

BD Gram Stain Kits and Reagents

English: pages 1 – 5 Italiano: pagine 14 – 18
Français : pages 5 – 9 Español: páginas 19 – 23
Deutsch: Seiten 10 – 14



8820191JAA(05)
2016-01

Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Pokynu vám poskytné místní zástupce společnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Ota yhteyts lähimpään BD:n edustajaan ohjeiden saamiseksi. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / Нұсқаулар үшін жергілікті BD өкілімен хабарласыңыз. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Neem contact op met uw plaatselijke BD-vertegenwoordiger voor instructies. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielem BD. / Contacte o reprezentante local da BD para instruções. / Pentru instructiuni, contactați reprezentantul local BD. / Для получения указаний обратитесь к местному представителю компании BD. / Instrukcie ziskate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Kontakta närmaste BD-representant för anvisningar. / Talimatlar için yerel BD temsilcinizle temasa geçin. / За інструкціями зверніться до місцевого представника компанії BD.

Gram Stain Kit		1	Cat. No.
Gram Crystal Violet	For the differential staining of bacteria.	1 x 250 mL	212539
Gram Iodine (Stabilized)		1 x 250 mL	
Gram Decolorizer		1 x 250 mL	
Gram Safranin		1 x 250 mL	
Gram Stain Kit		1	212524
Gram Crystal Violet	For the differential staining of bacteria.	1 x 250 mL	
Gram Iodine (Unstabilized)		1 x 250 mL	
Gram Decolorizer		1 x 250 mL	
Gram Safranin		1 x 250 mL	
Gram Crystal Violet	For staining microorganisms by the differential Gram method.	4 x 250 mL 1 x 3.8 L	212525 212526
Gram Iodine (Stabilized)	For staining microorganisms by the differential Gram method.	4 x 250 mL 1 x 3.8 L	212542 212543
Gram Iodine (Unstabilized)	For staining microorganisms by the differential Gram method.	4 x 250 mL 1 x 3.8 L	212529 212530
Gram Decolorizer	For staining microorganisms by the differential Gram method.	4 x 250 mL 1 x 3.8 L	212527 212528
Gram Safranin	For staining microorganisms by the differential Gram method.	4 x 250 mL 1 x 3.8 L	212531 212532
Gram Basic Fuchsin	For staining microorganisms by the differential Gram method.	4 x 250 mL 1 x 3.8 L	212544 212545

INTENDED USE

Gram Stain Kits and Reagents are used to stain microorganisms from cultures or specimens by the differential Gram method.

SUMMARY AND EXPLANATION

The Gram stain was devised in 1884 by Christian Gram in an attempt to differentiate bacterial cells from infected tissue. Although Gram observed what is now called the "Gram reaction," he did not recognize the taxonomic value of his technique.

The Gram stain is now used to differentiate intact, morphologically similar bacteria into two groups based on cell color after staining. In addition, cell form, size and structural details are evident. Such preliminary information provides important clues to the type of organism(s) present and the further techniques required to characterize them.

Because inorganic iodine is rapidly oxidized and loses its effectiveness as a mordant,¹ the Gram Stain Kit (Cat. No. 212539) differs from Gram's original formulation by offering a more stable organic iodine complex, L-polyvinylpyrrolidone-iodine.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The Gram stain procedure² consists of:

Staining a fixed smear with crystal violet.

Applying iodine as a mordant.

Decolorizing the primary stain with alcohol/acetone; and, counterstaining with safranin or basic fuchsin.

A crystal violet-iodine complex forms in the protoplast (not the cell wall) of all organisms stained by this procedure.

Organisms able to retain this dye complex after decolorization are classified as gram-positive while those that can be decolorized and counterstained are classified as gram-negative.

Upon disruption or removal of the cell wall, the protoplast of gram-positive (as well as gram-negative) cells can be decolorized and the gram-positive attribute lost. Thus, the mechanism of the Gram stain appears to be related to the presence of an intact cell wall able to act as a barrier to decolorization of the primary stain.

Generally, the cell wall is nonselectively permeable. It is theorized that during the Gram stain procedure, the cell wall of gram-positive cells is dehydrated by the alcohol in the decolorizer and loses permeability, thus retaining the primary stain. However, the cell wall of the gram-negative cells has a higher lipid content and becomes more permeable when treated with alcohol, resulting in loss of the primary stain.

The molecular basis for the Gram stain has not yet been determined.

REAGENTS

Approximate Formula* Per Liter

Gram Crystal Violet

PRIMARY STAIN

Crystal Violet	3.0 g
Isopropanol.....	50.0 mL
Ethanol/Methanol	50.0 mL
Distilled Water	900.0 mL

Gram Iodine

MORDANT

(Working solution prepared from Gram Diluent and Gram Iodine 100X)

Iodine Crystals	3.3 g
Potassium Iodide	6.6 g
Distilled Water	1.0 L

Stabilized Gram Iodine

MORDANT

Polyvinylpyrrolidone-Iodine Complex.....	100.0 g
Potassium Iodide	19.0 g
Distilled Water	1.0 L

Gram Decolorizer

DECOLORIZER

Acetone	250.0 mL
Isopropanol.....	750.0 mL

Gram Safranin

COUNTERSTAIN

Safranin O Powder (pure dye)	4.0 g
Ethanol/Methanol	200.0 mL
Distilled Water	800.0 mL

Gram Basic Fuchsin

COUNTERSTAIN

Basic Fuchsin	0.08 g
Phenol	2.6 g
Isopropyl Alcohol	4.5 mL
Distilled Water	993.0 mL

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Warnings and Precautions: For *in vitro* Diagnostic Use.

Over time, a fine precipitate may develop in Gram Basic Fuchsin. Product performance will not be affected.

Gram Decolorizer

DANGER



H225 Highly flammable liquid and vapour. **H319** Causes serious eye irritation. **H336** May cause drowsiness or dizziness.

P210 Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces – No smoking. **P303/361/353** IF ON SKIN (of hair): Remove/take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower. **P403/235** Store in a well-ventilated place. Keep cool. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Gram Safranin

WARNING



H226 Flammable liquid and vapour.

P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. **P303/361/353** IF ON SKIN (or hair): Remove/Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower. **P403/235** Store in a well-ventilated place. Keep Cool. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Gram Crystal Violet

Gram Stain Set with Stabilized Iodine

WARNING



H332 Harmful if inhaled. **H412** Harmful to aquatic life with long lasting effects.

P273 Avoid release to the environment. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Gram Crystal Violet

Gram Stain Set

Methanol

WARNING



H332 Harmful if inhaled.

P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray. **P312** Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.

Gram Crystal Violet

Methanol

WARNING



H332 Harmful if inhaled. **H412** Harmful to aquatic life with long lasting effects.

P273 Avoid release to the environment. **P304/340** IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Gram Iodine (Stabilized)

WARNING



H315 Causes skin irritation. **H319** Causes serious eye irritation. **H401** Toxic to aquatic life.

P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. **P305/351/338** IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. **P302/352** IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Gram Iodine

WARNING



H315 Causes skin irritation. **H319** Causes serious eye irritation.

P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. **P305/351/338** IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. **P302/352** IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

Gram Iodine 100X

WARNING



H315 Causes skin irritation. **H319** Causes serious eye irritation.

P335 May cause respiratory irritation. **P261** Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray. **P312** Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell. **P405** Store locked up. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Gram Iodine
(Gram Stain Set)

WARNING



H313 May be harmful in contact with skin. **H333** May be harmful if inhaled. **H315** Causes skin irritation. **H319** Causes serious eye irritation. **H335** May cause respiratory irritation. **H400** Very toxic to aquatic life.

P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray. **P305/351/338** IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. **P405** Store locked up. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Storage: On receipt, store at 15 – 30 °C. The expiration date is for product in unopened bottles stored as directed. Do not open until ready to use.

Use the traditional Gram Iodine working solution within 3 months of preparation, not exceeding the Expiry of either component.

Product Deterioration: Unstabilized Gram Iodine when reconstituted may cause variability in the Gram stain when sufficient iodine is no longer available in solution. Protect the iodine solution from undue exposure to air, light and heat, to ensure that the solution is providing proper mordant activity.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Apply the test specimen to a clean glass slide in a manner that will yield a thin, uniform smear. Emulsify colonies from an 18 – 24 h culture in saline to obtain the proper density.

Allow the smear to air dry.

Fix the smear to the slide using one of the following techniques:

1. Heat fix by passing the slide through a low flame 2 – 3 times. Cool the slide to room temperature before staining.
NOTE: Do not overheat the slide; excessive heating will cause atypical staining.
2. Methanol fix the slide by flooding with absolute methanol for 1 – 2 min and rinse with tap water before staining.³
NOTE: For proper fixation, store absolute methanol in a brown screw-capped bottle and replenish the working supply every two weeks.

PROCEDURE

Reagent Preparation

Prepare the traditional Gram Iodine working solution by adding an entire 2.5 mL ampule of Gram Iodine 100X to 250 mL Gram Diluent or an entire 40 mL vial of Gram Iodine 100X to 3.8 L of Gram Diluent; mix thoroughly.

Materials Provided: Gram Crystal Violet, Gram Iodine or Stabilized Gram Iodine, Gram Decolorizer and Gram Safranin or Gram Basic Fuchsin.

Materials Required But Not Provided: Microscope slides, bunsen burner or methanol, bacteriological loop, swabs, blotting paper, microscope with oil immersion lens and Gram slide.

Test Procedure:

1. Flood the fixed smear with primary stain (Gram Crystal Violet) and stain for 1 min.
2. Remove the primary stain by gently washing with cold tap water.
3. Flood the slide with mordant (Gram Iodine or Stabilized Gram Iodine) and retain on the slide for 1 min.
4. Remove the mordant by gently washing with tap water.
5. Decolorize (Gram Decolorizer) until solvent running from the slide is colorless (3 – 60 sec).
6. Wash the slide gently in cold tap water.
7. Flood the slide with counterstain (either Gram Safranin or Gram Basic Fuchsin) and stain for 30 – 60 sec.
8. Wash the slide with cold tap water.
9. Blot with blotting paper or paper towel or allow to air dry.
10. Examine the smear under an oil immersion lens.

