

			№ по кат.
Acridine Orange Stain	Для обнаружения микроорганизмов в прямых мазках с помощью методики флуоресцентного окрашивания.	1 x 250 мл	212536
		4 x 250 мл	212537

НАЗНАЧЕНИЕ

Acridine Orange Stain (Акридиновый оранжевый краситель) рекомендуется для использования при флуоресцентном микроскопическом обнаружении микроорганизмов в прямых мазках, подготовленных из клинических и неклинических материалов. Он особенно полезен при быстром исследовании нормально стерильных образцов, например спинномозговой жидкости, где может присутствовать несколько микроорганизмов, а также при быстром исследовании мазков крови или мазков, содержащих белковые вещества, где дифференциация микроорганизмов исходного материала может быть более сложной.

КРАТКИЙ ОБЗОР И ОПИСАНИЕ

Флуохроматическое окрашивание микроорганизмов с использованием акридинового оранжевого было впервые описано Штруггером (Strugger) и Хилбричем (Hilbrich) в 1942 г. С тех пор оно используется для исследования почвы и воды на наличие микробов. В 1975 г. Джонс (Jones) и Симон (Simon) проанализировали эпифлуоресцентные методы, используемые для прямого подсчета водных бактерий, и определили, что акридиновый оранжевый обеспечивает лучшую оценку популяции бактерий в образцах воды из озер, рек и морской воды.¹ Методика прямого подсчета с использованием акридинового оранжевого (AODC) использовалась для определения количества бактерий в отходах.^{2,3} Гейдельберг с соавторами использовал AODC при изучении сезонных изменений в популяциях морских бактерий и сделал вывод, что методики с использованием акридинового оранжевого красителя обладают преимуществами по сравнению с методиками прямого подсчета с использованием флуоресцентного олигонуклеотида (FODC).⁴ Методика прямой эпифлуоресцентной фильтрации (DEFT) с использованием акридинового оранжевого изложена в методах для исследования микробов в пище и воде.^{5,6,7,8}

Акридиновый оранжевый также использовался в клинических исследованиях, и его использование в окрашивании бактерий в гемокультурах стало общепринятым. В 1980 г. Маккарти (McCarthy) и Сенн (Senne) сравнили окрашивание акридиновым оранжевым со слепым пересевом для обнаружения положительных гемокультур.⁹ Их результаты показали, что акридиновый оранжевый является быстрой и недорогой альтернативой слепому пересеву. Они также сообщили, что акридиновый оранжевый оказался более чувствительным, чем краситель Грама при обнаружении микроорганизмов, позволяя обнаружить бактерии в концентрации приблизительно 1×10^4 КОЕ (колониеобразующих единиц)/мл. Лауэр (Lauer), Реллер (Reller) и Миррет (Mirret) сравнили акридиновый оранжевый с красителем Грама для обнаружения микроорганизмов в спинномозговой жидкости и в других клинических материалах.¹⁰ Их результаты совпадали с результатами Маккарти (McCarthy) и Сенна (Senne) и показывали, что методика окрашивания с использованием акридинового оранжевого является простой и быстрой и обеспечивает более высокую чувствительность, чем краситель Грама, при обнаружении микроорганизмов в клинических материалах.

Акридиновый оранжевый также использовался для обнаружения *Trichomonas vaginalis* в вагинальных мазках,¹¹ при диагностике малярии^{12,13} и микоплазм.¹⁴

ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ

Акридиновый оранжевый — это флуорохроматический краситель, который связывается с нуклеиновыми кислотами бактерий и других клеток.¹⁵ Под действием ультрафиолетового излучения акридиновый оранжевый окрашивает РНК и однонитевую ДНК в оранжевый цвет, двунитевую ДНК — в зеленый.

В среде буфера при pH 3,5 – 4,0 акридиновый оранжевый по-разному окрашивает микроорганизмы и клеточный материал. Бактерии и грибки равномерно окрашиваются в оранжевый цвет, тогда как человеческие эпителиальные и воспалительные клетки, а также фоновые остатки окрашиваются в цвета от светло-зеленого до желтого. Ядра активированных лейкоцитов окрашиваются в желтый, оранжевый или красный цвет благодаря увеличенному производству РНК, вызванному активацией. Эритроциты либо не окрашиваются, либо становятся светло-зелеными.

