

# Barvení dle Gram-Nicolle

## Fixace a diferenciální barvení buněčných struktur

Pro použití v laboratoři vyškoleným personálem. In Vitro diagnostické zařízení.

### 1 – Použití

Gram-Nicolle barvení je pro fixaci a diferenciální barvení buněčných struktur před mikroskopováním.

### 2 – Princip stanovení

Barvení Gram-Nicolle je diferenciální metoda, založena na prostupnosti buněčné stěny. Během barvení se buněčná stěna nebarví, ale její struktura umožňuje klasifikaci Gram-pozitivní nebo Gram-negativní.

Lugol roztok umožňuje tvorbu vnitrobuněčných komplexů s Carbolic Gential Violet. U Gram-negativních buněk pak alkohol tento komplex rozpustí.

Gram-negativní buňky jsou barveny Ziehl Carbolic Fuschinem do růžova, Gram-pozitivní nejsou odbarveny alkoholem a zůstávají fialové.

### 3 – Reagencie

Carbolic Gential Violet	Lugol PVP-stabilized
320960-1000 1 x 1l	367400-1000 1 x 1l
320960-2500 1 x 2,5l	367400-2500 1 x 2,5l
Fast Differentiator (aceton / alkohol)	Ziehl Carbolic Fuchsin 1/10
361510-1000 1 x 1l	364540-1000 1 x 1l
361510-2500 1 x 2,5l	364540-2500 1 x 2,5l
Slow Differentiator (alcohol-based)	
363030-1000 1 x 1l	

### Další potřebný materiál

Skříčka pro mikroskopování.

### 4 – Skladování a manipulace

Výše uvedené reagencie skladujte při pokojové teplotě (15 – 25°C), mimo přímé sluneční světlo.

Datum expirace před a po otevření jsou uvedeny na obalu.







Veškerá manipulace se vzorky a reagensy musí být prováděna vyškoleným personálem dle relevantních norem. Při manipulaci používejte správná ochranná zařízení pro jednotlivce i pro pracoviště dle příslušných regulací.

Personál musí být obeznámen s klasifikací nebezpečí materiálu. Kompletní informace viz bezpečnostní list pro uvedené reagensy.

Měření musí být provedeno autorizovaným personálem dle platných laboratorních řádů.

### Preventivní opatření pro manipulaci

Carbolic Gential Violet	
<p>P210: Držte mimo zdroje tepla, teplých povrchů, zdrojů jiskření a otevřeného ohně. Nekuřte.</p> <p>P264: Důkladně si umyjte ruce po manipulaci.</p> <p>P280: Používejte osobní ochranné prostředky – rukavice, oblečení, ochranu očí a obličeje.</p> <p>P308+P313: Při vystaví látce nebo podezření: Vyhledejte lékařskou pomoc.</p> <p>P337+P313: Pokud přetrvává podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc.</p>	
Fast Differentiator (alohol/acetone)	
<p>P210: Držte mimo zdroje tepla, teplých povrchů, zdrojů jiskření a otevřeného ohně. Nekuřte.</p> <p>P261: Nevdechujte páry, prach, aerosol, mlhu.</p> <p>P280: Používejte osobní ochranné prostředky – rukavice, oblečení, ochranu očí a obličeje.</p> <p>P312: Pokud se necítíte dobře, volejte Toxikologické středisko nebo lékaře.</p> <p>P337+P313: Pokud přetrvává podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc.</p> <p>Obsahuje CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>; butan-2-one; isopropyl alcohol</p>	
Slow Differentiator (alcohol-based)	
<p>P210: Držte mimo zdroje tepla, teplých povrchů, zdrojů jiskření a otevřeného ohně. Nekuřte.</p> <p>P280: Používejte osobní ochranné prostředky – rukavice, oblečení, ochranu očí a obličeje.</p> <p>P305+P351+P338+P310: Při zasažení očí: Opatrně vyplachujte vodou několik minut. Pokud možné, odstraňte kontaktní čočky a dál vyplachujte. Ihned volejte lékařskou pomoc nebo toxikologické středisko.</p> <p>Obsahuje CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH</p>	
Ziehl Carbolic Fuchsin	
<p>P210: Držte mimo zdroje tepla, teplých povrchů, zdrojů jiskření a otevřeného ohně. Nekuřte.</p> <p>P264: Důkladně si umyjte ruce po manipulaci.</p> <p>P280: Používejte osobní ochranné prostředky – rukavice, oblečení, ochranu očí a obličeje.</p> <p>P308+P313: Při vystaví látce nebo podezření: Vyhledejte lékařskou pomoc.</p> <p>P337+P313: Pokud přetrvává podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc.</p> <p>Obsahuje C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>OH 80%</p>	

### 5 – Barviva

320960: Crystal Violet < 0,2%

## 6 – Příprava vzorku

Manipulujte se vzorky dle laboratorních norem.

