رنگ آمیزی گرم

اصول:

در آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی، رنگ آمیزی گرم آزمایشی مهم برای تشخیص احتمالی سریع عوامل عفونی است و کیفیت نمونه های بالینی را ارزیابی می کند . این آزمایش برای طبقه بندی باکتری ها بر اساس شکل، اندازه، مورفولوژی سلول و واکنش گرم آنها به کار می رود.

تفسیر گسترش هایی که رنگ آمیزی گرم شده اند، با در نظر گرفتن مشخصه های رنگ آمیزی ، اندازه، شکل و آرایش سلول صورت می گیرد. این مشخصه ها ممکن است بوسیله بسیاری از فاکتورها مانند مدت زمان ماندگی پلیت ها، محیط کشت، اتمسفر انکوباسیون ، روش رنگ آمیزی و وجود مواد مهارکننده تحت تأثیر قرار بگیرند. برای تفسیر اسمیرهای تهیه شده از نمونه های بالینی مانند خلط، به وجود عوامل اضافی مانند انواع سلول های میزبان و فاگوسیتوز نیز می بایست دقت نمود .

نمونه:

اسمیر برای رنگ آمیزی گرم ممکن است از نمونه های بالینی، محیط براث یا کلنی های رشد کرده روی محیط کشت جامد تهیه شود. نمونه های بالینی تازه وکشت های تازه (کمتر از ۲۴ ساعت) از محیط های غیرمهارکننده ، صحیح ترین نتایج را می دهند؛برای برخی بررسی های مورفولوژیکی، اسمیر تهیه شده از کشت براث مورد نیاز می باشد.

مواد:

A. معرف ها

معرف ها ممکن است به صورت تجاری خریداری شوند یا در آزمایشگاه تهیه گردند.

۱- Hucker's modification

a. کریستال ویوله

b. ید

احتیاط: ید خاصیت خورندگی دارد. از استنشاق، خوردن یا تماس آن با پوست خودداری کنید.

c. رنگ برها

۱) کندترین رنگ بر: اتانول ۹۵ ٪

۲) رنگ بر متوسط: استون ـ الکل؛ مخلوطی از ml ۱۰۰ اتانول ۹۵٪ و ml ۱۰۰ استون (reagent grade) را در بطری شیشه ای قهوه ای رنگ ترکیب کنید، با یک سال تاریخ انقضاء، برچسب بزنید و در حرارت اتاق نگهداری کنید.

۳) سریع ترین رنگ بر: استون (reagent grade)

احتیاط: اتانول و استون قابل اشتعال هستند.

d. **Counterstains** (رنگ متقابل)

۱) سافرانین

۲) به طور جایگزین: فوشین بازی (wt/vol) ۰/۲٪ یا ۰/۱٪

۲- Kopeloff's modification for anaerobes
۳- Carbol-fuchsin–basic fuchsin counterstain

B. وسایل و مواد مورد نیاز

۱- لام شیشه ای (۲۵×۷۵ mm)
۲- NaCl ۰/۸۵٪ استریل
۳- پی پت پاستور و اپلیکاتور چوبی استریل
۴- لوپ میکروب شناسی، آنس تلقیح سازی
۵- Safety box برای دور ریختن زباله بیولوژیک شامل وسایل نوک تیز
۶- روغن ایمرسیون

C. تجهیزات

موارد اختیاری با توجه به نوع نمونه
۱- سانتریفوژ
۲- ورتکس
۳- لوله درپیچ دار استریل
۴- قیچی، اسکالپل و پنس استریل
۵- خردکن بافت
۷- متانول خالص

نکته: متانول را در بطری های درپیچ دار قهوه ای ذخیره کنید. ذخیره کاری را می توان در ظروف پلاستیکی برای حداکثر دو هفته ذخیره نمود .

