

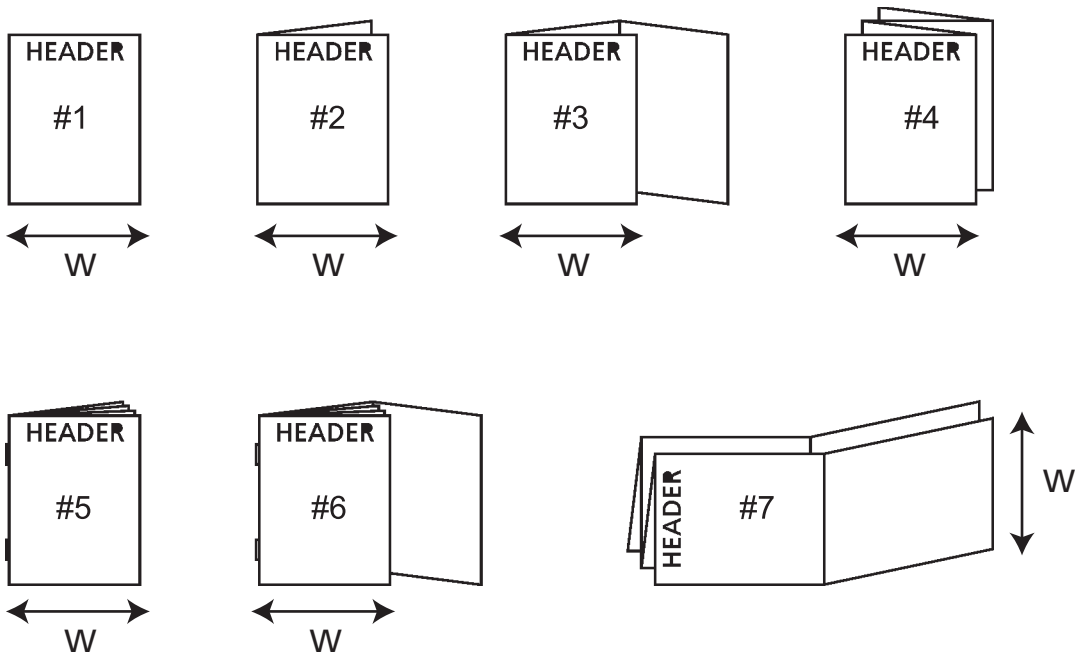
Revisions

BALTSO0191 Version 11.0 Template 4
Inserts

Rev from	Rev to	JOB #
06	07	52-17

Notes:

1. BD Catalog Number: 212525, 212526, 212527, 212528, 212531, 212532, 212539, 212542, 212543, 212544, 212545
2. Blank (Sheet) Size: Length: 25.5" Width: 22"
3. Number of Pages: 28 Number of Sheets: 1
4. Page Size: Length: 8.5" Width: 5.5" Final Folded Size: 4.25" x 5.5"
5. Ink Colors: No. of Colors: 2 PMS#: 032 Red; Standard Black
6. Printed two sides: Yes No
7. Style (see illustrations below): # 5



8. Vendor Printed Online/In House Printed Web
9. See specification control no. N/A for material information.
10. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level.

Label Design REVISED BY By Sonia Thompson at 4:48 pm, Oct 20, 2017	COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION.	BD Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA
Proofer PROOFING APPROVED BY By Natalie Morio at 1:29 pm, Oct 26, 2017		
Checked By THIRD EYE BY By Nichole Graham at 2:03 pm, Nov 29, 2017	Category and Description <div style="text-align: center;">Package Insert, Gram Stain Kits and Reagents</div>	
Part Number: <div style="text-align: center; font-weight: bold;">8820191JAA</div>	Sheet: 1 of 29 <hr/> Scale: N/A	A

BD Gram Stain Kits and Reagents

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

R_x Only



8820191JAA(07)
2017-09

Contact your local BD representative for instructions. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Pokyny vám poskytne místní zástupce společnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Die Packungsbeilage erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung. / Póngase en contacto con su representante local de BD para instrucciones. / Contacter le représentant local de BD pour les instructions. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Ota yhteys lähimpään BD:n edustajaan ohjeiden saamiseksi. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőtől. / Rivolgarsi al rappresentante BD di zona per istruzioni. / Нусқаулар үшін жериникті BD өкілімен хабарласыңыз. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Neem contact op met uw plaatselijke BD-vertegenwoordiger voor instructies. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielem BD. / Contacte o reprezentante local da BD para instruções. / Pentru instrucțiuni, contactați reprezentantul local BD. / Для получения указаний обратитесь к местному представителю компании BD. / Instrukcie ziskate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Kontakta närmaste BD-representant för anvisningar. / Talimatlar için yerel BD temsilcinizle temasa geçin. / За інструкціями зверніться до місцевого представника компанії BD.

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

INTENDED USE

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

SUMMARY AND EXPLANATION

The Gram stain was devised in 1884 by Christian Gram in an attempt to differentiate bacterial cells from infected tissue. Although Gram observed what is now called the “Gram reaction,” he did not recognize the taxonomic value of his technique. The Gram stain is now used to differentiate intact, morphologically similar bacteria into two groups based on cell color after staining. In addition, cell form, size and structural details are evident. Such preliminary information provides important clues to the type of organism(s) present and the further techniques required to characterize them.

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

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The Gram stain procedure² consists of:

Staining a fixed smear with crystal violet.

Applying iodine as a mordant.

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

A crystal violet-iodine complex forms in the protoplast (not the cell wall) of all organisms stained by this procedure. Organisms able to retain this dye complex after decolorization are classified as gram-positive while those that can be decolorized and counterstained are classified as gram-negative.

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

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

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

REAGENTS

Approximate Formula* Per Liter

Gram Crystal Violet

PRIMARY STAIN

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

Gram Iodine

MORDANT

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

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

Stabilized Gram Iodine

MORDANT

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

Gram Decolorizer

DECOLORIZER

Acetone.....	250.0 mL
Isopropanol.....	750.0 mL

Gram Safranin

COUNTERSTAIN

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

Gram Basic Fuchsin

COUNTERSTAIN

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

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

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

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

BD BBL Gram Crystal Violet (212525, 212526)

Warning



H332 Harmful if inhaled. **H351** Suspected of causing cancer. **H402** Harmful to aquatic life. **H412** Harmful to aquatic life with long lasting effects.

P201 Obtain special instructions before use. **P202** Do not handle until all safety precautions have been read and understood.

P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapors/spray. **P271** Use only outdoors or in a well-ventilated area. **P273** Avoid release to the environment. **P280** Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. **P304+P340** IF

INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. **P308+P313** IF exposed or concerned: Get

medical advice/attention. **P312** Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell. **P405** Store locked up.

P501 Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

BD BBL Gram Decolorizer (212527, 212528)

Danger



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

P210 Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking. **P240** Ground/bond

container and receiving equipment. **P241** Use explosion-proof electrical/ventilating/lighting/...equipment. **P242** Use only non-

sparkling tools. **P243** Take precautionary measures against static discharge. **P261** Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapors/

spray. **P264** Wash thoroughly after handling. **P271** Use only outdoors or in a well-ventilated area. **P280** Wear protective gloves/

protective clothing/eye protection/face protection. **P303+P361+P353** IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated

clothing. Rinse skin with water/shower. **P304+P340** IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.

