مقاله پژوهشی

مقایسه لام‌های تماسی و برش‌های بافتی با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی مختلف در تشخیص عفونت پنوموسیستیس کارینی

خسرو حضرتی تپه[۱]، توحید یحیی‌پور[۲]، جلیل موسوی[۳]، حبیب محمدزاده[٤]، کامبیز دیبا[٥]، علی رحیمی‌نژاد*[٦]

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۱/۱٦ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۳/۳۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: پنوموسیستیس کارینی یک میکروارگانیسم خارج سلولی و موجودی فرصت‌طلب است که در شرایط طبیعی، بدن مانع تهاجم آن می‌گردد ولی در شرایط ضعف یا نارسایی ایمنی مثلاً در جریان بیماری ایدز، هوچکین و سایر بیماری‌های تضعیف کننده دستگاه ایمنی به بدن تهاجم کرده و عفونت ایجاد می‌کند. هدف این مطالعه مقایسه لام‌های تماسی و برشهای بافتی با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی متانامین سیلور، گیمسا، گرام وایگرت، پاپا نیکولائو و هماتوکسیلین ائوزین ازنظر زمان رنگ‌آمیزی، سهولت، هزینه، قابلیت دسترسی به مواد و روش‌ها، شناسایی اشکال مختلف میکروارگانیسم پنوموسیستیس کارینی و ویژگی و توانایی این روش‌ها در تشخیص پنوموسیستیس کارینی می‌باشد.

مواد و روش کار: برای ایجاد پنوموسیستوزیس در رت‌های نژاد ویستار به مدت ۱۲-۱۰ هفته و هر هفته ۲ بار به میزان ۰/۵ سی‌سی دگزامتازون زیر جلدی تزریق شد که بعد از ایجاد بیماری از ریه رت‌ها لام‌های گسترش تماسی و همچنین قطعه‌هایی در فرمالین درصد۱۰ جهت لام‌های برش بافتی استفاده شد سپس لام‌های موجود با روش‌های رنگ‌آمیزی متان امین سیلور، گرام وایگرت، پاپانیکولائو، گیمسا، هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شده و ازلحاظ زمان رنگ‌آمیزی، سهولت، هزینه و قابلیت دسترسی آن‌ها به یکدیگر مقایسه شدند. همچنین ازنظر ویژگی و توانایی روش‌های تشخیص میکروارگانیسم در برش‌های بافتی و گسترش‌های تماسی نیز با همدیگر مقایسه شدند.

یافته‌ها: روش‌های رنگ‌آمیزی گیمسا و پاپانیکولائو قادر به رنگ‌آمیزی اجسام داخل کیست می‌باشند و دیواره کیست را رنگ نمی‌کنند. روش‌های رنگ‌آمیزی متانامین سیلور و گرام وایگرت دیواره‌ی کیست‌ها را رنگ‌آمیزی می‌کنند. گیمسا راحت‌ترین، کم‌هزینه‌ترین و سریع‌ترین روش جهت تشخیص میکروارگانیسم می‌باشد و در مقابل متانامین سیلور، پرهزینه‌ترین و زمان‌برترین روش جهت تشخیص می‌باشد. همچنین روش رنگ‌آمیزی متانامین سیلور، گرام وایگرت، پاپانیکولائو قادر به رنگ‌آمیزی و تشخیص پنوموسیستیس کارینی در برش‌های بافتی و گسترش‌های تماسی می‌باشند ولی گیمسا فقط قادر به تشخیص میکروارگانیسم در گسترش‌های تماسی بوده و هماتوکسیلین ائوزین قادر به تشخیص میکروارگانیسم در هیچ‌کدام از نمونه‌ها نمی‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری: در میان رنگ‌آمیزی‌های انجام‌شده، رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو و گیمسا به علت این‌که اجسام داخل کیست را به‌صورت واضح رنگ کرده و همچنین تعداد کمی و یا هیچ‌کدام از مخمرها با این روش‌ها رنگ نمی‌گیرند، نسبت به رنگ‌آمیزی گرام وایگرت که دیواره کیست میکروارگانیسم را رنگ کرده و مخمرها نیز با این روش رنگ می‌گیرند ویژگی بالاتری جهت تشخیص پنوموسیستیس کارینی دارند. متانامین سیلور در تشخیص پنوموسیستیس کارینی در نمونه‌های برونکوآلوئلار لاواژ، خلط و بیوپسی استاندارد طلایی می‌باشد، ولی در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده معمولاً اندازه کیست‌های پنوموسیستیس کارینی تقریباً هم‌اندازه مخمرها می‌باشد و همچنین مخمرها مانند کیست‌های پنوموسیستیس کارینی رنگ می‌گیرند احتمال مثبت کاذب در تشخیص نمونه‌ها وجود دارد، درنتیجه توصیه می‌شود جهت تشخیص دقیق‌تر میکروارگانیسم در نمونه‌های به‌دست‌آمده همراه با رنگ‌آمیزی متانامین سیلور حتماً از رنگ‌آمیزی گیمسا که به‌جای دیواره کیست‌ها اجسام داخل کیست را رنگ می‌کند نیز استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: پنوموسیستیس کارینی، رت، نمونه‌های تشخیصی، روش‌های رنگ‌آمیزی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره پنجم، ص ۴۵۷-۴۴۹، مرداد ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: ارومیه – پردیس نازلو، دانشکده پزشکی گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی تلفن: ۳۲۷۸۰۸۰۰ -۰۴۴

