**1. رنگ ها و رنگ آمیزی ها**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل ساخت، انجام و کنترل کیفی رنگ ها و رنگ آمیزی ها** | |
| **کد سند:** | D-003-0001 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل و کنترل کیفی مواد و تست های تشخیصی | |
| **شماره ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ بازنگری سند:** | {{ReviewDate}} | |
| **تهیه کننده:** | **تایید کننده:** | **امضاء :** |
| شرکت دارا ویرا آزما  دکتر داریوش شکری | {{ConfirmerOneName}} | {{ConfirmerTwoName}} |

**(1) هدف:**

تشريح روند ساخت رنگ ها و نحوه رنگ آمیزی ها و کنترل کیفی آنها در بخش میکروب شناسی.

**(2) دامنه كاربرد:**

واحد میکروب شناسی.

**(3) مسئولیت ها:**

بررسی روزانه کیفیت ظاهری رنگ ها و مسئولیت کنترل کیفی بر عهده تمامی پرسنل بخش می باشد.مسئولیت نظارت بر کنترل کیفی و تأیید مستندات آن بر عهده مسئول بخش و واحد کنترل کیفی و تضمین کیفیت می باشد.

**(4) تعاریف و اصطلاحات:**

* یکی از مشخصات مهم باکتری ها که به شناسایی آنها کمک می کند، رنگ پذیری آنها با رنگ های مختلف است.
* این رنگ ها یا عمومی هستند یعنی همه باکتری ها را یکسان رنگ می کنند و یا اختصاصی که هر گروه از باکتری ها را به رنگ خاصی در می آورند.
* غالباً از سه نوع رنگ آمیزی استفاده می شود: 1) رنگ آمیزی ساده، 2) رنگ آمیزی مخصوص و 3) رنگ آمیزی افتراقی

**1) رنگ آمیزی ساده:** در این نوع رنگ آمیزی از یک نوع رنگ استفاده می شود و از آن می توان برای رنگ کردن کامل سلول یا ساختارهای ویژه آن و شناسایی مورفولوژی استفاده کرد. رنگ آمیزی ساده به دو روش می تواند انجام شود:

**الف) رنگ آمیزی ساده به روش مثبت**: **آبی متیلن (متیلن بلو)** غالباً برای رنگ آمیزی ساده باکتری های تثبیت شده به کار می رود و آنها را به رنگ آبی در می آورد. از رنگ های دیگری چون کریستال ویوله، گیمسا و کربول فوشین نیز می توان استفاده نمود.

**ب) رنگ آمیزی ساده به روش منفی (مرکب چینی یا نگروزین)**: گاهی یک رنگ ساده به عنوان رنگ منفی (رنگ زمینه و عدم رنگ خود باکتری) به کار می رود که در این ارتباط می توان به رنگ آمیزی منفی در رابطه با تشخیص کپسول اشاره نمود که زمینه رنگ می گیرد در حالی که کپسول بدون رنگ و شفاف مشخص می گردد.

**2) رنگ آمیزی مخصوص:** از رنگ آمیزی مخصوص جهت مشاهده و بررسی برخی باکتری های خاص و اجزاء داخلی و جانبی آنها استفاده می شود. در اینجا به رنگ آمیزی های خاصی چون زیل-نلسون، لیفسون، شیفر فولتون و آلبرت می توان اشاره نمود.

**3) رنگ آمیزی افتراقی:** برای افتراق باکتری ها از یکدیگر استفاده می شوند. مهمترین آنها رنگ آميزي گرم است.

**(5) شرح دستورالعمل:**

* در اغلب آزمایشگاهها از کیت های رنگ آماده به مصرف شرکتی استفاده می گردد ولی در صورت عدم وجود آنها رنگ طبق دستورهای آمده در جلوتر ساخته می شود.
* رنگ ها باید از نظر محتویات، غلظت، شرایط ذخیره سازی، تاریخ آماده سازی (یا دریافت)، تاریخ قرارگیری در سرویس (که معمولاً "تاریخ باز شدن" نامیده می شود)، تاریخ انقضاء، منبع (سازنده تجاری یا کاربر آماده شده) و شماره سری ساخت برچسب گذاری شوند.
* تمام رنگ ها باید طبق توصیه های سازنده نگهداری شوند و قبل از استفاده با کنترل های مثبت و منفی آزمایش شوند.
* رنگ هایی که حتی پس از آزمایش مجدد با ارگانیسم های تازه، QC را از دست می دهند، باید فوراً دور ریخته شوند.
* نمونه های بیمار نباید با استفاده از شماره سری ساخت مورد نظر آزمایش شوند تا زمانی که مشکل حل نشده باشد. در صورت تکرار شکست، باید از روش جایگزین استفاده شود، یا نمونه بیمار باید به آزمایشگاه مرجع ارسال شود.

