

روش استاندارد رنگ آمیزی تریکروم : (Trichrome Stain)

مقدمه :

عفونتهای انگلی علائم بسیار متنوعی از قبیل اسهال، درد شکم، تب و لرز، درد عضلات، ائوزینوفیلی، تکرر و وجود خون در ادرار، درگیبری سیستم اعصاب مرکزی، کاهش وزن، پنومونی گذرا، آبسه های فضاگیر، کیست و غیره ایجاد می کنند. بنابراین با توجه به علائم غیر اختصاصی ایجاد شده توسط انگلهای مختلف و نیز با توجه به طولانی شدن فاصله زمانی بین عفونت و ظهور مراحل تشخیصی، بیشتر بیماریهای انگلی تنها بوسیله معاینه فیزیکی تشخیص داده نمی شوند و آزمایشگاه نقش مهمی را جهت تشخیص عفونت و در نهایت انتخاب یک داروی مناسب جهت درمان ایفا می کند.

در مواردی ممکن است با تجربه ترین افراد، نوتروفیلهای موجود در نمونه آماده شده در سرم فیزیولوژی راباکیست آمیب اشتباه نمایند که در واقع با این تشخیص بیماری شخص به غلط به سبب وجود انگل تشخیص داده می شود و از طرفی درمان غیر ضروری با داروهایی که اثرات جانبی فراوان دارند، انجام می گیرد. بنابراین انجام آزمایش باروش استاندارد بوسیله خصوص استفاده از روشهای رنگ آمیزی در مورد تک یاخته ها بیش از پیش لازم است تا بتوان به نتایج صحیحی دست یافت و در عین حال انجام آزمایش نیز برای بیمار بیهوده نباشد.

رنگ آمیزی باروش تریکروم یک روش ساده و سریع است که به طوریکه نواخت انگلهای سلولها، قارچها و عناصر دیگر را رنگ می کند، به نحویکه بتوان کروماتین و سیتوپلاسم انگل را از هم افتراق داد. سیتوپلاسم تروفوزوئیت به رنگ سبز-آبی و بعضی مواقع مایل به بنفش، کیستها به رنگ بنفش، هسته و عناصری مانند اجسام کروماتوئید، گلبولهای قرمز و باکتریها و نیز کریستالهای شارکوت لیدن به رنگ قرمز و بعضی مواقع مایل به بنفش مشاهده می گردد. گلیکوژن موجود در انگل به وسیله فیکساتیو حل گردیده و ناحیه شفاف رادر سیتوپلاسم ایجاد می کند. زمینه گسترش سبزرنگ بوده که مخالف رنگ انگل می باشد و باعث سهولت در تشخیص می گردد.

طریقه تهیه نمونه :

نمونه مدفوع باید تازه و بدون فرمالین باشد. یک سوسپانسیون از مدفوع با سرم فیزیولوژی و چند قطره سرم اسب ، سرم انسان و یا آلبومین درست می کنیم ، که مخلوط روی لام بچسبند. می توان گسترش را به نحوی آماده نمود که قسمتی از آن ضخیم و قسمت دیگر آن نازک باشد. اندازه گسترش باید به اندازه لامل باشد، زیرا قسمتهای اضافی خشک می شود. از نمونه بوسیله اپلیکاتور و باروش غلتانیدن می توان گسترش تهیه نمود.

در مواردی که نمونه مدفوع بوسیله فیکساتیو PVA فیکس گردیده، باید اضافه فیکساتیو گسترش تهیه شده را بوسیله حوله کاغذی به مدت ۳ تا ۵ دقیقه گرفت و سپس اجازه داد که در هوا خشک شود.

همچنین می توان جهت چسبندگی بیشتر مدفوع، گسترش را به مدت حدود ۴ دقیقه در ۶۰ درجه سانتیگراد در روی دستگاه گرم کننده اسلاید گذاشت و یا گسترش تهیه شده را جهت خشک شدن در انکوباتور ۳۵ تا ۳۷ درجه به مدت یک ساعت قرار داد و همچنین می توان اسلاید رایک شب در حرارت اطاق

قرارداد. برای فیکس کردن، نمونه ها نباید بآب، سرم فیزیولوژی و یا فرمالین مخلوط گردد. باید توجه نمود که جهت رنگ آمیزی کاملاً گسترش خشک شده باشد.

