

Die Gram-Färbung

Protokoll für BIOMEDs Färbelösungen Gramyfix®

Ein WhitePaper der BIOMED Labordiagnostik GmbH



Inhaltsverzeichnis

1. Einführung/Hintergrund	3
2. Material.....	4
2.1. Präparate	4
2.2. Färbelösungen	5
2.3. Zusätzlich benötigte Materialien.....	5
3. Methode	6
3.1. Fixierung	6
3.2. Manuelle Färbung.....	6
3.3. Färbung in Färbegeräten von Dagatron.....	7
4. Analyse und Bewertung	8
4.1. Analyse	8
4.2. Färbeergebnisse	8
4.3. Bewertung	9
5. Tipps und Troubleshooting.....	9
5.1. Tipps.....	9
5.2. Troubleshooting	10
6. Literatur	11

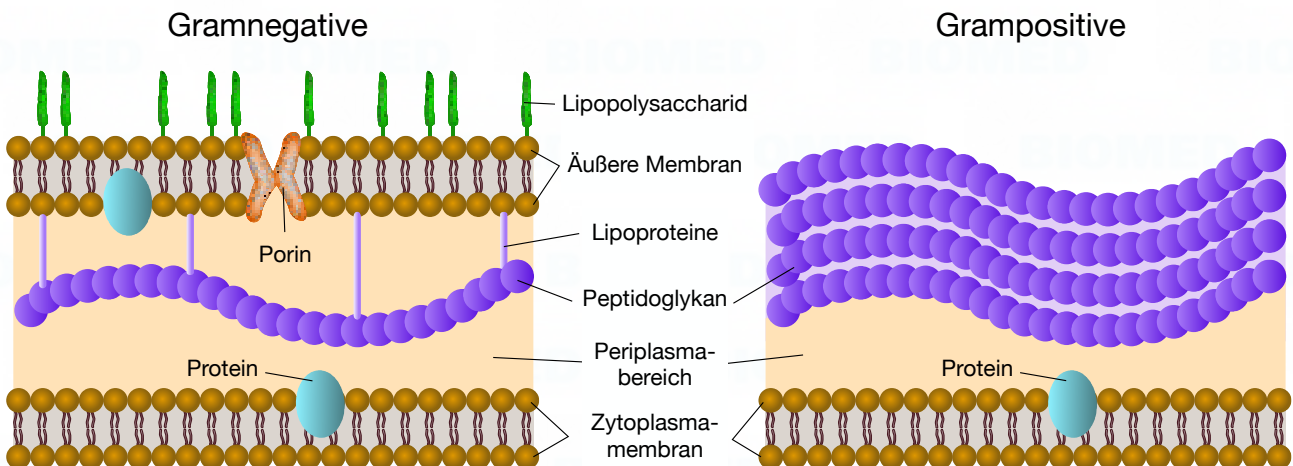
1. Einführung/Hintergrund

Die Gram-Färbung wurde 1884 von Hans Christian Gram entwickelt. Es handelt sich hierbei um eine Differentialfärbung bei der mehrere Farbstoffe eingesetzt werden um histologische, mikrobielle und morphologische Strukturen darzustellen.

Mit dieser Färbemethode lassen sich Bakterien in zwei Gruppen einteilen: Grampositive und Gramnegative. Die beiden Gruppen unterscheiden sich in ihrer Zellwandstruktur.

Bei grampositiven Bakterien besteht die Zellwand aus einer ca. 15-80 nm dicken Wand mit etwa 40 Schichten von Zucker- und Eiweißmolekülen, sogenannten Peptidoglykanen oder Mureinen, und Teichonsäure. Sie wird deshalb auch Peptidoglykan- oder Mureinschicht genannt. Grampositive Bakterien haben darunter außerdem nur eine Schicht einer Lipidmembran.

Bei gramnegativen Bakterien ist die Zellwand viel dünner als bei grampositiven. Sie ist hier nur ca. 10-20 nm dick und besteht aus einer bis wenigen Peptidoglykanschichten. Außerdem enthält sie keine Teichonsäure. Darüber und darunter befindet sich jeweils eine Lipidmembran. Insgesamt sind bei den gramnegativen im Gegensatz zu den grampositiven Bakterien also zwei Lipidmembranen vorhanden.



