

Kit colorazione di Gram Catalogo n. 607K

Uso previsto

La colorazione di Gram fu inventata dallo scienziato danese Hans Gram nel 1884. Il colorante di Gram consente di suddividere tutti i batteri in due grandi gruppi: quelli che trattengono il colorante primario (Gram-positivi) e quelli che assumono il colore del colorante di contrasto (Gram-negativi). Il meccanismo della ritenzione del colorante si basa sulle proprietà chimico-fisiche della parete cellulare. Il colorante primario è il cristalvioioletto e il colorante secondario è generalmente safranina O, fucsina basica o una loro combinazione. La fucsina basica migliora la controcolorazione dei batteri anaerobi. Sono in uso molte formulazioni differenti di cristalvioioletto. Fra le più comuni ci sono il cristalvioioletto Gram, il cristalvioioletto Hucker e il cristalvioioletto alcolico 2%. La soluzione iodo-iodurata per Gram è una soluzione acquosa di iodio e ioduro di potassio. A causa della breve durata di conservazione della soluzione iodata nei flaconi di plastica, lo iodopovidone viene spesso utilizzato come soluzione iodo-iodurata per Gram stabilizzata. I decoloranti vanno da lenti (alcol reagente) a veloci (acetone/alcol).

Reagenti forniti

I materiali forniti nel kit da 8 oz, numero di catalogo 607K, sono:

1. Cristalvioioletto di Gram.
2. Soluzione iodo-iodurata per Gram.
3. Decolorante acetone/alcol 25%.
4. Safranina O, 0.4% p/V.

Reagenti necessari ma non forniti

L'utente necessita di acqua purificata priva di batteri e metanolo per la fissazione in metanolo.

Avvertenze di pericolo



Avvertenza: Liquido e vapore infiammabili. Tenere lontano da fonti di calore, scintille, fiamme libere e superfici calde. Non fumare. Tenere il contenitore ben chiuso. Utilizzare solo strumenti che non producono scintille. Prendere precauzioni contro le scariche statiche. Indossare indumenti protettivi e protezioni oculari. In caso di contatto con la cute, rimuovere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Risciacquare con acqua o fare una doccia. In caso di incendio, utilizzare estintori approvati per incendi alcolici. aumentare eccessivamente lo spessore dello striscio. Nel caso in cui il terreno sia liquido, si utilizza una goccia prelevata direttamente dal terreno di coltura. Tuttavia questo metodo non è

Raccolta dei campioni e allestimento per l'analisi

I vetrini vengono generalmente allestiti da un terreno di coltura solido o liquido inoculato con campioni provenienti dalla fonte originale (per esempio, tamponi faringei, espettorato eccetera). Una piccola quantità della sospensione solida viene sospesa in una goccia d'acqua priva di batteri su un vetrino portaoggetti. Non

sempre soddisfacente a causa dei solidi provenienti dal terreno. La sospensione ottenuta con un metodo o l'altro viene asciugata all'aria e quindi fissata in metanolo o al calore. Per fissare lo striscio in metanolo, versare il metanolo sul vetrino e lasciare agire circa due minuti. In alternativa, per fissare lo striscio a calore passare il vetrino rapidamente attraverso una fiamma due o tre volte. Non surriscaldare. Il vetrino non deve essere sgradevolmente caldo quando lo si mette a contatto con il dorso della mano. Lasciare raffreddare lo striscio prima di colorare. Tradizionalmente il metodo raccomandato era la fissazione a calore, ma una recente pubblicazione ha evidenziato che la fissazione in metanolo è più efficace nel trattenere le cellule e le loro caratteristiche di colorazione.

Procedura

1. Posizionare lo striscio fissato su un rack per colorazione e coprirlo con cristalvioioletto, lasciando agire per 30-60 secondi.
2. Risciacquare il colorante con acqua purificata priva di batteri.
3. Coprire il vetrino con la soluzione iodo-iodurata, lasciando agire per 30 secondi.
4. Risciacquare con acqua purificata priva di batteri.
5. Decolorare con il decolorante fino a quando la soluzione di risciacquo non diventa limpida (da 10 a 15 secondi circa per l'alcol reagente; molto più rapido per l'alcol-acetone).
6. Risciacquare con acqua purificata priva di batteri.
7. Colorare con il colorante di contrasto safranina O per 30-60 secondi.
8. Risciacquare con acqua purificata priva di batteri.
9. Asciugare all'aria ed esaminare al microscopio ad immersione in olio.

NB: Tutti i tempi sono approssimativi. Si consiglia all'utente di regolare i tempi di colorazione come necessario.

Fonti di errore

Gli strisci devono essere fissati e lasciati asciugare. I campioni fissati in modo inadeguato potrebbero non colorarsi correttamente. Il controllo deve essere eseguito a ogni processo, preferibilmente sullo stesso vetrino. Gli strisci non devono avere uno spessore eccessivo. Se il risciacquo con acqua non viene eseguito adeguatamente, il colorante si cristallizzerà sul vetrino. Se possibile, tenere il vetrino inclinato durante il risciacquo per facilitare la rimozione del colorante. Devono essere utilizzate solo colture giovani (da 18 a 24 ore). Le colture più vecchie possono essere Gram-variabili, in particolare se generano spore.

Data di revisione: 13-02-18

* Bioscene: Journal of College Biology Teaching, v35 n2 p36-41 Dec 2009