کنترل کیفی:

A. روزانه معرف ها را از نظر ظاهری بررسی کنید.

۱- اگر کریستال ویوله رسوب کرده یا ته نشین شده، قبل از استفاده آن را صاف کنید، حتی زمانی که معرف ها به صورت تجاری خریداری می شوند.

نکته: بعضی رنگ ها، خصوصاً فوشین بازی و سافرانین می توانند آلوده شوند. در صورت شک به آلودگی ، انجام رنگ آمیزی با استفاده از معرف تازه توصیه میگردد .

۲- تبخیر شدن مواد ممکن است کارایی و تأثیر معرف ها را دگرگون کند. اگر محلول های کاری با مصرف روزانه تمام نمی شوند، باید به طور منظم تعویض شوند.

B. به طور روزانه و زمانی که یک سری ساخت جدید استفاده می شود، گسترشی از *اشریشیا کلی* (ATCC 25922) و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* (ATCC 12228) و یا *استافیلوکوک اورئوس* (ATCC 25923) تهیه و فیکس کرده و مطابق روش فوق رنگ آمیزی کنید.

نتایج مورد انتظار:

۱ - باسیل های گرم منفی، صورتی

۲- کوکسی های گرم مثبت، بنفش پررنگ

توجه: به عنوان روش کنترل کیفی جایگزین پیشنهاد می شود با یک اپلیکاتور چوبی از بین دندان ها نمونه گیری شود؛ هم ارگانیسم های گرم مثبت و هم گرم منفی وجود خواهد داشت.

C. برخی از علل رایجی که موجب تهیه اسلاید رنگ آمیزی گرم نامناسب می گردند:

۱- استفاده از لام های شیشه ای که قبلا تمیز یا چربی زدایی نشده اند.

توجه: با ذخیره لام ها در ظرف حاوی اتانول ۹۵٪ از تمیز بودن آنها مطمئن خواهیم بود. قبل از استفاده، الکل اضافی را از

روی لام خالی کنید یا آن را روی شعله بگیرید.

۲- گسترش ها خیلی ضخیم تهیه شده است.

۳- حرارت دادن زیاد گسترش، زمانی که برای فیکس کردن از حرارت ا ستفاده می شود.

۴- آب کشی زیاد در طی فرایند رنگ آمیزی

D. برای اطمینان از صحت تفسیر، سیستمی برای بررسی گزارش های رنگ آمیزی گرم برقرار کنید.

۱- بررسی روزانه تعدادی از رنگ های گرم توسط سوپروایزر

۲- مقایسه نتایج کشت نهایی با گزارش های رنگ آمیزی گرم

۳- گردآوری مجموعه ای از لام های مرجع برای آموزش

روش انجام آزمایش:

A. تهیه اسمیر

اسمیر مناسب باید لایه ای از ارگانیسم ها با تراکم مناسب برای مشاهده آسان ایجاد نماید. پراکندگی ارگانیسم ها می بایست به نحوی باشد که آرایش آنها مشخص شود. برای تهیه اسمیر از لام های شیشه ای نو و تمیز استفاده نمایید.

نکته: زمانی که از یک پی پت یا سواب برای تهیه اسمیر و تلقیح محیط کشت استفاده می کنید، همیشه قبل از تهیه اسمیر، ابتدا محیط کشت را تلقیح کنید.

۱- نمونه های بالینی:

نکته : استفاده از دستکش لاتکس در زمان کار روی نمونه های بالینی ضروری است .

a. نمونه های دریافت شده روی سواب

ترجیحاً باید یک سواب جداگانه برای تهیه اسمیر آماده شود .

۱) جهت جلوگیری از تخریب عناصر سلولی و از بین رفتن آرایش باکتریایی، به آرامی سواب را در سرتاسر لام بچرخانید.