P305+P351 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. **P312** Call a POISON CENTER or doctor/physician if

you feel unwell. **P337+P313** If eye irritation persists: Get medical advice/attention. **P338** Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. **P370+P378** In case of fire: Use for extinction: CO₂, powder or water spray. **P403+P233** Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed. **P403+P235** Store in a well-ventilated place. Keep cool. **P405** Store locked up. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

BD BBL Gram Safranin (212531, 212532)

Warning



H226 Flammable liquid and vapor.

P210 Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking. **P241** Use explosion-proof electrical/ventilating/lighting/.../equipment. **P280** Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. **P240** Ground/bond container and receiving equipment. **P233** Keep container tightly closed. **P242** Use only non-sparking tools. **P243** Take precautionary measures against static discharge. **P303+P361+P353** IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower. **P370+P378** In case of fire: Use for extinction: CO₂, powder or water spray. **P403+P235** Store in a well-ventilated place. Keep cool. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

BD BBL Gram Stain Kit (212539)

Danger



H225 Highly flammable liquid and vapor. **H226** Flammable liquid and vapor. **H315** Causes skin irritation. **H319** Causes serious eye irritation. **H332** Harmful if inhaled. **H336** May cause drowsiness or dizziness. **H351** Suspected of causing cancer. **H401** Toxic to aquatic life. **H402** Harmful to aquatic life. **H412** Harmful to aquatic life with long lasting effects.

P201 Obtain special instructions before use. **P202** Do not handle until all safety precautions have been read and understood. **P210** Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking. **P233** Keep container tightly closed. **P240** Ground/bond container and receiving equipment. **P241** Use explosion-proof electrical/ventilating/lighting/.../equipment. **P242** Use only non-sparking tools. **P243** Take precautionary measures against static discharge. **P261** Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapors/spray. **P264** Wash thoroughly after handling. **P271** Use only outdoors or in a well-ventilated area. **P273** Avoid release to the environment. **P280** Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. **P302+P352** IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. **P303+P361+P353** IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower. **P304+P340** IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. **P305+P351+P338** IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. **P308+P313** IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. **P312** Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell. **P321** Specific treatment (see on this label). **P332+P313** If skin irritation occurs: Get medical advice/attention. **P337+P313** If eye irritation persists: Get medical advice/attention. **P362+P364** Take off contaminated clothing and wash it before reuse. **P370+P378** In case of fire: Use for extinction: CO₂, powder or water spray. **P403+P233** Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed. **P403+P235** Store in a well-ventilated place. Keep cool. **P405** Store locked up. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

BD BBL Gram Iodine (Stabilized) (212542, 212543)

Warning



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

P264 Wash thoroughly after handling. **P280** Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. **P305+P351+P338** IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. **P321** Specific treatment (see on this label). **P332+P313** If skin irritation occurs: Get medical advice/attention. **P337+P313** If eye irritation persists: Get medical advice/attention. **P350** Gently wash with plenty of soap and water. **P362+P364** Take off contaminated clothing and wash it before reuse. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

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

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

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

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

Allow the smear to air dry.

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

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

PROCEDURE

Reagent Preparation

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

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

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

Test Procedure:

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

User Quality Control

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

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

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

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

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

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

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

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

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

EXPECTED RESULTS AND PERFORMANCE CHARACTERISTICS¹⁻⁴

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

REFERENCES

1. Magee, C.M., G. Rodenheaver, M.T. Edgerton, and R.F. Edlich. 1975. A more reliable Gram staining technique for diagnosis of surgical infections. *Am. J. Surg.* 130:341–346.
2. Kruczak-Filipov, P., and R.G. Shively. 1994. Gram stain procedures, p. 1.5.1–1.5.18. In H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Mangels, J.I., M.E. Cox, and L.H. Lindley. 1984. Methanol fixation. An alternative to heat-fixation of smear. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2:129–137.
4. Chapin, K. 1995. Clinical microscopy, p. 33-51, In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Technical Information: In the United States contact BD Technical Service and Support at 1.800.638.8663 or www.bd.com.

BD Troussets et réactifs Gram Stain

Français

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

APPLICATION

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

RESUME ET EXPLICATION

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

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

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

L-polyvinylpyrrolidone-iodé.

PRINCIPES DE LA METHODE

La méthode de coloration de Gram² comprend les étapes suivantes :

Coloration d'un frottis fixé au cristal violet.

Application d'une solution iodée servant de mordant.

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

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

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

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

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

REACTIFS

Formule approximative* par litre

Gram Crystal Violet

COLORANT PRIMAIRE

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

Gram Iodine

MORDANT

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

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

Stabilized Gram Iodine

MORDANT

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

Gram Decolorizer

DECOLORANT

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

Gram Safranin

CONTRE-COLORANT

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

Gram Basic Fuchsin

CONTRE-COLORANT

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

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

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

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

BD BBL Gram Crystal Violet (212525, 212526)

Attention



H332 Nocif par inhalation. **H351** Susceptible de provoquer le cancer. **H402** Nocif pour les organismes aquatiques. **H412** Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P201 Se procurer les instructions avant utilisation. **P202** Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. **P261** Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. **P271** Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé. **P273** Éviter le rejet dans l'environnement. **P280** Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. **P304+P340** EN CAS D'INHALATION: transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. **P308+P313** EN CAS D'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin. **P312** Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. **P405** Garder sous clef. **P501** Éliminer le contenu/réceptier conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

BD BBL Gram Decolorizer (212527, 212528)

Danger



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

P210 Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'inflammation. Ne pas fumer. **P240** Mise à la terre/liaison équipotentielle du récipient et du matériel de réception. **P241** Utiliser du matériel électrique/de ventilation/d'éclairage/.../antidéflagrant. **P242** Ne pas utiliser d'outils produisant des étincelles. **P243** Prendre des mesures de précaution contre les décharges électrostatiques. **P261** Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. **P264** Se laver soigneusement après manipulation. **P271** Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé. **P280** Porter des gants de protection/des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/du visage. **P303+P361+P353** EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/Se doucher. **P304+P340** EN CAS D'INHALATION: transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. **P305+P351** EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. **P312** Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. **P337+P313** Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. **P338** Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. **P370+P378** En cas d'incendie: pour l'extinction, utiliser un extincteur à CO₂, à poudre ou à eau. **P403+P233** Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche. **P403+P235** Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais. **P405** Garder sous clef. **P501** Éliminer le contenu/réceptier conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

BD BBL Gram Safranin (212531, 212532)

Attention



H226 Liquide et vapeurs inflammables.

