



Basic Medical Sciences Research Center
Histogenotech

Basic Medical Sciences Research Center Histogenotech Co., Tehran, Iran

مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی
شرکت دانش بنیان بافت و ژن
پاسارگاد

آموزش جامع رنگ آمیزی اختصاصی گیمسا (Giemsa)
در آزمایشگاه بافت شناسی

- ۳..... *مقدمه‌ای از رنگ آمیزی اختصاصی گیمسا در بافت شناسی
- ۳..... *تاریخچه رنگ آمیزی اختصاصی گیمسا
- ۳..... *انواع کاربرد های رنگ آمیزی اختصاصی گیمسا در بافت شناسی
- ۴..... *نگاهی اجمالی به سلول های خون رنگ شده با گیمسا
- ۵..... *انواع نمونه های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ آمیزی اختصاصی گیمسا
- ۵..... *پروتکل رنگ آمیزی اختصاصی گیمسا در بافت شناسی
- ۵..... مراحل آماده سازی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی گیمسا
- ۶..... مراحل رنگ آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی گیمسا
- ۷..... *تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ آمیزی گیمسا
- ۸..... *تفسیر نتایج رنگ آمیزی گیمسا
- ۹..... *ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی گیمسا در آزمایشگاه بافت شناسی
- ۱۰..... *جمع بندی
- ۱۰..... *سوالات متداول

مقدمه‌ای از رنگ‌آمیزی اختصاصی گیمسا در بافت‌شناسی

رنگ آمیزی گیمسا یکی از چندین رنگ های هماتولوژی معروف به رنگ‌های رومانوفسکی است که ساختارهای مختلف سلولی را متمایز می‌کند و باکتری‌ها را در اسمیر خون تشخیص می‌دهد. گیمسا یک تکنیک چند رنگی شامل رنگ های اسیدی (ائوزین و آزور B) و بازی (رنگ پایه متیلن بلو) است. رنگ های بازی بخش های اسیدی سلول را رنگ آمیزی و رنگ های اسیدی اجزای بازی سلول مانند سیتوپلاسم و گرانولها را رنگ می‌کند. دو ترکیب مختلف رنگ های رومانوفسکی (Romanowski) سبب تفکیک دقیق سلول‌ها، طیف رنگی و مجزا نمودن گرانول های سلول با رنگ های تفکیکی می‌شود. از انواع رنگ های رومانوفسکی می‌توان به رنگ رایت، گیمسا، لیشمن اشاره نمود که متداول ترین آنها در آزمایشگاه پاتولوژی و هماتولوژی، رنگ آمیزی گیمسا می‌باشد.

تاریخچه رنگ‌آمیزی اختصاصی گیمسا

گوستاو گیمسا (Gustav Giemsa)، شیمیدان آلمانی که این تکنیک رنگ آمیزی به نام او نامگذاری شده است، در سال ۱۹۰۲ میلادی برای اولین بار این روش رنگ آمیزی گیمسا را جهت نشان دادن انگل های عامل مالاریا توسعه داد. رنگ گیمسا می‌تواند به طور موثر نقاط شوفنر یا نقاط رنگی در نمونه خون شناسی (Schüffner's dots) را نشان دهد، که به انگل مالاریا (*Plasmodium vivax*) وابسته هستند. این نمونه ها با رنگ رایت-گیمسا (Wright-Giemsa) تشخیص داده نمی‌شوند، بنابراین امروزه گیمسا به عنوان روش استاندارد طلایی برای تشخیص مالاریا در نظر گرفته می‌شود.

انواع کاربردهای رنگ‌آمیزی اختصاصی گیمسا در بافت‌شناسی

مطالعه و بررسی سلول‌های خونی و تشخیص انگل مالاریا: علاوه بر تکنیک رنگ آمیزی رایت (Wright's Stain) جهت مطالعه خون محیطی، رنگ گیمسا نیز استفاده می‌شود. رنگ آمیزی لام خون محیطی و تشخیص انگل مالاریا از جمله کاربردهای جهانی رنگ گیمسا است. تشخیص زودهنگام انگلی مالاریا سنگ بنای درمان و کنترل مالاریا است. اگرچه تست های تشخیصی سریع مالاریا به طور فزاینده ای مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما بررسی میکروسکوپی آن همچنان

استاندارد مرجع برای تشخیص مالاریا است. علاوه بر مقرون بصره بودن تست، مزیت رنگ آمیزی گیمسا ارزیابی کمی از انگل خون محیطی و مراحل زندگی انگل و همچنین اطلاعات در مورد سایر عناصر خونی را ارائه می دهد.

