

«ПОГОДЖЕНО»

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

Код за НК 024:2023 – 42709

REF № НР030.02

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

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

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 грам-позитивних або до грам-негативних 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* тільки кваліфікованим лабораторним персоналом.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Забарвлення за Грамом застосовується для забарвлення бактерій в мазках з культур, ексудатів, тканин і та інших. Принцип методу заснований на різниці в хімічному складі клітинної стінки прокаріотичних 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 грам-позитивних бактеріях. Подальше промивання забарвленого препарату нейтральним спиртом або ацетоном не знебарвлює грам-позитивні бактерії. У грам-негативних бактеріях під впливом йоду не утворюється міцного комплексу, і обробка ацетоном або спиртом призводить до їх знебарвлення. Грам-негативні бактерії діагностуються шляхом дофарбовування контрастним барвником.

Кристалвіолет забарвлює бактерії в синьо-фіолетовий колір. Розчин Люголя реагує з кристалвіолетом, формуючи комплекс кристалвіолет-йодид. Знебарвлюючий агент усуває синій колір у грам-негативних 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.
4. Додатково потрібний реактив *Імерсійна олія для мікроскопії* (REF НР060.01 або REF НР060.02). **До складу набору не входить!**

АНАЛІЗУЄМИЙ МАТЕРІАЛ

Рідини, секрети з нижніх дихальних шляхів і тканинні секрети, спинномозкова рідина. Не використовувати зразки, забрудненні 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 взяття 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 нахиленому положенні.

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

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

Виробник залишає за собою право вносити зміни без попереднього повідомлення. Дата останньої перевірки **15.01.2024**

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

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;

- 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 грам-позитивні бактерії мають синьо-фіолетовий колір, а грам-негативні - 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.

УТИЛІЗАЦІЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і разом 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 «Філісіт-Діагностика»,
Україна, 49051 м. Дніпро, 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: filicet@ukr.net <http://www.felicet.com.ua>