**روش انجام رنگ آمیزی ساده:**

1- ابتدا توسط یک لوپ پلاتینی از کلنی یا سوسپانسیون باکتری های موجود یک گسترش بیضی شکل بر روی یک لام تمیز و غیر چرب تهیه نمایید و اجازه دهید تا گسترش مذکور در مجاورت هوا خشک شود. گسترش خشک شده را با عبور دادن لام طی ۲ تا ۳ بار از میان شعله فیکس نمایید.   
2- چند قطره از محلول رنگی آبی متیلن (یا کریستال ویوله، گیمسا و کربول فوشین) را روی گسترش میکروبی ریخته و پس از 1 الی 2 دقیقه آن را با آب مقطر بشویید.   
3- اجازه دهید تا لام در مجاورت هوا خشک شود. پس از آن در زیر میکروسکوپ به بررسی آن بپردازید.

4- باکتری و زمینه در رنگ آمیزی با کریستال ویوله و گیمسا به رنگ آبی و در رنگ کربول فوشین به رنگ قرمز دیده می شوند.

# **رنگ آمیزی لوفر متیلن بلو برای تشخیص دیفتری:**

رنگ آمیزی لوفر متیلن بلو (Loeffler methylene blue) یک روش متاکروماتیک است و برای رنگ آمیزی ساده، شناسایی کورینه باکتریوم دیفتری و همچنین رنگ آمیزی اسید فست کاربرد دارد. در رنگ‌آمیزی‌های متاکروماتیک، رنگ متصل به بافت به‌طور قابل توجهی با رنگ کمپلکس اصلی متفاوت است. به این ترتیب تضاد مشخصی در رنگ آمیزی ایجاد می‌شود.

لوفلر متیلن بلو در ابتدا به رنگ سبز تیره دیده می‌شود اما در صورت مثبت بودن نتیجه، به آبی تغییر می‌کند. علت این تغییر رنگ در مورد تجمع پلی فسفات‌های پلیمریزه شده در غلظت بالا در داخل سلول است. این حالت به صورت گرانول‌های پلی فسفات آبی تیره مشاهده می‌شود. این گرانول‌ها توسط سیتوپلاسم با رنگ آبی روشن‌تر احاطه شده‌اند. این گرانول‌ها، اغلب اجسام بیب-ارنست (Babes-Ernst bodies) یا گرانول‌های متاکروماتیک نامیده می‌شوند. خود سلول نیز با ظاهر نواری یا مهره‌ای شکل متمایز می‌شود.

## **ترکیبات رنگ آمیزی لوفلر متیلن آبی**

متیلن بلو: 5/0 گرم، اتانول (اتیل الکل) 95٪: 30 میلی‌لیتر و آب مقطر: 100 میلی‌لیتر

**آماده‌سازی رنگ لوفلر متیلن آبی**

رنگ لوفر متیلن بلو به صورت تجاری و آماده خریداری می شود. در صورت تهیه رنگ به صورت زیر ساخته می شود:

1. 5/0 گرم متیلن بلو را روی یک تکه کاغذ تمیز (از قبل وزن شده) وزن کنید. سپس آن ‌را در حدود 30 میلی لیتر آب مقطر حل کنید.
2. رنگ را به یک بطری قهوه‌ای رنگ و تمیز منتقل کنید.
3. سپس الکل و بقیه آب مقطر را اضافه کنید. مواد را خوب مخلوط کنید.
4. روی بطری برچسب بزنید و در مکانی تاریک و در دمای اتاق نگهداری کنید. این رنگ برای چندین ماه پایدار است.

**نتایج رنگ آمیزی دیفتری**

چنانچه نمونه‌ی مشکوک حاوی کورینه باکتریوم دیفتری باشد، نتایج زیر پس از رنگ‌آمیزی مشاهده خواهد شد:

دانه‌های متاکروماتیک باکتری: آبی تیره، سیتوپلاسم: آبی کمرنگ

**دستورالعمل رنگ آمیزی گیمسا:**

رنگ آمیزی گیمسا یک روش رنگ آمیزی ساده است که علاوه بر رنگ آمیزی ساده باکتری ها بر روي اسميرهاي مغز استخوان و خون محيطي، برش های بافت پارافینی، برش هاي تهيه شده از بافت معده جهت بررسي هلیکوباکتر پیلوری و نیز بررسی جسم لشمن (عامل سالک) در نمونه های پوستی و موارد مشابه انجام مي شود. همچنین برای دیدن مورفولوژی باکتری ها و بررسی سلول های خونی در لام های میکروبی از جمله WBC و RBC بسیار مفید است.

