

1.00567.1000 **REF**
 1.00567.2500
 1.09261.1000
 1.09261.2500

Microscopy

Lugol's solution stabilized with PVP

for the Gram staining method

Lugol's solution (diluted iodine-potassium iodide solution)

for the Gram staining method

For professional use only

IVD In Vitro Diagnostic Medical Device



Intended purpose

These "Lugol's solution stabilized with PVP - for the Gram staining method" and "Lugol's solution (diluted iodine-potassium iodide solution) - for the Gram staining method" are used for human-medical cell diagnosis and serve the purpose of the bacteriological investigation of sample material of human origin. They are ready-to-use solutions these when used together with other *in vitro* diagnostic products from our portfolio make bacterial target structures evaluable for diagnostic purposes (Gram-positive or Gram-negative bacteria) by fixing, staining, counterstaining, mounting in bacteriological specimen materials, e.g. smears of body fluids.

Unstained structures are relatively low in contrast and are extremely difficult to distinguish under the light microscope. The images created using the staining solutions help the authorized and qualified investigator to better define the form and structure in such cases. Further tests must be carried out according to recognized, valid methods to reach a definitive diagnosis.

Principle

In bacteriology, the Gram staining allows a fast differentiation of bacteria in Gram-positive and Gram-negative.

The mureine structure of the bacteria wall is the basis of the color affinity. In the first step, bacteria will be stained with crystal violet, an aniline dye. After the treatment with iodine solution (Lugol's solution), a dye-iodine complex will form. During the decolorizing step, this complex stays in the multilayer mureine structure of the cell wall of Gram-positive bacteria - they will appear blue-violet.

Gram-negative bacteria, by contrast, have a cell wall consisting of a single-layered murein structure, and correspondingly re-release the staining dye with the decolorizing solution. Gram-negative bacteria will be counterstained with safranin solution and will then appear pink to red.

Sample material

Body fluids, exudate, pus, liquid or solid cultures

Reagents

Cat. No. 1.00567
 Lugol's solution stabilized with PVP 1 l, 2.5 l
 for the Gram staining method

Cat. No. 1.09261
 Lugol's solution (diluted iodine-potassium iodide solution) 1 l, 2.5 l
 for the Gram staining method

Also required:

Cat. No. 1.09217 Gram's safranin solution 500 ml, 2.5 l
 for the Gram staining method
 Cat. No. 1.09218 Gram's crystal violet solution 500 ml, 2.5 l
 for the Gram staining method
 Cat. No. 1.10218 Gram's decolorizing solution 500 ml, 2.5 l
 for the Gram staining method

Alternatively:

Instead of the combination of single reagents, the staining kit 1.11885.0001 can be used:

Cat. No. 1.11885.0001
 Gram-Color
 stain set for the Gram staining method

1 set

Sample preparation

The sampling must be performed by qualified personnel.

Apply the specimen material to a clean and grease-free slide using an annealed loop. Then smear the material either directly onto the slide or first mix with 1 - 2 drops of physiological saline solution (Ringer's solution). Air-dry and then heat-fix by slowly drawing the slide (smear side facing up) through the upper part of the Bunsen-burner flame for three times. Subsequently, allow to cool and stain.

The air-dried smears must be heat-fixed very carefully. This prevents the risk of infections and reduces the dissolution of specimen material and thus, the contamination of solutions and other slides.

All samples must be treated using state-of-the-art technology.

All samples must be clearly labeled.

Suitable instruments must be used for taking samples and their preparation. Follow the manufacturer's instructions for application / use.

When using the corresponding auxiliary reagents, the corresponding instructions for use must be observed.

Reagent preparation

The Lugol's solution stabilized with PVP - for the Gram staining method and Lugol's solution (diluted iodine-potassium iodide solution) - for the Gram staining method used for staining are ready-to-use, dilution of the solutions is not necessary and merely produces a deterioration of the staining result and their stability.

Procedure

Staining in the staining cell

It is recommended to dilute the Gram's crystal violet solution 1:3 with distilled water, if the immersion method is used.

The slides must be immersed and moved about in the solutions, simple immersion alone yields inadequate staining results.

The slides should be allowed to drip off well after the individual staining steps as a measure to avoid any unnecessary cross-contamination of solutions.

The stated times should be adhered to in order to guarantee an optimal staining result.

Slide with fixed smear	
Gram's crystal violet solution	1:30 min
Running tap water	30 sec
Lugol's solution*	3 min
Running tap water	20 sec
Gram's decolorizing solution**	5 - 10 sec
Running tap water	30 sec
Gram's safranin solution	1 min
Running tap water	1 min
Air-dry (e. g. over night or at 50 °C in the drying cabinet)	

* filter Lugol's solution after 3 runs

** discard Gram's decolorizing solution after 5 runs

Staining on the staining rack

Slide with fixed smear		
Gram's crystal violet solution	cover completely and leave to react	1 min
Lugol's solution	rinse briefly	
Lugol's solution	cover completely and leave to react	1 min
Distilled water	wash carefully	5 sec
Gram's decolorizing solution	carefully swirl the slides until no further clouds of dye are produced and the smear takes on a grey-blue color	10 - 15 sec
Distilled water	wash carefully	5 sec
Gram's safranin solution	cover completely and leave to react	1 min
Distilled water	wash carefully	5 sec
Air-dry (e. g. over night or at 50 °C in the drying cabinet)		

Covering with non-aqueous mounting media (e.g. Neo-Mount™ or Entellan™) and a cover glass is recommended for the storage of bacteriological specimens for several months. For this purpose, the stained specimens must be dried very well.

