دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

# آزمایشگاه میکروب ۲

## رنگ آمیزی اسید فاست

تهیه کننده : سهیلا عباسی

# زمینه ی نظری

- باسیل‌های اسید فاست، باسیل‌هایی صاف یا خمیده هستند که به علت داشتن مقادیر زیاد موم و چربی در دیواره خود به سختی رنگ آمیزی می‌شوند و پس از رنگ آمیزی در برابر رنگ زدایی به وسیله اسیدهای معدنی (اسیدسولفوریک ۲۵-۲۰ درصد) و الکل مقاومت نموده و رنگ خود را از دست نمی‌دهند به همین جهت آن‌ها را به نام باسیل‌های اسید فاست (مقاوم به اسید) نامیده‌اند.

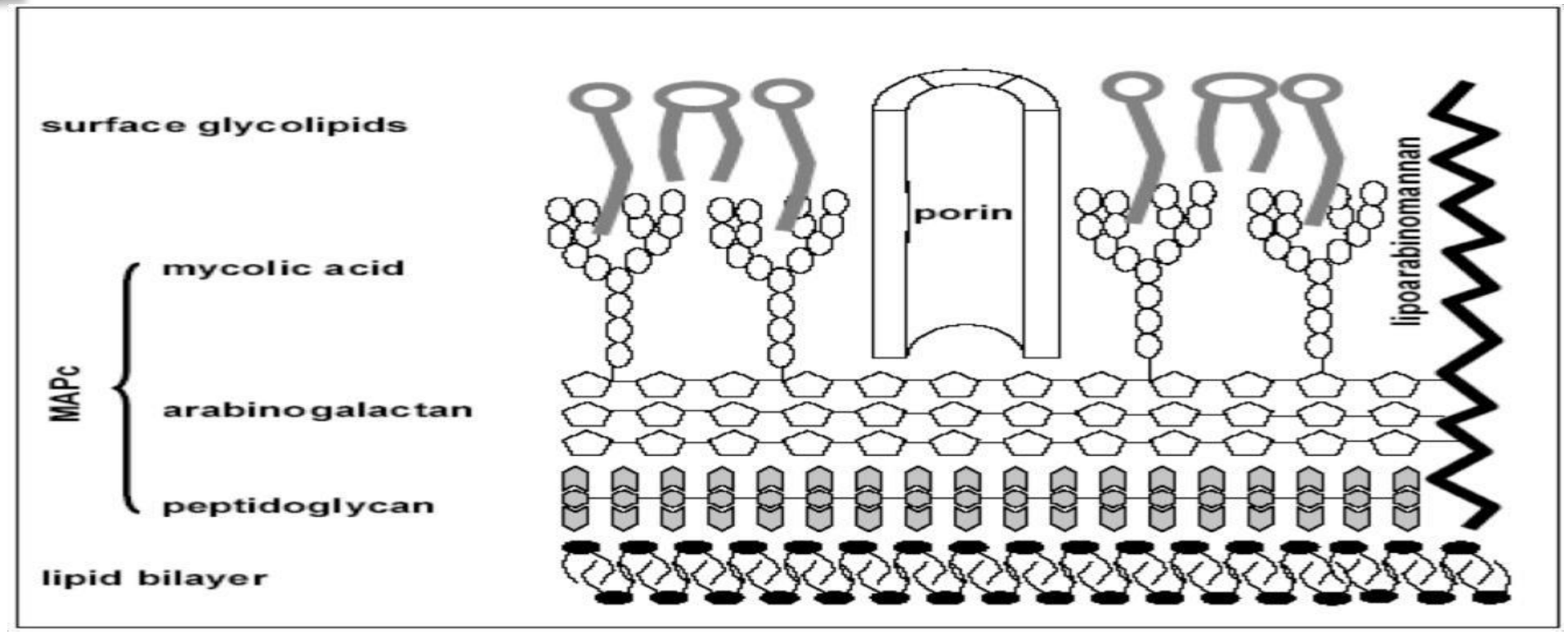
- مایکوباکتریوم‌ها اعضای اصلی این گروه هستند. که از بسیاری جهات با کورینه باکتری‌ها، نوکاردیا و رودوکوکوس شباهت دارند و در مجموع می‌توان آن‌ها را در یک گروه به نام CMNR قرار داد. که هریک از این حروف از اول نام این چهار جنس گرفته شده است.

- اسید فاست بمعنای مقاومت در مقابل رنگ بری با یک رنگ بر اسیدی می باشد. این خاصیت در باکتریها بسیار نادر است و فقط باکتریهای جنس مایکوباکتریوم و بعضی گونه های جنس نوکاردیا، اسید فاست هستند.

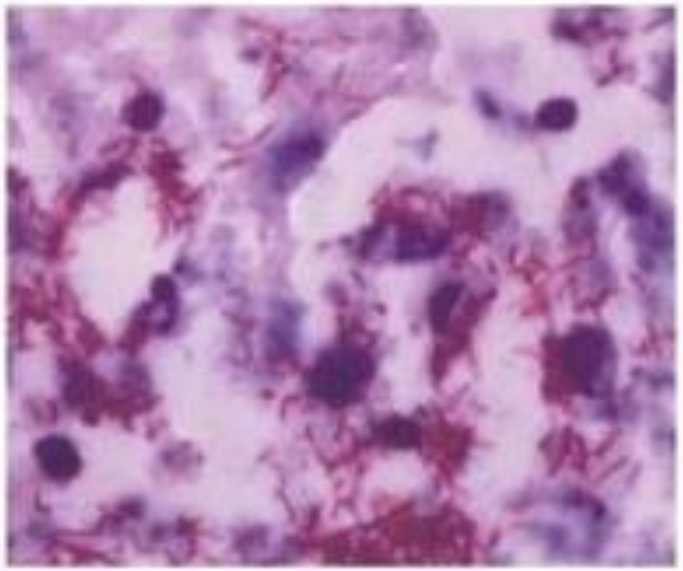
- بطور کلی در دیواره سلولی باکتریهای اسید فاست مقدار چربی بسیار زیاد است (خصوصا در مایکوباکتریومها) و آنها مقادیر نسبتا زیادی مواد چربی ، مثل اسیدهای چرب ، مومها و چربیهای پیچیده دارند. دیواره سلولی این ارگانیسمها شبیه موم بوده بنابراین نسبتا غیر قابل نفوذ هستند. این نفوذ ناپذیری در برابر مواد ضد عفونی کننده هم به این باکتریها مقاومت بیش از حدی می دهد. همچنین آنها را در برابر خشک شدن مقاوم می کند و برای مدتهای طولانی می توانند در خلط یا دیگر مایعات خشک شده بدن باقی بمانند. ولی باسیل سل توسط پاستوریزاسیون و سترون سازی عادی توسط حرارت با آسانی از بین می رود.