User Quality Control

Quality control requirements must be performed in accordance with applicable local, state and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to pertinent CLSI (formerly NCCLS) guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

Run controls using **BBL™** Gram Slide (Cat. No. 231401) or 18 – 24 h cultures of known gram-positive and gram-negative microorganisms. The following test strains are recommended:

Organism	ATCC™	Expected Results
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	gram-positive cocci
<i>Escherichia coli</i>	25922	gram-negative rods

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The Gram stain provides preliminary identification information only and is not a substitute for cultural studies of the specimen. Gram stain results must be confirmed with additional procedures such as direct antigen tests and culture on media.

Prior treatment with antibacterial drugs may cause gram-positive organisms from a specimen to appear gram-negative.

Use of an 18 – 24 h culture is advisable for best results since fresh cells have a greater affinity than old cells for most dyes. This is particularly true of many spore formers, which are strongly gram-positive when examined in fresh cultures but which later become gram-variable or gram-negative.

The Gram stain reaction is altered by physical disruption of the bacterial cell wall or protoplast. The cell walls of gram-positive bacteria interpose a barrier which prevents leaching of the dye complex from the cytoplasm. Cell walls of gram-negative bacteria contain lipids soluble in organic solvents, which are then free to decolorize the cytoplasm. Therefore, a microorganism that is physically disrupted by excess heating will not react to Gram staining as expected.

“Careful adherence to procedure and interpretive criteria is required for accurate results. Accuracy is highly dependent on the training and skill of the microbiologist.”²

Gram stain results, including organism morphology, can be affected by the age of the isolate, bacteria containing autolytic enzyme systems, cultures transferred from antibiotic-containing media, as well as specimens collected from patients on antibiotics.⁴ “Background material and artifacts can also interfere with interpretation. Precipitated gram-positive stain generally appears as irregular coccoid shapes or as asters resembling fungal hyphae.”⁴

EXPECTED RESULTS AND PERFORMANCE CHARACTERISTICS¹⁻⁴

Reaction	Using Gram Safranin	Using Gram Basic Fuchsin
Gram-positive	Purple-black cells	Bright purple to purple-black cells
Gram-negative	Pink to red cells	Bright pink to fuchsia cells

REFERENCES

1. Magee, C.M., G. Rodenheaver, M.T. Edgerton, and R.F. Edlich. 1975. A more reliable Gram staining technique for diagnosis of surgical infections. *Am. J. Surg.* 130:341-346.
2. Kruczak-Filipov, P., and R.G. Shively. 1994. Gram stain procedures, 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.
3. Mangels, J.I., M.E. Cox, and L.H. Lindley. 1984. Methanol fixation. An alternative to heat-fixation of smear. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2:129-137.
4. Chapin, K. 1995. Clinical microscopy, p. 33-51, In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Technical Information: In the United States, contact BD Technical Service and Support at 800-638-8663 or www.bd.com/ds.

BD Trousses et réactifs Gram Stain

Français

Trousse Gram Stain		1	N° de réf.
Gram Crystal Violet	Pour la coloration différentielle des bactéries.	1 x 250 mL	212539
Gram Iodine (stabilisé)		1 x 250 mL	
Gram Decolorizer		1 x 250 mL	
Gram Safranin		1 x 250 mL	
Trousse Gram Stain		1	
Gram Crystal Violet	1 x 250 mL		
Gram Iodine (non stabilisé)	1 x 250 mL		
Gram Decolorizer	1 x 250 mL		
Gram Safranin	1 x 250 mL		
Gram Crystal Violet	Pour la coloration des microorganismes par la méthode différentielle de Gram.	4 x 250 mL	212525
		1 x 3,8 L	212526
Gram Iodine (stabilisé)	Pour la coloration des microorganismes par la méthode différentielle de Gram.	4 x 250 mL	212542
		1 x 3,8 L	212543
Gram Iodine (non stabilisé)	Pour la coloration des microorganismes par la méthode différentielle de Gram.	4 x 250 mL	212529
		1 x 3,8 L	212530
Gram Decolorizer	Pour la coloration des microorganismes par la méthode différentielle de Gram.	4 x 250 mL	212527
		1 x 3,8 L	212528
Gram Safranin	Pour la coloration des microorganismes par la méthode différentielle de Gram.	4 x 250 mL	212531
		1 x 3,8 L	212532
Gram Basic Fuchsin	Pour la coloration des microorganismes par la méthode différentielle de Gram.	4 x 250 mL	212544
		1 x 3,8 L	212545

APPLICATION

Les trousse et réactifs Gram Stain sont utilisés pour colorer les microorganismes des cultures ou des échantillons par la méthode de Gram différentielle.

RESUME ET EXPLICATION

La coloration de Gram a été mise au point en 1884 par Christian Gram alors qu'il tentait de différencier les cellules bactériennes de tissus infectés. Bien qu'ayant observé ce qu'on appelle aujourd'hui la « réaction de Gram », Gram n'a pas reconnu la valeur taxonomique de sa technique.

La coloration de Gram est utilisée aujourd'hui pour différencier les bactéries intactes et morphologiquement similaires en deux groupes sur la base de la couleur des cellules après coloration. De plus, la forme, la taille et les détails structurels des cellules sont mis en évidence. Ces informations préliminaires fournissent des indices importants sur le type des organismes présents et sur les techniques plus approfondies requises pour les caractériser.

Comme la solution iodée inorganique s'oxyde rapidement et perd de son efficacité de mordant, la trousse Gram Stain (n° de réf. 212539) diffère de la formule originale de Gram en proposant un complexe iodé organique plus stable : L-polyvinylpyrrolidone-iodé.

PRINCIPES DE LA METHODE

La méthode de coloration de Gram² comprend les étapes suivantes :

Coloration d'un frottis fixé au cristal violet.

Application d'une solution iodée servant de mordant.

Décoloration du colorant primaire à l'alcool/acétone ; et contre-colorant à la safranine ou à la fuchsine basique.

Un complexe cristal violet-iodé se forme dans le protoplaste (et non dans la paroi cellulaire) de tous les organismes marqués par cette méthode. Les organismes capables de conserver ce complexe de marquage après la décoloration sont classés Gram positifs tandis que ceux capables d'être décolorés et contre-colorés sont classés Gram négatifs.

Lors de la rupture ou du retrait de la paroi cellulaire, le protoplaste de cellules Gram positives (et Gram négatives) peut être décoloré et l'attribut Gram positif perdu. Ainsi, le mécanisme de la coloration de Gram apparaît lié à la présence d'une paroi cellulaire intacte afin de servir de barrière à la décoloration du colorant primaire.

En règle générale, la paroi cellulaire est non sélectivement perméable. Il est admis en théorie que pendant la méthode de coloration de Gram, la paroi cellulaire de cellules Gram positives est déshydratée par l'alcool présent dans le décolorant et perd de sa perméabilité, permettant ainsi de conserver le colorant primaire. Toutefois, la paroi cellulaire des cellules Gram négatives présente un contenu de lipides plus élevé et devient plus perméable une fois traitée à l'alcool, entraînant une perte du colorant primaire.

La base moléculaire pour la coloration de Gram n'a pas été encore déterminée.

REACTIFS

Formule approximative* par litre

Gram Crystal Violet

COLORANT PRIMAIRE

Cristal violet.....	3,0 g
Isopropanol.....	50,0 mL
Ethanol/Méthanol	50,0 mL
Eau distillée.....	900,0 mL

Gram Iodine

MORDANT

(Solution d'analyse préparée à partir de Gram Diluent et de Gram Iodine 100X)

Cristaux d'iode.....	3,3 g
Iodure de potassium.....	6,6 g
Eau distillée.....	1,0 L

Stabilized Gram Iodine

MORDANT

Complexe polyvinylpyrrolidone-iodé.....	100,0 g
Iodure de potassium.....	19,0 g
Eau distillée.....	1,0 L

Gram Decolorizer

DECOLORANT

Acétone.....	250,0 mL
Isopropanol.....	750,0 mL

Gram Safranin

CONTRE-COLORANT

Poudre de safranine O (colorant pur).....	4,0 g
Ethanol/Méthanol	200,0 mL
Eau distillée.....	800,0 mL

Gram Basic Fuchsin

CONTRE-COLORANT

Fuchsine basique.....	0,08 g
Phénol.....	2,6 g
Alcool isopropylique	4,5 mL
Eau distillée.....	993,0 mL

*Ajustée et/ou complétée en fonction des critères de performance imposés.

Avertissements et précautions : Réservé au diagnostic *in vitro*.

Une mince couche de précipité est susceptible de se développer au fil du temps dans Gram Basic Fuchsin. Les performances du produit n'en seront pas affectées.

Gram Decolorizer

DANGER



H225 Liquide et vapeurs très inflammables. **H319** Provoque une sévère irritation des yeux. **H336** Peut provoquer somnolence ou vertiges.

P210 Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes – Ne pas fumer. **P303/361/353** EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher. **P403/235** Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais. **P501** Éliminer le contenu/réceptif conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

Gram Safranin

ATTENTION



H226 Liquide et vapeurs inflammables.

P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P303/361/353 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher. **P403/235** Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais. **P501** Éliminer le contenu/réceptier conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

Gram Crystal Violet

Gram Stain Set with Stabilized Iodine

ATTENTION



H332 Nocif par inhalation. **H412** Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P273 Éviter le rejet dans l'environnement. **P501** Éliminer le contenu/réceptier conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

Gram Crystal Violet

Gram Stain Set

Méthanol

ATTENTION



H332 Nocif par inhalation.

