

VERWENDUNGSZWECK

Die Gram-Färbereagenzien von Sigma-Aldrich werden zur Darstellung Gram-positiver und Gram-negativer Organismen in Filmen und Gewebe verwendet. Die Gram-Färbereagenzien sind für die „In-vitro-Diagnostik“ bestimmt.

Die Gram-Färbung wird klinisch zur Darstellung zweier Gruppen von Mikroorganismen verwendet. Die, die den primären Farbstoff (Kristallviolett) behalten, werden Gram-positiv genannt. Die, die den primären Farbstoff in einem Entfärbungsschritt verlieren, werden Gram-negativ genannt. Die Mechanismen, mit denen Gram-positive Organismen den primären Farbstoff zurückhalten, sind nicht bekannt; sehr wahrscheinlich sind jedoch die Chemie und Struktur der Zellwände daran beteiligt.

Es wurden mehrere Modifizierungen der ursprünglichen Gram-Methode beschrieben.¹ Das Verfahren von Sigma-Aldrich beruht auf der Arbeit von Hucker und Conn² und verwendet eine Kristallviolett-Ammoniumoxalat-Lösung, die bei der Differenzierung hilft und sehr stabil ist.

REAGENZIEN

KRISTALLVIOLETT-LÖSUNG, Bestell-Nr. HT90-1

Zertifiziertes Kristallviolett, 2,3 %, Ammoniumoxalat, 0,1 %, und 20 % Ethylalkohol, SD-3A.

GRAMS JOD-LÖSUNG, Bestell-Nr. HT90-2

Jod, 0,33 %, und Kaliumjodid, 0,66 %.

ENTFÄRBELOÖSUNG, Bestell-Nr. HT90-3

Nur für Filme erforderlich.

Isopropylalkohol, 75 % und Azeton, 25 %.

SAFRANIN-O-LÖSUNG, Bestell-Nr. HT90-4

Zertifiziertes Safranin 0,6 % in 20 % Ethylalkohol, SD-3A.

TARTRAZIN-LÖSUNG, Bestell-Nr. HT30-2-8

Nur für Gewebe erforderlich.

Tartrazin, 0,25 %, und Essigsäure, 0,25 %.

AUFBEWAHRUNG UND STABILITÄT:

Bei Raumtemperatur (18–26 °C) aufbewahren. Das Verfallsdatum ist auf dem Reagenzietikett angegeben. Nur ein Mal verwenden und dann entsorgen.

VORBEREITUNG:

Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig.

VORSICHTSMASSNAHMEN:

Bei der Handhabung von Laborreagenzien sollten normale Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden. Bei der Entsorgung von Abfällen alle örtlichen, staatlichen und nationalen Vorschriften befolgen. Aktuelle Hinweise zu Risiken, Gefahren und Sicherheitsmaßnahmen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen.

Bei TISSUE – TROL Kontrollobjektträgern für die Gramfärbung handelt es sich um paraffineingebettetes Tiergewebe, das gramnegative und grampositive Bakterien enthält und als potentiell infektiös zu betrachten ist.

US-Gefahren- und Sicherheitsangaben

Kristallviolett-Lösung ist BRENNBAR und ein REIZMITTEL. Reizt Atemwege und Haut. Gefahr erster Augenschäden. Verdacht auf krebserzeugende Wirkung. Schädlich für Wasserorganismen; kann langfristig Umweltschäden im Gewässersystem verursachen. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Siehe spezielle Anweisungen/Sicherheitsdatenblätter.

Grams Jod-Lösung. Vorsicht: Die Substanz ist noch nicht vollständig geprüft.

Entfärbelösung ist ENTZÜNDLICH und ein REIZMITTEL. Hochentzündlich. Reizt Atemwege und Haut. Gefahr erster Augenschäden. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen. Den Behälter fest verschlossen und an einem gut durchlüfteten Ort aufbewahren.

Safranin-O-Lösung ist ENTZÜNDLICH und SCHÄDLICH. Schädlich bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Schädlich: Irreversible Schäden möglich bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Reizt Augen, Atmungssystem und Haut. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).

Reagenz-Alkohol ist ENTZÜNDLICH und ein REIZMITTEL. Reizt Augen, Atmungssystem und Haut. Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen. Zielorgane: Nerven und Leber.

Xylen ist ENTZÜNDLICH und SCHÄDLICH. Mögliches Risiko einer beeinträchtigten Fruchtbarkeit. Schädigungen des ungeborenen Kindes möglich. Schädlich bei Einatmen und bei Kontakt mit der Haut. Reizt Atemwege und Haut. Gefahr erster Augenschäden. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).

Azeton ist ENTZÜNDLICH und ein REIZMITTEL. Reizt die Augen. Wiederholte Exposition kann zu trockener oder rissiger Haut führen. Dämpfe können Schläfrigkeit und

Schwindel verursachen. Den Behälter an einem gut durchlüfteten Ort aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Zielorgane: Leber und Nieren.

EU-Gefahren- und Sicherheitsangaben (Vorsicht: Substanzen sind noch nicht vollständig geprüft)

Kristallviolett-Lösung ist SCHÄDLICH. Entzündlich. Verdacht auf krebserzeugende Wirkung. Schädlich für Wasserorganismen; kann langfristig Umweltschäden im Gewässersystem verursachen. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Siehe spezielle Anweisungen/Sicherheitsdatenblätter.

Grams Jod-Lösung. Vorsicht: Die Substanz ist noch nicht vollständig geprüft.

