

**IMPIEGO PREVISTO**

Da usare con il metodo di colorazione di Gram per la differenziazione dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi.

**INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST**

La colorazione di Gram fu originariamente ideata da Christian Gram nel 1884. Il metodo standard della colorazione di Gram è utilizzabile per differenziare in due gruppi batteri morfologicamente simili, intatti. Si basa sul colore che assume la parete cellulare dopo aver applicato il metodo della colorazione. Vengono evidenziati anche forma, dimensione e particolari strutturali della cellula. Queste informazioni preliminari possono fornire indizi sul tipo di organismo/i presente/i.

**PRINCIPIO**

Nel protoplasto di tutti gli organismi colorati con l'impiego della suddetta procedura si forma un complesso iodio-cristalvioletto. Dopo la decolorazione, gli organismi che sono in grado di trattenere il complesso colorante sono classificati come Gram-positivi. Quegli organismi che vengono decolorati e che assorbono la colorazione di contrasto sono classificati come Gram-negativi.

Dopo la distruzione o eliminazione della parete cellulare, è possibile decolorare il protoplasto sia delle cellule Gram-positive che di quelle Gram-negative e, quindi, perdere l'attributo Gram-negativo. Il meccanismo della colorazione di Gram sembra correlato alla presenza di una parete cellulare intatta, in grado di fungere da barriera alla decolorazione della colorazione primaria. In generale, la parete cellulare è permeabile in modo non selettivo. In teoria, accade che durante la procedura della colorazione di Gram la parete cellulare delle cellule gram-positive viene disidratata con alcol nel decolorante e perde permeabilità, trattenendo quindi la colorazione primaria. Nel caso della parete cellulare delle cellule gram-negative, per la presenza di un tenore lipidico più elevato, la parete cellulare trattata con alcol diventa più permeabile e, di conseguenza, perde la colorazione primaria rendendo possibile la successiva colorazione di contrasto.

**REAGENTI**
**Reagenti pronti all'uso.**

PL.7000	Cristalvioletto	500 ml
PL.7001	Cristalvioletto	1 litro
PL.7002	Cristalvioletto	2 litri
PL.7000/25	Cristalvioletto	250 ml
PL.7003	Iodio di Lugol	500 ml
PL.7004	Iodio di Lugol	1 litro
PL.7005	Iodio di Lugol	2 litri
PL.7003/25	Iodio di Lugol	250 ml
PL.7006	Differenziatore di Gram	500 ml
PL.7007	Differenziatore di Gram	1 litro
PL.7008	Differenziatore di Gram	2 litri
PL.7006/25	Differenziatore di Gram	250 ml
PL.7009	Rosso neutro	500 ml
PL.7010	Rosso neutro	1 litro
PL.7011	Rosso neutro	2 litri
PL.7009/25	Rosso neutro	250 ml
PL.7012	Safranina	500 ml
PL.7013	Safranina	1 litro

PL.7014	Safranina	2 litri
PL.7012/25	Safranina	250 ml
PL.7015	Carbolfucsina diluita	500 ml
PL.7016	Carbolfucsina diluita	1 litro
PL.7017	Carbolfucsina diluita	2 litri
PL.7015/25	Carbolfucsina diluita	250 ml
PL.7052	Iodio di Lugol	500 ml
PL.7053	Iodio di Lugol	1 litro
PL.7053-2	Iodio di Lugol	2 litri
PL.7056	Acetone di iodio	500 ml
PL.7057	Acetone di iodio	1 litro
PL.7058	Acetone di iodio	2 litri
PL.7101	Fucsina di base / Rosso neutro	500 ml
PL.7102	Fucsina di base / Rosso neutro	1 litro
PL.7103	Fucsina di base / Rosso neutro	2 litri
PL.7073	CV – Ossalato di ammonio	500 ml
PL.7074	CV – Ossalato di ammonio	1 litro
PL.7075	CV – Ossalato di ammonio	2 litri
PL.7110	Colorazione Sandiford	500 ml
PL.7111	Colorazione Sandiford	1 litro
PL.7112	Colorazione Sandiford	2 litri
PL.7113	Violetto di metile	500 ml
PL.7114	Violetto di metile	1 litro
PL.7115	Violetto di metile	2 litri
PL.7116	Safranina / Rosso neutro	500 ml
PL.7117	Safranina / Rosso neutro	1 litro
PL.7118	Safranina / Rosso neutro	2 litri
PL.7206	Differenziatore di Gram (Acetone)	500 ml
PL.7207	Differenziatore di Gram (Acetone)	1 litro
PL.7208	Differenziatore di Gram (Acetone)	2 litri
PL.7306	Differenziatore di Gram (IMS)	500 ml
PL.7307	Differenziatore di Gram (IMS)	1 litro
PL.7308	Differenziatore di Gram (IMS)	2 litri

**Colorazioni concentrate. Diluire a 1 litro con acqua distillata prima dell'uso.**

PL.8000	Cristalvioletto	100 ml
PL.8001	Iodio di Gram	100 ml
PL.8002	Rosso neutro	100 ml
PL.8003	Safranina	100 ml
PL.8004	Carbolfucsina diluita	100 ml
PL.8010	Iodio di Lugol	100 ml
PL.8011	Violetto di metile	100 ml

**Colorazioni concentrate. Diluire a 4 litri con acqua distillata prima dell'uso.**

PL.8000-4.0	Cristalvioletto	400 ml
PL.8001-4.0	Iodio di Gram	400 ml
PL.8002-4.0	Rosso neutro	400 ml
PL.8003-4.0	Safranina	400 ml
PL.8004-4.0	Carbolfucsina diluita	400 ml
PL.8010-4.0	Iodio di Lugol	400 ml
PL.8011-4.0	Violetto di metile	400 ml