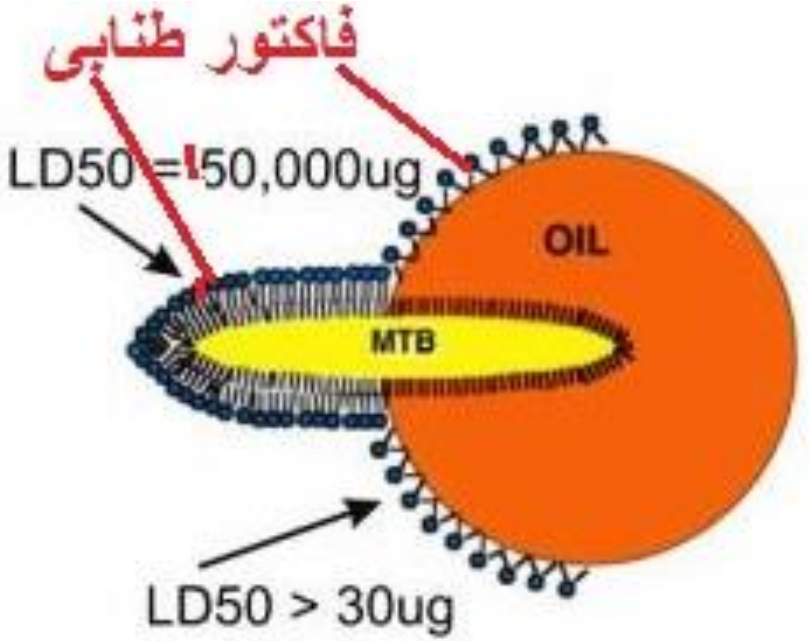
- پتیدوگلیکان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با باکتریهای دیگر از چند جهت متفاوت است.
- ۱- به جای N استیل مورامیک اسید دارای N گلیکولیل مورامیک اسید است.
- ۲- بر روی گلوتامات دارای ریشه‌های آمیدی است. ( دارای آمیدات گلوتامات است)
- ۳- پل‌های عرضی هم از نوع ۳ به ۳ و هم از نوع ۳ به ۴ است.
- ۴- بخشی از پپتیدوگلیکان این ارگانیسم به نام مورامیل دی پپتید شامل N گلیکولیل مورامیک اسید به علاوه N استیل گلوکز آمین و دو اسیدآمینه‌ی اول از زنجیره تتراپپتیدی ( L آلانین و D گلوتامیک اسید) یک ادجوانت است.

5


surface glycolipids
MAPc
mycolic acid
arabinogalactan
peptidoglycan
lipid bilayer
porin
lipoarabinomannan

- دیواره این باکتری غنی از چربی است. که ویژگی‌های زیر را به باکتری می‌دهد:
- ۱- تسهیل زندگی درون سلولی به واسطه تسهیل ورود به ماکروفاژ (مایکوباکتریوم درون سلولی اختیاری است)
- ۲- مقاومت به آنتی بیوتیک های رایج
- ۳- در کاهش جذب مواد غذایی و رشد کند باکتری نقش دارد. زمان تقسیم این ارگانیسم ۲۰- ۱۵ ساعت می‌باشد. به دلیل کندی و فعالیت اندک RNA پلی مراز کلنی در عرض ۲۱ روز ظاهر می‌شود.
- ۴- مقاومت به عوامل نامساعد محیطی.
- ۵- اسید فاست بودن ( مقاومت به رنگ بری به وسیله اسیدالکل که به واسطه مایکولیک اسید که یک نوع چربی است اتفاق می‌افتد).




فاکتور طنابی
LD50 =!50,000ug
OIL
MTB
LD50 > 30ug

# رنگ آمیزی اسید فاست

- این تکنیک اولین بار توسط Dr.Franz Zeehl و Dr.Friedrich Neelsen ابداع شد. واژه اسید فاست به معنی مقاومت در مقابل رنگ بری با یک رنگ بر قوی اسیدی می باشد. این خاصیت در باکتری های جنس میکوباکتریوم و نوکاردیا و تک یاخته کریپتوسپوردیوم وجود دارد.

- دراین رنگ آمیزی بخاطر وجود دیواره سلولی نفوذ ناپذیر مومی ، برای نفوذ دادن رنگ اولیه که کربول فوشین می باشد انجام اقدامات ویزه ای ضروری میباشد. رنگ اولیه همراه با فنل ۵٪ مایع (اسید کربولیک) تهیه می شود تا نفوذ با یاخته تشدید شود. حرارت هم بعنوان یک عامل نفوذ دهنده در اینجا بکار می رود. همین که رنگ به دیواره سلولی نفوذ کرد ، سلول باکتری بخاطر خاصیت اسید فاست بودن، علی رغم بکار بردن رنگ برهای قوی رنگ خود را حفظ می کند.
- سلولها اسید فاست رنگ اولیه را حفظ می کنند و در زیر میکروسکوپ برنگ قرمز دیده می شوند. در صورتیکه میکروبهای غیر اسید فاست رنگ ثانویه را جذب کرده و به رنگ آبی در می آیند.

- روش دیگر برای مشاهده میکوباکتریوم ها استفاده از رنگ اورامین و رودامین است، با این روش باکتری ها رنگ فلورسنت را جذب کرده و با اسید آن را از دست نمی دهند. مطالعه اسلایدها با بزرگنمایی ۴۰ Xمیکروسکوپ صورت می گیرد و باکتری ها به صورت نقاط نورانی در یک زمینه سیاه دیده می شوند.
- در این روش مدت زمان کمتری برای مطالعه اسلاید صرف می شود، در مقابل نیاز به میکروسکوپ فلورسنت دارد و واکنش های مثبت کاذب به دلیل رسوب رنگ یا رنگ گرفتن ترکیبات خاص با رنگ فلورسنت مشاهده می شود.

- تکنیک رنگ آمیزی اسید فاست در باکتری به منظور تشخیص گونه های بیماری زا

- تکنیک رنک آمیزی اسید فاست، یکی از مهمترین روش های تشخیصی میکوباکتریوم توبرکلوزیس از میکوباکتریوم لپره محسوب می شود. علاوه بر این، با استفاده از رنگ آمیزی اسید فاست می توان اکتینومیست های جنس نوکاردیا از جمله؛ نوکاردیا استروئیدس و نوکاردیا برازیلنسیس را که به عنوان عوامل نوکاردیوزیس ریوی مطرح هستند، شناسایی کرد. هچنین تک یاخته انگلی کریپتوسپوریدیوم که عامل عفونت گوارشی و اسهال در انسان می باشد، با این روش قابل شناسایی است.

- مایکوباکتریوم ها باسیل های بدون حرکت و بدون اسپور می باشند که در دیواره سلولی خود علاوه بر پپتید و گلیکان مقادیر زیادی **گلیکولیپید** بویژه **اسید میکولیک** دارند، بطوریکه ۶۰ درصد دیواره سلولی باکتری را اسید میکولیک تشکیل میدهد.

- دیواره سلولی این باکتری ها شبیه موم بوده و نسبتا غیر قابل نفوذ است.

- اسید میکولیک و سایر گلیکولیپید ها نفوذ مواد شیمیایی مورد نیاز برای رشد باکتری را آهسته می کند، همچنین باکتری را در مقابل عوامل شیمیایی باکتری کش و ترکیبات لیزوزومی محافظت می کنند. حتی این باکتری ها را در مقابل خشکی مقاوم می سازد. با این وجود **باسیل سل** توسط پاستوریزاسیون و سترون سازی عادی توسط حرارت به آسانی از بین می رود.مایکوباتریوم ها به شدت هوازی هستند و رشد بسیار آهسته ای دارند. زمان دو برابر شدن باکتری ۲۰-۱۵ ساعت است.

# مواد و وسایل

- ۱- تشتک رنگ آمیزی
- ۲- لوپ
- ۳- واکسن BCG
- ۴- کشت تازه استافیلوکوکوس‌آرئوس
- ۵- رنگ فوشین
- ۶- متیلن بلو
- ۷- پنبه
- ۸- الکل

# شرح آزمایش

- از روش رنگ آمیزی ذیل نلسون استفاده می‌شود. رنگ اولیه کربول فوشین بازی به علاوه‌ی الکل، آب و فنل است و رنگ زمینه بلودومتیلن است.

- به طور معمول جهت رنگ آمیزی از آمپول واکسن ب- ث- ژ استفاده می-شود.

# شرح آزمایش

- ۱- ابتدا واکسن را آماده کرده و یک قطره از آن را روی لام پهن می کنیم.
- ۲- روی همان قطره نمونه‌ای که روی لام وجود دارد، مقداری باکتری استاف آرئوس می‌گذاریم و به خوبی مخلوط می‌کنیم و بعد از خشک شدن آن را فیکس می‌کنیم.

