راهنمای رنگ آمیزی گرم

آزمایشگاه مرجع سلامت

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

تابستان ۱۳۹۶

محل مهر تضمین کیفیت	
تاریخ :	تاریخ :

۱- هدف:

رنگ آمیزی گرم برای طبقه بندی باکتری ها بر اساس شکل، اندازه، مرفولوژی سلول و واکنش گرم آنها در آزمایشگاه میکروب شناسی پزشکی استفاده می شود. همچنین به عنوان آزمایش کلیدی و بسیار مهم برای تشخیص احتمالی عوامل عفونت و بررسی کیفیت نمونه های بالینی به کار می رود.

۲- دامنه کاربرد:

این دستورالعمل در بخش میکروب شناسی آزمایشگاه کاربرد دارد.

۳- اصول:

این آزمایش در ابتدا در سال ۱۸۸۴ توسط Christian Gram پایه گذاری شد. در سال ۱۹۲۱ توسط Hucker برای باکتری شناسی عمومی اصلاح شد، که معرف ها پایداری بیشتری داشته و افتراق ارگانیسم ها بهتر انجام می شود. اصلاحات دیگری به صورت اختصاصی برای رنگ آمیزی بی هوازی ها (Kopeloff's modification) و برای باسیل های گرم منفی که به صورت ضعیف رنگ آمیزی می شوند (*Legionella* spp., *Campylobacter* spp., *Brucella* spp.) با استفاده از کربول فوشین یا فوشین بازی انجام شده است. در واقع بسیاری از آزمایشگاه ها از این رنگ ها به طور معمول استفاده می کنند، به خصوص برای اسمیر مستقیم نمونه های بالینی.

باکتری ها بر اساس تفاوت در ساختمان و ترکیب دیواره سلولی، گرم مثبت یا گرم منفی رنگ می گیرند. گونه های گرم مثبت دارای لایه ضخیم پپتیدوگلیکان و مقدار زیادی اسید تیکوئیک هستند و اگر دیواره سلولی آنها در اثر سن، عوامل ضد میکروبی یا دیگر فاکتورها آسیب ندیده باشد، به وسیله الکل، بی رنگ نشده و به رنگ بنفش تیره اولیه باقی می مانند. گونه های گرم منفی دارای تک لایه پپتیدوگلیکان هستند. پپتیدوگلیکان به یک غشاء خارجی دو لایه لیپوساکارید-فسفولیپید که به صورت پراکنده در آن پروتئین وجود دارد، متصل است. غشاء خارجی به وسیله الکل، تخریب شده، ترکیب کریستال ویوله و ید خارج شده و به وسیله رنگ دیگر جایگزین می شود.

این آزمایش علاوه بر واکنش رنگ آمیزی گرم، اندازه، شکل و آرایش سلول باکتریایی را بررسی می کند. این خصوصیات ممکن است تحت تأثیر عوامل متعددی شامل سن کشت، محیط کشت، شرایط محیط انکوباسیون، روش های رنگ آمیزی و وجود مواد مهارکننده قرار گیرد. برای تفسیر اسمیر تهیه شده از نمونه های بالینی نیز شرایط مشابه به کار می رود، اما عوامل دیگری مثل وجود انواع سلول های میزبان و فاگوسیتوز نیز مؤثر می باشند.

۴- نمونه:

- ✓ نمونه های بالینی عموماً شامل سواب حلق، سواب بینی، خلط بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک، مایعات استریل بدن، مدفوع و پروتزهای مصنوعی می باشد. لام مستقیم برای نمونه های زخم، جراحات چشم، بافت های بدن و ترشحات خاص بسیار مفید است.
- ✓ کشت های مایع و کشت های خون برای تعیین رشد یا مرفولوژی باکتری ها
- ✓ کلنی های رشد کرده روی محیط کشت جامد
- توجه: تهیه اسمیر از کشت های تازه (کمتر از ۲۴ ساعت) روی محیط های غیر مهار کننده و نمونه های بالینی تازه، صحیح ترین نتیجه را می دهند. زمانی که مرفولوژی مهم است (مانند استرپتوکک ها و باسیل های گرم مثبت)، کشت های مایع ارجحیت دارد.
- ✓ برای جمع آوری نمونه به دستورالعمل های مربوطه برای هر نوع نمونه مراجعه شود.

- ✓ عموماً اسمیر در آزمایشگاه تهیه می شود، اما زمانی که انتقال آن با تأخیر صورت گیرد، یا ماده نگهدارنده به نمونه اضافه شود، اسمیر را آماده نموده و لام را به آزمایشگاه ارسال نمایید.
- ✓ **معیارهای رد نمونه:** رنگ آمیزی گرم برای اسمیر مستقیم مدفوع، خون یا حلق، ارزش کمی داشته و همچنین برای خلط بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک کاربردی ندارد.