### تهیه محلول ذخیره رنگ گیمسا به میزان 500 میلی‌لیتر

رنگ گیمسا به صورت تجاری و آماده خریداری می شود. در صورت تهیه رنگ به صورت زیر ساخته می شود:

1. به 250 میلی‌لیتر متانول، 8/3 گرم پودر گیمسا اضافه کرده و حل کنید.
2. محلول را تا 60 درجه سانتی‌گراد گرم کنید.
3. سپس 250 میلی‌لیتر گلیسیرین را به آرامی به محلول اضافه کنید.
4. محلول را فیلتر کنید و بگذارید حدود 1 تا2 ماه قبل از استفاده بماند.

### **تهیه محلول کاری جهت استفاده**

10 میلی‌لیتر محلول ذخیره را به 80 میلی‌لیتر آب مقطر و 10 میلی‌لیتر متانول اضافه کنید.

**روش انجام رنگ آمیزی گیمسا برای موارد غیر رنگ آمیزی ساده باکتری ها**

1. یک گستره نازک از نمونه روی لام میکروسکوپ تهیه کنید و آن را با غوطه ور کردن در متانول خالص یا ریختن چند قطره متانول خالص روی لام، به مدت 30 ثانیه، فیکس کنید.
2. اسلاید فیکس شده را به مدت 20-30 دقیقه در یک محلول رنگ 5٪ گیمسا تازه آماده شده غوطه ور کنید (در مواردی که نیاز است کار را سرعت بخشید می توان زمان رنگ را کاهش داد (5 تا 10 دقیقه در محلول 10٪ گیمسا قرار دهید).
3. سپس آن را با آب شست و شو داده و اجازه دهید تا خشک شود.
4. سلول ها و زمینه به رنگ آبی دیده خواهد شد.

**روش رنگ آمیزی منفی برای تشخیص کپسول به ترتیب زیر است:**  
۱. ابتدا مقداری از نمونه باکتریایی را در یک لوله آزمایش با حجمی برابر با مرکب چین یا نگروزین مخلوط نمایید.  
۲. توسط لوپ مقداری از این سوسپانسیون را بر روی لام گذاشته و یک گسترش از آن تهیه نمایید.  
۳. اجازه دهید تا گسترش خشک شود سپس توسط میکروسکوپ به مطالعه آن بپردازید. در این رنگ آمیزی کپسول باکتری به صورت یک هاله بی رنگ در زمینه تیره مشخص می شود. برای تشخیص باکتری پنوموکوک این روش کاربرد دارد.

**دستورالعمل رنگ آمیزی زیل-نلسون:**

برخی از باکتری ها مانند مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (عامل بیماری سل) و مایکوباکتریوم لپره آ (عامل بیماری جذام) و برخی از جنس های نوکاردیا و کورینه باکتریوم و همچنین انگل هایی مانند کریپتوسپوریوم و گونه های سیستوایزوسپورا به واسطه دارا بودن میزان بالایی از چربی به آسانی با روش های معمولی رنگ آمیزی نمی شوند بلکه برای این امر به یک رنگ و حرارت قوی و زمان بیشتری جهت نفوذ رنگ به داخل پیکرشان نیاز دارند. بعد از نفوذ رنگ و رنگ آمیزی آنها، حتی توسط اسیدهای معدنی و یا اسید الکل رنگ زدایی نمی شوند که به همین جهت واژه اسید فست یا مقاوم به اسید به آنها اطلاق می گردد. این خاصیت اجازه می دهد که باکتری ها حتی به تعداد کم در گسترش رنگ شده قابل تشخیص باشند.

**طرز تهیه رنگ زیل- نلسون:** رنگ به صورت تجاری و آماده خریداری می شود. در صورت تهیه رنگ به صورت زیر ساخته می شود:

**1. رنگ کربول فوشین:** به 5/2 میلی لیتر فنل کریستال آب شده (یا 5/2 گرم کریستال)، 5/0 گرم فوشین بازیک می افزائیم، در بن ماری جوش تا 5 دقیقه با تکان دادن متناوب حل نموده و 5 میلی لیتر الکل 96 درجه افزوده و مخلوط نموده و به حجم 50 میلی لیتر با آب مقطر می رسانیم.1 گرم فوشین بازیک را در 10 میلی لیتر الکل مطلق حل کرده و با محلول 5% فنل در آب به 100 میلی لیتر می رسانیم.

**2. محلول اسید–الکل:** 3 میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ را با الکل 96 درجه به 100 میلی لیتر می رسانیم.به 80 میلی لیتر آب به ملایمت و از جداره هر دفعه 5 میلی لیتر و در نهایت 20 میلی لیتر متناوباً اسید سولفوریک غلیظ اضافه می کنیم.

**3. رنگ متضاد:** 5/0 گرم متیلن بلو را در 5/0 میلی لیتر اسید استیک گلاسیال حل کرده و با آب مقطر به 100 میلی لیتر می رسانیم.3/0 گرم متیلن بلو را در 3 میلی لیتر الکل 96 درجه حل کرده و با آب مقطر به 100 میلی لیتر می رسانیم.مالاشیت گرین 1 گرم در 100 میلی لیتر آب مقطر که در هنگام مصرف 5 برابر رقیق شود.

