Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 21:28 IRDT on Tuesday September 19th 2017

مقایسه روش ایمیونوفلورسنت مونوکلونال آنتی‌بادی مستقیم و رنگ‌آمیزی کاینیون اسیدفاست در تشخیص آزمایشگاهی کریپتوریدیوزیس

*دکتر مهدی شکرآبی I
دکتر هرمزد اورمزدی II
دکتر احمد قمچیلی III
دکتر محسن رضوی IV

چکیده

در حال حاضر کریپتوسپوریدیوم پاروم بعنوان یک عامل بیماریزای reaspeased انسانی و یک از هار عامل بیماریزای روده‌ای مهم مولد اسهالهای مرگبار در افراد مبتلا به نارساییهای ایمنی در سطح جهان مطرح است. در این راستا تشخیص آزمایشگاهی دقیق و سریع عامل بیماریزا می‌تواند در جلوگیری از پیشرفت بیماری نقش مهمی داشته باشد. از اینرو در مطالعه اخیر ایمونوفلورسنت مستقیم با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال کونژوگه بعنوان یک روش تشخیص دقیق، سریع و آسان با روش رنگ‌آمیزی اسیدفاست کاینیون ـ که یک روش رنگ‌آمیزی رایج آزمایشگاهی است ـ مورد بررسی و ارزیابی همه جانبه قرار گرفت. بهمین منظور بمدت ٦ ماه نمونه مدفوع ٣٤٠ فرد سالم، ١٨٥ بیماران تحت شیمی درمانی و ١٧٠ کودکان زیر ١٠ سال مبتلا به اسهالهای طولانی برای تشخیص اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم با دو روش ایمونوفلورسانس و رنگ‌آمیزی فوق‌الذکر مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصله بشرح زیر خلاصه شد:

١- حساسیت، ویژگی، دقت و سهولت در کار با روش ایمونوفلورسانس در مقایسه با روش رنگ‌آمیزی کاینیون ١٠٠٪ بود. ٢- برتری حداقل قدرت تشخیص بوسیله کارشناس با روش ایمونوفلورسانس ٨ برابر روش رنگ‌آمیزی بود. بعبارت دیگر حداقل تعداد اووسیستهای انگل در هر میلی‌لیتر مدفوع مایع برای تشخیص با روش ایمونوفلورسانس مستقیم ٧٥٠٠ عدد بود در حالیکه این رقم با روش رنگ‌آمیزی به ٦٠٠٠٠ عدد می‌رسید. مدت زمان لازم برای تشخیص با روش اول در حدود یک دقیقه و با روش دوم ٥ دقیقه بود. ٣- با روش یک سوکور (Single Blind) برتری چشمگیر مهارت یک کارشناس آزمایشگاه با تجربه در تشخیص اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم ـ که بسیار کوچک و بسادگی با اجرام مشابه قابل اشتباه هستند ـ با استفاده از روش ایمونوفلورسانس نسبت بروش رنگ‌آمیزی نشان داده شد. ٤- در این مطالعه اووسیست از نمونه‌های مدفوع ٠/٧٪ از افراد سالم، ٠/٥٪ از افراد تحت شیمی درمانی و ٤/١٪ از کودکان مبتلا به اسهالهای طولانی مدت جدا گردید. در مواردیکه با تجویز مترونیدازول مسیر بیماریی متوقف گردید، تقویت سیستم ایمنی بیمار حائز اهمیت بود.

کلید واژه‌ها: ١ – فلورسنت آنتی‌بادی مستقیم ٢ – رنگ‌آمیزی کاینیون اسیدفاست ٣ – کریپتوسپوریدیوزیس

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم از تک یاخته‌های انگلی داخل سلولی است که اولین بار در سال ١٩٠٧ در موش شناسایی شد اما

این مقاله خلاصه‌ایست از پایان نامه دکتر احمد قمچیلی جهت دریافت درجه دکترای علوم آزمایشگاهی به راهنمایی دکتر مهدی شکرآبی و تحت مشاوره دکتر هرمزد اورمزدی و دکتر محسن رضوی، خرداد ١٣٧٨؛ همچنین در کنگره سراسری آسیب‌شناسی تهران، آبان ١٣٧٨ ارائه شده است.

استادیار گروه ایمیونولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران(*مولف مسؤول)
II) اسستاد گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران.
III) دکترای علوم آزمایشگاهی
IV) استادیار و فوق تخصص بیماریهای خون و سرطان، بیمارستان حضرت رسول اکرم(ص)، خیابان ستارخان، خیابان نیایش، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران.

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 21:28 IRDT on Tuesday September 19th 2017

از آن تاریخ بمدت تقریباً ۵۰ سال به فراموشی سپرده شد(۱). در سال ۱۹۵۵ بسبب گاستروآنتریتهای خطرناک در جوجه بوقلمونها و از آن ببعد تا سال ۱۹۷۱ بسبب یجاد اسهالهای طولانی مدت و غیرقابل کنترل در گوساله‌ها از اهمیت ویژه در دامپزشکی برخوردار گردید.

در سال ۱۹۷٦ دو مورد کریپتوسپوریدیوزیس انسانی مورد توجه واقع شد(۲، ۳و ۱۲). در دهه ۱۹۸۰ با اشاعه رسمی بیماری ایدز، کریپتوسپوریدیوزیس بعنوان یک تک یاخته پاتوژن بازپدید اهمیت جهانی پیدا نمود.