۵- معرف ها، لوازم و تجهیزات:

A. معرف ها:

a) کریستال ویوله

b) ید گرم

c) رنگ برها

- ✓ رنگ بر آهسته: اتانول ۹۵٪
- ✓ رنگ بر متوسط: استون ـ الکل: مخلوطی از اتانول ۹۵٪ و استون (Reagent grade) از هر کدام ۵۰ ml در بطری شیشه ای قهوه ای رنگ ریخته، با یک سال تاریخ انقضاء برچسب زده و در دمای اتاق نگهداری کنید.
- ✓ رنگ بر سریع: استون (Reagent grade)
- توجه: اتانول و استون قابل اشتعال هستند.

d) رنگ کننده ها:

- ✓ سافرانین
- ✓ جایگزین: فوشین بازی (۰/۸، ۰/۱ یا ۰/۲ درصد)

معرف ها ممکن است به صورت آماده مصرف تجاری، خریداری و یا در آزمایشگاه تهیه شوند. حجم زیادی از معرف ها را تهیه کرده و به اندازه نیاز، محلول کاری آماده نمایید. برای مصرف روزانه، معرف ها را در بطری های کوچک تر بریزید، اما برای دوری از ایجاد رسوب روی لام، بطری های کوچک تر کریستال ویوله و رنگ برها باید هر ماه جایگزین شوند.

- توجه: نام معرف، تاریخ آماده سازی، تاریخ استفاده، شماره ساخت، تاریخ انقضاء و شرایط نگهداری روی بطری و در برگه کاری مشخص شود. اگر تاریخ استفاده به طور واضح روی بطری های ذخیره و در برگه های کاری کنترل ثبت شده باشد، نیازی به برچسب گذاری بطری های کاری با این مشخصات نیست، به غیر از نام معرف.

B. لوازم:

- ✓ قلم الماس
- ✓ لام شیشه ای
- ✓ NaCl ۰/۸۵٪ استریل
- ✓ (نرمال سالین)، آب یا براث
- ✓ لوپ یا نیدل
- ✓ لوازم برای دور ریختن پسماند بیولوژیک مثل وسایل نوک تیز و برنده
- ✓ پنس
- ✓ چراغ گازی
- ✓ روغن ایمرسیون

۶- روش انجام آزمایش:

A. تهیه اسمیر

از یک لایه ارگانیسم با غلظت کافی اما با تراکم کم به گونه ای که خصوصیت آرایش میکروارگانیسم مشخص باشد، برای تهیه اسمیر مستقیم استفاده کنید. از لام های شیشه ای نو و تمیز استفاده نمایید.

- توجه: 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.

<u>نمونه های بالینی</u>

a) مایعات بدن، BAL و CSF

۱) ۵ یا ۶ قطره از نمونه به اضافه ۱ قطره فرمالین ۳۷٪ را در Cytospin Slide Centrifuge سانتریفوژ کنید.

- توجه: برای مایعات غلیظ بدن از Cytospin Slide Centrifuge استفاده کنید، که باعث افزایش حساسیت رنگ آمیزی گرم، کاهش زمان سانتریفوژ و آزمایش و در نهایت نتیجه سریع تر می گردد.

۲) به عنوان یک روش جایگزین، زمانی که نمونه غلیظ یا کدر باشد یا مقدار نمونه کافی نباشد، ۱ یا ۲ قطره نمونه را به وسیله پی پت پاستور مستقیماً روی لام قرار دهید. سپس جای قطره را با قلم الماس مشخص کنید. اجازه دهید قطره ها یک قطره بزرگ تشکیل دهند. مایع را روی لام پخش نکنید. در صورت نیاز برای افزایش غلظت مایع مورد آزمایش، یک قطره دیگر از نمونه را روی همان اسمیر اضافه کنید.

b) نمونه های ادرار

۱) ۱۰ میکرولیتر از ادرار که به خوبی مخلوط شده، بدون سانتریفوژ نمودن روی لام شیشه ای قرار دهید. سپس جای قطره را با قلم الماس مشخص کنید.

۲) قطره را پخش نکنید و اجازه دهید قطره در مجاورت هوا خشک شود.

c) نمونه های فرستاده شده روی سواب

ترجیحاً باید یک سواب جدا برای رنگ آمیزی گرم فرستاده شود.

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

۲) در مواردی که فقط یک سواب فرستاده شده، سواب را در مقدار کمی سالین یا محیط مایع قرار داده و درِ لوله را بسته و آن را ورتکس کنید. سواب را به دیواره داخلی لوله فشرده، و آن را برای تهیه اسمیر استفاده کنید. باقیمانده سوسپانسیون را برای تلقیح محیط کشت استفاده کنید.

d) نمونه هایی که روی سواب فرستاده نمی شوند، شامل آسپیره ها، ترشحات، خلط و غیره

(۱) نمونه را روی یک لام تمیز قرار دهید

a) اگر نمونه داخل یک سرنگ ارسال شده است، ابتدا همه محیط های کشت را تلقیح کنید و سپس مقدار کمی از آن را روی لام قرار دهید.

