

مقایسه چهار روش در آزمایش‌های روزمره برای تشخیص تریکوموناس و اژینالیس بمنظور تعیین مناسب‌ترین روش

مجله نظام پزشکی

سال پنجم ، شماره ۵ ، صفحه ۴۳۶ - ۴۳۴

دکتر ایرج مدبر

مقدمه :

محققین مانند Morton و Woodcock (۱۹۷۲) فقط یک آزمایش میکروسکوپی ساده را به کشت تریکوموناس ترجیح میدهند. Lowe (۱۹۷۲) نیز آزمایش میکروسکوپی مستقیم را فقط در مواقعي که تشخیص سریع مورد نظر باشد، مناسب میداند. برای آزمایش میکروسکوپی مستقیم فقط لام تازه تهیه شده را باید آزمایش کرد McCann (۱۹۷۴). ولی در درمانگاههای زینوکولوژی با مراجعین نسبتاً زیاد، انجام آزمایش بلا فاصله پس از نمونه برداری از همبل در مواد همه بیماران تقریباً غیر محدود می‌باشد. تهیه لام رنگ شده از ترشح همبل 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، بلا فاصله پس از نمونه کثیری صحیح انجام گردد. پس از آن حتی میتوان نمونه ثابت شده را به آزمایشگاه دیگری جهت رنگ آمیزی و تشخیص ارسال داشت. درین روشهای رنگ آمیزی که بطور معمول برای تشخیص تریکوموناس بکار می‌رود، میتوان Papanicolaou (بوسیله Hughes و همکارانش ۱۹۶۶) و Giemsa (۱۹۵۸) و Romanowsky (Lowe ۱۹۷۲ b) را نام برد. وسایر رنگهای Acridine Orange یا AO ترکیبی است که RNA و DNA را به صور مختلف رنگ آمیزی می‌کند Von Bertalanffy, Bickis (۱۹۵۶) با این نوع رنگ آمیزی، DNA بدرنگ زرد مایل به سبز فلورسانس و RAN به رنگ قرمز روش تحت نور مأموراء بنفش مشاهده میگردد. در آزمایش‌های بافت‌شناسی (Cytologic) که با استفاده از AO تو مط Dart و Turner (۱۹۵۹)، بعمل آمد.

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

* دانشکده پزشکی داریوش کبیر- دانشگاه تهران.

گردیده بودند ثابت نگردید و روز بعد از تهیه، آنها را با روش استاندارد (Culling ۱۹۶۲) رنگ آمیزی کردیم و بلافاصله با میکروسکوپ فلورسانس زایس (با فیلتر BG12 و فیلترهای ۴۴ و ۵۳ و ۴۶) مورد آزمایش قرار دادیم (Fripp و همکارانش ۱۹۷۵). پس از اینکه سواب و اژینال را روی لام کشیدیم و فروتی تهیه گردید، سواب را داخل محیط کشتی که شامل ۵ ساعتی مترکعب محیط FW بود انداختیم و در حرارت ۳۶ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگاهداشتیم. ۷۲، ۴۸، ۹۶ ساعت پس از قرار دادن محیط کشت در انکوباتور از هر لوله حاوی محیط کشت و سواب، آزمایش میکروسکوپی جهت تعیین تریکوموناس بعمل آمد.

نتیجه:

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

در رنگ آمیزی باروش AO، ۱۶۴ مورد مثبت باقته شد که اختلاف چشمگیری با نتایج بدست آمده به روش پاپانیکولاوی ندارد. ولی اختلاف فاحشی در مورد کشت که فقط ۱۰۹ مورد مثبت باقته گردید، مشاهده شد. آمیزی با گیمسا که فقط ۹۵ مورد مثبت باقته گردید، مشاهده شد. در مقایسه‌ای که بین لامهای رنگ آمیزی شده به روش پاپانیکولاوی و آزمایش پارازیتو‌لوریک آن‌ها (Para-Pap) با نمونه‌های برداشت شده از دهانه رحم به روش سیتو‌لوریک (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، باهمه 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 باهمه روش‌های دیگری که مورد آزمایش قرار گرفتند، نتیجه منفی بود.

بحث:

بالاترین درصد موارد مثبت تریکوموناس در آزمایش‌های انجام شده به روش‌های مختلف یادشده در بالا، روش تهیه لام از دهان در حالت ورنگ آمیزی پاپانیکولاوی می‌باشد.

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

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

روش کار:

نمونه برداری: سواب‌های و اژینال از بیماران مراجعت کننده به درمانگاه‌های بیماریهای زنان و بیماران بستری در بخش زنان دانشکده پزشکی داریوش کبیر و درمانگاه‌های تنظیم خانواده وزارت بهداشت تهیه گردید. هر سواب و اژینال تهیه شده از فرد مورد آزمایش را در لوله حاوی محلول سرم فیزیولوژیکی سترون در حرارت اطاق نگهداری کردیم (دققت کامل گردید تا حداقل زمان بین دریافت نمونه تا شروع آزمایش از سه ساعت تجاوز نکند). سواب و اژینال ابتدا روی یک لام تمیز کشیده شد. سپس سواب را در ظرف محیط کشت بطريقی که ذکر خواهد شد، قرار دادیم.