Благодаря свойству дифференцирующего окрашивания мазки, окрашенные акридиновым оранжевым, полученные из клинических материалов, можно быстро изучить с помощью флуоресцентного микроскопа при 100 – 400-кратном увеличении на наличие микроорганизмов, флуоресцирующих ярко-оранжевым цветом, на фоне черного или от светло-зеленого до желтого цвета.

РЕАГЕНТЫ

Acridine Orange Stain

Приблизительная рецептура*

Acridine Orange	0,1 г
Acetate Buffer, 0.5M	1000 мл

* При необходимости изменяется и/или дополняется для соответствия критериям эффективности.

Меры предосторожности. Для диагностического использования в условиях *in vitro*.

Точно выполняйте установленные лабораторные методики при работе с инфицированными материалами и их утилизации.

Условия хранения. Хранить при температуре 15 – 30 °С. Указанный срок хранения относится к продукту в контейнере при соблюдении условий хранения.

Разложение продукта. Не используйте при наличии видимого осадка или других признаков разложения раствора.

ВЗЯТИЕ И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Образцы следует собирать в стерильные контейнеры или с помощью стерильного тампона и немедленно передавать в лабораторию в соответствии с рекомендациями.¹⁶

МЕТОДИКА

Предоставленные материалы. Acridine Orange Stain.

Необходимые, но не предоставленные материалы. Флуоресцентный микроскоп, подходящий для работы с акридиновым оранжевым, предметные стекла и метанол.

Подготовка, окрашивание и исследование мазков

1. Подготовьте мазок образца для окрашивания на чистом предметном стекле.
2. Дайте высохнуть на воздухе.
3. Закрепите мазок 50 % или 100 % метанолом в течение 1 – 2 минут.
4. Удалите излишки метанола и дайте мазку высохнуть.
5. Залейте предметное стекло акридиновым оранжевым красителем на 2 минуты
6. Тщательно промойте водопроводной водой и дайте высохнуть.
7. Мазки можно сначала исследовать при 100 – 400-кратном увеличении с помощью флуоресцентного микроскопа. Полученные данные должны быть подтверждены исследованием при 1000-кратном увеличении с иммерсионным объективом.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Изучите цвет и прозрачность красящего раствора акридинового оранжевого. Раствор должен быть чистым оранжевым и без видимого осадка.
2. Определите pH раствора. Значение pH должно быть 3,5 – 4,0.
3. Проверьте эффективность красителя с помощью 4 – 6 ч. триптического соевого бульона с 5 % гемокультурами организмов, приведенных ниже. Подготовьте мазки (одна культура на предметное стекло) и обработайте, как описано в разделе «Подготовка, окрашивание и исследование мазков».

Микроорганизмы	Бактерии	Фон
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ярко-оранжевые	Светло-зеленые эритроциты и желтые, желто-зеленые или оранжевые лейкоциты на черном поле.
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 33186	Ярко-оранжевые	Могут быть обнаружены зеленые, желтые, оранжевые или красные окрашенные остатки.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ

Окрашивание акридиновым оранжевым предоставляет предположительную информацию о наличии и идентификации микроорганизмов, которые могут присутствовать в образце. Поскольку микроорганизмы, обнаруженные в мазках, включая нежизнеспособные, могли попасть из внешних источников, т. е. с устройств сбора образцов, предметных стекол или с водой, используемой для промывания, все положительные мазки должны подтверждаться посевом.

Для обнаружения данной методикой требуется концентрация около 10⁴ КОЕ/мл.

При окрашивании акридиновым оранжевым не различаются грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы. Методику окраски бактерий по Граму можно проводить с использованием красителя Грама непосредственно поверх акридинового оранжевого после удаления иммерсионного масла.

Ядра или гранулы разрушенных активированных лейкоцитов могут походить на кокки при небольшом увеличении, т. е. при 100 – 400-кратном. Их можно отличить на основе морфологии при большем увеличении, т. е. при 1000-кратном.