**مراحل رنگ آمیزی زیل-نلسون**

**الف) روش گَرم**

1. یک گسترش ضخیم و یکنواخت از نمونه تهیه و آن را در هوا خشک کرده و سپس توسط شعله فیکس نمایید.

2. یک کاغذ صافی به ابعاد ۲×۴ سانتی متر یا کمی کوچکتر از لام فراهم کنید. این کاغذ باید اسمیر (گسترش) را بپوشاند تا از رسوب رنگ روی لام جلوگیری کند.

3. تمام سطح گسترش را با رنگ بازی قرمز رنگ کربول فوشین بپوشانید و به آرامی از سطح زیرین لام توسط شعله حرارت دهید. در زمان حرارت دادن لام باید میزان حرارت آنقدر باشد که سطح لام فقط بخار بلند شود و نباید رنگ روی لام بجوشد و یا خشک شود. در صورتی که به علت حرارت و بخار رنگ میزان رنگ کاهش یابد، می توان مجدداً روی لام رنگ اضافه کرد. تا ۵ دقیقه این فرایند را ادامه و بعد از آن کاغذ را برداشته و لام را با آب بشویید. این رنگ تمام ارگانیسم ها را به رنگ قرمز در می آورد.

4. محلول اسید الکل مخصوص رنگ زدایی را روی لام قطره قطره ریخته تا آخرین قطره خارج شده از روی لام شفاف باشد. این محلول در ارگانیسم های اسیدفست نفوذ ندارد و آنها به همان رنگ اولیه کربول فوشین یعنی قرمز دیده می شوند اما ارگانیسم های معمول را بی رنگ می کند.

5. رنگ آبی متیلن را روی لام بریزید و مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه صبر کنید. این رنگ ارگانیسم های معمول و زمینه را به رنگ آبی در می آورد اما روی اسید فاست ها بی اثر است.

6. لام را شسته، در هوا خشک کنید و با عدسی روغنی به مطالعه بپردازید.

**تفسیر نتیجه:** در این رنگ آمیزی باکتری عامل بیماری سل به صورت باسیل ظریف و قرمز رنگ در زمینه آبی مشخص می شود.

**ب) روش سرد یا کینیون:**

1. یک گسترش یکنواخت از نمونه تهیه و آن را در هوا خشک کرده و سپس توسط شعله فیکس نمایید.

2. اسمیر را با کربول فوشین حاوی فنول به مدت 3 تا 5 دقیقه در دمای اتاق بپوشانید. فنول موجود در اینجا به جای حرارت باکتری را به رنگ نفوذ پذیر می کند.

3. لام را به آرامی با آب بشویید.

4. محلول رنگبری اسید سولفوریک 1% را به مدت تقریبی 3 دقیقه روی لام قرار دهید یا قطره قطره بریزید تا لام بی رنگ شود.

5. اسمیر را با رنگ ثانویه متیلن بلو به مدت 1 دقیقه بپوشانید و سپس با آب بشویید.

**دستورالعمل رنگ آميزي گرم:**

**اصول:**

* بهترین و رایج ترین روش رنگ آمیزی افتراقی در باکتری شناسی می باشد و یک آزمایش حیاتی برای تشخیص سریع احتمالی است.
* باکتری‌ها بر مبنای ساختمان دیواره سلولی خود رنگ می شوند و پس از رنگ‌آمیزی، در صورت رنگ پذیر بودن بر اساس واکنش گرم به دو دسته گرم مثبت و گرم منفی و بر اساس ساختار (مورفولوژی) به 5 دسته کلی کوکسی یا گرد (cocci)، کوکوباسیل یا بیضی (cocobacilli)، باسیلی یا میله ای (bacilli)، اسپيروکتی (مارپیچی) (spirochetes) و چندشکلی یا پلی مورف تقسیم می‌شوند.
* در این رنگ آمیزی باکتری های گرم مثبت به رنگ آبی-بنفش ظاهر می شوند و باکتری های گرم منفی به رنگ صورتی-قرمز نمایان می شوند.

**نمونه:** اسمیر برای رنگ آمیزی گرم ممکن است از نمونه های بالینی به طور مستقیم یا از محیط براث یا کلنی های رشد کرده روی محیط کشت جامد تهیه شود (رنگ آمیزی گرم غیرمستقیم). بهترین تهیه نمونه از نمونه های بالینی تازه و کشت های تازه (کمتر از ۲۴ ساعت) از محیط های غیر مهارکننده، می باشد.