P261 Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. **P312** Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

Gram Crystal Violet

Méthanol

ATTENTION



H332 Nocif par inhalation. **H412** Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P273 Éviter le rejet dans l'environnement. **P304/340** EN CAS D'INHALATION : transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer. **P501** Éliminer le contenu/réceptier conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

Gram Iodine (Stabilized)

ATTENTION



H315 Provoque une irritation cutanée. **H319** Provoque une sévère irritation des yeux. **H401** Toxique pour les organismes aquatiques.

P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P305/351/338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P302/352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau et au savon. **P501** Éliminer le contenu/réceptier conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

Gram Iodine

ATTENTION



H315 Provoque une irritation cutanée. **H319** Provoque une sévère irritation des yeux.

P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P305/351/338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes.

Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P302/352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau et au savon.

Gram Iodine 100X

ATTENTION



H315 Provoque une irritation cutanée. **H319** Provoque une sévère irritation des yeux.

H335 Peut irriter les voies respiratoires. **P261** Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.

P312 Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. **P405** Garder sous clef. **P501** Éliminer le contenu/réceptif conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

Gram Iodine

(Gram Stain Set)

ATTENTION



H313 Peut être nocif par contact cutané. **H333** Peut être nocif par inhalation. **H315** Provoque une irritation cutanée. **H319** Provoque une sévère irritation des yeux. **H335** Peut irriter les voies respiratoires. **H400** Très toxique pour les organismes aquatiques.

P261 Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. **P305/351/338** EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. **P405** Garder sous clef. **P501** Éliminer le contenu/réceptif conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

Conservation : Stocker entre 15 et 30 °C dès la réception. La date d'expiration s'applique aux produits dans les bouteilles non ouvertes conservées selon les directives. Ne pas ouvrir prématurément.

Utiliser la solution d'analyse iodée de Gram traditionnelle dans les 3 mois suivant la préparation, sans dépasser la date d'expiration de l'un des composants.

Détérioration du produit : Lorsque la solution iodée de Gram non stabilisée est reconstituée, elle est susceptible de provoquer une variabilité dans la coloration de Gram lorsque l'iode n'est plus disponible en suffisance dans la solution. Protéger la solution iodée de l'exposition inutile à l'air, la lumière et la chaleur pour s'assurer que la solution produit l'activité de mordant appropriée.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Appliquer l'échantillon de test à une lame de verre propre afin d'aboutir à un frottis uniforme finement étalé. Emulsifier les colonies obtenues d'une culture de 18 à 24 h dans une solution saline pour obtenir la densité appropriée. Laisser le frottis sécher à l'air.

Fixer le frottis sur la lame en utilisant l'une des techniques suivantes :

1. Fixer à la chaleur en passant la lame 2 à 3 fois à flamme faible. Laisser refroidir la lame à température ambiante avant la coloration.
REMARQUE : Ne pas surchauffer la lame ; un chauffage excessif entraîne une coloration atypique.
2. Fixer la lame au méthanol en recouvrant au méthanol absolu pendant 1 à 2 min et rincer à l'eau courante avant la coloration.³
REMARQUE : Pour une fixation adéquate, conserver le méthanol absolu dans une bouteille brune à capuchon à vis et renouveler la solution d'analyse toutes les deux semaines.

METHODE

Préparation des réactifs

Préparer la solution d'analyse iodée de Gram traditionnelle en ajoutant une ampoule complète de 2,5 mL de Gram Iodine 100X à 250 mL de Gram Diluent, ou un flacon entier de 40 mL de Gram Iodine 100X à 3,8 L de Gram Diluent ; bien mélanger.

Matériaux fournis : Gram Crystal Violet, Gram Iodine ou Stabilized Gram Iodine, Gram Decolorizer et Gram Safranin ou Gram Basic Fuchsin.

Matériaux requis mais non fournis : Lames de microscope, bec bunsen ou méthanol, ensementeur bactériologique à anse, écouvillons, papier absorbant, microscope avec objectif à immersion dans l'huile et lame de Gram.

Mode opératoire du test :

1. Recouvrir le frottis fixé de colorant primaire (Gram Crystal Violet) et marquer pendant 1 min.
2. Retirer le colorant primaire en lavant délicatement à l'eau courante froide.
3. Recouvrir la lame de mordant (Gram Iodine ou Stabilized Gram Iodine) et maintenir sur la lame pendant 1 min.
4. Retirer le colorant primaire en lavant délicatement à l'eau courante.
5. Décolorer (Gram Decolorizer) jusqu'à ce que le solvant coulant de la lame soit incolore (3 à 60 s).
6. Laver la lame délicatement à l'eau courante froide.
7. Recouvrir la lame de contre-colorant (Gram Safranin ou Gram Basic Fuchsin) et marquer pendant 30 à 60 s.
8. Laver la lame à l'eau courante froide.
9. Absorber avec des serviettes de papier absorbant ou laisser sécher à l'air libre.
10. Examiner le frottis sous l'objectif à immersion dans l'huile.

Contrôle de qualité par l'utilisateur

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations locales, nationales et/ou internationales en vigueur, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives CLSI (anciennement NCCLS) et la réglementation CLIA correspondantes pour plus d'informations sur les modalités du contrôle de qualité.

Exécuter des contrôles en utilisant **BBL Gram Slide** (N° de réf. 231401) ou des cultures de 18 à 24 h de microorganismes Gram positifs et Gram négatifs connus. Les colorations de test suivantes sont recommandées :

Microorganisme	ATCC	Résultats attendus
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	cocci gram positifs
<i>Escherichia coli</i>	25922	bacilles Gram négatifs

LIMITATIONS DE LA METHODE

La coloration de Gram ne fournit que des informations d'identification préliminaires et ne remplace pas les études culturelles sur l'échantillon. Les résultats de coloration de Gram doivent être confirmés avec des méthodes supplémentaires, telles que des tests d'antigènes directs et la culture sur milieux.

Un traitement préalable avec des agents antimycobactériens peut faire apparaître des organismes Gram positifs comme étant Gram négatifs.

L'utilisation d'une culture de 18 à 24 h est conseillée pour obtenir de meilleurs résultats, car les cellules fraîches ont une plus grande affinité avec la plupart des colorants que les cellules anciennes. Ceci est particulièrement vrai pour de nombreux générateurs de spores, qui sont fortement Gram positifs lorsqu'ils sont observés dans les cultures fraîches, mais qui évoluent ensuite vers un état Gram variable ou Gram négatif.

La réaction de coloration de Gram est affectée par la rupture physique du protoplaste ou de la paroi cellulaire de la paroi bactérienne. Les parois cellulaires de bactéries Gram positives s'interposent en barrière pour empêcher le complexe colorant d'être lessivé du cytoplasme. Les parois cellulaires des bactéries Gram négatives contiennent des solubles lipides dans des solvants organiques, qui sont ensuite libres de décolorer le cytoplasme. Un microorganisme qui est physiquement rompu par une chaleur excessive ne réagit donc pas à la coloration de Gram comme prévu.

« Un respect méticuleux de la méthode et des critères d'interprétation est nécessaire pour obtenir des résultats précis. La précision est fortement tributaire du niveau de formation et de compétence du microbiologiste. »²

Les résultats de coloration de Gram, y compris la morphologie des organismes, peuvent être affectés par l'âge de l'isolat, par la bactérie contenant les enzymes endocellulaires qui produisent l'autolyse, par les cultures transférées du milieu contenant l'antibiotique, et par les échantillons prélevés auprès des patients sur les antibiotiques.⁴ « Les artefacts et les matières en arrière-plan peuvent également gêner l'interprétation. Une coloration de Gram positive avec précipité présente généralement des formes coccoïformes irrégulières ou des asters ressemblant à des hyphes fongiques. »⁴

RESULTATS ATTENDUS ET CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES¹⁻⁴

Réaction	Avec Safranine de Gram	Avec Fuch sine basique de Gram
Gram positif	Cellules violet noir	Cellules violet brillant à violet noir
Gram négatif	Cellules rose à rouge	Cellules rose brillant à fuchsia

REFERENCES : Voir la rubrique « References » du texte anglais.

Service et assistance technique de BD Diagnostics : contacter votre représentant local de BD.

Gram Stain Kit		1	Best.-Nr.
Gram Crystal Violet	Zur Differentialfärbung von Bakterien.	1 x 250 mL	212539
Gram Iodine (stabilisiert)		1 x 250 mL	
Gram Decolorizer		1 x 250 mL	
Gram Safranin		1 x 250 mL	
Gram Stain Kit		1	212524
Gram Crystal Violet	Zur Differentialfärbung von Bakterien.	1 x 250 mL	
Gram Iodine (nicht stabilisiert)		1 x 250 mL	
Gram Decolorizer		1 x 250 mL	
Gram Safranin		1 x 250 mL	
Gram Crystal Violet	Zur Färbung von Mikroorganismen nach der differentiellen Gram-Methode.	4 x 250 mL	212525
		1 x 3,8 L	212526
Gram Iodine (stabilisiert)	Zur Färbung von Mikroorganismen nach der differentiellen Gram-Methode.	4 x 250 mL	212542
		1 x 3,8 L	212543
Gram Iodine (nicht stabilisiert)	Zur Färbung von Mikroorganismen nach der differentiellen Gram-Methode.	4 x 250 mL	212529
		1 x 3,8 L	212530
Gram Decolorizer	Zur Färbung von Mikroorganismen nach der differentiellen Gram-Methode.	4 x 250 mL	212527
		1 x 3,8 L	212528
Gram Safranin	Zur Färbung von Mikroorganismen nach der differentiellen Gram-Methode.	4 x 250 mL	212531
		1 x 3,8 L	212532
Gram Basic Fuchsin	Zur Färbung von Mikroorganismen nach der differentiellen Gram-Methode.	4 x 250 mL	212544
		1 x 3,8 L	212545

VERWENDUNGSZWECK

Gram Stain Kits und -Reagenzien werden zur Färbung von Mikroorganismen aus Kulturen oder Proben nach der differentiellen Gram-Methode verwendet.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die Gramfärbung wurde 1884 von Christian Gram entwickelt, um Bakterienzellen von infiziertem Gewebe zu unterscheiden. Gram beobachtete zwar die heute nach ihm benannte Gram-Reaktion, erkannte jedoch nicht die taxonomische Bedeutung seiner Technik.