مواد و معرفهای لازم :

• فیکساتیو شاولدین:

محلول آبی اشباع کلرومر کوریک :

طریقه تهیه: کلرومر کوریک ($HgCl_2$) - ۱۱۰ گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر

در زیر هود مخلوط فوق را بجوشانید تا کلرومر کوریک حل شود و سپس صبر کنید تا کریستال تشکیل و محلول به حالت اشباع در آید.

طریقه تهیه فیکساتیو شاولدین: محلول آبی اشباع کلرومر کوریک - ۶۰۰ میلی لیتر، الکل اتیلیک ۹۵٪ - ۳۰۰ میلی لیتر

قبل از استفاده فوراً به ازای ۱۰۰ میلی لیتر محلول ذخیره فوق، ۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه نمایید. محلول محتوی اسید استیک به مدت ۲ هفته پایدار می باشد.

• الکل ۷۰٪

• الکل ۷۰٪ با محلول ید جهت نمونه های فیکس شده با ترکیبات کلرومر کوریک

طریقه تهیه محلول ذخیره ید: حدود ۲ تا ۳ گرم کریستال ید را به ازای ۱۰۰ میلی لیتر محلول به الکل ۷۰٪ اضافه نمایید تا محلول تیره رنگی بدست آید.

طریقه تهیه محلول کاری: موقع استفاده با الکل ۷۰٪ از محلول ذخیره، محلول کاری را با رنگ قرمز - قهوه ای و یا رنگ چای پررنگ تهیه نمایید. معمولاً این محلول تا مدتی پایدار است. جایگزینی محلول بستگی به تعداد گسترش رنگ شده، اندازه محفظه، و مدت زمان قرار گرفتن در معرض نور دارد که معمولاً از یک هفته تا چند هفته متغیر می باشد.

• رنگ تری کروم :

طریقه تهیه: کروموتروپ 2R : ۶ گرم - اسید فسفو تنگستیک : ۷ گرم - لایت گرین: ۱/۵ گرم

فست گرین: ۱/۵ گرم - اسید استیک گلاسیال: ۱۰ میلی لیتر - آب مقطر: ۱۰۰۰ میلی لیتر

رنگ تری کروم را در ظرف خشک ریخته و ۱۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه نموده و مخلوط می نماییم و در ظرف رابا کاغذ آلومینیوم می بندیم تا مواد ترکیب شوند. بعد از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و خوب مخلوط می نماییم تا حل گردد. رنگ محلول بنفش می باشد. رنگ را در ظروف پلاستیکی و یا شیشه ای ذخیره کنید. نیمه عمر رنگ تا ۲۴ ماه می باشد، اما تا زمانی که کیفیت مطلوبی داشته باشد، می توان استفاده نمود.

• محلول اسید- الکل :

طریقه تهیه : به آهستگی ۹۹/۵ میلی لیتر اتانول را به ۰/۵ میلی لیتر اسیداستیک گلاسیال اضافه نموده و مخلوط می نمایم.

• الکل مطلق (۱۰۰٪)

• گزیل و یادگر محلولهای جانشین شونده آن به دلیل رعایت اصول ایمنی

مراحل رنگ آمیزی :

این روش جهت نمونه های تازه و بانمونه های فیکس شده در ترکیبات بدون کلرومرکریک کاربرد دارد.

باید توجه نمود که در هر مرحله رنگ آمیزی باید انتهای لام را با حوله کاغذی به مدت ۲ ثانیه تماس داد تا اضافه مایع گرفته شود. این عمل باعث جلوگیری از تداخل مواد و نیز رقیق شدن محلول ها می گردد.

۱- به محض تهیه گسترش از نمونه تازه و قبل از اینکه خشک شوند ، لامها را به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در فیکساتیو شادین قرار می دهیم. این مرحله خیلی مهم است، زیرا اگر نمونه به خوبی فیکس نشده باشد، تک یاخته ها خوب رنگ نشده و بابه رنگ قرمز مشاهده می گردند.

