بسم الله الرحمن الرحيم

Gram Stain

دکنر سینا مباشری زاده

PhD, Medical Microbiology

مقدمه:

- اساس و پایه آزمایشگاه میکروب شناسی
- تشخیص احتمالی و سریع عوامل عفونی
- کیفیت نمونه بالینی
- طبقه بندی باکتری ها بر اساس شکل، اندازه، مورفولوژی سلول و واکنش گرم آنها

عوامل مداخله گر در کیفیت

- مدت زمان ماندگی پلیت ها
- محیط کشت
- اتمسفر انکوباسیون
- روش رنگ آمیزی
- وجود مواد مهارکننده

تهیه اسمیر

- نمونه های بالینی
- محیط مایع
- کلنی های رشد کرده روی محیط کشت جامد
- نمونه های بالینی تازه وکشت های تازه (کمتر از ۲۴ساعت) 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
- درصورت ارسال نمونه به خارج از آزمایشگاه یا محل نمونه گیری بهتر است اسمیر جهت رنگ آمیزی گرم در مبداء انجام گردد.

نمونه بالینی

بطور کلی رنگ آمیزی گرم از:

- سواب بینی، گلو، مدفوع، خلط بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس، نوک کاتتر و پروتزها ارزش بالینی ندارد.
- نمونه های زخم، جراحات چشم، مایعات استریل، آبسه ها و بافت های بدن ارزشمند است.
- نمونه از ادرار و کشت خون گاهاُ می تواند موثر باشد اما بطور روتین نیاز نیست.

کنترل کیفی

روزانه معرف ها را از نظر ظاهری بررسی کنید.

- 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 .
- 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

- به طور روزانه و زمانی که یک سری ساخت جدید استفاده می شـود، گسترشـی از سویه های زیر تهیه کنید.

- *E.coli* ATCC 25922 Gram-negative rods, pink
- *S.aureus* ATCC 25923 Gram-positive cocci, deep violet
- *S.epidermidis* ATCC 12228

- یک نمونه مایع با کدورت ضعیف از دو باکتری گرم منفی و مثبت تهیـه کـرده و دو قطـره بـا پی پت پاستور بر روی اسلاید ریخته اجازه داده تا خشک شود و سپس توسط متـانول فـیکس شده و رنگ آمیزی شود.

علل رایج کیفیت بد رنگ آمیزی گرم

- استفاده از لام های شیشه ای که قبلا تمیز یا چربی زدایی نشده اند.
- گسترش ها خیلی ضخیم تهیه شده است.

توجه: بهترین گسترش نمونه ای است که پس از تهیه و فیکس شدن بتوان حروف روزنامه را از روی آن تشخیص داد.

- حرارت دادن زیاد گسترش، زمانی که برای فیکس کردن از حرارت استفاده می شود.
- آب کشی زیاد در طی فرایند رنگ آمیزی

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

- بررسی روزانه تعدادی از رنگ های گرم توسط سوپروایزر
- مقایسه نتایج کشت نهایی با گزارش های رنگ آمیزی گرم
- گردآوری مجموعه ای از لام های مرجع برای آموزش

روش انجام آزمایش

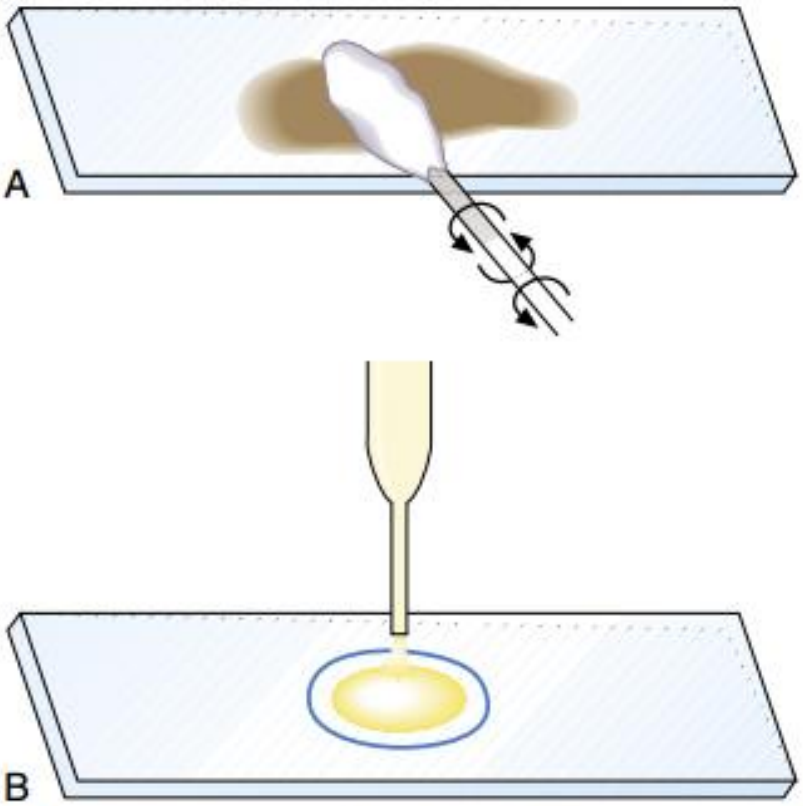
- تهیه اسمیر
- فیکس کردن اسمیر
- روش انجام رنگ آمیزی
- نتایج و تفسیر
- ثبت مشاهدات

تهیه اسمیر

- نمونه های بالینی
- کشت های مایع
- کلنی از کشت های جامد

فیکس کردن اسمیر

- حرارت
- متانول



• **Fig. 6.2** Smear preparations by swab roll (A) and pipette deposition (B) of a patient specimen on a glass slide.

