

**IVD** DISPOSITIVO MEDICO-DIAGNOSTICO IN VITRO AI SENSI DEL D. Lgs. 332/2000 

**NOME** KIT GRAM - Modificato secondo Hucker

**Codice CND:** W0104080201 Identificazione Gram – Manuale  
W0104080203 Identificazione Gram + Manuale

### Confezionamenti disponibili

454441 Gram kit modificato secondo Hucker Confezione 4X250 ml

### Scopo previsto

Colorante di contrasto nella colorazione Gram, colorante per batteriologia, per identificazione di Batteri Gram + e Gram -.

### Principio del metodo

Nella diagnostica batteriologica si può considerare la colorazione di Gram come uno dei metodi colorimetrici più importanti. Nella reazione, i coloranti all'Anilina si fissano in base alla successiva azione dello iodio nelle cellule dei batteri. La presenza di lipoproteine nei Gram +, come componenti della struttura e quindi della permeabilità della parete cellulare, ha un'importanza decisiva. In base a questo metodo di colorazione è possibile suddividere tutti i batteri in due gruppi: Gram-positivi e Gram-negativi. Nei Gram-positivi contenenti lipoproteine non è più possibile disciogliere il complesso sostanza colorata/iodio una volta formato, mediante i decoloranti come Alcool o Acetone: la cellula rimane blu-viola. Nei Gram-negativi, cioè batteri che non contengono lipoproteine nella parete cellulare, è possibile sciogliere il complesso facendo virare la colorazione della cellula dal rosa al rosso.

Hucker ha inserito il Violetto cristalli ossalato al posto del Violetto Genziana fenata (il Violetto Genziana è una miscela di coloranti) e la Safranina al posto della Fucsina per migliorare l'affinità verso i costituenti cellulari coinvolti. L'uso del Polivinilpirrolidone nel liquido di Lugol migliora le fasi di colorazione e decolorazione e permette una miglior conservazione del Lugol stesso.

### Composizione del KIT: 4 flaconi da 250 ml

Violetto Cristalli Ossalato	codice 491561	Violetto Cristalli, in soluzione idroalcolica
Liquido di Lugol	codice 458751	PVP-Iodio e Potassio Joduro in soluzione alcolica
Decolorante	codice 444131	Miscela Alcool Etilico e Acetone
Safranina Soluzione	codice 477241	Safranina in soluzione acquosa

### Procedura/Campioni in Esame

- 1) Applicare, con ansa sterile, il materiale in esame: liquidi biologici, essudati, pus, colture solide o liquide, su un vetrino portaoggetti sgrassato preventivamente;
- 2) Fissare per breve riscaldamento o a freddo con Alcool Etilico 95°;
- 3) Lasciare raffreddare;
- 4) Ricoprire con la soluzione di Violetto Cristalli Ossalato per 1 minuto;
- 5) Lavare con abbondante acqua per eliminare le tracce di colorante in eccesso;
- 6) Ricoprire interamente il porta-oggetti con Liquido di Lugol per 1 minuto;
- 7) Lavare abbondantemente con acqua corrente;
- 8) Decolorare rapidamente con il Decolorante fino a che lo striscio appare grigio-blu;
- 9) Lavare con acqua;
- 10) Ricoprire con soluzione di Safranina per un tempo variabile 10 secondi a 1 minuto;
- 11) Risciacquare con acqua e lasciare asciugare;
- 12) Osservare al microscopio usando l'obiettivo ad immersione.

### Risultati

Batteri Gram +	BLU-VIOLA
Batteri Gram -	ROSSO-ARANCIO



**NOTA BENE**

*In caso di risultati dubbi dell'analisi, ripetere il procedimento sopra riportato.*

**Note**

E' importante lavare bene il Violetto Cristalli ed il Lugol, perché un eccesso di colorante può causare rischi di cristallizzazione.

L'età delle colture è un fattore importante, le colture vecchie decolorano più facilmente.

Il contrasto delle colorazioni dipende da come viene condotta la colorazione e la decolorazione, i tempi riportati devono essere adattati alle particolarità di ciascun vetrino.

La colorazione di Gram fornisce solo informazioni identificative preliminari e non sostituisce la coltura del campione.

**Avvertenza**

La durata dei reagenti, una volta aperti, è di 2 anni se conservati ben chiusi ed a temperatura ambiente.

A temperature inferiori ai 15°C si possono formare dei precipitati nelle soluzioni dei coloranti: in questo caso si possono ridisciogliere per riscaldamento a 60°C a bagno maria per alcuni minuti ore. La formazione di uno "specchio" sulle pareti del flacone indica che il prodotto è invecchiato e pertanto si consiglia di smaltirlo.

**Stabilità**

Il prodotto è stabile nelle normali condizioni di impiego e di stoccaggio.

Non vi sono particolari pericoli di reazione con altre sostanze nelle normali condizioni di impiego.

**Scadenza del prodotto**

Il prodotto ha durata di vita di 2 anni, in confezione integra e correttamente conservata.

Richiudere il flacone dopo l'uso.

Dopo la prima apertura, il prodotto può essere utilizzato per 6 mesi.

**Conservazione**

Non fumare, né bere, né mangiare durante la manipolazione, lavarsi le mani dopo l'uso.

I prodotti sono confezionati in flaconi schermati, con tappo a tenuta; devono essere conservati ben chiusi, al riparo dalla luce, in luogo fresco ed asciutto. Intervallo di Temperatura consigliato per la conservazione: 5-30°C. Richiudere il flacone dopo l'uso.

**Avvertenze e Precauzioni**

Il prodotto è destinato all'utilizzo di personale tecnico specializzato.

Il prodotto è pronto all'uso e riservato a tecniche manuali di colorazione. Leggere attentamente le informazioni relative alle Indicazioni di Pericolo e ai Consigli di Prudenza, riportati in etichetta. Consultare sempre la Scheda di Sicurezza dove sono reperibili le informazioni relative ai rischi presentati dal prodotto, alle misure precauzionali da adottare durante l'uso, alle misure di primo soccorso e di intervento in caso di rilascio accidentale. Durante e dopo l'utilizzo, manipolare tutti i materiali agendo in conformità delle Buone Pratiche di Laboratorio e ricordare sempre che il materiale da analizzare deve essere considerato come a potenziale rischio biologico. I reagenti vengono prodotti con metodiche uniformate ai Riferimenti Bibliografici e controllati come da Specifiche Controllo Qualità. Non utilizzare in caso di contenitore primario danneggiato.

**Smaltimento**

Per informazioni riguardanti lo smaltimento si rimanda alla Scheda di Sicurezza. È opportuno seguire appropriate misure di sicurezza nel maneggiare, processare ed eliminare tutti i campioni clinici, perché potrebbero essere presenti organismi patogeni

**Bibliografia**

Staining Procedures – Edited by G.Clark 4th Ed. – Williams & Wilkins Baltimore/London

H.J. Conn's, Biological Stains – R.D. Lillie, M.D.

**Rev. 4 – Settembre 2016**

