تحقیقی

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

مقایسه روش های رنگ آمیزی فلوروکروم، ذیل نلسون و تن تیام هاک به منظور شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه های خلط افراد مشکوک به سل ریوی

مریم پورحاجی باقر
دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

محترم نصرالهی
استاد باکتری شناسی پزشکی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

نویسنده مسئول: مریم پورحاجی باقر
تلفن : 09127148121
پست الکترونیک: mphb65@yahoo.com
آدرس : مازندران، ساری دانشگاه علوم پزشکی ، **مازندران** ، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

وصول مقاله: 90/5/12
اصلاح نهایی: 90/7/16
پذیرش مقاله:90/7/30

چکیده

زمینه و هدف: *رنگ آمیزی اسید فست و مشاهده مستقیم میکروسکوپی به علت سهولت، سرعت، هزینه پائین و حساسیت بالا روشی مناسب جهت شناسایی سل ریوی به شمار می آید. هدف از این مطالعه، مقایسه 3 روش رنگ آمیزی فلوروکروم، ذیل نلسون و تن تیام هاک به منظور تعیین بهترین روش تشخیص سل ریوی می باشد.*

روش بررسی: *هفتصدو چهارده نمونه خلط از افراد مشکوک به سل ریوی مراجعه کننده به مرکز بهداشت استان مازندران سال 1389 جمع آوری شد و از همه نمونه ها گسترش تهیه و با 3 روش مذکور رنگ آمیزی گردید. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی تعیین و نتایج با روش کشت لوین اشتاین جانسون که تست استاندارد می باشد مقایسه شد.*

یافته‌ها: *نود و سه نمونه توسط کشت مثبت تشخیص داده شد. حساسیت تن تیام هاک، ذیل نلسون و فلوروکروم به ترتیب 89/2%، 91/3%، 95/6% بود درحالی که ویژگی و ارزش اخباری مثبت هر سه آنها 100% و ارزش اخباری منفی آنها 98/3%، 98/7%، 99/3% به دست آمد.*

نتیجه گیری: *نتایج ما نشان داد که روش رنگ آمیزی ذیل نلسون با داشتن حساسیت و ویژگی مناسب در مقایسه با دو روش رنگ آمیزی دیگر، هنوز هم روشی قابل اعتماد برای شناسایی باسیل های اسید فست در نمونه های خلط می باشد.*

واژه های کلیدی: *سل ریوی، رنگ آمیزی تن تیام هاک، رنگ آمیزی ذیل نلسون، رنگ آمیزی فلوروکروم*

آدرس مقاله:
پورحاجی باقر م ، نصرالهی م. مقایسه روش های رنگ آمیزی فلوروکروم، ذیل نلسون و تن تیام هاک به منظور شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه های خلط افراد مشکوک به سل ریوی. مجله علوم آزمایشگاهی، 1390دوره پنجم(شماره1) :12-8

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سل ریوی یکی از دلایل عمده مرگ و میر ناشی از عفونتهای باکتریال است و 95% موارد آن در کشورهای درحال توسعه در آسیا، آفریقا، خاورمیانه و آمریکای لاتین که وسایل و امکانات محدودی برای تشخیص و درمان دراختیار دارند، رخ می دهد(1و2). تخمین زده اند که یک سوم مردم جهان با باکتری مولد توبرکلوزیس که معمولاً در ریه ایجاد عفونت می کند، آلوده می شوند(3) و سالانه 8 تا 12 میلیون مورد جدید به سایر افراد مبتلا افزوده می گردد(4و5). میزان تلفات سل سالانه را حدود 3میلیون نفر گزارش کرده اندکه 2میلیون نفر از بزرگسالان و یک میلیون نفراز کودکان می باشند(2). در کشورهای اروپایی نیز بیماری سل یکی از مشکلات مهم بهداشت عموم است که علت اصلی آن پدیده مهاجرت می باشد. با اپیدمیک شدن عفونت HIV، در یک دوره 10 ساله تعداد موارد سل 2 تا 3 برابر شده است. چنانچه کنترل جهانی سل در حد فعلی باقی بماند، میزان موارد جدید سل تا سال 2020، 40 درصد افزایش خواهد یافت(2). گفته می شود 2/1 میلیون بیمار آلوده به باسیل توبرکلوزیس در سراسر جهان می توانند فرم فعال بیماری را دوباره نشان دهند(6). فعال شدن مجدد توبرکلوزیس و پیدایش مقاومت چند دارویی سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ضرورت به کارگیری روش های سریع جداسازی و تشخیص بالینی مایکوباکتریوم ها را تشدید می کند(7). درنتیجه تشخیص سریع مایکوباکتریوم بویژه در بیماران با نقص سیستم ایمنی، به منظور مدیریت سریع ، درمان موفق بیماران و کنترل بیماری سل امری ضروری است(8و9).