این رنگ آمیزی همچنین برای تشخیص پارازیت تریکوموناس تروفوزوئیت (Trophozoite Trichomonas) عامل بیماری جنسی مقاربتی تریکومونیاژیس، در نمونه های مایع مخاطی کاربرد دارد.

تشخیص نمونه آلوده به باکتری: در نمونه های بیوپسی معده جهت تشخیص باکتری هلیکوباکتر پیلوری (H.pylori) از رنگ آمیزی گیمسا استفاده می شود. همچنین می توان از این رنگ افتراقی برای مطالعه چسبیدن باکتری های بیماری زا به سلول های انسانی استفاده کرد. سلول های انسانی و باکتریایی را به رنگ بنفش و صورتی رنگ می کند.

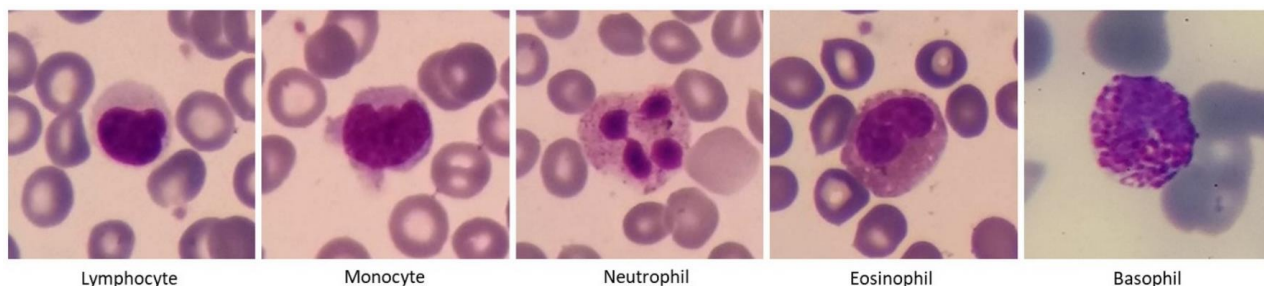
تشخیص و بررسی بدخیمی های خونی: مطالعه و تشخیص برخی از انواع بدخیمی های خونی در نمونه های پرسیلولار مغز استخوان رنگ شده با گیمسا نیز انجام می شود.

نگاهی اجمالی به خون و سلول های خونی رنگ شده با گیمسا

خون مایع تخصصی بدن است، دارای چهار جزء اصلی شامل: پلاسما، گلبول های قرمز، گلبول های سفید و پلاکت ها. خون عملکردهای مختلفی دارد، از جمله: انتقال اکسیژن و مواد مغذی به بافت های بدن، تشکیل لخته های خون برای جلوگیری از دست دادن خون اضافی، حامل سلول ها و آنتی بادی هایی که در سیستم ایمنی بدن ایفای نقش می کنند، تصفیه خون و تنظیم دمای بدن.

گلبول های سفید خون به نام لکوسیت شامل دو گروه فاگوسیت ها و لنفوسیت ها هستند. در حالی که فاگوسیت ها سلول های سیستم ایمنی ذاتی را تشکیل می دهند و پس از عفونت به سرعت عمل می کنند، لنفوسیت ها واسطه پاسخ ایمنی اکتسابی هستند. خود فاگوسیت ها را می توان به گرانولوسیت ها (نوتروفیل ها، بازوفیل ها و ائوزینوفیل ها) و مونوسیت ها تقسیم کرد. با افزایش یا کاهش تعداد گلبول های سفید خون بیماری هایی بروز می کنند. به عنوان مثال در بیماری های آلرژیک تعداد بازوفیل ها افزایش می یابد یا در بدخیمی های خونی می توان شاهد افزایش تعداد پیش سازهای سلول های خونی و تغییر شکل و اندازه آنها بود. در دو دهه اخیر، تکنیک های تصویربرداری خودکار از لام های حاوی اسمیر خون توسط