Bakterien können in verschiedenen Proben wie z.B. Gewebe oder Blut nachgewiesen werden. Bei der Gram-Färbung wird das Probenmaterial zunächst auf einem Objektträger fixiert und entparaffiniert, wobei die äußere Membran der gramnegativen Bakterien aufgelöst wird.

Die Lösungen für die Färbung sind häufig gebrauchsfertig erhältlich.

Zuerst wird die Peptidoglykanschicht mit Kristallviolett angefärbt.

Dann wird die Farbe durch die Verwendung einer Iod-Kaliumiodid-Lösung (Lugolsche Lösung) fixiert. Iod bildet zusammen mit Kristallviolett bei grampositiven Bakterien stabile Komplexe in der Peptidoglykanschicht der Zellwand. Bei gramnegativen Bakterien dagegen sind diese Komplexe aufgrund der anderen Zellwandstruktur nicht stabil und können leicht ausgewaschen werden. Dies geschieht in dem nächsten Differenzierungsschritt.

Zur Differenzierung von grampositiven und gramnegativen Bakterien werden die Präparate mit einer alkoholhaltigen Lösung gewaschen. Dadurch löst sich die Farbe aus den gramnegativen Bakterien. In den grampositiven Bakterien bleibt die Farbe aufgrund der hohen Stabilität des Kristallviolett-Iodkomplexes dagegen in der Zellwand erhalten. Sie erscheinen unter dem Mikroskop dunkel-violett.

Um auch die gramnegativen Bakterien unter dem Mikroskop sichtbar zu machen erfolgt eine Gegenfärbung mit Safranin oder Fuchsin. Dadurch erscheinen sie unter dem Mikroskop rötlich-orange. Die grampositiven Bakterien behalten ihre dunkel-violette Färbung.

Zwischen den einzelnen Schritten werden die Präparate jeweils mit destilliertem Wasser gewaschen.

Beispiele für grampositive Bakterien sind Staphylokokken, Laktobazillen und Listerien. Beispiele für gramnegative Bakterien sind Gonokokken, Meningokokken und Enterobakterien.

Mit der Gram-Färbung können fast alle Bakterien gefärbt werden. Ausgenommen sind Bakterien ohne Zellwand (z.B. Mycoplasmen), säurefeste Bakterien (z.B. Mycobakterien), intrazelluläre Bakterien (z.B. Chlamydien) und sehr kleine Bakterien, die unter dem Mikroskop nicht sichtbar sind (z.B. Spirochäten).

2. Material

2.1. Präparate

Die Gram-Färbung eignet sich z.B. für Färbungen von Präparaten in Laboratorien von Kliniken, der Pharmaindustrie, Arztpraxen und Tierarztpraxen. Als Präparate für die Gram-Färbung sind beispielsweise Gewebeproben, Körperflüssigkeiten oder Kulturproben einsetzbar. Für die Ausstriche der Materialien sollten Objektträger der Größe 76x26 mm verwendet werden.

Die Färbung kann entweder manuell mit den gebrauchsfertigen Gramyfix® Färbelösungen durchgeführt werden oder voll automatisch nach dem Injektionsverfahren mit dem Gerät AT-3002 GRAM/AFB (Z/N) Dual Stainer von Dagatron.

Alle Proben sind nach dem Stand der Technik und den anerkannten Labormethoden zu entnehmen, zu behandeln, vorzubereiten und zu trocknen.



Als Probenmaterial für Blutausstriche wird frisches kapillares oder venöses, mit EDTA koaguliertes Blut empfohlen. Mit Na-Citrat, Na-Oxalat bzw. Heparin versetzte Proben eignen sich nicht für diese Untersuchungen, da diese Antikoagulanzen die Färbung teilweise schwerwiegend verfälschen können. Das Kapillarblut sollte sofort, das venöse Blut spätestens 3 Stunden nach Probenahme ausgestrichen und luftgetrocknet werden.

