

## مقایسه چهار روش در آزمایش‌های روزمره برای تشخیص تریکوموناس واژینالیس بمنظور تعیین مناسب‌ترین روش

مجله نظام پزشکی

سال پنجم ، شماره ۵ ، صفحه ۴۳۴ ، ۲۵۳۶

دکتر ایرج مدبر \*

مقدمه :

محققین مانند Morton و Woodcock (۱۹۷۲) فقط يك آزمایش میکروسکوپی ساده را به کشت تریکوموناس ترجیح می‌دهند .  
Lowe (۱۹۷۲) نیز آزمایش میکروسکوپی مستقیم را فقط در مواقعی که تشخیص سریع مورد نظر باشد ، مناسب میدانند .

برای آزمایش میکروسکوپی مستقیم فقط لام تازه تهیه شده را باید آزمایش کرد (McCann ۱۹۷۴) . ولی در درمانگاه‌های ژینوکولوژی با مراجعین نسبتاً زیاد ، انجام آزمایش بلافاصله پس از نمونه برداری از مهبل در مورد همه بیماران تقریباً غیرمقدور می‌باشد . تهیه لام رنگ شده از ترشح مهبل این مزیت را دارد که مدت زمانی که بین گرفتن نمونه و رنگ آمیزی آن ، هر قدر طولانی باشد ، باعث تغییری در نتیجه آزمایش نمیگردد . البته این امر مشروط بر آن است که ثابت کردن لام ، بلافاصله پس از نمونه گیری صحیح انجام گردد . پس از آن حتی میتوان نمونه ثابت شده را به آزمایشگاه دیگری جهت رنگ آمیزی و تشخیص ارسال داشت . در بین روشهای رنگ آمیزی که بطور معمول برای تشخیص تریکوموناس بکار می‌رود ، میتوان Papanicolaou (بوسیله Hughes و همکارانش ۱۹۶۶) و Giemsa (Freeman ۱۹۵۸) و سایر رنگهای Romanowsky (Lowe ۱۹۷۲ b) را نام برد .  
Acridine Orange یا AO ترکیبی است که DNA و RNA را به‌صورت مختلف رنگ آمیزی می‌کند (Von Bertalanff, Bickis ۱۹۵۶) با این نوع رنگ آمیزی ، DNA به رنگ زرد مایل به سبز فلورسانت و RAN به رنگ قرمز روشن تحت نور ماوراء بنفش مشاهده میگردد . در آزمایش‌های بافت شناسی (Cytologic) که با استفاده از AO توسط Dart و Turner (۱۹۵۹) ، بعمل آمد .

پس از کشف Metronidazole برای درمان تریکوموناس واژینالیس بوسیله Durel و همکارانش در سال ۱۹۶۰ ، هنوز مشکل صحت و دقت تشخیص آزمایشگاهی این بیماری لاینحل بود . Hughes و همکارانش از محیط‌های کشت متعدد به این منظور استفاده کردند و رنگ آمیزی‌های مختلفی بکار بردند تا شاید بر تشخیص بالینی این بیماری به کمک وسائل پیرا بالینی صحه نهند . در سال ۱۹۶۸ Rayner محیط FW (Feinberg, whittington ۱۹۵۷) را با محیط (Cysteine, Peptone, Liver, Maltose) = CPLM مقایسه کرد و در نتیجه محیط CPLM را خیلی قابل اطمینان یافت . مقایسه محیط CPLM توسط Lowe در ۱۹۷۲ نیز رجحان این محیط را ، حتی بر محیط SSA (Semi Solid Agar) به اثبات رسانید . Hess در سال ۱۹۶۹ محیط‌های پیش ساخته شده تجاری Oxoid No2 را مناسب‌تر از محیط CPLM برای کشت تریکو موناس یافت . ولی Lowe در سال ۱۹۷۲ این محیط‌های پیش ساخته و مهیا را کم ارزش‌تر از محیط SSA تشخیص داد . Cox و Nicol در سال ۱۹۷۳ محیط FW را بهتر از محیط Oxoid 2 گزارش کردند . بطور کلی باید گفت که تاکنون نتایج متضادی توسط دانشمندان مختلف درباره مقایسه محیط‌های کشت و روش‌های تشخیص میکروسکوپی تریکوموناس انتشار یافته است . مثلاً Lowe (۱۹۷۲) روش‌های آزمایشی را که بطریقه کشت انجام می‌گیرد نسبت به آزمایش‌های میکروسکوپی نمونه‌های تازه پارنگ شده مناسب‌تر میدانند و در این مورد Hess (۱۹۴۹) و McCann (۱۹۷۴) با او هم عقیده می‌باشند . در مقابل ، بعضی از

\* دانشکده پزشکی دارپوش کبیر - دانشگاه تهران .