روش انجام رنگ آمیزی

Table 3.2.1–1 Gram stain modifications, recommended reagents, timing, and uses

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 (3).

Activate Windows

Table 3.2.1–4 Common descriptions of bacterial Gram staining characteristics

Bacterial Gram staining characteristics	Common descriptions
Staining characteristics	Even, bipolar, beaded, stippled, barred, irregular
Predominant shapes	Round, coccoid, coccobacillary, rod, filament, yeastlike
Ends of cells[a]	Rounded, pointed, tapered, flattened, clubbed (swollen), concave
Sides	Parallel, ovoid (bulging), concave, irregular
Axis	Straight, curved, spiral
Pleomorphism[b]	Variation in shape
Relative size[c]	
Overall	Minute or tiny (<0.3 μm), small (~0.3–0.5 μm), medium, or large
Length	Short (~0.5–1 μm), medium, long, or filamentous (10–30 μm)
Width	Thin, medium, or thick
Pleomorphic	Variation in size
Characteristic arrangements	Singles, pairs, chains, tetrads, clusters, palisades, Chinese letters, packets, angular forms (V and L shapes), etc.

Table 3.2.1–5 Reporting Gram stain results[a]

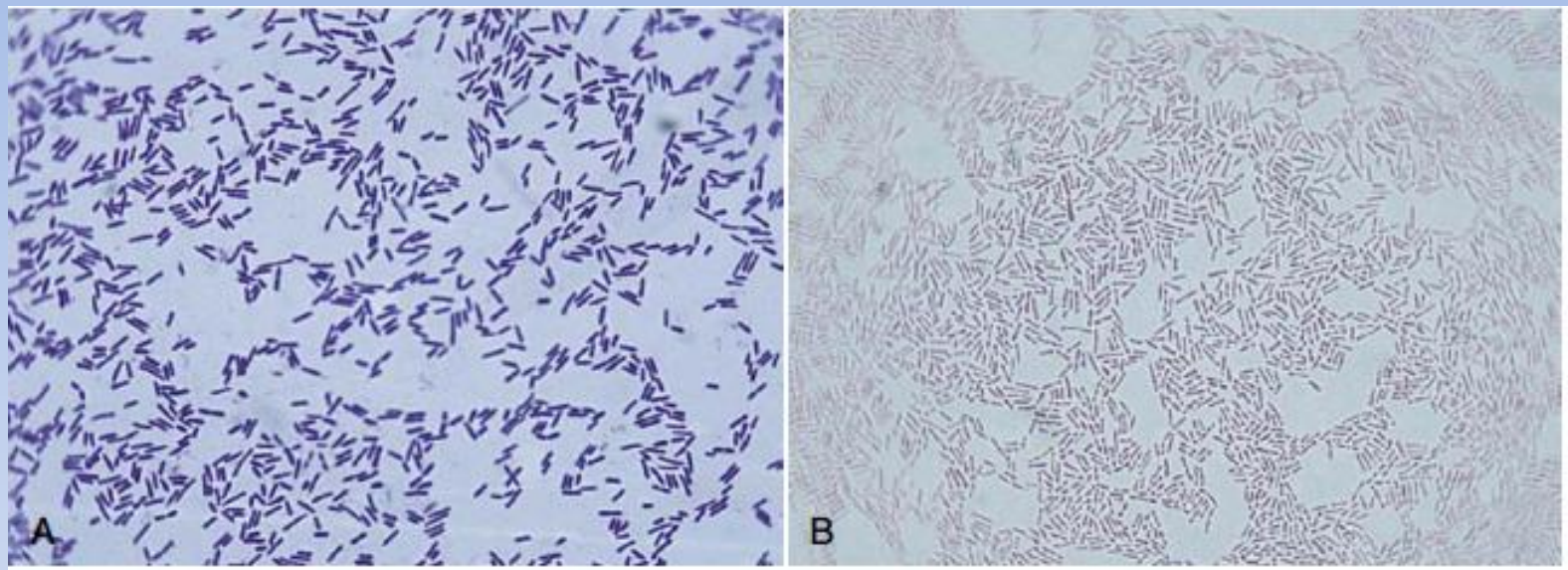
Enumeration of cells under low-power objective[b]	Description of the types of cells to report	Enumeration of bacteria under oil immersion objective[c]	Description of the morphology of bacteria[d]
Count each type of cell and report: 1+ (rare or occasional): <1/LPF 2+ (few): 1–9/LPF 3+ (moderate): 10–25/LPF 4+ (heavy): >25/LPF	ECs PMNs RBCs Host cellular material	Count bacteria and yeasts from areas associated with cells and report: 1+ (rare or occasional): <1/OIF 2+ (few): 1–5/OIF 3+ (moderate): 6–30/OIF 4+ (heavy): >30/OIF	Gram positive Cocci in pairs (and chains) Cocci in clusters Large bacilli Small bacilli Branching bacilli Coryneform bacilli Gram negative Diplococci Bacilli Bacilli, filamentous (or pleomorphic) Gram variable: coccobacilli Budding yeast cells Pseudohyphae

