

# Gebrauchsanweisung

## Gram-Färbekit HP02

### Unterscheidung Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien

Die Gram-Färbung ist die weltweit wichtigste Färbetechnik zur Unterscheidung und Identifikation von Bakterien. Die Probe wird zunächst mit Karbol-Gentianaviolett-Lösung gefärbt und mit Lugolscher Lösung gebeizt. Bei der anschließenden Behandlung mit Entfärbelösung werden Gram-positive Bakterien nicht wieder entfärbt, da ihre mehrschichtige Zellwand den entstandenen Farbkomplex zurückhält. Gram-negative Bakterien dagegen besitzen nur eine einschichtige Zellwand, können daher leicht entfärbt und anschließend mit Karbol-Fuchsin-Lösung gegengefärbt werden. Die Unterscheidung ist z.B. wichtig für die Behandlung von Infektionskrankheiten, bei denen die Wahl des passenden Antibiotikums vom jeweiligen Bakterientyp abhängt.

### Der Kit enthält

- Karbol-Gentianaviolett-Lösung (CN00.1)
  - ⚠️ Achtung H226-H319 500 ml
- Jod-Kaliumjodidlösung nach Lugol (N052.3) ⚠️ Achtung H373 500 ml
- Gram's Entfärbelösung (CN02.1)
  - ⚠️ Gefahr H225-H319-H336 EUH066 500 ml
- Karbol-Fuchsin-Lösung (A130.2)
  - ⚠️ Gefahr H314-H341 500 ml

Lösungen vor Gebrauch filtrieren! Die Lösungen können einzeln nachbestellt werden.

### Weitere benötigte Reagenzien

- ROTI®Histol (Best.-Nr. 6640) oder Xylol p.a. (Best.-Nr. 4436)
- ROTI®Histokitt (Best.-Nr. 6638), kompatibel mit ROTI®Histol, oder ROTI®Histokitt II (Best.-Nr. T160), kompatibel mit Xylol
- Safraninlösung (Best.-Nr. CN01) - optional

### Durchführung *Für luftgetrocknete, hitzefixierte Bakterienausstriche, dünn ausgestrichen*

1. Karbol-Gentianaviolett-Lösung auftropfen und einwirken lassen <b>2-3 min</b>	6. Karbol-Fuchsin-Lösung (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) auftropfen und einwirken lassen. <b>30-60 sec</b>
2. Farblösung abgießen und mit Lugolscher Lösung 2-3 x abspülen - nicht mit Wasser.	7. Farblösung abgießen und mit Aqua dest. spülen.
3. Ausstrich in Lugolsche Lösung einstellen <b>3 min</b>	8. Überschüssiges Wasser entfernen, lufttrocknen.
4. Gram's Entfärbelösung tropfenweise über Objektträger laufen lassen, bis keine Farbwolken mehr abgehen. <b>max. 20-30 sec</b> <i>Nicht länger differenzieren, da sonst auch Entfärbung Gram-positiver Strukturen möglich ist!</i>	9. Aufsteigende Alkoholreihe (70-96-100 %) Zwischenschritt mit ROTI®Histol bzw. Xylol Eindecken mit ROTI®Histokitt oder ROTI®Histokitt II
5. Vorsichtig mit Aqua dest. spülen, Entfärbelösung muss vollständig abgespült werden.	<b>Hinweis:</b> Für die Gegenfärbung der Gram-negativen Strukturen kann man an Stelle von Karbol-Fuchsin-Lösung auch Safraninlösung verwenden. Safraninlösung wird unverdünnt angewandt.

**Ergebnis:** Gram-positive Bakterien: violett, Gram-negative Bakterien: rot

**Hinweis:** Die Farbintensität ist abhängig von der Vorbehandlung und Beschaffenheit der zu färbenden Probe. Eine Anpassung der Methode an die jeweiligen Bedingungen kann also ggf. erforderlich sein.