این انگل ناقله از آب‌های آشامیدنی در سال ۱۹۹۳ موجب بروز اپیدمی چشمگیری در میل‌واکی ویسکانسین آمریکا شد و جمعیت کثیری را گرفتار نمود(٤). با این ترتیب کریپتوسپوریدیوم بعنوان یکی از مهمترین عوامل بهداشتی در جوامع مختلف دنیا اهمیت یافت.

این عامل تنها در آمریکا عامل بیش از ۱۰۰۰۰ مرگ و میر در سال است و بدلیل آنکه داروی مناسب برای درمان این عامل در دسترس نبود بعد از عوامل شایعه ویروسی و باکتریائی از مهمترین تک یاخته‌های بیماریزای روده‌ای، زئونوز و فرصت در انسان است.

از مهمترین تک یاختگان آنتروپاتوژن، زئونوز و فرصت طلب در انسان است. همچنین اهمیت آن در ایجاد عفونتهای خارج روده‌ای بخصوص در مورد مجاری صفراوی، لوزالمعده و ریه نیز نباید از نظر دور بماند(۵و ٦).

از نظر تاکسونومی جنس کریپتوسپوریدیوم از زیر کلاس کوکسیدیاها است و براساس مطالعات انجام شده برروی RNA آن، با پلاسمودیومها قرابت دارد(۷).

اگر چه تا کنون بیش از ۲۰ نوع از جنس کریپتوسپوریدیوم را شناسایی کرده‌اند، آنها را بدو گروه عمده یعنی جنس کریپتوسپوریدیومهای غیر پاروم که مهره‌داران (ماهیها، خزندگان، پرندگان، جوندگان و پستانداران) را آلوده می‌کند و جنس کریپتوسپوریدیوم با ژنوتیپ پاروم که در انسان و مهره‌داران (بخصوص در افراد مبتلا به اختلالات ایمنی، تحت درمان با داروهای سرکوبگر ایمنی و گیرندگان پیوند عضو) موجب اسهالهای حاد، عفونی، طولانی مدت و مرگبار می‌شود(۸). میزان آلودگی آب به اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم از ٦ تا ۱۰۰ درصد متغیر است و تراکم اووسیستها در مناطق آلوده به ۵۸۰۰ عدد در هر لیتر آب آشامیدنی تخمین زده شده است.

این میزان آلودگی در هنگام بارندگی، جاری شدن سیلابها، ششسته شدن سطوح زمین و نفوذ این آبها به منابع و مخازن آبهای کشاورزی و آشامیدنی افزایش می‌یابد(۹). اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم بسبب داشتن غشاء ضخیم خارجی نسبت به عوامل نامساعد محیط زیست بسیار مقاوم می‌باشند و در مناطق گرم و مرطوب برای ماهها زنده و فعال باقی می‌مانند.

انسان علاوه بر آلودگی از طریق آب، از طریق دیگر چون تماس مستقیم با منابع آلوده انسانی و حیوانی و همچنین از طریق (همجنس بازی) به آسانی آلوده می‌شود. در مبتلایان به اختلالات ایمنی بسبب سیکل درونی و عفونت زایی داخلی تک یاخته، بلع حتی ۳۰-۱۰ عدد اووسیست می‌تواند موجب بیماری شود(۱۰).

از آنجائیکه تک یاخته درون سلولی و خارج سلولی سیتوپلاسمی محسوب شده و در فضای پارازیتوفوروس سلولی زندگی می‌کند لذا تاثیر داروها بر آن بسیار ناچیز است و تاکنون درمان دارویی و کنترل این بیماری بصورت یک مشکل عمده باقی مانده با توجه به مطالب ذکر شده، در این مطالعه تشخیص تک یاخته در کودکان اسهالی و بیماران تحت شیمی درمانی بروش ایمونوفلورسانس مستقیم با استفاده از آنتی‌بادی ممونوکلونال کونژوگه با روش رنگ‌آمیزی اسید فاست مقایسه گردید و نکات تشخیصی قابل توجه مورد بحث قرار گرفت.

روش بررسی

مراحلی که در این قسمت از نظر می‌گذرد شامل چگونگی انتخاب بیماران، روشهای انجام آزمایش، تعیین حداقل قدرت تشخیص، مقایسه روشها و ارزشیابی مهارت کارشناس در تشخیص عامل بیماریزا است.

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 21:28 IRDT on Tuesday September 19th 2017

انتخاب بیماران ـ جهت بررسی میزان آلودگی به کریپتوسپوریدیوم پاروم سه گروه افراد بیمار و سالم بشرح زیر و براساس مراجعه آنان به بخش آزمایشگاه بیمارستانهای تابعه دانشگاه در سطح شهر تهران و بمدت شش ماه در نظر گرفته شد و از آنان نمونه مدفوع دریافت گردید که شامل موارد زیر بودند:

الف ـ گروه اول مراجعین سرپایی بظاهر سالم بتعداد ۳٤۰ نفر.

ب ـ گروه دوم مراجعین مبتلا به بدخیمیهای خونی که تحت شیمی درمانی، پیوند مغز استخوان و یا پیوند قرار داشتند؛ بتعداد ۱۸۵ نفر.

ج ـ گروه سوم کودکان زیر ده سال مبتلا به اسهالهای طولانی مدت و مقاوم به درمانهای معمول جمعاً به تعداد ۱۷۰ نفر.