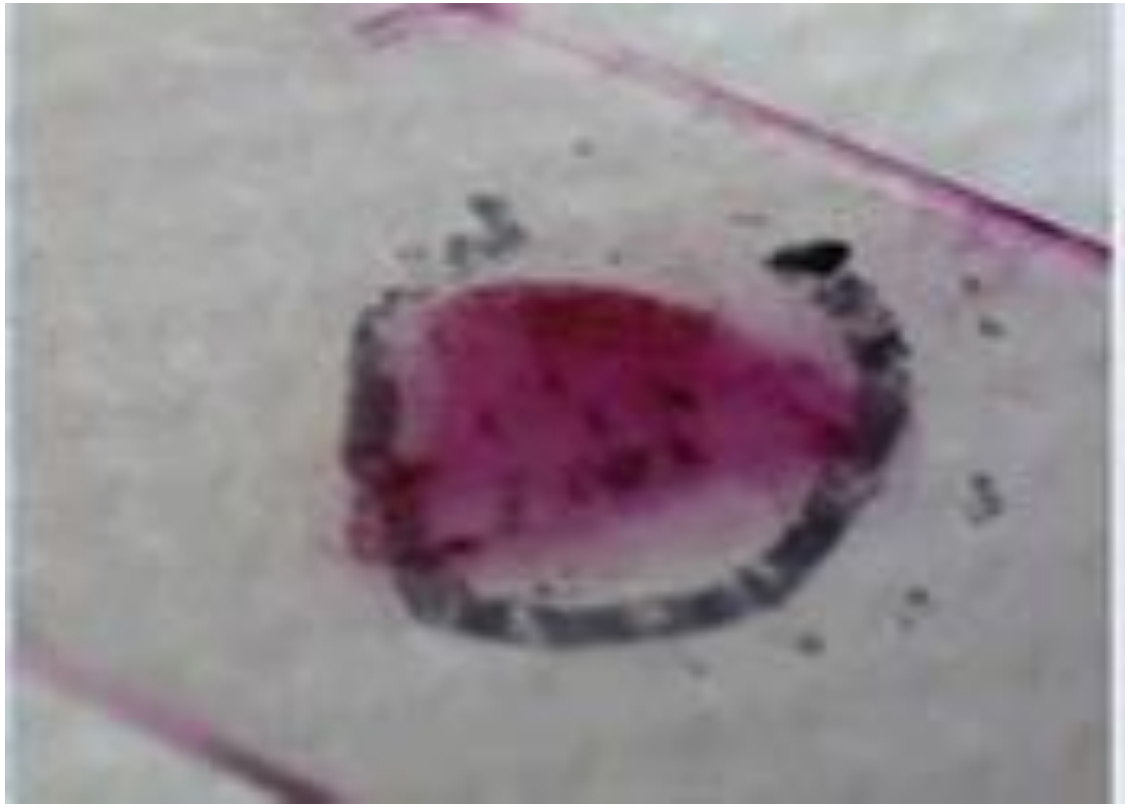
بعد از طی کردن مراحل تثبیت با حرارت سطح لام را با رنگ کربول فوشین آغشته کنید.

لام را حرارت دهید تا رنگ تبخیر شود(شعله را وارونه کنید و از زیر رنگ بطور مکرر عبور دهید ) با شروع تبخیر رنگ از روی لام دوباره شعله را از روی رنگ عبور دهید و بعد آنرا دور کنید و اجازه ندهید رنگ بجوشد یا گستره خشک شود. به موازات تبخیر رنگ از روی لام، کربول فوشین بیشتری به آن اضافه کنید. این عمل باید ۵ دقیقه ادامه یابد

- اگر از متد کربول- فوشین استفاده کنیم نیازی به حرارت نمی‌باشد. زیرا غلظت رنگ بیشتر است.

- لام را با آب شستشو می‌دهیم.

