

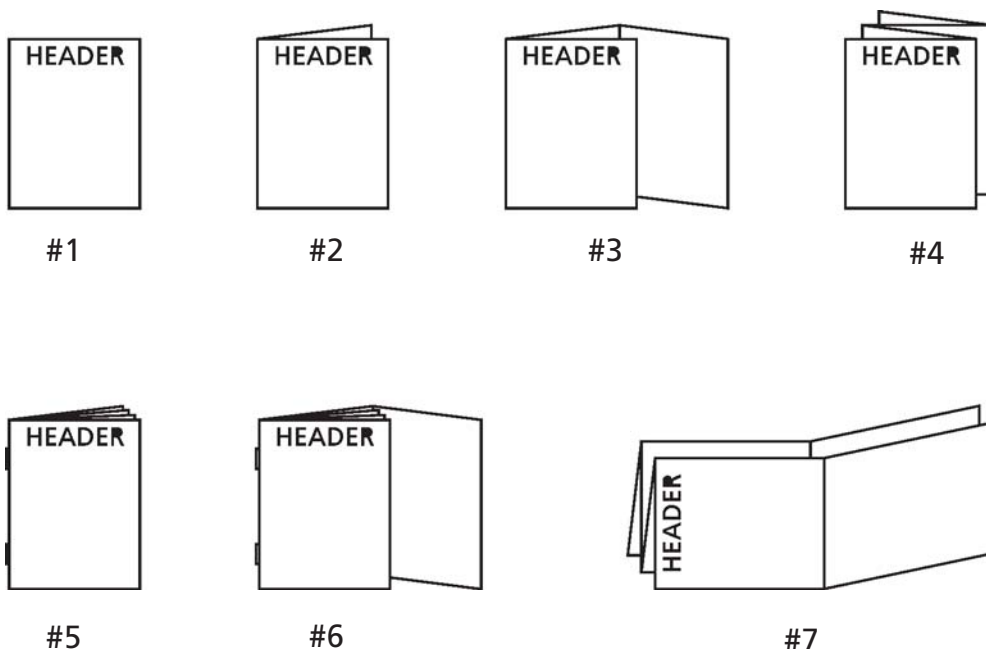
Revisions

SO 0191-5

Rev from	Rev to	ECO #
0408	0608	4823-08

Notes:

1. BD Cat. Number Various
2. Blank (Sheet) Size: Length: 25.5" Width: 16.5"
 Number of Pages: 18 Number of Sheets: 1
 Page Size: Length 8.5" Width 5.5" Final Folded Size: 4.25" x 5.5"
3. Style (see illustrations below): # 7



4. See Specification Control Number N/A for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides Yes No
 No. of Colors: 1 PMS# Standard Black
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level

Label Design	Date	<p style="font-size: small;">COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION</p>	Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA	
Proofer	Date			
Checked By	Date			
Part Number: 8820191JAA		Category and Description Package Insert, Gram Stain Kits and Reagents	Sheet: 1 of 19 <hr/> Scale: N/A	A

BD Gram Stain Kits and Reagents

English: pages 1 – 3 Italiano: pagine 10 – 12
Français: pages 4 – 6 Español: páginas 13 – 15
Deutsch: Seiten 7 – 9



8820191JAA
2008/06

Pokyny vám poskytnú miestni zástupce spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Інструкції зискате у місцевого зástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Contactați reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucțiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcilerinize danışın. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva.

Gram Stain Kit		1	Cat. No. 212539
Gram Crystal Violet	For the differential staining of bacteria.	1 x 250 mL	
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. 1212539) 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 Crystal Violet: Harmful by inhalation and if swallowed. Irritating to eyes, respiratory system and skin. Possible risk of irreversible effects. Keep container tightly closed. Keep away from sources of ignition - No Smoking. Do not breathe gas / fumes / vapor / spray. Wear suitable protective clothing and gloves.

Gram Iodine 100X: Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed. Keep container tightly closed. Do not breathe gas / fumes / vapor / spray. Avoid contact with skin and eyes. Wear suitable protective clothing.

Stabilized Gram Iodine: Harmful in contact with skin. Causes burns. Irritating to eyes, respiratory system and skin. Keep container tightly closed. Do not breathe gas / fumes / vapor / spray. Avoid contact with skin and eyes. Wear suitable protective clothing.

Gram Decolorizer: Irritating to eyes, respiratory system and skin. Keep container tightly closed and in a well ventilated place. Keep away from sources of ignition - No smoking. Do not breathe gas / fumes / vapor / spray. Avoid contact with skin and eyes.

