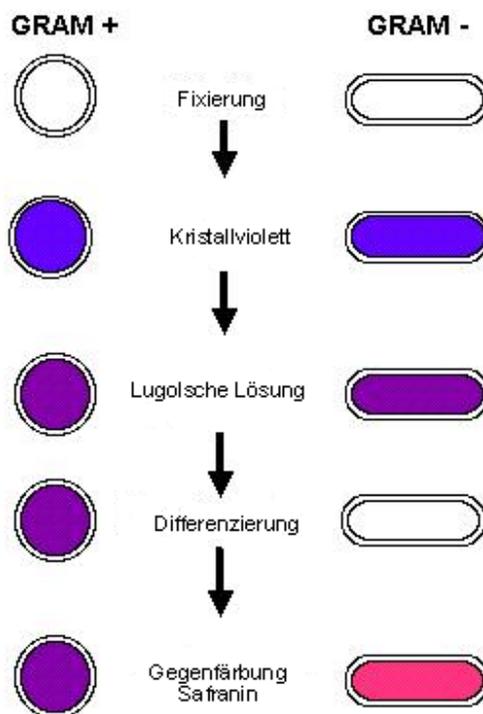


1. Prinzip

Die Originalmethode der Gram-Färbung wurde von dem dänischen Arzt Hans Christian Gram im Jahr 1884 entwickelt und erlaubt die Differenzierung grampositiver und gramnegativer Mikroorganismen. Für die Anfärbbarkeit der Mikroorganismen ist der Aufbau der Zellwand verantwortlich. Der im Cytoplasma gebildete lila Farbstoffkomplex kann in gramnegativen Erregern sehr leicht durch die Differenzierlösung ausgewaschen werden, während die Zellwand grampositiver Mikroorganismen gefärbt bleibt. Um die farblosen, gramnegativen Bakterien sichtbar zu machen, wird eine Gegenfärbung mit Safranin nach der Differenzierung durchgeführt.

Zugunsten der Qualität der Färberegebnisse, einer geringeren Toxizität und besseren Umweltverträglichkeit der verwendeten Reagenzien wurde die Originalvorschrift nach Gram modifiziert.



Nach Hashimoto (mod.)

2. Reagenzien

- Kristallviolett-Lösung (Gentianaviolett)
- Lugolsche Lösung
- Differenzierlösung
- Safranin-Lösung

Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig. Ausfällungen sind möglich und beeinträchtigen die Qualität der Reagenzien nicht, gegebenenfalls sind die Färbelösungen vor Gebrauch zu filtrieren. Die Färbereagenzien sind sowohl zur manuellen Durchführung der Färbung auf der Färbekbank oder in Küvetten, als auch zur Verwendung in Färbautomaten geeignet. Die Behälter sind nach Gebrauch dicht zu verschließen und lichtgeschützt zu lagern.

3. Herstellen der Ausstriche

Auf einen Objektträger wird mit einer sterilen Öse oder einem Abstrichbesteck eine dünne Schicht des Untersuchungsmaterials aufgebracht. Nach der Lufttrocknung folgt die Hitze-fixierung durch mehrmaliges durchziehen des Objektträgers durch eine Bunsenbrennerflamme. Dabei ist zu beachten, dass der Objektträger nicht zu heiß wird. Eine zu starke Hitze-fixierung führt zu Artefakten durch Zerstörung der Zellstrukturen. Um auf dem Objektträger sichtbar zu sein, sollten die Bakterien in einer Konzentration von mindestens 10^4 to 10^5 Zellen /ml vorliegen. Bei geringeren Konzentrationen werden oft auch positive Kulturen falsch negativ beurteilt. Werden die Ausstriche nicht ausreichend fixiert, können die Mikroorganismen durch die Färbereagenzien abgewaschen werden.

