# Lab - 10

## أنواع الصبغات البكتيرية

### 2- الصبغات التفريقية أو المركبة: Differential or compound stains -

سُميت هذه الصبغات بالصبغات التفريقية لكونها تفرق بين أنواع الجراثيم المختلفة اعتمادا على قابليتها على الاحتفاظ بنوع معين من الصبغات دون الأخرى، ومن أشهر هذه الصبغات هي **صبغة گرام والثانية الصبغة المقاومة للأحماض Acid-Fast stain** (صبغة بكتريا السل الرئوي) :-

**أ- صبغة كرام Gram stain:-** يعود الفضل في اكتشاف هذه الطريقة إلى الطبيب الدنماركي هانز كرستيان غرام (Hans Christian Gram) وتستخدم هذه الصبغة للتفريق بين مجموعتين هما مجموعة البكتيريا الموجبة لصبغة كرام Gram Positive Bacteria وترمز لها G+ve حيث تصطبغ هذه المجموعة باللون الأزرق , والمجموعة الثانية تدعى البكتيريا السالبة لصبغة كرام Gram Negative bacteria وترمز لها G-ve حيث تصطبغ بلون **أحمر** وبهذا سميت طريقة التصبيغ باسمه (صبغة كرام) تكريما لمكتشفها وعلى أساس هذه العملية تم تقسيم جميع الاجناس البكتيرية إلى مجموعتين رئيسيتين هما :-

الجراثيم الموجبة لصبغة كرام ( G+ve) Gram positive bacteria

مثال على ذلك المكورات العنقودية Staphylococcus والعصيات Bacillus

الجراثيم السالبة لصبغة كرام ( G-ve ) Gram negative bacteria

مثل بكتريا القولون E.coli وبكتريا الزوائف Pseudomonas

س: هناك بكتيريا لا تعتبر من مجموعة السالبة ولا الموجبة , ما اسم هذه البكتيريا ؟

**آلية عمل صبغة كرام**

إن الجراثيم الموجبة لصبغة كرام تحتفظ باللون البنفسجي (الصبغة الأولية) Crystal violet (gentian violet) بعد قصرها بالكحول، أما الجراثيم السالبة لصبغة كرام فإنها لا تحتفظ باللون البنفسجي بعد قصرها بالكحول ولذلك تصطبغ بالصبغة المضادة فتظهر باللون الأحمر, الاختلاف في التصبيغ يعزى إلى الإختلاف في مكونات الجدار الخلوي للخلايا البكتيرية.
إن جدار الخلية في البكتريا الموجبة لصبغة كرام (G+ve) يتكون من طبقة سميكة من مادة الببتيدوكلايكان peptidoglycan الذي يعمل كحاجز يحتفظ باللون الأرجواني للصبغة البنفسجية crystal violet ولا يزال اللون حتى بعد استعمال القصر بالكحول alcohol , أما

جدار الجراثيم السالبة لصبغة كرام (-G) يتكون من طبقة خفيفة من الببتيدوكلايكان وتغلفها من الخارج طبقة من البروتين ومتعدد السكريات lipopolysaccharide والتي لا تستطيع الاحتفاظ باللون الارجواني للصبغة البنفسجية crystal violet مما يؤدي إلى زوال الصبغة عند قصرها بالكحول وبذلك تأخذ اللون المضاد وهو اللون الأحمر لصبغة السفرانين safranin.

**المحاليل المكونة لصبغة كرام :-**

**1- صبغة crystal violet او Gentian violet:-** وتتمثل في الصبغة البنفسجية

**2- المادة المثبتة (Mordant ) وتسمى Lugol's iodine** ويعمل هذا المثبت على زيادة التصاق وتثبيت الصبغة بجدار الخلية البكتيرية.

**3- عامل مزيل الصبغة (قاصر) :decolorizing agent-** ويتمثل بالكحول الاثيلي ethanol بتركيز 95% حيث يعمل على إزالة الصبغة من الخلية المصبوغة .