Heute nutzt man die Gramfärbung zur Differenzierung intakter, morphologisch ähnlicher Bakterien in zwei Gruppen, basierend auf der Farbe der Zellen nach Färbung. Weiterhin macht die Färbung Zellform und Zellgröße sowie strukturelle Details sichtbar. Diese Vorabinformationen sind wertvolle Hinweise auf den Typ der vorhandenen Mikroorganismen und auf die für ihre Charakterisierung erforderlichen weiteren Untersuchungen.

Da anorganisches Jod schnell oxidiert wird und seine Wirksamkeit als Beizmittel verliert,¹ unterscheidet sich das Gram Stain Kit (Best.-Nr. 212539) von Grams Originalansatz durch Verwendung des stabileren, organischen Jodkomplexes L-Polyvinylpyrrolidon-Jod.

VERFAHRENSPRINZIPIEN

Das Verfahren der Gramfärbung besteht aus den folgenden Schritten:²

Färbung eines fixierten Abstrichs mit Kristallviolett.

Aufbringen von Jod als Beizmittel.

Entfärbung der Primärfärbung mit Alkohol/Azeton.

Gegenfärbung mit Safranin oder basischem Fuchsin.

Im Protoplasten (nicht in der Zellwand) aller Mikroorganismen, die nach diesem Verfahren gefärbt werden, bildet sich ein kristalliner Kristallviolett-Jod-Komplex. Mikroorganismen, bei denen dieser Farbkomplex nach dem Entfärben erhalten bleibt, werden als grampositiv eingestuft, während solche, die entfärbt und gegengefärbt werden können, als gramnegativ eingestuft werden.

Wird die Zellwand beschädigt oder entfernt, kann der Protoplast der grampositiven (wie auch der gramnegativen) Zellen entfärbt werden; die Eigenschaft „Grampositivität“ geht verloren. Der Mechanismus der Gramfärbung scheint also mit dem Vorhandensein einer intakten Zellwand zusammenzuhängen, die als Barriere für die Entfärbung der primären Färbung wirkt.

Im allgemeinen ist die Zellwand nicht-selektiv permeabel. Man hat die Theorie aufgestellt, daß bei der Gramfärbung die Zellwand der grampositiven Zellen durch den Alkohol im Gegenfärbereagenz dehydriert wird und ihre Permeabilität verliert, wodurch die Primärfärbung erhalten bleibt. Die Zellwand der gramnegativen Zellen weist dagegen einen höheren Lipidgehalt auf und wird bei Behandlung mit Alkohol stärker permeabel, wodurch die Primärfärbung verloren geht.

Was bei der Gramfärbung auf molekularer Basis abläuft, ist bis heute ungeklärt.

REAGENZIEN

Ungefähre Zusammensetzung* je 1 L

Gram Crystal Violet

PRIMÄRFÄRBEREAGENZ

Kristallviolett	3,0 g
Isopropanol	50,0 mL
Ethanol/Methanol	50,0 mL
Destilliertes Wasser	900,0 mL

Gram Iodine

BEIZE

(Arbeitslösung aus Gram Diluent und

Gram Iodine 100X)

Jodkristalle	3,3 g
Kaliumjodid	6,6 g
Destilliertes Wasser	1,0 L

Stabilized Gram Iodine

BEIZE

Polyvinylpyrrolidon-Jodkomplex	100,0 g
Kaliumjodid	19,0 g
Destilliertes Wasser	1,0 L

Gram Decolorizer

ENTFÄRBER

Aceton	250,0 mL
Isopropanol	750,0 mL

Gram Safranin

GEGENFÄRBEREAGENZ

Safranin-O-Pulver (reiner Farbstoff)	4,0 g
Ethanol/Methanol	200,0 mL
Destilliertes Wasser	800,0 mL

Gram Basic Fuchsin

GEGENFÄRBEREAGENZ

Basisches Fuchsin	0,08 g
Phenol	2,6 g
Isopropanol	4,5 mL
Destilliertes Wasser	993,0 mL

*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen: *In-vitro*-Diagnostikum.

Im Lauf der Zeit kann sich in Gram Basic Fuchsin ein leichter Niederschlag entwickeln, der jedoch auf die Produktqualität keine Auswirkungen hat.

Gram Decolorizer

GEFAHR



H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. **H319** Verursacht schwere Augenreizung. **H336** Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

P210 Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. **P303/361/353** BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.

P403/235 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

Gram Safranin

WARNUNG



H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.

P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. **P303/361/353** BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.

P403/235 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

Gram Crystal Violet

Gram Stain Set with Stabilized Iodine

WARNUNG



H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen. **H412** Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

Gram Crystal Violet

Gram Stain Set

Methanol

WARNUNG



H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.

P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. **P312** Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

Gram Crystal Violet

Methanol

WARNUNG



H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen. **H412** Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. **P304/340** BEI EINATMEN: Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

Gram Iodine (Stabilisiert)

WARNUNG



H315 Verursacht Hautreizungen. **H319** Verursacht schwere Augenreizung. **H401** Giftig für Wasserorganismen.

P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. **P305/351/338** BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. **P302/352** BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

Gram Iodine

WARNUNG



H315 Verursacht Hautreizungen. **H319** Verursacht schwere Augenreizung.

P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. **P305/351/338** BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. **P302/352** BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.

Gram Iodine 100X

WARNUNG



H315 Verursacht Hautreizungen. **H319** Verursacht schwere Augenreizung.

H335 Kann die Atemwege reizen. **P261** Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. **P312** Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. **P405** Unter Verschluss aufbewahren. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

Gram Iodine (Gram Stain Set)

WARNUNG



H313 Kann bei Hautkontakt gesundheitsschädlich sein. **H333** Kann bei Einatmen gesundheitsschädlich sein. **H315** Verursacht Hautreizungen. **H319** Verursacht schwere Augenreizung. **H335** Kann die Atemwege reizen. **H400** Sehr giftig für Wasserorganismen.

P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. **P305/351/338** BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. **P405** Unter Verschluss aufbewahren. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

Aufbewahrung: Nach Erhalt bei 15 – 30 °C lagern. Das Haltbarkeitsdatum gilt für ungeöffnete und sachgemäß gelagerte Fläschchen. Verpackung erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen.

Herkömmliche Gram-Jod-Arbeitslösung innerhalb von 3 Monaten nach dem Zubereiten verbrauchen. Das Haltbarkeitsdatum der einzelnen Komponenten darf nicht überschritten werden.

Haltbarkeit des Produkts: Die rekonstituierte nicht stabilisierte Gram-Jodlösung zu unzuverlässigen Ergebnissen bei der Gramfärbung führt, wenn nicht mehr genug Jod in der Lösung vorhanden ist. Jodlösung vor übermäßiger Einwirkung von Luft, Licht und Wärme schützen, daß die Beizwirkung der Lösung vollständig erhalten ist.

PROBENGEWINNUNG UND PRÄPARATION

Probe auf einem sauberen Objektträger ausstreichen, so daß eine dünne, einheitliche Schicht entsteht. Kolonien mit einer 18- bis 24-Stunden Kultur in Kochsalzlösung emulgieren, um die erforderliche Dichte zu erhalten.

Abstrich an der Luft trocknen lassen.

Abstrich mit einer der folgenden Techniken auf dem Objektträger fixieren:

1. Durch zwei- bis dreimaliges Durchziehen des Objektträgers durch eine niedrige Flamme hitzefixieren. Vor dem Färben Objektträger auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

HINWEIS: Objektträger nicht überhitzen – zu viel Hitze bewirkt eine atypische Färbung.

2. Objektträger durch Tränken mit absolutem Methanol fixieren. Methanol 1 – 2 Minuten einwirken lassen und dann vor dem Färben mit Leitungswasser abspülen.³

HINWEIS: Um eine ordnungsgemäße Fixierung sicherzustellen, absolutes Methanol in einer braunen Flasche mit Schraubverschluß aufbewahren und alle zwei Wochen durch frisches Methanol ersetzen.

VERFAHREN

Vorbereitung der Reagenzien:

Die herkömmliche Gram-Jod-Arbeitslösung wird hergestellt, indem man den Inhalt einer ganzen 2,5-mL-Ampulle Gram Iodine 100X in 250 mL Gram Diluent oder den Inhalt eines ganzen 40-mL-Fläschchens Gram Iodine 100X in 3,8 L Gram Diluent auflöst. Gut durchmischen.

Mittelgeliefertes Arbeitsmaterial: Gram Crystal Violet, Gram Iodine oder Stabilized Gram Iodine, Gram Decolorizer und Gram Safranin oder Gram Basic Fuchsin.

Benötigtes, jedoch nicht mittelgeliefertes Arbeitsmaterial: Mikroskop-Objektträger, Bunsen- oder Methanolbrenner, bakteriologische Öse, Wattestäbchen, Saugpapier, Mikroskop mit Immersionsöl-Objektiv und Gram-Objektträger.

Testverfahren:

1. Fixierten Abstrich mit Primärfärbung (Gram Crystal Violet) tränken. 1 Minute einwirken lassen.
2. Primärfärbereagenz durch vorsichtiges Abspülen mit kaltem Leitungswasser entfernen.
3. Objektträger mit Beize (Gram Iodine oder Stabilized Gram Iodine) tränken. 1 Minute einwirken lassen.
4. Beize durch vorsichtiges Abspülen mit kaltem Leitungswasser entfernen.
5. Entfärben (Gram Decolorizer), bis das vom Objektträger ablaufende Lösungsmittel farblos ist (3 – 60 Sekunden).
6. Objektträger vorsichtig mit kaltem Leitungswasser abspülen.
7. Objektträger mit Gegenfärbereagenz (Gram Safranin oder Gram Basic Fuchsin) tränken. 30 – 60 Sekunden einwirken lassen.
8. Objektträger mit kaltem Leitungswasser abspülen.
9. Mit Saugpapier oder einem Papiertuch abtupfen oder an der Luft trocknen lassen.
10. Abstrich unter einem Mikroskop mit Immersionsöl-Objektiv untersuchen.

