

«ПОГОДЖЕНО»

Перший заступник голови Державної
служби України з лікарських засобів
13 липня 2012 р. **І.Б. Демченко**

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар клінічної лікарні „Феофанія”
Державного управління справами
І.П. Семенів 22 червня 2011р.

REF № НР030.02

ТУ У 24.4-24607793-024:2011

ІНСТРУКЦІЯ ЩОДО ЗАСТОСУВАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ЗАБАРВЛЕННЯ ЗА ГРАМОМ З САФРАНІНОМ (НАБІР «ЗАБАРВЛЕННЯ ЗА ГРАМОМ С»)

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для диференціального забарвлення, дослідження структури клітинної стінки і виявлення приналежності бактерій до грампозитивних або до грамнегативних груп в клініко-діагностичних лабораторіях і науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на проведення **1000 аналізів** (при витраті кожного з робочих розчинів реагентів 50 мкл на визначення).

Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 25 °С.

Гарантійний термін придатності набору - 12 місяців від дня виготовлення.

Зберігати в захищеному від світла місці.

Набір призначено для застосування *in vitro* професійно навченим лаборантом.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Забарвлення за Грамом застосовується для забарвлення бактерій в мазках з культур, ексудатів, тканин і так далі. Принцип методу заснований на різниці в хімічному складі клітинної стінки прокариотичних мікроорганізмів. Сутність методу полягає в тому, що при слаболужній реакції бактерії забарвлюються основними барвниками трифенілметанової групи (кристалвіолет, генціанвіолет, метилвіолет). Обробка йодом призводить до міцної фіксації барвника в грампозитивних бактеріях. Подальше промивання забарвленого препарату нейтральним спиртом або ацетоном не знебарвлює грампозитивні бактерії. У грампозитивних бактеріях під впливом йоду не утворюється міцного комплексу, і обробка ацетоном або спиртом призводить до їх знебарвлення. Грампозитивні бактерії діагностуються шляхом дофарбовування контрастною барвою.

Кристалвіолет забарвлює бактерії в синьо-фіолетовий колір. Розчин Люголя реагує з кристалвіолетом, формуючи комплекс кристалвіолет - йодид. Знебарвлюючий агент усуває синій колір у грампозитивних бактерій, які забарвлюються в рожевий колір після забарвлення сафраніном.

СКЛАД НАБОРУ

- | | |
|--|-------------------------------|
| 1 Карболовий розчин генціану фіолетового | - 1 флакон з (10,0 ± 0,5) мл; |
| 2 Розчин Люголя | - 1 флакон з (50 ± 2) мл; |
| 3 Розчин сафраніну | - 1 флакон з (50 ± 2) мл. |

АНАЛІЗУЄМИЙ МАТЕРІАЛ

Рідини, секрети з нижніх дихальних шляхів і тканинні секрети, спинномозкова рідина. Не використовувати зразки, обсіменені нормальною бактерійною флорою.

ОБЛАДНАННЯ

- 1 Раковина або спеціальний місткий лоток для фарбування.
- 2 Спеціальний штатив («рейки») для фарбування мазків на предметних стеклах.
- 3 Пінцет або щипці для узяття предметних стекол.
- 4 Газовий або спиртовий пальник.
- 5 Фільтрувальний папір розміром < 4 x 1,5 см для фарбування мазків.
- 6 Дистильована вода для промивання мазків.
- 7 Штатив для просушування забарвлених стекол на повітрі у вертикальному або похилому положенні.

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

1 Робочий розчин генціану фіолетового одержують додаванням к вмісту флакона з **Карболовим розчином генціану фіолетового** 40 мл дистильованої води кімнатної температури. Енергійно струшують флакон протягом 30 с.

Витримують протягом 1 години. Розчин стійкий при зберіганні протягом 2-х місяців при температурі від плюс 15 °С до плюс 25 °С.

Виробник залишає за собою право вносити зміни без попереднього повідомлення. Дата останньої перевірки **21.04.2016**

2 **Розчин Люголя** готовий до використання. Придатний для роботи до закінчення терміну, зазначеного на упаковці, за умови зберігання при температурі від плюс 2 °С до плюс 25 °С.

3 **Розчин сафраніну** готовий до використання. Придатний для роботи до закінчення терміну, зазначеного на упаковці, за умови зберігання при температурі від плюс 2 °С до плюс 25 °С.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛИЗУ

Предметне скло перед дослідженням знежирюють і роблять на ньому мазок досліджуваних культур. Мазок слід робити тонким, щоб клітини рівномірно розподілялися на поверхні скла і не утворювали скупчень. Препарат висушують на повітрі, фіксують над полум'ям пальника (спиртовки) або метанолом і виконують наступні дії:

- на мазок кладуть смужку фільтрувального паперу;
- наносять 2 - 3 краплі з крапельниці (50 – 75 мкл) **Робочого розчину генціану фіолетового**;
- витримують протягом 2 хв;
- видаляють фільтрувальний папір;
- не промиваючи препарат водою, наносять 2-3 краплі з крапельниці (50 - 75 мкл) розчину Люголя;

Люголя;

- витримують протягом 1-2 хв до почорніння препарату;
- зливають залишки фарбника і розчину Люголя;
- знебарвлюють протягом 30-45 сек 96° етиловим спиртом; (*Предметне скло для знебарвлення мазка занурюють кілька разів в склянку із спиртом, процес знебарвлення вважається завершеним, коли від мазка перестають відділятися забарвлені у фіолетовий колір цівки рідини.*)

- ретельно промивають дистильованою водою;
- наносять 2-3 краплі з крапельниці (50-75 мкл) Розчину **сафраніну** (забарвлювач);
- витримують протягом 2 хв;
- зливають забарвлювач;
- промивають препарат дистильованою водою;
- висушують на повітрі;
- мікроскопують з імерсійною системою.

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

При правильному фарбуванні грампозитивні бактерії мають синьо-фіолетовий колір, а грамнегативні - рожево-червоний.

ДЖЕРЕЛА ПОМИЛОК

Забруднення проби нормальною мікробною флорою, кров'ю або фарбувальними речовинами можуть порушити фарбування.

ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1 При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.

2 Генціан фіолетовий: можливий канцероген. Небезпечний для водних організмів, може викликати довгострокові негативні ефекти у водному середовищі. Потрібно застосування спеціального захисного одягу і рукавичок. Необхідно уникати попадання мікроорганізмів в оточуюче середовище. Треба ретельно дотримуватися спеціальних інструкцій та техніки безпеки.

3 Розчин Люголя: не вдихати пари розчину Люголя.

УТИЛІЗУВАННЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і спільно з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

Паперову упаковку здайте в макулатуру, виполоскану тару - в сортоване сміття.

ЛІТЕРАТУРА

1 Lillie, R.D., H.J.Conn's Stain, ed.9th 1977.

2 Lehtonen, O-P., Gram-variayksen tekemisesta, Moodi, 2/1993.

3 Balows, A. et al., Manual of Clinical Microbiology, ed.5th.1991.



ТОВ НВП «Фелісіт-Діагностика»,
Україна, 49051 Дніпропетровськ, вул. Каштанова, 32
Тел./факс: (056) 747-47-76, 747-45-34
Тел.: (093) 573-75-35, (067) 535-15-73, (095) 168-36-54
E-mail: felicit_d@ua.fm <http://www.felicit.com.ua>