P210 Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'inflammation. Ne pas fumer. **P241** Utiliser du matériel électrique/de ventilation/d'éclairage/.../antidéflagrant. **P280** Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. **P240** Mise à la terre/liaison équipotentielle du récipient et du matériel de réception. **P233** Maintenir le récipient fermé de manière étanche. **P242** Ne pas utiliser d'outils produisant des étincelles. **P243** Prendre des mesures de précaution contre les décharges électrostatiques. **P303+P361+P353** EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/Se doucher. **P370+P378** En cas d'incendie: pour l'extinction, utiliser un extincteur à CO₂, à poudre ou à eau. **P403+P235** Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais. **P501** Éliminer le contenu/réceptier conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

BD BBL Gram Stain Kit (212539)

Danger



H225 Liquide et vapeurs très inflammables. **H226** Liquide et vapeurs inflammables. **H315** Provoque une irritation cutanée. **H319** Provoque une sévère irritation des yeux. **H332** Nocif par inhalation. **H336** Peut provoquer somnolence ou vertiges. **H351** Susceptible de provoquer le cancer. **H401** Toxique pour les organismes aquatiques. **H402** Nocif pour les organismes aquatiques. **H412** Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P201 Se procurer les instructions avant utilisation. **P202** Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. **P210** Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'inflammation. Ne pas fumer. **P233** Maintenir le récipient fermé de manière étanche. **P240** Mise à la terre/liaison équipotentielle du récipient et du matériel de réception. **P241** Utiliser du matériel électrique/de ventilation/d'éclairage/.../ antidéflagrant. **P242** Ne pas utiliser d'outils produisant des étincelles. **P243** Prendre des mesures de précaution contre les décharges électrostatiques. **P261** Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. **P264** Se laver soigneusement après manipulation. **P271** Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé. **P273** Éviter le rejet dans l'environnement. **P280** Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. **P302+P352** EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment à l'eau et au savon. **P303+P361+P353** EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/Se doucher. **P304+P340** EN CAS D'INHALATION: transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. **P305+P351+P338** EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. **P308+P313** EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin. **P312** Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. **P321** Traitement spécifique (voir l'étiquette). **P332+P313** En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin. **P337+P313** Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. **P362+P364** Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. **P370+P378** En cas d'incendie: pour l'extinction, utiliser un extincteur à CO₂, à poudre ou à eau. **P403+P233** Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche. **P403+P235** Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais. **P405** Garder sous clef. **P501** Éliminer le contenu/récipient conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

BD BBL Gram Iodine (Solution iodée stabilisée de Gram) (212542, 212543)

Attention



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

P264 Se laver soigneusement après manipulation. **P280** Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. **P305+P351+P338** EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. **P321** Traitement spécifique (voir l'étiquette). **P332+P313** En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin. **P337+P313** Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. **P350** Laver avec précaution et abondamment à l'eau et au savon. **P362+P364** Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. **P501** Éliminer le contenu/récipient conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

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

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

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

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

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

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

1. Fixer à la chaleur en passant la lame 2 à 3 fois à flamme faible. Laisser refroidir la lame à température ambiante avant la coloration.

REMARQUE : Ne pas surchauffer la lame ; un chauffage excessif entraîne une coloration atypique.

2. Fixer la lame au méthanol en recouvrant au méthanol absolu pendant 1 à 2 min et rincer à l'eau courante avant la coloration.³

REMARQUE : Pour une fixation adéquate, conserver le méthanol absolu dans une bouteille brune à capuchon à vis et renouveler la solution d'analyse toutes les deux semaines.

METHODE

Préparation des réactifs

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

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

Matériaux requis mais non fournis : Lames de microscope, bec bunsen ou méthanol, ensemencement 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 et la réglementation CLIA correspondantes pour plus d'informations sur les modalités du contrôle de qualité.

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

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

LIMITATIONS DE LA METHODE

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

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

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

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

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

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

RESULTATS ATTENDUS ET CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES¹⁻⁴

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

REFERENCES : voir la rubrique « References » du texte anglais

Service et assistance technique : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site www.bd.com.

		1	Best.-Nr.
Gram Stain Kit			212539
Gram Crystal Violet	Zur Differentialfärbung von Bakterien.	1 x 250 mL	
Gram Iodine (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 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

Stabilisiert 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.

BD BBL Gram Crystal Violet (212525, 212526)

Achtung



H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen. **H351** Kann vermutlich Krebs erzeugen. **H402** Schädlich für Wasserorganismen. **H412** Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. **P202** Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. **P261** Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. **P271** Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden. **P273** Freisetzung in die Umwelt vermeiden. **P280** Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. **P304+P340** BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. **P308+P313** BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. **P312** Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. **P405** Unter Verschluss aufbewahren. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

BD BBL Gram Decolorizer (212527, 212528)

Gefahr



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

P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen. **P240** Behälter und zu befüllende Anlage erden. **P241** Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel/Lüftungsanlagen/Beleuchtung/... verwenden. **P242** Nur funkenfreies Werkzeug verwenden. **P243** Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen. **P261** Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. **P264** Nach Gebrauch gründlich waschen. **P271** Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden. **P280** Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. **P303+P361+P353** BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. **P304+P340** BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. **P305+P351** BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. **P312** Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. **P337+P313** Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. **P338** Eventuell Vorhandene

Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. **P370+P378** Im Brandfall: Löschen mit CO₂, Pulver oder Sprühwasser. **P403+P233** Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren. **P403+P235** Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren. **P405** Unter Verschluss aufbewahren. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

BD BBL Gram Safranin (212531, 212532)

Achtung



H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.

P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen. **P241** Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel/Lüftungsanlagen/Beleuchtung/... verwenden. **P280** Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. **P240** Behälter und zu befüllende Anlage erden. **P233** Behälter dicht verschlossen halten. **P242** Nur funkenfreies Werkzeug verwenden. **P243** Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen. **P303+P361+P353** BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. **P370+P378** Im Brandfall: Löschen mit CO₂, Pulver oder Sprühwasser. **P403+P235** Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

BD BBL Gram Stain Kit (212539)

Gefahr



H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. **H226** Flüssigkeit und Dampf entzündbar. **H315** Verursacht Hautreizungen. **H319** Verursacht schwere Augenreizung. **H332** Gesundheitsschädlich bei Einatmen. **H336** Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. **H351** Kann vermutlich Krebs erzeugen. **H401** Giftig für Wasserorganismen. **H402** Schädlich für Wasserorganismen. **H412** Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. **P202** Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. **P210** Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen. **P233** Behälter dicht verschlossen halten. **P240** Behälter und zu befüllende Anlage erden. **P241** Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel/Lüftungsanlagen/Beleuchtung/... verwenden. **P242** Nur funkenfreies Werkzeug verwenden. **P243** Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen. **P261** Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. **P264** Nach Gebrauch gründlich waschen. **P271** Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden. **P273** Freisetzung in die Umwelt vermeiden. **P280** Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. **P302+P352** BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. **P303+P361+P353** BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. **P304+P340** BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. **P305+P351+P338** BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. **P308+P313** BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. **P312** Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. **P321** Besondere Behandlung (siehe auf diesem Kennzeichnungsetikett). **P332+P313** Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. **P337+P313** Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. **P362+P364** Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. **P370+P378** Im Brandfall: Löschen mit CO₂, Pulver oder Sprühwasser. **P403+P233** Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren. **P403+P235** Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren. **P405** Unter Verschluss aufbewahren. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

BD BBL Gram Iodine (Stabilisierte Gram-Jodlösung) (212542, 212543)

Achtung



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

P264 Nach Gebrauch gründlich waschen. **P280** Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. **P305+P351+P338** BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.

Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. **P321** Besondere Behandlung (siehe auf diesem Kennzeichnungsetikett). **P332+P313** Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. **P337+P313** Bei

anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. **P350** Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen. **P362+P364** Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

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

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

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

PROBENGEWINNUNG UND PRÄPARATION

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

Abstrich an der Luft trocknen lassen.

Abstrich mit einer der folgenden Techniken auf dem Objektträger fixieren:

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

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

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

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

VERFAHREN

Vorbereitung der Reagenzien:

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

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

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

Testverfahren:

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

Qualitätskontrolle durch den Anwender

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

Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung in Verbindung oder besuchen Sie www.bd.com.