- توجه: به کارکنان مربوطه آموزش دهید که در مورد نمونه هایی که با سرنگ ارسال می شود، قبل از ارسال، سوزن را از روی سرنگ بردارند.

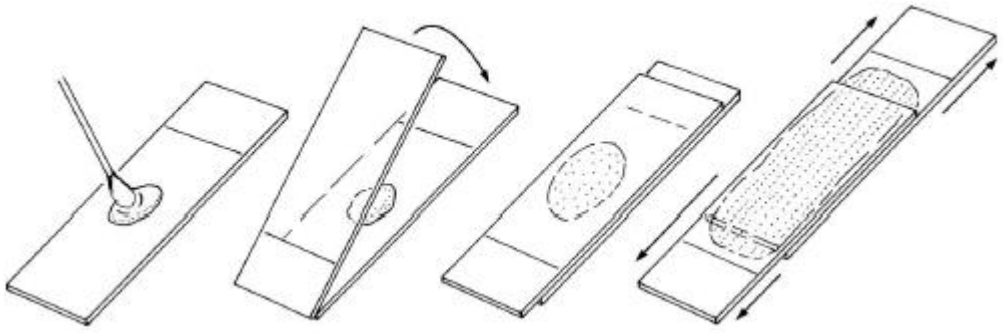
b) با استفاده از یک اپلیکاتور چوبی یا پی پت یا لوپ سیمی استریل، قسمت های چرکی یا خونی رنگ نمونه را انتخاب کنید.

c) نمونه را روی ناحیه بزرگی از لام پهن کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

(۲) برای نمونه های خیلی غلیظ یا چرکی

a) برای تهیه آسان تر اسمیر، نمونه را در یک قطره سالین روی لام رقیق کنید.

b) به عنوان یک روش جایگزین، نمونه را روی لام قرار داده، یک لام دیگر را روی آن قرار دهید. لام ها را روی یکدیگر فشار داده و مطابق شکل زیر لام را با کشیدن در دو جهت مخالف، از یکدیگر جدا کنید. مواد اضافی روی لام را با دستمال آغشته به محلول ضد عفونی کننده، بردارید.



c) مواد خشک یا نمونه های بالینی به مقدار خیلی کم

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

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

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

کشت های مایع

روی هر اسلاید فقط یک اسمیر آماده کنید.

a) با استفاده از پی پت پاستور استریل (یا سوزن خلأ، برای ظروفی مثل بطری های کشت خون، جهت جلوگیری از آلودگی با سوزن و سرنگ) ۱ تا ۲ قطره روی لام قرار دهید.

b) قطره را پخش کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

کلنی از محیط های کشت جامد

a) یک قطره سالین یا آب استریل روی لام قرار دهید. آب مقطر ممکن است مرفولوژی طبیعی ارگانیسم های حساس را از بین ببرد.

b) مقدار کمی از کلنی را با یک اپلیکاتور چوبی، نیدل سیمی یا لوپ استریل بردارید.

c) به آرامی آن را در قطره مخلوط کنید. اسمیر باید کمی کدر و یکنواخت باشد. اگر خطوط حلقوی در اسمیر خشک شده مشاهده شود، یا تلقیح خیلی غلیظ بوده، یا قطره سالین خیلی کوچک بوده، و/یا اسمیر در ناحیه خیلی کوچکی پخش شده است.

B. فیکس کردن اسمیر

لام ها را در مجاورت هوا در هود ایمنی بیولوژیک یا روی گرم کننده اسلاید در دمای ۶۰°C خشک کنید.

۱- خشک کردن با حرارت

a) اسلاید های خشک شده را دو یا سه بار از روی شعله بگذرانید یا برای ۵ تا ۱۰ ثانیه در مقابل میکروواینسینریتور نگه دارید. برای جلوگیری از تغییر شکل سلول ها، از حرارت زیاد اجتناب نمایید.

c) بگذارید لام قبل از رنگ آمیزی خنک شود.

۲- به عنوان روش جایگزین لام را با متانول فیکس کنید. متانول مانع از لیز RBC ها می شود. از تخریب سلول های میزبان جلوگیری می کند، زمینه واضح تر می شود و مانع از شسته شدن نمونه های مایع می شود.

a) روی یک اسمیر خشک شده، چند قطره متانول به مدت ۱ دقیقه بریزید. متانول باقیمانده را بدون آبکشی از لام دور بریزید و اجازه دهید تا لام در مجاورت هوا خشک شود.

b) قبل از رنگ آمیزی از حرارت استفاده نکنید.

C. روش انجام رنگ آمیزی

برای مقایسه روش ها به جدول ۱ مراجعه نمایید.

- توجه: رنگ ها، آب یا رنگ برها را مستقیماً روی اسمیر نریزید. قطره های معرف را نزدیک انتهای لام ریخته و اجازه دهید معرف روی سطح اسمیر را بپوشاند.

