

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 flaconcini di plastica con gocciolatore.

Ciascuna confezione contiene:

- 2 flaconi contenenti 12 ml di Soluzione Cristal Violetto;
- 2 flaconi contenenti 12 ml di Soluzione Iodica Lugol-PVP;
- 2 flaconi contenenti 12 ml di Soluzione Decolorante;
- 2 flaconi contenenti 12 ml di Soluzione Safranina;
- 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.

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%
Soluzione Decolorante	3	Alcool 95°C	50%
		Acetone	50%
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

1. Ricoprire il vetrino con la Soluzione Cristal Violetto. Attendere 1 minuto, quindi lavare delicatamente con acqua.
2. Ricoprire il vetrino con la Soluzione Lugol-PVP. Attendere 1 minuto, quindi lavare delicatamente con acqua.
3. Decolorare con la Soluzione Decolorante finché il preparato libera colorante (circa 30-60 secondi), quindi lavare delicatamente con acqua.
4. Ricoprire il vetrino con la Soluzione Safranina. Attendere 30-60 secondi, quindi lavare delicatamente con acqua.
5. Asciugare.
6. 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.

CONTROLLO QUALITÀ

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

- La colorazione di Gram fornisce una preliminare identificazione ma non sostituisce i normali studi culturali del campione.
- Terapie antibiotiche possono rendere i batteri Gram-positivi più sensibili alla decolorazione ed apparire di colore rosa-rosso invece di blu.
- Le cellule prelevate da colture giovani di 18-24 ore hanno una maggiore affinità per i coloranti rispetto alle cellule prelevate da colture vecchie.
- 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.	Contenuto
GRAM COLOR KIT	87101	8 x 12 ml

TABELLA DEI SIMBOLI

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



LIOFILCHEM® S.r.l.

Via Scozia, Zona Ind.le - 64026, Roseto degli Abruzzi (TE) - ITALY

Tel +39 0858930745 Fax +39 0858930330 Website: www.liofilchem.net E-mail: liofilchem@liofilchem.net



Rev.2 / 24.02.2014

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 dropper bottles. Each pack contains:

- 2 bottles containing 12 ml of Crystal Violet Solution;
- 2 bottles containing 12 ml of Lugol-PVP Iodine Solution;
- 2 bottles containing 12 ml of Decolourant Solution;
- 2 bottles containing 12 ml of Safranin Solution;
- 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.

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%
Decolourizing Solution	3	Alcohol 95°C	50%
		Acetone	50%
Safranin Solution	4	Safranin	0.25%
		Ethyl alcohol	10%

COLLECTION OF SAMPLE

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 Decolourizing 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.

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

- Gram staining provides a preliminary identification but does not replace normal cultural studies of the sample.
- Antibiotic therapy may make Gram-positive bacteria more sensitive to decolouration, so that they appear pinkish-red instead of blue.
- Cells taken from young, 18-24 hour cultures have a greater affinity for the stains than cells taken from older cultures.
- 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

- Kruczk-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.	Contents
GRAM COLOR KIT	87101	8 x 12 ml

TABLE OF SYMBOLS

 IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device	 LOT	Batch code
 Manufacturer			Contains sufficient for <n> tests
 REF	Catalogue number		Fragile, handle with care
 Use by			Caution, consult accompanying documents
	Temperature limitation		



LIOFILCHEM® S.r.l.

Via Scozia, Zona Ind.le - 64026, Roseto degli Abruzzi (TE) - ITALY

Tel +39 0858930745 Fax +39 0858930330 Website: www.liofilchem.net E-mail: liofilchem@lioilchem.net



Rev.2 / 24.02.2014