Email: hazrati_tappeh@yahoo.co.nz

[۱] استاد مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه انگل شناسی وقارچ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[۲] دستیار قلب، بیمارستان سید الشهدا، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[۳] استادیار عفونی، بیمارستان طالقانی، گروه عفونی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[٤] دانشیار گروه انگل شناسی وقارچ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[٥] دانشیار گروه انگل شناسی وقارچ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[٦] کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی وقارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-19]

مقدمه

پنوموسیستیس کارینی در دهه ۱۹۶۰ در افرادی که نقص سیستم ایمنی داشته‌اند یکی از عوامل مهم پنومونی محسوب می‌شد. در دهه ۱۹۸۰ همراه با افزایش روز بروز بیماری ایدز در جهان برافزایش تعداد افراد مبتلا به بیماری پنوموسیستوزیس نیز دیده شد. در کسانی که نقص ایمنی دارند مانند افرادی که به بیماری ایدز مبتلا هستند یا تحت درمان با داروهای تضعیف‌کننده ایمنی یا داروهای شیمی‌درمانی هستند، از بین عفونت‌های فرصت‌طلب پنوموسیستیس کارینی در ردیف اول قرار می‌گیرد. پنوموسیستیس کارینی در ریه و راه‌های هوایی و به‌صورت نادر در اعضای دیگر انسان و گونه‌های مختلف حیوانات به‌صورت میکروارگانیسم ساپروفیت زندگی می‌کند که میزبان‌های مختلف ازنظر ساختمان و ازنظر آنتی‌ژنیک شبیه هم هستند (۱). حیوانات آزمایشگاهی مختلفی جهت مطالعه بیماری‌زایی و تهیه نمونه جهت رنگ‌آمیزی و شناسایی میکروارگانیسم استفاده شده‌اند که برای اولین بار عفونت به‌وسیله شاگاس در سال ۱۹۰۹ در ریه خوکچه‌هندی آلوده توصیف گردید و ارتباط آن با بیماری انسان در سال ۱۹۴۲ توصیف شد (۲). ولی چون رت ازنظر آنتی‌ژنیک به انسان نزدیک‌تر بوده، نسبت به میکروارگانیسم حساس است و دسترسی به آن آسان‌تر است به همین دلیل در این مطالعه برای ایجاد بیماری و گرفتن نمونه جهت رنگ‌آمیزی از آن استفاده شده است (۲). تشخیص اختصاصی مستلزم مشاهده میکروارگانیسم در نمونه‌های مایع برونش‌ها، بیوپسی و اتوپسی با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی است (۳). با توجه به این‌که برخی از روش‌های رنگ‌آمیزی نظیر گیمسا و پاپانیکولائو قادر به رنگ‌آمیزی شکل تروفوزوئیت انگل و یا حداکثر اجسام داخل کیستی می‌باشند و از طرفی این روش‌ها بافت میزبان را نیز هم‌زمان رنگ می‌کنند، لذا رنگ‌های مذکور از حساسیت و ویژگی کافی برخوردار نیستند (۴). دسته دوم رنگ‌هایی هستند که قادر به رنگ‌آمیزی دیواره کیست بوده، اما در عفونت‌های سبک وجود مخمرها ممکن است با رنگ‌آمیزی نیترات نقره و متیلن بلو اشتباه شود (۶-۴). دسته سوم رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین ائوزین که به‌صورت روتین در بخش پاتولوژی برای رنگ‌آمیزی بافت‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرد. بنابراین ترجیح داده شد از رنگ‌آمیزی دیگری به نام گرام وایگرت در این موارد استفاده شود که دیواره شکل کیستی پنوموسیستیس را رنگ‌آمیزی نمود و درعین‌حال دیوار مخمرها به‌وسیله آن رنگ نمی‌گیرد و بدین ترتیب با کاهش نتایج مثبت و منفی کاذب در بهینه‌سازی روش‌های ردیابی پنوموسیستیس کارینی در بافت مؤثر خواهد بود. از طرفی، پنوموسیستیس با روش‌های معمول غیرقابل کشت بوده و بااینکه روش‌های مولکولی برای تشخیص پنوموسیستیس کارینی از حساسیت بالای برخوردار می‌باشند ولی امکان انجامان در تمام مراکز درمانی موجود نمی‌باشد (۷، ۸). در این مطالعه روش‌های رنگ‌آمیزی متانامین سیلور، گیمسا، پاپانیکولائو، گرام وایگرت و هماتوکسیلین ائوزین ازنظر زمان رنگ‌آمیزی، سهولت، هزینه، اشکال مختلف رنگ‌آمیزی شده میکروارگانیسم، ویژگی و توانایی تشخیص در برش‌های بافتی و گسترش‌های تماسی با همدیگر مقایسه شده‌اند. همچنین روش‌های رنگ‌آمیزی فوق ازنظر توانایی آن‌ها در شناسایی اشکال مختلف میکروارگانیسم در نمونه‌های لام با هم مقایسه شده‌اند که مشخص شود هر رنگ‌آمیزی کدام قسمت میکروارگانیسم را رنگ‌آمیزی می‌کند تا در مطالعات بعدی در تشخیص آزمایشگاهی با این مطالعه مقایسه شوند. در نهایت روش‌های رنگ‌آمیزی ازنظر ویژگی با همدیگر مقایسه شده‌اند تا اینکه مشخص شود کدام رنگ‌آمیزی در میان روش‌های فوق ویژگی بیشتری جهت تشخیص میکروارگانیسم دارد و همچنین تجربه کم‌تری جهت تشخیص آن در نمونه‌های آلوده به میکروارگانیسم با روش رنگ‌آمیزی با ویژگی بالا لازم است.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی و شبه تجربی تعداد ۳۰ عدد موش صحرایی (رت) نژاد ویستار با وزن متوسط ۲۰۰-۱۵۰ گرم که به ۲ گروه، گروه نمونه ۲۰ تایی و شاهد ۱۰ تایی تقسیم کرده، برای هر دو گروه غذای آماده استریل یکسان و آب لوله کشی معمولی در ظرف‌های نیم لیتری و حاوی انتی بیوتیک تتراسایکلین به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم داخل هر ظرف جهت جلوگیری از عفونت‌های باکتریایی روده‌ای و ریوی داده می‌شد. به‌منظور سرکوب سیستم ایمنی جهت ایجاد پنوموسیستوزیس به گروه نمونه هفته‌ای ۲ بار و هر بار به هر کدام از رت‌ها ۰/۵ میلی لیتر از دگزامتازون ۸ میلی‌گرم و در ۲ میلی لیتر به‌صورت زیر جلدی به مدت ۱۲-۱۰ هفته تزریق شد. گروه شاهد ازنظر تغذیه و محل نگهداری با گروه نمونه یکسان بود ولی هیچگونه دارویی به آن‌ها تزریق یا خورانده نشد (۹).