BD Gram Stain Kits e reagenti

Italiano

		1	N. de cat.
Gram Stain Kit			212539
Gram Crystal Violet	Per la colorazione differenziale di batteri	1 x 250 mL	
Gram Iodine (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 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 cristialvioletto.

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 cristialvioletto-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

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

Gram Iodine

MORDENTE

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

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

Stabilized Gram Iodine

MORDENTE

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

Gram Decolorizer

DECOLORANTE

Acetone	250,0 mL
Isopropanolo	750,0 mL

Gram Safranin

CONTROCOLORAZIONE

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

Gram Basic Fuchsin

CONTROCOLORAZIONE

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

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

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

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

BD BBL Gram Crystal Violet (212525, 212526)

Attenzione



H332 Nocivo se inalato. **H351** Sospettato di provocare il cancro. **H402** Nocivo per gli organismi acquatici. **H412** Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. **P202** Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze. **P261** Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. **P271** Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato. **P273** Non disperdere nell'ambiente. **P280** Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. **P304+P340** IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. **P308+P313** IN CASO DI esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. **P312** In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. **P405** Conservare sotto chiave. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

BD BBL Gram Decolorizer (212527, 212528)

Pericolo



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

P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare. **P240** Mettere a terra/massa il contenitore e il dispositivo ricevente. **P241** Utilizzare impianti elettrici/di ventilazione/d'illuminazione/.../a prova di esplosione. **P242** Utilizzare solo utensili antiscintillamento. **P243** Prendere precauzioni contro le scariche elettrostatiche. **P261** Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. **P264** Lavarsi accuratamente dopo l'uso. **P271** Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato. **P280** Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. **P303+P361+P353** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia. **P304+P340** IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. **P305+P351** IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. **P312** In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. **P337+P313** Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. **P338** Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. **P370+P378** In caso d'incendio: estinguere con CO₂, polvere o acqua nebulizzata. **P403+P233** Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato. **P403+P235** Conservare in luogo fresco e ben ventilato. **P405** Conservare sotto chiave. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

BD BBL Gram Safranin (212531, 212532)

Attenzione



H226 Liquido e vapori infiammabili.

P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare. **P241** Utilizzare impianti elettrici/di ventilazione/d'illuminazione/.../a prova di esplosione. **P280** Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. **P240** Mettere a terra/massa il contenitore e il dispositivo ricevente. **P233** Tenere il recipiente ben chiuso. **P242** Utilizzare solo utensili antiscintillamento. **P243** Prendere precauzioni contro le scariche elettrostatiche. **P303+P361+P353** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia. **P370+P378** In caso d'incendio: estinguere con CO₂, polvere o acqua nebulizzata. **P403+P235** Conservare in luogo fresco e ben ventilato. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

BD BBL Gram Stain Kit (212539)

Pericolo



H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. **H226** Liquido e vapori infiammabili. **H315** Provoca irritazione cutanea. **H319** Provoca grave irritazione oculare. **H332** Nocivo se inalato. **H336** Può provocare sonnolenza o vertigini. **H351** Sospettato di provocare il cancro. **H401** Tossico per gli organismi acquatici. **H402** Nocivo per gli organismi acquatici. **H412** Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. **P202** Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze. **P210** Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare. **P233** Tenere il recipiente ben chiuso. **P240** Mettere a terra/massa il contenitore e il dispositivo ricevente. **P241** Utilizzare impianti elettrici/di ventilazione/d'illuminazione/.../a prova di esplosione. **P242** Utilizzare solo utensili antiscintillamento. **P243** Prendere precauzioni contro le scariche elettrostatiche. **P261** Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. **P264** Lavarsi accuratamente dopo l'uso. **P271** Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato. **P273** Non disperdere nell'ambiente. **P280** Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. **P302+P352** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone. **P303+P361+P353** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia. **P304+P340** IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. **P305+P351+P338** IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. **P308+P313** IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. **P312** In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. **P321** Trattamento specifico (vedere l'etichetta). **P332+P313** In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. **P337+P313** Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. **P362+P364** Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. **P370+P378** In caso d'incendio: estinguere con CO₂, polvere o acqua nebulizzata. **P403+P233** Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato. **P403+P235** Conservare in luogo fresco e ben ventilato. **P405** Conservare sotto chiave. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

BD BBL Gram Iodine (Gram iodina stabilizzata) (212542, 212543)

Attenzione



H315 Provoca irritazione cutanea. **H319** Provoca grave irritazione oculare. **H401** Tossico per gli organismi acquatici.

P264 Lavarsi accuratamente dopo l'uso. **P280** Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. **P305+P351+P338** IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. **P321** Trattamento specifico (vedere l'etichetta). **P332+P313** In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. **P337+P313** Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. **P350** Lavare delicatamente e abbondantemente con acqua e sapone. **P362+P364** Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

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

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

Deterioramento del prodotto - Allorché ricostituita, la soluzione Gram Iodine non stabilizzata può provocare una certa variabilità nella colorazione di Gram, quando lo iodio non è più sufficiente per la soluzione. Proteggere la soluzione di iodio dall'esposizione eccessiva ad aria, luce e calore, per garantire 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 tradizione 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 e le norme CLIA in materia.

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

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

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

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

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

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

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

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

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

RISULTATI ATTESI E PERFORMANCE¹⁻⁴

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

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

Assistenza e supporto tecnico: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito www.bd.com.

BD Gram Stain Kits y reactivos

Español

Gram Stain Kit		1	Nº de ref.
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 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 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 ulteriores 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 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 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

Gram Basic Fuchsin

CONTRACOLORANTE

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

Stabilized Gram Iodine

MORDIENTE

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

*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.

BD BBL Gram Crystal Violet (212525, 212526)

Atención



H332 Nocivo en caso de inhalación. **H351** Se sospecha que provoca cáncer. **H402** Nocivo para los organismos acuáticos. **H412** Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P201 Pedir instrucciones especiales antes del uso. **P202** No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. **P261** Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P271 Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado. **P273** Evitar su liberación al medio ambiente.

P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. **P304+P340** EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. **P308+P313** EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. **P312** Llamar a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico en caso de malestar. **P405** Guardar bajo llave. **P501** Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con las normativas locales, regionales, nacionales e internacionales.

BD BBL Gram Decolorizer (212527, 212528)

Peligro



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

P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. **P240** Conectar a tierra/enlace equipotencial del recipiente y del equipo de recepción. **P241** Utilizar un material eléctrico, de ventilación o de iluminación/.../antideflagrante. **P242** Utilizar únicamente herramientas que no

produzcan chispas. **P243** Tomar medidas de precaución contra descargas electrostáticas. **P261** Evitar respirar el polvo/ el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. **P264** Lavarse concienzudamente tras la manipulación. **P271** Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado. **P280** Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. **P303+P361+P353** EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ducharse. **P304+P340** EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. **P305+P351** EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. **P312** Llamar a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico en caso de malestar. **P337+P313** Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. **P338** Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. **P370+P378** En caso de incendio: para la extinción utilizar CO₂, polvo o agua pulverizada. **P403+P233** Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente cerrado herméticamente. **P403+P235** Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco. **P405** Guardar bajo llave. **P501** Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con las normativas locales, regionales, nacionales e internacionales.

BD BBL Gram Safranin (212531, 212532)

Atención



H226 Líquidos y vapores inflamables.

