

GRAM COLOR KIT

DESCRIZIONE

GRAM COLOR KIT è un kit per per la colorazione dei microrganismi, che ne permette la differenziazione in due categorie: Gram-positivi (Gram+) che si colorano in blu e Gram-negativi (Gram-), che si colorano in rosso. Tale colorazione costituisce, insieme con l'osservazione diretta della morfologia cellulare, il primo livello di classificazione tassonomica dei procarioti.

CONTENUTO DELLE CONFEZIONI

I reagenti sono contenuti in flaconi di plastica, chiusi in termoinvoluzione e forniti di tappo gocciolatoio. Ciascuna confezione contiene:

- 1 flacone contenente 250 ml di Soluzione Cristal Violetto
- 1 flacone contenente 250 ml di Soluzione Lugol-PVP
- 1 flacone contenente 250 ml di Soluzione Decolorante
- 1 flacone contenente 250 ml di Soluzione Safranina
- 1 foglio istruzioni

PRINCIPIO DEL METODO

La colorazione di Gram è basata sulla proprietà che ha il Cristal Violetto di combinarsi con lo Iodio, formando composti non decolorabili con l'alcool o con la miscela alcool-acetone. Alcuni batteri hanno una speciale affinità per questa reazione e, una volta colorati con il cristal violetto, non perdono il colore, se trattati con l'alcool o con la miscela alcool-acetone, restando colorati in blu (batteri Gram-positivi). Altri perdono il colore blu e si colorano con la Safranina assumendo una colorazione rossa (batteri Gram-negativi).

COMPOSIZIONE

Le soluzioni che compongono il GRAM COLOR KIT sono tutte soluzioni acquose ad eccezione della Soluzione Decolorante.

Tabella n°1

GRAM COLOR KIT			
Contenuto			
Soluzione Cristal Violetto	1	Cristal Violetto	2%
		Alcool etilico	20%
		Ossalato d'ammonio	0.8%
Soluzione Lugol-PVP	2	Iodio	1.3%
		Ioduro di potassio	2%
		PVP(Polivinilpirrolidone)	7%
		Alcool 95°C	50%
Soluzione Decolorante	3	Acetone	50%
		Safranina	0.25%
Soluzione Safranina	4	Safranina	0.25%
		Alcool etilico	10%

RACCOLTA DEI CAMPIONI

I campioni da sottoporre alla colorazione di Gram sono costituiti principalmente da materiale clinico e da colture microbiche.

Le colonie da sottoporre alla colorazione di Gram devono essere prelevate da colture giovani (18-24 ore) preferibilmente da terreni agarizzati.

PROCEDURA DEL TEST

Preparazione e fissazione

Utilizzando vetrini puliti, eseguire uno striscio della coltura o del materiale patologico. Lasciare essiccare all'aria e fissare al calore con passaggi rapidi sulla fiamma. Eseguire la fissazione del campione evitando un eccesso di riscaldamento. Si possono adottare anche altri metodi di fissazione.

Colorazione

- Ricoprire il vetrino con la Soluzione Cristal Violetto. Attendere 1 minuto, quindi lavare delicatamente con acqua.
- Ricoprire il vetrino con la Soluzione Lugol-PVP. Attendere 1 minuto, quindi lavare delicatamente con acqua.
- Decolorare con la Soluzione Decolorante finché il preparato libera colorante (circa 30-60 secondi), quindi lavare delicatamente con acqua.
- Ricoprire il vetrino con la Soluzione Safranina. Attendere 30-60 secondi, quindi lavare delicatamente con acqua.
- Asciugare.
- Osservare il preparato al microscopio con obiettivo per immersione.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I microrganismi Gram-negativi appaiono di colore rosso.

I microrganismi Gram-positivi appaiono di colore blu.

La colorazione di Gram permette di differenziare:

- I bacilli Gram-negativi da quelli Gram-positivi;
- I cocci Gram-negativi da quelli Gram-positivi;
- I coccobacilli Gram-negativi da quelli Gram-positivi; I diplococchi Gram-negativi da quelli Gram-positivi.

CONTROLLO QUALITA'

Ogni lotto di GRAM COLOR KIT viene sottoposto al controllo di qualità utilizzando una coltura di *Escherichia coli* ATCC 25922 per il controllo dei batteri Gram-negativi (colore rosso) ed una coltura di *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 per il controllo dei batteri Gram-positivi (colore blu).

LIMITI

1. La colorazione di Gram fornisce una preliminare identificazione ma non sostituisce i normali studi colturali del campione.
2. Terapie antibiotiche possono rendere i batteri gram-positivi più sensibili alla decolorazione ed apparire di colore rosa-rosso invece di blu.
3. Le cellule prelevate da colture giovani di 18-24 ore hanno una maggiore affinità per i coloranti rispetto alle cellule prelevate da colture vecchie.
4. La colorazione di Gram viene alterata dalla distruzione fisica della parete cellulare o del protoplasma; infatti la parete cellulare dei batteri Gram-positivi interpone una barriera che impedisce il rilascio del complesso Cristal Violetto-Iodio dal citoplasma e la parete cellulare dei batteri Gram-negativi contiene lipidi solubili in solventi organici che permettono la decolorazione del citoplasma. Pertanto i microrganismi distrutti fisicamente da un eccesso di calore non reagiscono alla colorazione di Gram come atteso.

PRECAUZIONI

La confezione di GRAM COLOR KIT contiene sostanze classificate come pericolose ai sensi della legislazione vigente; per il suo impiego si consiglia di consultare la scheda di sicurezza.

GRAM COLOR KIT è un kit per la colorazione batterica, da usare solo per uso diagnostico *in vitro*, è destinato ad un ambito professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.

