

---

## TILSIGTET ANVENDELSE

---

Sigma-Aldrichs Gram-farvereagenser er beregnet til brug ved afbildning af Gram-positive og Gram-negative organismer i film og væv. Gram-farvereagenser er til in vitro diagnostisk brug.

Gram-farvestof anvendes til klinisk afbildning af to forskellige grupper mikroorganismer. Den gruppe, der bevarer den primære farve (krystalviolet), kaldes Gram-positive. Den gruppe, der mister den primære farve under et affarvningsstrin, kaldes Gram-negative. De mekanismer, der bevirker, at Gram-positive organismer bevarer den primære farve, kendes ikke, skønt det er klart, at cellevæggenes kemi og struktur er involveret.

Der er beskrevet utallige modificeringer af den originale Gram-metode<sup>1</sup>. Sigma-Aldrichs procedure er baseret på Hucker og Conns arbejde<sup>2</sup>, der anvender en krystalviolet ammoniumoxalatopløsning, som bidrager til differentiering, og som er ret stabil.

---

## REAGENSER

---

**KRYSTALVIOLETOPLØSNING**, katalognr. HT90-1  
Certificeret krystalviolet, 2,3 %, ammoniumoxalat, 0,1 %, og 20 % ethylalkohol, SD3A.

**GRAMS JODOPLØSNING**, katalognr. HT90-2  
Jod, 0,33 %, og kaliumiodid, 0,66 %.

**AFFARVNINGSOPLØSNING**, katalognr. HT90-3  
**Kun påkrævet til film.**  
Isopropylalkohol, 75 %, og acetone, 25 %.

**SAFRANIN O-OPLØSNING**, katalognr. HT90-4  
Certificeret safranin 0,6 % i 20 % ethylalkohol, SD3A.

**TARTRAZINOPLØSNING**, katalognr. HT30-2-8  
**Kun påkrævet til væv.**  
Tartrazin, 0,25 %, og eddikesyre, 0,25 %.

**OPBEVARING OG STABILITET:**  
Opbevares ved stuetemperatur (18–26 °C). Udløbsdatoen fremgår af reagensetiketten. Til engangsbrug. Skal kasseres efter brug.

**KLARGØRING:**  
Alle reagenser er klar til brug.

**FORHOLDSREGLER:**  
De normale forholdsregler ved håndtering af laboratoriereagenser skal følges. Ved kassering af affald skal alle lokale og nationale bestemmelser overholdes. Der henvises til materialesikkerhedsdatabladet angående opdaterede oplysninger om risici, fare eller sikkerhed.

Gram Stain TISSUE - TROL kontrolobjektglas er paraffinindstøbt animalsk væv, som indeholder gram negative og gram positive bakterier, og skal opfattes som potentielt smittebærende.

Amerikanske risiko- og sikkerhedserklæringer

Krystalvioletoopløsning er BRÆNDBAR og LOKALIRRITERENDE. Irriterer åndedrætsorganerne og huden. Risiko for alvorlig øjenskade. Begrænset dokumentation for kræftfremkaldende virkning. Skadelig for organismer, der lever i vand, kan forårsage uønskede langtidsvirkninger i vandmiljøet. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Bær passende beskyttelsesdragt, handsker og øjen-/ansigtsbeskyttelse. Undgå udslip til miljøet. Se de særlige instruktions-/sikkerhedsdatablade.

Grams jodopløsning. Advarsel: Stoffet er endnu ikke fuldt ud testet.  
Affarvningsopløsning er BRÆNDBAR og LOKALIRRITERENDE. Meget brandfarlig. Irriterer åndedrætsorganerne og huden. Risiko for alvorlig øjenskade. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Bær passende beskyttelsesbeklædning. Emballagen skal holdes tæt lukket og opbevares på et godt ventileret sted.

Safranin O-opløsning er BRÆNDBAR og SUNDHEDSSKADELIG. Farlig ved indånding, ved hudkontakt og ved indtagelse. Farlig: mulighed for varig skade for helbred ved indånding, ved hudkontakt og ved indtagelse. Irriterer øjnene, åndedrætsorganerne og huden. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt. Bær passende beskyttelsesbeklædning og -handsker. Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig (vis etiketten, hvis det er muligt).

Reagensalkohol er BRÆNDBAR og LOKALIRRITERENDE. Irriterer øjnene, åndedrætsorganerne og huden. Emballagen skal holdes tæt lukket. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Bær passende beskyttelsesbeklædning. Målorganer: nerver og lever.

Xylen er BRÆNDBAR og SUNDHEDSSKADELIG. Risiko for nedsat frugtbarhed. Kan forårsage fosterskader. Farlig ved indånding og ved hudkontakt. Irriterer åndedrætsorganerne og huden. Risiko for alvorlig øjenskade. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Bær passende beskyttelsesdragt, handsker og øjen-/ansigtsbeskyttelse. Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig (vis etiketten, hvis det er muligt).

Acetone er BRÆNDBAR og LOKALIRRITERENDE. Irriterer øjnene. Gentagen kontakt kan medføre udtørring af eller revner i huden. Dampe kan forårsage sløvhed og svimmelhed. Emballagen skal opbevares på et godt ventileret sted. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Målorganer: lever og nyrer.

Risiko- og sikkerhedserklæringer i EU (Advarsel: Stoffene er endnu ikke fuldt ud testet)  
Krystalvioletoopløsning er SUNDHEDSSKADELIG. Brandfarlig. Begrænset dokumentation for kræftfremkaldende virkning. Skadelig for organismer, der lever i vand, kan forårsage uønskede langtidsvirkninger i vandmiljøet. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt. Bær passende beskyttelsesbeklædning og -handsker. Undgå udslip til miljøet. Se de særlige instruktions-/sikkerhedsdatablade.