The use of immersion oil is recommended for the analysis of stained slides with a microscopic magnification >40x.

Staining in the automatic stainer

Staining in automated staining systems can be performed according to the protocol of the staining in the staining cell.

Result

Gram-positive microorganisms	blue-violet
Gram-negative microorganisms	pink to red

Trouble-shooting

Fixation of smear samples

A sufficient degree of heat-fixing using a Bunsen burner or in a heating cabinet is essential to prevent the infectious potential of the specimens and further proliferation of the bacteria.

No staining of the gram-positive bacteria

The critical stage of the Gram-staining procedure is the decolorizing step, which can be influenced by the thickness of the smear. In addition, a fresh decolorizing solution is highly reactive, which is why the result should be evaluated with care. During the decolorizing step, the user should stick to the exact incubation times described in the protocol, since otherwise false-negative results may result.

Technical notes

The microscope used should meet the requirements of a medical diagnostic laboratory. When using automatic staining systems, please follow the instructions for use supplied by the supplier of the system and software. Remove surplus immersion oil before filing.

Analytical performance characteristics

“Lugol’s solution stabilized with PVP” and “Lugol’s solution (diluted iodine-potassium iodide solution)” aid in the microscopic examination of biological structures as described in the “Intended purpose” of this IFU. The use of the products is only to be carried out by authorized and qualified persons, this includes, among other things, sample and reagent preparation, sample handling, decisions regarding suitable controls and more.

The analytical performance of the products is confirmed by testing each production batch.

For the following stains, the analytical performance was confirmed in terms of specificity, sensitivity and repeatability of the product with a rate of 100 %:

Cat. No. 1.00567 - Lugol’s solution stabilized with PVP

	Inter-assay Specificity	Inter-assay Sensitivity	Intra-assay Specificity	Intra-assay Sensitivity
Gram staining				
Gram-positive microorganisms	20/20	20/20	7/7	7/7
Gram-negative microorganisms	20/20	20/20	7/7	7/7

Analytical performance results

Cat. No. 1.09261 - Lugol’s solution (diluted iodine-potassium iodide solution)

	Inter-assay Specificity	Inter-assay Sensitivity	Intra-assay Specificity	Intra-assay Sensitivity
Gram staining				
Gram-positive microorganisms	20/20	20/20	7/7	7/7
Gram-negative microorganisms	20/20	20/20	7/7	7/7

Analytical performance results

Intra- (performed on the same batch) and inter-assay (performed on different batches) data list the number of correctly stained structures in relation to the number of performed assays.

The results of this Performance Evaluation confirms that the products are suitable for the intended use and perform reliably.

Diagnostics

Diagnoses are to be made only by authorized and qualified personnel. Valid nomenclatures must be used. This method can be supplementarily used in human diagnostics. Further tests must be selected and implemented according to recognized methods.

Suitable controls should be conducted with each application in order to avoid an incorrect result. The staining set may be controlled with Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria. Bacteria taken from a culture medium after 18 - 24 hours of incubation should be used.

Storage

Store the Lugol’s solution stabilized with PVP - for the Gram staining method and Lugol’s solution (diluted iodine-potassium iodide solution) - for the Gram staining method at +15 °C to +25 °C.

At temperatures below 15 °C a colored precipitate may settle out of the staining solutions. If precipitation has occurred, place the bottle for 2 - 3 hours in a water bath set at approx. 60 °C. This will re-dissolve most of the precipitate. Subsequently, filter the staining solutions through a paper filter.

Shelf-life

The Lugol’s solution stabilized with PVP - for the Gram staining method and Lugol’s solution (diluted iodine-potassium iodide solution) - for the Gram staining method can be used until the stated expiry date.

After first opening of the bottle, the contents can be used up to the stated expiry date when stored at +15 °C to +25 °C.

The bottles must be kept tightly closed at all times.

Capacity

approx. 250 stainings / 500 ml

Additional instructions

For professional use only.

In order to avoid errors, the application must be carried out by qualified personnel only. National guidelines for work safety and quality assurance must be followed. Microscopes equipped according to the standard must be used. If necessary use a standard centrifuge suitable for medical diagnostic laboratory.

Protection against infection

Effective measures must be taken to protect against infection in line with laboratory guidelines.

Instructions for disposal

The package must be disposed of in accordance with the current disposal guidelines. Used solutions and solutions that are past their shelf-life must be disposed of as special waste in accordance with local guidelines. Information on disposal can be obtained under the Quick Link “Hints for Disposal of Microscopy Products” at www.microscopy-products.com. Within the EU the currently applicable REGULATION (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 applies.

Auxiliary reagents

Cat. No.	1.04699	Immersion oil for microscopy	100-ml dropping bottle, 100 ml, 500 ml
Cat. No.	1.07960	Entellan™ rapid mounting medium for microscopy	500 ml
Cat. No.	1.07961	Entellan™ new rapid mounting medium for microscopy	100 ml, 500 ml, 1 l
Cat. No.	1.09016	Neo-Mount™ anhydrous mounting medium for microscopy	100-ml dropping bottle, 500 ml
Cat. No.	1.09217	Gram’s safranin solution for the Gram staining method	500 ml, 2.5 l
Cat. No.	1.09218	Gram’s crystal violet solution for the Gram staining method	500 ml, 2.5 l
Cat. No.	1.10218	Gram’s decolorizing solution for the Gram staining method	500 ml, 2.5 l
Cat. No.	1.11885	Gram-Color stain set for the Gram staining method	1 set

Hazard classification

Cat. No. 1.00567

Cat. No. 1.09261

Please observe the hazard classification printed on the label and the information given in the safety data sheet. The safety data sheet is available on the website and on request.

