



Gram-Stain

Färbekit für die mikroskopische Untersuchung nach dem Färbeverfahren von Gram

Prinzip

Im Zellkörper von Mikroorganismen werden Anilinfarbstoffe bei nachfolgender Iodeinwirkung als Farbstoff-Iod-Komplex gebunden.

Bei grampositiven Mikroorganismen kann der Farbstoff-Iod-Komplex nicht durch Entfärbemittel (Gram-Stain Entfärbelösung, Ethanol, Aceton) aus der Zelle herausgelöst werden. Die blauviolette Zellfärbung bleibt erhalten.

Bei gramnegativen Mikroorganismen wird durch Gram-Stain Entfärbelösung der Farbstoff-Iod-Komplex gelöst und die Zelle durch Gegenfärbung mit Safranin rosa bis rot eingefärbt.

Reagenzien

Die Reagenzien sind bei vorschriftsmäßiger Lagerung (dunkel, +15...+25 °C) verwendbar bis zum aufgedruckten Verfallsdatum. Angebrochene Flaschen sind kontaminationsfrei bei Lagertemperatur bis zum Verfallsdatum haltbar.

Bei Lagerung unter +15 °C können Farbstoffniederschläge auftreten. Diese können größtenteils durch Erwärmung im Wasserbad bei 60 °C über 2...3 Stunden (zwischenmischen) wieder gelöst werden. Die Farbstofflösungen müssen anschließend filtriert werden. Flaschen stets gut verschlossen halten.

Gefahren und Sicherheit

Beachten Sie die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen im Gebrauch von Laborreagenzien und Körperflüssigkeiten, sowie mikrobiologischer Proben. Der Umgang sollte durch sachkundiges Personal erfolgen. Nationale und interne Labor-Richtlinien für Arbeitssicherheit und Infektionsschutz sind zu befolgen. Tragen Sie geeignete Schutzkleidung und Einmalhandschuhe während der Arbeit. Es ist auf wirksamen Infektionsschutz entsprechend der Laborrichtlinien zu achten.

Lugol's Lösung kann Kunststoffe, Lacke und Oberflächen durch Jod-Diffusion reversibel oder irreversibel einfärben.



Für weitere und allgemeine Sicherheitshinweise beachten Sie bitte auch die Angaben auf dem Etikett und das entsprechende Sicherheitsdatenblatt (SDB/SDS).

Download über QR-Code oder Link:

- www.sds-id.com/100028-2 (Kristallviolettlösung)
- www.sds-id.com/100025-5 (Lugol's Lösung)
- www.sds-id.com/100029-1 (Entfärbelösung)
- www.sds-id.com/100030-8 (Safraninlösung)

Inhalt/ Hauptbestandteile

003821-...	Cont.	C.I. 42555-Carbol 4.75 g/l, Methanol 12.5 %v/v.
003421-...	Cont.	Iod-Iodkalium 1:3, 10.0 g/l
003823-...	Cont.	Ethanol, Aceton
003824-...	Cont.	C.I. 50240 2,4 g/l, Ethanol <20 %
003825-...	Cont.	CAS 108-95-2 40 g/l, C.I. 42520 7 g/l, MeOH 79 g/l
003901-...	Cont.	C.I. 52015 6 g/l, EtOH 236,7 g/l, KOH 1,25 mmol/l

003820-6001 SET

		Gram-Stain
003821-0500	(A)	1x 500 ml Gram-Stain Kristallviolettlösung
003421-0500	(B)	1x 500 ml Gram-Stain Lugol's Lösung
003823-0500	(C)	2x 500 ml Gram-Stain Entfärbelösung
003824-0500	(D)	1x 500 ml Gram-Stain Safraninlösung

Der Färbeset 5x 500 ml reicht für etwa 250 Färbungen (Färbekbank)

Die Lösungen stehen auch als Einzellösungen in verschiedenen Gebindegrößen zu Verfügung.