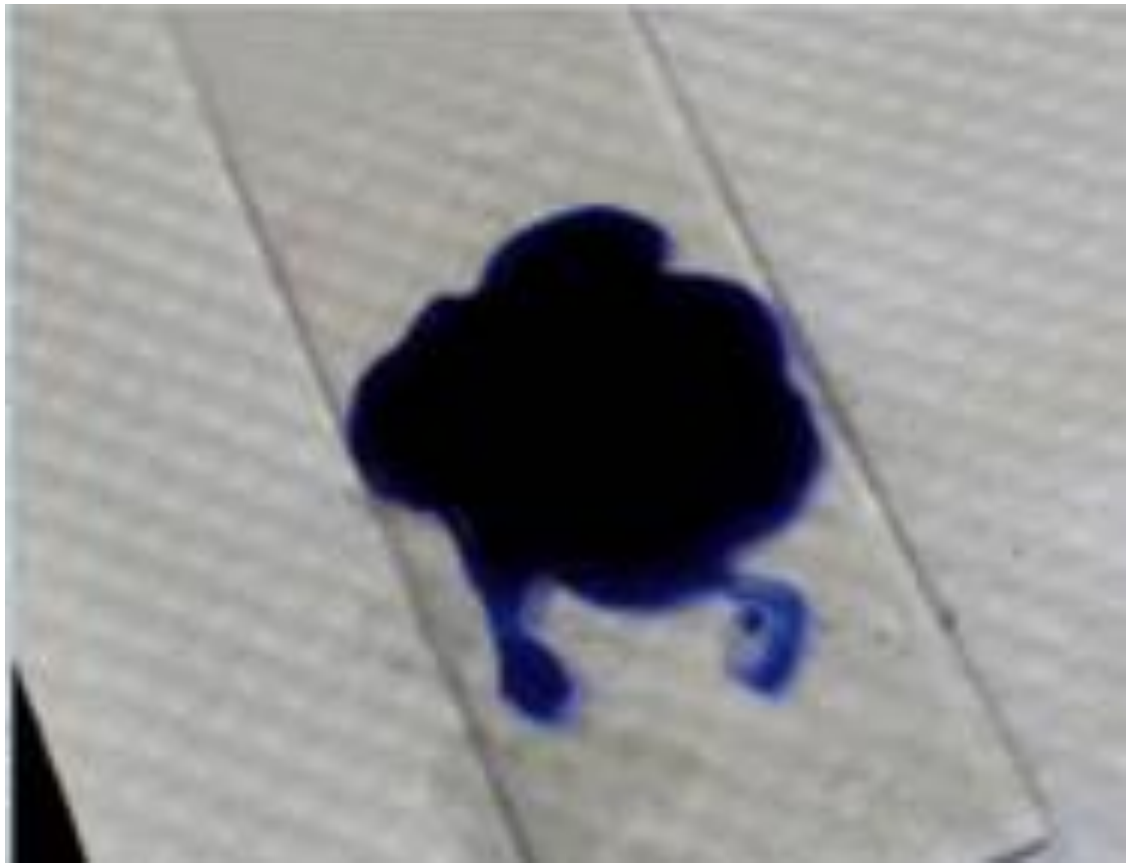
لام را سرد کنید بعد شستشو دهید تا نشکند



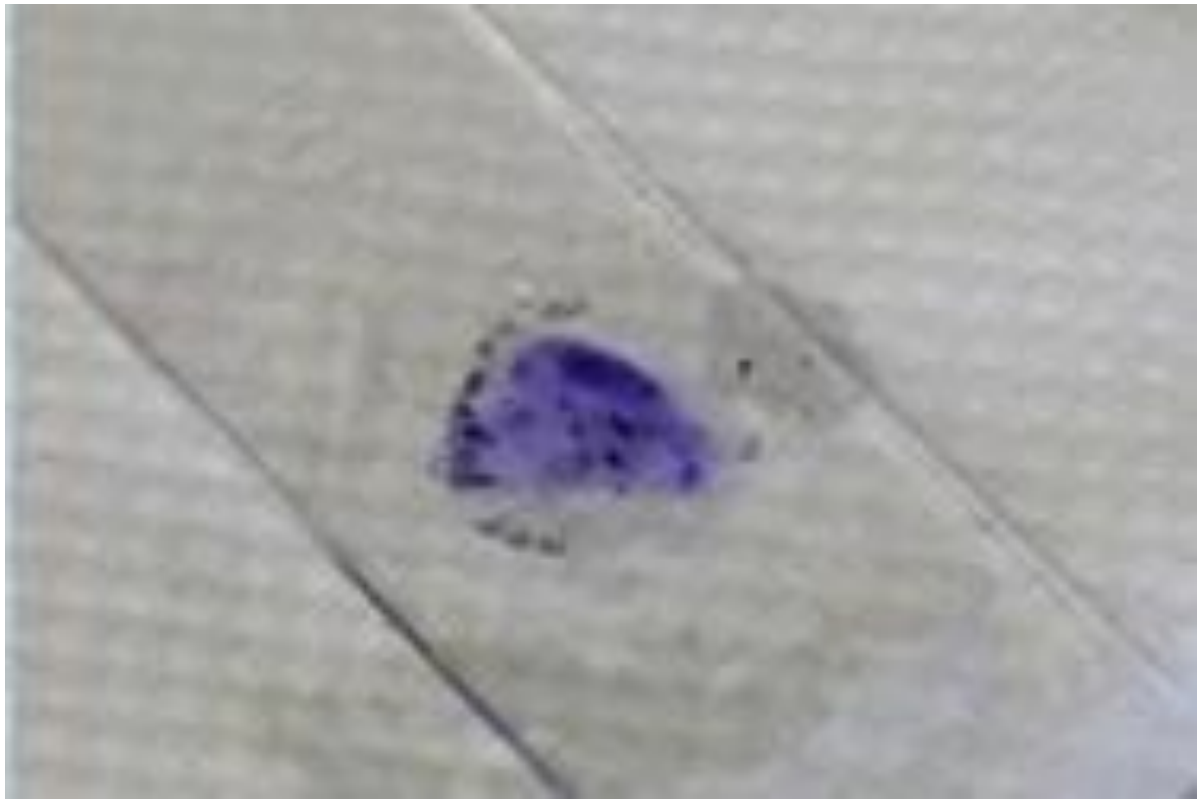
سطح لام را با اسید- الکل آغشته کنید.

ماده رنگ بر در این رنگ آمیزی HCL ۳٪ در اتانول ۹۵٪ است که این اسید الکل یک رنگ بر بسیار قوی است و بگذارید ۱۵ تا ۳۰ ثانیه بماند . لام را با زاویه ۴۵ درجه نگهدارید و محلول رنگ بر را قطره قطره روی آن بریزید . اگر خروج رنگ قرمز با محلول رنگ بر ادامه یافت دوباره لام را با اسید الکل آغشته کنید . زمانی که دیگر رنگ قرمز خارج نشد مرحله بعدی را انجام دهید . معمولا رنگبری کامل مایکوباکتریوم مشکل است

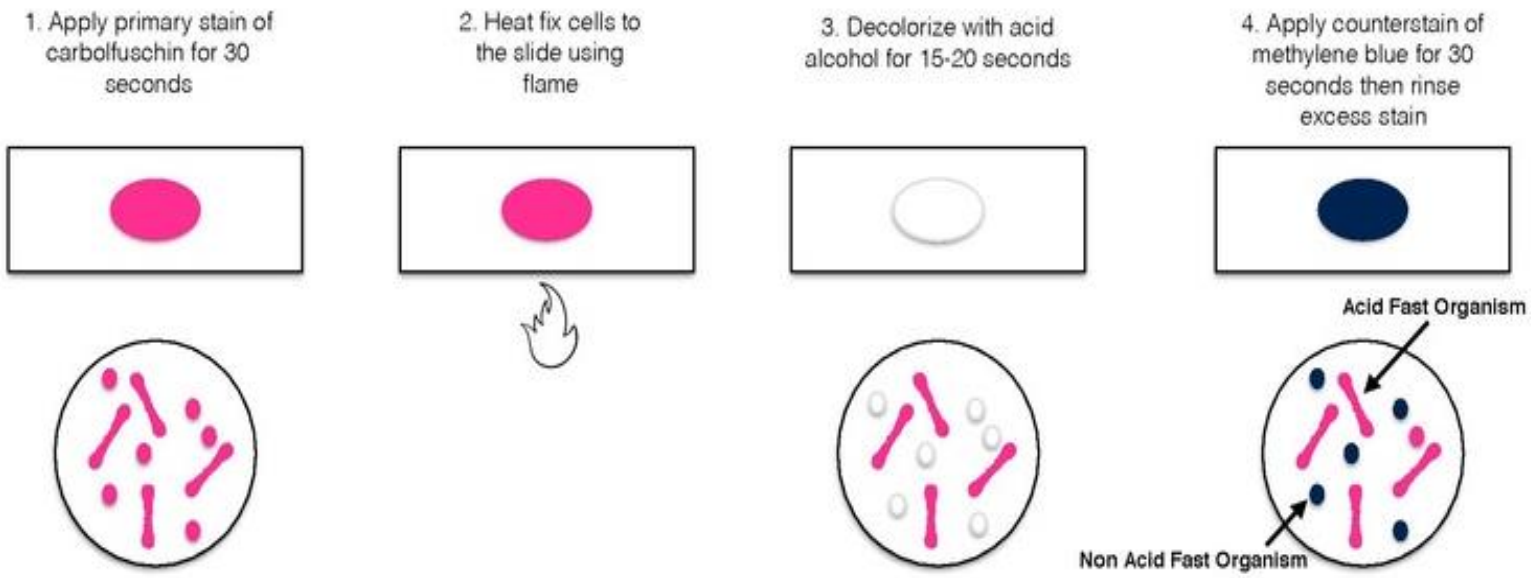
- برای رنگ آمیزی زمینه یا مخالف از بلودومتیلن ۰/۳ درصد یا مالاشیت سبز به مدت ۱ دقیقه استفاده می-کنیم
- سطح لام را با آبی متیلن لوفلر (رنگ ثانویه) آغشته کنید و بگذارید ۱ دقیقه بماند.



رنگ را خالی کرده و لام را بشوئید



- لام را شسته و با کاغذ خشک کن به آرامی خشک کنید یا بگذارید در حالت زاویه دار در مجاورت هوا خشک شود.
- گسترش را میکروسکوپ با عدسی ۱۰۰ با روغن ایمرسیون مشاهده می‌کنیم

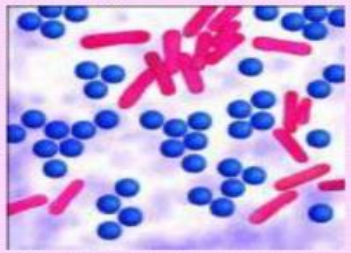

1. Apply primary stain of carbolfuschin for 30 seconds
2. Heat fix cells to the slide using flame
3. Decolorize with acid alcohol for 15-20 seconds
4. Apply counterstain of methylene blue for 30 seconds then rinse excess stain
Acid Fast Organism
Non Acid Fast Organism