4. Quantitate organisms as follows:

Many	4+	10–20 per oil immersion field
Moderate	3+	6–10 per oil immersion field
Few	2+	3–5 per oil immersion field
Rare	1+	Fewer than 10 identified on complete smear
None		

5. Quantitate cells (WBCs, RBCs, and epithelial cells) as follows:

Many	4+	25 or more per low-power field
Moderate	3+	10–25 per low-power field
Few	2+	2–10 per low-power field
Rare	1+	Fewer than 2 per low-power field
None		



• **Fig. 6.3** Gram stain procedures and principles. (A) Gram-positive bacteria observed under oil immersion appear purple. (B) Gram-negative bacteria observed under oil immersion appear pink. (Modified from Atlas RM. *Principles of Microbiology*. St. Louis: Mosby; 2006.)

• **Fig. 6.7** Gram stains of direct smears can reveal infectious etiologies other than bacteria, such as the yeast *Candida tropicalis*.

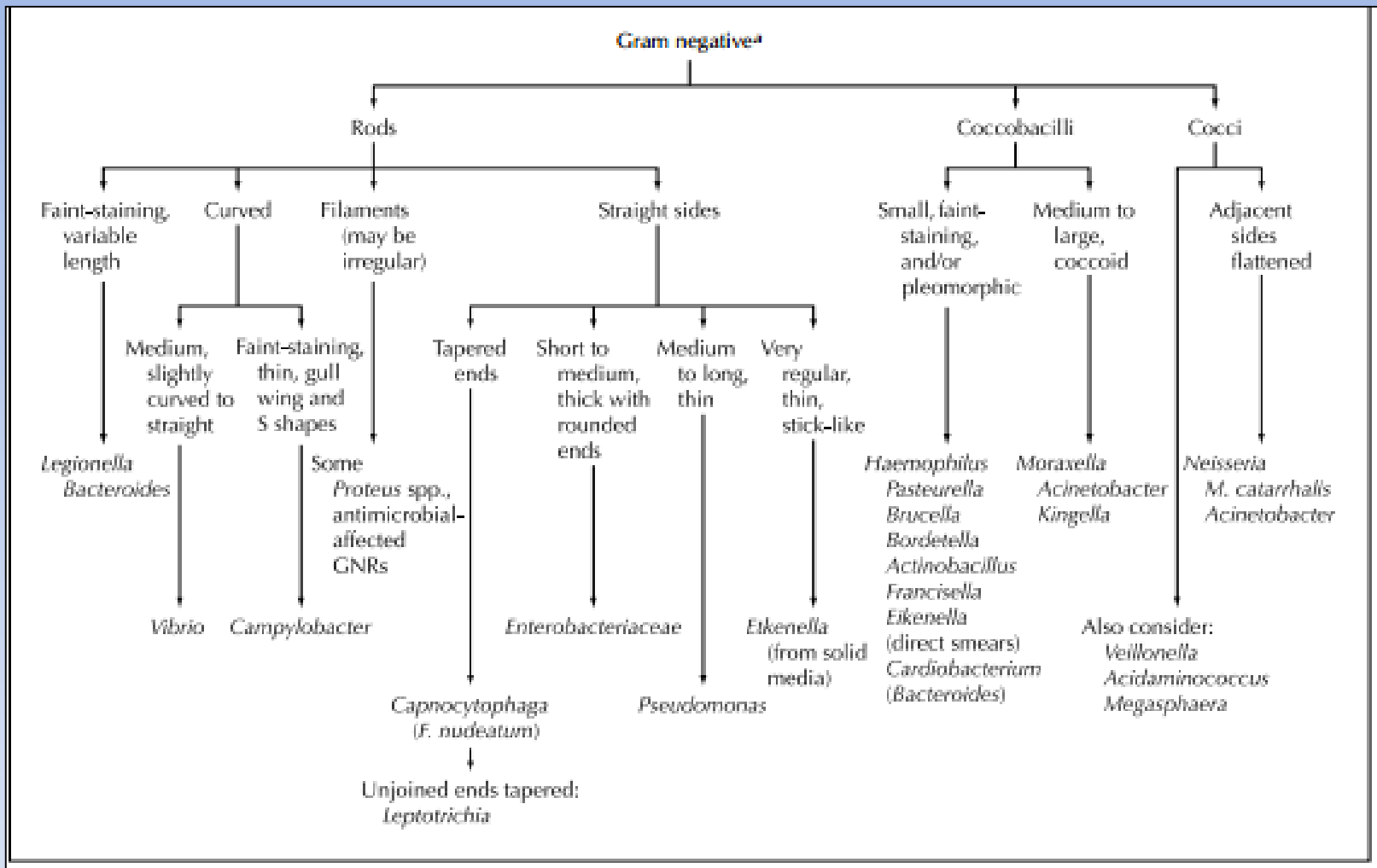


Figure 3.2.1–4 Typical Gram stain morphologies of Gram-negative genera.