پس از اینکه لام بطريق فوق فوق تهیه گردید و خشک شد بلافاصله آن را به مدت یک دقیقه در اتانول مطلق قرار می‌دهیم. سپس لام را از الكل خارج کرده در معرض هوا می‌گذاریم تا خشک شود. روز بعد لام را به روش گیمسا رنگ آمیزی می‌کنیم (یک جزء گیمسارا با ۱۹ جزء بافرفسفات $\frac{1}{۱۵}$ PH ۷/۲ با مدت ده دقیقه رنگ آمیزی می‌کنیم). 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 و اژینالیس تشخیص داده شد. پس از این مدت لام را شسته، خشک کرده، زیر میکروسکوپ با بزرگ نمای ۱۶۰ آن را مطالعه می‌کنیم. در صورتی جواب نمونه مورد آزمایش منفی گزارش می‌شود که حداقل ۳۰ میدان میکروسکوپی مورد آزمایش قرار گرفته باشد. از دهانه رحم ۶۰ درصد بیمارانی که سواب و اژینال از آنها تهیه گردیده بود، آزمایش سیتو‌لوری نیز به عمل آمد و مثبت یافته شد. در این قطر عفو نت باتریکوموناس و اژینالیس یادداشت گردید. در مورد بیمارانی که انجام آزمایش‌های سیتو‌لوری لازم تشخیص داده نشد از سواب و اژینال لام تهیه گردید و در حالی که لام هنوز کاملاً مرطوب بود، آن را بامداد فیکساتیو ثابت کرده سپس باروش پاپانیکولاوی استاندارد (Culling ۱۹۶۲) رنگ آمیزی و برای وجود تریکوموناس مورد آزمایش میکروسکوپی قرار دادیم. لامهایی را که برای رنگ آمیزی به روش AO تهیه

روشهای آزمایش سواب و اژینال بدمست می‌آید . AO یک رنگ اسیدنوکلئیک فلورسانس می‌باشد که تریکوموناس و اژینالیس را بدرنگ مشخص قرمز آجری باهسته بیضی و به رنگ زرد مایل به سبز مشخص می‌کند. با این نوع رنگ آزمیزی با اینکه فلاذل و سایر رواهدسلولی تریکوموناس و اژینالیس رنگ را بخود نمیگیرد، ولی فلورسانس سیتوپلاسم و هسته آنقدر مشخص کننده تریکوموناس می‌باشد که می‌توان آن را حتی بازرگ نمایی پائین میکرسكپ نیز تشخیص داد. لامهای تهیه شده ولی ثابت نشده راحتی میتوان ۱۰۴ ساعت درحرارت اطاق‌نگهداری کرد، بی‌آن که از ارزش تشخیصی نمونه کاسته شود.

چنانچه اجبار ازمان زیادی باید بین تهیه‌لام و رنگ آزمیزی آن فاصله باشد، میتوان از لامهای آغشته بهمود ثابت کننده استفاده کرد. در این صورت می‌توان لام را حتی تا مدت ۵ روز بی‌آن که در خصائص مرفو‌لوژیک و رنگ آزمیزی تریکوموناس تغییری حاصل شود، قبل از رنگ آزمیزی نگهداری کرد.

نقطه ضعی که در این روش وجود دارد این است که پس از رنگ آزمیزی لام، نمیتوان با یک‌انی کاملی برای همیشه از آن تهیه کرد. سرعت، سادگی و اطمینان در روش رنگ آزمیزی با AO بحدی است که میتوان با اطمینان کامل در آزمایش‌های روزمره برای تشخیص عفونتهای تریکوموناس و اژینالیس از آن سودجوست.

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 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 trichomoniasis of the female genital tract. *J. Obstet. Gynaec. Brit. G.* 73, 821-877.

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

در گزارشی که Lowe در سال ۱۹۷۲ منتشر کرد، متذکر گردید که از ۶۶ بیمار که بطریق رنگ آزمیزی با پایه‌پانیکولاو براي جستجوی تریکوموناس و اژینالیس آزمایش به عمل آمد و مثبت بودند، تکرار آزمایش بهروش کشت روی همین بیماران فقط ۶۴ درصد موادردا مثبت نشان داد. در آزمایش به طریق رنگ آزمیزی با AO، ۲۳ درصد موادر 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 بهروش کشت و سایر

- 11- Johnson, G and Trussel, R.E. (1943). Experimental basis for the chemotherapy of *T. vaginalis* infestations. Proc. Soc. Exp. Biol. (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).