Weitere und alternative Lösungen

003821-1025	(A)	1x 2.5l	Gram-Stain Kristallviolettlösung
003421-1025	(B)	1x 2.5l	Gram-Stain Lugol's Lösung
003823-1025	(C)	1x 2.5l	Gram-Stain Entfärbelösung
003824-1025	(D)	1x 2.5l	Gram-Stain Safraninlösung
003825-0500		1x 500 ml	Ziehl-Neelsen's Carbol-Fuchsinlösung
003825-1025		1x 2.5l	Ziehl-Neelsen's Carbol-Fuchsinlösung
003901-0500		1x 500 ml	Löffler's Methylenblaulösung
003901-1025		1x 2.5l	Löffler's Methylenblaulösung

Hilfsmittel

005200-0500 *	Natriumchlorid-Lösung 0.9 %; 500 ml *
005100-1010 *	Aqua z. A.; 1.0l *
004211-... *	BioKitt Schnelleinschlussmittel *

* Erhältlich bei Bioanalytic GmbH.

Geräte

Geeignetes Labor-Mikroskop, Färbekbank, Objektträger, allgem. Laborausrüstung.

Probenmaterial

Als Probenmaterial sind Körperflüssigkeiten, Eiter, Exsudate, Koloniematerial und Flüssignährbodenmaterial geeignet, sowie weitere Probenmaterialien lt. Literatur oder eigener Anweisung.

Durchführung

Die nachstehende Beschreibung gilt allgemein. Der Färbeset und dessen Einzellösungen sind auch für andere und spezielle Anwendungen und Verfahren geeignet. Hierzu beachten Sie bitte die Arbeitsanweisungen der Anwendung bzw. die gültigen Literaturangaben.

Probenvorbereitung

Das Untersuchungsgut (Körperflüssigkeiten, Eiter, Exsudate, Koloniematerial, Flüssignährbodenmaterial) wird mit einer ausgeglühten Öse auf einen fettfreien Objektträger aufgetragen, mit 1...2 Tropfen Natriumchloridlösung 0.9 % (REF 005200) verrieben und anschließend ausgestrichen.

Fixierung

Material zuerst lufttrocknen lassen, dann Hitzefixierung vornehmen. Hierzu den Ausstrich mit der Ausstrichseite nach oben dreimal langsam durch den oberen Teil der Bunsenbrennerflamme ziehen. Abkühlen lassen und Färbung durchführen.

Die ausreichende Hitzefixierung ist sehr wichtig, um infektiöses Potential und die Weitervermehrung der Bakterien zu verhindern.

Färbung

Bei allen Färbeverfahren ist der kritische Schritt die Entfärbung, der durch die Dicke des Ausstriches beeinflusst werden kann. Frische Lösungen sind sehr reaktiv woraus eine sorgfältige Auswertung erfolgen sollte.

Die angegebenen Zeiten sollten genau eingehalten werden um falsch negative Ergebnisse zu verhindern.

Färbung (Färbebank)

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig (unverdünnt) einzusetzen.

Zeit	Aktion
1 min	Objektträger vollständig mit Gram-Stain Kristallviolettlösung (A) bedecken, färben und abgießen.
kurz	Farbstoffreste kurz mit Lugol's Lösung abspülen.
1 min	Objektträger vollständig mit Lugol's Lösung (B) bedecken und einwirken lassen.
5 sec	Abgießen und mit Aqua dest. vorsichtig abspülen.
10 ... 60 sec	Objektträger in Gram-Stain Entfärbelösung (C) schwenken, bis keine Farbwolken mehr abgehen. Der Ausstrich erscheint graublau.
5 sec	Mit Aqua dest. vorsichtig abspülen.
1 min	Objektträger vollständig mit Safraninlösung (D) bedecken und Färben.
5 sec	Mit Aqua dest. vorsichtig abspülen.

Trocknen lassen (über Nacht oder bei 50 °C im Trockenschrank) und mikroskopisch auswerten.

Färbung (Färbeküvetten)

Zur Färbung im Tauchverfahren in Färbeküvetten wird empfohlen, die Gram-Stain Kristallviolettlösung mit Aqua z. A. 1 : 4 (1 Volumenteil Kristallviolett + 3 Volumenteile Aqua z. A.) zu verdünnen.