Entscheidend für die Auswertung gefärbter Blutausstriche ist die Ausstrichqualität. Wichtig ist die Verwendung fettfreier und sauberer Objektträger. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Ausstrichtechnik. Hierbei wird ein kleiner Blutropfen auf einer Seite eines beschrifteten Objektträgers aufgebracht (ca. 1,5 cm vom Rand entfernt), ein zweiter Objektträger mit geschliffenen Kanten wird im Winkel von 45° vor dem Blutropfen angesetzt und dann vorsichtig in den Blutropfen geführt. Sobald sich das Blut über die ganze Kante verteilt hat, wird der zweite Objektträger in unverändertem Winkel kontinuierlich über den ersten Objektträger geschoben. Die Bewegung muss gleichmäßig und zügig erfolgen. Es dürfen keine Stufen im Ausstrich entstehen. Ein gut ausgestrichenes Präparat zeigt am Ende, wo der Objektträger schliesslich abgehoben wird, ein bartförmiges Ausfransen des Blutmaterials.

Die Dicke des Ausstrichs hängt vom Winkel zwischen dem ersten und zweiten Objektträger ab: Je kleiner der Winkel, desto dünner wird der Ausstrich. Lässt man auf dem getrockneten Ausstrich Licht reflektieren, sollte er grünlich erscheinen. Erscheint er rot, ist er zu dick



geraten. Zu hastige Bewegungen beim Ausstreichen können zum Abriss des Flüssigkeitsfilms führen.

Erst wenn der Ausstrich sorgfältig an der Luft getrocknet worden ist, kann er gefärbt werden. Spätestens 24 - 48 Stunden nach Ausstrich sollte die Färbung begonnen werden, um eine wesentliche Änderung des Färbeverhaltens zu vermeiden. Für eine spätere Färbung sollten die Präparate sofort nach der Lufttrocknung der Präparatdicke entsprechend ausreichend lang fixiert werden.

Die nachfolgenden Protokolle sind für dünne bis mitteldicke Ausstrichpräparate.

Zytologische Proben können frische Knochenmarkausstriche oder klinisch-zytologisches Material wie Urinsediment, Sputum etc. sein. Geeignet sind auch Abstriche von Feinnadelaspirationsbiopsien und Spülungen.

Für die Analyse von Liquorsediment sollte Liquor (auch: Liquor cerebrospinalis, cerebrospinal fluid, CSF) sofort (bis 1 h nach Entnahme) prozessiert werden. Liquor ist eine klare, zellarme Flüssigkeit. Die häufigsten Zellen im Liquor gesunder Personen sind Lymphozyten, seltener Monozyten. Erhöhte Zahlen von Leukozyten oder das Auftreten von Erythrozyten im Liquor weisen auf eine Erkrankung hin.

2.2. Färbelösungen

Für die manuelle Färbung:

- Gramyfix® Blau
- Gramyfix® Entfärbung
- Gramyfix® Iod
- Gramyfix® Fuchsin oder Gramyfix® Safranin

Für die vollautomatische Färbung mit Geräten von Dagatron:

- GR-2A GRAM Stain Kit mit
- Kristallviolett
- Iod
- Aceton-Alkohol
- Safranin bzw. Fuchsin



2.3. Zusätzlich benötigte Materialien



Die zusätzlich benötigten Materialien müssen geeignet sein und den Anforderungen an ein medizinisch-diagnostisches Labor gerecht werden.

- Entsprechendes Probenmaterial
- Fettfreie, saubere Objektträger
- Für die Fixierung mit Hitze: Heizplatte bei 70-80° C für 10-20 Minuten oder dreimaliges kurzes Durchziehen über einer starken Flamme
- Destilliertes Wasser zum Waschen
- Eventuell Deckgläser in geeigneter Größe und Eindeckmedium (Mounting Medium), z. B. Euparal oder Entellan
- Durchlichtmikroskop für die medizinische und biologische Anwendung in Laboren
- Eventuell Immersionsöl
- Färbeküvetten oder ein geeignetes Färbegerät

Das vorliegende Protokoll wurde manuell in Färbeküvetten und an folgenden Färbeautomaten getestet:

- Dagatron AT-2000G GRAM Auto Stainer
- Dagatron AT-3002 GRAM /AFB (Z/N) Dual Stainer
- Dagatron AT-3002 GRAM /AFB (F/L) Dual Stainer
- Dagatron AT-3004 GRAM/HEMA Dual Stainer

3. Methode

Sowohl die manuelle als auch die automatische Gram-Färbung können grundsätzlich im Injektions- oder Tauchverfahren durchgeführt werden. Der Vorteil der Injektionsmethode ist die Vermeidung von Kreuzkontamination. Die Lösungen werden entsprechend auf das Präparat aufgetragen oder das gesamte Präparat wird in die Lösung getaucht.