Main components of the products

Cat. No. 1.00567	
PVP-Iodine	50 g/l
KI	10 g/l
1 l =	1.02 kg
Cat. No. 1.09261	
I ₂	3.4 g/l
KI	6.8 g/l
1 l =	1.01 kg

General remark

If during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national authority.

Literature

- 1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
- 2. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
- 3. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Edition

Cat. No. 1.00567



- H318: Causes serious eye damage.
- H412: Harmful to aquatic life with long lasting effects.
- P273: Avoid release to the environment.
- P280: Wear 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.
- P501: Dispose of contents/ container to an approved waste disposal plant.

Revision History

Version	Modification Comment
2024-Jul-24	Initial version with the introduction of Revision History



Consult instructions for use



Manufacturer



Catalog number



Batch code



Caution, consult accompanying documents



Use by
YYYY-MM-DD



Temperature limitation

Status: 2024-Jul-24

1.00567.1000 **REF**
 1.00567.2500
 1.09261.1000
 1.09261.2500

Microscopie

Solution de Lugol stabilisée avec PVP

pour la coloration selon Gram

Solution de Lugol (Iode et iodure de potassium en solution diluée)

pour la coloration selon Gram

Réservé à une utilisation professionnelle

IVD

Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

CE

Objectif prévu

Les présentes « Solution de Lugol stabilisée avec PVP - pour la coloration selon Gram » et « Solution de Lugol (Iode et iodure de potassium en solution diluée) - pour la coloration selon Gram » sont utilisées pour le diagnostic cellulaire dans la médecine humaine et servent à l'examen bactériologique d'échantillons d'origine humaine. Ce sont solutions prêtes à l'emploi, qui sont utilisées conjointement avec d'autres diagnostics *in vitro* de notre portefeuille pour rendre des structures bactériennes cibles analysables pour le diagnostic (les bactéries Gram-positives ou Gram-négatives) par fixation, coloration, contre-coloration, montage dans des épreuves bactériologiques, telles que les frottis de liquides corporels, p.ex.

Les structures non colorées présentent des contrastes relativement faibles et ne peuvent à peine être différenciées par microscopie optique. Les images créées au moyen des solutions de coloration permettent à un examinateur formé et autorisé de mieux distinguer la forme et la structure. Pour un diagnostic final, il est nécessaire d'effectuer des examens supplémentaires selon des méthodes valides et reconnues.

Principe

La méthode de coloration de Gram permet d'obtenir rapidement une différenciation des bactéries entre Gram-positives et Gram-négatives.

La coloration des bactéries dépend de la structure de leurs parois cellulaires. Lors de la coloration de Gram, les bactéries sont colorées par du violet cristallin, un colorant aniline. Après traitement avec une solution iodée (solution de Lugol), on obtient un complexe colorant-iodé. Les multiples couches des chaînes de muréine des parois cellulaires Gram-positives empêchent que le complexe colorant-iodé disparaisse au lavage lors de l'étape de décoloration, et les bactéries conservent leur coloration bleue violet. Les bactéries Gram-négatives, en revanche, ont une paroi cellulaire composée d'une chaîne de muréine à une seule couche : c'est pourquoi le décolorant disparaît avec la solution de décoloration. Les bactéries Gram-négatives sont colorées en rose à rouge par une contre-coloration effectuée à l'aide d'une solution de safranine.

Matériel des échantillons

Liquides corporels, exsudats, salive, produits liquides ou comportant des colonies

Réactifs

Art. 1.00567
 Solution de Lugol stabilisée avec PVP 1 l, 2,5 l
 pour la coloration selon Gram

Art. 1.09261
 Solution de Lugol (Iode et iodure de potassium en solution diluée) 1 l, 2,5 l
 pour la coloration selon Gram

Nécessaire en plus :

Art. 1.09217	Safranine en solution selon Gram pour la coloration selon Gram	500 ml, 2,5 l
Art. 1.09218	Violet cristallisé en solution selon Gram pour la coloration selon Gram	500 ml, 2,5 l
Art. 1.10218	Solution de décoloration selon GRAM pour la coloration selon Gram	500 ml, 2,5 l

En alternative :

Le kit de coloration 1.11885.0001 peut être utilisé à la place de la combinaison des réactifs individuelles :

Art. 1.11885.0001	Gram-Color	1 set
Set de coloration pour la coloration de Gram		

Préparation des échantillons

Le prélèvement d'échantillons doit être effectué par du personnel qualifié.

L'échantillon est placé sur un porte-objet exempt de toute trace de gras à l'aide d'une anse flambée. Il est ensuite frotté et étalé soit directement, soit avec une à deux gouttes de solution physiologique de chlorure de sodium (solution de Ringer). Après séchage à l'air, on procède à la fixation à la chaleur en faisant passer le frottis (côté frottis vers le haut) trois fois lentement dans le haut de la flamme d'un bec Bunsen. Laisser ensuite refroidir et colorer.

Les frottis séchés à l'air doivent être soigneusement fixés à la chaleur. Les frottis séchés à l'air doivent être soigneusement fixés à la chaleur afin d'éviter que de la matière se détache et contamine ainsi les solutions ou les autres porte-objets.

Tous les échantillons doivent être traités conformément aux règles de l'art. Tous les échantillons doivent être clairement identifiés.

