

Protokolas nr. ° 11

Rinkinys Gram-Hücker

Greitas: (Ref.: 361520-0000)

(Ref.: 361525-0000)

Lėtas: (Ref.: 362860-0000)

Dažymo rinkinys gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų diferencijavimui

Principas:

Gram-Hucker dažymo yra deferencialinis dažymas paremtas bakterijų sienelių pralaidumu. Šiuo metodu bakterijų sienelės yra nera nudažomos, bet jų struktūra leidžia klasifikuoti bakterijas į gramteigiamas ir gramneigiamas.

Liugolio tirpalas leidžia susiformuoti intraląsteliniam kompleksui su Kristal violeto oksalatų.

Daugiau svarbus gramneigiamų bakterijų sienelių pralaidumas leidžiantis alkoholiui pašalinti šį kompleksą iš ląstelės. Gramneigiamos ląstelės gali fiksuoti Safraniną ir tuomet ląstelės atrodo nudažomos oranžiniai rožine spalva. Gramteigiamoms bakterijoms būdingas mažesnis ląstelės sienelės pralaidumas, todėl alkoholis iš ląstelės neišplauna komplekso ir jos lieka nudažytos violetine spalva

Rinkinio aprašymas:

Kristal violeto oksalatas	1 x 240 ar 1 x 1000 mL
Liugolio tirpalas, PVP stabilizuotas	1 x 240 ar 1 x 1000 mL
Greitas diferenciatorius (alkoholis/ acetonas)	1 x 240 ar 1 x 1000 mL
ar Lėtas diferenciatorius (alkoholio pagrindu)	1 x 240 mL
Safraninas	1 x 240 ar 1 x 1000 mL

Su rinkiniu galima nudažyti nuo 230 ir 300 stiklelių.

Dažymo trukmė: 3 minutės

Turimi papildymai:

Kristal violeto aksalatas Ref. 361490-	0240, 1000 ar 2500 mL
Liugolio tirpalas, PVP stabilizuotas Ref. 367400-	0240, 1000 ar 2500 mL

Greitas diferenciatorius (alkoholis/ acetonas)

Ref. 361510-

0240, 1000 ar 2500 mL

Lėtas diferenciatorius (alkoholio pagrindu)

Ref. 363030-

0240, 1000 ar 2500 mL

Safraninas

Ref. 361500-

0240, 1000 ar 2500 mL

Mėginio paruošimas:

Mėginys turi būti ruošiamas pagal laboratorijoje nustatytus reikalavimus ir kurios paskelbė nacionalinės valdžios institucijos.

Jei reikia, atlikite preliminarų fiksavimą karščiu ir/arba karštu alkoholiu

It is necessary to perform a preliminary fixation by heat and/or hot alcohol (žr.

Pranešimas 03: Mėginio fiksavimas, prieš dažymą bakteriologijoje).

Dažymo procedūra:

Prieš naudojant šias priemones, atidžiai perskaitykite visą šią informaciją.

- Padėkite stiklėlį ant stovo fiksuotu mėginiu į viršų.
- Stiklėlį pilnai padenkite kristal violeto oksalato tirpalu (butelis ❶) ir laikykite **1 minutę**.
- Plaukite tekančiu vandentiekio vandeniu.
- Perplaukite liugolio tirpalu (PVP stabilizuotu) (butelis ❷) pašalindami perteklinį vandenį po skalavimo.
- Stiklėlį padenkite liugoliu (PVP stabilizuotu) (bottle ❷) ir laikykite **nuo 30 sekundžių iki 1 minutės**.
- Kruopščiai nuplaukite vandentiekio vandeniu.
- Blukinimo laiką koreguokite priklausomai nuo mėginio storio ir technikos:
 - Greitas diferenciatorius (alkoholis/ acetonas) (butelis ❸) **2 – 5 sekundės**
 - Arba Lėtas diferenciatorius (alkoholio pagrindu) (butelis ❹) **20 – 40 sekundžių**, o po to skubiai skalauti vandentiekio vandeniu.
- Uždenkite stiklį safraninu (butelis ❺) **1 minutel**.
- Skubiai skalaukite vandentiekio vandeniu ir laiskite mėginiui išdžiūti.
- Mikroskopinis tyrimas su x100 imersiniu objektyvu.

Rezultatai:

Gramteigiamos bakterijos:	Violetinės
Gramneigiamos bakterijos:	Oranžiniai rožinės

Rekomendacijos ir/arba pastabos:

Tik profesionaliems naudojimui. Tik *In vitro* diagnostikai.



Surinkimas ir cheminių biologinių atliekų tvarkymas turi būti vykdomas pasitelkiant specializuotas ir registruotas įmones.

Saugojimas: 15 – 25 °C

Pridėjimas Polivinilpirolidono (PVP) į Liugolio tirpalą padeda išvengti jodo migracijos ir taip tirpalui suteikia pakankamo stabilumo, kad būtų galima naudoti kaip paruoštą tirpalą iš plastikinio butelio.

Galima pagerinti stebėjimą su žalios šviesos mikroskopu (žalios arba geltonos spalvos filtras uždėtas ant mėlynos spalvos filtro). Kontrastas priklausys nuo to, kokia diferenciacija pasirinkta.

Campylobacter gentis blogai nudažoma safraninu, o Legionella gentis lieka bespalvė.

Bibliografija:

CLARK G., Staining Procedures, Williams & Wilkins, 4^{ème} éd., 1981, p. 377-379.

VASTEL C.L., Coloration Gram-Hücker, Le Tech. Biol., n° 5, 1978, p. 243-245.