میکروسکوپ‌های متصل به کامپیوتر که قادر به ارزیابی مورفولوژی سلول‌های خونی هستند، معرفی شده‌اند. با پیشرفت تکنولوژی امکان افتراق تعداد سلول‌های خونی طبیعی از غیر طبیعی فراهم شده است.



شکل ۱: پنج نوع از سلول‌های سفید در خون محیطی نرمال

انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی گیمسا

طیف گسترده‌ای از نمونه‌های بافتی و مایعات بدن قابلیت رنگ‌آمیزی با گیمسا را دارند. از جمله این نمونه‌ها می‌توان به نمونه‌های خون تازه یا ضد انعقادی در EDTA، مغز استخوان، خلط، ادرار، بیوپسی آسپیراسیون از مغز استخوان، برش‌های بافتی تازه، فیکس شده با پارافین مثل بیوپسی معده، بافت دستگاه تولیدمثل، گره‌های لنفاوی یا بافت لنفوئید، نمونه طحال و لوزه اشاره نمود.

در این مقاله به یک مورد از پروتکل‌های ستاپ شده رنگ‌آمیزی اختصاصی گیمسا می‌پردازیم.

پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی گیمسا در بافت‌شناسی

در رنگ‌آمیزی گیمسا، رعایت دقیق دستورالعمل‌ها برای به دست آوردن نتایج قابل اعتماد با ساختارهای سلولی بسیار متمایز، مهم است. روش‌های رنگ‌آمیزی اسمیر خون و مقاطع بافتی دارای تفاوت‌هایی هستند که در اینجا شرح داده می‌شوند.

مراحل آماده سازی نمونه بافتی در رنگ‌آمیزی اختصاصی گیمسا

هنگامی که نمونه مورد بررسی بخشی از بافت است ابتدا می‌بایست بافت طی چندین مرحله فیکس و برش زده شود.

۱. آبیگری بافت: مرحله آبیگری بافت اولین مرحله پروتکل، پس از تحویل نمونه به آزمایشگاه است که نمونه های بافتی در اتانول غوطه ور می شوند. اتانول جایگزین آب در سلول های نمونه بافتی می شود. از افزایش غلظت اتانول (معمولاً از ۷۰ تا ۱۰۰٪) در این مراحل استفاده می شود.
۲. قالب گیری بافت: پس از آبیگری، پارافین مذاب با دستگاه پارافین دیسپنسر در تیشوبسکت ها می ریزیم. تکه های بافت را در تیشوبسکت حاوی پارافین مذاب قرار داده و قالب گیری کرده و اضافه های پارافین را حذف می کنیم نهایتاً بلوکهای پارافینی جامد از بافت داریم. پارافین که منجمد شد می بایست آن را از قالب جدا کنیم.
۳. برش گیری از بلوک پارافینی: در این مرحله از نمونه پارافینی با دستگاه میکروتوم برشهای نازک در حد کمتر از ۱۰ میکرون تهیه می کنیم. چندین برش اولیه را دور می ریزیم و از سطح مقطع میانی بافت برش تهیه می کنیم.
۴. آبدهی نمونه برش زده: برش های نمونه بافتی را روی لام قرار داده و سپس پارافین های اضافی نمونه ها را با دستگاه گرمکن اسلاید حذف می کنیم تا برش بافتی صاف و بدون چروکیدگی روی لام قرار گیرد و نهایتاً با غلظت های مختلف از اتانول (غلظت زیاد به کم) نمونه ها را آبدهی می کنیم.
۵. هنگامی که نمونه موردنظر، خون باشد نیازی به انجام مراحل ذکر شده نیست و می بایست اسمیری از نمونه خون روی لام تهیه کنیم و اجازه دهیم اسمیر در محیط آزمایشگاه خشک شود و سپس رنگ آمیزی را انجام دهیم.
۶. اکنون لام های آماده شده را طبق پروتکل رنگ آمیزی پاپ رنگ می کنیم.

