مقایسه چهـار 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 :

پس از کشف Metronidazole برای درمـان تـریکوموناس واژینالیس‌بوسیله Durel وهمکارانش درسال ۱۹۶۰، هنوزمشکل صحت‌ودقت تشخیص آزمایشگاهی‌این بیماری‌لاینحل‌بود. Hughes وهمکارانش از محیط‌های‌کشت متعدد به‌این منظور استفاده‌کردند ورنگ‌آمیزی‌های مختلفی بکار بردند تا شاید برتشخیص بـالینی این‌بیماری به‌کمك وسائل پیرا بالینی صحه نهند . درسال ۱۹۶۸ Rayner محیط FW (Feinberg, whittington ۱۹۵۷) را با محیط CPLM = (Cysteine, Peptone, Liver, Maltose) مقایسه‌کرد ودرنتیجه محیط CPLM را خیلی قابل‌اطمینان یافت. مقایسه محیط CPLM توسط Lowe در ۱۹۷۲ نیز رجحان این محیط را ، حتی برمحیط SSA (Semi Solid Agar) به اثبات رسانید. Hess درسال ۱۹۶۹ محیط‌های پیش ساخته شده‌تجاری Oxoid No2 را مناسب‌تر از محیط CPLM برای‌کشت تریکو موناس یافت . ولی Lowe در سال ۱۹۷۲ این محیط‌هـای پیش ساخته ومهیا را کم ارزش‌تر از محیط SSA تشخیص داد . Cox و Nicol درسال ۱۹۷۳ محیط FW را بهتر از محیط Oxoid 2 گزارش‌کردند . بطورکلی بایدگفت‌که تـاکنون نتایج متضادی تـوسط دانشمندان مختلف دربـاره مقـایسه محیط‌های کشت و روش‌های تشخیص میکروسکوپی تریکوموناس انتشاریافته است. مثلا Lowe (۱۹۷۲) روشهـای آزمایشی را که بطریقه کشت انجام می‌گیرد نسبت به آزمایش‌های میکرسکپی نمونه‌های تـازه یارنگ شده مناسب‌تر میداند و در این مورد Hess (۱۹۴۹) و McCann (۱۹۷۴) بااوهم عقیده می‌باشند. درمقابل ، بعضی از محققین مانند Morton و Woodcock (۱۹۷۲)فقط یك‌آزمایش میکروسکپی ساده را به کشت تریکوموناس ترجیح میدهنـد . Lowe (۱۹۷۲) نیز آزمایش میکرسکپی‌مستقیم رافقط درمواقعی که تشخیص سریع مورد نظر باشد ، مناسب میداند.

برای آزمایش میکرسکپی مستقیم فقط لام تازه تهیه شده را باید آزمـایش‌کرد (McCann ۱۹۷۴) . ولی در درمانگاههـای ژینوکولوژی با مراجعین نسبتاً زیاد ، انجام آزمایش بلافاصله پس‌ازنمونه‌برداری ازمهبل درمورد همه بیماران تقریباً غیرمقدور می‌بـاشد . تهیه لام رنگ شده از ترشح مهبل این مزیت را دارد که مدت زمـانی‌که بین‌گرفتن نمونه و رنگ‌آمیزی آن، هرقدر طولانی باشد، باعث تغییری درنتیجه آزمایش نمیگردد. البته‌این امرمشروط برآن است‌که ثابت‌کردن لام، بلافاصله پس از نمونه‌گیری صحیح انجام‌گردد . پس از آن حتی میتوان نمونه ثـابت شده را به‌آزمایشگاه دیگری جهت رنگ‌آمیزی وتشخیص ارسال داشت. دربین روشهای رنگ‌آمیزی‌که بطور معمول برای‌تشخیص تریکوموناس بکار می‌رود ، میتوان Papanicolaou (بوسیله Hughes وهمکارانش۱۹۶۶) و Giemsa (Freeman ۱۹۵۸) وسایر رنگهای Romanowsky (Lowe ۱۹۷۲ b) را نام برد. Acridine Orange یا AO ترکیبی است که RNAوDNA را به‌صور مختلف رنگ‌آمیزی می‌کند (Von Bertalanff, Bickis ۱۹۵۶) بااین‌نوع رنگ‌آمیزی، DNA به‌رنگ زرد مایل‌به‌سبز فلورسانت و RAN به رنگ قرمز روشن تحت نورماوراء بنفش مشاهده میگردد . درآزمایش‌های بافت شناسی (Cytologic) که بااستفاده ازAO توسط Dart و Turner (۱۹۵۹)، بعمل‌آمد.

* دانشکده پزشکی داریوش کبیر- دانشگاه تهران.

این‌دانشمندان متذکر گردیدندکه‌تریکوموناس واژینالیس‌بصورت مشخص و مخصوص بخود این رنگ را به‌خود جذب می‌کند.
دراین کار تحقیقی آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی داریوش‌کبیر ، مقایسه نتایج رنگ‌آمیزی AO با سایر روشهای رنگ‌آمیزی‌تریکوموناواژینالیس(گیمساوپاپانیکولائو)وهمچنین کشت روی محیط FW ، مورد مطالعه قرارگرفته است.