در طول مدت تزریق قبل از ۱۰ هفته، ۴ عدد از رت‌های گروه نمونه در داخل قفس‌ها مرده و ریه آن‌ها توسط رت‌های دیگر خورده شده بود که به همین علت نمونه‌ای از ریه آن‌ها جهت بررسی عفونت به دست نیامد. در طول مدت ۱۲-۱۰ هفته بر اساس شدت علائم بیماری که در حیوانات ظاهر می‌شد، حیوانات با استفاده از اتر کشته شده و در شرایط آزمایشگاهی کالبد گشایی شدند، معدوم‌سازی حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده مطابق استاندارد مقررات کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. ریه‌های حیوانات به‌طور کامل خارج و بعد از شست و شو با سرم فیزیولوژی، از ریه هر رت گسترش تماسی تهیه شد. پس از رنگ‌آمیزی به روش گیمسا توسط

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-19]

میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۱۰۰۰ و در ۲۰ میدان ازنظر وجود کیست و یا تروفوزوئیت برسی گردیدند. از ریه یکی از حیوانات که ازنظر آلودگی به پنوموسیستیس کارینی مثبت بود، بیشتر از ۱۰۰ لام گسترش تماسی تهیه و همچنین قطعات کوچک‌تر ریه داخل فرمالین درصد۱۰ گذاشته شده و جهت تهیه برش‌های بافتی به آزمایشگاه پاتولوژی فرستاده شد.

نمونه‌های ریه پس از مراحل آماده سازی به‌وسیله دستگاه میکروتم مقاطعی با ضخامت ۳ میکرومتر تهیه و سپس با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین حداقل ۲۰ عدد از لام‌ها رنگ‌آمیزی شدند بیش از ۱۰۰ لام از برش‌ها جهت رنگ‌آمیزی متانامین سیلور، گیمسا، پاپانیکولائو و گرام وایگرت انتخاب شدند و همراه با لام‌های گسترش تماسی با روش‌های رنگ‌آمیزی مختلف رنگ شدند. برای تشخیص آلودگی نمونه‌های ریوی به دست آمده ازنظر پنوموسیستیس کارینی از ۳ گروه روش رنگ آمیزی استفاده گردید که بر اساس معیارهای انتخابی این مطالعه مورد بررسی گرفتند.

گروه اول رنگ‌آمیزی گیمسا (۴) و پاپانیکولائو (۱۰) که اجسام داخل کیست‌ها (اسپروزوئیت) و تروفوزوئیت ها را رنگ‌آمیزی کردند، این‌ها ازنظر سهولت انجام رنگ‌آمیزی، طول مدت رنگ‌آمیزی، تشخیص اشکال مختلف پنوموسیستیس کارینی، میزان هزینه و قابلیت دسترسی طبق جدول شماره یک با هم مقایسه شدند. گروه دوم رنگ‌آمیزی‌های متانامین سیلور (۷) و گرام وایگرت (۱۰) که فقط دیواره کیست را رنگ کرده‌اند که اینها نیز ازنظر سهولت مراحل انجام، طول مدت رنگ‌آمیزی، تشخیص اشکال مختلف پنوموسیستیس کارینی، میزان هزینه و قابلیت دسترسی در جدول شماره یک با همدیگر مقایسه شده‌اند. گروه سوم شامل رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو و هماتوکسیلین ائوزین (۱۰) که جهت رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در این مطالعه نیز مقاطع بافتی به دست آ مده از ریه رت‌ها با این دو روش رنگ‌آمیزی گردیدند که رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو قادر به رنگ‌آمیزی کیست‌ها در مقاطع بافتی می‌باشد ولی هماتوکسیلسن ائوزین کیست‌ها و یا تروفوزوئیت‌های پنوموسیستیس کارینی را رنگ نمی‌کند لذا برای تشخیص پنوموسیستیس کارینی در مقاطع بافتی ولام‌های تماسی مناسب نمی‌باشد.