مراحل رنگ آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی گیمسا

۱. جهت تهیه استوک اصلی گیمسا، ۷٫۶ گرم از پودر رنگ گیمسا را به ظرف تیره حاوی ۵۰۰ سی سی متانول اضافه نموده و ۵۰۰ سی سی گلیسرین را به آن اضافه کرده و ظرف را در آون با دمای ۳۷ درجه یا روی شیکر قرار می دهیم تا رنگ به آرامی حل شود و پس از آن محلول رنگی را با کاغذ صافی واتمن فیلتر کرده و در محیط آزمایشگاه (۱۸-۲۶ درجه سانتی گراد) نگهداری می کنیم. مقادیر دقیق مواد جهت تهیه استوک بر اساس پروتکل سازنده پودر گیمسا و ستاپ آزمایشگاه انجام دهنده می باشد.
۱. اگر گیمسا بصورت محلول در دسترس باشد طبق پروتکل تولید کننده، جهت تهیه working solution تازه رقیق سازی انجام می شود. عمدتاً ترکیبات رنگ گیمسا شامل رنگ متیلن بلو، متانول و پایدارکننده (Stabilizer) می باشد.

۲. رنگ آمیزی گیمسا را می توانیم طبق دو پروتکل با نام های استاندارد و سریع (Rapid) انجام دهیم. تفاوت این دو پروتکل در غلظت های محلول رنگی گیمسا است. در پروتکل استاندارد، working solution ۳ درصد از استوک اصلی رنگ تهیه می کنیم و در پروتکل رپید یا سریع، با working solution ۱۰ درصد کار می کنیم.
۳. لام های حاوی نمونه های برش زده را ۵ الی ۷ دقیقه در متانول قرار می دهیم تا نمونه روی لام فیکس شود. متانول بعنوان فیکساتور اجازه تغییر بیشتر در سلولها را نمی دهد و سبب چسبیدن سلولهای نمونه مورد بررسی به لام می گردد. نکته: اگر نمونه مورد نظر خون باشد نیازی به انجام مرحله فیکس کردن نمی باشد.
۴. لام ها را در رک لام میکروسکوپی قرار داده و در محیط آزمایشگاه قرار می دهیم تا با جریان هوا خشک شوند.
۵. لام ها را به مدت ۴۵ الی ۶۰ دقیقه در محلول رنگ گیمسا با غلظت ۳٪ قرار می دهیم. برای غلظت ۱۰ درصد گیمسا، لام ها را ۱۰ الی ۱۵ دقیقه با رنگ انکوبه می کنیم. مدت زمان این مرحله بستگی به غلظت محلول رنگ گیمسا دارد، هر چه غلظت بیشتر باشد زمان انکوبه لام در رنگ کمتر است.
۶. بعد از سپری مدت زمان لازم، لام ها را در رک مخصوص لام قرار می دهیم و لام ها را با آب مقطر به مدت دو دقیقه شستشو می دهیم. pH آب در کلیه مراحل رنگ آمیزی گیمسا بسیار مهم است و می بایست ۷٫۲ باشد.
۷. اکنون نمونه های رنگ شده با گیمسا را می توانیم با میکروسکوپ نوری بررسی کنیم.

تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ آمیزی گیمسا

مواد مورد نیاز

- پودر گیمسا
- متانول
- گلیسرین
- آب مقطر
- بافر PBS
- کاغذ صافی واتمن (Whatman filter paper)

تجهیزات مورد نیاز

- آون یا فور
- دستگاه میکروتوم
- شیکر
- دستگاه پارافین دیسپنسر
- لام و لامل
- تیشوبسکت
- رک لام میکروسکوپی

تفسیر نتایج رنگ آمیزی گیمسا

رنگ آمیزی گیمسا ترکیبی از رنگ‌های متیلن بلو و محصولات اکسیداتیو آن، آزور A و آزور B و رنگ اسیدی به نام ائوزین تشکیل شده است که منجر به تمایز اجزای مختلف سلولی و انواع سلولها با رنگ های متنوع در نمونه مورد مطالعه می‌شود.