گردیده بودند ثابت نکردیم و روز بعد از تهیه، آنها را با روش استاندارد (Culling ۱۹۶۳) رنگ آمیزی کردیم و بلافاصله با میکروسکپ فلورسانس زایس (بافیلتر BG12 و فیلترهای ۴۴ و ۵۳ بادیر) مورد آزمایش قرار دادیم (Fripp و همکارانش ۱۹۷۵). پس از اینکه سواب واژینال را روی لام کشیدیم و فروتنی تهیه گردید، سواب را داخل محیط کشتی که شامل ۵ سانتی متر مکعب محیط FW بود انداختیم و در حرارت ۳۶ درجه سانتی گراد در آنکو با تور نگاهداشتیم. ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت پس از قرار دادن محیط کشت در آنکو با تور از هر لوله حاوی محیط کشت و سواب، آزمایش میکروسکپی جهت تجسس تریکوموناس بعمل آمد.

#### نتیجه:

از ۴۹۵ بیمار که مورد آزمایش قرار گرفتند، ۲۳۱ بیمار (۴۷ درصد) آقا با یکی از چهار روش مذکور، تریکوموناس داشتند. در مقایسه روشها، بالاترین رقم مثبت به روش پاپانیکولاو بدست آمد که ۱۷۱ مورد بود.

در رنگ آمیزی باروش AO، ۱۶۴ مورد مثبت یافته شد که اختلاف چشمگیری با نتایج بدست آمده به روش پاپانیکولاو ندارد. ولی اختلاف فاحشی در مورد کشت که فقط ۱۰۹ مورد مثبت و رنگ آمیزی با گیمسا که فقط ۹۵ مورد مثبت یافته گردید، مشاهده شد. در مقایسه‌ای که بین لامهای رنگ آمیزی شده به روش پاپانیکولاو و آزمایش پارازیتولوژیک آن‌ها (Para-Pap) با نمونه‌های برداشت شده از دهانه رحم به روش سیتولوژیک (Cyto-Pap) بعمل آمد، تفاوت فاحشی ملاحظه گردید. در مورد Para-Pap بیست و چهار درصد از ۱۸۲ نمونه و در مورد Cyto-Pap از ۳۱۳ نمونه ۴۰ درصد مثبت بود.

در ۱۸ درصد از نمونه‌های مورد آزمایش به روش Para-pap که مثبت بودند، با همه روشهای دیگری که مورد آزمایش قرار گرفتند نتیجه منفی بود. در مقابل، ۳۰ درصد از نمونه‌های مورد آزمایش به روش Cyto-Pap که مثبت بودند با همه روشهای دیگری که مورد آزمایش قرار گرفتند، نتیجه منفی بود.

#### بحث:

بالاترین درصد موارد مثبت تریکوموناس در آزمایشهای انجام شده به روشهای مختلف یاد شده در بالا، روش تهیه لام از دهانه رحم و رنگ آمیزی پاپانیکولاو می باشد.

یافته‌های بخش میکروبیولوژی دانشکده پزشکی داریوش کبیر دانشگاه تهران با نتایج آزمایش Thin و همکارانش (۱۹۷۵) و Hughes و همکارانش (۱۹۶۶) که روشهای سیتولوژی و بالینی

این دانشمندان متذکر گردیدند که تریکوموناس واژینالیس بصورت مشخص و مخصوص بخود این رنگ را به خود جذب می کند. در این کار تحقیقی آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی داریوش کبیر، مقایسه نتایج رنگ آمیزی AO با سایر روشهای رنگ آمیزی تریکوموناس واژینالیس (گیمسا و پاپانیکولاو) و همچنین کشت روی محیط FW، مورد مطالعه قرار گرفته است.

#### روش کار:

نمونه برداری: سوابهای واژینال از بیماران مراجعه کننده به درمانگاههای بیماریهای زنان و بیماران بستری در بخش زنان دانشکده پزشکی داریوش کبیر و درمانگاههای تنظیم خانواده وزارت بهداشتی تهیه گردید. هر سواب واژینال تهیه شده از فرد مورد آزمایش را در لوله حاوی محلول سرم فیزیولوژیائی سترون در حرارت اتاق نگهداری کردیم (دقت کامل گردید تا حداکثر زمان بین دریافت نمونه تا شروع آزمایش از سه ساعت تجاوز نکند). سواب واژینال ابتدا روی يك لام تمیز کشیده شد. سپس سواب را در ظرف محیط کشت بطریقی که ذکر خواهد شد، قرار دادیم.