Entfärbelösung ist ENTZÜNDLICH und ein REIZMITTEL. Hochentzündlich. Reizt Atemwege und Haut. Gefahr erster Augenschäden. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Safranin-O-Lösung ist ENTZÜNDLICH. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen.

Reagenz-Alkohol ist HOCHENTZÜNDLICH und ein REIZMITTEL. Hochentzündlich. Reizt Augen, Atmungssystem und Haut. Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Xylen ist SCHÄDLICH. Entzündlich. Schädlich bei Einatmen und Kontakt mit der Haut. Reizt die Haut. Kontakt mit den Augen vermeiden.

Azeton ist HOCHENTZÜNDLICH und ein REIZMITTEL. Hochentzündlich. Reizt die Augen. Wiederholte Exposition kann zu trockener oder rissiger Haut führen. Dämpfe können Schläfrigkeit und Schwindel verursachen. Den Behälter an einem gut durchlüfteten Ort aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen.

VERFAHREN

PROBENNAHME:

Es wird empfohlen, die Probenahme gemäß NCCLS-Dokument M29-A2 durchzuführen. Keine Testmethode kann eine absolute Gewähr dafür liefern, dass Blut- und Gewebeproben keine Infektionen übertragen. Deshalb müssen alle Blutderivate und Gewebeproben als potenziell infektiös behandelt werden.

Filme: Es eignen sich alle gut vorbereiteten, hitzefixierten Filme. Die Dicke des Films hat einen Einfluss auf die erforderliche Zeit zur Entfärbung.

Gewebe: Jegliche gut fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte von 5 Mikron.

SPEZIELL ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN:

In jedem Durchlauf sollten positive Objektträger-Kontrollen getestet werden

ALKOHOL, ABSOLUT

AZETON, ACS-GÜTE

XYLEN

Mikroskop

HINWEISE:

Es muss darauf geachtet werden, dass es zu keiner übermäßigen Entfärbung der Objektträger mit der Entfärbelösung kommt. Sogar Gram-positive Organismen werden farblos und erscheinen rot, wenn die Entfärbelösung übermäßig lange auf den Objektträgern bleibt.⁴

Die aus diesem Verfahren gewonnenen Daten dienen nur als Hilfe zur Diagnose und sollten im Zusammenhang mit anderen klinischen Diagnostiktests und Informationen überprüft werden.

VERFAHREN:

VERFAHREN FÜR FILME:

1. Den Film mit Kristallviolett-Lösung, Bestell-Nr. HT90-1, **1 Minute** überschwemmen.
2. In entionisiertem Wasser gründlich spülen.
3. Den Film mit Grams Jod-Lösung, Bestell-Nr. HT90-2, **1 Minute** überschwemmen.
4. In entionisiertem Wasser gründlich spülen.
5. Mit Entfärbelösung, Bestell-Nr. HT90-3, bis zu **10 Sekunden** oder bis keine Farbe mehr ausgewaschen wird überschwemmen.
6. In entionisiertem Wasser gründlich spülen.
7. Den Film mit Safranin-O-Lösung, Bestell-Nr. HT90-4, **1 Minute** überschwemmen.
8. In entionisiertem Wasser gründlich spülen.
9. Den Film an der Luft trocknen lassen und unter dem Mikroskop untersuchen.

VERFAHREN FÜR GEWEBE:⁵

1. Die Gewebeschnitte entparaffinieren und zu entionisiertem Wasser hydrieren.
2. Die Objektträger in den Probenhalter stellen und mit Kristallviolett-Lösung, Bestell-Nr. HT90-1, **1 Minute** bedecken.
3. Die Kristallviolett-Lösung abfließen lassen und in entionisiertem Wasser gründlich spülen.
4. In Grams Jod-Lösung, Bestell-Nr. HT90-2, **5 Minuten** beizen.
5. In entionisiertem Wasser spülen und die Schnitte trockentupfen.
6. In absolutem Alkohol oder Azeton differenzieren.
7. In entionisiertem Wasser spülen.
8. Die Objektträger mit Safranin-O-Lösung, Bestell-Nr. HT90-4, **30–60 Sekunden** bedecken.
9. In entionisiertem Wasser spülen und die Schnitte trockentupfen.
10. Die Schnitte mit Tartrazin-Lösung, Bestell-Nr. HT30-2, **5–10 Sekunden** bedecken.
11. Die überschüssige Farbe abtupfen.
12. In 2 Mal gewechseltem absolutem Alkohol spülen.
13. In Xylen klären und fixieren.

LEISTUNGSMERKMALE

Gram-positive Organismen – Violett

Gram-negative Organismen – Rot

Falls sich die beobachteten Ergebnisse von den erwarteten Ergebnissen unterscheiden, bitte den technischen Kundendienst von Sigma-Aldrich verständigen.

LITERATURANGABEN

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

Sigma-Aldrich, Inc. gewährleistet, dass ihre Produkte mit den Angaben in dieser und anderen Sigma-Aldrich-Publikationen übereinstimmen. Der Anwender entscheidet selbst über die Eignung des Produkts für den jeweiligen Einsatzzweck. Es können zusätzliche Geschäftsbedingungen gelten. Weitere Informationen zu den Verkaufsbedingungen finden Sie auf der Rückseite der Rechnung oder des Lieferscheins.

Verfahren Nr. HT90
Vorherige Ausgabe: 2003-09
Revidiert: 2005-01



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

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA +1 314 771 5765

Technischer Kundendienst: R-Gespräch +1 314 771 3122

oder Email an clintech@sial.com

Bestellungen: R-Gespräch +1 314 771 575

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

Postfach 1120, 89552 Steinheim, Deutschland 49-7329-970