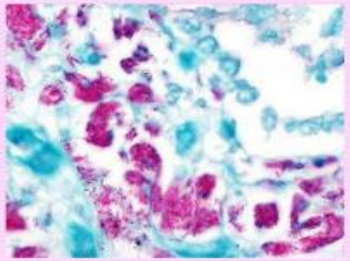
## رنگ آميزي اسيدفاست

رنگ اوليه: فوشين

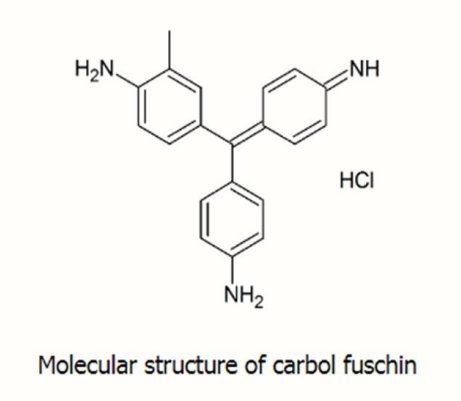
رنگ بر : اسيد-الكل

رنگ ثانويه: آبی متيل

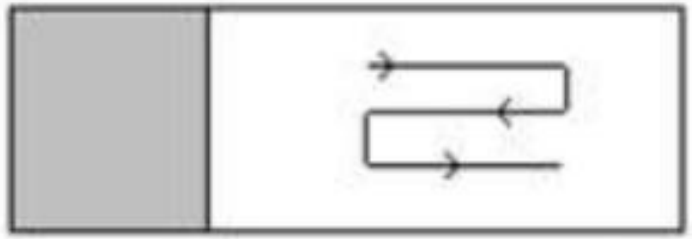




- طرز تهیه رنگها و محلولها :
- - کربول فوشین
- فوشین بازی 3/. گرم
- اتانول 95% 10سی سی
- فنل متبلور 5 گرم
- آب مقطر 95 سی سی
- فوشین را در اتانول حل کنید . در ظرف دیگر بلورهای فنل را در آب حل کنید بعد دو محلول را با هم کاملا مخلوط کنید.
- - رنگ بر اسید – الکل
- اسید HCL 37% 3 سی سی
- اتانول 95% 97 سی سی
- اسید را به اتانول اضافه کرده و خوب مخلوط کنید.
- - آبی متیلن لوفلر
- آبی متیلن 3/.گرم
- اتانول 95% 30 سی سی
- آب مقطر 100 سی سی
- ابتدا آبی متیلن را در اتانول حل کنید . بعد آب مقطر را اضافه کرده و خوب مخلوط کنید . در پایان محلول را با استفاده از کاغذ صافی و قیف صاف کنید.
-



Molecular structure of carbol fuschin



Recommended method for examining acid-fast stained smears

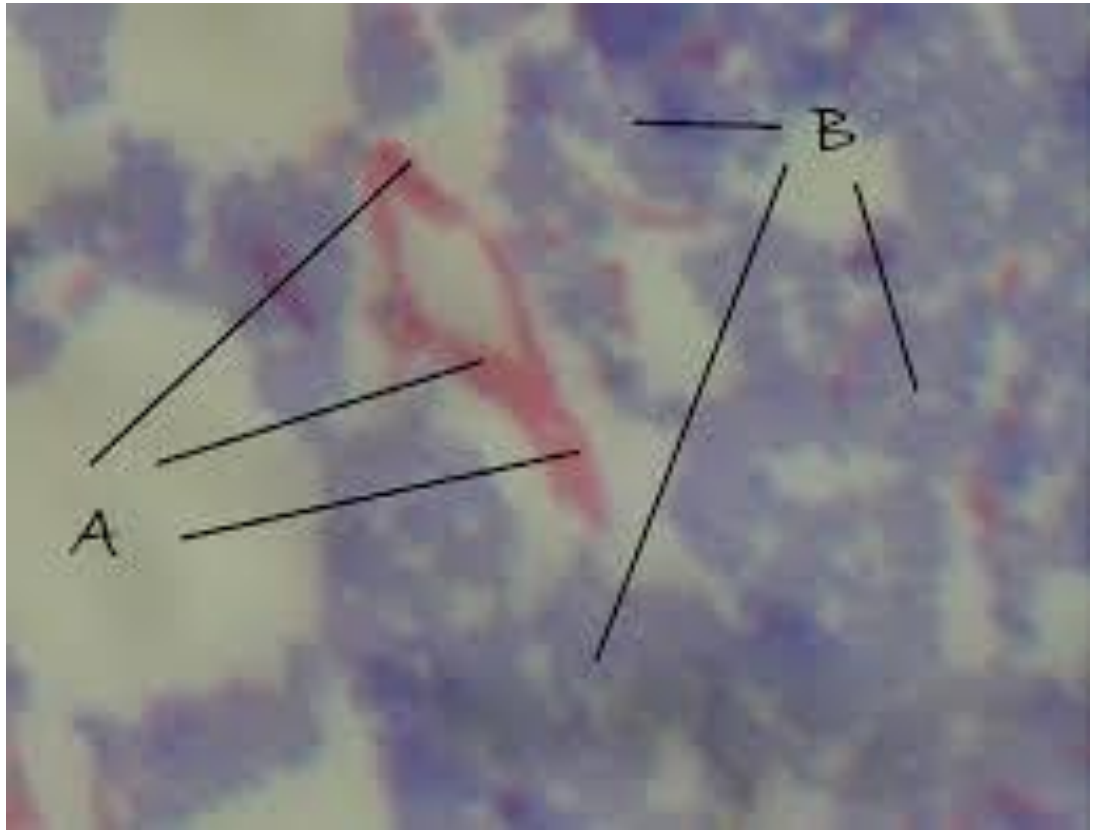
## METHOD FOR REPORTING NUMBERS OF ACID FAST BACILLI OBSERVED IN STAINED SMEARS

| NUMBER OF BACILLI OBSERVED | GRADE |
|---|---|
| 0 | - |
| 1-2/300 FIELDS | + OR - |
| 1-9/100 FIELDS | 1+ |
| 1-9/10 FIELDS | 2+ |
| 1-9/FIELD | 3+ |
| MORE THAN 9/FIELD | 4+ |

# نتیجه گیری :

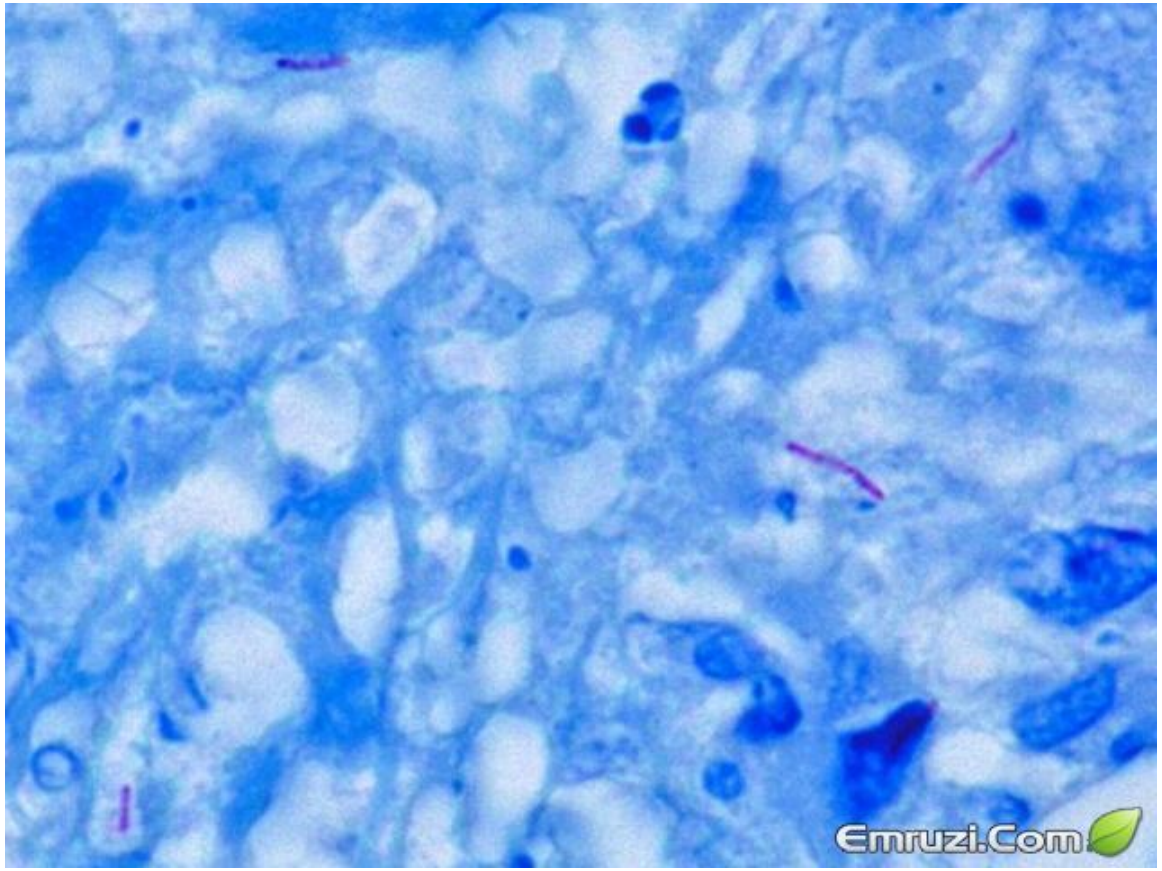
- باکتری‌های اسید فاست را به رنگ قرمز و کوکسی‌های گرم مثبت را به رنگ آبی مشاهده می‌کنیم.

