

AVSEDD ANVÄNDNING

Sigma-Aldrich gramfärgsreagenser är avsedda för användning vid beskrivning av grampositiva och grampositiva organismer i filmer och vävnad. Gramfärgsreagenser är avsedda för "in vitro-diagnostik".

Gramfärg används kliniskt för att beskriva två olika grupper av mikroorganismer. De mikroorganismer som bibehåller ursprunglig färg (kristallviolett) kallas grampositiva. De mikroorganismer som förlorar sin ursprungliga färg under ett avfärgningssteg kallas gramnegativa. De mekanismer, varigenom grampositiva organismer bibehåller sin ursprungliga färg, är okända, även om cellväggarnas kemi och struktur utan tvivel är inblandade.

Talrika modifikationer av den ursprungliga grammetoden¹ har beskrivits. Sigma-Aldrich-proceduren är baserad på Huckers och Conns arbete,² som använder en kristallviolett-ammoniumoxalatlösning som bistår vid differentiering och är mycket stabil.

REAGENSER

KRISTALLVIOLETTLÖSNING, katalognummer HT90-1
Certifierad kristallviolett, 2,3 %, ammoniumoxalat, 0,1 %, och 20 % etylalkohol, SD3A.

GRAMS JODLÖSNING, katalognummer HT90-2
Jod, 0,33 % och kaliumjodid, 0,66 %.

AVFÄRGNINGSLÖSNING, katalognummer HT90-3
Krävs endast för filmer.
Isopropylalkohol, 75 %, och aceton, 25 %.

SAFRANIN O-LÖSNING, katalognummer HT90-4
Certifierat safranin 0,6 % i 20 % etylalkohol, SD3A.

TARTRAZINLÖSNING, katalognummer HT30-2-8
Krävs endast för vävnad.
Tartrazin, 0,25 %, och ättiksyra, 0,25 %.

FÖRVARING OCH STABILITET:

Förvara i rumstemperatur (18–26 °C). Reagensens etikett visar utgångsdatum. Använd en gång och kasta.

BEREDNING:

Alla reagenser är bruksfärdiga.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER:

Normala försiktighetsåtgärder vid hantering av laboratoriereagenser ska iaktas. Kassera avfall enligt lokala lagar och bestämmelser. Se Faktablad om materialsäkerhet för uppdaterad information om risker, faror eller säkerhet.

Gramfärg-VÄNVAD – TROL-kontrollobjektglas är paraffinbäddad djurvävnad som innehåller gramnegativa och grampositiva bakterier och som ska betraktas som potentiellt smittsamma.

Amerikanska risk- och säkerhetsbestämmelser

Kristallviolett-lösning är BRÄNNBAR och IRRITERANDE. Irriterar ögon, andningsorgan och hud. Risk för svåra ögonskador. Misstänks kunna ge cancer. Skadligt för vattenorganismer, kan ha långvariga biverkningar i vattenmiljön. Förvaras åtskilt från antändningskällor – rökning förbjuden. Vid kontakt med ögon, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare. Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar och skyddsglasögon eller ansiktsskydd. Undvik utsläpp till miljön. Läs särskilda instruktioner/varuinformationsblad.

Grams jodlösning Försiktighet: Substansen är inte fullständigt testad ännu.

Avfärgningslösning är BRANDFARLIG och IRRITERANDE. Mycket brandfarligt. Irriterar ögon, andningsorgan och hud. Risk för svåra ögonskador. Förvaras åtskilt från antändningskällor – rökning förbjuden. Vid kontakt med ögon, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare. Använd lämpliga skyddskläder. Förvaras väl försluten och på väl ventilerad plats.

Safranin O-lösning är BRANDFARLIG och FARLIG. Skadlig vid inandning, hudkontakt och förtäring. Farligt: möjlig risk för bestående hälsoskador vid inandning, hudkontakt och förtäring. Irriterar ögon, andningsorgan och hud. Förvaras åtskilt från antändningskällor – rökning förbjuden. Använd lämpliga skyddskläder och skyddshandskar. Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare. Visa om möjligt etiketten.

Reagensalkohol är BRANDFARLIG och IRRITERANDE. Irriterar ögon, andningsorgan och hud. Förpackningen förvaras väl tillsluten. Förvaras åtskilt från antändningskällor – rökning förbjuden. Vid kontakt med ögon, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare. Använd lämpliga skyddskläder. Målorgan: nerver och lever.

Xylen är BRANDFARLIGT och FARLIGT. Möjlig risk för nedsatt fortplantningsförmåga. Kan ge fosterskador. Farligt vid inandning och hudkontakt. Irriterar ögon, andningsorgan och hud. Risk för svåra ögonskador. Förvaras åtskilt från antändningskällor – rökning förbjuden. Vid kontakt med ögon, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare. Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar och skyddsglasögon eller ansiktsskydd. Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare. Visa om möjligt etiketten.

Aceton är BRANDFARLIGT och IRRITERANDE. Irriterar ögonen. Upprepad exponering kan orsaka torr hud eller hudsprickor. Ångor kan göra att man blir dåsig och omtöcknad. Förpackningen förvaras på väl ventilerad plats. Förvaras åtskilt från antändningskällor – rökning förbjuden. Vid kontakt med ögon, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare. Målorgan: lever och njurar.

Risk- och säkerhetsbestämmelser enligt EU (Försiktighet: Substanserna är inte fullständigt testade ännu)

Kristallviolett-lösning är FARLIG. Brandfarligt. Misstänks kunna ge cancer. Skadligt för vattenorganismer, kan ha långvariga biverkningar i vattenmiljön. Förvaras åtskilt från antändningskällor – rökning förbjuden. Använd lämpliga skyddskläder och skyddshandskar. Undvik utsläpp till miljön. Läs särskilda instruktioner/varuinformationsblad.