Utiliser des instruments appropriés pour le prélèvement d'échantillons et la préparation, respecter les instructions du fabricant pour l'emploi / l'utilisation.

Lors de l'utilisation des réactifs auxiliaires adéquats, il y a lieu de respecter les consignes d'utilisation correspondantes.

Préparation du réactif

Les Solution de Lugol stabilisée avec PVP - pour la coloration selon Gram et Solution de Lugol (Iode et iodure de potassium en solution diluée) - pour la coloration selon Gram utilisées sont prêtes à l'emploi ; il n'est pas nécessaire de diluer les solutions étant donné que cela réduit le résultat de coloration et la stabilité.

Mode opératoire

Coloration dans la cuve de coloration

Lors de la coloration par le procédé à immersion, il est recommandé de diluer le Violet cristallisé en solution selon Gram avec de l'eau distillée dans le rapport 1 : 3.

Il est nécessaire de plonger et de déplacer les lames porte-objets dans les solutions ; une simple introduction donne des résultats de coloration insuffisants.

Les lames porte-objets doivent être égouttées conformément aux procédures de coloration pour éviter tout transfert non nécessaire des solutions.

Pour obtenir un résultat de coloration optimal, il convient de respecter les durées indiquées.

Porte-objet avec frottis fixé	
Violet cristallisé en solution selon Gram	1:30 minute
Eau du robinet courante	30 secondes
Solution de Lugol*	3 minutes
Eau du robinet courante	20 secondes
Solution de décoloration selon GRAM**	5 - 10 secondes
Eau du robinet courante	30 secondes
Safranine en solution selon Gram	1 minute
Eau du robinet courante	1 minute
Sécher à l'air (p.ex. pendant toute une nuit, ou à 50 °C dans l'armoire de séchage)	

* filtrer après trois passages la Solution de Lugol

** jeter après cinq passages la Solution de décoloration selon GRAM

Coloration sur le banc de coloration

Porte-objet avec frottis fixé		
Violet cristallisé en solution selon Gram	recouvrir complètement et laisser agir	1 minute
Solution de Lugol	rincer brièvement	
Solution de Lugol	recouvrir complètement et laisser agir	1 minute
Eau distillée	laver avec précaution	5 secondes
Solution de décoloration selon GRAM	agiter le porte-objet avec précaution jusqu'à ne plus voir aucun nuage de couleur, et jusqu'à ce que le frottis penne une couleur bleu-grisâtre	10 - 15 secondes
Eau distillée	laver avec précaution	5 secondes
Safranine en solution selon Gram	recouvrir complètement et laisser agir	1 minute
Eau distillée	laver avec précaution	5 secondes
Sécher à l'air (p.ex. pendant toute une nuit, ou à 50 °C dans l'armoire de séchage)		

Si l'on souhaite stocker des préparations hématologiques pendant plusieurs mois, il est conseillé de les recouvrir d'un produit de montage anhydre (p.ex. Neo-Mount™ ou Entellan™) et d'une lamelle couvre-objet. Les préparations colorées doivent être alors parfaitement sèches.

Pour l'examen microscopique de préparations colorées avec un grossissement >40x, il est recommandé d'utiliser de l'huile d'immersion.

Coloration dans le distributeur automatique de coloration

La coloration en distributeurs automatiques de coloration peut s'effectuer comme celle réalisée dans la cuve de coloration.

Résultat

Microorganismes Gram-positives	bleu violet
Microorganismes Gram-négatives	rose à rouge

Diagnostic d'erreurs

Fixation des préparations de frottis

Il est important d'effectuer une fixation à la chaleur suffisante avec un bec Bunsen ou dans une étuve, afin d'empêcher le potentiel infectieux des préparations et une prolifération des bactéries.

Pas de coloration des bactéries Gram-positives

L'opération critique de la coloration de Gram est la décoloration, qui peut être influencée par l'épaisseur du frottis. De plus, une solution de décoloration fraîche est très réactive. C'est pourquoi le résultat doit être analysé très soigneusement. Lors de la décoloration, les temps indiqués ici doivent être respectés scrupuleusement, faute de quoi on risque d'obtenir des résultats faux-négatifs.

Remarques techniques

Le microscope utilisé doit respecter les exigences d'un laboratoire de diagnostics médicaux.

En cas d'utilisation d'un automate de coloration, se conformer aux instructions du fabricant de l'appareil et du logiciel.

Éliminer l'excédent d'huile pour immersions avant l'archivage.

Caractéristiques de performance analytique

Les présents réactifs auxiliaires « Solution de Lugol stabilisée avec PVP » et « Solution de Lugol (Iode et iodure de potassium en solution diluée) » facilitent l'examen au microscope des structures biologiques comme décrit dans « Objectif prévu » du présent mode d'emploi. Ces produits ne doivent être utilisés que par des personnes agréées et qualifiées, ce qui englobe notamment la préparation des échantillons et des réactifs, la manipulation des échantillons, la prise de décisions en matière de contrôles appropriés et autres.

La performance analytique des produits est confirmée via l'analyse de chaque lot de production.