**4- صبغة مغايرة counter stain:-** وتتمثل بصبغة السفرانين Safranin يستخدم السفرانين كصبغة تباين في بعض بروتوكولات الصباغة إذ يصبغ نواة الخلية بلون أحمر.أو أي صبغة تختلف في لونها عن الصبغة الأولى لإعطاء الخلية التي فقدت الصبغة بعد معاملتها بالكحول لون مغاير, إن الجراثيم التي لم تفقد صبغتها تبقى محتفظة بالصبغة الأولى ( crystal violet) وهذه هي الجراثيم (البكتريا) الموجبة لصبغة كرام (+G), أما الجراثيم التي فقدت صبغتها الأولى فإنها سوف تتلون بالصبغة المغايرة (safranin) وهذه هي البكتريا السالبة لصبغة كرام (-G).

س: عدد مكونات عُدة تصبيغ كرام مع توضيح دور كل جزء منها؟

**خطوات التصبيغ بصبغة كرام :-**

1- تحضير المسحة : يتم تحضير المسحة بالطريقة التي تم وصفها في المختبر السابق.

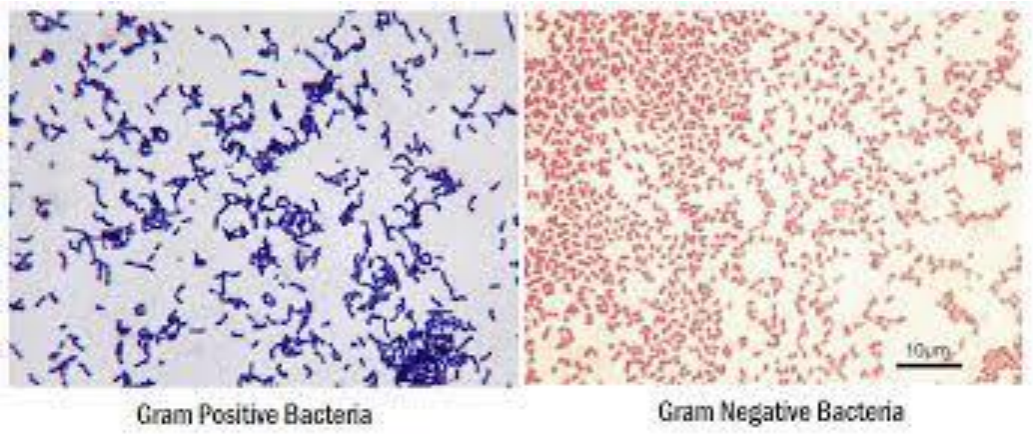
2- تضاف صبغة **الكريستال البنفسجي (crystal violet )** إلى المسحة البكتيرية بحيث تغمر كامل طبقة المسحة وتترك لمدة دقيقة واحدة وبعدها تغسل بالماء المقطر او ماء الحنفية الى حين يكون الماء النازل رائق clear خالي من الصبغة البنفسجية.

3- تضاف كمية من اليود **Lugol's iodine** لتثبيت الصبغة السابقة وايضا تترك لدقيقة واحدة وبعدها تغسل بالماء المقطر او ماء الحنفية .

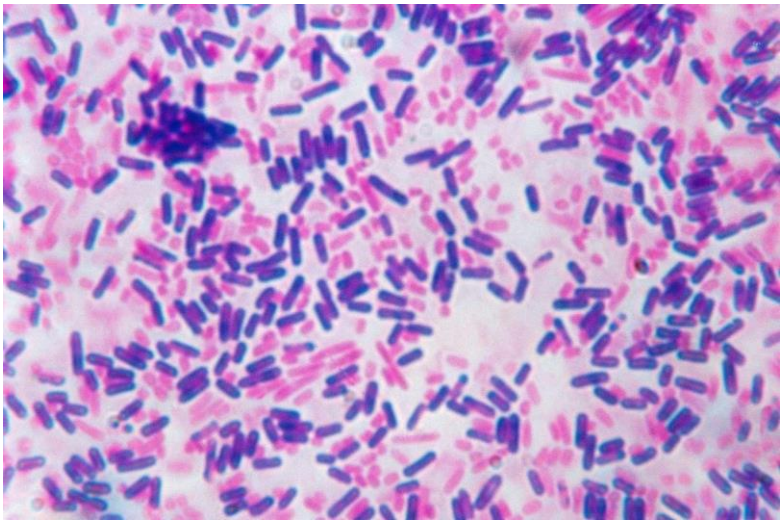
4- يضاف الكحول الاثيلي Ethanol بتركيز95% للمسحة البكتيرية وتترك لمدة 15-10 ثانية مع ملاحظة عدم ترك الكحول أكثر من هذه المدة وبعدها مباشرة يتم غسل الشريحة بالماء المقطر او ماء الحنفية.