یافته‌ها

از ۲۰ رت که به‌عنوان گروه نمونه در هفته هشتم تزریق با توجه به علائم بالینی رت‌ها که به علت کاهش سیستم ایمنی و احتمال پنومونی پنوموسیستیس کارینی دچار ضعف، بی‌حالی وتغییر رنگ موها به رنگ زرد شده بودند، یکی از ضعیف‌ترین آن‌ها به‌وسیله اتر در شرایط آزمایشگاهی کشته شد از ریه نمونه تهیه شد که بعد از رنگ‌آمیزی وبررسی ازنظر آلودگی پنوموسیستیس کارینی منفی بود. همچنین در هفته نهم یکی از رت‌های ضعیف که خود به خود در قفس مرده بود از ریه آن نمونه تهیه شد و بررسی گردید که نتایج منفی بود. در هفته دهم اولین نمونه ریه به‌دست آمده از رت‌ها ازنظر پنوموسیستیس کارینی مثبت بود اما علی‌رغم مثبت بودن آن جهت اطمینان از آلودگی کامل رت‌ها بازهم ۲ هفته تزریق ادامه یافت و در هفته دوازدهم تمام ۱۳ رت باقی مانده کشته شده و از تمام نمونه‌های ریه آن‌ها لام تهیه شد. تمام نمونه‌های به‌دست آمده ازنظر آلودگی به پنوموسیستیس کارینی مثبت بودند، بنابراین ازنظر بیماریزایی پنوموسیستیس کارینی در موش‌ها، از ۱۶ رت باقی مانده در گروه نمونه ۲ عدد ازنظر آلودگی منفی و ۱۴ عدد مثبت ارزیابی شدند. همچنین از گروه شاهد نیز رت‌هایی انتخاب شده و بعد از کشتن، ریه آن‌ها ازنظر آلودگی به میکروارگانیسم مورد بررسی قرار گرفت که نتایج همگی منفی به دست آمد. بنابراین با تزریق زیر جلدی دگزامتازون به میزان ۰/۵ سی‌سی به مدت ۱۲-۱۰ هفته و هفته‌ای دو بار عفونت پنوموسیستیس کارینی در موش‌ها ایجاد می‌شود برای تشخیص آلودگی نمونه‌های ریوی به دست آمده ازنظر پنوموسیستیس کارینی از ۳ گروه روش رنگ‌آمیزی استفاده گردید که بر اساس معیارهای مورد بررسی در این مطالعه به‌صورت زیر تقسیم شدند.

گروه اول رنگ‌آمیزی گیمسا و پاپانیکولائو که اجسام داخل کیست‌ها (اسپروزوئیت) و تروفوزوئیت ها را رنگ‌آمیزی کردند که اینها ازنظر سهولت انجام رنگ‌آمیزی، طول مدت رنگ‌آمیزی، تشخیص اشکال مختلف پنوموسیستیس کارینی، میزان هزینه و قابلیت دسترسی طبق جدول شماره یک با هم مقایسه شدند. گروه دوم رنگ‌آمیزی‌های متانامین سیلور و گرام وایگرت که فقط دیواره کیست را رنگ کرده‌اند که اینها نیز ازنظر سهولت مراحل انجام، طول مدت رنگ‌آمیزی، تشخیص اشکال مختلف پنوموسیستیس کارینی، میزان هزینه و قابلیت دسترسی در جدول شماره ۱ با همدیگر مقایسه شده‌اند روش‌های رنگ‌آمیزی به کار برده شده در این مطالعه جهت رنگ‌آمیزی و تشخیص اشکال مختلف پنوموسیستیس کارینی در لام‌های کسترش تماسی و برش‌ها با هم دیگر مقایسه شده‌اند که در جدول شماره ۲ آورده شده است. رنگ‌آمیزی گیمسا و پاپانیکولائو اجسام داخل کیست و تروفوزوئیت ها را بنفش رنگ کرده و دیواره کیست‌ها و سیتو پلاسم را رنگ نکردند. متانامین سیلور و گرام وایگرت دیواره کیست‌ها را به رنگ سیاه یا آبی تیره رنگ می‌کنند. تمام رنگ‌آمیزی‌های انجام شده و میکرو ارگانیسم‌های تشخیص داده شده در آن‌ها از شکل ۱ تا ۹ نشان داده شده است.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-19]

جدول (۱): مقایسه رنگ‌آمیزی ها ازنظر هزینه، زمان، قابلیت دسترسی و اشکال میکروارگانیسم مشاهده شده در نمونه

هزینه و قابلیت دسترسی	اشکال مشاهده شده	زمان لازم برای رنگ‌آمیزی (دقیقه)	رنگ‌آمیزی
۳+	تروفوزوئیت و اجسام داخل کیست	۱۰ دقیقه	گیمسا
۲+	دیوار کیست	۱۷ تا ۲۰ دقیقه	گرام وایگرت
۲+	تروفوزوئیت و اجسام داخل کیست	۱۶ تا ۲۰ دقیقه	پاپانیکولائو
۱+	دیوار کیست	۱۳۵ تا ۱۴۰ دقیقه	متانامین سیلور
۱+	_	۶۰ دقیقه	هماتوکسیلین ائوزین