۲- سپس لامها را داخل الکل ۷۰٪ به مدت ۵ دقیقه قرار می دهیم .

۳- سپس لام را داخل محلول دوم الکل ۷۰٪ به مدت ۳ دقیقه قرار می دهیم. حتی به مدت یک شب و مدت زمان بیشتری می توان لامها را داخل این محلول نگه داشت.

۴- لام را داخل رنگ تریکروم به مدت ۱۰ دقیقه نگهدارید.

۵- لام را داخل محلول اسید-الکل به مدت ۱ تا ۳ ثانیه قرار دهید. سریعاً مرحله بعدی را انجام دهید تا گسترش در تماس بیشتر با محلول اسید-الکل قرار نگیرد.

۶- چندین دفعه لام را در محلول اتانول ۱۰۰٪ شست و شو دهید.

۷- لام را در محلول اتانول ۱۰۰٪ به مدت ۳ دقیقه قرار دهید. لام را میتوان در این محلول به مدت ۲۴ ساعت قرارداد بدون اینکه زبانی متوجه کیفیت رنگ آمیزی انگل گردد.

۸- لام را مجدداً در محلول اتانول ۱۰۰٪ به مدت ۳ دقیقه قرار دهید

۹- لام را در گزیل و یا دیگر محلولهای جانشین آن به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار دهید.

۱۰- لام را مجدداً در گزیل و یا دیگر محلولهای جانشین آن به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار دهید.

گسترش را با استفاده از یک قطره کانادا با الزام به نحوی مونته می نمایم که بین لام و لامل حباب تشکیل نشود.

باید لامها را روی یک سطح مسطح قرارداد تا کاملاً خشک شوند. معمولاً مدت زمان زیادی لازم است تا گسترشها کاملاً خشک شوند، اما قبل از خشک شدن کامل می توان آنها را بررسی نمود.

- در مورد نمونه هایی که در محلول فیکساتیو پلی وینیل الکل و شادین قرار گرفته اند، باید کلرورمر کوریک موجود در این ترکیبات در هنگام رنگ آمیزی استخراج گردد، زیرا این ترکیب می تواند به علت بازتاب نوراز باقیمانده ذرات آن مانع تشخیص ارگانیسما گردد. بنابراین نمونه های فیکس شده توسط این دو محلول را باید در ابتدا و در اولین مرحله داخل محلول الکل - ید به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار داد تا کلرورمر کوریک از گسترش خارج گردد و سپس بقیه مراحل را از مرحله قرار دادن لام در رنگ تریکروم ادامه می دهیم.
- اگر رنگ سبز در گسترش رنگ آمیزی شده به طور غالب مشاهده گردد، علت آن می تواند به دلیل عدم برداشت ید بوسیله محلول الکل باشد. بنابراین باید زمان نگهداری لام را در محلول الکل طولانی تر کرده و با تعداد مراحل نگهداری در الکل را بیشتر نمود. همچنین علت دیگر آن می تواند به دلیل رنگ بری بیش از حد در شست و شو با اسید - الکل باشد
- در مراحل انتهایی آب گیری، باید حتی الامکان اتانول ۱۰۰٪ و گزیل عاری از آب باشند. باید در تمامی ظروف کاملاً بسته باشد، تا مایعات بخار نشده و همچنین رطوبت جذب نکنند. اگر محلول گزیل کدر شد، باید تعویض گردد.
- اگر گسترش تهیه شده بعد از رنگ آمیزی، لایه لایه و یا به عبارتی از روی لام برداشته شود، مشخص می گردد که گسترش به اندازه کافی روی لام خشک نشده است. (به خصوص در مورد نمونه های تهیه شده در PVA این موضوع صدق می کند) و یا ممکن است سطح لام چرب باشد که باید قبل از تهیه گسترش تمیز گردد.
- اگر گسترش تهیه شده به خوبی رنگ نگرفته باشد و نمونه دیگری نداشته باشید، می توان گسترش را رنگ بری و مجدداً آن را رنگ آمیزی نمایید. بدین ترتیب که در ابتدا لام را داخل محلول گزیل قرار می دهیم تا لامل آن برداشته شده و در عین حال مراحل آب گیری را برعکس شروع می کنیم. یعنی در ابتدا داخل اتانول ۵۰٪ گذاشته و سپس لام را جهت رنگ بری داخل اسید استیک ۱۰٪ به مدت چند ساعت نگهداری نموده و سپس آن را کاملاً در آب و بعداً در اتانول ۵۰٪ و ۷۰٪ شست و شوداده و سپس لام را داخل رنگ تریکروم به مدت ۸ دقیقه قرار می دهیم و مراحل رنگ آمیزی را کامل می نماییم.