۲) در مواردی که فقط یک سواب دریافت می شود، سواب را در مقدار کمی سالین قرار داده و آن را ورتکس کنید. سواب را به دیواره داخلی لوله بفشارید و آن را برای تهیه گسترش به کار ببرید. از باقیمانده سوسپانسیون برای تلقیح محیط کشت استفاده کنید.

b. نمونه هایی که روی سواب دریافت نمی شوند شامل: آسپیره ها، ترشحات، چرک، مدفوع

۱) اگر نمونه در یک سرنگ دریافت شده باشد، ابتدا تمامی آن را در یک لوله استریل بریزید. در صورت کافی بودن حجم نمونه آن را ورتکس کنید.

نکته: سرنگ های همراه سوزن را ، نپذیرید. به کارکنان مربوطه جداسازی ایمن سوزن ها را آموزش دهید .

۲) با استفاده از یک اپلیکاتور، پی پت یا لوپ سیمی استریل قسمت های چرکی یا خونی نمونه را انتخاب کنید. نمونه های خیلی غلیظ یا نمونه های چرکی را می توان در یک قطره سالین روی لام رقیق نمود تا تهیه اسمیر آسان تر شود.

۳) نمونه را روی منطقه بزرگی از لام پهن کنید تا یک لایه نازک ایجاد شود.

c. CSF و سایر مایعات بدن که نیاز به سانتریفوژ دارند

بعضی از آزمایشگاهها ممکن است برای تغلیظ مایعات بدن و تهیه اسمیر از Cytopsin Slide Centrifuge استفاده کنند. این روش به افزایش حساسیت رنگ گرم ،کاهش زمان سانتریفوژ و دسترسی سریعتر به نتیجه کمک می نماید.

۱) بعد از انجام سانتریفوژ، با استفاده از پی پت استریل، محلول رویی را به یک لوله استریل منتقل کنید، حدود ۰/۵ ml را به عنوان رسوب باقی بگذارید.

۲) رسوب را ورتکس کرده یا با چند بار داخل و خارج کردن از یک پی پت پاستور استریل آنرا کاملا مخلوط نمایید.

۳) با استفاده از پی پت پاستور یک قطره کوچک از رسوب را روی یک لام تمیز قرار دهید.

۴) قطره را پخش نکنید. اجازه دهید تا در مجاورت هوا خشک شود.

d. نمونه های ادرار

۱) سانتریفوژ نکنید. نمونه را به خوبی مخلوط کنید.

۲) با استفاده از یک پی پت پاستور استریل ۱ قطره را روی لام قرار دهید. قطره را پخش نکنید.

۳) اجازه دهید قطره در مجاورت هوا خشک شود.

e. مواد خشک یا مقادیر خیلی کم نمونه های بالینی:

۱) نمونه را در ۰/۵ ml سالین استریل حل کنید. در صورت نیاز ورتکس نمایید.

۲) با استفاده از پی پت پاستور استریل ۱ قطره را روی لام قرار دهید.

۳) با استفاده از نوک پی پت، قطره را پخش کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

f. بیوپسی ها و برش های بافت

تهیه نمونه حاصل از تماس مستقیم اسلاید با سطح نمونه (touch prep) و/یا نمونه خرد شده (ground specimen)

۱)بافت را با استفاده از قیچی یا اسکالپل استریل خرد کنید.

۲) نمونه ای حاصل از تماس مستقیم اسلاید با سطح نمونه (touch prep) تهیه کنید. با استفاده از پنس استریل قطعه ها را نگه دارید و کناره های یک یا تعداد بیشتری از قطعات خرد شده را با اسلاید شیشه ای استریل تماس دهید، برای بررسی آسانتر تماس ها را با هم دسته بندی کنید.

۳) برای نمونه های تماسی یکنواخت، یک قطره را روی اسلاید قرار دهید و به اندازه یک دایره ۲/۵ سانتی متری پخش کنید.