روش اصلی تشخیص سل ریوی در آزمایشگاه های کشورهای درحال توسعه که اجازه ی کشت از نمونه ها را ندارند ، تهیه اسمیر و مشاهده مستقیم میکروسکوپی است، هرچند که اسمیر اسیدفست حساسیت کمتری نسبت به کشت دارد ، یکی از روش های سریع و ضروری تشخیص سل به شمار می رود (9 و 10). در مناطق با شیوع بالای HIV، میزان اسمیرهای منفی در بیماران مبتلا به سل ریوی بالاتر است (11)، به موجب آن نیاز به استفاده از روش های حساس تر برای تشخیص، امری ضروری است.

این روش ها باید به گونه ای باشند که در آزمایشگاه ها با حداقل امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی قابل اجرا باشند(12 و 13). روش های رنگ آمیزی گوناگونی برای شناسایی باسیل های اسیدفست وجود دارد که از جمله آن ها می توان به روش های رنگ آمیزی ذیل نلسون، تن تیام هاک و فلوروکروم اشاره نمود(9و10و12). مطالعات انجام شده در سال های اخیر، افزایش استفاده از روش رنگ آمیزی فلوروکروم در مقایسه با روش های رنگ آمیزی سنتی را نشان می دهد(14) و نسبت به رنگ آمیزی ذیل نلسون برتری دارد به این علت که سریعتر، ساده تر و کارآمد تر می باشد(15 و 16 و 17).رنگ آمیزی تن تیام هاک نیز از جمله روش های تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد (18) که به صرفه بوده و کاربرد آن آسان است و در این روش تشخیصی، مراحل انجام رنگ آمیزی و استفاده از حرارت که در روش ذیل نلسون به کار گرفته می شود به حداقل می رسد. به منظور تشخیص سریع مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در آزمایشگاه باید روشی اجرا گردد که در حداقل زمان با حداقل امکانات و با بالاترین دقت و حساسیت باسیل های اسیدفست را شناسایی نماید. هدف از این مطالعه مقایسه روش های رنگ آمیزی فلوروکروم، ذیل نلسون و تن تیام هاک برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه های تنفسی بیماران مبتلا به سل ریوی مراجعه کننده به مرکز بهداشت استان مازندران سال 1389 می باشد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، تمامی نمونه های خلط بیماران مشکوک به سل ریوی ارجاع شده به بخش سل مرکز بهداشت استان مازندران در سال 1389 جمع آوری شد و برای انجام رنگ آمیزی و کشت به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انتقال یافت. کلیه نمونه های خلط پس از رقیق شدن با N استیل L سیستئین و آلودگی زدایی به روی محیط کشت لوین اشتاین جانسون(شرکت بهارافشان، ایران)کشت داده شده و در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه گردیدند و بخشی از آن نیز برای رنگ آمیزی

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شد. مراحل رنگ آمیزی ذیل نلسون نمونه های خلط برای شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس براساس روش استاندارد (19) انجام یافت . در روش رنگ آمیزی فلوروکروم 0/1- 2/ میلی لیتر0از رسوب حاصل از نمونه های خلط پس از قرار گرفتن بر روی لام با حرارت فیکس شدند و به مدت 24 ساعت در دمای $75\ ^{\circ}C$ انکوبه گردیدند. سپس روی آن ها با رنگ اورامین- رودامین به مدت 2 دقیقه پوشانیده شد. لام ها پس از شستشو با آب، زیر میکروسکوپ فلورسانس با بزرگنمایی 25X بررسی شدند. در روش رنگ آمیزی تن تیام هاک، رسوب نمونه های خلط هموژن شده در سطح لام با کربول فوشین پوشانده شدند و به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس با آب ملایم شستشو داده شدند و متیلن بلو به عنوان رنگ زمینه به آن ها افزوده گشت. در نهایت پس از شستشو و خشک شدن، توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 1000X مورد بررسی قرار گرفتند (18و19). تجزیه و تحلیل داده ها و تعیین حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری منفی و مثبت به کمک نرم افزار SPSS 18 محاسبه گردید.