### Manuální bakteriální nátěr:

Na sklíčko rozetřete tenkou vrstvu bakterií a nechte zaschnout při pokojové teplotě. Nátěr můžete zafixovat teplem (plamenem nebo horkým povrchem) nebo chemickým fixativem (methanol, ehtanol, kyselinou octovou, formalinem...)

***Nikdy neopalujte plemenem vzorek, který není úplně suchý. Mohl by vzniknout aerosol a uvolnit bakterie do okolí.***

Dle potřeby mohou být fixační metody kombinovány.

## 7 – Příprava reagensů a nástrojů

Dle potřeby naředte Ziehl Carbolic Fuchsin a kyselinu sírovou v destilované vodě dle níže uvedených protokolů.

## 8 – Protokoly

Níže uvedené protokoly sestávají z postupných pokrývání sklíček různými barvicími roztoky. Pro kroky s barvením vložte sklíčka na stojánek s fixovaným nátěrem nahoře.

### **Bakteriální vzorky – manuální barvení s Fast Differentiator – manuální mikroskopická analýza**

Délka barvení: 3 minuty 2 sekundy

Kroky	Reagencie	Čas [min:s]	Instrukce
Barvení	Carbolic gential violet	01:00	-
Opláchnutí	Voda	-	Odstraňte reagensii a přebytek vody
Opláchnutí	Lugol	-	Na odstranění zbytku vody
Barvení	Lugol	01:00	-
Opláchnutí	Voda	-	Důkladně opláchněte
Odbarvení	Fast Differentiator	00:02	Může být prodlouženo na 5 sekund
Opláchnutí	Voda	-	Rychle
Barvení	Ziehl carbolic fuchsin 1/10	01:00	-
Opláchnutí	Voda	-	Rychle
Schnutí	-	≥03:00	-

## Bakteriální vzorky – manuální barvení s Slow Differentiator – manuální mikroskopická analýza

Délka barvení: 2 minuty 20 sekund

Kroky	Reagencie	Čas [min:s]	Instrukce
Barvení	Carbolic gential violet	01:00	-
Opláchnutí	Voda	-	Odstraňte reagensii a přebytek vody
Opláchnutí	Lugol	-	Na odstranění zbytku vody
Barvení	Lugol	01:00	-
Opláchnutí	Voda	-	Důkladně opláchněte
Odbarvení	Slow Differentiator	00:20	Může být prodlouženo na 40 sekund
Opláchnutí	Voda	-	Rychle
Barvení	Ziehl carbolic fuchsin 1/10	01:00	-
Opláchnutí	Voda	-	Rychle
Schnutí	-	≥03:00	-

Upravte dobu odbarvení dle tloušťky nátěru.

### 9 – Předpokládané výsledky

Bakteriální nátěr	
Gram-pozitivní bakterie	Fialová
Gram-negativní bakterie	Růžová

Pokud se výsledky liší od předpokladu, kontaktujte prosím výrobce nebo jeho zástupce.

### 10 - Charakteristika

Analytická validita reagensů je zaručena CE certifikací. Pro optimální výsledky používejte čisté a suché laboratorní příslušenství. Laboratoř je zodpovědná za kontaktování výrobce nebo jeho zástupce při jakékoliv závažné příhodě.

### 11 – Kontrola kvality

Uživatelé jsou zodpovědní za provedení kontroly kvality, její procedury a návaznosti s příslušnými laboratorními řády.

Výrobce (RAL Diagnostics) doporučuje použití Gram pozitivních a Gram negativních kontrolních vzorků při každé obnově barev, pro každou sadu barvení a alespoň pro každý nový barvicí cyklus, pokud se barví vícekrát denně.

Kontrolní sklíčka mohou být připravena napřed a tepelně zafixována pro skladování.

Pro kontrolu kvality používejte pouze vzorky se známou Gram-pozitivitou nebo negativitou.

### Stabilita barvy:

Kvalita a reprodukovatelnost barvení závisí na správném použití produktů. Barvení dle výše uvedených doporučení je stabilní po dobu několik dní.

Pokud je potřeba skladovat nátěry několik měsíců až let, výrobce doporučuje zakrýt je krycím sklíčkem se správnou tekutinou a skladovat v prachotěsném obalu.

### **12 – Bezpečnostní údaje**

Se všemi vzorky biologického původu by se mělo manipulovat jako s potencionálně infekčními.

Likvidaci provádějte dle místních platných regulací.

Chemický a biologický odpad musí být shromážděn a likvidován registrovanými společnostmi. Bezpečnostní údaje jednotlivých reagentů naleznete v jejich příslušných bezpečnostních listech.

### **13 – Reference**

**CALMETTE A., BOQUET A., NEGRE L. et BRETEY J.**, *Manuel technique de Microbiologie et Sérologie*, Masson & Cie, 4ème éd., 1948, p. 94-95.

**GENEVA WORLD HEALTH ORGANIZATION**, *Manual of basic techniques for a health laboratory*, n°39, 1982, p. 231-234.

**LANGERON M.**, *Précis de microscopie*, Masson & Cie, 6ème éd., 1942, p. 553-556.

Revize: 05/2022