Pour les colorants suivants, la performance analytique a été confirmée au niveau des spécificité, sensibilité et répétabilité du produit avec un taux de 100 % :

Art. 1.00567 - Solution de Lugol stabilisée avec PVP

	Spécificité inter-essai	Spécificité inter-essai	Spécificité intra-essai	Spécificité intra-essai
Coloration de Gram				
Microorganismes Gram-positives	20/20	20/20	7/7	7/7
Microorganismes Gram-négatives	20/20	20/20	7/7	7/7

Résultats de la performance analytique

Art. 1.09261 - Solution de Lugol (Iode et iodure de potassium en solution diluée)

	Spécificité inter-essai	Spécificité inter-essai	Spécificité intra-essai	Spécificité intra-essai
Coloration de Gram				
Microorganismes Gram-positives	20/20	20/20	7/7	7/7
Microorganismes Gram-négatives	20/20	20/20	7/7	7/7

Résultats de la performance analytique

Les données des essais intra-lot (au sein du même lot) et inter-lot (sur différents lots) répertorient le nombre de structures dont la coloration est appropriée en relation avec le nombre d'essais effectués.

Les résultats de cette évaluation de performance confirment que les produits sont appropriés à l'usage prévu et peuvent être utilisés de manière fiable.

Diagnostic

Les diagnostics doivent être exclusivement effectués par des personnes autorisées et qualifiées.

Les nomenclatures en vigueur doivent être utilisées.

Cette méthode doit être appliquée dans le diagnostic humain à titre complémentaire.

Des tests plus poussés seront choisis et réalisés selon des méthodes reconnues.

Chaque étape doit être effectuée sous contrôle, afin d'exclure toute possibilité de résultat erroné.

Le contrôle du kit de coloration peut être effectué avec des bactéries Gram-positives et des bactéries Gram-négatives. Pour ce faire, il faut utiliser des cultures sur milieux nutritifs incubées 18 à 24 heures.

Stockage

Stocker les Solution de Lugol stabilisée avec PVP - pour la coloration selon Gram et Solution de Lugol (Iode et iodure de potassium en solution diluée) - pour la coloration selon Gram entre +15 °C et +25 °C.

A une température inférieure à +15 °C, on peut noter la formation de précipité de colorant dans les solutions de coloration. Dans ce cas, placer les flacons pendant 2 à 3 heures dans un bain marie chaud à env. 60 °C. De ce fait, la plus grande partie des précipités de colorant se dissout à nouveau. Filtre ensuite les solutions de coloration à travers un papier filtre.

Stabilité

Les Solution de Lugol stabilisée avec PVP - pour la coloration selon Gram et Solution de Lugol (Iode et iodure de potassium en solution diluée) - pour la coloration selon Gram peuvent être utilisées jusqu'à la date de péremption indiqué.

Après la première ouverture du flacon, conserver entre +15 °C et +25 °C et utiliser jusqu'à la date de péremption.

Tenir les flacons toujours bien fermés.

Capacité

env. 250 colorations / 500 ml

Remarques sur l'utilisation

Réservé à une utilisation professionnelle.

Pour éviter les erreurs, l'application doit être effectuée par un personnel qualifié.

Respecter les directives nationales relatives à la sécurité au travail et à l'assurance de la qualité.

Utiliser des microscopes équipés conformément au standard.

En cas de besoin, utiliser une centrifugeuse conforme à la norme de laboratoire et aux critères.

Protection contre les infections

Veiller impérativement à une protection efficace conformément aux directives des laboratoires.

Consignes d'élimination

Éliminer l'emballage conformément à la réglementation en vigueur.

Les solutions usagées et les solutions dont la date de péremption est dépassée doivent être traitées comme des déchets dangereux, en respectant les directives locales relatives à l'élimination des déchets. Pour commander les instructions sur l'élimination des déchets, cliquer sur le Quick Link « Hints for Disposal of Microscopy Products » sur www.microscopy-products.com. Au sein de l'UE s'applique le règlement CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) N° 1907/2006.

Réactifs auxiliaires

Art. 1.04699	Huile pour immersions pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 1.07960	Entellan™ produit de montage rapide pour la microscopie	500 ml

Art. 1.07961	Entellan™ néo produit de montage rapide pour la microscopie	100 ml, 500 ml, 1 l
Art. 1.09016	Neo-Mount™ agent de montage anhydre pour la microscopie	flacon compte- gouttes de 100 ml, 500 ml
Art. 1.09217	Safranine en solution selon Gram pour la coloration selon Gram	500 ml, 2,5 l
Art. 1.09218	Violet cristallisé en solution selon Gram pour la coloration selon Gram	500 ml, 2,5 l
Art. 1.10218	Solution de décoloration selon GRAM pour la coloration selon Gram	500 ml, 2,5 l
Art. 1.11885	Gram-Color Set de coloration pour la coloration de Gram	1 set

Classification des matières dangereuses

Art. 1.00567

Art. 1.09261

Tenir compte de la classification des matières dangereuses indiquées sur l'étiquette et les indications de la fiche de données de sécurité.
La fiche de données de sécurité est disponible sur le site web et sur demande.

Composants principaux des produits

Art. 1.00567

PVP-Iod 50 g/l
KI 10 g/l
1 l = 1,02 kg

Art. 1.09261

I₂ 3,4 g/l
KI 6,8 g/l
1 l = 1,01 kg

Remarque générale

Si un incident grave s'est produit durant ou par suite de l'utilisation, veuillez informer de celui-ci le fabricant et/ou son mandataire et votre autorité nationale.

Littérature

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
3. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Edition

Art. 1.00567



H318 : Provoque de graves lésions des yeux.

H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P273 : Éviter le rejet dans l'environnement.

P280 : Porter 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.

P501 : Éliminer le contenu/ récipient dans une installation d'élimination des déchets agréés.