3.1. Fixierung

Eine ausreichende Hitzefixierung mit dem Bunsenbrenner, in einem Hitzeschrank oder auf einer Heizplatte sind wichtig, um das infektiöse Potential der Präparate und ein Weiterwachsen der Bakterien zu verhindern. Deshalb müssen die Ausstriche sofort noch im feuchten Zustand fixiert werden.

3.2. Manuelle Färbung

Die manuelle Färbung kann in Färbeküvetten oder durch das Auftragen der Lösungen mit Hilfe einer Pipette durchgeführt werden. Bei einer größeren Anzahl von Präparaten empfiehlt sich der Gebrauch von Färbeküvetten, bei wenigen ist die Methode des Auftrages mit Hilfe einer Pipette sparsamer und daher zu bedenken. Das folgende Protokoll ist mit Gramyfix®-Lösungen optimiert worden, kann jedoch auch mit anderen Färbelösungen durchgeführt werden.

Alle Gramyfix®-Lösungen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden. Die jeweils benötigte Menge der Lösungen Gramyfix® Blau, Gramyfix® Iod und Gramyfix® Fuchsin oder Gramyfix® Safranin sollte für die manuelle Durchführung mit einem Faltenfilter gefiltert werden um Artefaktbildungen zu vermeiden.



Färbeschritte:

- Färben mit Gramyfix® Blau für eine Minute
- Waschen mit destilliertem Wasser für eine Minute
- Fixieren der Färbelösung mit Gramyfix® Iod für eine Minute
- Entfärben mit Gramyfix® Entfärbung für 30 Sekunden
- Waschen mit destilliertem Wasser für eine Minute
- Gegenfärben mit Gramyfix® Safranin oder Fuchsin für eine Minute
- Waschen mit destilliertem Wasser für eine Minute
- Lufttrocknen der Präparate

Die Inkubationszeiten können individuell angepasst werden. Für die Lagerung der Präparate können sie mit einem Deckglas eingedeckt und haltbar gemacht werden.

3.3. Färbung in Färbegeräten von Dagatron

Die Gram-Färbung und die nachfolgende Trocknung mit den Färbegeräten von Dagatron erfolgen voll automatisch. Das Verfahren ist ein präzises, komfortables und sicheres Verfahren und spart im Vergleich zu manuellen Techniken Zeit. Die ausgewählte Menge der Färbelösung wird durch automatische Injektionsköpfe des Gerätes auf die einzelnen Objektträger aufgetragen, wodurch ein gleichmäßiges, einheitliches Ergebnis ohne Verlust von Probenmaterial erreicht wird.

Ein Durchlauf dauert nur wenige Minuten und es können bis zu 10 oder, bei zusätzlichem Objektträgerrad, bis zu 20 Objektträger gleichzeitig im Gerät gefärbt werden. Ein Standard Färbeprogramm ist bereits im Gerät eingestellt. Die einzelnen Injektions- und Inkubationszeiten können aber auch nach Bedarf individuell eingestellt werden. Die vorgenommenen Einstellungen bleiben nach Beendigung der Nutzung gespeichert und werden beim nächsten Gebrauch wieder angewandt.

Das Gerät verfügt zudem über ein Selbstreinigungsprogramm und zeigt an, wenn das Volumen der Reagenzien auf ein kritisches Restvolumen gesunken ist.

Die Färbelösungen sind alle gebrauchsfertig und müssen nicht weiter verdünnt werden.

Für die Färbung werden die Objektträger mit den fixierten Proben horizontal auf das Objektträgerrad gelegt. Hierbei empfiehlt es sich, die Objektträger so auszurichten, dass die beschriftete Seite zur Mitte zeigt. Der Deckel wird sicher verschlossen und das Programm ‚GRAM‘ ausgewählt. Mit der Taste ‚Stain‘ wird die Färbung gestartet.