نمونه مدفوع افراد مورد بررسی در ظرف پلاستیکی درب‌دار که حاوی ۱۰ میلی‌ایتر فرمالین ۱۰٪ بود قرار گرفت و به آزمایشگاه انگل‌شناسی مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی دانشگاه منتقل شد.

روش‌های انجام آزمایش ـ در انجام آزمایش برای تشخیص اووسیستها در نمونه‌های مدفوع، دو روش رنگ‌آمیزی کاینیون اسید فاست و فلورسسنت مستقیم بشرح زیر مورد استفاده قرار گرفت:

الف ـ روش رنگ‌آمیزی کاینیون اسید فاست: ۳-۲ میلی‌لیتر از هر نمونه مدفوع به لوله‌های سانتریفوژ ته گرد انتقال یافت و بطریق فرمالین ـ اثر تغلیظ گردید. سپس با استفاده از ۵۰ میکرولیتر از رسوب حاصل یک گسترش نازک بر روی تیغه شیشه‌ای که قبلاً با الکل چربی‌زدایی شده بود تهیه گردید. کنترل کیفی گسترشها به اینصورت بود که خطوط روزنامه در زیر لامها قابل رویت باشد و لذا لامهای ضخیم‌تر و نازکتر، کنار گذارده شدند. چون سرعت رسوب بلاستوسیستیس هومینیس و اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم پاروم یکسان است لذا در تمام مراحل تغلیظ با فرمل ـ اتر، یک نمونه جداگانه که حاوی بلاستوسیستیس هومینیس بود جهت تاثیر کیفیت کار مورد استفاده قرار گرفت. این روش کنترل کیفی تنها براساس تجربه شخصی و در حین کار کسب گردید.

جهت یافتن اووسیستها گسترشهای نازک پس از تثبیت با الکل، رنگ‌آمیزی اسید فاست (کاینیون اسید فاست) و شستشو با بزرگنمایی ۱۰۰۰ و با میکروسکوپ نوری ـ مورد کاوش قرار می‌گرفتند.

بمنظور کنترل دقیق کیفی در هر مرحله از کار ـ که از ویژگیهای این مطالعه بود ـ تا زمان یافتن اولین اووسیست در نمونه مدفوع بیمار، از یک گسترش تائید شده حاوی اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم پاروم بعنوان کنترل خارجی استفاده شد.

بدینصورت که پس از یافتن اووسیستهای مطمئن در نمونه‌های مرضی، بطور همزمان در سریهای بعدی یک نمونه مثبت از یافته‌های از پیش تایید شده بعنوان نمونه کنترل مورد استفاده قرار گرفت. شرط اطمینان به جوابها رنگ گرفتن کامل نمونه‌های کنترل بود. در این رنگ‌آمیزی اووسیستها برنگ قرمز در زمینه آبی دیده می‌شدند. اگر چه روش رنگ‌آمیزی آنهم در تعداد زیاد نمونه‌ها بسیار پرمشقت و وقت‌گیر بود، اما جهت حصول اطمینان، تنها نمونه‌هایی که دارای بیش از یک اووسیست رنگ شده بودند بعنوان نمونه مثبت محسوب شده و ثبت گردیدند. از هر نمونه مدفوع بیمار دو گسترش تهیه و رنگ‌آمیزی می‌گردید.

ب ـ روش ایمونوفلورسانس مستقیم: در این روش بررسی با استفاده از یک کیت ساخت آمریکا ـ مخصوص تشخیص توام کریپتوسپوریدیوم و ژیاردیا ـ انجام شد.

۱- استفاده کیت بصورت توام در تشخیص کریپتوریدیوم و ژیاردیا اختلال تشخیصی را باعث نخواهد شد زیرا:

الف ـ اووسیست کریپتوسپوریدیوم دارای قطر ٦-۲ میکرون است، اندکی نیز بیضی شکل می‌باشد و حاوی یک شیار میانی (suture line) می‌باشد، در حالیکه کیست ژیاردیا ۱۲-۸ میکرون (دو برابر) و دارای دیوار کیستی کاملاً مشخص است که کلیه این مشخصات توسط یک تکنسین مجرب قابل تفکیک است.

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 21:28 IRDT on Tuesday September 19th 2017

ب ـ در اجرای تست بصورت موازی از نمونه کنترلهای مدفوع که حاوی ژیاردیا و کریپتوسپوریدیوم بودند بعنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

در این کار از کلیه نمونه‌های مرضی که در روش رنگ‌آمیزی مورد استفاده قرار گرفته بودند استفاده شد. برابر دستور کارخانه سازنده، یک قطره از هر نمونه که بطریق تغلیظ فرمل ـ اتر تهیه شده بود در میکروپلیتهای مربوط قرار گرفت، همزمان با توزیع نمونه‌های کنترل مثبت و منفی و قرار دادن نمونه‌ها در دمای اطاق بمدت نیم ساعت ـ بمنظور تثبیت شدن و یکسان شدن دمای نمونه‌ها با دمای اطاق ـ آزمایشها ادامه یافت. پس از اضافه نمودن یک قطره آنتی‌بادی ضدکریپتوسپوریدیوم پاروم (آنتی‌بادی مونوکلونال) به حفره میکروپلیت‌های حاوی نمونه مدفوع، یک قطره از معرف رنگی جهت رنگ زمینه اضافه شد و پس از نیمساعت انکوباسیون در یک جار (microplate) مرطوب آزمایشگاهی، پلیت‌ها با محلول بافر (PH=۷) به آرامی شسته شدند و با استفاده از میکروسکوپ ایمونوفلورسانس، همه نمونه‌های مثبت (۱۱ مورد) همراه با نمونه‌های منفی (۲۲ مورد) مجدداً شمارگذاری شدند و بصورت یکسو کور و با استفاده از ایمونوفلورسانس بررسی گردیدند.