Gram Safranin: Harmful by inhalation and if swallowed. Irritating to eyes, respiratory system and skin. Keep container tightly closed. Keep away from sources of ignition - No Smoking. Wear suitable protective clothing and gloves.

Gram Basic Fuchsin: May cause cancer. May cause heritable genetic damage. Irritating to eyes. Keep container tightly closed. Do not breathe dust. Avoid contact with skin and eyes. Wear suitable protective clothing.

In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

Gram Iodine 100X: Immediately remove all contaminated clothing.

After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

If inhaled, remove to fresh air. If not breathing, give artificial respiration. If breathing is difficult, give oxygen. Seek medical advice.

If swallowed seek medical advice immediately and show the container or label.

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:

- 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.
- 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.

			N° de réf.
Trousse Gram Stain		1	
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	212524
Gram Crystal Violet	Pour la coloration différentielle des bactéries.	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 1 x 3,8 L	212525 212526
Gram Iodine (stabilisé)	Pour la coloration des microorganismes par la méthode différentielle de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212542 212543
Gram Iodine (non stabilisé)	Pour la coloration des microorganismes par la méthode différentielle de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212529 212530
Gram Decolorizer	Pour la coloration des microorganismes par la méthode différentielle de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212527 212528
Gram Safranin	Pour la coloration des microorganismes par la méthode différentielle de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212531 212532
Gram Basic Fuchsin	Pour la coloration des microorganismes par la méthode différentielle de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212544 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,¹ 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

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

Avvertissements 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 Crystal Violet : Nocif par inhalation et par ingestion. Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau.

Possibilité d'effets irréversibles. Bien boucher le récipient. Eloigner des sources d'ignition. Interdit de fumer. Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/pulvérisations. Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

Gram Iodine 100X : Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Bien boucher le récipient. Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/pulvérisations. Eviter le contact avec la peau et les yeux. Porter un vêtement de protection adapté.

Stabilized Gram Iodine : Contact avec la peau dangereux. Provoque des brûlures. Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Bien boucher le récipient. Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/pulvérisations. Eviter le contact avec la peau et les yeux. Porter un vêtement de protection adapté.

Gram Decolorizer : Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Conserver le récipient hermétiquement fermé et dans un endroit bien ventilé. Eloigner des sources d'ignition. Interdit de fumer. Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/pulvérisations. Eviter le contact avec la peau et les yeux.

Gram Safranin : Nocif par inhalation et par ingestion. Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Bien boucher le récipient. Eloigner des sources d'ignition. Interdit de fumer. Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

Gram Basic Fuchsin : Peut provoquer le cancer. Peut entraîner des lésions génétiques héréditaires. Irritant pour les yeux. Bien boucher le récipient. Ne pas respirer les poussières. Eviter le contact avec la peau et les yeux. Porter un vêtement de protection adapté.

En cas de projection dans les yeux, laver immédiatement à grande eau et consulter un médecin.

Gram Iodine 100X : Retirer immédiatement tous les vêtements contaminés.

Après un contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau.

En cas d'inhalation, se retirer à l'air libre. Si la victime ne respire pas, pratiquer la respiration artificielle. Si la respiration est difficile, donner de l'oxygène. Consulter un médecin.

En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer le récipient ou l'étiquette.

Conservation : Stocker entre 15 et 25 °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, ensemenceur 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 artéfacts et les matières en arrière-plan peuvent également gêner l'interprétation. Une coloration de Gram positive avec précipité présente généralement des formes cocciformes irrégulières ou des asters ressemblant à des hyphes fongiques. »⁴

RESULTATS ATTENDUS ET CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES¹⁻⁴

Réaction	Avec Safranin de Gram	Avec Fuchsin 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.

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 1 x 3,8 L	212525 212526
Gram Iodine (stabilisiert)	Zur Färbung von Mikroorganismen nach der differentiellen Gram-Methode.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212542 212543
Gram Iodine (nicht stabilisiert)	Zur Färbung von Mikroorganismen nach der differentiellen Gram-Methode.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212529 212530
Gram Decolorizer	Zur Färbung von Mikroorganismen nach der differentiellen Gram-Methode.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212527 212528
Gram Safranin	Zur Färbung von Mikroorganismen nach der differentiellen Gram-Methode.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212531 212532
Gram Basic Fuchsin	Zur Färbung von Mikroorganismen nach der differentiellen Gram-Methode.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212544 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 Crystal Violet: Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken. Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut. Möglichkeit irreversibler Schäden. Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Gas/Rauch/Dämpfe/Spray nicht einatmen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Gram Iodine 100X: Giftig beim Einatmen, bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken. Behälter dicht geschlossen halten. Gas/Rauch/Dämpfe/Spray nicht einatmen. Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Stabilized Gram Iodine: Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut. Verursacht Verätzungen. Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut. Behälter dicht geschlossen halten. Gas/Rauch/Dämpfe/Spray nicht einatmen. Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Gram Decolorizer: Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut. Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Gas/Rauch/Dämpfe/Spray nicht einatmen. Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.