**تجهیزات و مواد مورد نیاز:** لام شیشه ای،NaCl 85/0 استریل، پی پت پاستور و اپلیکاتور چوبی استریل، لوپ میکروب شناسی، آنس تلقیح سازی، روغن ایمرسیون و ظرف ایمنی برای دور ریختن زباله بیولوژیک شامل وسایل نوک تیز، سانتریفیوژ، ورتکس، لوله در پیچ دار استریل، قیچی اسکالپل و پنس استریل، خردکن بافت، متانول خالص.   
**طرز تهیه مواد رنگ آمیزی گرم:** رنگ به صورت تجاری و آماده خریداری می شود. در صورت تهیه رنگ به صورت زیر ساخته می شود:

**کریستال ویوله**: کریستال ویوله (20 گرم) در اتانول 96 درصد (100 میلی لیتر) حل می شود. اگزالات آمونیوم (1 گرم) در 100 میلی لیتر آب دیونیزه حل می شود. هنگـام مصـرف، محلـول کریسـتال ویولـه ذخیـره را بـه نسـبت ۱:۱۰بـا آب مقطـر رقیـق نمائید(1 میلی لیتر محلــول کریســتال ویولــه و ۹ میلی لیتر آب مقطــر). ســپس ایــن محلــول را بــا چهــار حجــم از محلول اگزالات آمونیم رقیق کنید ( ۱ میلی لیتر محلول کریستال ویوله رقیق شده و 4 میلی لیتر اگزالات آمونیم). محلول ذخیره و مصرفی کریستال ویوله، در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می شوند.

**معرف لوگل:** ید ۱ گرم، یدور پتاسیم ۲ گرم، آب مقطر۲۴۰ میلی لیتر، محلول آبی بیکربنات سدیم 5 درصد به میزان 60 میلی لیتر.   
در مقدار کمی از آب مقطر، ید و یدور پتاسیم را کاملاً حـل نماییـد، بعـد حجـم را بـا آب مقطـر بـه ۲۴۰ میلی لیتر برسانید. محلول %۵ بیکربنات سدیم (بیکربنات سدیم: ۵ گرم آب مقطـر ۱۰۰ میلی لیتر) را نیـز بـه آن اضافه نمایید. محلول با درب کاملاً بسته در دمای اتاق نگهداری می شود .

**محلول الکل-استون:** اتانول ۲۵۰ میلی لیتر، استون ۲۵۰ میلی لیتر. حجم مساوی از الکل اتیلیک (اتانول) را با استون مخلوط نمایید.

**فوشین/ یا سافرانین ذخیره**: پودر فوشین ۲ گرم (یا پودر سافرانین 5/2 گرم)، اتانول ۱۰۰ میلی لیتر   
به هنگام مصرف، محلول ذخیره فوشین یا محلول ذخیره سـافرانین را بـه نسـبت ۱:۱۰بـا آب مقطـر رقیق نمایید.

تمامی محلولها در ظروف تیره، تهیه و در دمای اتاق ذخیره می شوند.

**رنگ آمیزی گرم به روش هوکر (**Hucker**)**

1- ابتدا از نمونه ارسالی (روش مستقیم) یا باکتری رشد کرده (روش غیرمستقیم) یک گسترش نازک تهیه کرده و در هوای آزمایشگاه اجازه دهید تا خشک شود.  
۲- گسترش مذکور را با حرارت فیکس کنید.  
۳- کریستال ویوله را به مدت ۱ دقیقه روی لام قرار دهید و سپس لام را با آب مقطر شستشو دهید.  
۴- محلول لوگل را به مدت ۱ دقیقه روی لام اثر دهید و سپس لام را با آب مقطر شستشو دهید.  
5-محلول رنگ بر را به صورت قطره قطره اضافه کنید تا لام به صورت بی رنگ و شفاف در آید (معمولاً کمتر از 10 ثانیه وقت لازم است). سپس سریعاً لام را با آب مقطر شستشو دهید.

6-از محلول ۲۵ درصد فوشین قلیایی (سافرانین) به مدت 30 ثانیه بر روی لام استفاده کنید.  
7- لام را با آب مقطر شسته و پس از خشک شدن در زیر میکروسکوپ به مطالعه آن بپردازید.

**نکته 1:** در مرحله آخر رنگ آمیزی گرم برخی از آزمایشگاه ها به جای فوشین قلیایی از سافرانین استفاده می کنند. فوشین قلیایی بسیاری از باکتری های گرم منفی را با شدت بیشتری نسبت به سافرانین رنگ می کند و دیدن آنها را آسان تر می کند. برخی از باکتری‌هایی که با سافرانین ضعیف رنگ‌آمیزی می‌شوند، مانند هموفیلوس، لژیونلا، کمپیلوباکتر، بروسلا و برخی از باکتری‌های بیهوازی، به آسانی توسط فوشین قلیایی رنگ‌آمیزی می‌شوند.