یافته ها

در این مطالعه، 714 بیمار مشکوک به سل در طول سال 1389 به مرکز بهداشت استان مازندران مراجعه کردند و نمونه های جمع آوری شده از آن ها از طریق کشت بر روی محیط لوین اشتاین جانسون و روش های رنگ آمیز ذیل نلسون، تن تیام هاک و فلوروکروم مورد بررسی قرار گرفت. میانگین سنی افراد مسلول 17/93 ± 45/5 و حداقل سن بیماران 15 و حداکثر آن 79 بود.

از میان 714 نمونه مورد مطالعه، 93 نمونه به روش استاندارد کشت روی محیط لون اشتاین جانسون، 85 نمونه با رنگ آمیزی ذیل نلسون (شکل شماره1 ، الف) (20)، 89 نمونه با رنگ آمیزی فلوروکروم (شکل شماره1، ب) (20) و 83 نمونه با رنگ آمیزی تن تیام هاک (شکل شماره1، پ) مثبت تشخیص داده شدند(جدول شماره 1) (21). میزان حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی در هر 3 روش رنگ آمیزی محاسبه گردید (جدول شماره 2).

جدول 1: نتایج حاصل از کشت و رنگ آمیزی نمونه های خلط بیماران مشکوک به سل مراجعه کننده به مرکز بهداشت استان مازندران در سال 1389

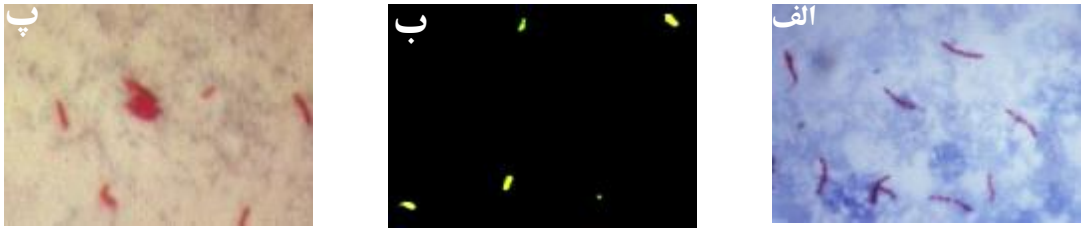
	کشت	ذیل نلسون	فلوروکروم	تن تیام هاک
نتیجه مثبت	93	85	89	83
نتیجه منفی	621	629	625	631
مجموع	714	714	714	714

جدول 2: حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی 3 روش رنگ آمیزی باسیل اسید فاست به نسبت کشت در محیط لوون اشتاین جانسون

	ذیل نلسون	فلوروکروم	تن تیام هاک
حساسیت	%91/3	%95/6	%89/2
ویژگی	%100	%100	%100
ارزش اخباری مثبت	%100	%100	%100
ارزش اخباری منفی	%98/7	%99/3	%98/3

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 1: باسیلهای اسید فاست در نمونه های بیماران، الف: رنگ آمیزی ذیل نلسون،ب: رنگ آمیزی فلوروکروم و پ:رنگ آمیزی تن تیام هاک (20و21)

بحث

تهیه اسمیر و مشاهده مستقیم میکروسکوپی یکی از روش های سریع و ضروری تشخیص سل ریوی به شمار می رود. اگرچه با روش کشت و PCR می توان حضور باکتری را در نمونه مشاهده نمود ، این روش ها در تمامی آزمایشگاه های بالینی قابل اجرا نیستند، لذا برای شناسایی مایکوباکتریوم های بیماریزا باید روشی را برگزید که در تمامی آزمایشگاه ها با حداقل امکانات، کوتاه ترین زمان، بالاترین دقت و حساسیت، تشخیص باسیل های اسیدفست را امکانپذیر سازد(19).

Gokhale S و همکاران در سال 1990 روش رنگ آمیزی تن تیام هاک را به علت آنکه روشی آسان و کم هزینه بود و اختصاصی بودن آن با روش ذیل نلسون برابری می نمود، برای شناسایی مایکوباکتریوم مناسب اعلام نمودند، علی رغم اینکه حساسیت آن از روش ذیل نلسون کمتر بوده است(22). در تحقیق دیگری که در کشور اندونزی در سال 2005 توسط Karuniawati A و همکاران انجام شد، روش ذیل نلسون با دارا بودن بالاترین ارزش اخباری مثبت، بهترین روش برای شناسایی باسیل های اسیدفست معرفی گردید(18). بهادر ع. و همکارانش در سال 2006 در تهران در طی مطالعه خود روش فلوروکروم را برگزیدند ، بیان داشتندکه این روش رنگ آمیزی پر هزینه و نیازمند به کارگیری تجهیزات خاص می باشد اما برای شناسایی باسیل های مایکوباکتریوم از حساسیت بالاتری نسبت به روش ذیل نلسون برخوردار است(14). در سال 2009 در کشور هند مطالعه ای توسط Pandey A و همکاران انجام شد و آن ها روش رنگ آمیزی تن تیام هاک را با توجه به کم هزینه بودن و داشتن دقت و حساسیت لازم، مناسب دانستند(21).