Qualitätskontrolle durch den Anwender

Die Qualitätskontrollen müssen unter Einhaltung der örtlich, landesweit und/oder bundesweit geltenden Bestimmungen oder Auflagen der Akkreditierungsorganisationen sowie der Standard-Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors erfolgen. Anwendern wird geraten, sich über geeignete Maßnahmen zur Qualitätskontrolle an die einschlägigen CLSI-Richtlinien (ehemals NCCLS) und CLIA-Vorschriften zu halten.

Kontrollen mit **BBL Gram Slide** (Best.-Nr. 231401) oder 18 – 24 Stunden alte Kulturen bekannter grampositiver und gramnegativer Mikroorganismen mittesten. Empfohlen werden die folgenden Teststämme:

Organismus	ATCC	Erwartetes Ergebnis
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	grampositive Kokken
<i>Escherichia coli</i>	25922	gramnegative Stäbchen

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Die Gramfärbung dient nur zur vorläufigen Identifizierung. Sie kann eine Kulturuntersuchung der Probe nicht ersetzen. Die Ergebnisse der Gramfärbung müssen durch zusätzliche Tests wie z. B. direkte Antigentests oder Kultivierung auf Nährmedien bestätigt werden.

Eine vorangehende Antibiotikabehandlung kann dazu führen, daß grampositive Mikroorganismen aus einer Probe gramnegativ erscheinen.

Die besten Ergebnisse erhält man mit 18 – 24 Stunden alten Kulturen, da frische Zellen zu den meisten Farbstoffen eine stärkere Affinität haben als ältere Zellen. Dies gilt insbesondere für viele Sporenbildner, die stark grampositiv sind, wenn sie in frischen Kulturen untersucht werden, die aber später gramvariabel oder gramnegativ werden.

Die Gram-Färbereaktion wird durch eine physische Beschädigung der bakteriellen Zellwand oder der Protoplasten beeinflusst. Die Zellwand grampositiver Bakterien bildet eine Barriere, die ein Auslaugen des Farbkomplexes aus dem Zytoplasma verhindert. Die Zellwand gramnegativer Bakterien enthält in organischen Lösungsmitteln lösliche Lipide, die dann das Zytoplasma ungehindert entfärben können. Physisch beschädigte Mikroorganismen reagieren auf die Gramfärbung also nicht wie erwartet.

„Eine sorgfältige Einhaltung der einzelnen Arbeitsschritte und Interpretationskriterien ist für korrekte Ergebnisse unerlässlich. Die Genauigkeit der Ergebnisse hängt in starkem Maß von der Erfahrung und Geschicklichkeit des Mikrobiologen ab.“²

Die Ergebnisse der Gramfärbung, einschließlich der Morphologie der Mikroorganismen, kann beeinflusst werden durch das Alter des Isolats, durch Bakterien mit autolytischen Enzymsystemen, durch Kulturen aus antibiotikahaltigen Nährmedien und auch durch Proben von Patienten unter Antibiotikatherapie.⁴ „Hintergrundmaterialien und Artefakte können ebenfalls die Interpretation erschweren. Ausgefällte grampositive Färbungen erscheinen im allgemeinen als unregelmäßige kokkenartige Formen oder als Aster-Spezies, die Pilzhyphen ähneln.“⁴

ZU ERWARTENDE ERGEBNISSE UND LEISTUNGSMERKMALE¹⁻⁴

Reaktion	Mit Gram-Safranin	Mit Basisches Gram-Fuchsin
Grampositiv	Violett-schwarze Zellen	Hellviolette bis violett-schwarze Zellen
Gramnegativ	Rosafarbene bis rote Zellen	Hellrosafarbene bis fuch sienrote Zellen

LITERATUR: S. "References" im englischen Text.

BD Diagnostics Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung.

BD Gram Stain Kits e reagenti

Italiano

Gram Stain Kit		1	N. di cat.
Gram Crystal Violet	Per la colorazione differenziale di batteri	1 x 250 mL	212539
Gram Iodine (stabilizzata)		1 x 250 mL	
Gram Decolorizer		1 x 250 mL	
Gram Safranin		1 x 250 mL	
Gram Stain Kit		1	212524
Gram Crystal Violet	Per la colorazione differenziale di batteri	1 x 250 mL	
Gram Iodine (non stabilizzata)		1 x 250 mL	
Gram Decolorizer		1 x 250 mL	
Gram Safranin		1 x 250 mL	
Gram Crystal Violet	Per la colorazione di microrganismi con metodica differenziale di Gram	4 x 250 mL	212525
		1 x 3,8 L	212526
Gram Iodine (stabilizzata)	Per la colorazione di microrganismi con metodica differenziale di Gram	4 x 250 mL	212542
		1 x 3,8 L	212543
Gram Iodine (non stabilizzata)	Per la colorazione di microrganismi con metodica differenziale di Gram	4 x 250 mL	212529
		1 x 3,8 L	212530
Gram Decolorizer	Per la colorazione di microrganismi con metodica differenziale di Gram	4 x 250 mL	212527
		1 x 3,8 L	212528
Gram Safranin	Per la colorazione di microrganismi con metodica differenziale di Gram	4 x 250 mL	212531
		1 x 3,8 L	212532
Gram Basic Fuchsin	Per la colorazione di microrganismi con metodica differenziale di Gram	4 x 250 mL	212544
		1 x 3,8 L	212545

USO PREVISTO

I kit e i reagenti di Gram Stain sono usati per colorare microrganismi da colture o campioni con metodica differenziale di Gram.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL METODO

La colorazione di Gram venne concepita nel 1884 da Christian Gram nell'intento di differenziare le cellule batteriche dal tessuto infetto. Gram, pur osservando quella che viene ora chiamata "reazione di Gram", non seppe riconoscere il valore tassonomico della sua tecnica.

La colorazione di Gram viene ora usata per differenziare batteri integri morfologicamente simili in due gruppi in base al colore delle cellule dopo la colorazione. Sono inoltre evidenziati forma, dimensioni e dettagli strutturali delle cellule. Tali dati preliminari forniscono importanti indicazioni sul tipo di microrganismi presenti e sulle tecniche da utilizzare per una loro precisa definizione.

Poiché la iodina inorganica si ossida rapidamente perdendo la sua efficacia di mordente,¹ il Gram Stain Kit (numero di catalogo 212539) differisce dalla formulazione originaria di Gram in quanto offre un complesso di iodina organica più stabile, la L-polinilpirrolidone-iodina.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

La procedura della colorazione di Gram² è la seguente.

Colorare uno striscio fissato con cristalvioletto.

Applicare iodina come mordente.

Decolorare la colorazione primaria con alcol/acetone e quindi controcolorare con safranina or fucsina basica.

Nel protoplasto (non nella parete cellulare) di tutti i microrganismi colorati con questa procedura, si forma un complesso cristalvioletto-iodina. I microrganismi in grado di trattenere questo complesso colorante dopo la decolorazione, sono classificati come gram-positivi mentre quelli decolorabili e controcolorabili vengono classificati come gram-negativi.

La rottura o rimozione della parete cellulare può causare la decolorazione del protoplasto delle cellule gram-positive (e gram-negative) e la perdita della proprietà di gram-positività. Il meccanismo della colorazione di Gram appare pertanto correlato alla presenza di una parete cellulare integra in grado di agire come barriera alla decolorazione della colorazione primaria.

In generale, la parete cellulare possiede una permeabilità non selettiva. In via teorica, si ritiene che durante la procedura di colorazione di Gram la parete cellulare delle cellule gram-positive venga disidratata dall'alcol contenuto nel decolorante e perda permeabilità, trattenendo così la colorazione primaria. La parete cellulare delle cellule gram-negative ha tuttavia un contenuto lipidico maggiore e diventa più permeabile allorché sottoposta a trattamento con alcol, che determina una perdita della colorazione primaria.

La base molecolare per la colorazione di Gram non è stata ancora determinata.

REAGENTI

Formula approssimata* per un litro

Gram Crystal Violet

COLORAZIONE PRIMARIA

Cristalvioletto	3,0 g
Isopropanolo	50,0 mL
Etanolo/metanolo	50,0 mL
Acqua distillata	900,0 mL

Gram Iodine

MORDENTE

(Soluzione di lavoro preparata con Gram Diluent e Gram Iodine 100X)

Cristalli di iodina	3,3 g
Ioduro di potassio	6,6 g
Acqua distillata	1,0 L

Stabilized Gram Iodine

MORDENTE

Complesso polivinilpirrolidone-iodina	100,0 g
Ioduro di potassio	19,0 g
Acqua distillata	1,0 L

Gram Decolorizer DECOLORANTE

Acetone.....	250,0 mL
Isopropanolo	750,0 mL

Gram Safranin

CONTROCOLORAZIONE

Polvere di safranina O (colorante puro)	4,0 g
Etanolo/metanolo	200,0 mL
Acqua distillata	800,0 mL

Gram Basic Fuchsin

CONTROCOLORAZIONE

Fucsina basica	0,08 g
Fenolo	2,6 g
Alcol isopropilico	4,5 mL
Acqua distillata	993,0 mL

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di performance.

Avvertenze e precauzioni - Per uso diagnostico *in vitro*.

Col passare del tempo, nelle colorazioni Gram Basic Fuchsin potrebbe formarsi un fine precipitato che non altera le performance del prodotto.

Gram Decolorizer

PERICOLO



H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. **H319** Provoca grave irritazione oculare. **H336** Può provocare sonnolenza o vertigini.