❖ **روش Hucker**

- توجه: از این روش به طور گسترده ای در کارهای روتین استفاده می شود. استون- الکل نتایج سازگاری می دهد، اما اتانول ۹۵٪ برای دانشجویان و کارکنان کم تجربه ارجح است. استون یک رنگ بر سریع است و فقط برای کارکنان با تجربه پیشنهاد می شود. استفاده از استون- الکل برای نمونه های حاوی تعداد زیادی از سلول های میزبان مفیدتر واقع می شود.

a) اسمیر فیکس شده را با محلول کریستال ویوله بپوشانید. اجازه دهید رنگ به مدت ۳۰ ثانیه باقی بماند.

b) کریستال ویوله را دور بریزید و لام را به آرامی با آب شیر آبکشی کنید.

- توجه: آبکشی زیاد در این مرحله می تواند باعث شسته شدن کریستال ویوله از سلول های گرم مثبت شود.

c) آب اضافه را با محلول ید، شسته و سپس لام را با محلول ید بپوشانید. اجازه دهید ید به مدت ۳۰ ثانیه باقی بماند.

d) ید را دور بریزید و لام را به آرامی با آب شیر آبکشی کنید.

e) در حالی که لام را به صورت زاویه دار (کج) نگه داشته اید، استون- الکل را روی اسمیر بریزید. زمانی که رنگ خارج شده از روی لام کمرنگ شد، این مرحله را متوقف کنید. زمان رنگ بری را بر اساس ضخامت اسمیر و نوع رنگ ر مورد استفاده تنظیم کنید.

f) لام را با آب شیر آبکشی کنید.

g) لام را با سافرانین بپوشانید و اجازه دهید حداقل ۳۰ ثانیه و اگر از رنگ های فوشین استفاده می شود، یک دقیقه یا بیشتر روی لام بماند. در این مرحله می توانید یکی از رنگ های زیر را استفاده کنید:

- ✓ سافرانین
- ✓ فوشین بازی ۰/۱ تا ۰/۲ درصد
- ✓ کربول فوشین یا فوشین بازی ۰/۱ تا ۰/۸ درصد برای ارگانیسم های گرم منفی که کمرنگ رنگ می شوند.

h) رنگ را دور بریزید و لام را به آرامی با آب شیر آبکشی کنید.

i) آب اضافی را خارج کرده و لام را به صورت عمودی قرار دهید تا در مجاورت هوا خشک شود یا از خشک کننده لام تجاری استفاده نمایید.

j) اسمیر را از نظر میکروسکوپی بررسی کنید.

❖ روش Kopeloff

این روش برای مشاهده و افتراق بهتر باکتری های بی هوازی پیشنهاد می شود که ممکن است با روش Hucker به آسانی و خیلی زیاد تحت تأثیر رنگ بر، رنگ خود را از دست داده و کمرنگ رنگ بگیرند. این روش همچنین برای اسمیرهای واژن در تشخیص واژینوزیس باکتریایی پیشنهاد می شود. (برای انجام رنگ آمیزی به روش Kopeloff و روش استفاده از کربول فوشین به جدول ۱ مراجعه نمایید).

جدول ۱- روش های رنگ آمیزی گرم، معرف های پیشنهادی، زمان های رنگ آمیزی و موارد استفاده

Stain and use	Hucker's		Carbol fuchsin		Kopeloff's	
	Reagent	Time	Reagent	Time	Reagent	Time
Initial stain	Crystal violet	30 s	Crystal violet	30 s	Alkaline crystal violet: flood with solution A: add 5 drops of solution B	2–3 min
Iodine	Gram's iodine	30 s	Gram's iodine	30 s	Kopeloff's iodine	≅2 min
Decolorizer	Acetone-alcohol	~1–5 s	95% ethanol	~30 s	3:7 acetone-alcohol: rinse immediately after applying	
Counterstain	Safranin[a]	30 s	Carbol fuchsin or 0.8% basic fuchsin	≅1 min	Kopeloff's safranin	10–30 s
Recommended use	General bacteriology		*Bacteroides* spp. *Fusobacterium* spp. *Legionella* spp. *Campylobacter* spp. *Brucella* spp. and other faintly staining gram-negative organisms		Anaerobes Diagnosis of bacterial vaginosis (Appendix 3.2.1–3)	

[a] Or, preferably, use 0.1 to 0.2% basic fuchsin as a counterstain (7).

D. برای دور ریختن اسمیر رنگ شده، آن را به عنوان پسماند بیولوژیک و تیز در نظر گرفته، و در safety box بریزید.

E. گزارش نتایج:

اسمیر رنگ شده را با عدسی روغنی (۱۰۰×) میکروسکوپ مشاهده کنید. میکروارگانیسم ها را از نظر وجود در اسمیر و مرفولوژی بررسی نمایید.