**نکته 2:** زمان استاندارد استفاده از هر رنگ ممکن است بسته به کیت مورد استفاده متفاوت باشد.

**رنگ آمیزی گرم از محیط براث:** تمام نواحی آبگوشت را که دارای رشد هستند بررسی کنید و با استفاده از یک پیپت پلاستیکی استریل چند قطره را روی یک لام شیشه ای برچسب دار بریزید و پخش کنید تا لکه ای به اندازه یک چهارم لام ایجاد شود. سپس به روش گفته شده در فوق رنگ آمیزی گرم به انجام می رسد.

**مکانیسم آزمایش**: در این رنگ آمیزی کریستال ویوله به عنوان رنگ اولیه عمل می کند و به دیواره سلولی باکتری متصل می شود. این اتصال به واسطه کمپلکسی که با (ید) لوگل ایجاد می کند تثبیت می گردد. برخی از گونه های باکتریایی (باکتری های گرم مثبت) این توانایی را دارند که حتی پس از اضافه کردن رنگ بر (الکل یا استن) رنگ کریستال ویوله را حفظ کنند لذا در رنگ آمیزی گرم به رنگ آبی-بنفش در می آیند. این امر به آن علت است که در دیواره باکتری های گرم مثبت ضخیم بودن لایه پپتیدوگلیکان و کم بودن مقدار چربی مانع از نفوذ الکل به دیواره و در عین حال مانع از خروج رسوب رنگی از دیواره می گردد. این در حالی است که دیواره ی سلولی باکتری های گرم منفی به علت وجود مقادیر زیاد چربی و نازک تر بودن لایه پپتیدوگلیکان پس از اضافه نمودن رنگبر، رنگ کریستال ویوله را از دست می دهد و بعد از اضافه کردن فوشین قلیایی یا سافرانین در مرحله آخر به رنگ قرمز-صورتی در می آیند.

**کاربردهای رنگ آمیزی گرم:**

1) تمایز باکتری ها به دو دسته گرم مثبت و گرم منفی اولین قدم برای طبقه بندی و شناسایی باکتری ها در کشت ها است.

2) مشاهده باکتری در نمونه های بالینی سرنخ حیاتی در تشخیص بیماری های عفونی را فراهم می کند.

3) در تخمین تعداد کل باکتری ها مفید است.

4) انتخاب تجربی آنتی بیوتیک ها در آنتی بیوگرام را می توان بر اساس گزارش گرم انجام داد.

5) انتخاب محیط کشت برای تلقیح را می توان به صورت تجربی بر اساس گزارش رنگ آمیزی گرم انجام داد.

**نکته:** طبق توصیه آزمایشگاه مرجع سلامت، برای تمام کلنی های جدا شده از کشت مایعات استریل بدن باید رنگ آمیزی گرم انجام شود ودر سایر موارد، رنگ آمیزی گرم در کنار روش های تشخیصی توصیه می شود.

**(6) كنترل كيفي رنگ ها**

کنترل کیفی رنگ های رایج در میکرب شناسی باید در موارد زیر انجام شوند:

1- هر زمان رنگ با معرف جدیدی تهیه می شود.

2- در مورد رنگ زیل-نلسون هر هفته باید از نظر کارایی چک شود.

در موارد زیر باید رنگ دور ریخته شود:

1- تاریخ انقضاء آن تمام شده است.

2- علائم خرابی (تغییر رنگ، رسوب یا کدورت) در آن ظاهر شده است.

3- در ارتباط با رنگ گرم علاوه بر بررسی با سوش های استاندارد مطابق با طرح کیفیت بهتر است کنترل آلودگی میکروبی انجام شود به این شکل که مقداری از رنگ را روی لام تمیز ریخته و به صورت مستقیم زیر میکروسکوپ از نظر وجود میکروب بررسی می کنیم.

**کنترل کیفی رنگ آمیزی ساده (گیمسا، متیلن بلو و کربول فوشین):**

هر سری ساخت و خرید، سپس هر روز کاری به انجام می رسد.

**کنترل شاهد منفی**: نرمال سالین: بدون مشاهده باکتری.

**کنترل باکتری**: در رنگ آمیزی گیمسا و متیلن بلو اشریشیاکلی ATCC25922: باسیل آبی و استافیلوکوک آرئوسATCC25923: کوکسی آبی. در رنگ آمیزی کربول فوشین این باکتری ها به رنگ قرمز دیده می شوند.

**کنترل کیفی رنگ لوفلر متیلن بلو:**

هر سری ساخت و خرید، سپس هر روز کاری به انجام می رسد.

**کنترل شاهد منفی**: نرمال سالین: بدون مشاهده باکتری.

**کنترل با باکتری:** اشریشیاکلی ATCC25922: باسیل آبی و کورینه باکتریوم: باسیل های پلی مورف آبی رنگ با دانه های متاکروماتیک.