روش‌کار :

نمونه‌برداری: 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 بهداری تهیه گردید . هرسواب واژینال تهیه شده از فرد مورد آزمایش را در لوله حاوی محلول سرم فیزیولوژیائی سترون در حرارت اطاق نگهداری کردیم (دقت کامل گردید تا حداکثر زمان بین دریافت نمونه تاشروع آزمایش از سه ساعت تجاوز نکند). سواب واژینال ابتدا روی یك لام تمیز کشیده شد. سپس سواب را در ظرف محیط‌کشت بطریقی‌که ذکرخواهد شد ، قرار دادیم .
پس از اینکه لام بطریق فوق تهیه‌گردید وخشك شد بلافاصله آن را به‌مدت یك دقیقه در اتانول مطلق قرار می‌دهیم . سپس لام را از الکل‌خارج‌کرده در معرض هوا می‌گذاریم تا خشك شود. روز بعد لام را به‌روش‌گیمسا رنگ‌آمیزی می‌کنیم (یك جزء گیمسارا با ۱۹ جزء بافرفسفات $\frac{1}{15}M$ با PH ۷/۲ به مدت ده دقیقه رنگ‌آمیزی می‌کنیم). در آزمایش‌های مکرری که جهت یافتن درجه رقت رنگ وزمان مناسب برای رنگ‌آمیزی انجام گرفت ، ارقام فوق مناسب‌ترین شرایط برای رنگ‌آمیزی تریکوموناس واژینالیس تشخیص داده شد. پس از این مدت لام را شسته، خشك کرده ، زیر میکرسکپ با بزرگ نمائی ۱۶۰ آن را مطالعه می‌کنیم . درصورتی جواب نمونه مورد آزمایش منفی گزارش می‌شود که حداقل ۳۰ میدان میکرسکپی مورد آزمایش قرار گرفته باشد. ازدهانه رحم۶۰ درصد بیمارانی‌که سواب واژینال از آنها تهیه‌گردیده بود ، آزمایش سیتولوژی نیز به‌عمل آمد و مثبت یامنفی بودن از نظر عفونت باتریکوموناس واژینالیس یادداشت گردید. درمورد بیمارانی‌که‌انجام‌آزمایش‌هایسیتولوژی لازم تشخیص داده نشد از سواب واژینال لام تهیه گردیدودرحالی که لام هنوزکاملا مرطوب بود، آن را بامواد فیکساتیو ثابت‌کرده سپس باروش پاپانیکولائوی استاندارد (Culling ۱۹۶۳) رنگ‌آمیزی و برای وجود تریکوموناس مورد آزمایش میکرسکپی قرار دادیم . لامهایی راکه برای رنگ‌آمیزی به روش AO تهیه گردیده بودند ثابت نکردیم و روز بعداز تهیه ، آنها را با روش استاندارد (Culling ۱۹۶۳) رنگ‌آمیزی‌کردیم وبلافاصله با میکرسکپ فلورسانت زایس (بافیلتر BG12 وفیلترهای ۴۴ و۵۳ باریر) موردآزمایش قرار دادیم (Fripp وهمکارانش ۱۹۷۵).
پس‌ازاینکه سواب واژینال‌را روی لام‌کشیدیم وفروتی‌تهیه گردید، سواب را داخل محیط‌کشتی‌که شامل ۵ سانتی مترمکعب محیط FW بود انداختیم ودرحرارت۳۶ درجه‌سانتی گراد درانکوباتور نگاهداشتیم . ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت پس از قرار دادن محیط‌کشت درانکوباتور از هرلوله حاوی محیط کشت وسواب ، آزمایش میکرسکپی جهت تجسس تریکوموناس بعمل آمد .

نتیجه :

از ۴۹۵ بیمار که مورد آزمایش قرار گرفتند ، ۲۳۱ بیمار (۴۷ درصد) اقلا بایکی از چهار روش مذکور ، تریکوموناس داشتند . درمقایسه روشها، بالاترین رقم مثبت به‌روش‌پاپانیکولائو بدست آمدکه ۱۷۱ مورد بود .
در رنگ‌آمیزی‌باروش AO ، ۱۶۴مورد مثبت‌یافته شدکه اختلاف چشمگیری بانتایج بدست‌آمده به روش پاپانیکولائو ندارد . ولی اختلاف فاحشی در موردکشت که فقط ۱۰۹ مورد مثبت و رنگ‌آمیزی باگیمسا که فقط ۹۵ مورد مثبت یافته گردید، مشاهده‌شد.
در مقایسه‌ای‌که بین‌لامهای رنگ‌آمیزی شده به‌روش پاپانیکولائو وآزمایش‌پارازیتولوژیك‌آن‌ها (Para_Pap) بانمونه‌های‌برداشت شده از دهانه رحم به‌روش سیتولوژیك (Cyto_Pap) به‌عمل‌آمد، تفاوت فاحشی ملاحظه گردید. درمورد Para_Pap بیست وچهار درصداز۱۸۲ نمونه ودرمورد Cyto_Pap از۳۱۳ نمونه ۴۰درصد مثبت بود.
در۱۸درصد ازنمونه‌های موردآزمایش به‌روشPara-pap که مثبت بودند ، باهمه روشهای‌دیگری‌که موردآزمایش قرارگرفتندنتیجه منفی بود . در مقابل ، ۳۰ درصد از نمونه‌های مورد آزمایش به روش Cyto-Pap که مثبت بودند باهمه روشهای دیگری‌که مورد آزمایش قرارگرفتند ، نتیجه‌منفی بود.