5- الخطوة الاخيرة تصبغ بصبغة السفرانين الحمراء (Safranin) لمدة دقيقة واحدة ثم تغسل بالماء وتجفف بِرقة باستعمال ورق الترشيح او روق العدسات او مناديل ناعمة لتلافي ازالة

المسحة البكتيرية من على سطح الشريحة وتغطى بغطاء الشريحة slide cover or cover slip, بعدها توضع قطرة من زيت السدر ثم تفحص بالمجهر الضوئي باستخدام العدسة الزيتيةX 100, فالبكتريا التي تتلون باللون الازرق - البنفسجي (violet) هي بكتريا موجبة لصبغة كرام Gram positive bacteria (G+) بينما التي تأخذ اللون الأحمر هي بكتريا سالبة لصبغة كرام Gram negative bacteria (G-) وكما في الرسم التوضيحي ادناه.




* تظهر البكتيريا المصبغة بصبغة كرام اما بلون ازرق او بلون وردي ولكن أحيانا تظهر مسحات صبغة كـرام بلونين الأحمر والازرق كما في الشكل ادناه، ما هي الأسباب؟ ابحث عن الإجابة.



س: اشرح خطوات تصبيغ البكتيريا بصبغة كرام بشكل متسلسل ودقيق؟

https://www.youtube.com/watch?v=NjC2dtNLj1U

## ب- الصبغة المقاومة (الصامدة) للحامض Acid fast stain (صبغة زيل نيلسون) :-

تعد هذه الطريقة من طرق التصبيغ التفريقي المهمة لتفريق جنس الـ Mycobacterium عن بقية الأجناس إذ ينفرد هذا الجنس باحتوائه على كمية من المعقد الدهني Mycolic acid على سطح الخلايا يعطي للسطح خاصية **شمعية** وبالتالي من الصعب تصبيغ هذه الخلايا بالطرق الاعتيادية ويمكن تلافي صعوبة التصبيغ وارغام الصبغة لاختراق الجدار الخلوي في هذه الخلايا باستخدام الحرارة لتليين المكونات الدهنية والشمعية على الجدار ثم تسهيل دخول الصبغة إلى الخلايا, هذا النوع من الخلايا حالما تصطبغ بالصبغة يصعب إزالة الصبغة منها بالمواد القاصرة مثل الكحول المحمض ( محلول الحامض والكحول) ولذلك تسمى الصامدة للحامض, هذه الصبغة تستخدم في تشخيص عصيات السل الرئوي (Tuberculosis) التي تعود لهذا الجنس *Mycobacterium tuberculosis* , كغيرها من الصبغات التفريقية يستخدم فيها نوعين من الصبغات : **الصبغة الأولية صبغة الكاربول فوكسين الحمراء** ( carbol fuchsin) والصبغة المعاكسة صبغة المثيلين الأزرق (methylene blue) أما القاصر هنا فهو الكحول المحمض (1- 3% حامض الهيدروكلوريك في 95% كحول) حيث أن الكحول المحمض هو قاصر قوي جدا.

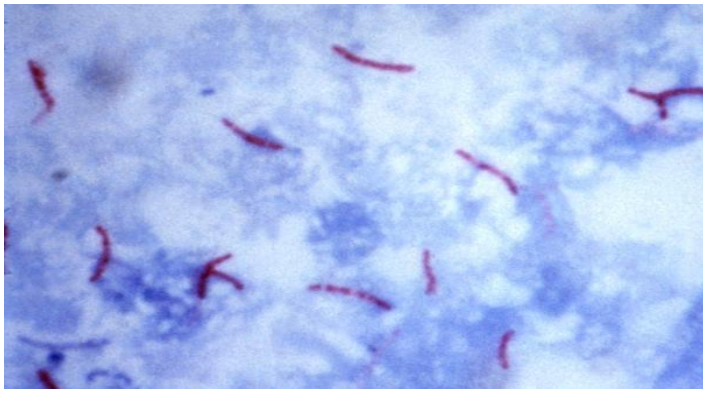
في هذه الطريقة تدخل صبغة الكاربول فوكسين الحمراء إلى الخلية البكتيرية باستخدام التسخين.