**كنترل كيفي رنگ آمیزی گرم:**

1- بررسی روزانه معرف ها از نظر ظاهري

* اگر كريستال ويوله رسوب كرده يا ته نشين شده، قبل از استفاده آن را صاف كنيد.
* **نكته**: فوشين بازي و سافرانين مي توانند آلوده شوند و بنابراین در صورت شک به آلودگی، انجام رنگ آميزی با استفاده از معرف تازه باید به انجام برسد.
* تبخير شدن مواد كارايي و تأثير معرف ها را دگرگون می كند. اگر محلول هاي كاري به زودی تمام نمي شوند، بايد به طور منظم تعويض شوند.

2- به طور روزانه و زماني كه يك سري ساخت جديد استفاده مي شود، گسترشي از اشريشياكلي (ATCC 25922) و استافيلوكوك اپيدرميديس (ATCC 12228) و يا استافيلوكوك اورئوس (ATCC 25923) تهيه و فيكس کرده و رنگ آميزي كنيد. همچنین به عنوان **کنترل شاهد منفی** از نرمال سالین نیز یک گسترش تهیه نمایید.

**نتايج مورد انتظار:**

**اشريشياكلي**: باسيل هاي گرم منفي، صورتي

**استافيلوكوك اپيدرميديس و يا اورئوس**: كوكسي هاي گرم مثبت، بنفش پررنگ

**کنترل شاهد منفی**: نرمال سالین: بدون مشاهده باکتری.

3-برخی از علل رايجی که موجب اسلايد رنگ آميزی گرم نامناسب می گردند:

* استفاده از لام هاي شيشه اي كه قبلاً تميز يا چربي زدايي نشده اند.

**توجه:** با ذخيره لام ها در ظرف حاوي اتانول 95% از تميز بودن آنها مطمئن خواهيم بود. قبل از استفاده، الكل اضافي را از روي لام خالي كنيد يا آن را روي شعله بگيريد.

* گسترش ها خيلي ضخيم تهيه شده است.
* حرارت دادن زياد گسترش، زماني كه براي فيكس كردن از حرارت ا ستفاده مي شود.
* آب كشي زياد در طي فرايند رنگ آميزي

4- براي اطمينان از صحت تفسير، سيستمي براي بررسي گزارش هاي رنگ آميزي گرم برقرار كنيد، مانند موارد زیر:

- بررسي روزانه تعدادي از رنگ هاي گرم توسط سوپروايزر

- مقايسه نتايج كشت نهايي با گزارش هاي رنگ آميزي گرم

- گردآوري مجموعه اي از لام هاي مرجع براي آموزش

**کنترل کیفی رنگ آمیزی زیل-نلسون:**

هر سری ساخت و خرید، سپس هر روز کاری به انجام می رسد.

**کنترل منفی**: اشریشیاکلی ATCC25922: باسیل آبی

**کنترل مثبت**: واکسن BCG: باسیل صورتی-قرمز

**کنترل شاهد منفی**: نرمال سالین: بدون مشاهده باکتری.

**(7) محدودیت ها و تداخلات:**

## محدودیت‌های رنگ آمیزی لوفلر متیلن بلو: رنگ ‌آمیزی لوفلر متیلن بلو، رنگ بیش از حد روی اسمیر نماند. زیرا ممکن است کنتراست بین باکتری و زمینه (بین سیتوپلاسم و گرانول) کاهش یابد. این روش برای برخی از سویه‌های باکتری مانند پروپیونی باکتریوم، اکتینومایس، و اشکال پلئومورفیک استرپتوکوک‌ها چندان مناسب نیست.

**محدودیت های رنگ آمیزی زیل-نلسون با روش سرد:**

1. ممکن است نسبت به روش زیل-نلسون حساسیت کمتری داشته باشد.

2. اسمیرهایی که خیلی ضخیم هستند ممکن است به درستی رنگ نشوند.