P210 Tenere lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici riscaldate - Non fumare. **P303/361/353** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia. **P403/235** Conservare in luogo ben ventilato. Conservare in luogo fresco. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

Gram Safranin

ATTENZIONE



H226 Liquido e vapori infiammabili.

P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. **P303/361/353** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia. **P403/235** Conservare in luogo ben ventilato. Conservare in luogo fresco. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

Gram Crystal Violet

Gram Stain Set with Stabilized Iodine

ATTENZIONE



H332 Nocivo se inalato. **H412** Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

P273 Non disperdere nell'ambiente. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

Gram Crystal Violet

Gram Stain Set

Metanolo

ATTENZIONE



H332 Nocivo se inalato.

P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. **P312** In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Gram Crystal Violet

Metanolo

ATTENZIONE



H332 Nocivo se inalato. **H412** Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

P273 Non disperdere nell'ambiente. **P304/340** IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

Gram Iodine (stabilizzata)

ATTENZIONE



H315 Provoca irritazione cutanea. **H319** Provoca grave irritazione oculare. **H401** Tossico per gli organismi acquatici.
P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. **P305/351/338** IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. **P302/352** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

Gram Iodine

ATTENZIONE



H315 Provoca irritazione cutanea. **H319** Provoca grave irritazione oculare.
P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. **P305/351/338** IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. **P302/352** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.

Gram Iodine 100X

ATTENZIONE



H315 Provoca irritazione cutanea. **H319** Provoca grave irritazione oculare.
H335 Può irritare le vie respiratorie. **P261** Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. **P312** In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. **P405** Conservare sotto chiave. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

Gram Iodine

(Gram Stain Set)

ATTENZIONE



H313 Può essere nocivo per contatto con la pelle. **H333** Può essere nocivo se inalato. **H315** Provoca irritazione cutanea. **H319** Provoca grave irritazione oculare. **H335** Può irritare le vie respiratorie. **H400** Molto tossico per gli organismi acquatici.

P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. **P305/351/338** IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. **P405** Conservare sotto chiave. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

Conservazione - Al ricevimento, conservare tra 15 e 30 °C. La data di scadenza indicata si riferisce al prodotto in flaconi chiusi, correttamente conservato. Non aprire fino al momento dell'uso.

Usare la soluzione di lavoro di Gram Iodine tradizionale entro 3 mesi dalla preparazione, senza superare la data di scadenza di alcun componente.

Deterioramento del prodotto - Allorché ricostituita, la soluzione Gram Iodine non stabilizzata può provocare una certa variabilità nella colorazione di Gram, quando lo iodio non è più sufficiente per la soluzione. Proteggere la soluzione di iodio dall'esposizione eccessiva ad aria, luce e calore, per garantirne il mantenimento di proprietà mordenti appropriate.

RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Stendere il campione da testare su un vetrino pulito in modo da formare uno striscio sottile e uniforme. Emulsionare le colonie da una coltura di 18 – 24 ore in soluzione fisiologica per ottenere la densità appropriata.

Lasciare asciugare lo striscio all'aria.

Fissare lo striscio al vetrino usando una delle tecniche seguenti.

1. Termofissare il vetrino passandolo su fiamma bassa 2 – 3 volte. Lasciare raffreddare il vetrino a temperatura ambiente prima della colorazione.

NOTA - Non surriscaldare il vetrino in quanto un calore eccessivo provoca una colorazione atipica.

2. Fissare il vetrino con metanolo irrorandolo con metanolo assoluto per 1 – 2 min e risciacquare con acqua corrente prima della colorazione.³

NOTA: Per una fissazione appropriata, conservare il metanolo assoluto in un flacone scuro con tappo a vite e reintegrare la provvista per i test ogni due settimane.

PROCEDURA

Preparazione dei reagenti

Preparare la soluzione di lavoro di tradizionale versando l'intera ampolla da 2,5 mL di Gram Iodine 100X in 250 mL di Gram Diluent oppure l'intero flacone da 40 mL di Gram Iodine 100X in 3,8 L di Gram Diluent e mescolare con cura.

Materiali forniti - Gram Crystal Violet, Gram Iodine o Stabilized Gram Iodine, Gram Decolorizer e Gram Safranin o Gram Basic Fuchsin.

Materiali necessari ma non forniti - Vetrini per microscopio, becco Bunsen o metanolo, ansa batteriologica, tamponi, carta assorbente, microscopio con obiettivo a immersione in olio e vetrino Gram.

Procedura del test

1. Irrorare il vetrino fissato con la colorazione primaria (Gram Crystal Violet) e colorare per 1 min.
2. Rimuovere la colorazione primaria lavando delicatamente con acqua corrente fredda.
3. Irrorare il vetrino con il mordente (Gram Iodine o Stabilized Gram Iodine) e lasciarlo sul vetrino per 1 min.
4. Rimuovere il mordente lavando delicatamente con acqua corrente.
5. Decolorare (Gram Decolorizer) finché il solvente che deborda dal vetrino è incolore (3 – 60 sec).
6. Lavare il vetrino delicatamente in acqua corrente fredda.
7. Irrorare il vetrino con la controcolorazione (Gram Safranin o Gram Basic Fuchsin) e colorare per 30 – 60 sec.
8. Lavare il vetrino con acqua corrente fredda.
9. Tamponare con carta assorbente o un panno di carta o lasciare asciugare all'aria.
10. Esaminare lo striscio con un obiettivo a immersione in olio.

Controllo di qualità a cura dell'utente

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità del laboratorio specifico. Per una corretta esecuzione delle procedure relative al controllo di qualità, si consiglia di consultare le linee guida CLSI (già NCCLS) e le norme CLIA in materia.

Analizzare i controlli usando BBL Gram Slide (numero di catalogo 231401) o colture di 18 – 24 h di microrganismi gram-positivi e gram-negativi conosciuti. Si consigliano i ceppi di test sotto elencati.

Microrganismo	ATCC	Risultati attesi
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	cocchi gram-positivi
<i>Escherichia coli</i>	25922	bastoncini gram-negativi

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

La colorazione di Gram fornisce unicamente dati preliminari per l'identificazione e non deve essere concepita come una metodica sostitutiva degli studi in coltura del campione. I risultati della colorazione di Gram devono essere confermati con altre procedure come per esempio test diretti dell'antigene e colture in terreno.

Il precedente trattamento con antibiotici può far sì che i microrganismi gram-positivi di un campione appaiano gram-negativi.

Per ottenere risultati ottimali, è consigliabile usare una coltura di 18 – 24 h poiché le cellule fresche hanno una maggiore affinità per gran parte dei coloranti rispetto alle cellule vecchie. Ciò è particolarmente vero nel caso di molti organismi sporigeni, che sono fortemente gram-positivi allorché esaminati in colture fresche ma diventano successivamente gram-variabili o gram-negativi.

La reazione della colorazione di Gram è alterata dalla degradazione fisica del protoplasto o della parete cellulare dei batteri. Le pareti cellulari dei batteri gram-positivi frappongono una barriera che previene l'infiltrazione del complesso colorante dal citoplasma. Le pareti cellulari dei batteri gram-negativi contengono lipidi solubili in solventi organici, che sono quindi liberi di decolorare il citoplasma. Un microrganismo che viene fisicamente degradato da un calore eccessivo, non reagirà quindi alla colorazione di Gram nel modo atteso.

"Per ottenere risultati accurati, è essenziale rispettare scrupolosamente la procedura e i criteri di interpretazione. L'accuratezza dipende essenzialmente dalla preparazione e dalla capacità del microbiologo".²

I risultati della colorazione di Gram, inclusa la morfologia dei microrganismi, possono essere influenzati dall'età dell'isolato, da batteri contenenti sistemi enzimatici autolitici, colture trasferite da terreni contenenti antibiotici nonché da campioni prelevati da pazienti in terapia antibiotica.⁴ "Materiale di fondo e artefatti possono anch'essi interferire con l'interpretazione. La colorazione gram-positiva precipitata appare generalmente sotto forma di corpi coccoidi irregolari o astriformi che rassomigliano a ife fungine".⁴

RISULTATI ATTESI E PERFORMANCE¹⁻⁴

Reazione	Con Gram Safranin	Con Gram Basic Fuchsin
Gram-positiva	Cellule porpora-nere	Cellule da porpora brillante a porpora-nere
Gram-negativa	Cellule rosa-rosse	Cellule rosa brillante-fucsia

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD.

			Nº de ref.
Gram Stain Kit		1	
Gram Crystal Violet	Para la tinción diferencial de bacterias.	1 x 250 mL	212539
Gram Iodine (estabilizado)		1 x 250 mL	
Gram Decolorizer		1 x 250 mL	
Gram Safranin		1 x 250 mL	
Gram Stain Kit		1	212524
Gram Crystal Violet	Para la tinción diferencial de bacterias.	1 x 250 mL	
Gram Iodine (no estabilizado)		1 x 250 mL	
Gram Decolorizer		1 x 250 mL	
Gram Safranin		1 x 250 mL	
Gram Crystal Violet	Para tinción de microorganismos por medio del método diferencial de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212525 212526
Gram Iodine (estabilizado)	Para tinción de microorganismos por medio del método diferencial de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212542 212543
Gram Iodine (no estabilizado)	Para tinción de microorganismos por medio del método diferencial de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212529 212530
Gram Decolorizer	Para tinción de microorganismos por medio del método diferencial de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212527 212528
Gram Safranin	Para tinción de microorganismos por medio del método diferencial de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212531 212532
Gram Basic Fuchsin	Para tinción de microorganismos por medio del método diferencial de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212544 212545

USO PREVISTO

Los Gram Stain Kits y reactivos para tinción de Gram se utilizan para realizar tinciones de microorganismos de cultivos o muestras mediante el método diferencial de Gram.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La tinción de Gram fue creada en 1884 por Christian Gram con la intención de distinguir las células bacterianas del tejido infectado. Aunque Gram observó lo que ahora se denomina la "reacción de Gram", no reconoció el valor taxonómico de su técnica.