CONSERVAZIONE

Conservare GRAM COLOR KIT a 10-25°C nella sua confezione originale. Non conservare vicino a fonti di calore ed evitare eccessive variazioni di temperatura. In queste condizioni il prodotto GRAM COLOR KIT è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (cambiamenti di colore delle soluzioni o presenza di precipitati grossolani).

ELIMINAZIONE DEL MATERIALE USATO

Dopo l'utilizzazione, i vetrini colorati con il GRAM COLOR KIT ed il materiale venuto a contatto con il campione devono essere decontaminati e smaltiti in accordo con le tecniche in uso in laboratorio per la decontaminazione e lo smaltimento di materiale potenzialmente infetto.







BIBLIOGRAFIA

- Kruczak-Filipov, P., and R.G. Shively.1992. *Gram stain procedure*, p.1.5.1-1.5.18. In H.D. Isenberg (ed.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Murray, P.R. (ed.) 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

PRESENTAZIONE

Prodotto	REF	Σ
GRAM COLOR KIT	80293	4 x 250 ml

TABELLA DEI SIMBOLI

IVD	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>		Non riutilizzare
	Fabbricante	Σ	Contenuto sufficiente per <n> saggi
REF	Numero di catalogo		Fragile, maneggiare con cura
	Utilizzare entro		Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso
	Limiti di temperatura	LOT	Codice del lotto



Liofilchem s.r.l.

Via Scozia-Zona industriale - 64026 Roseto degli Abruzzi Tel. +39.085.8930745 - Fax +39.085.8930330
Web site: <http://www.liofilchem.net> E-mail: liofilchem@liofilchem.net

F00411

Rev.1/ 20.10.2009

GRAM COLOR KIT

DESCRIPTION

GRAM COLOR KIT is a kit for staining micro-organisms that allows them to be differentiated into two categories: Gram-positives (Gram+), which are coloured blue, and Gram-negatives (Gram-), which are coloured red. Combined with direct observation of the cell morphology, this staining constitutes the first level in the taxonomic classification of prokaryotes.

CONTENT OF THE PACKAGES

The reagents are contained in plastic bottles, sealed by thermo-induction and provided with a dropper lid. Each pack contains:

- 1 bottle containing 250 ml of Crystal Violet Solution
- 1 bottle containing 250 ml of Lugol-PVP Solution
- 1 bottle containing 250 ml of Decolourant Solution
- 1 bottle containing 250 ml of Safranin Solution
- 1 Instruction sheet

PRINCIPLE OF THE METHOD

Gram staining is based on the property of Crystal Violet of combining with iodine to form compounds that cannot be decoloured with alcohol or with an alcohol-acetone mixture. Some bacteria have a special affinity for this reaction and, once stained with crystal violet, do not lose the colour if treated with alcohol or alcohol-acetone mixture, thus retaining the blue colouring (Gram-positive bacteria). Others lose the blue colour and are stained by Safranin, taking a red colour (Gram-negative bacteria).

COMPOSITION

The solutions comprised in the GRAM COLOR KIT are all aqueous solutions, with the exception of the Decolourant Solution.

Table n°1

GRAM COLOR KIT			
Content			
Crystal Violet Solution	1	Crystal Violet	2%
		Ethyl alcohol	20%
		Ammonium oxalate	0.8%
Lugol-PVP Solution	2	Iodine	1.3%
		Potassium iodide	2%
		PVP (Polyvinylpyrrolidone)	7%
Decolourant Solution	3	Alcohol 95°C	50%
		Acetone	50%
Safranin Solution	4	Safranin	0.25%
		Ethyl alcohol	10%

COLLECTION OF SAMPLES

Samples to be subjected to Gram staining are usually clinical material and microbial cultures. The colonies to be subjected to Gram staining must be taken from young cultures (18-24 hours) preferably on an agar medium.

TEST PROCEDURE

Preparation and fixing

On clean slides, make a smear of the culture or pathological material. Leave to dry in the air and fix by heat, passing rapidly over the flame. Do not overheat the sample when fixing. Other fixing methods may be used.

Staining

1. Cover the slide with the Crystal Violet Solution. Wait 1 minute, then rinse gently with water.
2. Cover the slide with the Lugol-PVP Solution. Wait 1 minute, then rinse delicately with water.
3. Decolour with the Decolourant Solution for as long as the preparation releases colour (about 30-60 seconds), then rinse delicately with water.
4. Cover the slide with the Safranin Solution. Wait 30-60 seconds, then rinse delicately with water.
5. Dry.
6. Examine the preparation under the microscope with the objective for immersion.

INTERPRETATION OF THE RESULTS

The Gram-negative micro-organisms appear as red in colour.
The Gram-positive micro-organisms appear as blue in colour.
The Gram staining makes it possible to distinguish between:

- Gram-negative bacilli from Gram-positive ones;
- Gram-negative cocci from Gram-positive ones;
- Gram-negative coccobacilli from Gram-positive ones;
- Gram-negative diplococci from Gram-positive ones.

QUALITY CONTROL

Each lot of GRAM COLOR KIT is subjected to quality control using a culture of *Escherichia coli* ATCC 25922 for the test for Gram-negative bacteria (red colour) and a culture of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 for the test for Gram-positive bacteria (blue colour).

LIMITS

1. Gram staining provides a preliminary identification but does not replace normal cultural studies of the sample.
2. Antibiotic therapy may make Gram-positive bacteria more sensitive to decolouration, so that they appear pinkish-red instead of blue.
3. Cells taken from young, 18-24 hour cultures have a greater affinity for the stains than cells taken from older cultures.
4. Gram staining is altered by the physical destruction of the cell wall or protoplasm. In fact the cell wall of Gram-positive bacteria constitutes a barrier which impedes release of the Crystal Violet-iodine complex from the cytoplasm, and the cell wall of Gram-negative bacteria contains lipids soluble in organic solvents that permit decolouration of the cytoplasm. Hence, micro-organisms physically destroyed by an excess of heat do not react as expected to the Gram stain test.