Historique des révisions

Version	Commentaire concernant les modification
2024-Jul-24	Version initiale avec l'introduction de l'historique des révisions



Respectez les
consignes d'utili-
sation



Fabricant



N° catalogue



Code de lot



Attention : observez la
documentation complé-
mentaire



Utilisable
jusqu'au
AAAA-MM-JJ



Limitation de
température

Status: 2024-Jul-24

MilliporeSigma est le nom de l'activité Life Science américaine et canadienne de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne et/ou ses sociétés affiliées. Tous droits réservés.
MilliporeSigma et Sigma-Aldrich sont des marques de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne. Toutes les autres marques citées appartiennent à leurs propriétaires respectifs.
Des informations détaillées sur les marques sont disponibles via des ressources accessibles au public.



EMD Millipore Corporation, 400 Summit Drive, Burlington MA 01803,
USA, Tel. +1-978-715-4321
MilliporeSigma Canada Ltd., 2149 Winston Park Dr, Oakville, Ontario,
L6H 6J8, Canada, Phone: +1 800-565-1400
www.sigmaaldrich.com

**Millipore
Sigma**

1.00567.1000 **REF**
 1.00567.2500
 1.09261.1000
 1.09261.2500

Microscopía

Solución de Lugol estabilizada con PVP

para la tinción de Gram

Solución de Lugol (solución diluida de yodo y yoduro potásico)

para la tinción de Gram

Solamente para uso profesional

IVD

Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Finalidad prevista

Las presentes "Solución de Lugol estabilizada con PVP - para la tinción de Gram" y "Solución de Lugol (solución diluida de yodo y yoduro potásico) - para tinción de Gram" son utilizadas para el diagnóstico celular en la medicina humana y se emplean en el examen bacteriológico de muestras de origen humano. Hay soluciones listas para el uso que, junto con otros materiales de diagnóstico *in vitro* pertenecientes a nuestra cartera, hace evaluables determinadas para el diagnóstico estructuras de destino bacterianas (bacterias Gram positivas y Gram negativas) mediante fijación, tinción, contratinción, montaje en material de examen bacteriológico, como pueden ser frotis de líquidos corporales.

Las estructuras sin teñir son relativamente pobres en contrastes y apenas si pueden diferenciarse bajo el microscopio óptico. Las imágenes generadas con ayuda de las soluciones de tinción permiten a un examinador autorizado y cualificado reconocer mejor la forma y la estructura. Para un diagnóstico final deben realizarse pruebas más complejas según métodos reconocidos y válidos.

Principio

El método de tinción de Gram permite realizar con rapidez una diferenciación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

El comportamiento de las bacterias respecto a la tinción depende de la estructura de las paredes celulares de las bacterias. Durante la tinción de Gram, las bacterias son teñidas con violeta cristal, un colorante de anilina. Después del tratamiento con solución de yodo (solución de Lugol) se produce un complejo de colorante y yodo. La red de mureína de varias capas que presentan las paredes celulares Gram positivas evita la lixiviación del complejo de colorante y yodo durante el paso de decoloración, las bacterias conservan su tinción azul violeta. Contrariamente a esto, las bacterias Gram negativas disponen de una pared celular compuesta por una red de mureína con una sola capa, por lo que devuelven el colorante con la solución de decoloración. Las bacterias Gram negativas son teñidas de color rosa a rojo por medio de una contratinción con solución de safranina.

Material de las muestras

Líquidos corporales, exudados, pus, material de colonias líquido o sólido

Reactivos

Art. 1.00567
 Solución de Lugol estabilizada con PVP 1 l, 2,5 l
 para la tinción de Gram

Art. 1.09261
 Solución de Lugol (solución diluida de yodo y yoduro potásico) 1 l, 2,5 l
 para la tinción de Gram

Necesario además:

Art. 1.09217 Safranina en solución según Gram 500 ml, 2,5 l
 para la tinción de Gram
 Art. 1.09218 Violeta cristal en solución según Gram 500 ml, 2,5 l
 para la tinción de Gram
 Art. 1.10218 Solución decolorante según Gram 500 ml, 2,5 l
 para la tinción de Gram

Alternativamente:

En lugar de la combinación de los reactivos sueltos puede utilizarse también el kit de tinción 1.11885.0001:

Art. 1.11885.0001
 Gram-Color 1 set
 Equipo de tinción para la tinción de Gram

Preparación de las muestras

La toma de muestra debe ser realizada por personal especializado.

El material de ensayo es aplicado en un portaobjetos exento de grasa sirviéndose de un asa bacteriológica esterilizada al rojo vivo. A continuación se extiende y se le realiza un frotis, directamente o con 1 a 2 gotas de solución fisiológica de cloruro sódico (solución de Ringer). Después del secado al aire se efectúa la termofijación haciendo pasar el frotis (con el lado del frotis mirando hacia arriba) tres veces lentamente a través de la parte superior de la llama del mechero de Bunsen. Después, esperar hasta que se haya enfriado y teñir.

Los frotis secados al aire han de ser termofijados con gran esmero. Esto impide que haya peligro de infección y reduce el desplazamiento de material por flotación y, debido a esto, la contaminación de soluciones y otros portaobjetos.

Todas las muestras deben tratarse de acuerdo con el estado de la tecnología. Todas las muestras deben estar rotuladas inequívocamente.

Deben usarse instrumentos adecuados para la toma de muestras y en la preparación, y deben seguirse las instrucciones del fabricante para la aplicación / el empleo.

Al usar los correspondientes reactivos auxiliares deberán tenerse en cuenta las respectivas instrucciones de empleo.