La tinción de Gram ahora se utiliza para diferenciar las bacterias intactas y morfológicamente similares en dos grupos según el color de la célula después de la tinción. Además, se hacen evidentes la forma, el tamaño y los detalles estructurales de la célula. Dicha información preliminar proporciona indicios importantes en cuanto al tipo de organismo u organismos presentes y las técnicas posteriores necesarias para caracterizarlos.

Dado que el yodo inorgánico se oxida rápidamente y pierde su eficacia como mordiente¹, el Gram Stain Kit (Nº de ref. 212539) se distingue de la fórmula original de dicho procedimiento por ofrecer un complejo de yodo orgánico más estable, L-polivinilpirrolidona-yodo.

FUNDAMENTO DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento de tinción de Gram² consta de las siguientes etapas:

Realizar la tinción de un frotis preparado con cristal violeta.

Aplicar yodo como mordiente.

Decolorar el colorante primario con alcohol/acetona; y realizar una contracoloración con safranina o fucsina básica

Un complejo de cristal violeta-yodo se forma en el protoplasto (no en la pared celular) de todos los organismos a los que se aplica la tinción con este procedimiento. Los organismos capaces de retener este complejo colorante después de la decoloración se clasifican como grampositivos, mientras los que pueden decolorarse y admiten contratinción se clasifican como gramnegativos.

Si se altera o se elimina la pared celular, el protoplasto de células grampositivas (además de las gramnegativas) pueden decolorarse y el atributo grampositivo se pierde. Por consiguiente, el mecanismo de tinción de Gram parece estar relacionado con la presencia de una pared celular intacta capaz de actuar como barrera a la decoloración del colorante primario.

Por lo general, la pared celular es permeable de una manera no selectiva. Teóricamente, durante el procedimiento de tinción de Gram, la pared celular de las células grampositivas se deshidrata por el alcohol en el descolorante y pierde permeabilidad, por lo que retiene el colorante primario. Sin embargo, la pared celular de las células gramnegativas tiene un contenido lipídico mayor, y se vuelve más permeable cuando se le trata con alcohol, lo que da como resultado la pérdida del colorante primario.

La base molecular para la tinción de Gram no se ha determinado todavía.

REACTIVOS

Fórmula aproximada* por litro

Gram Crystal Violet

COLORANTE PRIMARIO

Cristal violeta.....	3,0 g
Isopropanol.....	50,0 mL
Etanol/Metanol.....	50,0 mL
Agua destilada.....	900,0 mL

Gram Iodine

MORDIENTE

(Solución de trabajo preparada con diluyente para Gram y yodo para Gram 100X)

Cristales de yodo.....	3,3 g
Yoduro potásico.....	6,6 g
Agua destilada.....	1,0 L

Stabilized Gram Iodine

MORDIENTE

Complejo polivinilpirrolidona-yodo.....	100,0 g
Yoduro potásico.....	19,0 g
Agua destilada.....	1,0 L

Gram Decolorizer

DESCOLORANTE

Acetona.....	250,0 mL
Isopropanol.....	750,0 mL

Gram Safranin

CONTRACOLORANTE

Safranina O en polvo (colorante puro).....	4,0 g
Etanol/Metanol.....	200,0 mL
Agua destilada.....	800,0 mL

Gram Basic Fuchsin

CONTRACOLORANTE

Fucsina básica.....	0,08 g
Fenol.....	2,6 g
Alcohol isopropílico.....	4,5 mL
Agua destilada.....	993,0 mL

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Advertencias y precauciones: Para uso diagnóstico *in vitro*.

Con el tiempo, puede generarse un ligero precipitado en Gram Basic Fuchsin. No se verá afectado el rendimiento del producto.

Gram Decolorizer

PELIGRO



H225 Líquido y vapores muy inflamables. **H319** Provoca irritación ocular grave. **H336** Puede provocar somnolencia o vértigo.

P210 Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llama abierta o superficies calientes. — No fumar. **P303/361/353** EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ducharse. **P403/235** Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco. **P501** Eliminar el contenido y el recipiente conforme a la normativa local, regional, nacional, internacional.

Gram Safranin

ADVERTENCIA



H226 Líquidos y vapores inflamables.

P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. **P303/361/353** EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ducharse. **P403/235** Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco. **P501** Eliminar el contenido y el recipiente conforme a la normativa local, regional, nacional, internacional.

Gram Crystal Violet

Gram Stain Set with Stabilized Iodine

ADVERTENCIA



H332 Nocivo en caso de inhalación. **H412** Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P273 Evitar su liberación al medio ambiente. **P501** Eliminar el contenido y el recipiente conforme a la normativa local, regional, nacional, internacional.

Gram Crystal Violet

Gram Stain Set

Metanol

ADVERTENCIA



H332 Nocivo en caso de inhalación.

P261 Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. **P312** Llamar a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico en caso de malestar.

Gram Crystal Violet

Metanol

ADVERTENCIA



H332 Nocivo en caso de inhalación. **H412** Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P273 Evitar su liberación al medio ambiente. **P304/340** EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. **P501** Eliminar el contenido y el recipiente conforme a la normativa local, regional, nacional, internacional.

Gram Iodine (estabilizada)

ADVERTENCIA



H315 Provoca irritación cutánea. **H319** Provoca irritación ocular grave. **H401** Tóxico para los organismos acuáticos.

P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. **P305/351/338** EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. **P302/352** EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. **P501** Eliminar el contenido y el recipiente conforme a la normativa local, regional, nacional, internacional.

Gram Iodine

ADVERTENCIA



H315 Provoca irritación cutánea. **H319** Provoca irritación ocular grave.

P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. **P305/351/338** EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. **P302/352** EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

Gram Iodine 100X

ADVERTENCIA



H315 Provoca irritación cutánea. **H319** Provoca irritación ocular grave.

H335 Puede irritar las vías respiratorias. **P261** Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. **P312** Llamar a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico en caso de malestar. **P405** Guardar bajo llave. **P501** Eliminar el contenido y el recipiente conforme a la normativa local, regional, nacional, internacional.

Gram Iodine
(Gram Stain Set)

ADVERTENCIA



H313 Puede ser nocivo en contacto con la piel. **H333** Puede ser nocivo si se inhala. **H315** Provoca irritación cutánea. **H319** Provoca irritación ocular grave. **H335** Puede irritar las vías respiratorias. **H400** Muy tóxico para los organismos acuáticos.

P261 Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. **P305/351/338** EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. **P405** Guardar bajo llave. **P501** Eliminar el contenido y el recipiente conforme a la normativa local, regional, nacional, internacional.

Conservación: Al recibir el producto, se debe guardar entre 15 y 30 °C. La fecha de caducidad es aplicable a los frascos sin abrir, almacenados según indicaciones. No abrir hasta que vayan a utilizarse.

Utilizar la solución de trabajo de yodo para Gram tradicional dentro de los 3 meses de preparación, sin superar la fecha de caducidad de ningún componente.

Deterioro del producto: La solución de yodo para Gram no estabilizada reconstituida puede causar una variabilidad en la tinción de Gram, cuando no quede suficiente yodo en la solución. Proteger la solución de yodo de la exposición indebida al aire, la luz y el calor, para asegurar que la solución está suministrando la actividad de mordiente adecuada.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Aplicar la muestra de análisis a un portaobjetos de vidrio limpio de manera que se produzca un frotis delgado y uniforme. Emulsionar las colonias de un cultivo de 18 – 24 h en solución salina para obtener la densidad adecuada.

Dejar que el frotis se seque al aire.

Fijar el frotis al portaobjetos mediante una de las técnicas siguientes:

1. Fijar con calor pasando el portaobjetos por una pequeña llama entre 2 y 3 veces. Deje enfriar el portaobjeto a temperatura ambiente antes de realizar la tinción.

NOTA: No sobrecalentar el portaobjetos; el calentamiento excesivo causará una tinción atípica.

2. Fijar el frotis con metanol en el portaobjetos cubriéndolo con metanol absoluto durante 1 – 2 minutos y aclarar con agua corriente antes de la tinción³.

NOTA: Para una fijación adecuada, almacenar el metanol absoluto en un frasco con tapa roscada y opaca, y volver a llenar con solución de trabajo cada dos semanas.

PROCEDIMIENTO

Preparación del reactivo

Preparar la solución de trabajo de yodo para Gram tradicional agregando una ampolla completa de 2,5 mL de Gram Iodine 100X a 250 mL de Gram Diluent o un vial completo de 40 mL de Gram Iodine 100X a 3,8 L de Gram Diluent; mezclar a conciencia.

Materiales suministrados: Gram Crystal Violet, Gram Iodine o Stabilized Gram Iodine, Gram Decolorizer y Gram Safranin o Gram Basic Fuchsin.

Materiales necesarios pero no suministrados: Portaobjetos de microscopio, mechero Bunsen o metanol, asa bacteriológica, torundas, papel secante, microscopio con lente de inmersión en aceite y portaobjetos para Gram.

Procedimiento del análisis:

1. Cubrir el frotis fijado con tinción primaria (Gram Crystal Violet) y dejar actuar la tinción durante 1 minuto.
2. Retirar la tinción primaria lavando suavemente con agua corriente fría.
3. Cubrir el portaobjetos con mordiente (Gram Iodine o Stabilized Gram Iodine) y mantenerlo en el portaobjetos durante 1 minuto.
4. Retirar el mordiente lavando suavemente con agua corriente fría.
5. Descolorar (con Gram Decolorizer) hasta que el disolvente del portaobjetos se vaya completamente con el agua (3 – 60 seg.).
6. Lavar el portaobjetos suavemente en agua corriente fría.
7. Cubrir el portaobjetos con contracolorante (Gram Safranin o Gram Basic Fuchsin) y realizar la tinción durante 30 – 60 segundos.
8. Lavar el portaobjetos con agua corriente fría.
9. Secar con papel secante o toalla de papel o dejar secar al aire.
10. Examinar el frotis bajo una lente de inmersión en aceite.

