

Color Gram 2 (COLOR GRAM 2 - F)

Colorazione dei microrganismi.

INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST

Questi coloranti permettono la colorazione di batteri e funghi per l'esame diretto, secondo il metodo di Gram.

PRINCIPIO

La parete dei germi è colorata di viola dall'ossalato di cristalvioletto (R1).

Lo iodio, stabilizzato dal P.V.P. (R2) fissa il cristalvioletto. Il complesso iodio-cristalvioletto così formato viene eliminato, durante la decolorazione, dall'alcool-acetone (R3) solamente nei germi Gram (-) in funzione della composizione chimica della parete.

La safranina (R4) agisce poi come colorante di contrasto : i germi Gram (-) appaiono rosa, i Gram (+) che non si sono decolorati rimangono viola (1).

PRESENTAZIONE

REF 55 542 Color Gram 2 (COLOR GRAM 2 - F), confezione contenente :
 R1 = 1 x 240 ml
 R2 = 1 x 240 ml
 R3 = 1 x 240 ml
 R4 = 1 x 240 ml
 + 1 scheda tecnica fornita nel kit o scaricabile da www.biomerieux.com/techlib

Color Gram 2, confezionamenti individuali :

REF 55 545 R1 = 1 x 2 litri (COLOR GRAM 2 R1-F)
REF 55 546 R2 = 1 x 2 litri (COLOR GRAM 2 R2-F)
REF 55 547 R3 = 1 x 2 litri (COLOR GRAM 2 R3-F)
REF 55 548 R4 = 1 x 2 litri (COLOR GRAM 2 R4-F)

COMPOSIZIONE

Formule teorica per 1 litro :

R1 Soluzione di ossalato di cristalvioletto	
Cristalvioletto (CAS n° 548-62-9 – Cl n° 42555) *	18 g
Alcool etilico denaturato	200 ml
Ossalato di ammonio	8 g
Acqua demineralizzata	800 ml
R2 Lugol-PVP stabilizzato ***	
Iodio (CAS n° 7553-56-2)	13 g
Ioduro di potassio	20 g
PVP (polivinil-pirrolidone)	100 g
Acqua demineralizzata	970 ml
R3 Decolorante	
Alcool etilico denaturato **	500 ml
Acetone **	500 ml
R4 Soluzione di safranina ****	
Safranina (CAS n° 477-73-6 – Cl n° 50240)	2,4 g
Alcool etilico denaturato	100 ml
Acqua demineralizzata	900 ml

* Attenzione : Il reattivo R1 è NOCIVO (Xn).

R 40 : Possibilità di effetti irreversibili.

R 52/53 : Nocivo per gli organismi acquatici, può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico.

S 26 : In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S 36/37/39 : Usare indumenti e guanti protettivi e proteggersi gli occhi/la faccia.

S 61 : Non disperdere nell'ambiente. Riferirsi alle istruzioni speciali/schede informative in materia di sicurezza.

** Attenzione : Il reattivo R3 è FACILMENTE INFIAMMABILE (F) ed IRRITANTE (Xi).

R 11 : Facilmente infiammabile.

R 36 : Irritante per gli occhi.

R 67 : L'inalazione dei vapori può provocare sonnolenza e vertigini.

S 9 : Conservare il recipiente in luogo ben ventilato.

S 16 : Conservare lontano da fiamme e scintille. Non fumare.

S 23 : Non respirare i vapori.

S 33 : Evitare l'accumulo di cariche elettrostatiche.

Per ulteriori informazioni, consultare la scheda di sicurezza disponibile su richiesta.

*** Questo reattivo contiene l'1% di iodio e di ioduro di potassio. Una scheda di sicurezza è disponibile su richiesta.

**** Questo reattivo contiene l'1% di etanolo. Una scheda di sicurezza è disponibile su richiesta.

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

- Vaschette per la colorazione.
- Vetrini porta-oggetto puliti e sgrassati.
- Blocco termico.
- Olio per immersione.
- Microscopio con obiettivo a immersione.
- Tappi dispensatori per flaconi da 2 L (Cod. 55 541).

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- **Unicamente per diagnostica *in vitro*.**
- **Esclusivamente per uso professionale.**
- I prelievi, le colture batteriche ed i prodotti seminati devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere manipolati in maniera appropriata. Le tecniche di asepsi e le precauzioni d'uso per il gruppo batterico studiato devono essere rispettate durante tutta la manipolazione; fare riferimento a "CLSI® M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline - Revisione in vigore*". Per informazioni complementari sulle precauzioni nella manipolazione, consultare "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Ultima edizione", oppure fare riferimento alla normativa vigente nel Paese.
- Non utilizzare i reattivi dopo la data di scadenza.
- Prima dell'uso, assicurarsi che il sigillo di sicurezza della capsula dei flaconi sia intatto.
- La comparsa di depositi sul fondo dei flaconi di cristal violetto (R1 – cod. 55 545) può verificarsi alla fine della validità, ma ciò non ha impatto sulle performance del prodotto.
- Le performance riportate di seguito sono state ottenute seguendo il procedimento indicato in questa scheda tecnica. Qualsiasi deviazione dal procedimento indicato può alterare i risultati.
- L'interpretazione dei risultati del test deve essere fatta tenendo conto del contesto clinico e, eventualmente, dei risultati di altri test.

CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE

- I flaconi si conservano a 15-25°C, nella loro confezione, fino alla data di scadenza.

CAMPIONI

Si possono utilizzare tutti i tipi di campione. Per il prelievo ed il trasporto dei vari tipi di campioni si devono rispettare le norme di buona pratica di laboratorio. Questi coloranti possono essere utilizzati anche per l'esame diretto di ceppi isolati con coltura.

PROCEDIMENTO**Preparazione e fissazione del campione (2) :**

1. Effettuare su un vetrino pulito uno striscio sottile del campione da esaminare.
2. Lasciare essiccare.
3. Fissare al calore (piastra termica o passaggio rapido del vetrino sulla fiamma) o con metanolo (ricoprire il vetrino con alcool e attendere 10-15 minuti fino alla completata evaporazione dell'alcool).

Colorazione (2) :

1. Ricoprire lo striscio con il cristalvioletto (R1).
2. Lasciare a contatto per 1 minuto.
3. Lavare delicatamente con acqua.
4. Ricoprire con il lugol (R2).
5. Lasciare a contatto per 1 minuto.
6. Lavare delicatamente con acqua.
7. Decolorare con l'alcool acetone (R3).
8. Lavare delicatamente con acqua.
9. Ricoprire con la safranina (R4).
10. Lasciare a contatto per 1 minuto.
11. Lavare delicatamente con acqua.
12. Lasciare asciugare.

Nota : Si raccomanda di rispettare la standardizzazione dei tempi delle differenti tappe del Procedimento.

LETTURA E INTERPRETAZIONE

- Osservare al microscopio (obiettivo ad immersione, ingrandimento 1000 X) :
 - i microrganismi Gram (+) appaiono di color viola.
 - i microrganismi Gram (-) appaiono di color rosa.
- È necessario proseguire con dei metodi complementari (coltura, identificazione ...) per stabilire una diagnosi.

CONTROLLO DI QUALITÀ**Protocollo :**

L'aspetto dei microrganismi all'esame diretto può essere verificato con i seguenti ceppi :

- *Escherichia coli* ATCC® 25922.
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

Risultati attesi :

Ceppo	Risultati
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Bacilli Gram (-) di colore rosa.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Cocchi Gram (+) di colore viola.

Nota :

E' responsabilità dell'utilizzatore tenere conto della natura dell'applicazione ed assicurarsi che il controllo di qualità corrisponda a quanto previsto dalla legislazione locale vigente (frequenza, numero di ceppi...).

LIMITI DEL METODO E INTERFERENZE

- La colorazione di Gram deve essere effettuata su colture giovani (24-48 ore), poiché le colture più vecchie si decolorano più facilmente (2).
- Le terapie antibiotiche possono rendere più sensibili alla decolorazione i batteri Gram (+).
- In caso di scarsa concentrazione di microrganismi nel prelievo, l'esame diretto può risultare negativo.

PERFORMANCE

Le performance sono state valutate su 22 ceppi batterici (batteri Gram (+) e Gram (-)) e su 3 lieviti (*Candida* e *Saccharomyces*)

Tutti i ceppi Gram (+), come anche i lieviti, si sono colorati di viola.

Tutti i batteri Gram (-) si sono colorati di rosa.

SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

Smaltire i reattivi non utilizzati seguendo le procedure relative ai rifiuti chimici pericolosi.








Smaltire i reattivi utilizzati ed i materiali monouso contaminati seguendo le procedure relative ai prodotti infettivi o potenzialmente infettivi.

E' responsabilità di ogni laboratorio gestire i rifiuti e gli effluenti prodotti a seconda della loro natura e della loro pericolosità ed assicurarne (o farne assicurare) il trattamento e lo smaltimento conformemente alla legislazione vigente.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI


1. MAGEE C.M., RODEHEAVER G., EDGERTON M.T. et al. – A more reliable gram staining technic for diagnosis of surgical infections – *Am. J. Surg.*, 1975, vol. 130, p. 341-346.
2. VASTEL C. – Coloration de gram – Description technique – *Le Technicien Biologiste*, 1978, vol. 5, p. 243-245.
3. BARTHOLOMEW J.W. – Variables influencing results and the precise definition of steps in Gram staining as a means of standardizing the results obtained – *Stain Technol.*, 1962, vol. 37, p. 139-155.
4. SPENGLER M., RODEHEAVER G., RICHTER L. et al. – The gram stain- The most important diagnostic test of infection – *J. Am. Colleger Emerg. Physicians*, 1978, vol. 7, n°12, p. 434-438.

TABELLA DEI SIMBOLI

Simbolo	Significato
	Numero di catalogo
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Limiti di temperatura
	Utilizzare entro
	Codice del lotto
	Consultare le istruzioni per l'uso

BIOMERIEUX e il logo blu sono marchi utilizzati, depositati e/o registrati di proprietà di bioMérieux o di una delle sue filiali.
CLSI è un marchio di proprietà di Clinical and Laboratory Standards Institute Inc.
ATCC è un marchio di proprietà di American Type Culture Collection.
Gli altri marchi e nomi di prodotti menzionati in questo documento sono marchi commerciali dei loro rispettivi detentori.




bioMérieux SA
Chemin de l'Orme
69280 Marcy-l'Etoile - France

RCS LYON 673 620 399
Tel. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com