۲- کشت های براث:

برای جلوگیری از مخلوط شدن نمونه های مختلف روی یک لام ، توصیه می شود روی هر اسلاید، یک گسترش تهیه شود.

a. با استفاده از پی پت پاستور استریل (یا یک سوزن منفذدار، برای ظروفی مثل بطری های کشت خون، جهت جلوگیری از آلودگی با سوزن و سرنگ) یک قطره روی لام قرار دهید.
b. قطره را پخش کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

۳- کلنی از روی محیط های کشت جامد:

a. یک قطره سالین یا آب مقطر استریل روی لام قرار دهید.
b. مقدار کمی از کلنی را با یک اپلیکاتور، آنس یا لوپ استریل بردارید.
c. به آرامی مخلوط کنید تا سوسپانسیون یکنواختی حاصل گردد.

B. فیکس کردن اسمیر (گسترش):

اسمیرها ممکن است با حرارت یا متانول فیکس شوند.

۱- حرارت:

a. اسمیر را در مجاورت هوا روی یک سطح صاف یا داخل اتو قرار دهید تا خشک شود.
b. اگر اسمیرها در مجاورت هوا خشک شدند، آنها را ۲ یا ۳ بار از روی شعله بگذرانید. برای جلوگیری از سوختگی یا تغییر شکل سلول ها، از حرارت زیاد استفاده نکنید .
c. بگذارید لام قبل از رنگ آمیزی خنک شود.

۲- از آنجا که حفظ مشخصات سلولهای میزبان جهت تفسیر گستره های بالینی ضروری است بهترین روش برای رنگ آمیزی گستره های مستقیم، فیکس کردن با استفاده از متانول است. این امر با ممانعت از لیز گلبول های قرمز و تخریب

سلول های میزبان موجب واضح تر شدن زمینه اسلاید می گردد که تفسیر نمونه راآسانتر میکند.این روش برای همه نمونه های بالینی، مخصوصاً ادرار موکدا توصیه می شود که در عین حال مانع از شسته شدن نمونه های ادرار می گردد.

a. اسمیر را در مجاورت هوا روی یک سطح صاف خشک نمایید.

b. برای ۱ دقیقه چند قطره متانول روی لام بریزید. متانول را بدون آبکشی از روی لام خالی کنید و اجازه دهید تا اسلاید در مجاورت هوا خشک شود.

c. قبل از رنگ آمیزی، از حرارت استفاده نکنید.

C. روش انجام رنگ آمیزی:

۱- Hucker's modification

a. اسمیر فیکس شده را با محلول کریستال ویوله بپوشانید. ۳۰ ثانیه منتظر بمانید.

b. آهسته کریستال ویوله را خالی کنید، اسلاید را به آرامی با آب جاری بشوئید.

احتیاط: شستشوی بیش از حد در این مرحله می تواند باعث شسته شدن کریستال ویوله از سلول های گرم مثبت شود. برای اطمینان از جریان آرام آب در سمت اسمیردار لام، اسلاید را به صورت زاویه دار نگه دارید.

c. آب اضافی را با محلول ید شستشو دهید و سپس اسلاید را با محلول ید تازه بپوشانید. ۳۰ ثانیه منتظر بمانید.

d. اسلاید را به آرامی با آب جاری بشوئید.

e. با جاری کردن معرف روی گستره در حالی که اسلاید زاویه دار نگه داشته شده است، رنگ بری کنید. وقتی مایع جاری ، بی رنگ می شود این کار را به اتمام برسانید. زمان رنگ بری را بر اساس ضخامت اسمیر و نوع رنگ بر مورد استفاده تنظیم کنید.

f. رنگ بر اضافی را با جریان آرام آب خارج کنید.

نکته: اسمیری که بطور مناسب رنگ بری شده است، با ته رنگ سبز زیتونی و بدون آثاری از رنگ کریستال ویوله دیده خواهد شد.

g. اسلاید را با سافرانین بپوشانید و اجازه دهید رنگ متقابل(counter stain) برای ۳۰ ثانیه باقی بماند.

h. رنگ متقابل اضافی را با جریان آرام آب خارج کنید.

i. اسلاید را در وضعیت ایستاده در مجاورت هوا خشک کنید. پشت لام را با استفاده از دستمال کاغذی آغشته به استون یا الکل پاک کنید.

j. اسمیر را از نظر میکروسکوپی بررسی کنید.