PRECAUTIONS

The GRAM COLOR KIT package contains substances classified as hazardous by current legislation. It is recommended that the Safety Data Sheets be consulted on their use. GRAM COLOR KIT is a kit for bacteria staining, only for diagnostic use *in vitro*. It is intended for use in a professional environment and must be used in a laboratory by adequately trained personnel using approved asepsis and safety methods for dealing with pathogenic agents.

CONSERVATION

Store GRAM COLOR KIT at 10-25°C in the original packaging. Keep away from sources of heat and avoid excessive changes of temperature. In such conditions the product GRAM COLOR KIT will be valid until the expiry date shown on the label. Do not use beyond that date. Eliminate without using if there are signs of deterioration (changes in the colour of the solutions or presence of substantial precipitates).

DISPOSAL OF USED MATERIAL

After use, the slides stained with the GRAM COLOR KIT and any material that has come into contact with the sample must be decontaminated and disposed of in accordance with the techniques used in the laboratory for decontamination and disposal of potentially infected material.











BIBLIOGRAPHY

- Kruczak-Filipov, P., and R.G. Shively. 1992. *Gram stain procedure*, p.1.5.1-1.5.18. In H.D. Isenberg (ed.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Murray, P.R. (ed.) 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

PRESENTATION

Product	REF	
GRAM COLOR KIT	80293	4 x 250 ml

TABLE OF SYMBOLS

 IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device		Do not reuse
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Catalogue number		Fragile, handle with care
	Use by		Caution, consult accompanying documents
	Temperature limitation		Batch code



Liofilchem s.r.l.

Via Scozia-Zona industriale - 64026 Roseto degli Abruzzi Tel. +39.085.8930745 - Fax +39.085.8930330
Web site: <http://www.liofilchem.net> E-mail: liofilchem@liofilchem.net

F00411
Rev.1/ 20.10.2009

GRAM COLOR KIT

DESCRIPTION

GRAM COLOR KIT est un kit pour la coloration des micro-organismes, qui permet de les différencier en deux catégories : Gram positifs (Gram +) qui se colorent en bleu et Gram négatifs (Gram-) qui se colorent en rouge. Cette coloration constitue, avec l'observation directe de la morphologie cellulaire, le premier niveau de classement taxonomique des procaryotes.

CONTENU DES EMBALLAGES

Les réactifs sont contenus dans des flacons en plastique, fermés par induction thermique et dotés d'un bouchon compte-gouttes.

Chaque emballage contient :

- 1 flacon contenant 250 ml de Solution Cristal Violet
- 1 flacon contenant 250 ml de Solution Lugol-PVP
- 1 flacon contenant 250 ml de Solution Décolorante
- 1 flacon contenant 250 ml de Solution Safranine
- 1 notice

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La coloration de Gram se base sur la propriété du Cristal Violet de se combiner avec l'iode, formant des composés n'étant pas décolorables avec l'alcool ou avec le mélange alcool-acétone. Certaines bactéries ont une affinité spéciale pour cette réaction et, une fois colorées avec le cristal violet, elles ne perdent pas la couleur, si elles sont traitées avec l'alcool ou avec le mélange alcool-acétone, restant colorées en bleu (bactéries Gram positives). D'autres perdent la couleur bleue et se colorent avec la Safranine, prenant une coloration rouge (bactéries Gram négatives).

COMPOSITION

Les solutions qui composent le GRAM COLOR KIT sont toutes des solutions aqueuses, excepté la Solution Décolorante.

Tableau n°1

GRAM COLOR KIT			
Contenu			
Solution Cristal Violet	1	Cristal Violet	2%
		Alcool éthylique	20%
		Oxalate d'ammonium	0.8%
Solution Lugol-PVP	2	Iode	1.3%
		Iodure de potassium	2%
		PVP (Polyvinylpyrrolidone)	7%
Solution Décolorante	3	Alcool 95° C	50%
		Acétone	50%
Solution Safranine	4	Safranine	0.25%
		Alcool éthylique	10%

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons à soumettre à la coloration de Gram sont constitués principalement d'échantillon clinique et de cultures microbiennes. Les colonies à soumettre à la coloration de Gram doivent être prélevées de cultures jeunes (18-24 heures) de préférence de milieux gélosés.

PROCÉDURE DU TEST

Préparation et fixation

En utilisant des lames propres, effectuer un frottis de la culture ou du matériel pathologique. Laisser sécher à l'air et fixer à la chaleur par des passages rapides sur la flamme. Effectuer la fixation de l'échantillon en évitant un excès de chaleur. D'autres méthodes de fixation peuvent être adoptées.

Coloration

1. Recouvrir la lame de la Solution Cristal Violet. Attendre 1 minute et laver délicatement avec de l'eau.
2. Recouvrir la lame de la Solution Lugol-PVP. Attendre 1 minute et laver délicatement avec de l'eau.
3. Décolorer avec la Solution Décolorante jusqu'à ce que la préparation libère un colorant (environ 30-60 secondes) et laver délicatement avec de l'eau.
4. Recouvrir la lame de la Solution Safranine. Attendre 30-60 secondes et laver délicatement avec de l'eau.
5. Essuyer.
6. Observer la préparation au microscope avec un objectif à immersion.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les micro-organismes Gram négatifs apparaissent de couleur rouge. Les micro-organismes Gram positifs apparaissent de couleur bleue. La coloration de Gram permet de différencier :

- Les bacilles Gram négatifs de ceux Gram positifs ;
- Les coques Gram négatifs de ceux Gram positifs ;
- Les coccobacilles Gram négatifs de ceux Gram positifs ;
- Les diplocoques Gram négatifs de ceux Gram positifs.

CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque lot de GRAM COLOR KIT est soumis au contrôle de qualité en utilisant une culture de *Escherichia coli* ATCC 25922 pour le contrôle des bactéries Gram négatives (couleur rouge) et une culture de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pour le contrôle des bactéries Gram positives (couleur bleue).

LIMITES

- La coloration de Gram fournit une identification préliminaire, mais ne remplace pas les études normales de cultures de l'échantillon.
- Des antibiothérapies peuvent rendre les bactéries Gram positives plus sensibles à la décoloration et ces dernières peuvent apparaître d'une couleur rose-rouge au lieu de bleu.
- Les cellules prélevées de cultures jeunes de 18-24 heures ont une plus grande affinité pour les colorants que les cellules prélevées de cultures vieilles.
- La coloration de Gram est altérée par la destruction physique de la paroi cellulaire ou du protoplasme. En effet, la paroi cellulaire des bactéries Gram positives interpose une barrière qui empêche la libération du complexe Cristal Violet-iodure par le cytoplasme, et la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives contient des lipides, solubles en solvants organiques, qui permettent la décoloration du cytoplasme. Les micro-organismes détruits physiquement par un excès de chaleur ne réagissent donc pas à la coloration de Gram comme attendu.

PRÉCAUTIONS

L'emballage de GRAM COLOR KIT contient des substances classées comme dangereuses aux termes de la législation en vigueur ; pour son emploi, il est conseillé de consulter la Fiche de données de sécurité.

GRAM COLOR KIT est un kit pour la coloration bactérienne, destiné exclusivement à un usage diagnostique *in vitro* et à un usage professionnel; il doit être utilisé en laboratoire par des opérateurs correctement formés, avec des méthodes approuvées d'asepsie et de sécurité à l'égard des agents pathogènes.

CONSERVATION

Conserver GRAM COLOR KIT à 10-25° C dans son emballage d'origine. Ne pas conserver à proximité de sources de chaleur et éviter toute variation excessive de température. Dans ces conditions, le produit GRAM COLOR KIT est valable jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser au-delà de cette date. Éliminer en présence de signes de détérioration (changements de couleur des solutions ou présence de précipités grossiers).

ÉLIMINATION DU MATÉRIEL UTILISÉ

Après utilisation, les lames colorées avec le GRAM COLOR KIT et le matériel ayant été au contact de l'échantillon doivent être décontaminés et éliminés conformément aux techniques utilisées en laboratoire pour la décontamination et l'élimination de matériel potentiellement infecté.











BIBLIOGRAPHIE

1. Kruczak-Filipov, P., and R.G. Shively.1992. *Gram stain procedure*, p.1.5.1-1.5.18. In H.D. Isenberg (ed.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Murray, P.R. (ed.) 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

PRÉSENTATION

Produit	REF	▽
GRAM COLOR KIT	80293	4 x 250 ml

TABLEAU DES SYMBOLES

 IVD	Dispositif médical diagnostique <i>in vitro</i>		Ne pas réutiliser
	Fabricant		Contenu suffisant pour « n » tests
	Référence du catalogue		Fragile, manipuler avec précautions
	Utiliser jusque		Attention, voir notice d'instructions
	Limites de température		Code du lot



GRAM COLOR KIT

DESCRIPCIÓN

GRAM COLOR KIT es un kit para la coloración de los microorganismos, que permite diferenciarlos en dos categorías: Grampositivos (Gram+), que se colorean de azul y Gramnegativos (Gram-) que se colorean de rojo. Dicha coloración constituye, junto a la observación directa de la morfología celular, el primer nivel de clasificación taxonómica de los procariontes.

CONTENIDO DE LOS ESTUCHES

Los reactivos están contenidos en frascos de plástico, cerrados con termoinducción y dotados de tapón cuentagotas.

Cada estuche contiene:

- 1 frasco que contiene 250 ml de Solución Cristal Violeta
- 1 frasco que contiene 250 ml di Solución Lugol-PVP
- 1 frasco que contiene 250 ml di Solución Decolorante
- 1 frasco que contiene 250 ml di Solución Safranina
- 1 hoja instrucciones

PRINCIPIO DEL METODO

La coloración de Gram se basa en la propiedad que tiene el Cristal Violeta de combinarse con el iodo, formando compuestos que no se pueden decolorar con el alcohol o con la mezcla alcohol-acetona. Algunas bacterias tienen una especial afinidad para esta reacción y, una vez coloreadas con el cristal violeta, no pierden el color, si se tratan con el alcohol o con la mezcla alcohol-acetona, quedan coloreados de azul (bacterias Grampositivas). Otras pierden el color azul y se colorean con la Safranina tomando una coloración roja (bacterias Gramnegativas).

COMPOSICIÓN

Las soluciones, que componen el GRAM COLOR KIT, son todas soluciones acuosas excepto la Solución Decolorante.

Tabla n°1

GRAM COLOR KIT			
Contenido			
Solution Cristal violeta	1	Cristal violeta	2%
		Alcohol etílico	20%
		Oxalato de amonio	0.8%
Solución Lugol-PVP	2	Iodo	1.3%
		Yoduro de potasio	2%
		PVP(Polivinilpirrolidona)	7%
Solución Decolorante	3	Alcohol 95°C	50%
		Acetona	50%
Solución Safranina	4	Safranina	0.25%
		Alcohol etílico	10%

RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras a someter a la coloración de Gram están formadas principalmente por material clínico y por cultivos microbianos.