Preparación del reactivo

Las Solución de Lugol estabilizada con PVP - para la tinción de Gram y Solución de Lugol (solución diluida de yodo y yoduro potásico) - para tinción de Gram para los procesos de tinción están listas para el uso, la dilución de las soluciones no es necesaria y empeora el resultado de la tinción así como la estabilidad.

Técnica

Tinción en la cubeta de tinción

En caso de tinción por el procedimiento de inmersión se recomienda diluir la Violeta cristal en solución según Gram con agua destilada en relación 1:3.

Los portaobjetos han de ser inmersos y movidos en las soluciones, la simple introducción proporcionará resultados de tinción insuficientes.

Los portaobjetos deberían ser escurridos bien por goteo después de los diferentes pasos de tinción, de esta manera se podrá evitar el innecesario arrastre de soluciones.

Para conseguir un óptimo resultado de tinción, deberían respetarse los períodos indicados.

Portaobjetos con frotis fijado	
Violeta cristal en solución según Gram	1:30 minuto
Agua corriente del grifo	30 segundos
Solución de Lugol*	3 minutos
Agua corriente del grifo	20 segundos
Solución decolorante según Gram**	5 - 10 segundos
Agua corriente del grifo	30 segundos
Safranina en solución según Gram	1 minuto
Agua corriente del grifo	1 minuto
Secar al aire (p.ej. durante la noche o a 50 °C en el armario de secado)	

* filtrar la Solución de Lugol después de 3 ciclos

** desechar la Solución decolorante según Gram después de 5 ciclos

Tinción en el banco de tinción

Portaobjetos con frotis fijado		
Violeta cristal en solución según Gram	cubrir completamente y dejar actuar	1 minuto
Solución de Lugol	enjuagar brevemente	
Solución de Lugol*	cubrir completamente y dejar actuar	1 minuto
Agua destilada	lavar con cuidado	5 segundos
Solución decolorante según Gram	mover el portaobjetos con cuidado hasta que ya no se desprendan nubes de color y el frotis tenga un aspecto gris azulado	10 - 15 segundos
Agua destilada	lavar con cuidado	5 segundos
Safranina en solución según Gram	cubrir completamente y dejar actuar	1 minuto
Agua destilada	lavar con cuidado	5 segundos
Secar al aire (p.ej. durante la noche o a 50 °C en el armario de secado)		

Para el almacenamiento de preparados bacteriológicos durante varios meses se recomienda el montaje con medios de montaje anhidros (p. ej. Neo-Mount™ o Entellan™) y cubreobjetos. Para ello, los preparados han de ser secados con gran esmero.

Para el análisis de preparados teñidos con un aumento microscópico >40x se recomienda el uso de aceite de inmersión.

Tinción en el aparato automático de tinción

La tinción en un aparato automático de tinción puede ser realizada de la misma manera que la tinción en una cubeta de tinción.

Resultado

Microorganismos Gram positivos	violeta azulado
Microorganismos Gram negativos	rosa a rojo

Localización de errores

Fijación de preparados de frotis

Es importante realizar una termofijación suficiente por medio de un mechero Bunsen o en un armario de calor para eliminar el potencial infeccioso de los preparados y evitar que las bacterias sigan creciendo.

Ninguna tinción de bacterias Gram positivas

El paso crítico en la tinción de Gram es el paso de descoloración, que puede ser influenciado por el espesor del frotis. Por lo demás, una solución decolorante fresca es muy reactiva, por lo que el resultado debería ser evaluado cuidadosamente. Durante la descoloración, los tiempos indicados aquí deberían ser respetados con máxima exactitud, ya que de lo contrario se podrían presentar resultados incorrectamente negativos.

Notas técnicas

El microscopio usado debería corresponder a los requisitos de un laboratorio de diagnóstico médico. Si se utilizan aparatos automáticos de tinción, deberán tenerse en cuenta las instrucciones de operación del fabricante, tanto del aparato como del software. Eliminar el aceite de inmersión en exceso antes de archivar.

Características de rendimiento analítico

Los reactivos auxiliares presentes “Solución de Lugol estabilizada con PVP” y “Solución de Lugol (solución diluida de yodo y yoduro potásico)” facilitan el examen microscópico de estructuras biológicas como se describe en la “Finalidad prevista” en esta instrucción de uso. Solo deben utilizar los productos personas autorizadas y cualificadas. Esta utilización incluye, entre otras actividades, la preparación de muestras y reactivos, la manipulación de muestras, as decisiones relativas a los controles adecuados, etc.

El rendimiento analítico de los productos se confirma analizando cada lote de producción.

En el caso de las siguientes tinciones, se confirmó el rendimiento analítico en términos de especificidad, sensibilidad y repetibilidad del producto, con una tasa del 100 %:

Art. 1.00567 - Solución de Lugol estabilizada con PVP

	Especifici- dad inter- ensayos	Especifici- dad inter- ensayos	Especi- ficidad intraensa- yos	Especi- ficidad intraensa- yos
Tinción de Gram				
Microorganismos Gram positivos	20/20	20/20	7/7	7/7
Microorganismos Gram negativos	20/20	20/20	7/7	7/7

Resultados de rendimiento analítico

Art. 1.09261 - Solución de Lugol (solución diluida de yodo y yoduro potásico)

	Especifici- dad inter- ensayos	Especifici- dad inter- ensayos	Especi- ficidad intraensa- yos	Especi- ficidad intraensa- yos
Tinción de Gram				
Microorganismos Gram positivos	20/20	20/20	7/7	7/7
Microorganismos Gram negativos	20/20	20/20	7/7	7/7

Resultados de rendimiento analítico

Los datos intraensayos (realizados en el mismo lote) e interensayos (realizados en diferentes lotes) enumeran las estructuras correctamente teñidas en relación con el número de ensayos realizados.