Grams jodopløsning. Advarsel: Stoffet er endnu ikke fuldt ud testet.  
Affarvningsopløsning er BRÆNDBAR og LOKALIRRITERENDE. Meget brandfarlig. Irriterer åndedrætsorganerne og huden. Risiko for alvorlig øjenskade. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Bær passende beskyttelsesbeklædning.  
Safranin O-opløsning er BRANDFARLIG. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt.

Reagensalkohol er MEGET BRANDFARLIG og LOKALIRRITERENDE. Meget brandfarlig. Irriterer øjnene, åndedrætsorganerne og huden. Emballagen skal holdes tæt lukket. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges. Bær passende beskyttelsesbeklædning.

Xylen er SUNDHEDSSKADELIGT. Brandfarligt. Farligt ved indånding og ved hudkontakt. Irriterer huden. Undgå kontakt med øjnene.

Acetone er MEGET BRANDFARLIG og LOKALIRRITERENDE. Meget brandfarlig. Irriterer øjnene. Gentagen kontakt kan medføre udtørring af eller revner i huden. Dampe kan forårsage sløvhed og svimmelhed. Emballagen skal opbevares på et godt ventileret sted. Holdes væk fra antændelseskilder – rygning forbudt. I tilfælde af kontakt med øjnene skylles straks grundigt med masser af vand og lægehjælp søges.

---

## PROCEDURE

---

### PRØVEINDSAMLING:

Det anbefales, at prøveindsamling sker i henhold til NCCLS-dokumentet M29–A2. Der er ingen kendt testmetode, som kan give fuldstændig sikring af, at blodprøver eller væv ikke overfører infektion. Derfor skal alle blodderivater eller vævsprøver behandles som potentielt infektiøse.

**Film:** Alle velleavede, varmefikserede film er acceptable. Filmens tykkelse indvirker på den tid, der kræves til affarvning.

**Væv:** Alle velfikserede paraffinindstøbte vævssnit, der er skåret ved 5 mikron.

### SÆRLIGE NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER:

Der bør inkluderes positive kontrolobjektglas i hver kørsel  
ALKOHOL, REN  
ACETONE, ACS-KVALITET  
XYLEN  
Mikroskop

### BEMÆRKNINGER:

Det skal omhyggeligt undgås, at objektglassene overaffarves med affarvningsopløsningen. Selv Gram-positive organismer bliver farveløse og ser røde ud, hvis affarvningsopløsningen bliver siddende på objektglasset i for lang tid.<sup>4</sup>

De data, som opnås via denne procedure, tjener kun som hjælp til diagnosticering og skal gennemses i forbindelse med andre kliniske diagnostiske tests eller oplysninger.

### PROCEDURE:

#### PROCEDURE TIL FILM:

1. Hæld krystalvioletoopløsning, katalognr. HT90-1, over filmen i **1 minut**.
2. Skyl grundigt i deioniseret vand.
3. Hæld Grams jodopløsning, katalognr. HT90-2, over filmen i **1 minut**.
4. Skyl grundigt i deioniseret vand.
5. Hæld affarvningsopløsning, katalognr. HT90-3, over i op til **10 sekunder**, til farven holder op med at løbe.
6. Skyl grundigt i deioniseret vand.
7. Hæld safranin O-opløsning, katalognr. HT90-4, over filmen i **1 minut**.
8. Skyl grundigt i deioniseret vand.
9. Lufftør filmen, og undersøg den under mikroskop.

#### PROCEDURE TIL VÆV:<sup>3</sup>

1. Atparaffiner og hydrer vævssnit til deioniseret vand.
2. Anbring objektglassene på et farvningsstativ, og dæk vævssnittene med krystalvioletoopløsning, katalognr. HT90-1, i **1 minut**.
3. Hæld krystalvioletoopløsningen af, og skyl grundigt i deioniseret vand.
4. Bejds i Grams jodopløsning, katalognr. HT90-2, i **5 minutter**.
5. Skyl i deioniseret vand, og dup vævssnittene tørre.
6. Differentier i ren alkohol eller acetone.
7. Skyl i deioniseret vand.
8. Dæk objektglassene med safranin O-opløsning, katalognr. HT90-4, i **30–60 minutter**.
9. Skyl i deioniseret vand, og dup vævssnittene tørre.
10. Dæk vævssnittene med tartrazinopløsning, katalognr. HT30-2, i **5–10 sekunder**.
11. Dup overskydende farvestof af.
12. Skyl i 2 hold ren alkohol.
13. Klar i xylen, og monter.

---

## RESULTATKARAKTERISTIKA

---

Gram-positive organismer – Lilla

Gram-negative organismer – Røde

Hvis de observerede resultater afviger fra de forventede, skal Sigma-Aldrich Technical Service kontaktes angående yderligere hjælp.

---

## HENVISNINGER

---

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. garanterer, at dets produkter stemmer overens med de oplysninger, som er indeholdt i denne og andre publikationer fra Sigma-Aldrich. Det påhviler køber at fastlægge produktets/produkternes egnethed til deres specifikke anvendelse. Yderligere vilkår og betingelser kan være gældende. Se bagsiden af faktura eller pakkeseddel angående yderligere vilkår og salgsbetingelser.

Procedure nr. HT90  
Tidligere revision: 2003-09  
Revideret: 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: +1 314 771 3122  
eller e-mail [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)  
Bestilling: +1 314 771 5750  
[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

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