۱. واکنش گرم

a) گرم مثبت: بنفش تیره

b) گرم منفی: صورتی یا قرمز (رنگ های کربول فوشین پر رنگ ترند).

c) گرم متغیر: هم سلول های گرم مثبت و هم گرم منفی با یک مرفولوژی

- توجه: واکنش گرم متغیر ممکن است ناشی از ضخامت غیر یکنواخت اسمیر، رنگ بری ناکامل، رنگ بری زیاد، وجود سلول های کهنه، تخریب دیواره سلولی یا طبیعت گرم متغیر بودن ارگانیسم های خاص باشد.

۲. مرفولوژی باکتری ها:

a) گرم مثبت

- ✓ کوکسی های جفت (و زنجیره ای)
- ✓ کوکسی خوشه ای
- ✓ باسیل های بزرگ
- ✓ باسیل های کوچک
- ✓ باسیل های شاخه ای
- ✓ باسیل های کورینه فرم

b) گرم منفی

- ✓ دیپلوکک
- ✓ باسیل
- ✓ باسیل، رشته ای (یا پلی مرفیک)

c) گرم متغیر: کوکوباسیل

d) سلول های مخمر

e) هیف کاذب (Pseudohyphae)

برای مشاهده خصوصیات مرفولوژی و واکنش گرم میکروارگانیسم های گرم مثبت، گرم منفی و سایر میکروارگانیسم هایی که ممکن است در اسمیرهای مستقیم بعضی نمونه های بالینی دیده شود، به جداول ۲، ۳ و ۴ مراجعه نمایید.

جدول ۲- میکروارگانیسم های گرم مثبت مشاهده شده در اسمیرهای مستقیم بعضی نمونه های بالینی

Organism(s)	Gram stain morphology	Frequent sources	Comments and additional tests or media that may be included
Actinomyces spp.	Thin, beaded, branched gram-positive filaments; may be within sulfur granules with peripheral clubs	Cervicofacial, thoracic, abdominal, and pelvic abscesses and drainages; pleural fluid; bronchial washings	Modified acid-fast stain; if sulfur granules present, wash and crush in THIO
Nocardia spp.	Long, thin, branching, beaded, gram-positive or irregularly staining bacilli; in culture smears, may be pleomorphic with branching and coccoid forms	Sputum, bronchial washings, biopsy material, purulent exudates, CSF, blood	Modified acid-fast stain; if mixed microbiota, mycobacterial decontamination procedures may be used; plate incubated at 45°C may enhance recovery; use CYE[a] or Thayer-Martin agar.
Mycobacterium spp.	Gram-positive beaded or gram-neutral bacilli; often found inside macrophages; bacilli may be short to long, banded or beaded, and/or slightly curved; some species appear pleomorphic and coccoid	Respiratory tract, urine, blood, biopsy material, CSF	Confirm with acid-fast stain. Add AFB culture.
Corynebacterium spp.	Gram-positive pleomorphic, club shaped, irregularly staining bacilli or coccobacilli with palisading and/or angular arrangements	Blood, tissue aspirates, skin lesions, wounds, indwelling catheters, prosthetic heart valves, upper and lower respiratory tracts	Add selective and differential media for *Corynebacterium diphtheriae*, if suspected.
C. jeikeium	Often small coccobacilli resembling streptococci		
Propionibacterium spp.	Gram-positive, very pleomorphic "diphtheroid" forms that may branch	Blood, CSF, other body fluids, skin lesions	Common skin contaminant during needle aspiration
Listeria monocytogenes	Gram-positive small to medium coccobacilli that may be pleomorphic; occur in short chains or palisades; may be confused with corynebacteria or enterococci	CSF, blood, amniotic fluid, placental or fetal tissue	Direct wet mount for tumbling motility; if mixed microbiota, cold enrichment may be used
Erysipelothrix rhusiopathiae	In tissue, long, slender, gram-positive bacilli; in blood, small "coryneforms"	Skin lesions, biopsy material, tissue aspirates, blood	Associated with occupational or animal contact
Lactobacillus spp.	Medium, straight, uniform gram-positive bacilli with rounded ends; may form chains or spirals; sometimes short and coccobacillary	Usually involved in mixed infections; rarely from blood, CSF	Recovery may be improved by anaerobic incubation; normal vaginal, mouth, and gastrointestinal tract microbiota
Bacillus spp.	Medium to large square-ended gram-positive bacilli with parallel sides with or without spores; some species have spores that swell sides; may stain gram variable or gram negative with age	May be clinically relevant from any source in compromised patient or intravenous-drug abuser; also intraocular	Frequent culture contaminants; may cause ocular infections

جدول ۲- میکروارگانیسم های گرم مثبت مشاهده شده در اسمیرهای مستقیم بعضی نمونه های بالینی (ادامه)