P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. **P241** Utilizar un material eléctrico, de ventilación o de iluminación/.../antideflagrante. **P280** Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. **P240** Conectar a tierra/enlace equipotencial del recipiente y del equipo de recepción. **P233** Mantener el recipiente herméticamente cerrado. **P242** Utilizar únicamente herramientas que no produzcan chispas. **P243** Tomar medidas de precaución contra descargas electrostáticas. **P303+P361+P353** EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ducharse. **P370+P378** En caso de incendio: para la extinción utilizar CO₂, polvo o agua pulverizada. **P403+P235** Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco. **P501** Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con las normativas locales, regionales, nacionales e internacionales.

BD BBL Gram Stain Kit (212539)

Peligro



H225 Líquido y vapores muy inflamables. **H226** Líquidos y vapores inflamables. **H315** Provoca irritación cutánea. **H319** Provoca irritación ocular grave. **H332** Nocivo en caso de inhalación. **H336** Puede provocar somnolencia o vértigo. **H351** Se sospecha que provoca cáncer. **H401** Tóxico para los organismos acuáticos. **H402** Nocivo para los organismos acuáticos. **H412** Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P201 Pedir instrucciones especiales antes del uso. **P202** No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. **P210** Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. **P233** Mantener el recipiente herméticamente cerrado. **P240** Conectar a tierra/enlace equipotencial del recipiente y del equipo de recepción. **P241** Utilizar un material eléctrico, de ventilación o de iluminación/.../antideflagrante. **P242** Utilizar únicamente herramientas que no produzcan chispas. **P243** Tomar medidas de precaución contra descargas electrostáticas. **P261** Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/ la niebla/los vapores/el aerosol. **P264** Lavarse concienzudamente tras la manipulación. **P271** Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado. **P273** Evitar su liberación al medio ambiente. **P280** Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. **P302+P352** EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. **P303+P361+P353** EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ducharse. **P304+P340** EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. **P305+P351+P338** EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. **P308+P313** EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. **P312** Llamar a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico en caso de malestar. **P321** Se necesita un tratamiento específico (ver en esta etiqueta). **P332+P313** En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. **P337+P313** Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. **P362+P364** Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. **P370+P378** En caso de incendio: para la extinción utilizar CO₂, polvo o agua pulverizada. **P403+P233** Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente cerrado herméticamente. **P403+P235** Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco. **P405** Guardar bajo llave. **P501** Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con las normativas locales, regionales, nacionales e internacionales.

Atención



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

P264 Lavarse concienzudamente tras la manipulación. **P280** Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos.

Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. **P321** Se necesita un tratamiento específico (ver

en esta etiqueta). **P332+P313** En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. **P337+P313** Si persiste la irritación

ocular: Consultar a un médico. **P350** Lavar suavemente con agua y jabón abundantes. **P362+P364** Quitar las prendas

contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. **P501** Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con las

normativas locales, regionales, nacionales e internacionales.

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 portaobjetos 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 y la normativa de la CLIA para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

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

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

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

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

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

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

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

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

RESULTADOS PREVISTOS Y CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO1-4

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

REFERENCIAS: Ver "Referencias" en el texto en inglés.

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite www.bd.com.



Manufacturer / Производител / Výrobce / Fabrikant / Hersteller / Κατασκευαστής / Fabricante / Tootja / Fabricant / Proizvođač / Gyártó / Fabbicante / Аткарушы / 제조업체 / Gamintojas / Ražotājs / Tilvirker / Producent / Producător / Производител / Výrobca / Proizvođač / Tilverkare / Üretici / Виробник / 生产厂商



Use by / Исполняйте до / Spoftebujte do / Brug før / Verwendbar bis / Χρήση έως / Usar antes de / Kasutada enne / Date de péremption / 사용 기한 / Uputrebite do / Felhasználhatóig dátuma / Usare entro / Дейніт пайданура / Naudokite iki / Izlietoti līdz / Houdbaar tot / Brukes for / Stosować do / Prazo de validade / A se utiliza până la / Исползовать до / Použite do / Uputrebiti do / Använd före / Son kullanna tarhi / Використати долине / 使用截止日期
YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month)
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца)
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutning af måned)
JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende)
EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fin del mes)
AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp)
AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois)
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)
ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja)
AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese)
ЖОЖОЖ-АА-КК / ЖОЖОЖ-АА / (АА = айдың соңы)
YYYY-MM-DD/YYYY-MM (MM = 월말)
MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mēnesio pabaiga)
GGGG-MM-DD/GGGG-MM (MM = mēneša beigas)
JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = sluttan av måneden)
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês)
AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii)
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца)
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutet av månaden)
YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu)
PPPP-MM-DD / PPPP-MM (MM = кінець місяця)
YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = 月末)



Catalog number / Каталоген номер / Katalogové číslo / Katalognummer / Αριθμός καταλόγου / Número de catálogo / Katalooginumber / Numéro catalogue / Kataloški broj / Katalógusszám / Numero di catalogo / Каталог номери / 카탈로그 번호 / Katalogo / numeris / Kataloga numurs / Catalogue number / Numer katalogowy / Număr de catalog / Номер на каталог / Katalogové číslo / Kataloški broj / Kataloga numarası / Номер за каталог / 目录号



Authorized Representative in the European Community / Оторизиран представител в Европейската общност / Autorizovaný zástupce pro Evropskou společenství / Autoriserer representant i De Europæiske Fællesskaber / Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Représentant autorisé pour la Communauté européenne / Autorizirani predstavnik u Evropskoj uniji / Meghatalmazotti képviselő az Európai Közösségekben / Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea / Европа қауымдастығындағы уәкілетті екіл / 유엔 공동체의 위원 대표 / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Pilnvarotais pārstāvis Eiropas Kopienā / Bevoegde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap / Autoriseret representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo we Wspólnocie Europejskiej / Reprezentante autorizado na Comunidade Europeia / Representantul autorizat pentru Comunitatea Europeană / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Autorizovan predstavništvo u Evropskoj uniji / Auktoriserad representant i Europeiska gemenskapen / Avrupa Topluluğu Yetkili Temsilcisi / Уповноважений представник у країнах СС / 欧洲共同授权代表



In Vitro Diagnostic Medical Device / Медицински уред за диагностика ин витро / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In vitro diagnostika meditsinilaparatuur / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medicinska pomagala za In Vitro Dijagnostiku / In vitro diagnostikai orvosi eszköz / Dispositivo medicale per diagnostica in vitro / Жасанды жағдайда жүргізілетін медициналық диагностика аспабы / In Vitro Diagnostic 의료 기기 / In vitro diagnostikos prietais / Medicinas ierices, ko lieto in vitro diagnostikā / Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek / In vitro diagnostisk mediskn utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Dispositiv medical pentru diagnostic in vitro / Медицинский прибор для диагностики in vitro / Medicinska pomôcka na diagnostiku in vitro / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik / In Vitro Diyagnostik Tibbi Cihaz / Медицинский прибор для диагностики in vitro / 体外诊断医疗设备



Temperature limitation / Температури ограничения / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturbegrenzung / Περιορισμοί θερμοκρασίας / Limitación de temperatura / Temperaturi piirang / Limites de température / Dozvoljena temperatura / Hőmérsékleti határ / Limiti di temperatura / Температураны шектеу / 온도 제한 / Laikymo temperatūra / Temperatūras ierobežojumi / Temperaturlimit / Temperaturbegrensnung / Ograniczenie temperatury / Limites de temperatura / Limite de temperatura / Ограничение температуры / Ohraničenie teploty / Ograničenje temperature / Temperaturgräns / Sıcaklık sınırlaması / Обмеження температури / 温度限制