گلبول‌های قرمز: صورتی

هسته‌های لکوسیت: آبی/بنفش

پلاکت‌هایی با سیتوپلاسم بنفش تیره حاوی گرانول‌های بنفش - قرمز

هسته سلول: آبی تیره

سیتوپلاسم لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها: آبی کم رنگ

گرانولهای نوتروفیل: بنفش

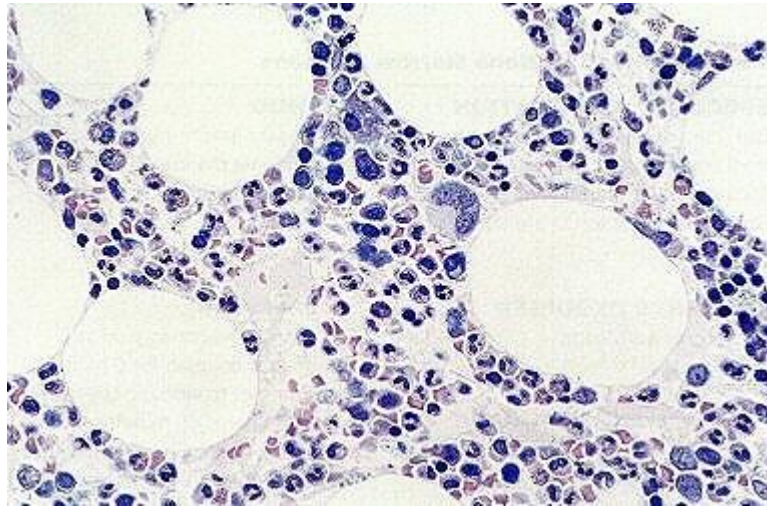
گرانول ائوزینوفیل: نارنجی و صورتی

گرانول های بازوفیل: سیاه - بنفش

اریتروسیت ها: صورتی

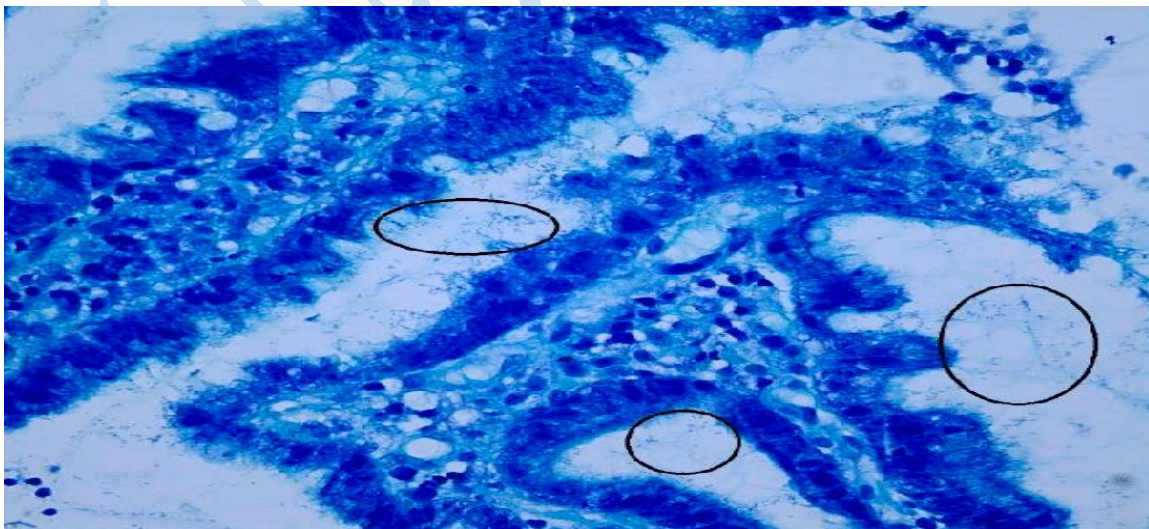
بافت همبند: صورتی تا بنفش روشن

در تصویر زیر، رنگ آمیزی برشی به ضخامت ۲ میکرومتر از مغز استخوان انسان با گیمسا را نشان می‌دهد. ابتدا نمونه بافتی با ترکیب HCL/EDTA کلسیم زدایی شده است.