Organism(s)	Gram stain morphology	Frequent sources	Comments and additional tests or media that may be included
Clostridium perfringens	Gram-positive large "boxcars" with no spores; may stain gram negative	Blood, wounds, intra-abdominal	Add egg yolk agar incubated anaerobically; absence of inflammatory cells may indicate clostridial myonecrosis; normal gastrointestinal tract microbiota
Clostridium spp.	Gram-positive, -variable, or -negative bacilli with or without spores; bacilli may be large, slender and short, or long; sometimes form coils; often smaller than *Bacillus* spp.	Blood, intra-abdominal, wounds, abscesses	Normal gastrointestinal and genital tract microbiota
S. pneumoniae	Gram-positive cocci in pairs, lancet shapes, short chains	Lower respiratory tract, blood, CSF, sterile fluids	Quellung test may be used on selected clinical specimens.
Enterococcus spp.	Gram-positive cocci in pairs, short chains; may resemble pneumococci	Urine, wounds, blood, intra-abdominal abscesses	Normal gastrointestinal tract microbiota; common cause of superinfections in patients treated with expanded-spectrum cephalosporins
Streptococcus spp.	Round to oval gram-positive cocci, occasionally elongated; in pairs and/or short to long chains; nutritionally variant streptococci often seen as highly pleomorphic, gram-variable to gram-negative coccobacilli with pointed ends and spindle shapes	Blood, CSF, respiratory tract, multiple other sources	May be difficult to distinguish from corynebacteria and lactobacilli
Aerococcus viridans	Gram-positive cocci in pairs, tetrads, clusters	Blood, CSF	
Staphylococcus spp.	Gram-positive cocci in pairs, tetrads, clusters	Abscesses, drainages, wounds, respiratory tract, blood, tissue, sterile fluids, indwelling catheters	Normal microbiota, especially skin, nares
S. aureus	May often be characterized by very uniform, geometric clusters of small cocci, whereas coagulase-negative species are often irregular and more pleomorphic, with greater size variation		
Rothia mucilaginosa	Large gram-positive cocci in pairs, tetrads	Blood in compromised patients, peritoneal dialysates	Normal oral microbiota

[a] CYE, charcoal-yeast extract agar.

جدول ۳- میکروارگانیسم های گرم منفی مشاهده شده در اسمیرهای مستقیم بعضی نمونه های بالینی

Organism(s)	Gram stain morphology	Frequent sources	Comments
Enterobacteriaceae	Straight thick bacilli; short to medium length with rounded ends; antimicrobial agent-affected organisms may be pleomorphic, filamentous, and/or irregularly staining	Urinary tract, multiple other sources	Includes organisms that cause gastroenteritis and bacterial dysentery; also normal gastrointestinal tract microbiota; nosocomial strains may be multiply resistant to antimicrobial agents
Pseudomonas spp.	Thin bacilli; medium length to long with rounded to pointy ends; often in pairs; antimicrobial agent-affected organisms may appear filamentous, coiled, and/or pleomorphic	Lower respiratory tract, wounds, eyes, multiple sites in compromised patients	Nosocomial strains may be multiply resistant to antimicrobial agents
Haemophilus spp., *Pasteurella* spp., fastidious gram-negative bacilli	Small coccoid to bacillary forms; pleomorphic; often with filamentous forms; may be faintly staining	Blood, sterile fluid (including CSF), lower respiratory tract, abscesses, wounds, eyes, genital tract	Inoculate CHOC.
Legionella spp.	Pleomorphic slender bacilli of variable lengths that may stain pale; may not take stain in clinical specimens	Lower respiratory tract	Add special growth media; direct fluorescent antibody stains and molecular probes available; acid wash method may be used to enhance recovery from specimens with mixed microbiota
Fusobacterium nucleatum, Capnocytophaga spp.	Long slender bacilli with tapered to pointed ends; "needlelike"; may be in pairs, end to end, or filamentous	Respiratory tract, wounds, blood, abscesses	Endogenous microbiota
Fusobacterium necrophorum, Fusobacterium mortiferum, or *Fusobacterium varium*	Highly pleomorphic bacilli with rounded to tapered ends; pale and irregularly staining, with bizarre forms and round bodies	Wounds, blood, abscesses	Endogenous microbiota
Bacteroides spp.	Pleomorphic straight bacilli with possible irregular to bipolar staining	Wounds, blood, abscesses	Direct fluorescent antibody stain available; endogenous microbiota
Vibrio spp.	Slightly curved to straight bacilli	Stool, wounds	If mixed microbiota, selective medium (TCBS) recommended
Campylobacter spp. (*Helicobacter* spp.)	Thin, curved bacilli, including S shapes, gull wings, and long spiral forms	Stool, blood, gastric biopsy samples	Microaerophilic or capnophilic atmosphere required; if mixed microbiota, 42°C incubation recommended for recovery of thermophilic species
Acinetobacter spp.	Medium to large cocci in pairs; occasionally coccoid, bacillary, and filamentous forms; often resistant to decolorization	Urine, lower respiratory tract, blood, sterile fluids, wounds, abscesses, tissues, stool	Multiple sites in compromised patients
Neisseria spp., *Moraxella catarrhalis*	Medium to large cocci in pairs and tetrads, coffee bean shaped; no bacilli seen	Genital tract, urine, lower respiratory tract, blood, sterile fluids, wounds, abscesses	If mixed microbiota, selective medium may be used to enhance recovery of *Neisseria gonorrhoeae*
Veillonella spp.	Tiny cocci in sheets or clumps	Wounds, blood	Endogenous microbiota