ج ـ تعیین حداقل قدرت تشخیص کارشناس: این پدیده که یکی دیگر از نوآوریهای مجریان طرح بود باین طریق انجام شد که ابتدا نمونه‌هایی از مدفوع که حاوی تعداد بیشتری اووسیست بودند با افزودن پتاس ۱۰٪ رقیق شدند و سپس با سانتریفیوژ متوالی و شستشو تغلیظ گردیدند. استفاده از لام نئوبار مخصوص شمارش گویچه‌های سفید و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰، اقدامبه شمارش اووسیستها گردید.

در این طریق پتاس موجب محو باکتریها شد و اووسیستها برابر 10^7 در هر میلی‌لیتر تنظیم گردیدند. سپس از این سوسپانسیون نمونه‌های متوالی با تعداد ۵۰۰۰۰۰، ۲۵۰۰۰۰، ۱۲۵۰۰۰ و ۶۰۰۰۰ اووسیست تهیه شد و از هر محلول دو نمونه و با دو روش رنگ‌آمیزی و ایمونوفلورسانس جهت تشخیص میکروسکوپی آماده گردید. در روش رنگ‌آمیزی رویت هر اووسیست بوسیله کارشناس در مدت کمتر از ۵ دقیقه مثبت تلقی و ثبت می‌گردید. زمان حداقل قدرت تشخیص بطریق ایمونوفلورسانس ۱ دقیقه تعیین شد. این روش تا پایان شمارش اووسیستها ادامه داشت.

نتایج

از مجموعه سه گروه تحت مطالعه از نظر آلودگی به کریپتوسپوریدیوم پاروم ۱۱ مورد مثبت تشخیص داده شد و از مدفوع آنان اووسیست جدا گردید(جدول شماره ۱). از این تعداد یک نفر نیز همزمان آلوده به ژیاردیا لامبلیا بود که کیست‌های این تک‌یاخته تنها با روش ایمونوفلورسانس مشخص گردید.

جدول شماره ۱- میزان آلودگی سه گروه تحت مطالعه به کریپتوسپوریدیوم پاروم

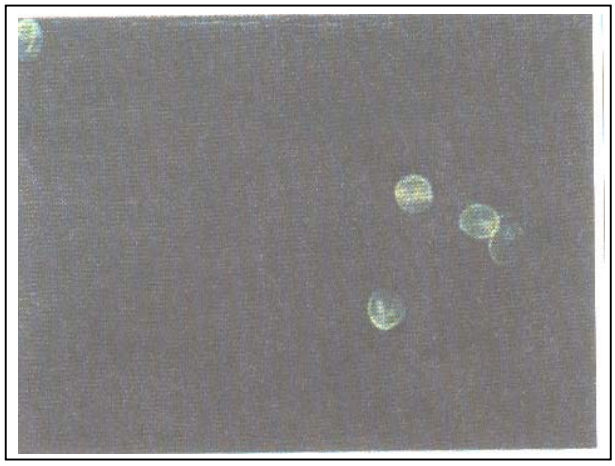
گروه	تعداد افراد مراجعه کننده	تعدا نفرات آلوده	درصد آلودگی
گروه مراجعه کننده سرپایی سالم	۳۴۰	۳	۰/۷
گروه بیماران تحت شیمی درمانی	۱۸۵	۱	۰/۵
گروه اطفال مبتلا به اسهالهای طولانی مدت	۱۷۰	۷	۴/۱
جمع	۶۹۵	۱۱	-

از ۱۱ مورد مثبت، یک کودک شش ساله مبتلا به اسهال مزمن بود که مدت آن به بیش از یکسال می‌رسید. در طی این مدت پاسخ آزمایشهای مدفوع از نظر کریپتوسپوریدیوم منفی بود. ولی علیرغم درمانهای مختلف بهبودی حاصل نمی‌گردید، در سه مورد دیگر از کودکان آلوده همراه با علائم گاستروآنتریت حاد، اسهال، شکم درد، تهوع و

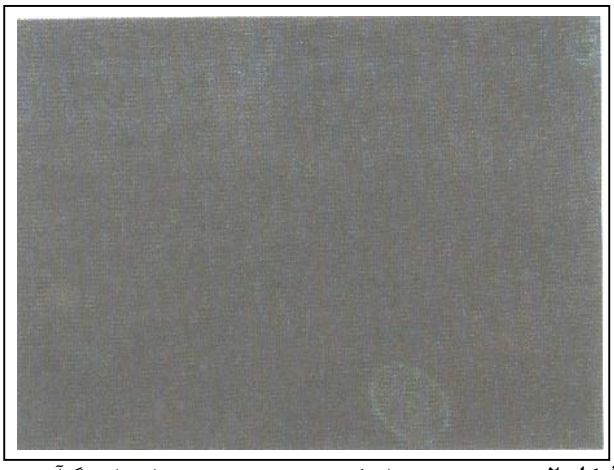
Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 21:28 IRDT on Tuesday September 19th 2017