بحث :

بالاترین درصد موارد مثبت تریکوموناس در آزمایش‌های انجام شده به‌روشهای مختلف یادشده دربالا، روش تهیه لام از دهانه‌رحم ورنگ‌آمیزی پاپانیکولائو می‌باشد .
یافته‌های بخش میکروبیولوژی دانشکده پزشکی داریوش کبیر دانشگاه تهران بانتایج آزمایش Thin و همکارانش (۱۹۷۵) و Hughes وهمکارانش(۱۹۶۶) که روشهای سیتولوژی وبالینی

وکشت را جهت انتخاب بهترین روش باهم مقایسه کرده‌اند، کاملا مطابقت دارد . ولذا نحوه نمونه گیری در این آزمایش بسیار مهم بوده واهمیت آن برای بدست آوردن جواب مثبت بیش از نحوه رنگ آمیزی می‌باشد. دراین مطالعه نتایج مثبت عفونت باتریکوموناس به‌روش Para_Pap که ۲۴ درصد می‌باشد ، مشابه نتایجی است که باروش کشت (۲۲ درصد) ورنگ آمیزی باگیمسا (۱۹ درصد) بدست آمده است. اگرچه بالاترین رقم مثبت از طریق آزمایش به‌روش Cyto-Pap بدست آمده، بااین حال باید متذکر گردید که با روشهای دیگر فقط میتوان در ۷۰ درصد موارد مثبت آزمایش انجام شده به‌روش Cyto-Pap دست یافت . درحالی که ۹۳ درصد ازموارد را که با روش AO آزمایش و مثبت گزارش گردیده است میتوان باآزمایش به‌روشهای دیگر مثبت بودن آنها را تأیید کرد .

در گزارشی که Lowe درسال ۱۹۷۲ منتشر کرد، متذکر گردید که از ۶۶۶ بیمار که به‌طریق رنگ آمیزی باپاپانیکولائو برای جستجوی تریکوموناس واژینالیس آزمایش به‌عمل آمد ومثبت بودند، تکرار آزمایش به‌روش کشت روی همین بیماران فقط ۶۴ درصد مواردرا مثبت نشان داد. درآزمایش به طریقه رنگ آمیزی با AO ، ۳۳ درصد موارد مثبت مشاهده گردید. اگرچه این درصد کمتر از ارقام مثبتی است که ازطریق آزمایش سیتولوژی بدست آمده ولی بااین حال بالاتر از درصدی میباشد که آزمایش به‌روش کشت و سایر روشهای آزمایش سواب واژینال بدست می‌آید . AO یك رنگ اسیدنوکلئیك فلورسانت می‌باشد که تریکوموناس واژینالیس را به‌رنگ مشخص قرمز آجری باهسته بیضی وبه رنگ زرد مایل به سبز مشخص می‌کند. بااین نوع رنگ آمیزی بااینکه فلاژل وسایر زوائدسلولی تریکوموناس واژینالیس رنگ را بخود نمیگیرد، ولی فلورسانس سیتوپلاسم و هسته آنقدر مشخص کننده تریکوموناس می‌باشد که می‌توان آن را حتی بابزرگ نمایی پائین میکرسکپ نیز تشخیص داد . لامهای تهیه شده ولی ثابت نشده راحتی میتوان ۱۰ تا ۲۴ ساعت درحرارت اطاق نگهداری کرد، بی‌آن که از ارزش تشخیصی نمونه کاسته شود .

چنانچه اجبارأزمان زیادی باید بین تهیه لام ورنگ آمیزی آن فاصله باشد ، میتوان از لامهای آغشته بمواد ثابت کننده استفاده کرد . دراین صورت می‌توان لام را حتی تا مدت ۵ روز بی‌آن که در خصائص مرفولوژیك ورنگ آمیزی تریکوموناس تغییری حاصل شود ، قبل از رنگ آمیزی نگهداری کرد .

نقطه ضعفی که دراین روش وجود دارد این است که پس ازرنگ آمیزی لام ، نمیتوان بایگانی کاملی برای همیشه ازآن تهیه کرد. سرعت، سادگی واطمینان در روش رنگ آمیزی با AO به‌حدی است که میتوان بااطمینان کامل در آزمایش‌های روزمره برای تشخیص عفونتهای تریکوموناس واژینالیس از آن سودجست.

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 trichomonasis, 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 trichomonasis with a derivative of nitro_imidazole, 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 tricho_monasis 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 trichomonasis. 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 trichomonasis, Brit. J. Vener. Dis., 50, 450_452.

16- Morton, R.S, (1972), Metronidazol in the single dose treatment of trichomonasis 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).