
USO PREVISTO

La colorazione di Gram di Sigma-Aldrich è idonea per la delineazione degli organismi Gram positivi e Gram negativi in pellicole e tessuto. I reagenti per la colorazione di Gram sono riservati al solo "uso diagnostico in vitro".

La colorazione di Gram è impiegata clinicamente per delineare due gruppi distinti di microrganismi: quelli che trattengono il colorante principale (violetto cristallizzato) sono definiti Gram positivi, mentre quelli che perdono il colorante principale nella fase di decolorazione sono definiti Gram negativi. Il meccanismo per cui gli organismi cosiddetti Gram positivi trattengono il colorante principale non è noto, tuttavia è probabile che la ragione sia da ricercare nella chimica e nella struttura delle pareti cellulari.

La metodica originale di Gram ha subito numerose modifiche nel corso del tempo. La procedura Sigma-Aldrich si ispira al lavoro di Hucker e Conn², in quanto utilizza una soluzione a base di violetto cristallizzato-ossalato di ammonio che favorisce la differenziazione ed è molto stabile.

REAGENTI

SOLUZIONE VIOLETTO CRISTALLIZZATO, n. di catalogo HT90-1

Violetto cristallizzato certificato 2,3%; ossalato di ammonio 0,1%; alcol etilico speciale denaturato con formula 3A 20%.

SOLUZIONE IODINA DI GRAM, n. di catalogo HT90-2

Iodina 0,33%; ioduro di potassio 0,66%.

SOLUZIONE DECOLORANTE, n. di catalogo HT90-3

Necessaria solo per le pellicole.

Alcol isopropilico 75%; acetone 25%.

SOLUZIONE SAFRANINA O, n. di catalogo HT90-4

Safranina certificata 0,6%; in alcol etilico speciale denaturato con formula 3A 20%.

SOLUZIONE TARTRAZINA, n. di catalogo HT30-2-8

Necessaria solo per le sezioni di tessuto.

Tartrazina 0,25%; acido acetico 0,25%.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare a temperatura ambiente (18–26°C). La data di scadenza è indicata sull'etichetta dei reagenti. Utilizzare una sola volta e scartare.

PREPARAZIONE

Tutti i reagenti sono forniti pronti per l'uso.

PRECAUZIONI

Seguire le normali precauzioni adottate per i reagenti di laboratorio. Smaltire i rifiuti in conformità alle normative vigenti a livello locale, regionale o nazionale. Fare riferimento al foglio dati relativo alla sicurezza dei materiali per informazioni aggiornate riguardanti i rischi, i pericoli e la sicurezza associati all'uso di questi prodotti.

I vetrini di controllo per colorazione Gram TISSUE - TROL contengono tessuti animali inclusi in paraffina con batteri gram-negativi e gram-positivi. Devono pertanto essere considerati come potenzialmente infetti.

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.S.A.)

La soluzione di violetto cristallizzato è **COMBUSTIBILE** e **IRRITANTE**. Irritante per il sistema respiratorio e la cute. Rischio di gravi lesioni oculari. Prove insufficienti di effetti cancerogeni. Nociva per gli organismi acquatici. A lungo termine, può provocare effetti negativi per l'ambiente acquatico. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. Non disperdere nell'ambiente. Consultare le istruzioni speciali o le schede di sicurezza.

Soluzione iodina di Gram. Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

La soluzione decolorante è **INFIAMMABILE** e **IRRITANTE**. Facilmente infiammabile. Irritante per il sistema respiratorio e la cute. Rischio di gravi lesioni oculari. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei. Conservare il contenitore ben chiuso e in un ambiente adeguatamente ventilato.

La soluzione di safranina O è **INFIAMMABILE** e **NOCIVA**. Nociva per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Nociva: possibile rischio di effetti irreversibili per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile).

L'alcol anidro è **INFIAMMABILE** e **IRRITANTE**. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Mantenere i contenitori ben chiusi. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei. Organi colpiti: nervi e fegato.

Lo xilene è **INFIAMMABILE** e **NOCIVO**. Possibile rischio di riduzione della fertilità. Può provocare danni al feto. Nocivo per inalazione e a contatto con la cute. Irritante per il sistema respiratorio e la cute. Rischio di gravi lesioni oculari. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante

acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile).

L'acetone è **INFIAMMABILE** e **IRRITANTE**. Irritante per gli occhi. L'esposizione ripetuta può provocare cute secca e screpolata. L'inalazione dei vapori può indurre sonnolenza e vertigini. Conservare il contenitore in un ambiente adeguatamente ventilato. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Organi colpiti: fegato e reni.

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.E.) – Attenzione: sostanze non ancora pienamente testate!

La soluzione di violetto cristallizzato è **NOCIVA**. Infiammabile. Prove insufficienti di effetti cancerogeni. Nociva per gli organismi acquatici. A lungo termine, può provocare effetti negativi per l'ambiente acquatico. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi. Non disperdere nell'ambiente. Consultare le istruzioni speciali o le schede di sicurezza.

Soluzione iodina di Gram. Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

La soluzione decolorante è **INFIAMMABILE** e **IRRITANTE**. Facilmente infiammabile. Irritante per il sistema respiratorio e la cute. Rischio di gravi lesioni oculari. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei.

La soluzione di safranina O è **INFIAMMABILE**. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare.

L'alcol anidro è **FACILMENTE INFIAMMABILE** e **IRRITANTE**. Facilmente infiammabile. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Mantenere i contenitori ben chiusi. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei.