Im Zubehör der Geräte von Dagatron sind Filter für die Zulaufschläuche enthalten. Um eine Kristallbildung in den Filtern zu verhindern und die Injektion des korrekten Färbenvolumens sicherzustellen, sollten die Filter regelmäßig (mindestens einmal pro Monat) gereinigt werden.



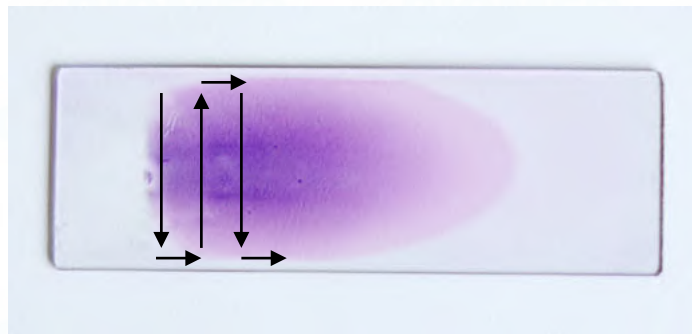
4. Analyse und Bewertung

4.1. Analyse

Zunächst kann die Betrachtung der Qualität des Präparats makroskopisch erfolgen, hierbei wird anhand der Güte und Dicke des Ausstrichs der zu analysierende Bereich festgelegt. Eine erste, oberflächliche Beurteilung der Färbung bezüglich Stärke der Färbung und Gleichmäßigkeit ist auch bereits möglich.

Die genauere Beurteilung der Präparate sollte mit einem geeigneten Durchlichtmikroskop erfolgen. Bei geringer Vergrößerung (Objektiv 10x oder 20x) kann die Ausstrichqualität und die Färbequalität festgestellt werden. Entscheidend ist, dass die Zellen möglichst vereinzelt, also wenig überlagert, liegen und auch nicht beim Ausstrich mechanisch zerstört wurden. Der geeignete Bereich für die Differenzierung der Zellen kann definiert werden.

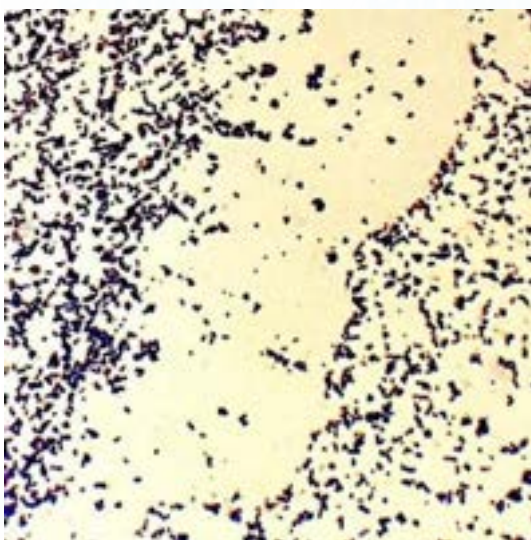
Bei höherer Vergrößerung (Objektiv 50x oder 100x, sofern nötig Ölimmersion) kann die Differenzierung der Zellen anhand ihrer Größe, Struktur und Färbung erfolgen. Um wiederholte Analyse des selben Bereichs zu verhindern, wird das Präparat in einem kurvenförmigen Muster gescreent.



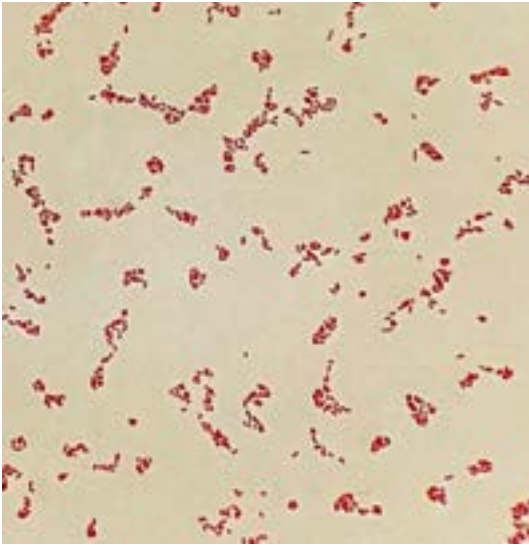
4.2. Färbeergebnisse

Mit der Gram-Färbung lassen sich Bakterien in grampositiv und gramnegativ einteilen.

