

VERWENDUNGSZWECK

Zur Verwendung bei Gramfärbeverfahren zur initialen Differenzierung von grampositiven und gramnegativen Bakterien.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Die Gramfärbung wurde ursprünglich im Jahr 1884 von Christian Gram entwickelt. Die Standardmethode dient der Differenzierung intakter, morphologisch ähnlicher Bakterien in zwei Gruppen. Dies beruht auf der Färbung der Zellwand durch das Verfahren. Außerdem können Zellform und -größe sowie Struktureinzelheiten besser erkannt werden. Diese vorläufige Information gibt wichtige Hinweise auf die Art des vorhandenen Organismus.

PRINZIP

Bei der Anwendung des oben beschriebenen Verfahrens bildet sich in allen angefärbten Organismen ein Komplex aus Kristallviolett und Iod. Nach dem Entfärben werden alle Organismen, die diesen Farbstoffkomplex noch immer aufweisen, als Grampositive klassifiziert. Organismen, die entfärbt werden und die Kontrastfärbung aufnehmen, werden als Gramnegative klassifiziert.

Nach dem Aufbrechen oder Entfernen der Zellwand entfärbt sich der Protoplast von Grampositiven und Gramnegativen; das Attribut gramnegativ ist somit verloren. Der Mechanismus der Gramfärbung scheint daher mit dem Vorhandensein einer intakten Zellwand in Verbindung zu stehen, die ein Entfärben des Organismus während des Verfahrens verhindert. Im Allgemeinen ist die Zellwand nicht-selektiv permeabel. Es wird angenommen, dass die Zellwand von Grampositiven bei der Gramfärbung durch den Alkohol im Entfärber dehydriert wird und ihre Permeabilität verliert und somit die Primärfärbung bestehen bleibt. Die Zellwand der gramnegativen Zellen weist einen höheren Lipidgehalt auf, weshalb sie nach Behandlung mit Alkohol durchlässiger wird und die Primärfärbung verschwindet bzw. die spätere Kontrastfärbung möglich wird.

REAGENZIEN

Gebrauchsfertige Färbelösungen.

PL.7000	Kristallviolett	500 ml
PL.7001	Kristallviolett	1 Liter
PL.7002	Kristallviolett	2 Liter
PL.7000/25	Kristallviolett	250 ml
PL.7003	Gram-Iod	500 ml
PL.7004	Gram-Iod	1 Liter
PL.7005	Gram-Iod	2 Liter
PL.7003/25	Gram-Iod	250 ml
PL.7006	Gram-Differenzierungslösung	500 ml
PL.7007	Gram-Differenzierungslösung	1 Liter
PL.7008	Gram-Differenzierungslösung	2 Liter
PL.7006/25	Gram-Differenzierungslösung	250 ml
PL.7009	Neutralrot	500 ml
PL.7010	Neutralrot	1 Liter
PL.7011	Neutralrot	2 Liter
PL.7009/25	Neutralrot	250 ml
PL.7012	Safranin	500 ml
PL.7013	Safranin	1 Liter
PL.7014	Safranin	2 Liter
PL.7012/25	Safranin	250 ml
PL.7015	Verdünnte Carbofuchsinlösung	500 ml
PL.7016	Verdünnte Carbofuchsinlösung	1 Liter
PL.7017	Verdünnte Carbofuchsinlösung	2 Liter
PL.7015/25	Verdünnte Carbofuchsinlösung	250 ml