**Carl Roth GmbH + Co. KG**

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe  
Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe  
Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0  
Fax: +49 (0) 721/ 5606-149  
info@carlroth.de • www.carlroth.de sse 06/2021

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428.  
Geschäftsführer: André Houdelet

**Gram Färbekit**

**HP02.1**

# Instructions for use

## Gram Staining Kit HP02

### Differentiation of Gram positive and Gram negative bacteria

Gram staining is the most important technique for differentiation and identification of bacteria. The probe is stained with gentianaviole and fixed with Lugol solution as a mordant. During the decolourising step Gram positive species remain stained, because its thick multilayer cellular walls retain the violet-iodine complex. In contrast, due to its thinner cellular walls, Gram negative species are decolourised easily and subsequently can be counterstained by carbolic fuchsine solution. The differentiation into Gram positive and Gram negative bacteria is important e.g. for choosing appropriate antibiotic treatment of infections.

### Kit contains

- Carbol gentianaviole solution (CN00.1)  
⚠ Warning H226-H319 500 ml
- Iodine-potassium iodide solution acc. to Lugol (N052.3) ⚠ Warning H373 500 ml
- Gram's decolourising solution (CN02.1)  
⚠ Danger H225-H319-H336 EUH066 500 ml
- Carbolic fuchsine solution (A130.2)  
⚠ Danger H314-H341 500 ml

*The staining solutions should be filtrated before use! Solutions may be bought separately.*

### Additional chemicals required

- ROTI®Histol (Art.-No. 6640) or xylene p.a. (Art.-No. 4436)
- ROTI®Histokitt (Art.-No. 6638), compatible with ROTI®Histol or ROTI®Histokitt II (Art.-No. T160), compatible with xylene
- Safranin solution (Art.-No. CN01) - *optional*

### Instructions

*Use air-dried, heat-fixed smears in a thin layer*

1. Add a few drops of carbol gentianaviole solution and let incubate. <p style="text-align: right;"><b>2-3 min</b></p>	6. Add a few drops of carbolic fuchsine solution (diluted with distilled water at a ratio of 1:10) and let incubate. <p style="text-align: right;"><b>30-60 sec</b></p>
2. Decant the staining solution and rinse 2-3 times with Lugol solution – do not use water.	7. Decant the staining solution and rinse with distilled water.
3. Let the smear incubate in Lugol solution. <p style="text-align: right;"><b>3 min</b></p>	8. Shake off the excess water and dry at the air.
4. Let a few drops of Gram's decolourising solution trickle down the slide, until no more colour runs off. <p style="text-align: right;"><b>max. 20-30 sec</b></p> <p><i>Do not prolong differentiation time! Otherwise Gram-positive species can be decolourised too!</i></p>	9. Dehydrate by ascend. alcohol series (70-96-100 %) Clear with ROTI®Histol or xylene Mount with ROTI®Histokitt or ROTI®Histokitt II
5. Rinse carefully with distilled water to remove the decolourising solution completely.	<p><b>Note:</b>            Instead of carbolic fuchsine solution it is possible to use safranin solution for counterstaining Gram negative bacteria. Safranin solution is used undiluted.</p>

**Results:** Gram positive bacteria: violet, Gram negative bacteria: red

**Note:** The colour intensity depends on the pre-treatment and the composition of the samples to be stained. It may initially be necessary to adapt the method to the respective conditions.

### Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe  
 P.O. Box 100121 • 76231 Karlsruhe  
 Phone: +49 (0) 721/ 5606-0  
 Fax: +49 (0) 721/ 5606-149  
 info@carlroth.com • www.carlroth.com

sse 06/2021

The company is a limited partnership with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRA 100055. Roth Chemie GmbH, with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRB 100428, is the personally liable partner. Managing Director: André Houdelet. Sales tax identification number: DE 143621073.

### Gram Staining Kit

**HP02.1**