Las colonias a someter a la coloración de Gram se tienen que sacar de cultivos jóvenes (18-24 horas) preferentemente de terrenos agarizados.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

Preparación y fijación

Utilizando platinas limpias, efectuar un frotis del cultivo o del material patológico. Dejar secar al aire y fijar al calor con pasajes rápidos sobre la llama. Efectuar la fijación de la muestra evitando un exceso de calentamiento. También se pueden adoptar otros métodos de fijación.

Coloración

1. Recubrir la platina con la Solución Cristal Violeta. Esperar 1 minuto, luego lavar delicadamente con agua.
2. Recubrir la platina con la Solución Lugol-PVP. Esperar 1 minuto, luego lavar delicadamente con agua.
3. Decolorar con la Solución Decolorante hasta que la preparación libera colorante (unos 30-60 segundos), luego lavar delicadamente con agua.
4. Recubrir la platina con la Solución Safranina. Esperar 30-60 segundos, luego lavar delicadamente con agua.
5. Secar.
6. Observar la preparación al microscopio con objetivo para inmersión.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los microorganismos Gramnegativos aparecen de color rojo.

Los microorganismos Grampositivos aparecen de color azul.

La coloración de Gram permite diferenciar:

- Los bacilos Gramnegativos de los Grampositivos;
- Los cocos Gramnegativos de los Grampositivos;
- Los cocobacilos Gramnegativos de los Grampositivos;
- Los diplococos Gramnegativos de los Grampositivos.

CONTROL CALIDAD

Cada lote de GRAM COLOR KIT es sometido al control de calidad utilizando un cultivo de *Escherichia coli* ATCC 25922 para el control de las bacterias Gramnegativas (color rojo) y un cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para el control de las bacterias Grampositivas (color azul).

LÍMITES

1. La coloración de Gram proporciona una preliminar identificación pero no sustituye los normales estudios de cultivo de la muestra.
2. Terapias antibióticas pueden volver las bacterias grampositivas más sensibles a la decoloración y aparecer de color rosa-rojo en cambio que azul.
3. Las células sacadas de cultivos jóvenes de 18-24 horas tienen una mayor afinidad para los colorantes con respecto a las células sacadas de cultivos viejos.
4. La coloración de Gram es alterada por la destrucción física de la pared celular o del protoplasma; en efecto la pared celular de las bacterias Grampositivas interpone una barrera que impide la liberación del complejo Cristal-Violeta-iodo del citoplasma y la pared celular de las bacterias Gramnegativas contiene lípidos, solubles en disolventes orgánicos que permiten la decoloración del citoplasma. Por lo tanto, los microorganismos destruidos físicamente por un exceso de calor no reaccionan a la coloración de Gram como esperado.

PRECAUCIONES

El estuche de GRAM COLOR KIT contiene sustancias clasificadas como peligrosas según la legislación vigente; para su empleo se aconseja consultar la ficha de seguridad. GRAM COLOR KIT es un kit para la coloración bacteriana, sólo para uso diagnóstico *in vitro*, está destinado a un ámbito profesional y tiene que ser utilizado en laboratorio por operadores adecuadamente formados, con métodos aprobados de asepsia y seguridad con respecto a los agentes patógenos.

CONSERVACIÓN

Conservar GRAM COLOR KIT a 10-25°C en su estuche original. No conservar cerca de fuentes de calor y evitar excesivas variaciones de temperatura. En estas condiciones el producto GRAM COLOR KIT es válido hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No utilizar después de esta fecha. Eliminar si hay signos de deterioro (cambios de color de las soluciones o presencia de precipitados gruesos).

ELIMINACIÓN DEL MATERIAL UTILIZADO

Después de la utilización, las platinas coloreadas con el GRAM COLOR KIT y el material que ha entrado en contacto con la muestra tienen que ser descontaminados y eliminados de acuerdo con las técnicas en uso en laboratorio para la descontaminación y la eliminación de material potencialmente infecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kruczak-Filipov, P., and R.G. Shively.1992. *Gram stain procedure*, p.1.5.1-1.5.18. In H.D. Isenberg (ed.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Murray, P.R. (ed.) 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

PRESENTACIÓN


Producto	REF	
GRAM COLOR KIT	80293	4 x 250 ml

TABLA DE LOS SÍMBOLOS

 Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>	 No reutilizar
 Fabricante	 Contenido suficiente para "n" ensayos
 Referencia de catálogo	 Frágil, manipular con precaución
 Fecha de caducidad	 Atención, ver instrucciones de uso
 Limite de temperatura	 Código de lote



Liofilchem s.r.l.

Via Scozia-Zona industriale - 64026 Roseto degli Abruzzi Tel. +39.085.8930745 - Fax +39.085.8930330
Web site: <http://www.liofilchem.net> E-mail: liofilchem@liofilchem.net

F00411

Rev.1/ 20.10.2009

GRAM COLOR KIT

DESCRIÇÃO

GRAM COLOR KIT é um kit para a coloração dos microrganismos, que permite a diferenciação em duas categorias: Gram-positivos (Gram +), que se coloram em azul e Gram-negativos (Gram-) que se coloram em vermelho. Esta coloração constitui, junto com a observação directa da morfologia celular, o primeiro nível de classificação taxionómica dos procaríotes.

CONTEÚDO DAS CONFECÇÕES

Os reagentes são contidos em frascos de plástica, fechados em indução térmica e fornecidos de tampa com contador de gotas.