Catalase

هدف :

– تشخیص استافیلوکوک و میکروکوک کاتالاز مثبت از استرپتوکوک کاتالاز منفی

افتراق کلستریدیوم از باسیلوس ها کاتالاز مثبت

افتراق لیستریا مونوسیتوژنز کاتالاز مثبت از استرپتوکوک بتاهمولیتیک

کشت ۱۸–۲۴ساعته از ارگانیسم مورد نظر

پراکسید هیدروژن ۳٪ این ماده باید در شیشه های قهوه ای یا تیره رنگ ودر یخچـال نگهـداری شود

اپلیکاتور چوبی یا شیشه ای یا لوپ پلاتینی

لام شیشه ای

مراحل انجام کار:

با یک اپلیکاتور چوبی از مرکز یک کلنی به سطح لام شیشه ای منتقل کنید.

یک قطره H2O2 را بلافاصله به کلنی روی لام اضافه کنید و ا یجـاد حبـاب روی لام را بررسـی نمایید. نتیجه را به صورت مثبت یا منفی گزارش کنید.

ایجاد حباب های سریع و ماندگار با حالت جوش زدن) کف نشانگر مثبت بودن تست است.

QC:

پراکسید هیدورژن باید هر روز یا قبل از تست نمودن باکتری مجهول با سوش هـای کنتـرل مثبـت و منفـی تست شود.

Staphylococcus aureus : سوش کنترل مثبت

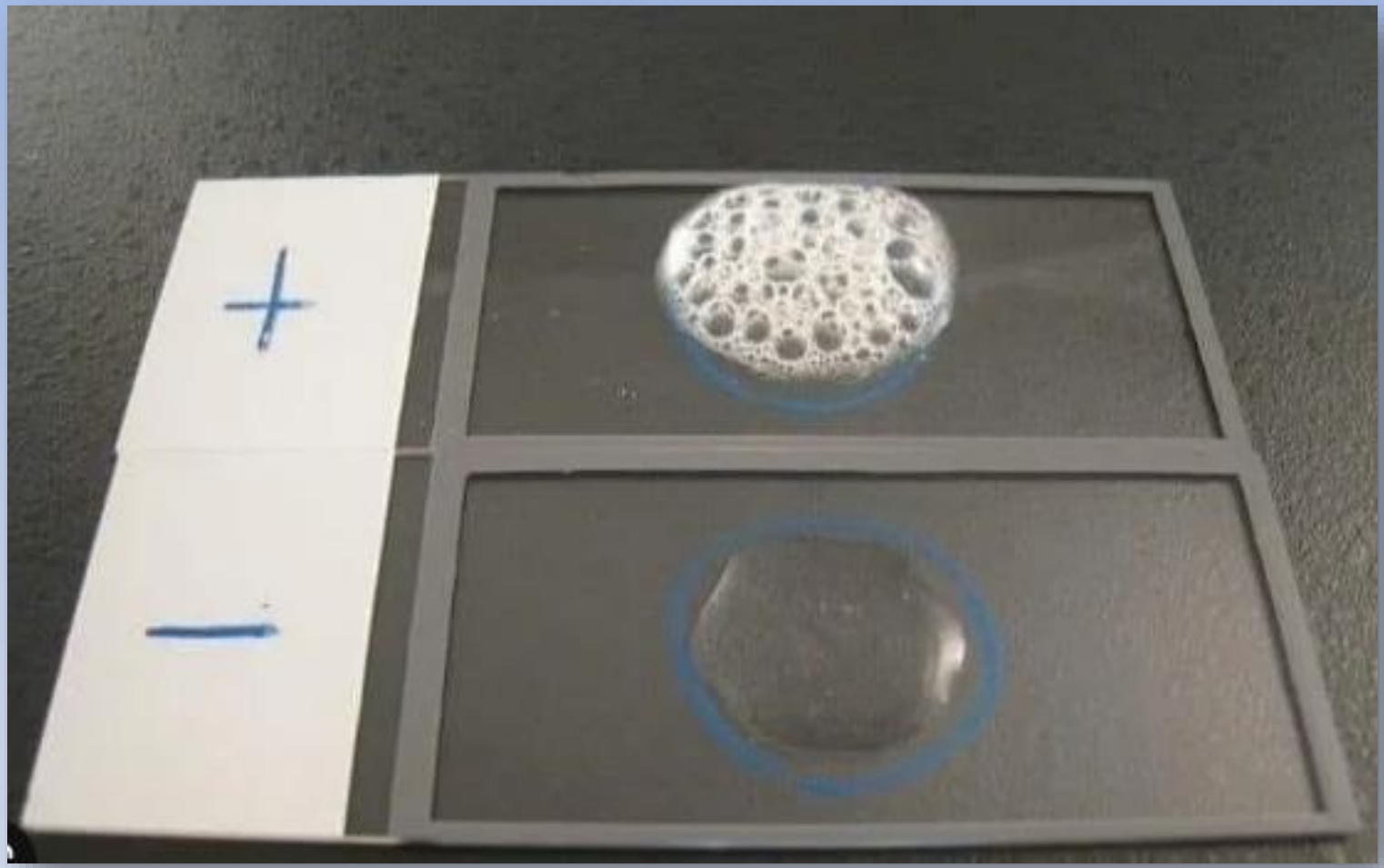
Streptococcus pyogenes : سوش کنترل منفی

تداخلات :

جهت تست کاتالاز باید از روی محیطی کلنی برداشته شود که فاقد خون باشد. زیرا گلبول های قرمز واکنش کاتالاز مثبت ضعیف ایجاد می کنند. اما از آنجائی که اکثر نمونه های کلینیکی روی محیط های خون دار کشت داده می شوند، برای انجام تست میتوان نمونه را از قله کلنی ها بدون تماس با محیط برداشت تا واکنش مثبت کاذب ایجاد نشود.