Zeit	Aktion
90 sec	Kristallviolettlösung (A) Verdünnung 1 : 4
30 sec	fließendes Leitungswasser
3 min	Lugol's Lösung (B) *
20 sec	fließendes Leitungswasser
5 ... 10 sec	Entfärbelösung (C) **
30 sec	fließendes Leitungswasser
1 min	Safraninlösung (D)
1 min	fließendes Leitungswasser

* Lugol's-Lösung nach ca. 3 Durchgängen filtrieren.

** Entfärbelösung nach ca. 5 Durchgängen verwerfen. Zwei Färbeküvetten hintereinander (Gesamtzeit aufteilen) verbessert die Nutzungszeit der Färbelösung.

Färbung (Färbeautomat)

Die Lösungen sind auch zur Färbung auf Färbeautomaten geeignet und werden dazu gebrauchsfertig (unverdünnt) eingesetzt.

Beachten Sie auch die Bedienungsanweisung des Geräteherstellers und der Steuerungssoftware.

Auswertung

Unter dem Mikroskop erscheinen:

grampositive Mikroorganismen blau bis violett.
gramnegative Mikroorganismen rosa bis rot.

Die Auswertung gefärbter Präparate mit mikroskopischer Vergrößerung > 40x sollte mit Immersionsöl und Immersionsobjektiv durchgeführt werden.

Diagnostik

Die Diagnosen sind ausschließlich von autorisiertem und geschultem Personal zu erstellen, die auch Fehlermöglichkeiten der Durchführung erkennen können. Dazu sind gültige Nomenklaturen anzuwenden. Weiterführende Untersuchungen sind nach anerkannten Methoden auszuwählen und durchzuführen.

Eindeckung

Für die Lagerung von bakteriologischen Proben über mehrere Monate wird das Eindecken mit nicht-wässrigen Eindeckmitteln (z. B. BioKitt Schnelleinschlussmittel) und Deckglas empfohlen. Präparate vor dem Eindecken sehr gut trocknen! Ohne Eindecken bleibt die Färbung etwa 3 Tage stabil. Immersionsöl reduziert die Stabilität auf einige Stunden.

Qualitätskontrolle

Bei jeder Anwendung sind geeignete Kontrollen mitzuführen. Die Überprüfung der Färbewirksamkeit kann mit grampositiven Bakterien (Staphylokokken) und gramnegativen Bakterien (Escherichia coli) durchgeführt werden. Dazu sollten Kulturen von 20 ± 2 Stunden lang bebrüteten Nährböden eingesetzt werden.

Hinweise

Klassifizierungen

Nicht für die Humandiagnostik.

Infektionsschutz

Es sind die einschlägigen Unfallverhütungsvorschriften und die jeweils gültigen Richtlinien über Desinfektionsmaßnahmen zu beachten.

Unterstützung / Infoservice

Methodische und technische Unterstützung erhalten Sie per E-Mail unter support@bioanalytic.de.

Überprüfen Sie die Aktualität dieser Produktinformation regelmäßig auf unseren Internetseiten.

Rückmeldungen

Hinweise der Anwender können an support@bioanalytic.de berichtet werden. Vorschläge werden für weitere Entwicklungen berücksichtigt.

Entsorgung

Bitte beachten Sie die gesetzlichen und lokalen Vorschriften.

Gebrauchte und zeitlich abgelaufene Lösungen sind i. d. R. als gefährlicher Abfall zu entsorgen.

Innerhalb der EU gelten die Vorschriften der Richtlinie 67/548/EWG des Rates der Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe, in der jeweils gültigen Fassung.

Literatur & Fußnoten

Verwendete grafische Symbole und Kennzeichnungen sind entsprechend der Norm bzw. auf unseren Internetseiten verfügbar.

- [1] Steve K. Alexander, Dennis Strete: Mikrobiologisches Grundpraktikum - ein Farbatlas, 2006, Pearson, München, ISBN 978-3-8273-7201-7.