نتایج :

این رنگ آمیزی جهت تخم کرمها و لاروها توصیه نمی شود هر چند که ممکن است این عناصر در بعضی موارد تشخیص داده شوند. بنابراین در این موارد، آزمایش مستقیم با تهیه لام مرطوب توصیه می گردد.

همچنین معمولاً کیست و تروفوزوئیت بالانتیديوم کلی و اووسیست ها رنگ نمی گیرد. در این رنگ آمیزی مخمرها شامل سلول، جوانه و میسیلیوم کاذب و نیز سلولهای انسانی شامل ماکروفاژ، سلولهای چندهسته ای، گلبولهای قرمز و سلولهای اپی تلیال تشخیص داده می شوند. (تکنیک جوانه و میسیلیوم کاذب مخمرها در مدفوع تازه که فوراً آزمایش نشده و یا در ماده نگهدارنده قرار نگرفته است، ادامه می یابد)

جهت مشاهده اووسیست انگلها، رنگ آمیزی اسید- فست توصیه می گردد. جهت تشخیص تک یاخته میکروسپوریدیانیز باید از رنگ آمیزی تریکروم اصلاح شده (Modified Trichrome) استفاده نمود.

گزارش نتایج :

نام انگل باید به طور کامل گزارش گردد، به طورمثال :

Giardia lamblia cysts present.

با استفاده از عدسی روغنی (بزرگنمایی $\times 1000$) و با محاسبه میانگین تعداد انگل در ۱۰ زمینه، تعداد تک یاخته و نیز تعداد سلولها، قارچ، و دیگر عناصر را می توان گزارش نمود.

تعداد کمتر یا مساوی ۲ Few

تعداد بین ۳ تا ۹ Moderate

تعداد بیشتر یا مساوی ۱۰ Many

معمولاً گزارش نیمه کمی تعداد تک یاخته جهت انگل بلاستوسیسیتیس هومینیس کار برد دارد که با مقادیر

Many, Rare, Few, Moderate گزارش می گردد و معمولاً انگلهای دیگر جز در موارد انجام آزمونهای مهارتی (PT) = Proficiency Testing به صورت نیمه کمی گزارش نمی گردند.

معمولاً تعداد سلولها به صورت نیمه کمی گزارش می گردند :

Moderate WBCs, Many RBCs, Few macrophages, rare Charcot-Leyden crystals.

معمولاً سلولهای مخمر به صورت نیمه کمی گزارش می شوند :

Moderate budding cells, and few pseudohyphae.

لامهای مثبت را جهت اهداف آموزشی و یا مراجعه مجدد با درج نام، شماره بیمار و نوع تک یاخته نگهداری نمایید. معمولاً می توان لامهای رنگ شده را برای ماهها و حتی سالها نگهداری نمود.

References :

- 1- Procedures for the Recovery and Identification of Parasites from the intestinal Tract: Approved Guideline, Second Edition. (2006) .Clinical and Laboratory Standards Institute = CLSI/NCCLS . M28- A2.
Vol : 25. No : 16. ISBN : 1-56238-572-0
- 2- Lynne Shore Garsia .(2001).Diagnostic Medical Parasitology. fourth Edition. Pub : ASM press .
ISBN : 1-55581-200-7
- 3- Elmer W. Konman; et al. (1997). color Atlas and Diagnostic Microbiology
Fifth Edition. pub: lippincott Williams & Wilkins. ISBN: 0-397-51529-4

گردآورنده : دکتر شهلا فارسی

دی ماه ۱۳۸۶