29

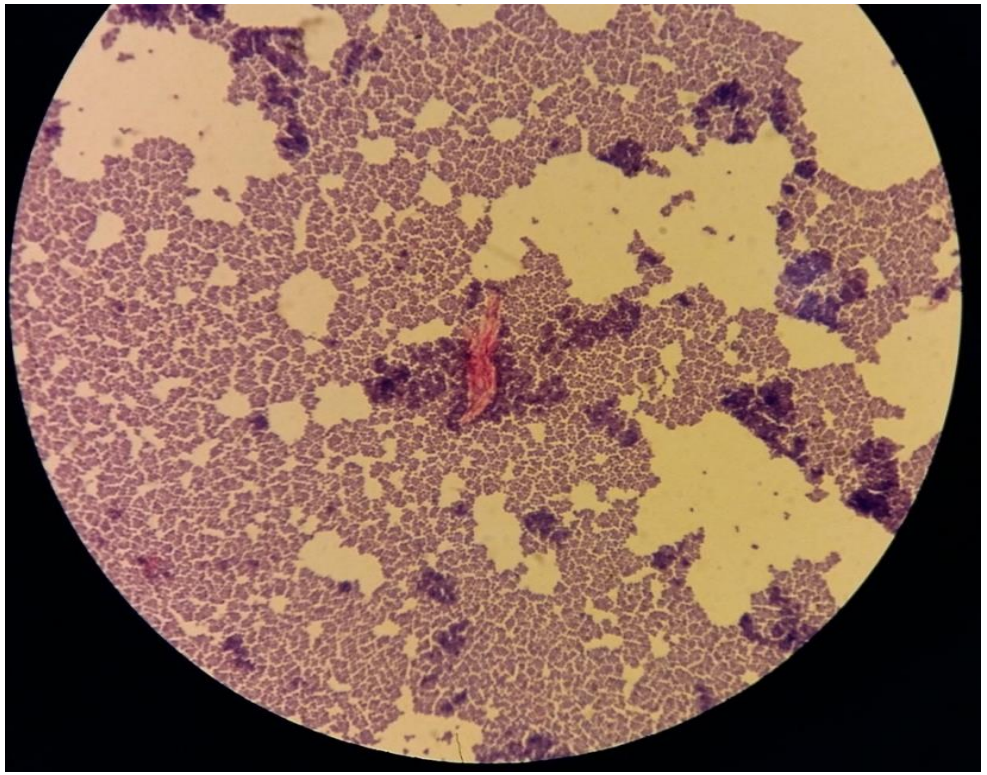



تهیه کننده : سهیلا عباسی

# تصویر باسیل سل در رنگ آمیزی اسید فست به رنگ صورتی :

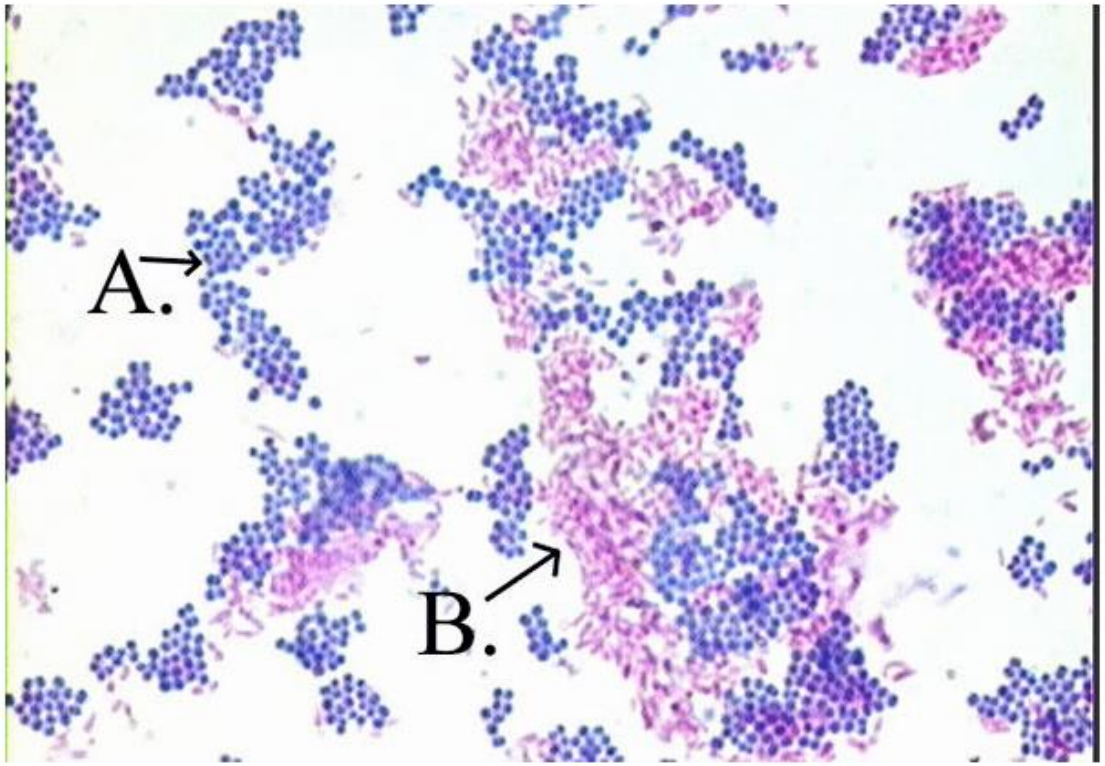


# رنگ آمیزی اسید فاست
# باکتری استافیلو