

Crystal Violet/Ammonium Oxalate

IMPIEGO PREVISTO

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

INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST

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

PRINCIPIO DEL METODO

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

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

AVVERTENZE

Le colorazioni di Gram di PRO-LAB Diagnostics sono solo per uso diagnostico *in vitro* e non sono previste in alcun modo per uno scopo terapeutico o di profilassi.

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.

Il dispositivo non costituisce un rischio ambientale superiore a quelli costituiti dai campioni clinici usati con il dispositivo. È opportuno seguire appropriate misure di sicurezza nel maneggiare, processare ed eliminare tutti i campioni clinici, perché potrebbero essere presenti organismi patogeni. Esiste un impatto ambientale che può essere adeguatamente affrontato con un opportuno smaltimento.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

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

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE DELLE COLTURE

Fare riferimento ad un manuale di tecniche microbiologiche.

MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

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

PROTOCOLLO DEL TEST

1. Preparare uno striscio sottile ed uniforme di campione ed lasciare asciugare.
2. Fissare a calore e lasciare raffreddare.
3. Immergere il vetrino nel cristalvioletto o violetto di metile, attendere 1 minuto. Sciacquare.
4. Versare sul vetrino iodio di Gram o di Lugol, attendere 1 minuto. Sciacquare.
5. Decolorare delicatamente con differenziatore per circa 10 secondi. Sciacquare.
6. Versare sul vetrino colorazione di contrasto, attendere 30 - 60 secondi.
7. Risciacquare bene con acqua, asciugare delicatamente con blotter.

8. Visualizzare con microscopio ad immersione in olio.

CONTROLLO DI QUALITA'

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

Colture consigliate per il CQ:

Escherichia coli NCTC 10418 (Bacilli Gram-negativi da rosa a rosso)

Oxford *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 (Cocchi Gram-positivi da blu a porpora)

Streptococchi emolitici Gruppo A NCTC 8198 (Cocchi Gram-positivi da blu a porpora)

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Organismi Gram-positivi - da blu a porpora.

Organismi Gram-negativi - da rosa a rossi.

LIMITI DEL METODO

La presenza di detriti cellulari colorati con questa tecnica può determinare risultati Gram-negativi e Gram-positivi falsi. Es.: i nuclei e il protoplasma dei leucociti e delle cellule epiteliali sono colorati con colorazione di contrasto. Anche materiale particellare solido può essere colorato con cristal violetto.

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

BIBLIOGRAFIA

1. Manual of Clinical Microbiology, Fifth Edition. Lennette.

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

PRODUTTORE Prolab-Diagnostic, Canada

CONFEZIONE

Crystal violet/Ammonium Oxalate 1 L

CND W0104010804