۲- Basic/carbol-fuchsin counterstain

Basic/carbol-fuchsin برای شناسایی ارگانیسم های گرم منفی که رنگ کمی گرفته اند به کار می رود.

۳- Kopeloff's modification

برای مشاهده و افتراق بهتر بی هوازیها توصیه می شود از روش رنگ آمیزیKopeloff's modification استفاده شود .

گزارش نتایج:

A. نتایج و تفسیر

۱- وضعیت کلی اسمیر را با بزرگنمایی کم (۱۰×) ارزیابی کنید.

a. دقت نمایید که اسمیر بطور مناسبی رنگ بری شده باشد. بسته به نوع نمونه، زمینه عموما باید شفاف یا صورتی باشد. اگر گلبول های سفید وجود دارند، بایدبه صورت گرم منفی ظاهر شوند. رسوب های نازک سوزنی شکل کریستال ویوله را با باکتری های میله ای شکل گرم مثبت اشتباه نگیرید.

b. دقت نمایید ضخامت اسمیر مناسب باشد. برای تفسیر مناسب، گستره نمیبایستی بیش از یک سلول ضخامت داشته و روی هم افتادگی سلول ها نباید مشاهده شود.

۲- اسمیرهای تهیه شده از نمونه های بالینی را جهت بررسی موارد زیر با بزرگنمایی کم بررسی کنید:

a. مقادیر مربوط به نوتروفیل ها، مونوسیت ها و گلبول های قرمز

b. مقادیر مربوط به سلول های اپی تلیال و باکتری های فلور نرمال که ممکن است نشانگر جمع آوری نامناسب نمونه باشد.

c. وضعیت و آرایش میکروارگانیسم ها

۳- مناطق متعددی از اسمیر را با روغن ایمرسیون از نظر وجود میکروارگانیسم ها بررسی و به شیوه زیر گزارش کنید.

a. در صورت عدم مشاهده هر گونه میکروارگانیزم :"هیچ میکروارگانیسمی مشاهده نشد".

b. در صورت مشاهده میکروارگانیزمها ، تراکم کلی و مرفولوژی را شرح دهید.

۴- شکل سلولی غالب میکروارگانیسم ها را ذکر نمایید

a. شکل کلی: کوکوس، کوکوئید، کوکوباسیل، باسیل، رشته ای شکل، شبه مخمر

b. ظاهر انتهاها: کروی، شمعی شکل، مسطح، گرزی شکل، مقعر. برآمدگی کناره ها می تواند وجود اسپورها را پیشنهاد کند، اما می تواند به علت واکوئل ها، پلئومرفیسم، یا رنگ آمیزی نامنظم باشد.

c. ظاهر کناره ها: موازی، تخم مرغی شکل (برآمده)، مقعر، نامنظم

d. ماهیت محور تقارن: مستقیم، منحنی، فنری

e. پلئومرفیسم (ناپایداری در شکل): عبارت توصیفی "دیفتروئید" یا "کورینه فرم" برای توصیف باسیل های گرم مثبت به کار می رود که چند شکلی، گرزی شکل یا نامنظم و بی قاعده هستند یا آرایش نرده ای یا زاویه دار دارند (اشکال Vو L).

f. گسترش شاخه ای یا سلولی

B. ثبت مشاهدات

هر آزمایشگاه باید سیاست گزارشدهی ویژه ای را تدوین کند. یافته های مهم بالینی باید جهت اطلاع به پزشک معالج اعلام شود.