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



Contains sufficient for <n> tests / Съдържано е достатъчно за <n> теста / Dostatečné množství pro <n> testů / Inneholder tilstrækkeligt til <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιεχύεταρ ποσότητα για <n> εξετάσεις / Contenido suficiente para <n> pruebas / Kullaldane <n> testide jaoks / Contenu suffisant pour <n> tests / Sadržaj za <n> testova / <n> testhez elegendő / Contenido suficiente per <n> test / <n> testleri için yeterli / <n> тесттерге ушін жеткілікті / <n> 테스트가 충분히 포함됨 / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Satur pietiekami <n> pārbaudēm / Inhoud voldoende voor "n" testen / Inholder tilstrækkelig til <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Conteúdo suficiente para <n> testes / Conținut suficient pentru <n> teste / Достаточнo для <n> тестoв(a) / Obsah vystačí na <n> testov / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Innehåller tillräckligt för <n> analyser / <n> test için yeterli miktarda içerir / Вистачить для аналізів: <n> / 足够进行 <n> 次检测



Consult Instructions for Use / Направете справка в инструкциите за употреба / Prostudujte pokyny k použití / Se brugsanvisningen / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Consultar las instrucciones de uso / Lugeda kaasvatustsiooni / Consulter la notice d'emploi / Koristi upute za upotrebu / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Пайдлаанбаны / Загаһуу танысан алынчы / 사용 지침 참조 / Skaitytie naudojimo instrukcijas / Skatīt lietošanas pamācību / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se i brugsanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consultar as instruções de utilização / Consultati instructiunile de utilizare / См. руководство по эксплуатации / Pozri Pokyny na používanie / Pogledajte uputstvo za upotrebu / Se bruksanvisningen / Kullannin Talimatit / ari başvurun / Див. інструкції за використання / 请参阅使用说明



Do not reuse / Не используйте повторно / Nepoužívejte opakovaně / Ikke til genbrug / Nicht wiederverwenden / Μην επαναχρησιμοποιείτε / No reutilizar / Mitte kasutada korudavalt / Ne pas réutiliser / Ne koristiti ponovo / Egyszer használatos / Non riutilizzare / Пайдлаанбаны / 재사용 금지 / Tik vienkartiniam naudojami / Nelietot atkārtoti / Niet opnieuw gebruiken / Kun til engangsbrug / Nie stosować powtórnie / Não reutilize / Nu refolositi / Не использовать повторно / Nepoužívejte opakovane / Ne utprebrljavajte ponovo / Får ej återanvändas / Tekrar kullannaynin / He vikoristovuvati povtorno / 请勿重复使用



Serial number / Серийен номер / Sériové číslo / Seriennummer / Seriennummer / Σειριακόσ αριθμός / N° de serie / Serienumber / Número de série / Serijski broj / Sorozatszám / Numero di serie / Totpamallik nimpi / 일련 번호 / Serijos numeris / Sérías numers / Serienummer / Numero serijy / Número de série / Numár de serie / Серийный номер / Seri numarasi / Номер серії / 序列号



For IVD Performance evaluation only / Само за оценка качеството на работа на IVD / Provo pro vyhodnocení výkonu IVD / Kun til evaluering af IVD ydelse / Nur für IVD-Leistungsbewertungszwecke / Móvo yva atjólóvunni aðþóðsög IVD / Sólo para la evaluación del rendimiento en diagnóstico in vitro / Ainult IVD seadmé hindamiseks / Réservé à l'évaluation des performances IVD / Samo u znanstvene svrhe za in vitro Dijagnostiku / Kizárólag in vitro diagnosztikához / Solo per valutazione delle prestazioni IVD / Жасанды жағдайда қырықпа ішіндеді жинақтасқа тек ымдыста ғарану үшін / IVD шынғынғыға дейтесіман саву / Tik IVD prietaisų veikimo charakteristikoms tikrinti / Vienigi IVD darbas novértésana / Uitsluitend voor doeltreffendheidsonderzoek / Kun for evaluering av IVD-ydelse / Tyklo do oseny wydajności IVD / Uso exclusivo para avaliação de IVD / Numai pentru evaluarea performanței IVD / Только для оценки качества диагностики in vitro / Urcené iba na diagnostiku in vitro / Samo za procenu učinka u in vitro dijagnostici / Endast för utvärdering av diagnostisk användning in vitro / Yalnızca IVD Performans değerlendirmesi için / Только для обновления качества диагностики in vitro / 仅限 IVD 性能评估

For US: "For Investigational Use Only"



Lower limit of temperature / Донен лимит на температурата / Dolni hranice teploty / Nedre temperaturgrænse / Temperaturuntergrenze / Κάτω όρο θερμότητας / Limite inférieure de température / Alumine temperatuuripiir / Limite inférieure de température / Najnižja dozvoljena temperatura / Alsó hőmérsékleti határ / Limite inferiore di temperatura / Temperaturaränçn temeri kurutleri / 하한 온도 / Žemiausia laikymo temperatūra / Temperaturarizma zemāk robeža / Laagste temperatuurlimiet / Nedre temperaturgrænse / Dolna granica temperatury / Limite máximo de temperatura / Limitá mínima de temperaturá / Nižnji predel temperature / Spodná hranica teploty / Donja granica temperature / Nedre temperaturgräns / Sıcaklık alt sınırı / Минимална температура / 温度下限



Control / Контроль / Kontrola / Kontrol / Kontrolle / Μάρτυρας / Kontroll / Contrôle / Controllo / Бақылау / 컨트롤 / Kontrolé / Kontrolle / Controlre / Controllo / Контроль / kontroll / Контроль / 对照



Positive control / Положителен контрол / Pozitivní kontrola / Positiv kontrol / Positive Kontrolle / Θετικός μάρτυρας / Control positivo / Positivite kontrol / Contrôle positif / Pozitivna kontrola / Pozitiv kontrol / Controllo positivo / Оң бақылау / 양성 컨트롤 / Teigiama kontrolė / Pozitivá kontrolé / Positivie controle / Kontrola dodatna / Controllo positivo / Control pozitiv / Положительный контроль / Pozitif kontrol / Позитивный контроль / 阳性对照试剂



Negative control / Отрицателен контрол / Negativní kontrola / Negativ kontrol / Negative Kontrolle / Αρνητικός μάρτυρας / Control negativo / Negativne kontrol / Contrôle négatif / Negativna kontrola / Negativ kontrol / Controllo negativo / Негативтік бақылау / 음성 컨트롤 / Neigiama kontrolė / Negativá kontrolé / Negative controle / Kontrola ujemna / Controllo negativo / Control negativ / Отрицательный контроль / Negatif kontrol / Негативный контроль / 阴性对照试剂