استفراغ تستهای کبدی بعمل آمده نشان داد که مقادیر ترانس آمیناز و بیلی‌روبین (تام و مستقیم) بالا بود. از بین ٤ کودک مذکور همراه با علائم بالینی مشخص، تنها یک نفر حدود یکماه پس از آغاز بیماری جهت آزمایش مجدد مراجعه نمود. ولی علی‌رغم بهبودی ظاهری هنوز اووسیست دفع می‌نمود ولی در روش اسید فاست پس از سه بار تغلیظ و رنگ‌آمیزی و تهیه لام اووسیستها مشاهده شد در حالیکه با روش ایمونوفلورسانس، در اولین لحظه تشخیص داده شد. سایر بیماران طی این مدت خود بخود و یا با استفاده از داروهای کمکی سلامت خود را بازیافته بودند و نتیجه آزمایش مدفوع آنان منفی بود. در گروه بیماران تحت شیمی درمانی به پیوند، یک مرد ۳۲ ساله گیرنده پیوند کلیه دچار آلودگی بود.

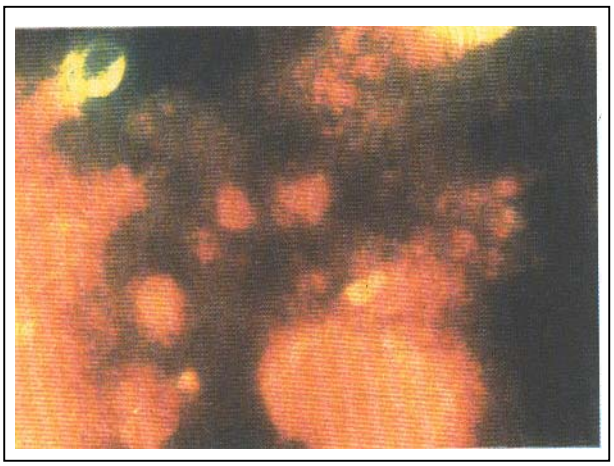
آزمایش کشت مدفوع بیمار منفی بود. ولی علی‌رغم درمانهای مختلف بهبودی نیافته بود. بیمار دچار اسهال، شکم درد، بی‌اشتهایی و ٤ مورد از ۱۱ بیمار فوق فاقد علائم بالینی مشخص بودند و فقط اووسیستهای انگل در مدفوع آنان مشاهده می‌گردید. هر ۱۱ نمونه‌ای که با روش اسیدفاست مثبت تشخیص داده شدند با روش ایمونوفلورسانس نیز مثبت شدند. لیکن راحتی عمل و تشخیص سریع اووسیستها با روش اخیر قابل مقایسه با روش رنگ‌آمیزی نبود. زمینه فلورسانس نیز در هیچ یک از موارد منفی مشاهده نگردید. هیچ مورد جواب کاذب (اعم از مثبت، منفی و مشکوک) در روش ایمونوفلورسانس مشاهده نشد. پاسخهای مثبت در روش ایمونوفلورسانس در زمانی کمتر از ۳۰ ثانیه براحتی حاصل شدند(شکل شماره ۱). در روش اسیدفاست، اووسیستها در بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکوپ اصلاً قابل مشاهده نبودند در حالیکه با روش فلورسانس براحتی قابل تشخیص بودند. با افزایش بزرگنمایی میکروسکوپ به ۱۰۰۰ X بسیاری از خصوصیات مرفولوژیکی اووسیستها قابل تشخیص بود. وجود شیار سراسری بر روی اووسیستها یکی از این ویژگیهای مورفولوژیک آن است. در این روش تشخیص کیست ژیاردیا نیز بسیار آسان بود(شکل شماره ۲و ۳).



شکل ۱– اووسیست کریپتوسپوریدیوم: رنگ‌آمیزی فلورسانس بزرگنمائی ۱۰۰۰ X



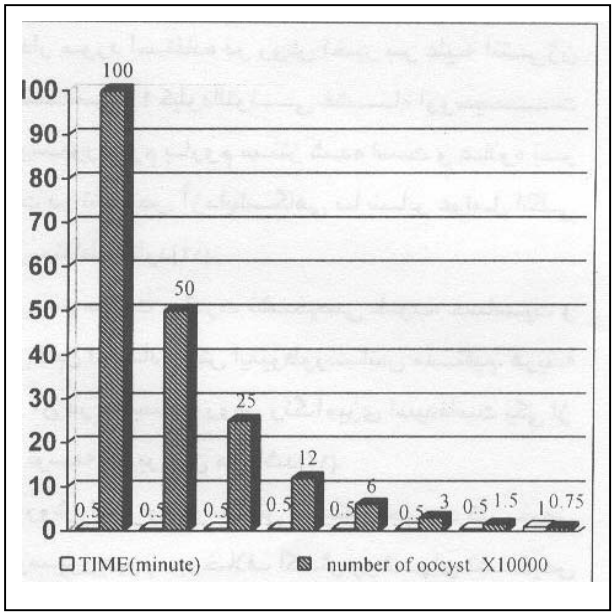
شکل ۲– تشخیص همزمان کریپتوسپوریدیوم و ژیاردیا. رنگ‌آمیزی فلورسانس بزرگنمائی ۱۰۰۰ X