Gram Safranin: Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken. Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut. Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Gram Basic Fuchsin: Kann Krebs hervorrufen. Kann Schäden am Erbgut hervorrufen. Reizt die Augen. Behälter dicht geschlossen halten. Keinen Staub einatmen. Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

Gram Iodine 100X: Kontaminierte Kleidung sofort entfernen.

Falls es zu Hautkontakt kommt sofort mit reichlich Wasser abwaschen.

Bei Inhalation Betroffene(n) sofort an die frische Luft bringen. Bei fehlender Atmung künstlich beatmen. Bei Atembeschwerden Sauerstoff verabreichen. Arzt aufsuchen.

Bei Verschlucken sofort Arzt aufsuchen und Behälter oder Etikett vorzeigen.

Aufbewahrung: Nach Erhalt bei 15 – 30 °C lagern. Das Haltbarkeitsdatum gilt für ungeöffnete und sachgemäß gelagerte Flaschen. 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.

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

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes 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.

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

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

La procedura della colorazione di Gram² è la seguente.

Colorare uno striscio fissato con cristallio violetto.

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 cristallio violetto-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

Cristalvioioletto	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

*Compensata elo 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 Crystal Violet - Nocivo per inalazione e ingestione. Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. Possibilità di effetti irreversibili. Conservare il recipiente ben chiuso. Conservare lontano da fiamme e scintille — Non fumare. Non respirare i gas / fumi / vapori / aerosol. Usare indumenti protettivi e guanti adatti.

Gram Iodine 100X - Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione. Conservare il recipiente ben chiuso. Non respirare i gas / fumi / vapori / aerosol. Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Usare indumenti protettivi adatti.

Stabilized Gram Iodine - Nocivo a contatto con la pelle. Provoca ustioni. Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. Conservare il recipiente ben chiuso. Non respirare i gas / fumi / vapori / aerosol. Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Usare indumenti protettivi adatti.

Gram Decolorizer - Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato. Conservare lontano da fiamme e scintille — Non fumare. Non respirare i gas / fumi / vapori / aerosol. Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle.

Gram Safranin - Nocivo per inalazione e ingestione. Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. Conservare il recipiente ben chiuso. Conservare lontano da fiamme e scintille — Non fumare. Usare indumenti protettivi e guanti adatti.

Gram Basic Fuchsin - Può provocare il cancro. Può provocare alterazioni genetiche ereditarie. Irritante per gli occhi. Conservare il recipiente ben chiuso. Non respirare le polveri. Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Usare indumenti protettivi adatti.

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

Gram Iodine 100X - Togliere di dosso immediatamente gli indumenti contaminati.

In caso di contatto con la pelle, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua.

In caso di inalazione, esporre il soggetto ad aria fresca. In assenza di respirazione spontanea, praticare respirazione artificiale. In caso di respirazione difficile, somministrare ossigeno. Consultare un medico.

In caso di ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore e l'etichetta.

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.

		1	Nº de ref.
Gram Stain Kit			
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 Crystal Violet: Nocivo por inhalación y por ingestión. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Posibilidad de efectos irreversibles. Manténgase el recipiente bien cerrado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados.

Gram Iodine 100X: Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel. Manténgase el recipiente bien cerrado. No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Evítese el contacto con los ojos y la piel. Úsense indumentaria protectora adecuada.

Stabilized Gram Iodine: Nocivo en contacto con la piel. Provoca quemaduras. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Manténgase el recipiente bien cerrado. No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Evítese el contacto con los ojos y la piel. Úsense indumentaria protectora adecuada.

Gram Decolorizer: Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Manténgase el recipiente bien cerrado y en lugar bien ventilado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Evítese el contacto con los ojos y la piel.

Gram Safranin: Nocivo por inhalación y por ingestión. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Manténgase el recipiente bien cerrado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados.