Lo xilene è **NOCIVO**. Infiammabile. Nocivo per inalazione e a contatto con la cute. Irritante per la cute. Evitare il contatto con gli occhi.

L'acetone è **FACILMENTE INFIAMMABILE** e **IRRITANTE**. Facilmente infiammabile. Irritante per gli occhi. L'esposizione ripetuta può provocare cute secca e screpolata. L'inalazione dei vapori può indurre sonnolenza e vertigini. Conservare il contenitore in un ambiente adeguatamente ventilato. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico.

PROCEDURA

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Per la raccolta dei campioni, attenersi alla procedura descritta nel documento NCCLS numero M29-A2. Nessun metodo di analisi noto garantisce con assoluta certezza che i campioni di sangue o il tessuto non trasmettano infezioni. Di conseguenza tutti i derivati del sangue e i campioni di tessuto devono essere considerati potenziali veicoli di infezioni.

Pellicole: è possibile utilizzare pellicole preparate e fissate al calore. Lo spessore della pellicola determina il tempo necessario per la decolorazione.

Tessuto: è possibile utilizzare sezioni di tessuto fissate e sparaffinate, tagliate a 5 micron.

MATERIALI SPECIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Includere vetrini di controllo positivi in ogni seduta

ALCOL ASSOLUTO

ACETONE GRADO ACS

XILENE

Microscopio

NOTE

Fare attenzione a non decolorare eccessivamente i vetrini con la soluzione decolorante. Se la soluzione decolorante viene lasciata agire sui vetrini troppo a lungo, anche gli organismi Gram positivi perdono colore e diventano rossi.*

I dati generati da questa procedura sono da utilizzarsi soltanto a sostegno della diagnosi e devono essere valutati congiuntamente ad altri esami e dati diagnostici.

PROCEDURA

PROCEDURA PER PELLICOLE

1. Inondare la pellicola con la soluzione di violetto cristallizzato (n. di catalogo HT90-1) per **1 minuto**.
2. Sciacquare accuratamente in acqua deionizzata.
3. Inondare la pellicola con la soluzione iodina di Gram (n. di catalogo HT90-2) per **1 minuto**.
4. Sciacquare accuratamente in acqua deionizzata.
5. Inondare la pellicola con la soluzione decolorante (n. di catalogo HT90-3) per un massimo di **10 secondi**, fino al momento in cui il colore smette di scorrere.
6. Sciacquare accuratamente in acqua deionizzata.
7. Inondare la pellicola con la soluzione safranina O (n. di catalogo HT90-4) per **1 minuto**.
8. Sciacquare accuratamente in acqua deionizzata.
9. Asciugare la pellicola all'aria ed esaminarla al microscopio.

PROCEDURA PER LE SEZIONI DI TESSUTO*

1. Deparaffinare le sezioni e idratare in acqua deionizzata.
2. Collocare i vetrini sul rack per la colorazione, quindi coprire le sezioni di tessuto con la soluzione violetto cristallizzato (n. di catalogo HT90-1) per **1 minuto**.
3. Eluire la soluzione di violetto cristallizzato e sciacquare accuratamente in acqua deionizzata.

4. Mordenzare nella soluzione iodina di Gram (n. di catalogo HT90-2) per **5 minuti**.
5. Sciacquare in acqua deionizzata e asciugare le sezioni.
6. Differenziare in alcol assoluto o acetone.
7. Sciacquare in acqua deionizzata.
8. Coprire i vetrini con la soluzione di safranina O (n. di catalogo HT90-4) per **30-60 secondi**.
9. Sciacquare in acqua deionizzata e asciugare le sezioni.
10. Coprire le sezioni con la soluzione di tartrazina (n. di catalogo HT30-2) per **5-10 secondi**.
11. Scartare il colorante in eccesso.
12. Sciacquare in 2 ricambi di alcol assoluto.
13. Chiarificare in xilene e montare.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Organismi Gram positivi – Viola

Organismi Gram negativi – Rosso

Se i risultati osservati si discostano dai risultati attesi, contattare l'assistenza tecnica Sigma-Aldrich per informazioni di supporto.

BIBLIOGRAFIA

1. Gram C: Ueber die isolierte färbung der schizomyceten in schnitt und trockenpräparaten. Fortschr Med 2:185, 1884
2. Hucker GJ, Conn HJ: Further studies on the methods of Gram staining. NY Agric Exp Stn Tech Bull No. 128, 1927
3. Histopathological Technic and Practical Histochemistry, 3rd ed., RD Lillie, Editor. McGraw-Hill, New York, 1965, pp 565-567
4. Theory and Practice of Histotechnology, 2nd Edition, Sheehan DC and Hrapchak BB, Battelle Press, Columbus (OH), 1980 p 234

Sigma-Aldrich, Inc. garantisce che i propri prodotti sono conformi alle informazioni contenute nel presente documento e in altre pubblicazioni Sigma-Aldrich. Spetta all'acquirente stabilire se i prodotti sono idonei all'uso particolare che ne viene fatto. È possibile che sussistano ulteriori termini e condizioni. Vedere il retro della fattura o la distinta di imballaggio per i termini e le condizioni di vendita.

Procedura n. HT90
Revisione precedente: 2003-09
Revisione: 2005-01



EC REP

AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham TW20 9BD (Regno Unito)

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (USA) +1 314 771 5765
Assistenza tecnica: a carico del destinatario +1 314 771 3122
o tramite e-mail all'indirizzo clintech@sial.com
Per ordinare: a carico del destinatario +1 314 771 5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim (Germania) 49-7329-970