

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	INSTRUCIUNE DE LUCRU COLORATIA GRAM cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

1. SCOP

Instrucțiunea descrie operațiunile necesare efectuării coloratiei Gram pentru detectarea prezentei *N.gonorrhoeae* pe frotiuri din produsul patologic si in culturi pe medii selective si neselective.

2. MOD DE LUCRU

2.1. Resurse necesare

2.1.1. Reactivi componentii ai trusei Gram :

- Solutie violet de gentiana : 1g violet de gentiana, 10ml etanol absolut, 2g fenol cristalizat, 90 ml apa distilata
- Solutie lugol : 1g iod, 2g iodura de potasiu, 300ml apa distilata
- Amestec etanol-acetona : 3 parti etanol 96^o + 1 parte acetona
- Solutie fuxina fenicata : 1g fixina bazica, 10ml etanol absolut, 5g fenol cristalizat, 90ml apa distilata

2.1.2. Materiale : lame microscopie curate, microscop cu obiectiv imersie (90-100x), ulei de imersie, solutie salina fiziologica, hartie de filtru, apa curenta.

2.2. Execuția coloratiei Gram

2.2.1. Frotiu din produsul patologic: se rotește tamponul pe suprafața lamei, nu se freacă de lamă pentru a nu strica structura celulelor

2.2.2. Frotiu din cultură : se depune o picătură de soluție salină 0.85% pe lamă în care se emulsionează o porțiune de colonie suspectă, fie cu ansa, fie cu un tampon (pe care se poate executa ulterior reacția Oxidazei).

2.2.3. Frotiurile se usucă la aer și apoi se fixează la flacără (încălzire ușoară)

2.2.4. Colorația :

- a. violet de gențiană 1min., spălare cu apă curgătoare
- b. lugol 2min.
- c. decolorare cu alcool-acetonă, secunde (frotiul devine roz)
- d. spălare cu apă curgătoare
- e. fuxină fenicată diluată 1/10 in apa distilata 1min.
- f. spălare și uscare

2.2.5. Examinare la microscop cu imersie :

- a. Frotiu din produs patologic : *Neisseria gonorrhoeae* apare sub formă de diplococi reniformi Gram negativ, extra- și intra-PMN
- b. Frotiu din cultură : *Neisseria gonorrhoeae* apare sub formă de coci reniformi Gram negativ, în diplo, terade sau grămezi
Rezultatul examinării se înregistrează in Formularul înregistrare rezultate Cod :

2.3. Controlul de calitate al coloratiei

Se execută un frotiu din amestec de culturi de 18 h de *E.coli* (sigur Gram negativ) și *Staphylococcus aureus* (sigur Gram pozitiv), care se colorează în paralel cu frotiurile din produsul patologic sau culturile de testat.

3. CRITERII DE ACCEPTARE / RESPINGERE

Colorația este validată numai în cazul în care frotiurile de control au aspectul caracteristic : *E.coli* Gram negativ și *Staphylococcus aureus*, Gram pozitiv

4. FORMULARE, ÎNREGISTRĂRI

4.1. FIȘĂ DE LUCRU IZOLARE, IDENTIFICARE SI CARACTERIZARE *NEISSERIA GONORRHORAE* Cod:

4.2. FORMULAR DE INREGISTRARE REZULTATE CARACTERE IDENTIFICARE *NEISSERIA GONORRHOEAE* Cod :