**طريقة العمل: -**

1- يتم وضع عينة قشع المريض المصاب بالسل على الشريحة الزجاجية أي تحضير المسحة وتثبيتها بواسطة تمريرها على اللهب.

2- نغطي الشريحة بصبغة الكاربول فوكسين الحمراء ونسخن الشريحة حتى تبدأ الصبغة بالتبخر وتترك الشريحة على اللهب لمدة 5 دقائق مع تزويد الصبغة وعدم السماح لها بأن تجف ثم نرفع الشريحة جانبا لتبرد ومن ثم نغسل الشريحة بالماء لمدة 30ثانية.

3- نغطي الشريحة بمحلول (3% حامض الهيدروكلوريك HCl في 95% كحول Alcohol) بإضافته قطرة تلو الأخرى للشريحة لمدة 10إلى 30 ثانية بعدها نغسل الشريحة بالماء.



4- نضع صبغة المثيلين الأزرق على الشريحة لمدة 2 دقيقة ثم نغسل الشريحة بالماء وتجفف وتفحص تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية نلاحظ بأن عصيات السل الرئوي تظهر مصبوغة باللون الأحمر وباقي الشريحة مصبوغة باللون الأزرق, كما في الشكل التالي:-

**شكل :- يظهر عصيات السل الرئوي تحت المجهر الخلايا تتلون بلون احمر مع خلفية زرقاء**

### 3- الصبغات الخاصة special stains :-

تستعمل هذه الصبغات لصباغة تراكيب الخلية البكتيرية مثل الأبواغ spores والمحفظة capsule, ومن هذه الصبغات :-

**أ- صبغة الأبواغ :spore stain-** إن بعض الجراثيم التابعة لجنس العصيات *Bacillus* والمطثيات *Clostridium* تنتج تراكيب مقاومة للحرارة تدعى الأبواغ الداخلية endospores بالإضافة إلى كون هذه التراكيب مقاومة للحرارة فإنها تقاوم بعض المواد الكيمياوية التي لها خاصية لتحطيم الأبواغ , إن هذه التراكيب لا يمكن صبغها بواسطة صبغة كرام أو الصبغات الاعتيادية وتستخدم في صبغها الحرارة (التسخين) التي تعمل على سرعة اختراق الصبغة لجدار البوغ وتسهل عملية التصبيغ.

**خطوات التصبيغ:-**

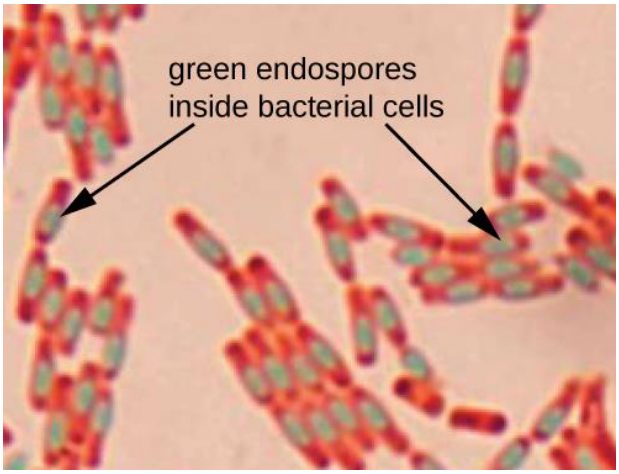
1- نحضر مسحة من جراثيم العصيات أو المطثيات ثم نثبتها بواسطة الحرارة.