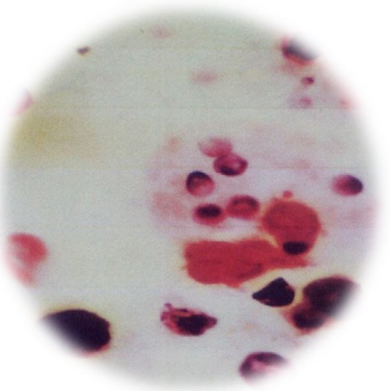
هزینه بالا و قابلیت دسترسی دشوار ۱+

هزینه متوسط و قابلیت دسترسی مناسب ۲+

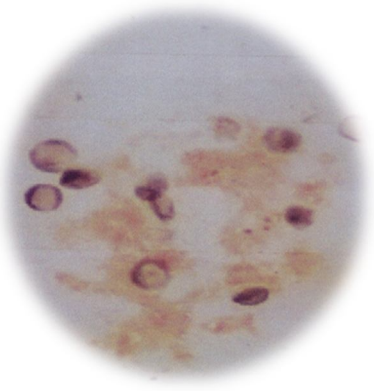
هزینه کم و قابلیت دسترسی آسان ۳+

جدول (۲): مقایسه رنگ‌آمیزی ها ازنظر قابلیت تشخیص میکروارگانیسم در برش‌های بافتی و گسترشهای تماسی

روش‌های رنگ‌آمیزی / نوع و نمونه‌ها	گیمسا	متانامین سیلور	گرام وایگرت	هماتوکسیلسن ائوزین	پاپانیکولائو
برش‌های بافتی	−	+	+	−	+
گسترش‌های تماسی	+	+	+	−	+

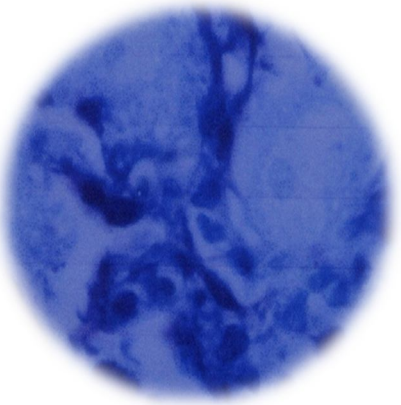


شکل (۱): رنگ‌آمیزی گرام وایگرت گسترش تماسی با بزرگ نمایی ۱۰۰۰

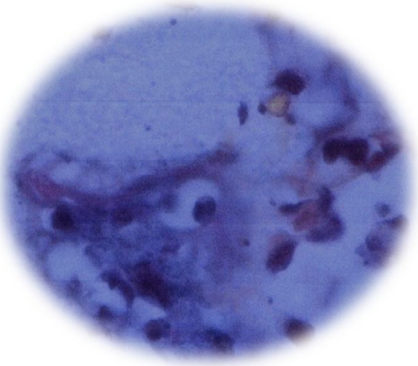


شکل (۲): رنگ‌آمیزی متانامین سیلور گسترش تماسی با بزرگنمایی ۱۰۰۰

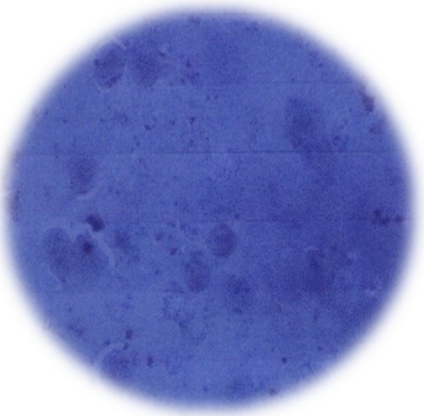
[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-19]



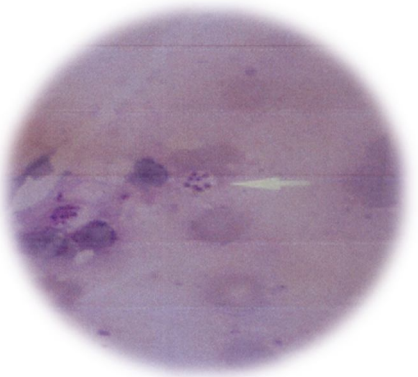
شکل (۳): رنگ‌آمیزی گیمسا در لام برش بافتی با بزرگنمایی ۱۰۰۰



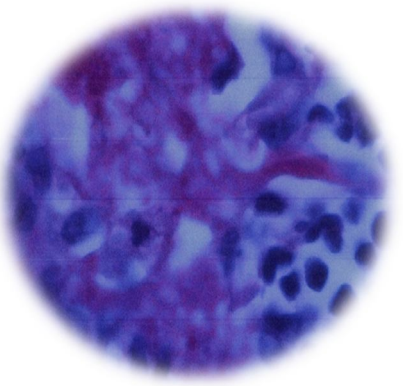
شکل (۴): رنگ‌آمیزی متاتامین سیلور در لام برش بافتی با بزرگنمایی ۱۰۰۰



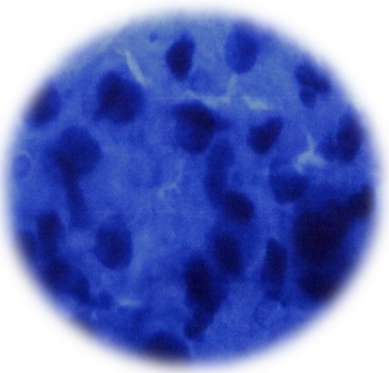
شکل (۵): رنگ‌آمیزی گرام وایگرت در لام برش بافتی با بزرگنمایی ۱۰۰۰



شکل (۶): رنگ‌آمیزی گیمسا در لام گسترش تماسی با بزرگنمایی ۱۰۰۰

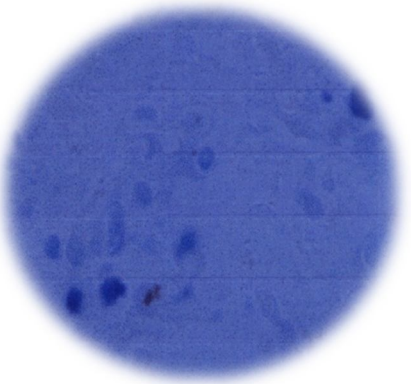


شکل (۷): رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین برش بافتی با بزرگنمایی ۱۰۰۰