Cada confeção contém:

- 1 frasco que contém 250 ml de Solução Cristal Violeta.
- 1 frasco que contém 250 ml de Solução Lugol-PVP.
- 1 frasco que contém 250 ml de Solução Descolorante.
- 1 frasco que contém 250 ml de Solução Safranina.
- 1 folha de instruções.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A coloração de Gram é baseada na propriedade que há o Cristal Violeta de combinar-se com o iodo, formando compostos que não se descoloram com o álcool ou com a mistura álcool-acetona. Alguns bactérias têm uma especial afinidade para esta reacção e, após ter sido colorada com o cristal violeta, não perdem a cor, se tratadas com o álcool ou com a mistura álcool-acetona, permanecendo coloridas em azul (bactérias Gram-positivas). Outras perdem a cor azul e se coloram com a safranina assumindo uma coloração vermelha (bactérias Gram-negativas).

COMPOSIÇÃO

As soluções, que compõem o GRAM COLOR KIT, são todas soluções aquosas com excepção da Solução Descolorante.

Tabela n.º 1

GRAM COLOR KIT			
Conteúdo			
Solução Cristal Violeta	1	Cristal violeta	2%
		Álcool etílico	20%
		Oxalato de amónio	0.8%
Solução Lugol-PVP	2	Iodo	1.3%
		Iodeto de potássio	2%
		PVP (Polivinilpirrolidona)	7%
Solução Descolorante	3	Álcool 95°C	50%
		Acetona	50%
Solução Safranina	4	Safranina	0.25%
		Álcool etílico	10%

RECOLHIMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras que devem ser submetidas a coloração de Gram são constituídas principalmente de material clínico e de culturas micróbicas.

As colónias que devem ser submetidas a coloração de Gram devem ser levantadas de culturas jovens (18-24 horas) de preferência de terrenos de Agar.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Preparação e fixação:

Utilizando vidros limpos, realizar uma linha de cultura ou do material patológico. Deixe secar ao ar livre e fixar ao calor com passagens rápidas em chamas. Realizar a fixação da amostra evitando um excesso de aquecimento. Se podem adoptar também outros métodos de fixação.

Coloração:

- Cobrir o vidro com a Solução Cristal Violeta. Aguarde 1 minuto, em seguida, lavar delicadamente com água.
- Cobrir o vidro com a Solução Lugol-PVP. Aguarde 1 minuto, em seguida, lavar delicadamente com água.
- Descolorar com a Solução Descolorante até quando o preparado libera colorante (cerca 30-60 segundos), em seguida, lavar delicadamente com água.
- Cobrir o vidro com a Solução Safranina. Aguarde 30-60 segundos, em seguida, lavar delicadamente com água.
- Secar.
- Observar o preparado no microscópio com objectivo para imersão.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os microrganismos Gram-negativos aparecem de cor vermelha.

Os microrganismos Gram-positivos aparecem de cor azul.

A coloração de Gram permite de diferenciar:

- Os bacilos Gram-negativos daqueles Gram-positivos;
- Os cocos Gram- negativos daqueles Gram-positivos;
- Os cocobacilos Gram- negativos daqueles Gram-positivos;
- Os diplococos Gram- negativos daqueles Gram-positivos.

CONTROLO DA QUALIDADE

Cada lote de GRAM COLOR KIT é submetido ao controlo de qualidade utilizando uma cultura de *Escherichia coli* ATCC 25922 para o controlo dos bactérias Gram-negativos (cor vermelha) e uma cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para o controlo dos bactérias Gram-positivos (cor azul).

LIMITES

1. A coloração de Gram fornece uma preliminar identificação, mas, não substitui os normais estudos culturais da amostra.
2. Terapias antibióticas podem render os bactérias gram-positivos mais sensíveis a descoloração e aparecer de cor rosa-vermelho, ao contrário, de azul.
3. As células levantadas de culturas jovens de 18-24 horas têm uma maior afinidade para os colorantes, em relação as células levantadas de culturas velhas.
4. A coloração de Gram é alterada pela destruição física da parede celular ou do protoplasma; de facto, a parede celular dos bactérias Gram-positivos interpõe uma barreira que impede a soltura do complexo Cristal violeta-iodo do citoplasma e a parede celular dos bactérias Gram-negativos contém lípidios, solúveis em solventes orgânicos que permitem a descoloração do citoplasma. Portanto, os microrganismos destruídos fisicamente por um excesso de calor não reagem a coloração de Gram como se espera.

PRECAUÇÕES

A confeção de GRAM COLOR KIT contém substâncias classificadas como perigosas em conformidade com a legislação em vigor; para o seu uso, se aconselha de consultar a ficha de segurança. GRAM COLOR KIT é um kit para a coloração bacteriana, que deve ser utilizado somente para uso diagnóstico "in vitro", é destinado a um âmbito profissional e deve ser utilizado em laboratório por operadores adequadamente treinados, com métodos aprovados de assepsia e de segurança nos confrontos dos agentes patogénicos.

CONSERVAÇÃO

Conservar o GRAM COLOR KIT a 10-25°C na sua confeção original. Não conservar próximo a fontes de calor e evitar excessivas variações de temperatura. Nestas condições o produto GRAM COLOR KIT é válido até a data de vencimento indicada na etiqueta. Não utilizar além desta data. Eliminar, caso sejam presentes sinais de deterioração (mudanças de cor das soluções ou presença de precipitados grosseiros).

ELIMINAÇÃO DO MATERIAL UTILIZADO

Depois da utilização, os vidros coloridos com o GRAM COLOR KIT e o material que entrou em contacto com a amostra, devem ser descontaminados e eliminados de acordo com as técnicas em uso no laboratório para a descontaminação e a eliminação de material potencialmente infecto.