بهتر است از یک اپلیکاتور چوبی برای برداشتن کلنی استفاده شود. استفاده از لوپ آهنی واکنش مثبت کاذب ایجاد می کند.

از آنجائی که بعضی از باکتری ها دارای آنزیم هایی غیر از کاتالاز هستند که موجب تجزیه پراکسید هیدروژن می شود، ایجاد حباب های ریز به تعداد کم، بعد از ۲۰ – ۳۰ثانیه به معنی واکنش مثبت نمی باشد.



Oxidase

- جداسازی انتروباکتریاسه ها که همه اکسیداز منفی هستند از باکتری هایی مثل:
- ویبریوناسه
- آئروموناس
- سودوموناس
- نیسریا
- کمپیلوباکتر
- پاستورلا

- کشت ۱۸-۲۴ساعته از ارگانیسم مورد نظر از محیط های کشت مناسب
- محلول ۱٪ تترامتیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید در آب مقطر استریل یا دیسک تجاری آماده اکسیداز

مراحل انجام کار

- **الف ـ روش مستقیم روی پلیت:**

دو تا سه قطره از معرف تازه تهیه شده را مستقیماً روی کلنی های باکتری بر روی پلیت اضافه می کنیم.

کلنی های باکتری های اکسیداز مثبت بلافاصله به رنگ بنفش تغییر رنگ می دهند.

ب-روش غیر مستقیم:

- از پودر معرف ، محلول ۱٪در آب مقطر تهیه کنید و ۱۰ mlاز محلول را در مقادیر ۱ mlتقسیم کرده در برودت –۲۰درجه در فریزر نگهداری نمایید.
- موقع مصرف یک ویال از فریزر خارج کرده ، پس از ذوب شدن ، به تعداد مورد نیاز کاغذ صافی را به معرف آغشته کرده در پلیت تمیز قرار دهید. البته می توان ازدیسک های آماده تجاری نیز استفاده نمود .
- مقداری از کلنی باکتری را روی کاغذ حاوی معرف می کشیم. توصیه می شود که از مشتق تترامتیل پارافنیلن دی آمین بجای مشتقات دی متیل استفاده شود، زیرا این معرف برای ذخیره کردن پایدارتر و برای تعیین سیتوکروم اکسیداز حساس تر است و نسبت به مشتق دی متیل، کمتر سمی می باشد.

در باکتری های اکسیداز مثبت در محل تلقیح کلنی در عرض ۱۰ثانیه رنگ آبی تیره مایل به بنفش ایجاد می شود زمان بسیار مهم است. اما باکتری های اکسیداز منفی در عرض ۱۰ثانیه بیرنگ باقی می مانند.

باکتری هایی که در مدت ۱۰– ۶۰ثانیه رنگ بنفش ایجاد می کنند، نیاز به انجام تست های بیشتری دارند، زیرا احتمالاً متعلق به خانواده آنتروباکتریاسه نمی باشند.

QC:

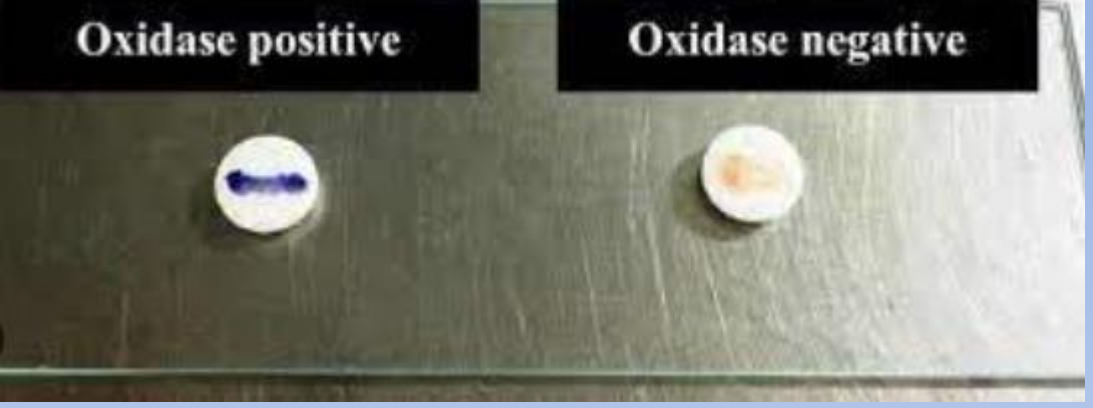
کنترل کیفی باید برای هر سری جدید و هر زمان که این تست انجام می شود، صورت گیرد.