شکل (۸): رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو گسترش تماسی با بزرگنمایی ۱۰۰۰

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-19]



شکل (۹): رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو در لام برش بافتی با بزرگنمایی ۱۰۰۰

بحث و نتیجه‌گیری

پنومونی ناشی از پنوموسیستیس کارینی شایع‌ترین عامل فرصت‌طلب مرگ ومیر در بیماران ایدزی و افراد نقص سیستم ایمنی است. تعداد بیماران مصرف کننده داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی و بیمارانی که به دلایلی سیستم ایمنی بدن آن‌ها دچار نقصان شده است و در معرض خطر ابتلاء به پنومونی ناشی از پنوموسیستیس کارینی قرار دارند به سرعت در حال افزایش است. از سوی دیگر شیوع سندروم نقص ایمنی اکتسابی یا ایدز در کشورهای در حال توسعه به سرعت در حال گسترش است، به‌دلیل طبیعت فرصت‌طلب این ارگانیسم، تشخیص معمولاً زمانی صورت می‌گیرد که بیماری در مراحل حاد بوده و درمان بی فایده و یا با موفقیت کمی همراه است. بنابراین تشخیص دقیق و سریع این بیماری با استفاده از روش‌هایی که حساسیت و ویژگی بالایی دارند و از سوی دیگر آسان و در دسترس هستند با اهمیت است (۵).

روش‌های مختلفی از قبیل رادیولوژی، سی تی اسکن، سرولوژی، پاتولوژی و روش‌های مولکولی برای تشخیص پنوموسیستیس کارینی مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ اما همه این‌ها به یک نسبت از حساسیت بالایی برای تشخیص برخوردار نیستند. بنابراین چون تشخیص قطعی پنومونی پنوموسیستیس کارینی نیازمند دیدن کیست و یا تروفوزوئیت انگل می‌باشد و برای مقایسه ارزش تشخیص روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی پاتولوژی، هماتولوژی و رنگ‌های رومانوفسکی نیاز به وجود نمونه‌های حاوی اشکال مختلف انگل می‌باشد، به همین علت روش‌های مختلفی جهت ایجاد بیماری به شکل داخل بدنی ازجمله خوراندن و یا تزریق زیر جلدی داروهای ایمونوساپروسیو به حیوانات متفاوتی مانند خرگوش، گربه، موش و رت‌ها استفاده شده است ولی هر کدام از آن‌ها معایب و مزایای خاص خود را دارند (۹).

در این مطالعه با توجه به مطالعات انجام شده قبلی جهت ایجاد بیماری در رت‌ها وضعیف کردن سیستم ایمنی آن‌ها در مدت ۱۲-۱۰ هفته میکروارگانیسم در نمونه‌های ریه به دست آمده مشاهده و تشخیص داده شد، پرتکل تزریقاتی این مطالعه جهت تضعیف سیستم ایمنی مانند محبعلی و همکاران که در سال ۲۰۰۲ انجام داده بودند می‌باشد (۹). در مطالعه دیگری که توسط رضایی منش و همکاران در سال ۱۳۸۸ انجام شد از داروی متیل پرد نیزولون به میزان ۴۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم هر هفته و هفته‌ای یک بار استفاده شد که توانستند در مدت ۸ هفته پنومونی پنوموسیستیس کارینی را ایجاد کنند (۵). همچنین در مطالعه رحیمی فرد و همکاران برای ایجاد بیماری از کورتیزون استات ۲۰درصد هفته‌ای ۲ بار و هر بار یک میلی لیتر به مدت ۸ هفته به‌صورت زیر جلدی تزریق کرده‌اند که در این مدت موفق به ایجاد بیماری شدند و سپس رت‌ها را اتوپسی کرده و از ریه آن‌ها گسترش تماسی تهیه کرده و نمونه‌هایی را در محلول فیکساتیو بوئن جهت تهیه برش‌های بافتی نگهداری کرده‌اند (۴). در روش‌های دیگر تشخیص با ایجاد بیماری پنومونی پنوموسیستیس کارینی به‌صورت داخل بدن در رت‌ها و همچنین پنوموسیستیس هایی که از ریه انسان جدا شده است، برعلیه بعضی از آنتی‌ژن‌های آن‌ها آنتی‌بادی منوکلونال ایجاد کرده‌اند که از این آنتی بادی‌ها در تست‌های سرولوژی مانند ایمونو فلورسانس جهت بالا بردن حساسیت و ویژگی تست‌ها استفاده می‌کنند. با توجه به این‌که بین آنتی‌ژن‌های انگل در حیوانات مختلف که به‌صورت مدل آزمایشگاهی می‌باشند شباهتهای زیادی وجود دارد. می‌توان از آنتی بادی پنوموسیستیس کارینی که از ریه رت‌ها به وجود آمده است در تشخیص بیماری پنومونی پنوموسیستیس کارینی در انسان به‌صورت تست‌های سرولوژیک مورد استفاده قرارداد (۶). بیشترین توجه کلینیکی و تحقیقاتی جهت تشخیص پنوموسیستیس کارینی در نمونه‌های اسمیر یا برش بافتی ریه روی رنگ‌آمیزی

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-19]