Gram Basic Fuchsin: Puede causar cáncer. Puede causar alteraciones genéticas hereditarias. Irrita los ojos. Manténgase el recipiente bien cerrado. No respirar el polvo. Evítese el contacto con los ojos y la piel. Úsense indumentaria protectora adecuada.

En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

Gram Iodine 100X: Quítese inmediatamente la ropa manchada o salpicada.

En caso de contacto con la piel, lávense inmediata y abundantemente con agua.

Si se produce inhalación, salir al aire libre. Si se detiene la respiración, administre la reanimación cardiopulmonar. Si la respiración es dificultosa, administrar oxígeno. Acúdase a un médico.

En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstrele la etiqueta o el envase.

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 decolorar 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".


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.


 Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare / Производител / Producător / Üretici / Proizvođač


 Use by / Spotfebuigte do / Anvendes for / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Pouzíte do / Usar antes de / Använd före / Исполняйте до / A se utiliza până la / Son kullanna tarini / Uptrebiti do


YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /
ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) /
JJJ-MM-DD / JJJ-MM (MM = einde maand) /
AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp) /
VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) /
AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /
JJJ-MM-TT / JJJ-MM (MM = Monatsende) /
EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /
ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) /
AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /
MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mensesio pabaiga) /
ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) /
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) /
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiacu) /
aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /
ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden) /
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца) /
AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii) /
YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) /
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca)


 Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalógové číslo / Número de catálogo / Καταλογен номер / Număr de catalog / Katalog numerasi / Kataloški broj


 Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatusd esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierter EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autoriseret representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Reprezentante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Reprezentante autorizado en la Comunidad Europea / Autoriserad representant i EU / Оторизован представител в EU / Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană / Автура Топлулугу Yetkilii Temsilcisi / Ovlažščen predstavnik u Evropskoj zajednici

 In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnostikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietais / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik / Медицински уред за диагностика ин витро / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In Vitro Diagnostik Tibbi Cihaz / Medicinski uredaj za in vitro dijagnostiku

 Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturlimit / Temperaturpiirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Οριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrænsning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenje teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sataklik sinrlaması / Ograničenje temperature

 Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch kode (Lot) / Chargennummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kode (Serie) / Kod partii (serie) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti) / Код (Партида) / Număr lot (Lotul) / Parti Kodu (Lot) / Kod serije


 Contains sufficient for <n> tests / Dostatečné množství pro <n> testů / Indeholder tilstrækkeligt til <n> test / Voldoende voor <n> tests / KÜllaldane <n> testide jaoks / Sisältöön riittävä <n> testejä varten / Contenu suffisant pour <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα <n> εξετάσεις / <n> teszthez elegendő / Contenu sufficient per <n> test / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Innholder tilstrekkelig for <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Contêmo suficiente para <n> testes / Obsah vystačí na <n> testov / Contenido suficiente para <n> pruebas / Räckertill <n> antal tester / Съдържанието е достатъчно за <n> теста / Conține suficient pentru <n> teste / <n> testleri için yeterli miktarda içerir / Sadržaj dovoljan za <n> testova


 Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeada kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instrucções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen / Направление справка в инструкциите за употреба / Consultați instrucțiunile de utilizare / Kullanim Talimatları'na başvurun / Pogledajte uputstvo za upotrebu

CONTROL - Negative control / Negativní kontrola / Negativ kontrol / Negatieve controle / Negatiivne kontroll / Negatiivkontrolli / Contrôle négatif / Negative Kontrolle / Αρνητικός έλεγχος / Negativ kontroll / Controllo negativo / Neigiama kontrolė / Negativ kontroll / Kontrola ujemna / Controllo negativo / Negativna kontrola / Control negativo / Отрицателен контрол / Etalon negativ / Negatif kontrol / Negativna kontrola

CONTROL + Positive control / Pozitivní kontrola / Positiv kontrol / Positieve controle / Positivne kontroll / Positivkontrolli / Contrôle positif / Positive Kontrolle / Θετικός έλεγχος / Pozitiv kontroll / Controllo positivo / Teigiamo kontrolė / Positiv kontroll / Kontrola dodatnia / Controllo positivo / Pozitivna kontrola / Control positivo / Положителен контрол / Etalon pozitiv / Pozitif kontrol / Pozitivna kontrola



 Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA
800-638-8663

 BENEX Limited
Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
Shannon, County Clare, Ireland
Tel: 353-61-47-29-20
Fax: 353-61-47-25-46

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo and BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2008 BD.