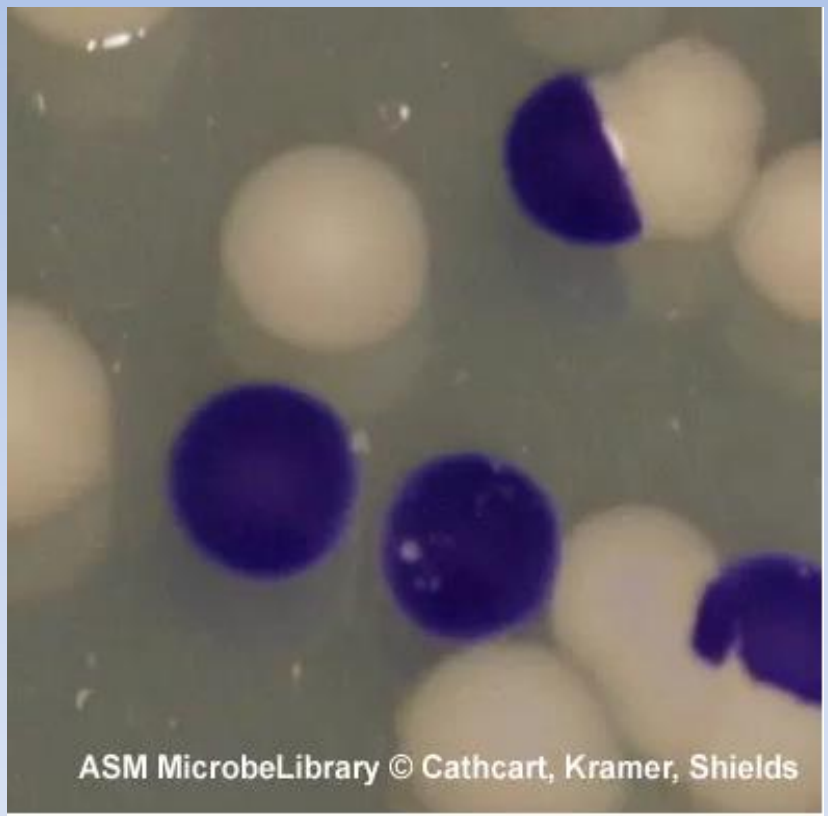
Pseudomonas aeruginosa : Pos

E.coli: Neg

ایمنی

بدلیل ایجاد تحریک ، از تماس معرف با پوست و چشم خودداری نمایید . در صورت تماس اتفاقی پوست یا چشم را با مقادیر زیادی آب حداقل به مدت ۱۵دقیقه شستشو دهید





Oxidase-positive V*ibrio cholerae* showing purple colonies, and oxidase-negative E*scherichia coli* with lack of color change

تداخلات:

- نباید از کشت کهنه بیشتر از ۲۴ساعت استفاده شود.
- محلول ۱٪اکسیداز باید بصورت تازه و روزانه تهیه شود مگر اینکه محلول ساخته شده در فریزر نگهداری گردد.
- نباید از محیط های کشت رنگی مثل مک کانکی استفاده شود زیرا نتیجه مثبت کاذب می دهد.
- برای انتقال باکتری روی کاغذ صافی یا دیسک اکسیداز نباید از لوپ فلزی مثل استیل یا نیکروم استفاده شود، زیرا بر اثر سوزاندن لوپ، مقدار کمی اکسید آهن بر روی آن ایجاد می شود، که ممکن است نتیجه مثبت کاذب دهد