Los resultados de esta evaluación de rendimiento confirman la aptitud de los productos para el uso previsto, así como su fiabilidad de funcionamiento.

Diagnóstico

Los diagnósticos deberán ser establecidos solamente por personas autorizadas y cualificadas. Deberán emplearse terminologías vigentes. Este método debe aplicarse complementariamente en el diagnóstico humano. Deberán elegirse y realizarse ensayos ulteriores según métodos reconocidos.

Cada aplicación debería implicar controles adecuados para descartar resultados erróneos. Los controles del kit de tinción pueden realizarse con bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Para ello deben utilizarse cultivos procedentes de medios de cultivo incubados durante 18 - 24 horas.

Almacenamiento

Guardar las Solución de Lugol estabilizada con PVP - para la tinción de Gram y Solución de Lugol (solución diluida de yodo y yoduro potásico) - para tinción de Gram de +15 °C a +25 °C.

A temperaturas inferiores a 15 °C puede precipitar colorante de las soluciones de tinción. En tal caso han de colocarse los frascos durante 2 - 3 horas en un baño de agua aprox. 60 °C. De esta manera se redisuelve la mayor parte de los precipitados de colorantes. Las soluciones de tinción deben filtrarse seguidamente a través de un papel de filtro.

Estabilidad

Las Solución de Lugol estabilizada con PVP - para la tinción de Gram y Solución de Lugol (solución diluida de yodo y yoduro potásico) - para tinción de Gram pueden ser utilizadas hasta la fecha de caducidad indicada.

Después de abrir el frasco por primera vez, el contenido almacenado entre +15 °C y +25 °C es utilizable hasta la fecha de caducidad indicada.

Los frascos deben mantenerse siempre bien cerrados.

Capacidad

aprox. 250 tinciones / 500 ml

Notas sobre el empleo

Solamente para uso profesional.

Para evitar errores, la aplicación debería ser realizada por personal especializado.

Deben cumplirse las directivas nacionales sobre seguridad en el trabajo y aseguramiento de la calidad.

Deben emplearse microscopios equipados de acuerdo con el estándar. Si es necesario, deberá utilizarse una centrifugadora que corresponda al estándar de laboratorios y a las exigencias.

Protección contra infecciones

Debe observarse a toda costa una protección eficaz contra infecciones de acuerdo con las directivas de laboratorio.

Indicaciones para la eliminación de residuos

El envase debe ser eliminado de acuerdo con las directivas válidas de eliminación de residuos.

Las soluciones usadas y las soluciones caducadas deben eliminarse como desecho peligroso, debiéndose cumplir las directivas locales de eliminación de residuos. Podrá pedirse información sobre los procedimientos de eliminación bajo el Quick Link “Hints for Disposal of Microscopy Products” en www.microscopy-products.com. Dentro de la UE tiene validez el REGLAMENTO (CE) Nº 1272/2008 sobre la clasificación, el etiquetado y el envasado de sustancias y mezclas, por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) Nº 1907/2006.

Reactivos auxiliares

Art. 1.04699	Aceite de inmersión para microscopía	frasco gotero de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 1.07960	Entellan™ medio de montaje rápido para microscopía	500 ml
Art. 1.07961	Entellan™ Nuevo medio de montaje rápido para microscopía	100 ml, 500 ml, 1 l

Art. 1.09016	Neo-Mount™ medio de montaje anhidro para microscopía	frasco gotero de 100 ml, 500 ml
Art. 1.09217	Safranina en solución según Gram para la tinción de Gram	500 ml, 2,5 l
Art. 1.09218	Violeta cristal en solución según Gram para la tinción de Gram	500 ml, 2,5 l
Art. 1.10218	Solución decolorante según Gram para la tinción de Gram	500 ml, 2,5 l
Art. 1.11885	Gram-Color Equipo de tinción para la tinción de Gram	1 set

Clasificación de sustancias peligrosas

Art. 1.00567
Art. 1.09261
Tener en cuenta la clasificación de sustancias peligrosas en la etiqueta y las indicaciones en la ficha de datos de seguridad.
La ficha de seguridad está disponible en el sitio web y a solicitud.

Componentes principales de los productos

Art. 1.00567
PVP-Yodo 50 g/l
KI 10 g/l
1 l = 1,02 kg

Art. 1.09261
I₂ 3,4 g/l
KI 6,8 g/l
1 l = 1,01 kg

Aviso general

Si se produce un incidente grave durante el uso o a causa del mismo, sírvase informar al fabricante y/o a su apoderado y a su autoridad nacional.

Literatura

- 1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
- 2. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
- 3. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Edition

Art. 1.00567



H318: Provoca lesiones oculares graves.
H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P273: Evitar su liberación al medio ambiente.
P280: Llevar equipo de protección para los ojos/ la cara.
P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.
P501: Eliminar el contenido/ el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.

Historial de revisiones

Versión	Comentario de modificación
2024-Jul-24	Versión inicial con la introducción del Historial de revisiones

Observe las instrucciones de uso

Fabricante

Número de catálogo

Código del lote

Atención, observar la documentación pertinente

Utilizable hasta AAAA-MM-DD

Delimitación de la temperatura

Status: 2024-Jul-24