BIBLIOGRAFIA

- Kruczak-Filipov, P., and R.G. Shively.1992. *Gram stain procedure*, p.1.5.1-1.5.18. In H.D. Isenberg (ed.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Murray, P.R. (ed.) 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

TABELA DOS SÍMBOLOS

	Dispositivo medico para diagnostico <i>in vitro</i>		Não reutilizar
	Fabricante		Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	Referência de catálogo		Frágil, manusear com cuidado
	Prazo de validade		Atenção, consulte a documentação incluída
	Limites de temperatura		Código do lote



Liofilchem s.r.l.

Via Scozia-Zona industriale - 64026 Roseto degli Abruzzi Tel. +39.085.8930745 - Fax +39.085.8930330
Web site: <http://www.liofilchem.net> E-mail: liofilchem@liofilchem.net

F00411

Rev.1/ 20.10.2009

GRAM COLOR KIT

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Το GRAM COLOR KIT είναι ένα kit για το χρωματισμό των μικροοργανισμών που επιτρέπει τη διαφοροποίηση σε δύο κατηγορίες: Gram θετικό (Gram +), που παίρνουν μπλε χρώμα και Gram αρνητικό (Gram-) που παίρνουν κόκκινο χρώμα. Ο χρωματισμός αυτός αποτελεί, μαζί με την άμεση παρατήρηση της κυτταρικής μορφολογίας, το πρώτο επίπεδο ταξονομικής ταξινόμησης των προκαρυωτών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ

Τα αντιδραστήρια περιέχονται σε πλαστικά φιαλίδια, κλεισμένα με θερμοεπαγωγή και εξοπλισμένα με σταγονομετρική τάπα.

Κάθε συσκευασία περιέχει:

- 1 φιαλίδιο που περιέχει 250 ml Διαλύματος Cristal μωβ
- 1 φιαλίδιο που περιέχει 250 ml Διαλύματος Lugol-PVP
- 1 φιαλίδιο που περιέχει 250 ml Αποχρωστικού Διαλύματος
- 1 φιαλίδιο που περιέχει 250 ml Διαλύματος Σαφρανίνης
- 1 φύλλο οδηγίων

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο χρωματισμός Gram βασίζεται στις ιδιότητες που έχει το μωβ Cristal να συνδυάζεται με το ιώδιο σχηματίζοντας μείγματα μη αποχρωματιζόμενα με αλκοόλη ή με μίγμα αλκοόλης-ακετόνης. Ορισμένα βακτηρίδια έχουν μια ιδιαίτερη ομοιότητα με αυτήν την αντίδραση και, αφού χρωματιστούν με μωβ cristal, δεν χάνουν χρώμα, αν γίνει επεξεργασία με αλκοόλη ή με μίγμα αλκοόλης-ακετόνης, παραμένοντας χρωματισμένα σε μπλε χρώμα (βακτηρίδια Gram θετικό). Άλλα χάνουν το μπλε χρώμα και χρωματίζονται με την σαφρανίνη σε κόκκινο χρώμα (βακτηρίδια Gram αρνητικό).

ΣΥΝΘΕΣΗ

Τα διαλύματα που συνθέτουν το GRAM COLOR KIT, είναι όλα υδάτινα διαλύματα με εξαιρέση το Αποχρωστικό Διάλυμα.

Πίνακας 1

GRAM COLOR KIT			
Περιεχόμενο			
Διάλυμα μωβ Cristal	1	Μωβ Cristal	2%
		Αιθυλική αλκοόλη	20%
		Οξαλικό αμμώνιο	0.8%
Διάλυμα Lugol-PVP	2	Ιώδιο	1.3%
		Ιωδιούχο κάλιο	2%
		PVP(Πολυβινυλοπυρρολιδόνη)	7%
Αποχρωστικό διάλυμα	3	Αλκοόλη 95°C	50%
		Ακετόνη	50%
Διάλυμα Σαφρανίνης	4	Σαφρανίνη	0.25%
		Αιθυλική αλκοόλη	10%

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα που πρέπει να υποβληθούν σε χρωματισμό Gram αποτελούνται κυρίως από κλινικό υλικό και από μικροβιακές καλλιέργειες. Τα δείγματα που πρέπει να υποβληθούν σε χρωματισμό Gram πρέπει να παραλαμβάνονται από πρόσφατες καλλιέργειες (18-24 ώρες) κατά προτίμηση από υποστρώματα με άγαρ.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΕΣΤ

Προετοιμασία και στερέωση

Χρησιμοποιώντας τζαμάκια καθαρά, κάντε ένα επίχρισμα στην καλλιέργεια ή στο παθολογικό υλικό. Αφήστε να ξεραθεί στον αέρα και στερεώστε με θερμότητα με γρήγορα περάσματα σε φλόγα. Εκτελέστε τη στερέωση του δείγματος αποφεύγοντας την υπερβολική θέρμανση. Μπορείτε να χρησιμοποιήσετε και άλλες μεθόδους στερέωσης.

Χρωματισμός

- Καλύψτε το τζαμάκι με το Διάλυμα Μωβ Cristal. Περιμένετε 1 λεπτό και στη συνέχεια πλύνετε προσεκτικά με νερό.
- Καλύψτε το τζαμάκι με Διάλυμα Lugol-PVP. Περιμένετε 1 λεπτό και στη συνέχεια πλύνετε προσεκτικά με νερό.
- Αποχρωματίστε με το Διάλυμα Αποχρωστικού μέχρι το παρασκεύασμα να απελευθερώσει χρωστική ουσία (περίπου 30-60 δευτερόλεπτα) και στη συνέχεια πλύνετε προσεκτικά με νερό.
- Καλύψτε εκ νέου το τζαμάκι με Διάλυμα Σαφρανίνης Περιμένετε 30-60 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια πλύνετε προσεκτικά με νερό.
- Στεγνώστε.
- Παρατηρήστε το παρασκεύασμα στο μικροσκόπιο με φακό μέσω εμβάπτισης.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι μικροοργανισμοί Gram αρνητικό εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα. Οι μικροοργανισμοί Gram θετικό εμφανίζονται με μπλε χρώμα. Ο χρωματισμός Gram επιτρέπει να διαφοροποιηθούν:

- Οι βακίλλοι Gram αρνητικό από τους Gram θετικό,
- Οι κόκκοι Gram αρνητικό από τους κόκκους Gram θετικό,
- Οι κοκκοβακίλλοι Gram αρνητικό από τους κοκκοβακίλλους Gram θετικό,
- Οι διπλοκόκκοι Gram αρνητικό από τους διπλοκόκκους Gram θετικό.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κάθε παρτίδα GRAM COLOR KIT περνάει από ελέγχους ποιότητας χρησιμοποιώντας μια καλλιέργεια *Escherichia coli* ATCC 25922 για τον έλεγχο των βακτηριδίων Gram αρνητικό (κόκκινο χρώματος) και μια καλλιέργεια *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 για τον έλεγχο των βακτηριδίων Gram θετικό (μπλε χρώματος).

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Ο χρωματισμός Gram παρέχει μια προκαταρκτική αναγνώριση αλλά δεν αντικαθιστά τις κανονικές μελέτες των καλλιεργειών του δείγματος.
2. Αντιβιοτικές θεραπείες μπορεί να καταστήσουν τα βακτηρίδια Gram θετικό πιο ευαίσθητα στον αποχρωματισμό και να εμφανιστούν με ροζ-κόκκινο χρώμα αντί για μπλε.
3. Τα κύτταρα που έχουν παραληφθεί από πρόσφατες καλλιέργειες 18-24 ωρών έχουν μεγαλύτερη ομοιότητα για τα χρωστικά υλικά σε σχέση με κύτταρα που έχουν παραληφθεί από παλιές καλλιέργειες.
4. Ο χρωματισμός Gram μεταβάλλεται από τη φυσική καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος ή του πρωτοπλάσματος. Πράγματι το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηριδίων Gram θετικό παρεμβάλλει ένα φράγμα που εμποδίζει την απελευθέρωση του συμπλέγματος μωβ Cristal-ιώδιο από το κυτοπλάσμα και το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηριδίων Gram αρνητικό περιέχει λιπίδια, διαλυόμενα σε οργανικούς διαλύτες που επιτρέπουν τον αποχρωματισμό του κυτοπλάσματος. Ως εκ τούτου οι μικροοργανισμοί που έχουν καταστραφεί λόγω υπερβολικής θερμότητας δεν αντιδρούν στον χρωματισμό Gram όπως θα αναμενόταν.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Η συσκευασία του GRAM COLOR KIT περιέχει ουσίες που σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία ταξινομούνται ως επικίνδυνες. Για τη χρήση του συστήματος να συμβουλευθείτε την κάρτα ασφαλείας. Το GRAM COLOR KIT είναι ένα kit βακτηριδιακού χρωματισμού που πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*, προορίζεται για επαγγελματική χρήση και πρέπει να χρησιμοποιείται στο εργαστήριο από κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό και με εγκεκριμένες ασφαλείες και ασφαλείς μεθόδους σε σχέση με τις παθογόνες ουσίες.

ΦΥΛΑΞΗ

Φυλάξτε το GRAM COLOR KIT σε θερμοκρασία 10-25°C στην αρχική του συσκευασία. Δεν πρέπει να φυλάσσεται κοντά σε πηγές θερμότητας και πρέπει να αποφεύγονται οι διακυμάνσεις. Υπό αυτές τις συνθήκες το προϊόν GRAM COLOR KIT ισχύει μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Μην τα χρησιμοποιείτε πέραν αυτής της ημερομηνίας. Μην το χρησιμοποιείτε εάν παρουσιάζει σημεία αλλοίωσης (αλλαγή χρώματος των διαλυμάτων ή παρουσία χοντροειδών ιζημάτων).

ΑΠΟΡΡΙΨΗ ΤΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Μετά τη χρήση, τα χρωματισμένα τζαμάκια με το GRAM COLOR KIT και το υλικό που ήρθε σε επαφή με το δείγμα πρέπει να απολυμάνονται και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις συνήθεις τεχνικές που υιοθετούνται στο εργαστήριο για την απολύμανση και την απόρριψη πιθανώς μολυσμένων υλικών.











ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Kruczak-Filipov, P., and R.G. Shively. 1992. *Gram stain procedure*, p.1.5.1-1.5.18. In H.D. Isenberg (ed.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Murray, P.R. (ed.) 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Προϊόν	REF	Σ
GRAM COLOR KIT	80293	4 x 250 mL

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΜΒΟΛΩΝ

ΣΥΜΒΟΛΟ	ΣΗΜΑΣΙΑ	ΣΥΜΒΟΛΟ	ΣΗΜΑΣΙΑ
	Ιατρική διαγνωστική συσκευή <i>in vitro</i>		Μην το επαναχρησιμοποιείτε
	Κατασκευαστής		Περιεχόμενο επαρκές για "n" δοκίμια
	Αριθμός καταλόγου		Εύθραυστο, χειριστείτε προσεκτικά
	Ημερομηνία λήξης		Προσοχή, δείτε τις οδηγίες χρήσης
	Περιορισμοί θερμοκρασίας		Κωδικός παρτίδας



Liofilchem s.r.l.

Via Scozia-Zona industriale - 64026 Roseto degli Abruzzi Tel. +39.085.8930745 - Fax +39.085.8930330
Web site: <http://www.liofilchem.net> E-mail: liofilchem@liofilchem.net

F00411

Rev.1/ 20.10.2009