جدول ۴- سایر میکروارگانیسم های مشاهده شده در اسمیرهای مستقیم بعضی نمونه های بالینی

Organism(s)	Gram stain morphology	Frequent sources	Comments
Pneumocystis carinii	Gram-negative spherical cysts (5–7 µm) often containing rosette of eight gram-negative intracystic bodies, or cluster of gram-negative cysts surrounded by halos in background of amorphous gram-negative material	Open lung and transtracheal biopsy materials, bronchial washings and lavage specimens, sputum	Confirm with Grocott methenamine-silver, toluidine blue O, Gram-Weigert, or direct or indirect fluorescent antibody stain.
Blastomyces dermatitidis	Gram-variable, broad-based, thick-walled yeast cell with figure-eight appearance	Bronchial washings, sputum, purulent exudates, skin lesions	
Microsporidia	Gram-variable spherical cells (1–4 µm), thicker at one end	Stool, respiratory, cornea, urine	Confirm with chromotrope stain
Cryptococcus neoformans	Partially or completely gram-positive round yeast cell with clear or red-orange halo; yeast cells may appear stippled or gram neutral	CSF, blood, biopsy material, sputum, bronchial washings, cutaneous lesions	Confirm capsule with India ink; direct antigen detection procedures may be used on CSF; inoculate urea slant.
Candida spp.	Gram-positive budding yeast cell with or without pseudohyphae; may also appear stippled or gram neutral	Sputum, urine, blood, biopsy material, vaginal discharge, upper respiratory tract	Endogenous microbiota
Malassezia furfur	Bottle-shaped yeast cells in compact clusters, usually with short hyphal elements	Skin scrapings, blood drawn through catheter lines, hyperalimentation fluids	Inoculate lipid-enriched medium.

۷- کنترل کیفیت:

a) معرف ها را از نظر ظاهری، به طور روزانه بررسی کنید.

۱. اگر کریستال ویوله رسوب کند یا ته نشین شود، قبل از استفاده آن را صاف کنید.
۲. اگر محلول های کاری با مصرف روزانه تمام نمی شوند، باید به طور منظم عوض شوند. تبخیر مواد ممکن است عملکرد معرف ها را تغییر دهد.
۳. معرف های کاری را حداقل به صورت ماهانه دور بریزید تا استفاده مکرر آنها محدود شود.

توجه: رنگ ها می توانند آلوده شوند. وقتی مشکوک می شوید، باید از سری ساخت جدید معرف استفاده کنید.

b) روش انجام آزمایش رنگ آمیزی را قبل از استفاده از هر سری ساخت جدید هر رنگ و معرف رنگ بر و بعد از آن حداقل به صورت هفتگی با یک میکروارگانیسم گرم مثبت و یک گرم منفی آزمایش کنید. کارکنان آزمایشگاه که رنگ آمیزی گرم را به دفعات کم انجام می دهند، باید به صورت روزانه یا با هر بار آزمایش نمونه بیمار، با یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی آزمایش کنند.

۱. سوسپانسیونی با کدورت کم از *Escherichia coli* (ATCC 25922) و *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) در محیط مایع تهیه کنید.
۲. دو قطره از براث روی هر لام ریخته و دو اسمیر تهیه نمایید.
۳. آنها را در متانول فیکس کرده و در ۲۰°C- نگهداری کنید.
۴. مطابق روش رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی نمایید.

۵. نتایج مورد انتظار:

- ✓ باسیل گرم منفی: صورتی
- ✓ کوکسی گرم مثبت: بنفش پررنگ

۶. به طور جایگزین، از بین دندان ها با یک اپلیکاتور چوبی نمونه گیری کرده و در انتهای لامی که برای نمونه استفاده شده است، قرار دهید. این یک روش کنترل Built-in می باشد که شامل سویه های گرم مثبت و گرم منفی است.

c) وقتی که اسمیرهای رنگ شده کیفیت خوبی نداشته باشند، تفسیر رنگ ها مشکل باشد، یا تفسیر آنها صحیح نباشد، اقدام اصلاحی انجام دهید. مشخصات رنگ آمیزی نامناسب (مانند رنگ آمیزی کمرنگ ارگانیسم های گرم مثبت، باقی ماندن کریستال ویوله در ارگانیسم های گرم منفی، رنگ گرفتن فقط کناره های اسمیر، رسوب روی لام و غیره) ممکن است به دلیل نامناسب بودن مراحل آماده سازی نمونه، معرف ها یا روش انجام رنگ آمیزی باشد. بعضی عوامل رایج که باعث ایجاد نتایج نامناسب در رنگ آمیزی گرم می شوند، عبارتند از:

۱. استفاده از لام های شیشه ای که تمیز نباشند.
۲. اسمیری که خیلی ضخیم تهیه شده باشد.
۳. حرارت دادن زیاد اسمیر، زمانی که برای فیکس کردن از روش حرارت استفاده می شود.
۴. آبکشی زیاد در طی انجام رنگ آمیزی، به خصوص اگر اسمیر به طور صحیح فیکس نشده باشد.
۵. وجود رسوب در معرف ها

d) به علاوه، برای اطمینان از صحت تفسیر، برنامه ای برای مرور گزارش های رنگ آمیزی گرم تهیه کنید.

۱. مرور رنگ آمیزی های گرم انتخابی به وسیله سوپروایزر، برای تعیین نیازهای آموزشی و همچنین کمک به یکپارچگی اطلاعات بالینی مربوطه
۲. نتایج کشت نهایی را با گزارش های رنگ آمیزی گرم مقایسه کنید. مرفولوژی های گزارش شده در رنگ آمیزی گرم را که در کشت جدا نشده اند، بررسی کنید. همچنین زمانی که به تعداد ۴-۳ میکروارگانیسم از کشت جدا شده، اما در رنگ آمیزی گرم میکروارگانیسمی مشاهده نشده است، هم رنگ آمیزی و هم کشت را بررسی نمایید.

- توجه: تعداد قابل توجهی از ارگانیسم های تشخیص داده شده روی اسمیر، از کشت جدا می شوند. بنابراین تفاوت ها باید برای از بین بردن خطاهای ناشی از بررسی اسمیر یا به عنوان نشانه هایی برای به کارگیری سایر روش های کشت (مانند کشت بی هوازی، کشت برای قارچ یا کشت باسیل های اسید فست [AFB]) بررسی شوند.

۳. مجموعه ای از لام های مرجع برای آموزش تهیه نمایید.

۸- محدودیت ها:

a) نتایج رنگ آمیزی گرم را در ارتباط با سایر یافته های بالینی و آزمایشگاهی استفاده کنید. از روش های اضافی دیگر (مثل رنگ آمیزی های خاص، استفاده از محیط های انتخابی و غیره) برای تأیید اطلاعات بدست آمده از اسمیرهای رنگ شده گرم استفاده نمایید.

b) به کارگیری دقیق روش انجام آزمایش و معیارهای تفسیر برای کسب نتایج صحیح نیاز می باشد. صحت، ارتباط زیادی با آموزش و مهارت شخص مشاهده کننده لام دارد.

c) روش های رنگ آمیزی دیگر برای نمونه های بالینی چرکی کـه هـیچ ارگانیسـمی در روش رنـگ آمیـزی گـرم مشاهده نشده، پیشنهاد می شود.

d) مشاهده میکروارگانیسم در لام گرم برای کشت های منفی ممکن است ناشی از آلودگی معرف ها و لوازم، وجود عوامل ضد میکروبی یا عدم رشد ارگانیسم ها تحت شرایط کشت معمول (محیط کشت، اتمسفر و غیره) باشد.

e) نتایج گرم کاذب ممکن است مربوط به مقدار ناکافی نمونه یا تأخیر در ارسال آن باشد.

f) تهیـــه اســـمیر از کشـــت هـــای تـــازه (کمتـــر از ۲۴ ســـاعت) روی محـــیط هـــای غیـــر مهـــار کننـــده و نمونه های بالینی تازه، صحیح ترین نتیجه را می دهند. زمانی که مرفولوژی مهم است (مانند استرپتوکک هـا و باسیل های گرم مثبت)، کشت های مایع ارجحیت دارد.

۹- ملاحظات ایمنی:

a) ید ماده خطرناکی است. از استنشاق، خوردن و تماس آن با پوست پرهیز شود.

b) اتانول و استون قابل اشتعال می باشند.

c) برای آماده سازی اسمیر از دستکش لاتکس و سایر وسایل محافظ مناسب با احتیاطات عمومی اسـتفاده نماییـد (BSL2).

d) به کارکنان مربوطه آموزش دهید که در مورد نمونه هایی که با سرنگ ارسال می شود، قبل از ارسال، سـوزن را از روی سرنگ بردارند.

e) هنگام تهیه اسمیر، هیچگاه قطره را به شدت مخلوط نکنید، تا از ایجاد ذرات معلق در هوا (آئروسل) جلـوگیری شود.

۱۰- مراجع:

1. Clinical Microbiology Procedures Handbook, second edition update, Garcia, Lynne S. & Isenberg, Henry D., 2007