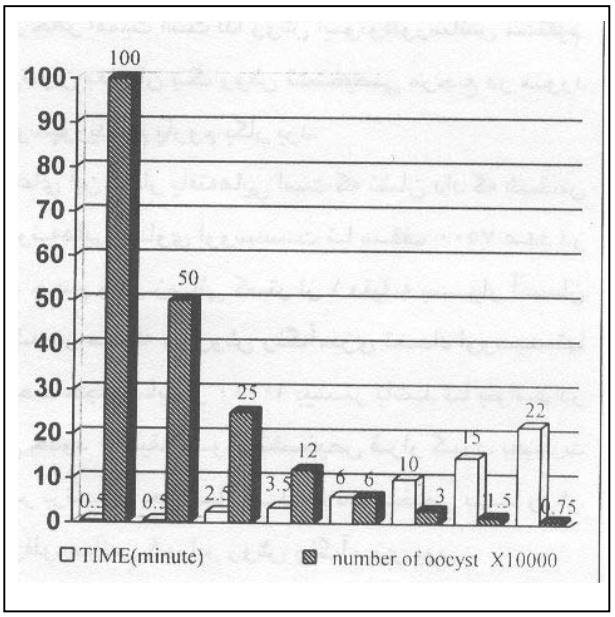
شکل ۳– وجود شیار بر روی اووسیست کریپتوسپوریدیوم. بزرگنمائی ۱۰۰۰ X

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 21:28 IRDT on Tuesday September 19th 2017

در این مطالعه مشخص شد که حساسیت و ویژگی با روش ایمونوفلورسانس در تمام نمونه‌های آزمایش شده صددرصد است(نمودارهای شماره ۱و ۲).



نمودار شماره ۱- زمان لازم جهت یافتن اووسیت کریپتوسپوریدیوم با استفاده از ایمنوفلورسانس مستقیم



نمودار شماره ۲- زمان لازم جهت یافتن اووسیت کریپتوسپوریدیوم با استفاده از روش اسید فاست

مقایسه کمی در تعیین حداقل قدرت تشخیص ـ نظر باینکه طولانیترین زمان برای دیدن اووسیستهای ٦-٤ میکرونی کریپتوسپوریدیوم پاروم ٥ دقیقه تعیین شده بود لذا این زمان در روش رنگی اسیدفاست در صورتی مقدور بود که تعداد اووسیستها در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون مدفوع از ٦٠ هزار عدد کمتر نباشد در غیر اینصورت زمانی بیش از ٥ دقیقه برای تشخیص مورد نیاز بود؛ اما این امر در روش ایمونوفلورسانس تا سقف ٧٥٠٠ اووسیست در واحد حجم یاد شده و در زمانی کمتر از ١ دقیقه براحتی مقدور است. بررسی‌های آماری نشان داد که اختلاف حداقل قدرت تشخیص با روش ایمونوفلورسانس بطور چشمگیری از روش رنگی بیشتر است(P=٠/٠٠٠٥). ارزشیابی مهارت کارشناس در تشخیص ـ نظر باینکه کوچکی بیش از حد کریپتوسپوریدیوم تشخیص آن را در نمونه‌های مرضی مشکل می‌سازد و حین تشخیص بسادگی با اجرام شبه کریپتوسپوریدیایی اشتباه می‌شود، برای اولین بار اقدام به ارزشیابی مهارت کارشناس در تشخیص این تک یاخته شد. از اینرو ٦ لام رنگ‌آمیزی شده حاوی اجسام شبه کریپتوسپوریدیوم که طی کاوشهای عملی و از طریق رنگ‌آمیزی تهیه شده بود بصورت یک سوکور در بین نمونه‌های مثبت و منفی حقیقی قرار داده شد و از دو نفر از کارشناسان آزمایشگاه که در تشخیص کریپتوسپوریدیوم مطلع بودند خواسته شد تا لامهای مورد نظر را بصورت مثبت و یا منفی گزارش کنند. در این مطالعه ٤ مورد را یکی از کارشناسان و ٢ مورد دیگر را هر دو نفر مثبت گزارش نمودند؛ یعنی در مواردی نتوانستند آنها را از اووسیستهای حقیقی تمیز دهند، در حالیکه این خطای چشمگیر در روش ایمیونوفلورسانس مشاهده نگردید و کارشناسان براحتی پاسخهای صحیح ارائه دادند.

بحث

اگر چه مطالعات اپیدمیولوژیکی کریپتوسپوریدیوزیس از اهداف اصلی این طرح نبود لیکن اطلاعاتی که در حین این پژوهش و در این رابطه کسب بسیار با ارزش بود. در وهله اول بسادگی قابل نتیجه‌گیری است که راههای انتقال و گسترش این بیماری تا حد زیادی به چگونگی قرار گرفتن

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 21:28 IRDT on Tuesday September 19th 2017

در معرض عامل پاتوژن بستگی دارد. حتی تعداد کم اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم پاروم بلافاصله پس از رفع بسیار آلوده کننده و بیماریزا هستند، همچنین نسبت به مواد گندزدا و داروها نیز مقاوم هستند(۱۲).

انتشار این عامل جهانی است و همه گروههای سنی و جنسی را آلوده می‌نماید(۱۱). از مهمترین عواملی که در ابتلا به این بیماری موثرند همجواری منابع مورد استفاده انسان بخصوص آب آشامیدنی با انواع حیوانات ـ مخازن عمده آلودگیها در طبیعت ـ می‌باشد(۹).