پس از اینکه لام بطریق فوق تهیه گردید و خشک شد بلافاصله آن را به مدت يك دقیقه در اتانول مطلق قرار می دهیم. سپس لام را از الکل خارج کرده در معرض هوا می گذاریم تا خشک شود. روز بعد لام را به روش گیمسا رنگ آمیزی می کنیم (يك جزء گیمسارا با ۱۹ جزء بافر فسفات  $M\frac{1}{15}$  با  $PH\ 7/2$  به مدت ده دقیقه رنگ آمیزی می کنیم). در آزمایشهای مکرری که جهت یافتن درجه رقت رنگ و زمان مناسب برای رنگ آمیزی انجام گرفت، ارقام فوق مناسبترین شرایط برای رنگ آمیزی تریکوموناس واژینالیس تشخیص داده شد. پس از این مدت لام را شسته، خشک کرده، زیر میکروسکپ با بزرگ نمایی ۱۶۰ آن را مطالعه می کنیم. در صورتی جواب نمونه مورد آزمایش منفی گزارش می شود که حداقل ۳۰ میدان میکروسکپی مورد آزمایش قرار گرفته باشد. از دهانه رحم ۶۰ درصد بیماران که سواب واژینال از آنها تهیه گردیده بود، آزمایش سیتولوژی نیز بعمل آمد و مثبت یا منفی بودن از نظر عفونت با تریکوموناس واژینالیس یادداشت گردید. در مورد بیماران که انجام آزمایشهای سیتولوژی لازم تشخیص داده نشد از سواب واژینال لام تهیه گردید و در حالی که لام هنوز کاملاً مرطوب بود، آن را با مواد فیکساتیو ثابت کرده سپس باروش پاپانیکولاوی استاندارد (Culling ۱۹۶۳) رنگ آمیزی و برای وجود تریکوموناس مورد آزمایش میکروسکپی قرار دادیم. لامهایی را که برای رنگ آمیزی به روش AO تهیه

روشهای آزمایش سواب واژینال بدست می‌آید. AO يك رنگ اسیدنوکلئیک فلورسانت می‌باشد که تریکوموناس واژینالیس را به رنگ مشخص قرمز آجری باهسته بیضی و به رنگ زرد مایل به سبز مشخص می‌کند. با این نوع رنگ آمیزی با اینکه فلاژل و سایر زوائد سلولی تریکوموناس واژینالیس رنگ را بخود نمی‌گیرند، ولی فلورسانس سیتوپلاسم و هسته آنقدر مشخص کننده تریکوموناس می‌باشد که می‌توان آن را حتی با بزرگ نمایی پائین میکروسکپ نیز تشخیص داد. لامهای تهیه شده ولی ثابت نشده راحتی می‌توان ۱۰ تا ۲۴ ساعت در حرارت اطاق نگهداری کرد، بی‌آنکه از ارزش تشخیصی نمونه کاسته شود.

چنانچه اجباراً زمان زیادی باید بین تهیه لام و رنگ آمیزی آن فاصله باشد، می‌توان از لامهای آغشته به مواد ثابت کننده استفاده کرد. در این صورت می‌توان لام را حتی تا مدت ۵ روز بی‌آنکه در خصائص مرفولوژیک و رنگ آمیزی تریکوموناس تغییری حاصل شود، قبل از رنگ آمیزی نگهداری کرد.

نقطه ضعفی که در این روش وجود دارد این است که پس از رنگ آمیزی لام، نمی‌توان بایگانی کاملی برای همیشه از آن تهیه کرد. سرعت، سادگی و اطمینان در روش رنگ آمیزی با AO به حدی است که می‌توان با اطمینان کامل در آزمایش‌های روزمره برای تشخیص عفونتهای تریکوموناس واژینالیس از آن سود جست.

و کشت را جهت انتخاب بهترین روش با هم مقایسه کرده‌اند، کاملاً مطابقت دارد. ولذا نحوه نمونه‌گیری در این آزمایش بسیار مهم بوده و اهمیت آن برای بدست آوردن جواب مثبت بیش از نحوه رنگ آمیزی می‌باشد. در این مطالعه نتایج مثبت عفونت با تریکوموناس به روش Para-Pap که ۲۴ درصد می‌باشد، مشابه نتایجی است که با روش کشت (۲۲ درصد) و رنگ آمیزی با گیمسا (۱۹ درصد) بدست آمده است. اگرچه بالاترین رقم مثبت از طریق آزمایش به روش Cyto-Pap بدست آمده، با این حال باید متذکر گردید که با روشهای دیگر فقط می‌توان در ۷۰ درصد موارد مثبت آزمایش انجام شده به روش Cyto-Pap دست یافت. در حالی که ۹۳ درصد از موارد را که با روش AO آزمایش و مثبت گزارش گردیده است می‌توان با آزمایش به روشهای دیگر مثبت بودن آنها را تأیید کرد.