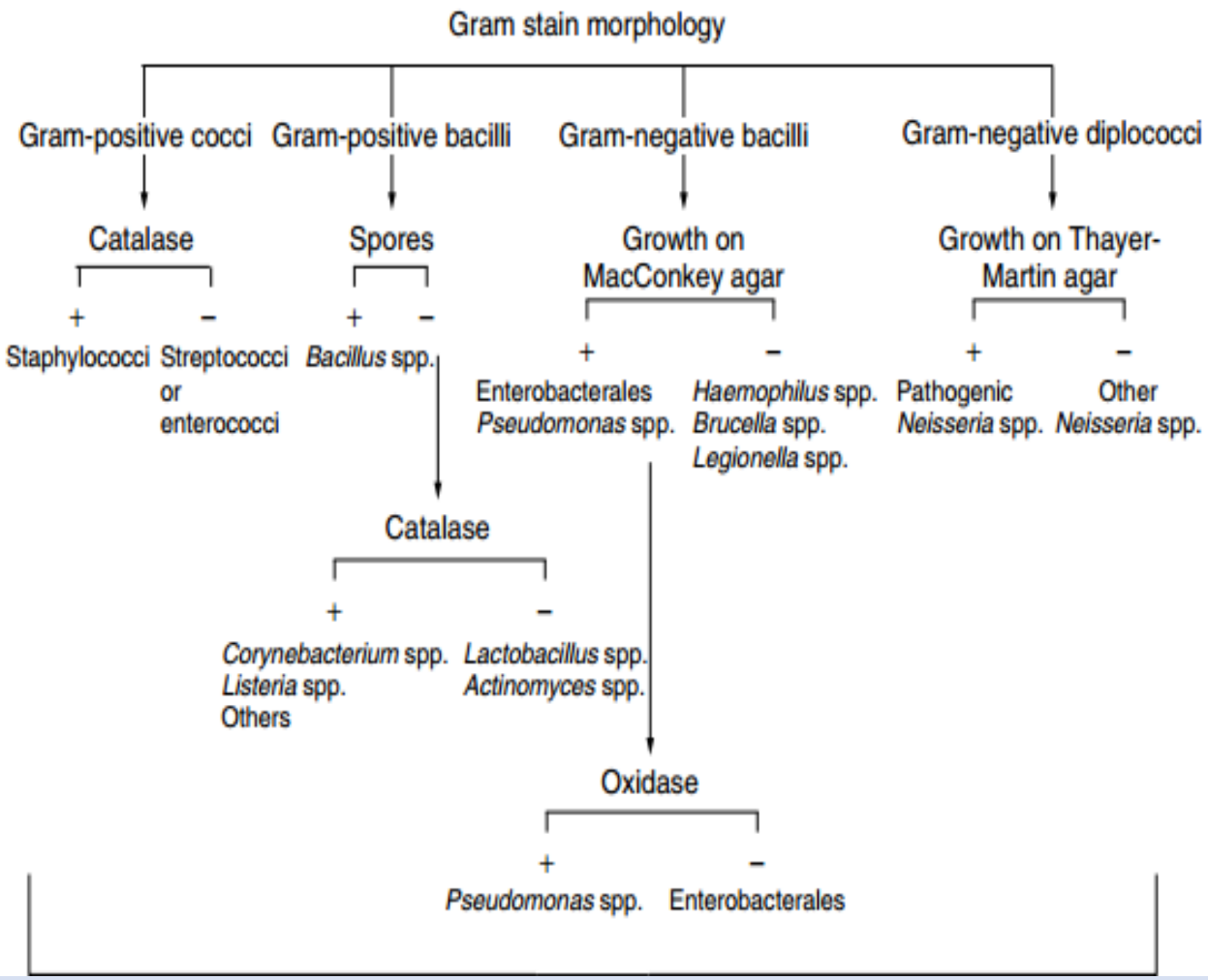

Gram stain morphology
Gram-positive cocci
Gram-positive bacilli
Gram-negative bacilli
Gram-negative diplococci
Catalase
Spores
Growth on MacConkey agar
Growth on Thayer-Martin agar
+
–
Staphylococci
Streptococci or enterococci
Bacillus spp.
Enterobacterales
Pseudomonas spp.
Haemophilus spp.
Brucella spp.
Legionella spp.
Pathogenic Neisseria spp.
Other Neisseria spp.
Catalase
Corynebacterium spp.
Listeria spp.
Others
Lactobacillus spp.
Actinomyces spp.
Oxidase
Pseudomonas spp.
Enterobacterales

Table 4C. Disk Diffusion Reference Guide to QC Frequency

This table summarizes the suggested QC frequency when modifications are made to antimicrobial susceptibility test systems (refer to CLSI document EP23™[1]). It applies only to antimicrobial agents for which satisfactory results have been obtained with either the 15-replicate (3- × 5-day) plan or 20 or 30 consecutive test day plan. Otherwise QC is required each test day.

Test Modification	Recommended QC Frequency			Comments
	1 Day	5 Days	15-Replicate Plan or 20- or 30-Day Plan	
Disks				
Use new shipment or lot number.	X			
Use new manufacturer.	X			
Addition of new antimicrobial agent to existing system.			X	In addition, perform in-house verification studies.
Media (prepared agar plates)				
Use new shipment or lot number.	X			
Use new manufacturer.		X		
Inoculum preparation				
Convert inoculum preparation/ standardization to use of a device that has its own QC protocol.		X		**Example:** Convert from visual adjustment of turbidity to use of a photometric device for which a QC procedure is provided.
Convert inoculum preparation/ standardization to a method that depends on user technique.			X	**Example:** Convert from visual adjustment of turbidity to another method that is not based on a photometric device.

Measuring zones				
Change method of measuring zones.			X	**Example:** Convert from manual zone measurements to automated zone reader. In addition, perform in-house verification studies.
Instrument/software (eg, automated zone reader)				
Software update that affects AST results		X		Monitor all drugs, not just those implicated in software modification.
Repair of instrument that affects AST results	X			Depending on extent of repair (eg, critical component such as the photographic device), additional testing may be appropriate (eg, 5 days).

توجه 1: QCرا میتوان قبل از آزمایش یا همزمان با آزمایش بر روی ایزوله های بیماران انجام داد. اگر نتایج QCدر حد قابل قبول باشد، نتایج بیماران را میتوان برای آن روز گزارش کرد.

توجه ۲:آزمایش های کنترل کیفی برای موادی که به صورت تجاری و یا به صورت دستی تهیه می شوند، به ترتیب باید بر اساس پروتکل شرکت مربوطه یا پروتکل های داخلی باشد.