میزان آلودگی در این مطالعه در کودکان ۴/۱٪ بود که با نتایج سایر مطالعات که در حدود ۱۱-۴ درصد بود همخوانی دارد(۱۳). با تنها موردی که با نتایج حاصله از این مطالعه اختلاف چشمگیر دارد مربوط به تحقیقی است که در اصفهان انجام شد و میزان آلودگی را در کودکان اسهالی ۱۸/۵٪ گزارش نمود(۱۴).

بطور تجربی علت این اختلاف را احتمالاً می‌توان به مشاهده اجرام شبه کریپتوسپوریدیایی، اشکالات تکنیکی نمونه‌گیری در یک اپیدمی و یا اشکالات تهیه و تفسیر نتایج دانست. در گروه دوم مورد مطالعه که بیماران تحت شیمی درمانی بودند، علت چشمگیر نبودن میزان آلودگی را می‌توان چنین تفسیر نمود که احتمالاً بسبب عدم تماس بیماران با منابع آلودگی و دقت بسیار زیاد کارشناسان مسئول از دور نگهداشتن بیماران خود از تماس با مخازن کریپتوسپوریدیوم میزان بروز پایین بود.

در این مطالعه یکی از کودکان که پس از کودکان که پس از ۳۴ روز به آزمایشگاه مراجعه نموده بود و دارای علائم مشخص بیماری بود تحت مشاوره پزشک معالج با یک دوره درمان ۲۱ روزه مترونیدازول بهبود یافت و چنین استنباط شد که با ارتقاء سیستم ایمنی بیمار و بهبود عملکرد آن، درمان موثر واقع گردید زیرا با مروری بر پژوهشهای انجام شده، مترونیدازول به تنهایی داروی انتخابی نیست و در نتیجه احتمالاً برطرف شدن اختلالات ایمنی زمینه‌ای و قطع عوامل مهارکننده ایمنی سبب بهبودی بیمار گردید(۱۲و ۱۳). در بررسیهای بعمل امده در این تتحقیق روش تشخیص بطریق فلورسنت مستقیم بروش رنگ‌آمیزی اسیدفاست ارحجیت چیم‌گیر داشت زیرا آنتی‌بادی مونوکلونال نشاندار مورد استفاده در روش اخیر بر علیه آنتی‌ژن اختصاصی ۴۰ کیلودالتونی غشاء اووسیست کریپتوسپوریدیوم پاروم سنتز شده است و علاوه بر تسهیل ویژه در تشخیص آزمایشگاهی با سایر عوامل انگلی واکنش متقاطع ندارد(۱۲).

علی‌رغم قدرت تشخیص خوب، حساسیت و ویژگی قابل اعتماد سرعت تشخیص روش ایمیوفلورسانس سیستم، هزینه بیشتر آن ر مقایسه با روش رنگ‌آمیزی اسیدفاست مورد تائید باشد(۱۲).

در روش ایمیونوفلورسانس مستقیم جهت تشخیص کریپتوسپوریدیوم ـ برخلاف اکثر روشهای تشخیص ایمونولوژیکی ـ امکان تشخیص خصوصیات ویژه مرفولوژیکی تک یاخته نیز میسر است. از آنجائیکه تشخیص خصوصیات مرفولوژیکی انگل در تشخیص نهایی بسیار حائز اهمیت است لذا روش ایمونوفلورسانس مستقیم را می‌توان بعنوان یک روش تشخیصی مرجع در مورد کریپتوسپوریدیوم پاروم بکار برد.

مدعای این گفتار یافته‌هایی است که نشان داد تا سقف ۷۵۰۰ اووسیست در واحد حجم و در زمانی کمتر از ۱ دقیقه تشخیص اووسیست بسیار آسان می‌باشد در حالیکه با روش رنگ‌آمیزی تعداد اووسیستها در واحد حجم باید از تعداد ۶۰۰۰۰ بیشتر باشد تا بتواند در زمانی حدود ۵ دقیقه تشخیص قرار گیرد. بعبارت دیگر برتری حداقل قدرت تشخیص با روش ایمونوفلورسانس ۸ برابر روش رنگ‌آمیزی بود.

در مطالعه ارزشیابی مهارت کارشناس آزمایشگاه در تشخیص کریپتوسپوریدیوم ـ که برای اولین بار در این پژوهش ابداع گردید ـ نشان داده شد که خطا در مورد تکنسین معمولی و غیر ماهر صددرصد می‌باشد و بدون مهارت قادر به تشخیص اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم نمی‌باشد در حالیکه با روش ایمونوفلورسانس هیچ گونه خطایی مشاهده نگردید و کارشناس آزمایشگاه پس از

کسب مهارتهای لازم ـ که نسبتاً ساده است ـ قادر خواهد بود بخوبی اووسیستهای حقیقی را شناسایی کند. نتایج این مطالعه نشان داد اگر چه روش‌های میکروسکوپی در آزمایش مدفوع قابل اعتماد، ساده و مقرون بصرفه هستند، نیاز به مواد و تجهیزات گرانقیمت ندارند و کارآیی آنها در کشورهای جهان سوم و غیرصنعتی بسیار بیشتر است، اما جهت تشخیص آزمایشگاهی پارازیتهای بسیار کوچک مانند کریپتوسپوریدیوم پاروم ـ که بآسانی با بسیاری از اجرام مشابه در مدفوع قابل اشتباه هستند ـ نیاز است تا تشخیص بروش ایمونوفلورسانس مستقیم انجام شود.