Grams jodlösning Försiktighet: Substansen är inte fullständigt testad ännu.

Avfärgningslösning är BRANDFARLIG och IRRITERANDE. Mycket brandfarligt. Irriterar ögon, andningsorgan och hud. Risk för svåra ögonskador. Förvaras åtskilt från antändningskällor – rökning förbjuden. Vid kontakt med ögon, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare. Använd lämpliga skyddskläder.

Safranin O-lösning är BRANDFARLIG. Förvaras åtskilt från antändningskällor – rökning förbjuden.

Reagensalkohol är MYCKET BRANDFARLIGT och IRRITERANDE. Mycket brandfarligt. Irriterar ögon, andningsorgan och hud. Förpackningen förvaras väl tillsluten. Förvaras åtskilt från antändningskällor – rökning förbjuden. Vid kontakt med ögon, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare. Använd lämpliga skyddskläder.

Xylen är FARLIGT. Brandfarligt. Farligt vid inandning och hudkontakt. Irriterar huden. Undvik kontakt med ögonen.

Aceton är MYCKET BRANDFARLIGT och IRRITERANDE. Mycket brandfarligt. Irriterar ögonen. Upprepad exponering kan orsaka torr hud eller hudsprickor. Ångor kan göra att man blir dåsig och omtöcknad. Förpackningen förvaras på väl ventilerad plats. Förvaras åtskilt från antändningskällor – rökning förbjuden. Vid kontakt med ögon, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare.

PROCEDUR

PROVTAGNING:

Provtagningen bör utföras i enlighet med NCCLS dokument M29-A2. Ingen känd testmetod ger fullständig garanti för att blodprov eller vävnad inte överför infektion. Alla blodderivat eller vävnadsprov bör därför anses vara potentiellt smittsamma.

Filmer: Alla välpreparerade, värmefixerade filmer är acceptabla. Filmens tjocklek kommer att påverka den tid som krävs för avfärgning.

Vävnad: Alla välfixerade, paraffinbäddade vävnader, som skurits till 5 mikroner.

SPECIELLA MATERIAL SOM BEHÖVS, MEN INTE MEDFÖLJER:

Positiva kontrollobjektglas bör inkluderas i varje körning.

ALKOHOL, REN
ACETON, ACS-KVALITET
XYLEN
Mikroskop

ANMÄRKNINGAR:

Överavfärga inte objektglaset med avfärgningslösningen. Även grampositiva organismer blir färglösa och verkar röda om avfärgningslösningen lämnas på objektglaset för länge.⁴

Data som erhållits från denna procedur tjänar endast som ett hjälpmedel vid diagnos och bör granskas tillsammans med andra kliniska, diagnostiska tester eller information.

PROCEDUR:

PROCEDUR FÖR FILMER:

1. Dränk in filmen i kristallviolett-lösning, katalognummer HT90-1, i **1 minut**.
2. Skölj noga i avjoniserat vatten.
3. Dränk in filmen i Grams jodlösning, katalognummer HT90-2, i **1 minut**.
4. Skölj noga i avjoniserat vatten.
5. Dränk i avfärgningslösning, katalognummer HT90-3, i upp till **10 sekunder** tills färgen slutar att rinna bort.
6. Skölj noga i avjoniserat vatten.
7. Dränk in filmen i Safranin O-lösning, katalognummer HT90-4, i **1 minut**.
8. Skölj noga i avjoniserat vatten.
9. Lufttorka filmen och undersök i mikroskop.

PROCEDUR FÖR VÄNVAD:³

1. Avparaffinera snitten och hydratisera till avjoniserat vatten.
2. Placera objektglaset på färgningsställ och täck snitten med kristallviolett-lösning, katalognummer HT90-1, i **1 minut**.
3. Häll bort kristallviolett-lösning och skölj noga i avjoniserat vatten.
4. Beta i Grams jodlösning, katalognummer HT90-2, i **5 minuter**.
5. Skölj i avjoniserat vatten och torka snitten försiktigt med pappershandduk.
6. Differentiera i ren alkohol eller aceton.
7. Skölj i avjoniserat vatten.
8. Täck objektglaset med Safranin O-lösning, katalognummer HT90-4, i **30–60 sekunder**.
9. Skölj i avjoniserat vatten och torka snitten försiktigt med pappershandduk.
10. Täck snitten med tartrazin-lösning, katalognummer HT30-2 i **5–10 sekunder**.
11. Sug upp överflödigt färg med pappershandduk.
12. Skölj i 2 byten ren alkohol.
13. Rena i xylen och montera.

PRESTANDAEGENSKAPER

Grampositiva organismer – lila

Gramnegativa organismer – röda

Om observerade resultat skiljer sig från förväntade resultat, kontakta Sigma-Aldrich tekniska service för assistans.

REFERENSER

1. Gram C: Ueber 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. garanterar att deras produkter överensstämmer med informationen i denna och andra Sigma-Aldrich-publikationer. Kunden måste avgöra produktens(ernas) lämplighet för deras speciella användning. Ytterligare villkor kan gälla. Se baksidan av fakturan eller packsedeln för ytterligare försäljningsvillkor.

Procedurnummer HT90
Föregående revidering: 2003-09
Reviderad: 2005-01



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

SIGMA-ALDRICH, INC.

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

Teknisk service: mottagaren betalar samtalet: +1 314 771 3122

eller e-post till clintech@sial.com

För beställningar: mottagaren betalar samtalet: +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

P.O. 1120, 89552 Steinheim, Tyskland +49-7329-970