**Colorazioni concentrate. Diluire a 5 litri con acqua distillata prima dell'uso.**

PL.8000-5.0	Cristalvioletto	500 ml
PL.8001-5.0	Iodio di Gram	500 ml
PL.8002-5.0	Rosso neutro	500 ml

PL.8003-5.0	Safranina	500 ml
PL.8004-5.0	Carbolfucsina diluita	500 ml
PL.8010-5.0	Iodio di Lugol	500 ml
PL.8011-5.0	Violetto di metile	500 ml

**Kit di colorazione (Pronti all'uso)**

PL.8055/25	Kit per colorazione di Gram - Cristalvioletto 250 ml, iodio di Gram 250 ml, differenziatore di Gram 250 ml, safranina 250 ml.
PL.8056/25	Kit per colorazione di Gram - Cristalvioletto 250ml, iodio di Gram 250 ml, differenziatore di Gram 250 ml, rosso neutro 250 ml.
PL.8057/25	Kit per colorazione di Gram - Cristalvioletto 250 ml, iodio di Gram 250 ml, differenziatore di Gram 250 ml, carbolfucsina diluita 250 ml.

**Olio da immersione (Basso rischio – senza DBP)**

PL.396	Olio da immersione	50 ml
--------	--------------------	-------

**MISURE DI SICUREZZA**

- Le colorazioni di Gram di PRO-LAB Diagnostics sono offerte solo come materiale *in vitro* e non sono previste in alcun modo per uno scopo curativo o profilattico.
- Durante e dopo l'utilizzo, manipolare tutti i materiali agendo in conformità delle Buone Pratiche di Laboratorio e ricordare sempre che il materiale da analizzare deve essere considerato come potenziale biorischio.
- Il dispositivo non costituisce un rischio ambientale superiore a quelli costituiti dai campioni clinici usati con il dispositivo. È opportuno seguire appropriate misure di sicurezza nel maneggiare, processare ed eliminare tutti i campioni clinici, perché potrebbero essere presenti organismi patogeni. L'impatto ambientale sussiste ed è adeguatamente affrontato con un opportuno smaltimento.

**STABILITÀ E CONSERVAZIONE**

Temperatura ambiente. Tenere lontano da fonti di combustione. Tenere al riparo dalle radiazioni solari dirette. Se conservati secondo le condizioni appena descritte i reagenti possono essere usati fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.

**RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE DELLE COLTURE**

Fare riferimento ad un testo di microbiologia standard.

**MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO**

Vetrini puliti, ansa sterile, fiamma / aria calda, rack per colorazione, acqua di rubinetto, olio da immersione, microscopio, carta per blotting o sostituto equivalente.

**PROCEDURA**

- Preparare uno striscio sottile ed uniforme di campione ed asciugarlo all'aria.
- Fissare a calore e lasciare raffreddare.



3. Sommergere il vetrino con cristalvioletto o violetto di metile, attendere 1 minuto. Sciacquare.
4. Versare sul vetrino iodio di Gram o di Lugol, attendere 1 minuto. Sciacquare con acqua.
5. Decolorare delicatamente con il differenziatore per circa 10 secondi o con acetone di iodio per 1 minuto. Sciacquare.
6. Versare sul vetrino una colorazione di contrasto, attendere 30 - 60 secondi.
7. Risciacquare bene con acqua, asciugare delicatamente con blotter.
8. Visualizzare con microscopio ad immersione in olio.

### CONTROLLO DI QUALITÀ

L'età delle colture ed il pH del terreno nel quale i batteri sono cresciuti può influenzare in modo evidente la reazione alla colorazione di Gram. Usare colture fresche di meno di 24 ore.

Colture consigliate per il CQ;

- *Escherichia coli* NCTC 10418 (Bacilli Gram-negativi da rosa a rosso)
- *Oxford Staphylococcus aureus* NCTC 6571 (Cocchi Gram-positivi da blu a porpora)
- Streptococchi emolitici Gruppo A NCTC 8198 (Cocchi Gram-positivi da blu a porpora)

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Organismi Gram-positivi - da blu a porpora.

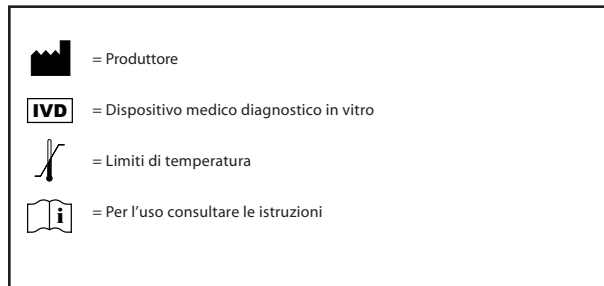
Organismi Gram-negativi - da rosa a rossi.

### AVVERTENZE

1. La presenza di detriti cellulari colorati con questa tecnica può determinare risultati Gram-negativi e Gram-positivi falsi. Es.: i nuclei e il protoplasma dei leucociti e delle cellule epiteliali sono colorati con colorazione di contrasto. Anche materiale particellare solido può essere colorato con cristalvioletto.
2. La colorazione di Gram fornisce solo informazioni identificative preliminari e non sostituisce la coltura del campione.

### BIBLIOGRAFIA

1. Manual of Clinical Microbiology. Lennette.
2. The Practice of Medical Microbiology. 12th Edition. V2. R. Cruickshank, J.P. Duguid, B.P. Marmion, R.H.A. Swain.



**Le presenti istruzioni per l'uso sono state accuratamente tradotte dalla versione originale in lingua inglese. In caso di ambiguità o apparente discrepanza rivolgersi al servizio assistenza Pro-Lab.**