توصیه می‌گردد جهت رفع شکل هزینه این روش برخی از آزمایشگاهیهای رفرانس دولتی مسئولیت چنین کارهایی را عهده‌دار شوند تا با پاسخدهی مطمئن، پزشکان و در نتیجه بیماران دچار گمراهی نگردند.

منابع

1- Tyzzer EE., A sporozoan found in the peptice glands of the common mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1907, 5, No 1: 12-13.

2- Slavin D., Cryptosporidium meleagridis: J. Comp. Pathol. 1995, Vol 65(Sep Nov.), 262-266.

3- Fayer R., Ungar PLB., Cryptosporidium sp and Cryptosporidiosis: Micrbiol. Rev 1986, 50: 458-483.

4- Mackenziee WR., Hoxie N. J., Proctor ME., et al., A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply: N. Engl. J. Med. 1994, 331, 3, 161-7.

5- Casemore DP., Sands RL., Curry A., Cryptosoprodium a new human pathogen: J. clin. Pathol. 1985, 38, 12, 1321-1336.

6- Tzipori S., Natural history and biology of cryptosporidium parvum. Adv. in. Parasitol. Vol. 40, 7-35, 1998.

7- Tilley M., Upton SJ., Biochemistry of cryptosporidium CRC press, Boca Raton, Fl (USA). 1997, p 165-181.

8- Eridman LS., Diarrhae and constipation: Harrison's principles of Int. Med. 14 th Ed., 1997, 237-238 McGraw Hill. Inc. USA.

9- Graczyk T.K., Fayer R., Zoonotic transsmission of cryptosporidium, Parasitol. Today, 1997, 13, 9, 348-351.

10- Miller RA., Experimental cryptosporidiosis in a primate midel. J. linfect. Dis., 1990, 161, 2, 312-315.

11- Markell EK., Cryptosporidium. Medical. Parasitology, 8 th Ed., 1999, P.81-95, W.B. Saunders. Company. Philadelphia, London, Toronto.

12- Mandel, Douglas, Bennetts: Cryptosporidium sp. Principles and practice of infectious diseases 5 th Ed. Churchill Livingstone, London. 2000, 2903-2912.

13- Saebi E., Cryptosporidium: Text Book of clinical parasitology, 1998, vol. 1, 197-204(1379).

14- Changizi E., Cryptosporidiosis in Isfahan, Iran, 1997, National Cong, Parasitol. Dis. Tehran PP. 148.

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 21:28 IRDT on Tuesday September 19th 2017

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 21:28 IRDT on Tuesday September 19th 2017

A COMPARATIVE STUDY ON THE TWO METHODS OF DIRECT FLUORESCENT ANTIBODY AND KYNION,ACID-FAST STAINING TECHNIQUES ON THE LABORATORY DIAGNOSIS OF CRYPTOSPORIDIOSIS.

*M.Shekarabi ,Ph.D[I] M.Oormazdi,Ph.D[II] A.Ghamchili,MTD[III] S.M.Razavi,MD[IV]

ABSTRACT

Cryptosporidium parvum in humans,as a re-appeared and as one of the four most important ubiquitous enteric pathogen which can cause diarrhea with high level of mortality mainly in the Immunocompromised patients and has stimulated research interest in the world. The quick and accurate laboratory diagnostic report of the pathogen are highly important in the prevention of the disease progress. Although kynion Acid-Fast(AF)staining procedure is accepted in the most clinical laboratories,a comparative study on the preferences of Direct Fluorescent (DF) antibody with staining techniques has undertaken in this recent work.During,months,beginning 1/5/1999,the stool samples of 340 apparently healthy people,185 from patients under chemotherapy and 170 from children under 10 years with chronic diarrhea have been collected for our research studies.The obtained results are as following:1-The sensitivity,specificity and the simplicity of the Direct Fluorescent (DF) was 100% as compared with kynion Acid-Fast (AF) technique.2-With regard of minimum detection time unit,each (DF) slide needs one minute, while this time limit for each (AF) slide was 5 minutes.3-By comparing the minimum diagnostic level(MDL) by expert technologists in two techniques, it was 8 for (DF). In other words, at least 60000 oocysts/ml of liquid stools are needed until to be able to detect by (AF) while (MDL) for (DF) was 7500 oocysts/ml.4-By using a single blind test the experience quality of the technologists in two techniques of (DF) and (AF) were evaluated. This test was significantly prefered as compared with (AF) technique.5-In these studies we have found that 0.7% of healthy people ,0.5% of patients under chemotherapy and 4.1% of diarrhaetic children were infected with Cryptosporidium parvum.

Key Words: 1)Direct fluorescent Antibody 2)Cryptosporidiosis 3)kynion Acid-Fast staining

---

This article is a summary of the thesis of A . Ghamchili for the degree of MTD under supervision of M .Shekarabi Ph.D and consultation with M.Oormazdi Ph.D and S.M.Razavi MD.1999;Also presented in the anniversary congress of pathology,Tehran,1999.

*I) Assistant professor of Immunology,School of medicine,Hemmat express way,Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.(*Corresponding author)*

II) Professor of parasitology and mycology,School of medicine,Hemmat express way,Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

III) MTD

IV) Assistant professor of hematology and oncology,Hazrat Rasul-e Akram Hospital,Niayesh st.,Sattar-khan Ave.,Tehran,Iran.