میکروارگانیسم می‌باشد و تمام اینها جهت یافتن روش رنگ‌آمیزی سریع و آسان انجام شده است. رنگ‌آمیزی‌های معمول ازجمله متانامین سیلور، تولوئیدن بلو، گریزل ویولت و گرام وایگرت که به‌صورت انتخابی دیواره کیست را رنگ می‌کند همراه با روش‌های رنگ‌آمیزی گیمسا، پلی کروم متانامین بلو، دیف کوئیک، گرم ورایت که اجسام داخل کیست را رنگ می‌کنند جهت تشخیص پنوموسیستیس کارینی استفاده می‌شود (۸). رنگ‌آمیزی متانامین سیلور که در رنگ‌آمیزی کیست‌های پنوموسیستیس کارینی به‌عنوان استاندارد طلایی پذیرفته می‌شود قادر است دیواره کیست‌ها را به رنگ قهوه‌ای و یا سیاه رنگ‌آمیزی کند؛ اما اگر در لام‌ها تعداد کیست‌ها کم باشد تشخیص آن‌ها با این روش مشکل خواهد بود چون احتمالاً مخمرها شبیه کیست‌ها رنگ می‌گیرند و درنتیجه مثبت کاذب بیشتر می‌شود (۱۱). اسمیت و همکاران در سال ۱۹۷۲ لام‌هایی را که با گرام وایگرت رنگ‌آمیزی کردند، دیواره کیست‌ها به رنگ آبی تند تا سیاه رنگ گرفت اما این رنگ‌آمیزی اجسام داخل کیست‌ها و تروفوزوئیت ها را رنگ نکرد. همچنین آماده سازی و انجام مراحل رنگ‌آمیزی زمان کوتاهی لازم دارد (۱۲). رنگ‌آمیزی با گیمسا که به‌طور معمول در هماتولوژی استفاده می‌شود. داخل کیست‌های پنوموسیستیس کارینی را رنگ‌آمیزی می‌کند یعنی اجسام داخل کیستی (اسپروزوئیت) و همچنین تروفوزوئیت های انگل را رنگ می‌کند اما دیواره کیست و سیتو پلاسم کیست‌ها را رنگ نمی‌کند (۱۳). رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو روش معمولی است که در پاتولوژی و مخصوصاً سیتولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در رنگ‌آمیزی پنوموسیستیس کارینی، تروفوزوئیت ها و اجسام داخل کیست‌ها را مانند گیمسا رنگ می‌کند و اسپروزوئیت را به رنگ بنفش کم رنگ، رنگ‌آمیزی می‌کند (۱۴). رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین که در این مطالعه جهت تشخیص پنومونی پنوموسیستیس کارینی استفاده شده است در هیچ‌کدام از لام‌های تهیه شده قادر به رنگ‌آمیزی میکروارگانیسم نمی‌باشد. گیمسا سریع‌ترین، کم‌هزینه‌ترین و قابل دسترس ترین روش جهت تشخیص میکرو ارگانیسم‌ها در نمونه‌های گسترش تماسی می‌باشد، پاپانیکولائو و گرام وایگرت نسبت به متانامین سیلور و هماتوکسیلین ائوزین دارای هزینه کم‌تر، سرعت انجام بیشتر و قابلیت دسترسی بهتری داشتند. گیمسا و پاپانیکولائو به علت اینکه اجسام داخل کیست و تروفوزوئیت‌ها را به‌صورت واضح رنگ کرده و شکل میکروارگانیسم نسبت به مخمرها و اجسام دیگر کاملاً متفاوت می‌باشد، جهت تشخیص اختصاصی پنوموسیستیس کارینی مناسب می‌باشند ولی متانامین سیلور و گرام وایگرت به علت اینکه مخمرها را نیز همرنگ با پنوموسیستیس رنگ کرده و اندازه آن‌ها نیز نزدیک به اندازه میکروارگانیسم می‌باشد به همین علت از اختصاصیت این دو روش رنگ‌آمیزی جهت تشخیص کاسته می‌شود، گیمسا و هماتوکسیلین ائوزین قادر به رنگ‌آمیزی میکروارگانیسم در برش‌های بافتی نمی‌باشند، علاوه بر آن رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین در گسترش‌های تماسی نیز قادر به رنگ‌آمیزی پنوموسیستیس کارینی نیست. توصیه می‌شود جهت تشخیص سریعتر، راحت‌تر و با اطمینان بیشتر از رنگ‌آمیزی گیمسا استفاده شود، اما به علت این‌که در تمام مطالعات متانامین سیلور استاندارد طلایی شمرده شده است، بهتر است از این دو رنگ‌آمیزی در کنار هم جهت افزایش احتمال تشخیص استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه در اجرای پایان نامه دکتر توحید یحیی پور مراتب تقدیر و تشکر خود را اعلام می‌دارد.

References:

1. Krajicek BJ, Thomas CF Jr, Limper AH. Pneumocystis pneumonia: current concepts in pathogenesis, diagnosis, and treatment. Clin Chest Med 2009; 30: 265–78.
2. Markell EK, Coge S. Medical parasitology. 9th ed. Philadelphia: WB saunders Co; 2006.
3. Walerz PD. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone; 2005. P. 3080-94.
4. Rahimifard N, Ahi M, kahnamuii A. A comparison of modified cytological and histological staining methods for the diagnosis pneumocystis carini pneumonia. APMIS 1997; 105(12): 904-8.
5. Rezaiemanesh M. Riyazipour M, Bahadoran H. Correction of Gomori methenamine silver staining methods for staining of pneumocystis carinii in lung biopsy specimens. Kowsar Med J 2009; 14(2): 71-5.
6. Aderaye G, woldeamanuel Y, Asrat D, Lebbad M, Beser J, workua A, et al. Evaluation of toluidine blue staining for the diagnosis of pneumocystis jiroveci in expectorated sputum sample and bronachoalveolar lavage from HIV-infected patient

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-19]

in a tertiary care referral center in Ethiopia. Infection 2008; 36(3): 237-43.

