

POUŽITÍ

Reagencie grambarviva Sigma-Aldrich jsou určeny pro použití při zobrazování grampozitivních a gramnegativních organizmů ve filmech a tkáních. Reagencie grambarviva jsou určeny k "diagnostice in vitro."

Grambarvivo se používá ke klinickému zobrazení dvou odlišných skupin mikroorganismů. Organismy, které uchovávají základní barvivo (krystalová violet) se nazývají grampozitivní. Organismy, které ztratí základní barvivo během odbarvování se nazývají gramnegativní. Mechanismus, kterým si grampozitivní organismy uchovávají základní barvivo není znám, ale chemie a struktura buněčných stěn je zcela určité do procesu zapojena.

Byla popsána řada modifikací původní Gram metody.¹ Postup společnosti Sigma-Aldrich je založen na práci Huckera a Conna², používá roztok krystalové violeti a amonného oxalátu, který je užitečný při diferenciaci a je poměrně stabilní.

REAGENCE

ROZTOK KRystalové VIOLETI, katalogové č. HT90-1

Certifikovaná krystalová violet, 2,3 %, amonný oxalát, 0,1 % a 20 % ethylalkohol, SD3A.

ROZTOK GRAMOVA JÓDU, katalogové č. HT90-2

jód, 0,33 % a jodid draselný, 0,66 %.

ROZTOK ODBARVOVAČE, katalogové č. HT90-3

Potřebné pouze pro filmy.

Isopropylalkohol, 75 % a aceton, 25 %.

ROZTOK SAFRANINU, katalogové č. HT90-4

Certifikovaný safranin 0,6 % v 20 % ethylalkoholu, SD3A.

ROZTOK TARTRAZINU, katalogové č. HT30-2-8

Potřebné pouze pro tkáň.

Tartrazin, 0,25 % a kyselina octová, 0,25 %.

ULOŽENÍ A STABILITA:

Skladujte reagencie při pokojové teplotě (18–26 °C). Štítek reagencie uvádí datum použitelnosti. Použít jednou a znehodnotit.

PŘÍPRAVA:

Reagencie jsou dodávána připravená k okamžitému použití.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagenty. Odpad likvidujte v souladu se všemi místními, státními a oblastními předpisy. Viz Bezpečnostní list k materiálu, který uvádí aktuální informace o riziku, nebezpečí a bezpečnosti.

Gramova kontrolní sklíčka TISSUE-TROL jsou parafrinové zvířecí tkáň obsahující gramnegativní a grampozitivní bakterie a je třeba s nimi zacházet jako s potenciálně infekčními.

US prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztok krystalové violeti je VZNEĚTLIVÝ a DRÁŽDIVÝ. Dráždí dýchací systém a pokožku. Riziko vážného poškození očí. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Škodlivý pro vodní organismy, může způsobit dlouhodobé negativní dopady ve vodním prostředí. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. Zabraňte úniku do životního prostředí. Viz speciální instrukce / bezpečnostní listy.

Roztok jódu Grama Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Odbarvovací roztok je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Vysoce hořlavý. Dráždí dýchací systém a pokožku. Riziko vážného poškození očí. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy. Udržujte dobře uzavřenou nádobu na dobře větraném místě.

Alkoholový roztok safraninu je HOŘLAVÝ a ŠKODLIVÝ. Škodlivé při vdechnutí, v kontaktu s pokožkou a spolknutím. Škodlivý: možné riziko ireverzibilních vlivů vdechnutím, v kontaktu s pokožkou a požitím. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření. Používejte vhodné ochranné oděvy a rukavice. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Reagenční alkohol je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy. Zasažené orgány: Nervy a játra.

Xylen je HOŘLAVÝ a ŠKODLIVÝ. Možné riziko poruch plodnosti. Může poškodit nenarozené dítě. Škodlivý je vdechnutím a v kontaktu s pokožkou. Dráždí dýchací systém a pokožku. Riziko vážného poškození očí. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Aceton je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči. Opakovaná expozice může způsobit vysušení a praskání pokožky. Výpary mohou způsobit utupělost a závratě. Udržujte nádobu na dobře větraném místě. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Zasažené orgány: Játra a ledviny.

EU Prohlášení o rizicích a bezpečnosti (Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná)

Roztok krystalové violeti je ŠKODLIVÝ. Hořlavý. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Škodlivý pro vodní organismy, může způsobit dlouhodobé negativní dopady ve vodním prostředí. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. Zabraňte úniku do životního prostředí. Viz speciální instrukce / bezpečnostní listy.

Roztok jódu Grama Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Odbarvovací roztok je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Vysoce hořlavý. Dráždí dýchací systém a pokožku. Riziko vážného poškození očí. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy.

Roztok safraninu O je HOŘLAVÝ. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření.