کوکوس آرئوس و مایکو باکتریوم بوویس



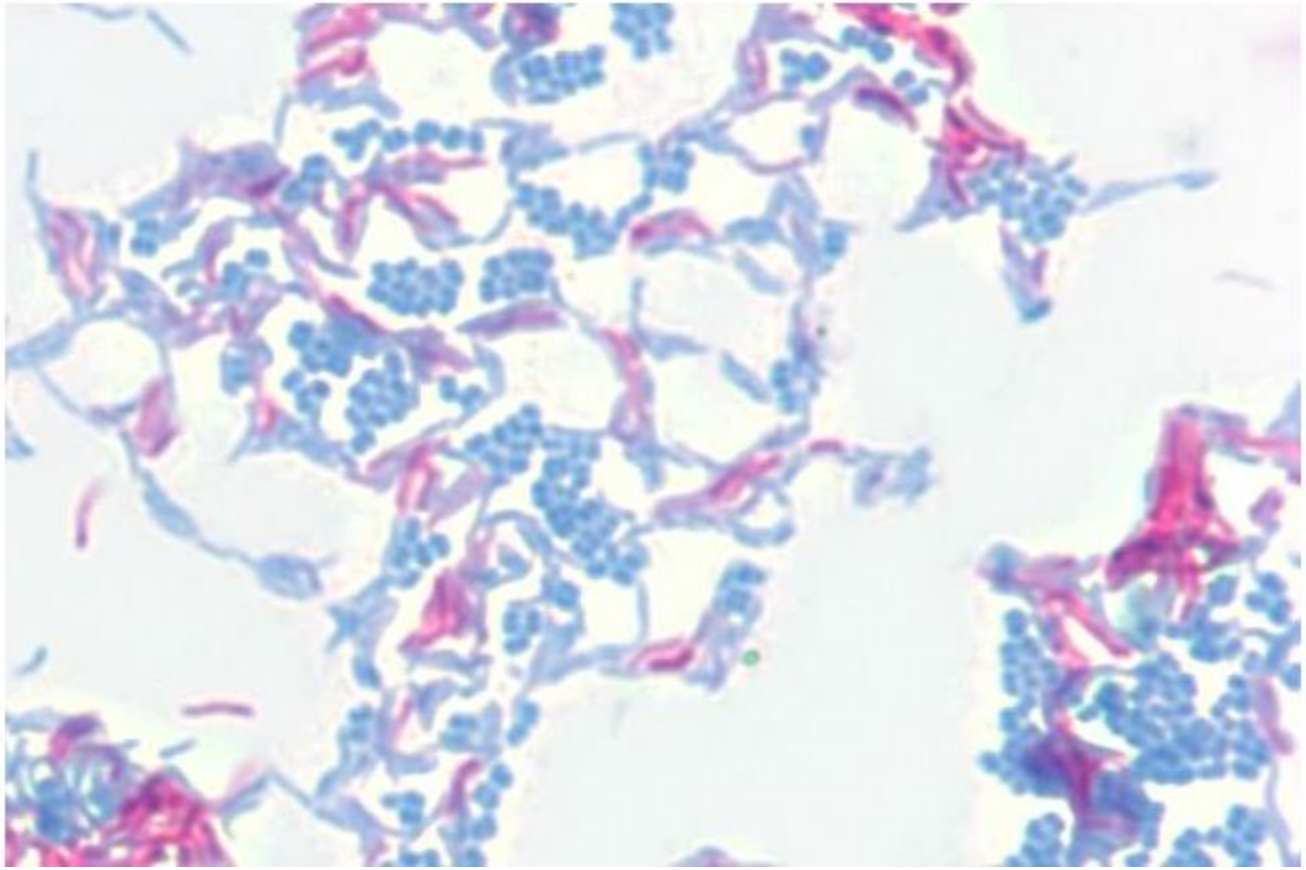
تهیه کننده : سهیلا عباسی

32



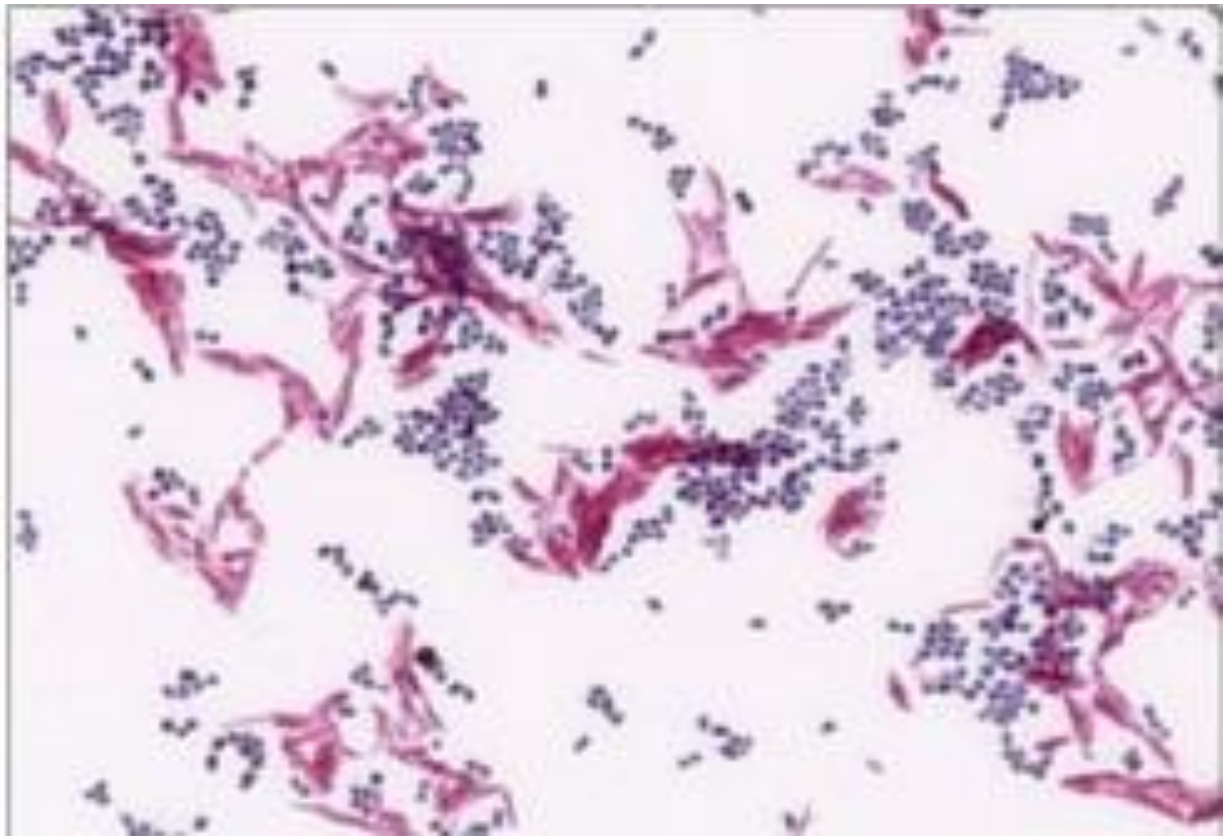

تهیه کننده : سهیلا عباسی

33

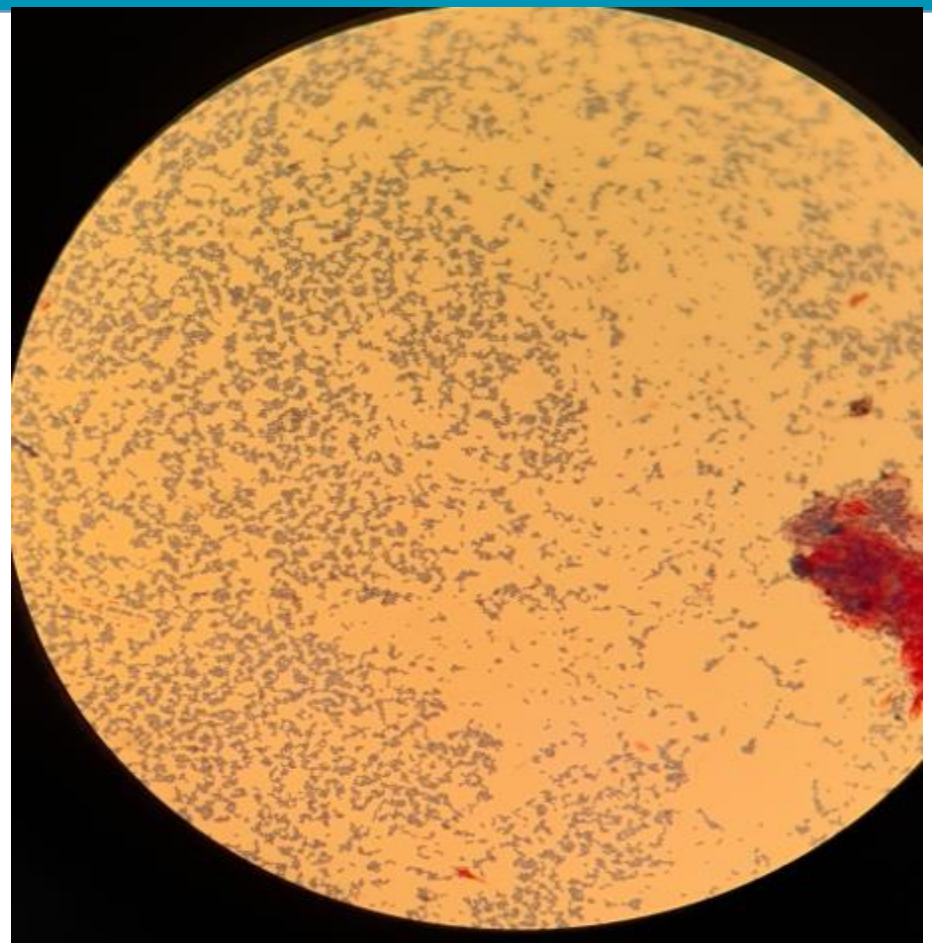