PL.7052	Lugolsche Jodlösung	500 ml
PL.7053	Lugolsche Jodlösung	1 Liter
PL.7053-2	Lugolsche Jodlösung	2 Liter
PL.7056	Jodid-Acteonlösung	500 ml
PL.7057	Jodid-Acteonlösung	1 Liter
PL.7058	Jodid-Acteonlösung	2 Liter
PL.7101	Basisfuchsin / Neutralrot	500 ml
PL.7102	Basisfuchsin / Neutralrot	1 Liter
PL.7103	Basisfuchsin / Neutralrot	2 Liter
PL.7073	Kristallviolett-Ammoniumoxalat	500 ml
PL.7074	Kristallviolett-Ammoniumoxalat	1 Liter
PL.7075	Kristallviolett-Ammoniumoxalat	2 Liter
PL.7110	Sandiford-Färbung	500 ml
PL.7111	Sandiford-Färbung	1 Liter
PL.7112	Sandiford-Färbung	2 Liter
PL.7113	Methylviolett	500 ml
PL.7114	Methylviolett	1 Liter
PL.7115	Methylviolett	2 Liter
PL.7116	Safranin / Neutralrot	500 ml
PL.7117	Safranin / Neutralrot	1 Liter
PL.7118	Safranin / Neutralrot	2 Liter
PL.7206	Gram-Differentiator (Aceton)	500 ml
PL.7207	Gram-Differentiator (Aceton)	1 Liter
PL.7208	Gram-Differentiator (Aceton)	2 Liter
PL.7306	Gram-Differentiator (Industriealkohol)	500 ml
PL.7307	Gram-Differentiator (Industriealkohol)	1 Liter
PL.7308	Gram-Differentiator (Industriealkohol)	2 Liter

Konzentrate. Vor dem Gebrauch mit Aqua dest. auf 1 Liter verdünnen.

PL.8000	Kristallviolett	100 ml
PL.8001	Gram-Iod	100 ml
PL.8002	Neutralrot	100 ml
PL.8003	Safranin	100 ml
PL.8004	Verdünnte Carbofuchsinlösung	100 ml
PL.8010	Lugolsche Lösung	100 ml
PL.8011	Methylviolett	100 ml

Konzentrate. Vor dem Gebrauch mit Aqua dest. auf 4 Liter verdünnen.

PL.8000-4.0	Kristallviolett	400 ml
PL.8001-4.0	Gram-Iod	400 ml
PL.8002-4.0	Neutralrot	400 ml
PL.8003-4.0	Safranin	400 ml
PL.8004-4.0	Verdünnte Carbofuchsin	400 ml
PL.8001-4.0	Lugolsche Lösung	400 ml
PL.8011-4.0	Methylviolett	400 ml

Konzentrate. Vor dem Gebrauch mit Aqua dest. auf 5 Liter verdünnen.

PL.8000-5.0	Kristallviolett	500 ml
PL.8001-5.0	Gram-Iod	500 ml
PL.8002-5.0	Neutralrot	500 ml
PL.8003-5.0	Safranin	500 ml
PL.8004-5.0	Verdünnte Carbofuchsin	500 ml
PL.8010-5.0	Lugolsche Lösung	500 ml
PL.8011-5.0	Methylviolett	500 ml

Färbekits (gebrauchsfertig)

PL.8055/25	Kit für die Gramfärbung – 250 ml Kristallviolett, 250 Gram-Iod, 250 ml Gram-Differenzierungslösung, 250 ml Safranin.
------------	--

PL.8056/25	Kit für die Gramfärbung – 250 ml Kristallviolett, 250 ml Gram-Iod, 250 ml Gram-Differenzierungslösung, 250 ml Neutralrot.
------------	---

PL.8057/25	Kit für die Gramfärbung – 250 ml Kristallviolett, 250 ml Gram-Iod, 250 ml Gram-Differenzierungslösung, 250 ml Verdünntes Carbofuchsin.
------------	--

Immersionöl (DBP-frei zur Gefahrenreduzierung)

PL.396	Immersionöl	50 ml
--------	-------------	-------

SICHERHEITSHINWEISE

- Die Gramfärbelösungen von PRO-LAB dürfen ausschließlich für *in vitro*-Verfahren und nicht für heilende oder prophylaktische Zwecke eingesetzt werden.
- Während und nach der Verwendung sollten alle Materialien entsprechend den Richtlinien der guten Laborpraxis behandelt werden; außerdem muss stets beachtet werden, dass alle Testmaterialien bei Nichtbeachten dieser Richtlinien möglicherweise biogefährdend sind.
- Die Vorrichtung stellt keine größere Umweltgefährdung dar als die mit der Vorrichtung verwendeten klinischen Proben. Während des Umgangs mit dem Test und der Entsorgung der klinischen Proben sollten alle geltenden Sicherheitsvorschriften eingehalten werden, da es sich um infektiöses Material handeln könnte. Es besteht die Möglichkeit einer Einflussnahme auf die Umwelt, welche durch korrekte Handhabung und Entsorgung vermieden wird.