- Staphylococcus aureus: Grampositiv, mit GRAMYfix® Safranin gegengefärbt:
Form: kugelförmig
Größe: \varnothing 0,8-1,2 μm , Zellwanddicke: 20-50 nm

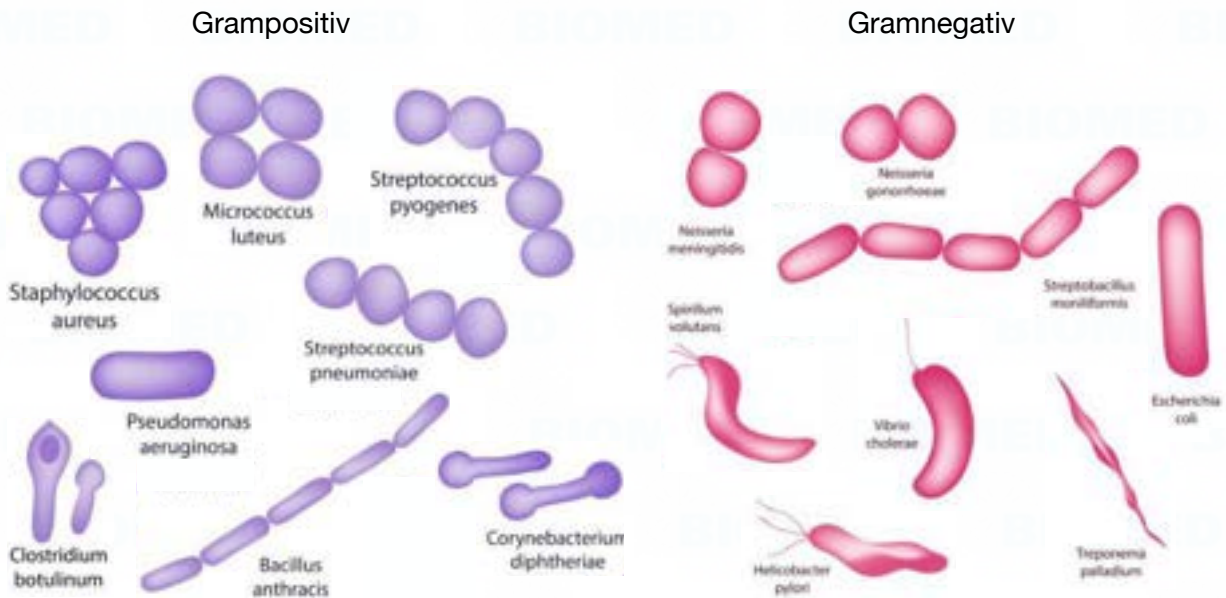


- *Escherichia coli*: Gramnegativ, mit GRAMYfix® Safranin gegengefärbt:
Form: stäbchenförmig
Größe: \varnothing 1,1-1,5 μm , Länge 2,0-6,0 μm



4.3. Bewertung

Aufgrund der Unterschiede in der Zellwandstruktur erscheinen grampositive Bakterien nach der Gram-Färbung blau und gramnegative rot. Anhand der Größe, Form und anderer struktureller Merkmale können die Bakterien weiter differenziert werden.



5. Tipps und Troubleshooting

5.1. Tipps

- Der kritischste Schritt bei der Gram-Färbung ist die Entfärbedauer. Sie korrekt festzulegen ist wichtig, damit nicht zu stark entfärbt wird.