تهیه کننده : سهیلا عباسی

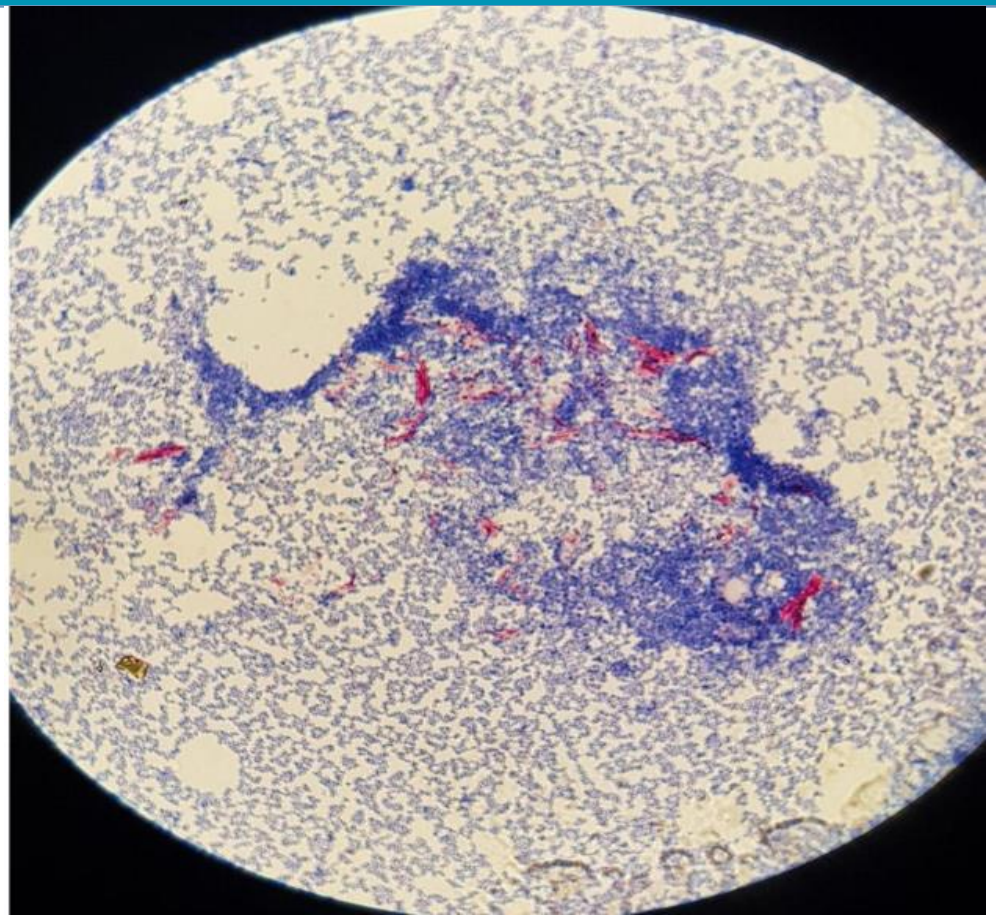
34



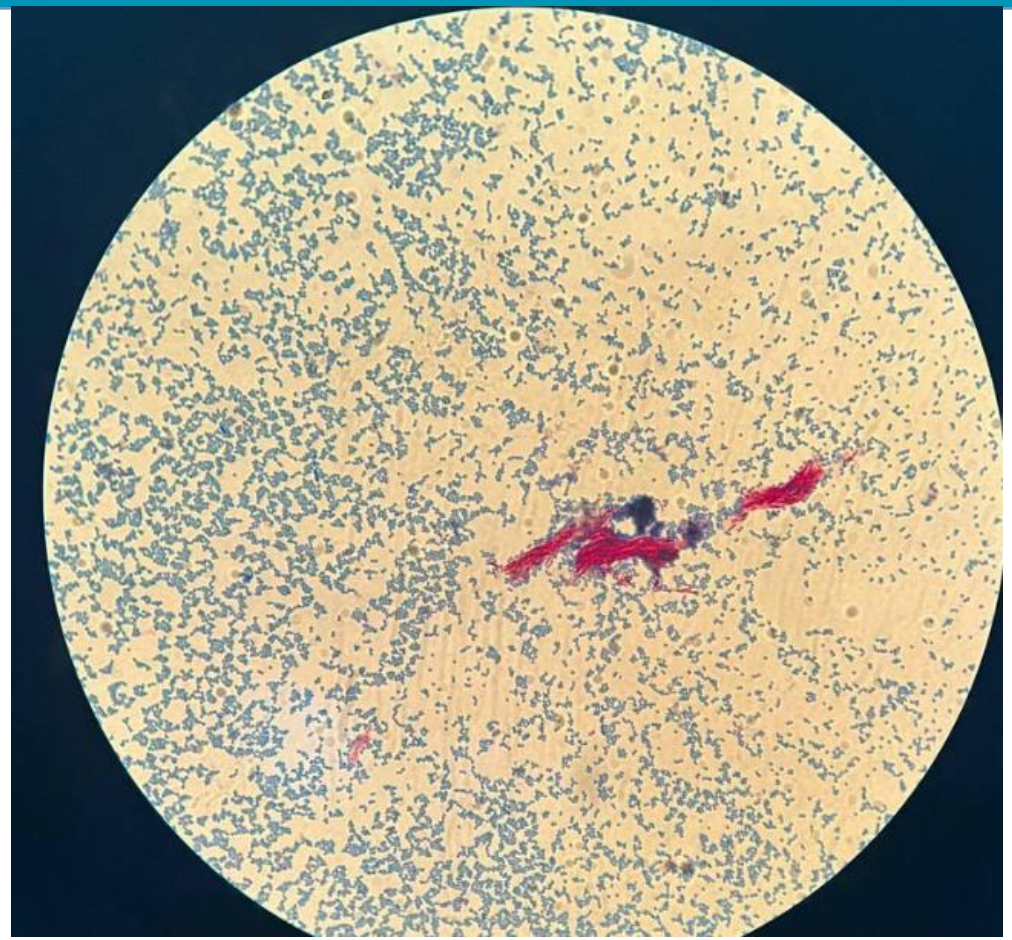
تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

از حسن توجه شما سپاسگزارم