شکل ۲: نمونه مغز استخوان رنگ آمیزی شده با گیمسا

از رنگ آمیزی گیمسا در پاتولوژی، برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در نمونه بیوپسی معده استفاده می‌شود. هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری رایج معده انسان است و کلونیزاسیون طولانی مدت با ایجاد گاستریت آتروفیک، زخم معده و سرطان معده مرتبط است.



شکل ۳: تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در بیوپسی معده بیمار مبتلا به سرطان گاستریک. نواحی مشخص شده با دایره مشکی، باکتری پیلوری متصل شده به سلول‌های اپیتلیال گاستریک را نشان می‌دهد.

ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی پاپ اسمیر در آزمایشگاه بافت شناسی

اگرچه دامنه تکنیک های آزمایشگاهی جهت مطالعه و بررسی انواع بافت های بدن موجودات گسترده است، اما اغلب دقیق ترین و قابل استنادترین اما متداول ترین تکنیک های تحقیقاتی هستند که برای تشخیص و مطالعه انواع بیماری ها کارآمد هستند. از این رو بسیاری از تست های آزمایشی از جمله انواع رنگ آمیزی ها در آزمایشگاه بافت شناسی جزئی از همین تکنیک ها هستند.

آزمایشگاه پاتولوژی شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد در حوزه تحقیقات بافت شناسی توانسته است یک پنبلی از انواع تست های رنگ آمیزی مانند رنگ آمیزی اختصاصی گیمسا، تری کروم ماسون، اوپل رد، گلژی، نقره و غیره برای مطالعه انواع نمونه های بیولوژیکی به دانشجویان، محققان و اساتید ارائه دهند. علاوه بر این نتایج حاصل از آنالیز را به همراه پروتکل های انجام تکنیک به محقق تحویل داده و همچنین فرصت شرکت در کارگاه های آموزشی رایگان و پاسخ به سوالات مرتبط با طرح پژوهشی برای محقق فراهم شده است.

جمع بندی

ارزش انواع رنگ ها و تست ها در پاتولوژی مدتهاست که تایید شده است، اما تعداد کمی از پاتولوژیست ها به دلیل مشکلات ستاپ رنگ ها و ترابلسوتینگ های روش انجام تکنیک، به طور مداوم در بخش های بافت شناسی موفق بوده اند. رنگ آمیزی گیمسا که سبب رنگ آمیزی افتراقی قابل تکرار برش های بافتی می شود به ویژه برای بررسی بافت های خون ساز مطلوب است. رنگ گیمسا به علت توانایی برتر آن، در رنگ آمیزی مغز استخوان، پلاسماسل ها و ماست سل ها معمولاً در هماتولوژی و پاتولوژی استفاده می شود. همچنین برای شناسایی انگل های خونی بسیار مورد توجه است.

سوالات متداول

۱. رنگ آمیزی گیمسا برای تشخیص کدام میکروارگانیسم در خون استفاده می شود؟
رنگ آمیزی گیمسا تکنیکی استاندارد جهت تشخیص انگل مالاریا در اسمیرهای خونی کاربرد دارد.
۲. چند نوع رنگ در تکنیک رنگ آمیزی گیمسا کاربر دارد؟

گیمسا از یک رنگ پایه (متیلن بلو) برای رنگ آمیزی هسته ها و یک رنگ اسیدی (ائوزین) برای رنگ آمیزی اجزای سلول مانند سیوپلاسم تشکیل شده اند.

مرکز پژوهشی جامع علوم پایه
پزشکی
شرکت دانش بنیان بافت و ژن
پاسارگاد

Email: histogenotechlab@gmail.com

www.histogene.ir

www.histogene.co



۰۹۲۲۶۳۸۳۳۴۱