STABILITÄT UND LAGERUNG

Bei Raumtemperatur aufbewahren. Entfernt von entzündlichen Materialien aufbewahren. Nicht direktem Sonnenlicht aussetzen. Unter diesen Bedingungen sind die Reagenzien bis zu dem auf der Packung angegebenen Datum haltbar.

PROBENGEWINNUNG UND ANZÜCHTUNG

Entsprechend den Standardverfahren in der Mikrobiologie.

ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT GELIEFERTE MATERIALIEN

Saubere Objektträger aus Glas, sterile Impföse, Bunsenbrenner/Heißluft, Färbegestell, Leitungswasser, Immersionöl, Mikroskop, Blottingpapier oder Ähnliches.

VERFAHREN

- Einen dünnen, gleichförmigen Abstrich der Probe präparieren und luft-trocknen.
- Wärmefixieren und abkühlen lassen.
- Den Objektträger mit Kristall- oder Methylviolett fluten, eine Minute ruhen lassen. Mit Wasser abspülen.
- Den Objektträger mit Gram- oder lugolscher Jodlösung fluten, eine Minute ruhen lassen. Abspülen mit Wasser.
- Mit dem Differentiator vorsichtig ca. 10 Minuten entfärben, oder mit Jodid-Acetonlösung 1 Minute lang. Mit Wasser abspülen.
- Den Objektträger mit Gegenfärbung fluten, 30 - 60 Sekunden ruhen lassen.
- Gut mit Wasser abspülen, sanft trocken tupfen.
- Mithilfe einer Ölimmersion unter dem Mikroskop betrachten.



QUALITÄTSKONTROLLE

Das Alter der Kulturen und der pH-Wert des Mediums, in dem die Bakterien angezüchtet werden, können deren Reaktion auf die Gramfärbung wesentlich beeinflussen. Es sollten nur Kulturen verwendet werden, die höchstens 24 Stunden alt sind.

Empfohlene Kulturen für die Qualitätskontrolle:

- *Escherichia coli* NCTC 10418 (gramnegative Bakterien mit rosa bis roter Farbe)
- Oxford *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 (grampositive Kokken mit blauer bis purpurner Farbe)
- Hämolytische *Streptokokken* Gruppe A NCTC 8198 (grampositive Kokken mit blauer bis purpurner Farbe)

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Grampositive Organismen – blau bis purpur.

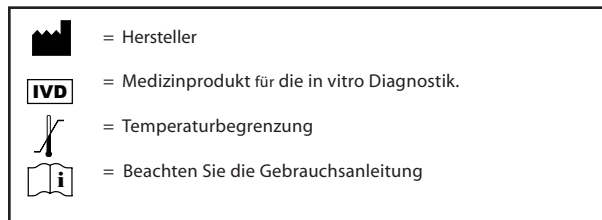
Gramnegative Organismen – rosa bis rot.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Aufgrund von Zelltrümmern, die bei dem Verfahren ebenfalls angefärbt werden, kann es zu falschen Ergebnissen bei der Gramfärbung kommen. So färben sich beispielsweise Zellkern und Protoplasmen von Leukozyten und Epithelzellen bei der Kontrastfärbung an. Festpartikel können sich dagegen mit Kristallviolett färben.
2. Die Gramfärbung liefert nur vorbehaltliche Informationen zur Identifizierung eines Organismus und ist kein Ersatz für die Probenanzucht.

QUELLEN

1. Handbuch der klinischen Mikrobiologie. Lennette.
2. The Practice of Medical Microbiology. 12. Auflage. V2. R. Cruickshank, J.P. Duguid, B.P. Marmion, R.H.A. Swain.



Bei diesen Anleitungen handelt es sich um eine Fachübersetzung der englischen Originalversion. Bei Unklarheiten oder offensichtlichen Abweichungen wenden Sie sich bitte an Pro-Lab.