7. Thomas CF, Limper AH. Pneumocystis pneumonia. N Engl J Med 2004; 350(24): 2487-99.
8. Pierre Flori, Bahrie Bellete, Fabrice Durand, Hélène Raberin, Céline Cazorla, Jamal Hafid, Frédéric Lucht, Roger Tran Manh Sung. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing Pneumocystis jiroveci pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol 2004; 53: 603-7.
9. Mohebali M, Mirbakhsh M, Keshavarz H. Rapid Detection of Pneumocystis Carini in Spiratory Specimens of Rats by Calcofluor White Staining. Iran J Pub Health 2002; 31(1-2): 108-10.
10. Luna LG. Histologig staining method of the A.F.I.P. McGraw-hill book Co; 1968.
11. Grocott RG. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. Am J Clin Pathol 1955; 25(8): 975-9.
12. Smith JW, Hughes WT. A rapid staining and techniques for peunomocystis carini. J Clin Pathol 1972; 25: 269-71.
13. Walker J, Conner G, J Ho, Hunt C, Pickerning L. Giemsa staining for cysts and trophozoites of pneumocystis carini. J Clin Pathol 1989; 42(4): 432-4.
14. Chandra P, Delaney MD, Tuzzon CU. Role of special stain in the diagnosis of pnenmocystis carini infection from bronchial washing specimens in patients with the acquired immune deficiency syndrome. Acta Cytol 1998; 32: 105-8.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-19]

Original Article

COMPARISION OF IMPRESS SMEARS AND TISSUE SECTION STAINED WITH DIFFERENT METHODS FOR DIAGNOSING OF PNEUMOCYSTIS CARINII

*Khosrow Hazrati Tappeh[1],Tohid Yahyapour[2], Jalil Musavi[3], Habib Mohammadzadeh[4], Kambiz Diba[5], Ali Rahiminejad [6]**

Received: 5 Apr, 2016; Accepted: 21 Jun, 2016

Abstract

Background & Aims: Pneumocystis carinii is an opportunist extracellular microorganism. The body can defend itself against it in natural conditions. But it can cause an infection in immunodificient conditions such as HIV, Hodgkins and other immunosuppressed diseases. The aim of this study was to apply a comparison of different staining methods such as Methenamine silver, Giemsa, Gram - Weigert, Papanicolaou and Hematoxylin eosin stains in terms of staining times, easiness, cost and availability of material and methods, detection of P. carinii, different forms and capability of this methods in detection of P. carinii in impression slides, and tissue slices of rats lungs.

Materials & Methods: In order to induce of Pneumocystis pneumonia, the Sprague Dawley rats were injected 0.5cc of dexamethasone subcutaneously twice a week over a 10-12 weeks, after induce pneumonia we removed the lungs and made impression slides and pieces of lung was put in 10% formalin to make tissue slides. After that the slides stained by Methenamine silver, Gram Weigert, papanicolaou, Giemsa and Hematoxylin eosin, and compared them in terms of staining time, easiness, cost and availability. In addition, we compared the capability of different methods to detect the microorganism in tissue preparation slices and impression slides.

Results: Giemsa and papanicolaou are capable to stain the intra cyst bodies but can't stain the cysts wall. Methenamine silver and Gram Weigert stain the cysts wall. Giemsa is fastest, cheapest and the most easy method to stain, vs. methenamine silver is expensive, difficult and takes long time to do. Methenamine silver papanicolaou, Gram Weigert can detect P. carinii in both tissue slice and smears but Hematoxylin eosin can't detect either slices or impression slides. Giemsa only detects microorganism in impression slides.

Conclusions: In these staining methods, Papanicolaou and Giemsa have more specificity than Gram Weigert to detect the P. carinii in specimens, because these staining method don't specify the wall of cysts together with yeasts, because of this the wrong diagnosis with Giemsa and Papanicolaou is less than Gram Weigert. Methenamine silver is golden standard method to detect P. carinii but it stains the yeasts like P. carinii because the yeasts are similar to cysts in shape and color when we stain with methenamine silver. Because of this we conclude that Methenamine silver is suitable and useful for demonstration of P. carinii cysts but it is better to be used together with Giemsa, because Giemsa can stain the intra cyst bodies so the diagnosis of pneumocystis pneumonia becomes easy with these methods together.

Keywords: Pneumocystis carinii, Rat, Diagnostic specimens, Different staining methods

Address: Department of Parasitology & Mycology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran, ***Tel***: +98-44-32780800
Email: Rahiminejad_a@umsu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2016: 27(6): 457 ISSN: 1027-3727

[1] *Professor, Cellular and Molecular Research Center and Parasitology & Mycology Department, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[2] *Resident, Cardialogy Department, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[3] *Assistant Professor, Infectious Disease Department, Faculty of Medicine, Taleghani Hospital, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[4] *Associate Professor of Parasitology & Mycology Department, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[5] *Associate Professor of Parasitology & Mycology Department, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[6] *MSc. in Medical Parasitology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author*)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-19]