così' come della risposta alla terapia.Ci riferiamo alla tab. 1 che mostra il modello standard di risposta .

.

Tabella –1: risultato semi quantitativo degli strisci di sputo , colorati con il metodo di Ziehl-Neelsen e osservati in microscopia ottica normale:

:

Numero di bastoncini osservati	Numero di campi osservati	Risultato
Nessuno	100 (*)	Negativo
Meno di 1	100	Dubbio.Ripetere
Da 1 a 4	100	+
1 a 10	50	++
Piu' di 10	20	+++

(*) Nel caso di non incontrare nessun bastoncino in 100 microscopici osservati è raccomandabile che si estenda la lettura a 300 campi.

Bacilloscopia– Morbo di Hansen

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

La diagnosi di laboratorio del morbo di Hansen (Lebbra) è basata nella determinazione dell'indice bacilloscopico (IB), che consiste nel riscontro di BAAR in strisci di linfa provenienti dalla lesioni, lobuli auricolari, gomito, ginocchio. Questi preparati vanno confezionati con un bisturi con il quale fare la raccolta di linfa, in vetrini puliti e sgrassati. Si asciugano i preparati a temperatura ambiente, si fissano i vetrini con il calore e si realizza la colorazione degli stessi attraverso il metodo di Ziehl-Neelsen. Si osservano i vetrini al microscopio ottico comune, con l'obiettivo ad immersione. Il risultato semi quantitativo è dato dai più +, secondo la scala preconizzata da Ridley e Jopling (Tabella-2) raccomandata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità.

Tabella-2: Risultati semi-quantitativi degli strisci di linfa, colorati con il metodo di Ziehl-Neelsen e osservati in microscopia ottica comune:

Numero di bastoncelli osservati	Numero di campi osservati	Risultato
Nessuno	100	0
1 a 10	100	1+
1 a 10/10campi	100	2+
1 a 10/per campo	25	3+
10 a 100/per campo	25	4+
100 a 1000/per campo	25	5+
Piu' di 1000/per campo	25	6+

10- Linearità e limite di sensibilità

Non applicato

11- Limitazioni del Metodo

Paziente in uso di anti microbici, raccolta impropria, uso di mezzi di coltura disidratati, temperatura di incubazione differente da 35-37 °C; vetrini vecchi possono presentare solchi onde aversi deposizione di fucsina, che possono confondersi con BAAR. Esiste una possibilità di bastoncini che vengono trasportati da un vetrino all'altro se durante la colorazione si trovano molto uniti. Quando si esamina un vetrino positivo al microscopio ottico utilizzando l'olio da immersione esiste la possibilità che dei bastoncelli siano portati da un vetrino all'altro se l'obiettivo non è adeguatamente pulito fra una lettura e l'altra.

12- Riferenze Bibliografiche

1. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1-4. *Williams & Wilkins*, Baltimore. 1984-1989

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

2. Center for Infectious Diseases. Reference/Diagnostic Services. *Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Ga.
3. Ghuyssen, JM; Hakenbeck, R: Bacterial cell wall. *Elsevier*, 1994.
4. Gould, GW; Hurst, A (eds): The Bacterial Spore. *Academic Press*, San Diego, 1969.
5. Jawetz, E; Melnick, JL; Adelberg, EA: Medical Microbiology. *Appleton & Lange*, East Norwalk, CT, 1989.
6. Lennette, EH et al (eds): Manual of Clinical Microbiology 4th Ed. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 1985.
7. Murray, PR; Baron, EJ; Pfaller, MA; Tenover, FC; Tenover, RH (eds): Manual of Clinical Microbiology 6th Ed. *ASM Press*, Washington, D.C., 1995.
8. Rogers, HJ: Bacterial Cell Structure. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 1983.
9. Skerman, VBD; McGowan, V; Sneath, PHA (eds): Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* 30:225, 1980.
10. Sneath, PHA (ed): International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990 Revision. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 1990.
11. Wright, A; Tipper, DJ: The outer membrane of gram-negative bacteria. p. 427. In Sokatch, JR; Ornston, LN (eds): The bacteria. Vol. 7. *Academic Press*, San Diego, 1979.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.