Reagenční alkohol je VYSOCE HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Vysoce hořlavý. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy.

Xylen je ŠKODLIVÝ. Hořlavý. Škodlivý je vdechnutím a v kontaktu s pokožkou. Dráždí oči. Zamezte kontaktu s očima.

Aceton je VYSOCE HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Vysoce hořlavý. Dráždí oči. Opakovaná expozice může způsobit vysušení a praskání pokožky. Výpary mohou způsobit utupělost a závratě. Udržujte nádobu na dobře větraném místě. Chraňte před zdrojem zapálení – zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc.

POSTUP

ODBĚR VZORKŮ:

Doporučuje se provádět odběr vzorků v souladu s dokumentem M29-A2 směrnice NCCLS. Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplné zajištění, že krevní vzorky nebo tkáň nebudou přenášet infekci. Proto všechny krevní deriváty nebo tkáňové vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční.

Filmy: Jakékoli dobře připravené, horkem upravené filmy jsou vhodné. Tloušťka filmů ovlivňuje čas potřebný k odbarvení.

Tkáň: Jakékoli dobře fixované parafrinové řezy nařezané na tloušťku 5 mikronů.

POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

Do každého cyklu musí být zařazena sklíčka s pozitivní kontrolou

ALKOHOL, ABSOLUTNÍ

ACETON, STUPEŇ ACS

XYLEN

Mikroskop

POZNÁMKY:

Je třeba dávat pozor, aby sklíčka nebyla příliš odbarvena odbarvovacím roztokem. Dokonce i grampozitivní organismy ztratí barevnost a zobrazí se červeně, jestliže je odbarvovací roztok ponechán na sklech příliš dlouhou dobu.⁴

Údaje získané z tohoto postupu slouží pouze jako diagnostická pomůcka a měly by se prověřit ve spojení s jinými klinickými diagnostickými testy nebo informacemi.

POSTUP:

POSTUP PRO FILMY:

1. Zavlážete film roztokem krystalové violeti, katalogové č. HT90-1, na **1 minutu**.
2. Opláchněte řádně v deionizované vodě
3. Zavlážete film roztokem Gramova jódu, katalogové č. HT90-2, na **1 minutu**.
4. Opláchněte řádně v deionizované vodě
5. Zavlážete odbarvovacím roztokem, katalogové č. HT90-3, na až **10 sekund** až se barva přestane odbarvovat.
6. Opláchněte řádně v deionizované vodě
7. Zavlážete film roztokem safraninu, katalogové č. HT90-4, na **1 minutu**.
8. Opláchněte řádně v deionizované vodě
9. Nechat oschnout na vzduchu a mikroskopicky sklíčka vyhodnotit.

POSTUP PRO TKÁŇ:³

1. Odstraňte parafin a hydratujte řezy deionizovanou vodou.
2. Vložte sklíčka do stojanu na barvení a pokryjte řezy roztokem krystalové violeti, katalogové č. HT90-1, na **1 minutu**.
3. Odstraňte roztok krystalové violeti a opláchněte řádně v deionizované vodě.
4. Zavlážete film mořicím roztokem Gramova jódu, katalogové č. HT90-2, na **5 minut**.
5. Propláchněte v deionizované vodě a vysajte do sucha.
6. Provedte diferenciaci v absolutním alkoholu nebo acetonu.
7. Opláchněte v deionizované vodě
8. Pokryjte sklíčka roztokem safraninu O, katalogové č. HT90-4, na **30–60 sekund**.
9. Propláchněte v deionizované vodě a vysajte do sucha.
10. Pokryjte řezy roztokem tartrazinu, katalogové č. HT30-2, na **5–10 sekund**.
11. Vysajte přebytečné barvivo.
12. Propláchněte ve 2 vyměňovaných lázních absolutního alkoholu.
13. Vyčistěte v xyleny a namontujte.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

Grampozitivní organizmy — Nachové

Gramnegativní organizmy — Červené

Pokud se zjištěné výsledky liší od očekávaných, kontaktujte prosím technické služby společnosti Sigma-Aldrich za účelem konzultace.

REFERENCE

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

Sigma-Aldrich, Inc. garantuje, že její produkty se shodují s informacemi obsaženými v této a jiných publikacích Sigma-Aldrich. Kupující musí stanovit vhodnost produktu(ů) pro dané použití. Mohou platit dodatečné podmínky. Viz zadní strana faktury nebo útržek obalu, kde jsou uvedeny dodatky k prodejním podmínkám.

Postup č. HT90
Předchozí revize: 2003-09
Revidováno: 2005-01



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Velká Británie

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765
Technické služby: 800-325-0250 nebo volejte na 314-771-3122
nebo e-mailujte na clintech@sial.com
Objednávky: 800-325-3010 nebo volejte na 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Německo 49-7329-970