Некоторые типы остатков могут флуоресцировать в окрашенных акридиновым оранжевым мазках. Эти остатки можно отличить от микроорганизмов на основе морфологии при большем увеличении.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Бактерии и грибки окрашиваются в ярко-оранжевый цвет. Фон окрашивается в цвета от черного до желто-зеленого. Человеческие эпителиальные и воспалительные клетки, а также остатки тканей окрашиваются в цвета от светло-зеленого до желтого. Активированные лейкоциты окрашиваются в желтый, оранжевый или красный цвет в зависимости от уровня активации и количества произведенной РНК, тогда как эритроциты или не окрашиваются, или становятся светло-зелеными

СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Jones, J.G. and B.M. Simon. 1975. An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method for dyeing membrane filters. *J. Appl. Bacteriol.* 39: 317 – 329.
2. Barlaz, M.A. 1997. Microbial studies of landfills and anaerobic refuse decomposition, p. 541 – 557. *In* C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach, and M.V. Walter (ed.), *Manual of environmental microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Palmisano, A.C., D.A. Mauruscik, and B.S. Schwab. 1993. Enumeration of fermentative and hydrolytic microorganisms from three sanitary landfills. *J. Gen. Microbiol.* 139:387-391.

4. Heidelberg, J.F., K.B. Heidelberg, and R.R. Colwell. 2002. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5488-5497.
5. Splittstoesser, D.F. 1992. Direct microscopic count, p. 97 – 104. *In* C.V. Vanderzant and D.F. Splittstoesser (ed.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3rd ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
6. Packard, V.S., Jr., S. Tatini, R. Fugua, J. Heady, and C. Gilman. 1992. Direct microscopic methods for bacteria or somatic cells, p. 309 – 325. *In* R.T. Marshall (ed.), *Standard methods for the examination of dairy products*, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
7. Duffy, G., Kilbride, B., Fitzmaurice, J., Sheridan, J.J. 2001. Routine diagnostic tests for food-borne pathogens. The National Food Centre, Dublin.
8. Eaton, A.D., L.S. Clesceri, and A.E. Greenberg (ed.). 1995. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
9. McCarthy, L.R. and J.E. Senne. 1980. Evaluation of acridine orange stain for detection of microorganisms in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **11**:281-285.
10. Lauer, B.A., L.B. Reller, and S. Mirrett. 1981. Comparison of acridine orange and Gram stains for detection of microorganisms in cerebrospinal fluid and other clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **14**:201-205.
11. Greenwood, J.R., and K. Kirk-Hillaire. 1981. Evaluation of acridine orange stain for detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **14**:699.
12. Keiser, J., J. Utzinger, Z. Premji, Y. Yamagata, and B.H. Singer. 2002. Acridine orange for malaria diagnosis: its diagnostic performance, its promotion and implementation in Tanzania, and the implications for malaria control. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **96**:643-654.
13. Bosch, I., C. Bracho, and H.A. Perez. 1996. Diagnosis of malaria by acridine orange fluorescent microscopy in an endemic area of Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **91**:83-86.
14. Rosendal, S. and A. Valdivieso-Garcia. 1981. Enumeration of mycoplasmas after acridine orange staining. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:1000-1002.
15. Kasten, F.H. 1967. Cytochemical studies with acridine orange and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acids. *Internat. Rev. Cytol.* **21**:141-202.
16. Shea, Y.R. 1994. Specimen collection and transport, p. 1.1.1-1.1.30. *In* H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1, American Society for Microbiology, Washington, D.C.



Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas /
 Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare / Производител / Producător / Üretici / Proizvođač / Производитель



Use by / Spotføjbjtje do / Anvendes for / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης /
 Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes for / Stosować do / Utilizar em / Pouzítje do / Usar antes de / Använd före / Исползуйте до
 do / A se utiliza până la / Son kullanna tarhi / Uputrebiti do / Исползовать до
 YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) /
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) /
 ÁÁÁÁ-KK-PP / ÁÁÁÁ-KK (KK = kuu lõpp) /
 VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) /
 ÁÁÁÁ-MM-JJ / ÁÁÁÁ-MM (MM = fin du mois) /
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /
 ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) /
 ÁÁÁÁ-MM-GG / ÁÁÁÁ-MM (MM = fine mese) /
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mēnesio pabaiga) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = fim do mês) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiac) /
 aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden) /
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца) /
 ÁÁÁÁ-LL-ZZ / ÁÁÁÁ-LL (LL = sfärsitul lunii) /
 YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) /
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca) /
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца)



Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Katalognummer / Katalogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός
 καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalogové číslo / Número de catálogo /
 Каталоген номер / Număr de catalog / Katalog numarası / Kataloški broj / Номер по каталогу



Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret representant i EU / Erkend
 vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé
 pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban /
 Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliojatis atstovas Europos Bendrijoje / Autorisert representant i EU / Autoryzowane
 przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Representante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Reprezentante
 autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизирани представител в EU / Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană /
 Avrupa Topluğlu Yetkili Temsilcisi / Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе



In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel
 voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiinaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro /
 Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnostikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnóstico in vitro. /
 In vitro diagnostikos prietaisas / In vitro diagnostisk medišinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico
 in vitro / Medicinska rombicka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro diagnostik /
 Медицински уред за диагностика ин vitro / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In vitro Diagnostik Tibbi Cihaz / Medicinski uređaj za in vitro
 dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики in vitro



Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturlimit / Temperaturi piirang / Lämpötilarajoitus / Température
 limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Όριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrænsning /
 Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenje teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning / Температурни
 ограничения / Limitare de temperatură / Sıcaklık sınırlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры



Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch kode (Lot) / Chargennummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode
 (Chargenbezeichnung) / Кодикóс партидос (Партида) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kodé (Serie) / Kod partii
 (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (partii) / Код (Партида) / Număr lot (Lotul) / Parti Kodu (Lot) / Kod serije /
 Код партии (лот)



Contains sufficient for <n> tests / Dostatečné množství pro <n> testů / Indeholder tilstrækkeligt til <n> test / Voldoende voor <n> tests / Küllaldane <n>
 testide jaoks / Sisältöön riittävä <n> testejä varten / Contenu suffisant pour <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα <n>
 εξετάσεις / <n> teszteszt elegendő / Contenido suficiente per <n> test / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Innholder tilstrækkelig for <n> tester / Zawiera
 ilość wystarczającą do <n> testów / Contêno suficiente para <n> testes / Obsah vystačí na <n> testov / Contenido suficiente para <n> pruebas / Rackertill
 <n> antal tester / Съдържанието е достатъчно за <n> теста / Conține suficient pentru <n> teste / <n> testleri için yeterli miktarda içerir / Sadržaj dovoljan za
 <n> testova / Достаточено для <n> тестов(а)



Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeđa kasutusjuhendit / Tarkista
 käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást /
 Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de
 utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen / Направление справка в инструкциите за употреба /
 Consultați instrucțiunile de utilizare / Kullanım Talimatları'na başvurun / Pogledajte uputstvo za upotrebu / См. руководство по эксплуатации



Negative control / Negativni kontrola / Negativ kontrol / Negative controle / Negatiivne kontroll / Negatiivkontrolli / Contrôle négatif / Negative Kontrolle /
 Αρνητικός έλεγχος / Negativ kontrol / Controllo negativo / Neigiama kontrolė / Negativ kontroll / Kontrola ujemna / Controllo negativo / Negativna kontrola /
 Control negativo / Отрицательный контрол / Etalon negativ / Negatif kontrol / Negativna kontrola / Отрицательный контроль



Positive control / Pozitivni kontrola / Positiv kontrol / Positieve controle / Positiivne kontroll / Positiivkontrolli / Contrôle positif / Positive Kontrolle /
 Θετικός έλεγχος / Pozitiv kontrol / Controllo positivo / Teigiama kontrolė / Positiv kontroll / Kontrola dodatnia / Controllo positivo / Pozitivna kontrola / Control
 positivo / Положительный контрол / Etalon pozitiv / Pozitif kontrol / Pozitivna kontrola / Положительный контроль



Becton, Dickinson and Company
 7 Loveton Circle
 Sparks, Maryland 21152 USA
 800-638-8663



BENEX Limited
 Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
 Shannon, County Clare, Ireland
 Tel: 353-61-47-29-20
 Fax: 353-61-47-25-46