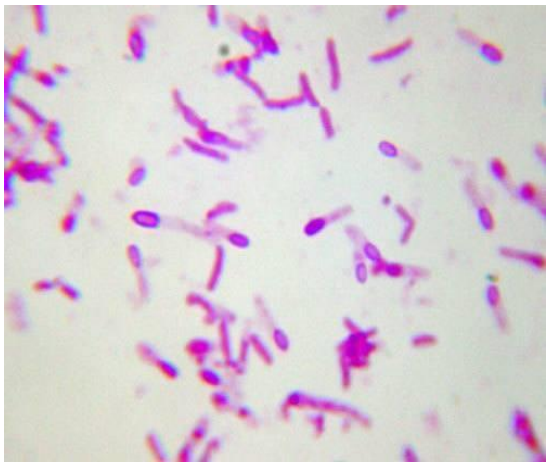
2- نغطي الشريحة بصبغة الملاكايت الخضراء (Malachite green) بتركيز 5% ونسخن الشريحة لمدة 5 دقائق فوق حمام مائي مع مراعاة عدم جفاف الصبغة وذلك بتقطير المزيد من الصبغة كلما اقتضت الحاجة.

3- نغسل الشريحة بالماء للتخلص من الصبغة.

4- نضع صبغة السفرانين (safranin) لمدة 2 دقيقة وتسمى الصبغة في هذه الحالة بالصبغة المضادة (counter stain).

5- بعد مرور دقيقتين نغسل الشريحة بالماء للتخلص من الصبغة وتجفف وتفحص تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية فتظهر الأبواغ الداخلية للبكتريا العصوية مصبوغة باللون الأخضر وباقي الشريحة مصبوغة باللون الأحمر، كما في الشكل التالي: -



**ب- صبغة المحفظة Capsule stain:-** تحاط بعض الجراثيم بطبقة من مواد جيلاتينية أو هلامية تدعى بالمحفظة (capsule) لا يمكن تصبيغ الجراثيم الحاوية على المحفظة بالطرق الاعتيادية والمشكلة تكمن في عملية تثبيت المسحة الجرثومية bacterial smear, حيث أن الحرارة المستعملة في التثبيت تعمل على تحطيم المحفظة capsule ولذلك تستعمل صبغة تربط بين التصبيغ السالب والتصبيغ البسيط (استعمال صبغات سالبة (صبغات حامضية) وهي صبغة النكروسين Nigrosin وصبغة الحبر الهندي India ink), تعتبر صبغة النكروسين والحبر الهندي من الصبغات الحامضية وذلك لاحتوائها على الآيون السالب الصابغ.

عندما تصبغ الجراثيم ذات الشحنة السالبة بصبغة حامضية سالبة الشحنة أيضا سوف لن تتحد الصبغة مع الشحنات السالبة الموجودة على الجراثيم وبعكسه فإنها سوف تتكدس حول الخلية الجرثومية مما يؤدي إلى اصطباغ المحفظة فقط لعدم مقدرة الصبغة على اختراق الخلية الجرثومية, هذا النوع من التصبيغ يسمى بالتصبيغ السالب negative staining كما هو الحال في صبغ جرثومة *Klebsiella*.

**خطوات التصبيغ :-**

1- نمزج قطرة من المعلق البكتيري مع قطرة من صبغة الحبر الهندي India ink أو النكروسين Nigrosin على الشريحة الزجاجية.

2- نستعمل شريحة زجاجية ثانية لسحب خليط الصبغة-المعلق البكتيري بشكل غشاء رقيق على طول الشريحة الأولى ونتركها لمدة 5-7 دقائق لتجف بالهواء.

3- نغمر المسحة بصبغة الكريستال البنفسجي crystal violet لمدة دقيقة واحدة (الصبغة تصبغ الخلية البكتيرية نفسها وليس المحفظة).

4- نتخلص من الصبغة الزائدة عن طريق إمالة الشريحة في زاوية 45 درجة والسماح لها أن تجف بالهواء.

5- نفحص الشريحة تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية للتحري عن وجود أو عدم وجود المحفظة, حيث عند وجود المحفظة تظهر بشكل منطقة شفافة محيطة بالخلية البكتيرية, كما في الشكل التالي :-