در گزارشی که Lowe در سال ۱۹۷۲ منتشر کرد، متذکر گردید که از ۶۶ بیمار که به طریق رنگ آمیزی با پاپانیکولاو برای جستجوی تریکوموناس واژینالیس آزمایش به عمل آمد و مثبت بودند، تکرار آزمایش به روش کشت روی همین بیماران فقط ۶۴ درصد موارد را مثبت نشان داد. در آزمایش به طریق رنگ آمیزی با AO، ۳۳ درصد موارد مثبت مشاهده گردید. اگرچه این درصد کمتر از ارقام مثبتی است که از طریق آزمایش سیتولوژی بدست آمده ولی با این حال بالاتر از درصدی میباشد که آزمایش به روش کشت و سایر

#### REFERENCES :

- 1- Amies, C.R. and Garabedian, M. (1965), Preparation and use of fixative slides for diagnosis of *Trichomonas vaginalis*, *J. Clin. Path.*, 18, 27-30.
- 2- Cox, P.J. and Nicol, C.S. (1973), Growth studies of various strains of *T. vaginalis* and possible improvements in the lab. diagnosis of trichomoniasis, *Brit. J. Vener. Dis.* 49, 536-539.
- 3- Culling, C.F.A. (1963), *Hand book of histopathological techniques*, 2nd. Ed, Butterworths, London.
- 4- Dart, L.H. and Turner, T.R. (1959), Fluorescence microscopy in exfoliate cytology: Report of acridine orange examination of 5491 cases, with comparison by the Papanicolaou technique, *Lab. Invest.* 1513-1522.
- 5- Durel, P., Roiron, V., Siboulet, A., and Barel, L.J. (1960), Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitroimidazole, 8823 RP, *Brit. J. Vener. Dis.* 39, 21-26.
- 6- Feinberg, J. G. and Whittington, M.J. (1957), A culture medium for *Trichomonas Vaginalis* Donne and species of *Candida*. *J. Clin. Path.*, 10, 327-329.
- 7- Freeman, F. (1958), A modified staining technique for *T. Vaginalis*, *Soc. Afr. Med. J.*, 32, 1235.
- 8- Fripp, P. J., Mason, P.R., and Super, H. (1975). A method for the diagnosis of *T. Vaginalis* using Acridine Orange, *J. Parasit.*, (in press).
- 9- Hess, J. (1969), Review of current methods for the detection of *Trichomonas* in clinical material. *J. Clin. Path.*, 22, 269-272.
- 10- Hughes, H.E., Gordon, A.M., and Barr, G.T.D. (1966), A clinical and laboratory study of trichomoniasis of the female genital tract. *J. Obstet. Gynaec. Brit. G.* 73, 821-877.

- 11- Johnson, G and Trussel, R.E. (1943). Experimental basis for the chemotherapy of T. Vaginalis infestations. Proc. Soc. Exp. Bil. (N.Y.), 54, 245\_249.
- 12- Lowe, G. H. (1965), A comparison of current laboratory methods and a new semi solid culture medium for the detection of T. Vaginalis. J.Clin. Path., 18, 432\_434.
- 13- Lowe, G.H. (1972a), A comparison of culture media for the isolation of T. Vaginalis. Med. Lab. Technol, 29, 389\_391.
- 14- Lowe, G.H. (1972b). The laboratory diagnosis of trichomoniasis. In laboratory diagnosis of venereal disease, pp. 40-42. Public Health Laboratory Service Monograph Series No. I. London.
- 15- McCann, J.S. (1974), Comparison of direct microscopy and culture in the diagnosis of trichomoniasis, Brit. J. Vener. Dis., 50, 450-452.
- 16- Morton, R.S, (1972), Metronidazol in the single dose treatment of trichomoniasis in men and women Brit. J. Vener. Dis., 48, 525-527.
- 17- Perl, G. (1972). Errors in the diagnosis of Trichomonas Vaginalis infection. Obstes. and Gynec., 39, 7-9.
- 18- Rayner, C.F.A. (1968). Comparison of culture media for the growth of T. Vaginalis, Brit. J. Vener. Dis., 44, 63-66.
- 19- Thin, R.M.T., Atia, W., Parker, J.O.J., Nicol, C.S., and Canti, G. (1975). Value of Papanicolaou Staining (Under Press).