### **محدودیت های رنگ آمیزی گیمسا:** رنگ گیمسا باید به صورت تازه و قبل از استفاده آماده شود.

### **محدودیت های رنگ آمیزی گرم:**

* تفسیر نادرست رنگ آمیزی گرم منجر به تشخیص اشتباه یا تأخیر در تشخیص بیماری عفونی می شود.
* برخی از باکتری ها نیز قابل رنگ آمیزی توسط این روش نیستند. بنابراین با رنگ آمیزی گرم می توان باکتریها را بر اساس رنگ پذیر بودن با واکنش گرم و مورفولوژی آنها تقسیم بندی نمود.
* اعمال گرمای بیش از حد در حین تثبیت اسمیر ممکن است ظاهر مورفولوژیک سلول های میزبان و میکروارگانیسم ها را تحت تأثیر قرار دهد.
* درمان با عوامل ضد میکروبی (و همینطور عوامل فعال علیه دیواره سلولی مانند لیزوزیم) ممکن است باعث شود باکتری های گرم مثبت، گرم منفی به نظر برسند (در گزارش لام نمونه های ارسالی بیمارستان که بیمار تحت مصرف آنتی بیوتیک هست دقت شود).
* باکتری های گرم مثبت که توسط پلی مورفونوکلئرها فاگوسیتوز شده اند نیز ممکن است گرم منفی به نظر برسند.
* برخی از باکتری های گرم مثبت ممکن است به راحتی رنگ را از دست بدهند و بنابراین به صورت مخلوطی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی (متغیر گرم) ظاهر می شوند.
* باکتری گاردنرلا دارای ساختار دیواره سلولی گرم مثبت غیرمعمولی است که باعث می شود باکتری های این جنس به صورت گرم منفی یا متغیر رنگ آمیزی شوند.
* وقتی بیش از حد رنگ‌زدایی انجام شود، حتی باکتری‌های گرم مثبت ممکن است صورتی به نظر برسند.
* واکنش گرم به سن سلول نیز بستگی دارد. کشت های قدیمی باکتری های گرم مثبت (با تضعیف دیواره های سلولی) ممکن است به آسانی بی رنگ شوند. کشت های قدیمی تر از 16 تا 18 ساعت حاوی سلول های زنده و مرده خواهند بود. سلول های مرده رو به زوال خواهند بود و رنگ را به درستی حفظ نمی کنند.
* باکتری های گرم مثبت مانند کورینه باکتریوم، آرتروباکتر، اکتینومیست و پروپیونی باکتریوم دارای دیواره های سلولی هستند که به ویژه در هنگام تقسیم سلولی به شکستگی حساس هستند و منجر به رنگ آمیزی گرم منفی آنها می شود.
* در کشت باسیلوس و کلستریدیوم، کاهش ضخامت پپتیدوگلیکان در طول رشد سلولی ممکن است باعث شود برخی از آنها گرم منفی به نظر برسند.
* گروه خاصی از باکتری ها می توانند پاسخ متغیری به واکنش گرم نشان دهند که می تواند به دلیل استرس رشد باشد (به عنوان مثال، مواد مغذی نامناسب، دما، pH یا الکترولیت ها).
* اعضای جنس آسینتوباکتر کوکوباسیل های گرم منفی هستند که در برابر مرحله رنگ زدایی رنگ گرم مقاوم هستند و اغلب پس از رنگ آمیزی گرم که حتی به خوبی آماده شده باشد، ممکن است گرم مثبت ظاهر شوند.
* برخی از باکتری ها وقتی در محیط اسیدی رشد می کنند، گرم منفی به نظر می رسند.
* از دست دادن دیواره های سلولی در باکتری های گرم مثبت ممکن است آنها را گرم منفی کند (L-فرم).
* باکتری های فاقد دیواره سلولی (مایکوپلاسما) همیشه گرم منفی هستند.
* برای گونه های مایکوباکتریوم، ماهیت مومی پوشش باعث می شود که باکتری ها به راحتی با رنگ های استفاده شده در رنگ آمیزی گرم رنگ پذیر نباشند، اگرچه باکتری ها گرم مثبت در نظر گرفته می شوند.
* باکتری های کوچک و باریک مانند ترپونما، کلامیدیا، ریکتزیا اغلب به سختی با روش گرم رنگ آمیزی می شوند.
* اسمیرهایی که خیلی ضخیم یا چسبناک هستند ممکن است رنگ اولیه زیادی را حفظ کنند و شناسایی واکنش‌های مناسب رنگ‌آمیزی گرم را دشوار ‌کند. مثلاً ارگانیسم های گرم منفی ممکن است به درستی بی رنگ نشوند و گرم مثبت دیده شوند.
* رنگ ممکن است با نگهداری طولانی رسوب ایجاد کند. فیلتر کردن با گاز استریل یا صافی کاغذی باعث حذف کریستال های اضافی می شود.
* گاهی اوقات، پنوموکوک هایی که در دستگاه تنفسی تحتانی در اسمیر مستقیم شناسایی می شوند، در کشت رشد نمی کنند چون برخی از سویه های آن بیهوازی اجباری هستند.

**(8) ملاحظات ایمنی:**

* برای رنگ آمیزی زیل-نلسون دقت شود که نمونه حتماً آلودگی زدایی شده باشد تا در صورت مثبت بودن لام، شخص آلوده نگردد.
* استفاده از دستکش برای انجام تمام رنگ آمیزی ها ضروری است.

**(9) مستندات و سوابق :**

فرم سوابق یاLog book ساخت رنگ هاوهمچنینسوابق کنترل کیفی، عدم انطباق ها و اقدامات اصلاحی.

**(10) منابع:**

1. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد اول: تشخیص. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
2. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد دوم: تفسیر کشت. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
3. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*، American Society for Microbiology. 2007.
4. Koneman، Elmer W، et al. Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. *Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers. Seventh edition.* 2021.
5. Tille، Patricia. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology-e-book*. Elsevier Health Sciences، fifteenth edition. 2021.