- Die Einwirkdauer der Färbelösungen und insbesondere auch der Entfärbelösung sollten immer an die entsprechenden Anforderungen angepasst werden.
- Die Dicke des Ausstrichs und somit die Dichte der Zellzahl beeinflussen das Färbeergebnis. Das Präparat sollte gleichmäßig auf dem Objektträger aufgetragen werden, d.h. es sollten keine Klumpen oder leere Stellen vorhanden sein. Bei dickeren Ausstrichen sind größere Volumen und längere Einwirkzeiten sinnvoll als bei dünneren. Es empfiehlt sich, Ausstriche ähnlicher Dicke und Qualität zusammen zu färben.
- Die Qualität der Probe kann die Färbequalität beeinflussen. Zur Färbung sollten immer Proben von gut wachsende Kulturen verwendet werden. Hier ist anzunehmen, dass die Zellen intakt und die Zellwände nicht beschädigt sind.
- Verschmutzungen auf den Objektträgern können das Ergebnis beeinträchtigen und sollten vermieden werden.
- Die Menge der verwendeten Färbelösung ist ebenfalls kritisch. Sie beeinflusst das Ergebnis des Auswaschens und der Differenzierung.
- Wenn die Färbelösungen über einen längeren Zeitraum nicht verwendet werden, können sich Ablagerungen bilden. Ein Filtrieren der Färbelösungen vor dem erneuten Gebrauch ist daher sinnvoll.
- Eine unsachgemäße Lagerung der Färbelösungen kann deren Funktion beeinträchtigen. Es ist darauf zu achten, dass die Angaben des Herstellers eingehalten werden.
- Färbelösungen in Küvetten sollten nach spätestens 3 Tagen gewechselt werden.
- Beim Einsatz des Färbegerätes muss unbedingt die Anleitung des Herstellers beachtet werden.
- Zur Beurteilung der Qualität der Färbemethode ist das Mitführen einer Kontrolle empfehlenswert, idealerweise auf entsprechenden Objektträgern wie die zu testende Probe.

5.2. Troubleshooting

- Grampositive und gramnegative Bakterien erscheinen grampositiv (blau) - mögliche Ursachen:
 - Zu kurze Einwirkzeit der Entfärbelösung
- Grampositive und gramnegative Bakterien erscheinen gramnegativ (rot) - mögliche Ursachen:
 - Zu lange Einwirkzeit der Entfärbelösung
- Anordnung und Form der Zellen nicht erkennbar - mögliche Ursachen:
 - Ausstriche zu dick
- Die Zellen erscheinen zu groß - mögliche Ursachen:
 - Ausstriche zu dünn
- Zu schwache Färbung - mögliche Ursachen:
 - Zu wenig Färbelösung verwendet
 - Zu dickes Präparat
 - Zu starke Spülung
 - Färbezeiten zu kurz
 - Färbelösung zu alt oder unsachgemäß gelagert oder pH Wert nicht korrekt
- Zu starke Färbung - mögliche Ursachen:
 - Zu viel Färbelösung verwendet
 - Zu dünnes Präparat
 - Zu schwache Spülung
 - Färbezeiten zu lang
 - Färbelösung alt, unsachgemäß gelagert oder pH Wert nicht korrekt
- Artefakte sind sichtbar - mögliche Ursachen:
 - Färbelösungen wurden nicht filtriert

- Filter der Zulaufschläuche wurde nicht gesäubert
 - Mechanische Zerstörung der Zellen beim Ausstreichen
 - Unzureichende/verwässerte Fixierung
 - Unzureichende Trocknung des Präparats
 - Fehlerhafte Lagerung der Probe (zu lang/gekühlt)
- Restflüssigkeit läuft nicht aus dem Gerät ab - mögliche Ursachen:
- Das Ende des Ablaufschlauchs berührt den Boden oder befindet sich zu nahe am Boden des Abwasserbehälters. Hier sollte ein Abstand eingehalten werden.
 - Partikel im Abflussrohr, z.B. von einem zerbrochenen Objektträger oder durch eine mikrobielle Verunreinigung

6. Literatur

- Maria Mulisch, Ulrich Welsch Romeis - Mikroskopische Technik, 12. Auflage
- Gerd Neumann, Axel Schäfer - Mikroskopische Diagnostik in der Frauenarztpraxis, 2012
- <https://microbeonline.com/gram-staining-principle-procedure-results/>
- https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-48986-4_1316
- <https://www.mikroskop-center.de/newsblog/gramfaerbung>
- <https://blog.biomed.de/news/gram-reaktion-auf-gramfaerbung>
- https://epub.ub.uni-greifswald.de/frontdoor/deliver/index/docId/1483/file/diss_raeth_susann.pdf
- <https://flexikon.doccheck.com>
- https://de.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

Herausgegeben am: 12.06.2023

Herausgeber:

BIOMED Labordiagnostik GmbH
Bruckmannring 32
D-85764 Oberschleißheim

Phone: + 49 89 315 700 0
Fax: + 49 89 315 700 10

Mail: info@biomed.de
Web: www.biomed.de