Method of sterilization: ethylene oxide / Метод на стерилизация: этиленов оксид / Způsob sterilizace: etylenoxid / Steriliseringsmetode: etylenoxid / Sterilisationsmethode: Ethylenoxid / Μέθοδος αποστείρωσης: αιθυλενοξείδιο / Método de esterilización: óxido de etileno / Steriliseerimismetood: etüleenoksiid / Méthode de stérilisation: oxyde d'éthylène / Metoda sterilizacije: etilen oksid / Sterilizálás módszere: etilén-oxid / Método de esterilização: óxido de etilene / Стерилизация әдісі – этилен тотғы / 소독 방법: 에틸렌옥사이드 / Sterilizavimo būdas: etileno oksidas / Sterilizšanas metode: etilēnoksīds / Gesteriliseerid met behulp van etylenoxide / Steriliseringsmetode: etylenoxid / Metoda sterilizacji: etilenoksid / Metoda sterilizacji: etylenoxid / Método de esterilização: óxido de etileno / Metoda de sterilizare: oxid de etilená / Метод стерилизации: этиленоксид / Metoda sterilizacije: etylenoksid / Metoda sterilizacije: etilen oksid / Steriliseringsmetod: etenoxid / Sterilizasyon yöntemi: etilen oksit / Метод стерилизації: этиленоксидом / 灭菌方法: 环氧乙烷



Method of sterilization: irradiation / Метод на стерилизация: ирадиация / Způsob sterilizace: záření / Steriliseringsmetode: bestråling / Sterilisationsmethode: Bestrahlung / Μέθοδος αποστείρωσης: ακτινοβολία / Método de esterilización: irradiación / Steriliseerimismetood: kiirgus / Méthode de stérilisation: irradiation / Metoda sterilizacije: zračenje / Sterilizálás módszere: besugárzás / Método de sterilizzazione: irradiazione / Стерилизация әдісі – сәулге түсірі / 소독 방법: 방사 / Sterilizavimo būdas: radiacija / Sterilizšanas metode: apstarošana / Gesteriliseerid met behulp van bestraling / Steriliseringsmetode: bestråling / Metoda sterilizacji: napromienianie / Método de esterilização: irradiação / Metoda de sterilizare: iradiere / Метод стерилизации: облучение / Metoda sterilizácie: ožiarenie / Metoda sterilizacije: ozračavanje / Steriliseringsmetod: stråling / Sterilizasyon yöntemi: irradyasyon / Метод стерилизації: опроміненням / 灭菌方法: 辐射



Biological Risks / Биологични ризици / Biologická rizika / Biologisk fare / Biogefährdung / Βιολογικά κίνδυνοι / Riesgos biológicos / Biologiskel riskid / Risques biologiques / Biološki rizik / Biológiallag veszélyes / Rischio biologico / Биологичны тауекелдер / 생물학적 위험 / Biologinis pavojus / Biologiskie riski / Biološki rizici / Biologisk risiko / Zagrożenia biologiczne / Perigo biológico / Riscuro biologice / Биологическая опасность / Biologické riziko / Biološki riziko / Biologisk risk / Biyolojik Riskler / Биологична небезпека / 生物学风险



Caution, consult accompanying documents / Внимание, направте справка в придружаващите документи / Pozor! Prostudujte si příloženou dokumentaci! / Forsigtig, se ledsagende dokumenter / Achtung, Begleitdokumente beachten / Προσοχή, ομψβουλευτείτε τα συνοδευτικά έγγραφα / Precacuin, consultar la documentacuin adjunta / Ettevaatus! Lugeda kaasvatustsiooni dokumentatsiooni / Attention, consulter les documents joints / Uprozegenje, koristi pratecu dokumentaciju / Figyelem! Olvassa el a mellékelt tájékoztatót / Attenzione: consultare la documentazione allegata / Абайлаңыз, тиісті құжаттармен танысыңыз / 주의, 동봉된 설명서 참조 / Dmesio, žiřrtekite pridedamus dokumentus / Piesardziba, skaiti ravaddokumentus / Voorzichtig, raadpleeg bijgevoegde documenten / Forsiktigt, se vedlagt dokumentasjon / Nalezý zapoznač się z dołączonymi dokumentami / Cuidado, consulte a documentação fornecida / Atenție, consultați documentele însoțitoare / Внимание: см. прилагаемую документацию / Vstraha, pozri sprievodné dokumenty / Pažnja! Pogledajte priložena dokumenta / Obs! Se meðfylgjande dokumentation / Dikkat, birlifite verilen belgelerle / Увага: див. супутню документацию / 小心, 请参阅附带文档。



Upper limit of temperature / Горен лимит на температурата / Horní hranice teploty / Övre temperaturgrænse / Temperaturobergrenze / Ανώτερο όρο θερμότητας / Limite superior de temperatura / Ülemine temperatuuripiir / Limite supérieure de température / Gornja dozvoljena temperatura / Felső hőmérsékleti határ / Limite superior de temperatura / Temperaturaränçn rukurut etinen joragary şeri / 상한 온도 / Aukščiausia laikymo temperatūra / Augšējā temperatūras robeža / Hoogste temperatuurlimiet / Övre temperaturgrænse / Górná granica temperatury / Limite máximo de temperatura / Limitá máxima de temperaturá / Верхний предел температуры / Horná hranica teploty / Gornja granica temperature / Övre temperaturgräns / Sıcaklık üst sınırı / Максимальна температура / 温度上限



Keep dry / Παзете сухо / Skladujte v suchém prostředí / Opbeavars tørr / Trocklagern / Φυλάξτε το στεγνό / Mantener seco / Hoida kuivais / Conservar au sec / Držati na suhom / Százaz helyen tartandó / Tenere all'asciutto / Құрғақ күйінде ұста / 건조 상태 유지 / Laiikyite sausiai / Uzglabāt sausu / Droog houden / Holds tørr / Przechowywać w stanie suchym / Manter seco / A se feri de umezeală / Ne dopuskać popadnięcia wplgni / Uchovávať v suchu / Držite na suvom mestu / Förvaras tørr / Kuru bir şekilde muhafaza edin / Берегти від вологи / 请保持干燥



Collection time / Време на събиране / Čas odběru / Opsamlingstidspunkt / Entnahmeuhrzeit / Ωρα συλλογής / Hora de recogida / Kogumisaeg / Heure de prélèvement / Sati prikupljanja / Mintavétel időpontja / Ora di raccolta / Жинақы уақыты / 수집 시간 / Paemimo laikas / Savākšanas laiks / Verzameltijd / Tid prøvetaking / Godzina pobrania / Hora de colheita / Ora colectării / Время сбора / Doba odboru / Vreme prikupljanja / Uppsamlingstid / Toplama zamani / Час забору / 采集时间



Peel / Обелете / Otevřete zde / Abn / Abziehen / Αποκολλήστε / Desprendre / Koorida / Décoller / Otvoriti skini / Húzza le / Staccare / Υστίρη κάθαίνι αλπι таста / 벗기기 / Plésti čia / Atfimmē / Schillen / Trekk av / Oderwac / Destacar / Se dezlipeste / Отклеить / Odtrhnite / Oluštiti / Dira isār / Айрма / Відкелити / 撕下



Perforation / Перфорация / Perforce / Perforing / Διείρηξη / Perforación / Perforatsioon / Perforacia / Perforalás / Perforazione / Tecik teicy / 점취선 / Perforacia / Perforación / Perforate / Perforacia / Perforação / Perforare / Perforaacion / Perforacia / Perforasyon / Перфорация / 穿孔