4. Durchführung der Färbung

Färbeschritt	Dauer
Aqua dest.	spülen
Kristallviolett-Lösung	1-2 min
Aqua dest.	kurz spülen
Lugolsche Lösung	1-2 min
Differenzierlösung *	1-2 sec
fließendes Wasser	spülen
Safranin	1 min
Aqua dest.	spülen
Trocknen	

* Die verwendete ermöglicht eine sehr Dennoch ist das

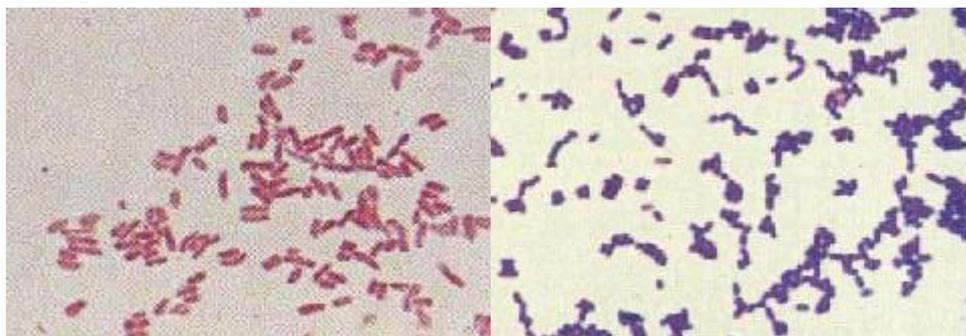
Präparate der kritische Schritt in der Färbeprozedur. Differenziert man zu kurz, bleiben auch gramnegative Organismen gefärbt, differenziert man zu lange, kommt es zu einer Entfärbung grampositiver Strukturen. Gut differenzierte Präparate sehen makroskopisch entfärbt aus, es gehen keine Farbstoffwolken mehr ab. Das Mitfärben eines Kontrollpräparates ist zur Sicherheit empfehlenswert. Die Färbezeiten sind als Empfehlung zu verstehen. Jedes Labor sollte seine eigene Methodik entwickeln.

Differenzierlösung "weiche" Differenzierung. Differenzieren der

5. Beurteilung der Präparate

Zur Beurteilung des Präparates ein Ölimmersionsobjektiv (100 x) verwenden. Mehrere Bereiche des Objektträgers sollten untersucht werden. Grampositive Mikroorganismen speichern den violetten Kristallviolett-Jod Komplex über die Differenzierung hinaus und erscheinen violett, gramnegative Bakterien erscheinen durch die Safranin Gegenfärbung rot.

Typische Gram Färbung



Gram negativ

Gram positiv

6. Sicherheitshinweise

In-Vitro-Diagnostikum. Die im Umgang mit Laborreagenzien üblichen Vorsichtsmassnahmen beachten.

Gesundheits- und Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich.

7. Literatur

1. Hashimoto, T. and Yoshida, N. Gram stain. Modern Media 6: 22-27, 1961.
2. Provine, H. and Gardner, B. P. Gram stain. Hospital Practice 9: 85, 1974
3. Romeis, Benno. Mikroskopische Technik, 17. Aufl., Urban u. Schwarzenberg München, 1989.
4. Ryan, J. R. and Ray, G. Principles of laboratory diagnosis of infectious diseases. Sherris Medical Microbiology 3rd ed. p.225, 1994
5. Scherre, Rene. Gram's staining reaction, Gram types and cell walls of bacteria. Trends Biochem.Sci. 9: 242, 1984
6. Washington, J. A. Rapid diagnosis by microscopy. Clin. Microbiol. Letter 8: 135, 1986

Info: Die jeweils aktuellste Fassung unserer Arbeitsanleitungen und Sicherheitsdatenblätter finden sie im Internet unter <http://www.niepoetter.de> zum Download.

Niepötter Labortechnik - Dieburger Straße 10 - 68642 Bürstadt
Telefon 06206/75558 Telefax 06206/75428 E-Mail info@niepoetter.de
Website <http://www.niepoetter.de>

24. November 2000