- اسمیر نمونه های بالینی

برای کشت های ادرار ۲۰ فیلد یا بیشتر را بررسی کنید. اگر بطور میانگین،ن یک ارگانیسم یا بیشتر در فیلد روغن ایمرسیون دیده می شود، مثبت گزارش کنید. این با کلنی کانت $CFU/ml \ ^{5}۱۰ \leq$ همبستگی دارد.

a. مقادیر مربوط به سلول ها و میکروارگانیسم های مشاهده شده را گزارش دهید. معمولا سیستم های کمی مورد استفاده شامل موارد زیر است.

۱) عددی

a) +۱ (۱> در فیلد روغن ایمرسیون [×۱۰۰])

b) +۲ (۱ در فیلد روغن ایمرسیون)

c) +۳ (۲ تا ۱۰ در فیلد روغن ایمرسیون)

d) +۴ (غالب یا ۱۰< در فیلد روغن ایمرسیون)

۲) توصیفی

a) کمیاب (۱< در فیلد روغن ایمرسیون)

b) کم (۱ تا ۵ در فیلد روغن ایمرسیون)

c) متوسط (۵ تا ۱۰ در فیلد روغن ایمرسیون)

d) زیاد (۱۰< در فیلد روغن ایمرسیون)

b. مرفولوژی باکتری های مشاهده شده را ثبت کنید.

C. مرور رنگ آمیزی گرم

۱- بعد از تفسیر اسمیرها، اسلایدها را به مدت کافی برای مرور تأییدی نگه دارید .

a. روغن اضافی را خالی کنید یا به آرامی پاک کنید.

b. برای اسلایدهای کتابخانه و مجموعه های آموزشی که برای مدت زمان طولانی تری ذخیره خواهد شد، روغن ایمرسیون را می توان با محلول گزیلن پاک کرد و با یک درزگیر نظیر محلول permount پوشاند تا از محوشدگی آنها جلوگیری شود.

c. اسلایدها ممکن است کیسه های خطر زیستی را سوراخ کنند، آنها را به عنوان مواد زائد بیولوژیک " تیز و برنده" در نظر گرفته

و جهت دفع از ظروف خطر زیستی (biohazard) مطابق با دستورالعمل دفع پسماند آزمایشگاه مرجع سلامت استفاده کنید.

۲- اگر تکرار رنگ آمیزی گرم یا یک رنگ آمیزی ویژه برای تأیید یافته ها لازم است، وقتی اسمیرهای رنگ نشده اضافی در دسترس نیستند، یک اسمیر رنگ گرم را می توان رنگ بری نمود.

a. روغن ایمرسیون را با محلول گزیلن از روی اسلاید بردارید.

b. اسلاید را با الکل- استون بپوشانید تا اسمیر بی رنگ شود.

c. دوباره رنگ کنید.

توجهات :

A. نتایج رنگ آمیزی گرم میبایستی در تطابق با سایر یافته های بالینی و آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد.

B. برای کسب نتایج صحیح، پیروی دقیق از روش انجام آزمایش و معیارهای تفسیر الزامی می باشد. صحت، ارتباط زیادی با آموزش و مهارت شخص مشاهده کننده اسلاید دارد.

C. مشاهده میکروارگانیزم های گرم مثبت و نمونه های کشت منفی ممکن است در نتیجه آلودگی معرف ها و سایر لوازم، حضور عوامل ضدمیکروبی، یا کاهش رشد ارگانیسم ها تحت شرایط کشت معمول (محیط کشت ، اتمسفر و غیره) باشد.

D. نتایج گرم نادرست ، ممکن است مربوط به کیفیت نامناسب جمع آوری نمونه باشد.

E. ممکن است گاهی واکنش رنگ آمیزی گرم با کلنی های خیلی تازه در مقایسه با کلنی های کهنه تر متفاوت باشد. وقتی که اسمیرها از ساب کالچر ۲۴ - ۱۸ ساعته تهیه می شوند (زمانی که سلول های باکتریایی در فاز لگاریتمی رشد هستند)، مرفولوژی اغلب باکتری ها در رنگ آمیزی گرم، در بهترین شرایط می باشد.