Do not use if package damaged / Не използвайте, ако опаковката е повредена / Nepoužívejte, je-li obal poškozený / Må ikke anvendes hvis emballagen er beskadiget / Inihal beschädigeter Packungnicht verwenden / Μη χρησιμοποιείτε εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά. / No use si el paquete está dañado / Mitte kasutada, kui pakend on kahjustatud / Ne pas l'utiliser si l'emballage est endommagé / Ne koristiti ako je oštećeno pakiranje / Ne használja, ha a csomagolás sérült / Non usare se la confezione è danneggiata / Eter niet bezuylman bokan, paiddalanba / 패키지가 손상된 경우 사용 금지 / Jei pakuočių pažeista, nenaudoti / Nelietoti, ja terapakujioms bojāts / Niet gebruiken indien de verpakking beschadigd is / Må ikke brukes hvis pakke er skadet / Nie używać, jeśli opakowanie jest uszkodzone / Nào usar se a embalagem estiver danificada / A nu se folosi dacă pachetul este deteriorat / Не использовать при повреждении упаковки / Nepoužívejte, ak je obal poškozený / Ne koristite ako je pakovanje oštećeno / Använd ej om förpackningen är skadad / Ambalaj hasar görmüşse kullanmayın / Не використовувати за пошкодженої упаковки / 如果包裝破損，請勿使用



Keep away from heat / Παзете от топлина / Nevystavujte přilísnému teplu / Må ikke udsættes for varme / Vor Wärme schützen / Κρατήστε το μακριά από τη θερμότητα / Mantener alejado de fuentes de calor / Hoida eemal valgusesit / Protéger de la chaleur / Držati dalje od izvora topline / Övja a melegtől / Tenere lontano dal calore / Салқын жерде сақта / 열을 피해야 함 / Laiikyti atokiau nuo šilumos šaltinių / Sargāt no karstuma / Beschermen tegen warmte / Må ikke utsettes for varme / Przechowywać z dala od źródeł ciepła / Manter ao abrigo do calor / A se feri de căldură / Не награвяте / Uchovávať mimo zdroja tepla / Držite dalje od toplote / Får ej utsättas för värme / Isidan uzak tutun / Берегти від дії тена / 请远离热源



Cut / Срежете / Odstřihněte / Klip / Schneiden / Κόψτε / Cortar / Lögata / Découper / Rezi / Vágja ki / Tagliare / Kecişia / 잘라내기 / Kirpti / Nogriet / Knippen / Kutt / Odciąć / Cortar / Decupajti / Отрезать / Odstřihněte / Iseći / Klipp / Kesme / Pozpaziti / 剪下



Collection date / Дата на събиране / Datum odběru / Opsamlingsdato / Entnahmedatum / Ημερομηνία συλλογής / Fecha de recogida / Kogumisküüpäev / Date de prélèvement / Dani prikupljanja / Mintavétel dátuma / Data di raccolta / Жинақаның тізбектелген / 수집 날짜 / Paemimo data / Savākšanas datums / Verzameldatum / Dato prøvetaking / Data pobrania / Data de colheita / Data colectării / Дата сбора / Datum odboru / Datum prikupljanja / Uppsamlingsdatum / Toplama tarihi / Дата забору / 采集日期



µL/test / µL/тест / µL/Test / µL/εξέταση / µL/prueba / µL/тест / µL/테스트 / мкл/тест / µL/tyrimas / µL/pärbaude / µL/teste / мкл/анализ / µL/检测



Keep away from light / Παзете от светлина / Nevystavujte světlu / Må ikke udsættes for lys / Vor Licht schützen / Κρατήστε το μακριά από το φως / Mantener alejado de la luz / Hoida eemal valgusesit / Conservar à l'abri de la lumière / Držati dalje od svetla / Fény nem érheti / Tenere al riparo dalla luce / Қараңғыланған жерде ұста / 빛을 피해야 함 / Laiikyti atokiau nuo šilumos šaltinių / Sargāt no gaismas / Niet blootstellen aan zonlicht / Må ikke utsettes for lys / Przechowywać z dala od źródeł światła / Manter ao abrigo da luz / Feriti de lumină / Хранить в темноте / Uchovávať mimo dosahu svetla / Držite dalje od svetlosti / Får ej utsättas för ljus / Iskitan uzak tutun / Берегти від дії світла / 请远离光线



Hydrogen gas generated / Образован е водород газ / Možnost úniku plyného vodíku / Frembringer hydrogengas / Wasserstoffgas erzeugt / Δημιουργία αερίου υδρογόνου / Producción de gas de hidrógeno / Vesinikigaasi tekitatud / Produit de l'hydrogène gazeux / Sadržaji hydrogen vodik / Hidrogen gázt fejleszt / Produzione di gas idrogeno / Газотекс сыури пайда болор / 수소 가스 생성됨 / Issikinä vandenilio dujas / Rodas vėderpatis / Waterstofgas gegeneereerd / Hydrogengas generert / Powoduje powstanie wodoru / Produção de gás de hidrógeno / Generare gaz de hidrogen / Выделение водорода / Vyrobené použitím vodíka / Oslobada se vodonik / Genererad vätgas / Açığı çıkan hidrojen gazı / Реакция з виділенням водню / 会产生氢气



Patient ID number / ИД номер на пациента / ID pacienta / Patientens ID-nummer / Patienten-ID / Αριθμός αναγνωρίσης ασθενούς / Número de ID del paciente / Patsiendi ID / No d'identification du patient / Identifikacjski broj pacijenta / Beteg azonosító száma / Numero ID paziente / Пациенттин идентификациялык нөмүрү / 환자 ID 번호 / Paciento identifikavimo numeris / Pacienta ID numurs / Identificationnummer van de patiënt / Patientens ID-nummer / Numer ID pacienta / Número da ID do doente / Numár ID pacient / Идентификационный номер пациента / Identifikacné číslo pacienta / ID broj pacijenta / Patientnummer / Hasta kimlik numarasi / Идентификатор пациента / 患者标识号



Fragile. Handle with Care / Чупливо, Работете с необходимото внимание. / Ктећк. При манипулаци постурите опатне. / Forsigtig, kan gå i stykker / Zerbrechlich, vorsichtig handhaben. / Ευθροιστο. Χειρτοсите το με προσοχή. / Frágil. Manipuler con cuidado. / Öm, käsitsege ettevaatlikult. / Fragile. Manipuler avec précaution. / Lomljivo, rukujte pažljivo. / Törékeny / Óvatosan kezelendő. / Fragile, maneggiare con cura. / Сынхьш, абайлан пайдаланңыз. / 조심해서 만지세요. / Trapu, elkites atsargiai. / Trausis; rikotes uzmanigai. / Breekbaar, voorzichtig behandelen. / Ömtålig, håndter försiktigt. / Kruha zawartość, przzenosć ostrożnie. / Frágil, Manuseie con Cuidado. / Frágil, manipulați cu atenție. / Хроукле! Обращаться с осторожностью. / Ктећк, вуждаје са опатна манипулациа. / Lomljivo - rukujte pažljivo. / Bräckligt. Hantera försiktigt. / Kolay Kirilir, Dikkatli Taşın. / Тендтна, звертагтис з осторожністю / 易碎，小心轻放

Rx Only

This only applies to US: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner." / S'applique uniquement aux États-Unis: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner." / Vale solo per gli Stati Uniti: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner." / Gilt nur für die USA: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner." / Sólo se aplica a los EE.UU.: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner."



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



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

Australian Sponsor:

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

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and BD BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company.