توجه ۳:آب، سرم فیزیولوژی و یا محیط کشت مایع جهت آماده سازی مایه تلقیحی، نیاز به کنترل کیفی روتین ندارد

موقعیت	ارگانیسم	عوامل ضدمیکروبی
"هشدار": مجموعه‌های ارگانیسم/عامل ضدمیکروبی زیر، ممکن است در شرایط برون‌تنی فعال به‌نظر برسند، اما اثربخشی بالینی نداشته و نباید به‌عنوان حساس گزارش شوند.		
جدول 2A	گونه‌های *سالمونلا* گونه‌های *شیگلا*	نسل اول و دوم سفالوسپورین‌ها، سفامایسین‌ها، آمینوگلیکوزیدها
جدول 2D	گونه‌های *انتروکک*	آمینوگلیکوزیدها (به‌جز آزمایش تعیین مقاومت به سطح بالای آنها)، سفالوسپورین‌ها، کلیندامایسین و تری‌متوپریم–سولفامتوکسازول
"هشدار": عوامل ضدمیکروبی ذکر شده در قسمت پایین نباید به‌صورت روتین برای سویه‌های جدا شده از CSF گزارش شوند. این عوامل ضدمیکروبی، درمان انتخابی نبوده و ممکن است در درمان عفونت‌های CSF ناشی از این ارگانیسم‌ها مؤثر نباشند (منظور از این ارگانیسم‌ها باکتری‌های موجود در جدول 2A تا 2J است)		
جداول 2A تا 2J	باکتری‌های جدا شده از CSF	عوامل ضدمیکروبی که فقط به‌صورت خوراکی تجویز می‌شوند، سفالوسپورین‌های نسل اول و دوم، سفامایسین، کلیندامایسین، ماکرولیدها، تتراسایکلین‌ها و فلوروکینولون‌ها

"هشدار": عوامل ضدمیکروبی زیر نباید به طور روتین برای باکتریهای جدا شده از CSFگزارش گردند. در عفونتهای CSF این عوامل ضدمیکروبی داروهای انتخابی نیستند و ممکن است در درمان عفونتهای ناشی از این ارگانیسم ها مؤثر نباشند.

عوامل صرفاً خوراکی

سفالوسپورینهای نسل اول و دوم و سفامایسینها

کلینداماسین

ماکرولیدها

تتراسایکلینها

فلوروکینولونها

Table 1A. Suggested Groupings of Antimicrobial Agents Approved by the US Food and Drug Administration for Clinical Use That Should Be Considered for Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Microbiology Laboratories in the United States

Group A: Includes antimicrobial agents considered appropriate for inclusion in a routine, primary testing panel, as well as for routine reporting of results for the specific organism group.			
Enterobacterales	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus* spp.	*Enterococcus* spp.[a]
Ampicillin[b]	Ceftazidime	Azithromycin[c] or clarithromycin[c] or erythromycin[c]	Ampicillin[d]
Cefazolin[f]	Gentamicin Tobramycin		Penicillin[e]
Gentamicin[b] Tobramycin[b]	Piperacillin-tazobactam	Clindamycin[c]	
		Oxacillin[g,h,i,j,k] Cefoxitin[g,h,j] (surrogate test for oxacillin)	
		Penicillin[g]	
		Trimethoprim-sulfamethoxazole	
Group B: Includes antimicrobial agents that may warrant primary testing but may be reported only selectively, such as when the organism is resistant to agents of the same antimicrobial class in Group A.[l]			
Amikacin[b]	Amikacin	Ceftaroline[m]	Daptomycin[l,n]
Amoxicillin-clavulanate Ampicillin-sulbactam	Aztreonam	Daptomycin[l,n]	Linezolid Tedizolid[o]
Azithromycin[p]			
Ceftazidime-avibactam	Cefepime	Linezolid Tedizolid[m]	Vancomycin
Ceftolozane-tazobactam	Ceftazidime-avibactam		
Imipenem-relebactam	Imipenem-relebactam		
Meropenem-vaborbactam	Ceftolozane-tazobactam		
Piperacillin-tazobactam			
Cefuroxime	Ciprofloxacin Levofloxacin	Doxycycline Minocycline[c] Tetracycline[q]	
Cefepime	Doripenem Imipenem Meropenem	Lefamulin[m]	
Cefotetan Cefoxitin		Vancomycin[l]	
Cefotaxime[b,f] or Ceftriaxone[b,f]			
Cefiderocol	**Cefiderocol**		
Ciprofloxacin[b] Levofloxacin[b]		Rifampin[r]	
Doripenem Ertapenem Imipenem Meropenem			
Trimethoprim-sulfamethoxazole[b]			

Table 1A. (Continued)

Group C: Includes alternative or supplemental antimicrobial agents that may require testing in institutions that harbor endemic or epidemic strains resistant to several of the primary drugs, for treatment of patients allergic to primary drugs, for treatment of unusual organisms, or for reporting to infection prevention as an epidemiological aid.			
Enterobacterales	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus* spp.	*Enterococcus* spp.[a]
Aztreonam Ceftazidime		Chloramphenicol[c]	Gentamicin (high-level resistance testing only)
Ceftaroline		Ciprofloxacin or levofloxacin Moxifloxacin	Streptomycin (high-level resistance testing only)
Chloramphenicol[b,c]			
Tetracycline[q]			Dalbavancin[i,s]
		Gentamicin[t]	Oritavancin[i,s]
		Dalbavancin[i,m]	Telavancin[i,s]
		Oritavancin[i,m]	
		Telavancin[i,m]	
Group U: Includes antimicrobial agents that are used only or primarily for treating UTIs.			
Cefazolin (surrogate test for uncomplicated UTI)[u]		Nitrofurantoin	Ciprofloxacin Levofloxacin
Fosfomycin[v]		Sulfisoxazole	
Nitrofurantoin		Trimethoprim	Fosfomycin[v]
Sulfisoxazole			Nitrofurantoin
Trimethoprim			Tetracycline[q]