Control de calidad del usuario

El control de calidad se debe llevar a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones pertinentes del CLSI (antes NCCLS) y la normativa de la CLIA para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

Realice los análisis de control con el **BBL Gram Slide** (N.º de ref. 231401) o cultivos de 18 – 24 h de microorganismos grampositivos o gramnegativos conocidos. Para ello se recomienda utilizar las siguientes cepas de prueba:

Microorganismo	ATCC	Resultados previstos
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	cocos grampositivos
<i>Escherichia coli</i>	25922	bastoncillos gramnegativos

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La tinción de Gram proporciona información de identificación primaria solamente, y no está diseñada para sustituir los estudios de cultivo de la muestra. Los resultados de tinción de Gram deben confirmarse con procedimientos adicionales tales como análisis directo de antígenos y cultivos de los medios.

Cualquier tratamiento anterior con antibióticos puede hacer que organismos grampositivos de una muestra aparezcan como gramnegativos.

Se aconseja el uso de cultivos de 18 – 24 h para obtener resultados óptimos, dado que las células recientes tienen una mayor afinidad que las células de más antigüedad para la mayoría de los colorantes. Esto se aplica en especial al caso de las bacterias formadoras de esporas, que son fuertemente grampositivas cuando se las examina en cultivos recientes, pero que luego se vuelven gram-variables o grampositivas.

La reacción de tinción de Gram se ve afectada por la alteración física de la pared celular bacteriana o protoplasto. Las paredes celulares de las bacterias grampositivas interponen una barrera que evita la absorción del complejo colorante desde el citoplasma. Las paredes celulares de las bacterias gramnegativas contienen lípidos solubles en disolventes orgánicos, que luego se liberan para descolorar el citoplasma. Por consiguiente, un microorganismo físicamente alterado por exceso de calor no reacciona a la tinción de Gram de la manera prevista.

“Para obtener resultados exactos, se debe cumplir cuidadosamente con el procedimiento y los criterios de interpretación. La exactitud depende en gran medida de la capacitación y la capacidad del especialista en microbiología”².

Los resultados de la tinción de Gram, incluida la morfología del organismo, pueden verse afectados por la antigüedad del aislado, las bacterias que contienen sistemas enzimáticos autolíticos, los cultivos transferidos de medios con antibióticos, además de muestras recogidas de pacientes que reciben tratamiento con antibióticos⁴. “El material de fondo y los artefactos también pueden interferir con la interpretación. La tinción grampositiva precipitada por lo general aparece con forma de cocos irregulares, o bien con forma de estrella similar al tejido reticulado de los hongos”⁴.

RESULTADOS PREVISTOS Y CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO¹⁻⁴

Reacción	Con Gram Safranin	Con Gram Basic Fuchsin
Grampositiva	Células de color violeta oscuro	Células de color violeta brillante a oscuro
Gramnegativa	Células de color rosa a rojo	Células de color rosa brillante a fucsia

REFERENCIAS: Ver “Referencias” en el texto en inglés.

Servicio técnico de BD Diagnostics: póngase en contacto con el representante local de BD.



Manufacturer / Производител / Výrobce / Fabrikant / Hersteller / Κατασκευαστής / Fabricante / Tootja / Fabricant /
 Produzodač / Gyártó / Fabricante / Аткарушы / Gamintojas / Tilvirker / Producent / Producător / Производител / Výrobca /
 Produzodač / Tilverkare / Üretici / Виробник



Use by / Исползвайте до / Spotbejute do / Brug før / Verwendbar bis / Χρήση έως / Usar antes de / Kasutada enne /
 Date de péremption / Uputrijebiti do / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Дейін пайдалануға / Naudokite iki /
 Houdbaar tot / Brukes for / Stosować do / Prazo de validade / A se utiliza până la / Исползовать до / Použite do /
 Uputrebiti do / Använd fööre / Son kullanma tarihi / Використати до/ліне

YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month)
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutning af måned)
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende)
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fin del mes)
 AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp)
 AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois)
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)
 ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja)
 AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese)
 ЖЮЮЖ-АА-КК / ЖЮЮЖ-АА / (АА = айдың соңы)
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mēnesio pabaiga)
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = sluttet av måneden)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês)
 AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii)
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiacu)
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = sluttet av månaden)
 YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu)
 PPPP-MM-ДД / PPPP-MM (ММ = кінець місяця)



Catalog number / Каталоген номер / Katalogové číslo / Katalognummer / Αριθμός καταλόγου / Número de catálogo /
 Katalognummer / Numéro catalogue / Kataloški broj / Katalógusszám / Numero di catalogo / Каталог номери / Katalog
 numeris / Catalogus nummer / Numer katalogowy / Număr de catalog / Номер по каталогу / Katalógové číslo / Kataloški broj /
 Katalog numarasi / Номер за каталогом



Authorized Representative in the European Community / Авторизиран представител в Европейската общност / Autorizovaný zástupce pro Evropském společenství / Autoriseret repræsentant i De Europæiske Fællesskaber / Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Représentant autorisé pour la Communauté européenne / Autorizirani predstavnik u Evropskoj uniji / Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségen / Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Bevoegde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap / Autoriseret repræsentant i EU / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Representante autorizado na Comunidade Europeia / Reprezentantul autorizat pentru Comunitatea Europeană / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Autorizovaný predstavništvo u Evropskoj uniji / Autoriserad representant i Europeiska gemenskapen / Автура Топлuluğu Yetkili Temsilcisi / Уповноважений представник у країнах ЄС



In Vitro Diagnostic Medical Device / Медицински уред за диагностика ин витро / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In vitro diagnostiska meditsiniparatuur / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medicinska pomagala za In Vitro Dijagnostiku / In vitro diagnostiskai orvosi eszköz / Dispositivo medicale per diagnostica in vitro / Жсанды жағдайда жүргізетін медициналық диагностика аспабы / In vitro diagnostikos prietais / Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro / Медицинский прибор для диагностики in vitro / Medicinska pomôcka na diagnostiku in vitro / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik / In Vitro Dijagnostik Tibbi Cihaz / Медицинский прибор для диагностики in vitro



Temperature limitation / Температурни ограничения / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturbegrenzung / Περιορισμοί θερμοκρασίας / Limitación de temperatura / Temperaturpirang / Limites de température / Dozvoljena temperatura / Hőmérsékleti határ / Limiti di temperatura / Температураны шектеу / Laikymo temperatūra / Temperaturulimiet / Temperaturbegrenzung / Ograniczenie temperatury / Limites de temperatura / Limite de temperatură / Ограничение температуры / Ohraničenje teploty / Ograničenje temperature / Temperaturgräns / Sicaklık sınırlaması / Обмеження температури



Batch Code (Lot) / Код на партидата / Kód (číslo) šarže / Batch-kode (lot) / Batch-Code (Charge) / Κωδικός παρτίδας (παρτίδα) / Código de lote (lote) / Partii kood / Numéro de lot / Lot (kod) / Tétel száma (Lot) / Codice batch (lotto) / Топтама коды / Partijos numeris (LOT) / Lot nummer / Batch-kode (parti) / Kod partii (seria) / Código do lote / Cod de serie (Lot) / Код партии (лот) / Kód série (šarža) / Kod serije / Partinummer (Lot) / Parti Kodu (Lot) / Код партії



Contains sufficient for <n> tests / Съдържанието е достатъчно за <n> теста / Dostatečné množství pro <n> testů / Ineholder tilstrækkeligt til <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα για <n> εξετάσεις / Contenido suficiente para <n> pruebas / Kullaladane <n> testide jaoks / Contenu suffisant pour <n> tests / Sadržaj za <n> testova / <n> teszthez elegendő / Contenuto sufficiente per <n> test / <n> тестрегі үшін жеткілікті / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Inhoud voldoende voor "n" testen / Innholder tilstrækkelig til <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Conteúdo suficiente para <n> testes / Conținut suficient pentru <n> teste / Достаточно для <n> тестов(а) / Obsah vystačí na <n> testov / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Innehåller tillräckligt för <n> analyser / <n> test için yeterli miktarda içerir / Вистачить для аналізи: <n>



Consult Instructions for Use / Направете справка в инструкциите за употреба / Prostudujte pokyny k použití / Se brugsanvisningen / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Consultar las instrucciones de uso / Lugada kasutusjuhendit / Consulter la notice d'emploi / Koristi upute za upotrebu / Olvassa el a használati utasítást / Consultare lestruzioni per l'uso / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consultar as instruções de utilização / Consultați instrucțiunile de utilizare / См. руководство по эксплуатации / Pokry Pokyny na použitie / Pogledajte uputstvo za upotrebu / Se bruksanvisningen / Kullanım Talimatları'na başvurun / Див. інструкції з використання



Negative control / Отрицателен контрол / Negativní kontrola / Negativ kontrol / Negative Kontrolle / Αρνητικός μάρτυρας / Control negativo / Negatiivne kontroll / Contrôle négatif / Negativa kontrola / Negativ kontroll / Controllo negativo / Негативтік бақылау / Neigiama kontrolė / Negatieve controle / Kontrola ujemna / Controllo negativo / Control negativ / Отрицательный контроль / Negatif kontrol / Негативний контроль



Positive control / Положительен контрол / Pozitivní kontrola / Positiv kontrol / Positive Kontrolle / Θετικός μάρτυρας / Control positivo / Positiivne kontroll / Contrôle positif / Pozitivna kontrola / Pozitiv kontroll / Controllo positivo / Оң бақылау / Teigiama kontrolė / Positive controle / Kontrola dodatnia / Controllo positivo / Control pozitiv / Положительный контроль / Pozitif kontrol / Позитивний контроль



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA

Australian Sponsor:
Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde, NSW 2113 Australia



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo and BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company. © 2016 BD