در مطالعه ی حاضر، رنگ آمیزی فلوروکروم بالاترین حساسیت را در شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مقایسه با سایر روش های رنگ آمیزی نشان داد که با مطالعه بهادر و همکاران مطابقت دارد اما این روش نیازمند استفاده از تجهیزات گران و ویژه می باشد و در تمامی آزمایشگاه ها قابلیت انجام ندارد. از طرفی، درمیان افراد مبتلا به AIDS و جمعیت های آلوده به HIV که میزان شیوع عفونت های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس و مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزی در آن ها بالا ست، تشخیص باسیل های اسیدفست با این روش دقیق نمی باشد (23). در رنگ آمیزی تن تیام هاک که به آن رنگ آمیزی سرد نیز گفته می شود، از حرارت که در سایر روشها به کار گرفته می شود استفاده نمی شود و قابلیت به کارگیری در آزمایشگاه ها را با حداقل امکانات دارد. این روش در مقایسه با روش رنگ آمیزی ذیل نلسون و فلوروکروم مقرون به صرفه تر و آسانتر است و می تواند جایگزین مناسبی برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به ویژه در آزمایشگاه های مراکز بهداشت با امکانات ضعیف و دور از از مرکز باشد(22 و 21).

این روش از حساسیت کمتری در مقایسه با دو روش دیگر برخوردار است. در مطالعه کنونی که با مطالعه Karuniawati A و همکاران مطابقت دارد، روش ذیل نلسون با داشتن مناسب ترین حساسیت و ویژگی، بهترین روش برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه های خلط شناخته می شود و در تمامی آزمایشگاه های مراکز بهداشت نیز قابل اجرا می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

تشکر و قدردانی

با تشکر و قدردانی از تمامی اعضاء هیئت علمی گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و تشکر از کارشناسان محترم مرکز بهداشت استان مازندران آقای سید رضا موسوی و آقای محمدرضا نظری که در این طرح نهایت همکاری را با ما لحاظ نمودند.

References

1. ATS-American Thoracic Society. *Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children*. Am J Resp Crit Care Med. 2000; 161:1376-95.

2. Rafi A, Maaddab R. *Principles of Mycobacteriology*. First ed. Tabriz: Sotude publications.2003.73-76.

3. Mostrom P, Gordon M, Sola C, Ridell M , Rastogi N. *Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis*. Clin Microbiol Infect. 2002; 8(11):694-704.

4. Tiwari RP, Tiwari D, Sanjay K, Garg SK, Chandra R, Bisen PS. *Glycolipid of Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv Are Potential Serological Markers for Diagnosis of Active Tuberculosis*. Clin Diag Lab Immun. 2005; 12:465-473.

5. Conde MB, Suffys P, Silva G, kritski A, Dorman S. *Immunoglobulin A (IgA) and IgG Immune Responses Against Antigen for Dignosis Pulmonary Tuberculosis and Screening for Mycobacterium tuberculosis infection*. Clin Diag Lab Immun. 2004; 11:94-97.

6 Godreuil S, Tazi L, Banuls A. *Pulmonary Tuberculosis and Mycobacterium Tuberculosis: Modern Molecular Epidemiology and Perspectives*. 2007;45: 1-29.

7. Talor TB,Patterson C,Hale Y,Safranek W. *Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media*. J Clin Microbiol .1997;35:79-85.

8. Ravn P, Munk M, Andersen A, Lundgren B, Lundgren GD, Nielsen LN, et al. *Prospective Evaluation of Whole Blood Test Using Mycobacterium tuberculosis-Specifice Antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active Tuberculosis*. Clin Diag Lab Immun . 2005; 12:491-496.

9. Brown, Power EG , French GL. *Evaluation of Three Commercial Detection Systems for Mycobacterium tuberculosis where clinical Diagnosis is Difficult*. J Clin Pathol.1999; 52: 193-197.

10. Styblo K. *The global aspects of tuberculosis and HIV infection.* Bull Intl Union Against Tuberc Lung Dis. 1990; 65: 28-32.

11. Raviglione MC, Harries AD, Msiska R, Wilkinson D ,Nunn P. *Tuberculosis and HIV: Current status in Africa*. AIDS. 1997; 11:115-123.

12. Gebre N, Karlsson U, Jonsson G, Macaden R, Wolde A, Assefa A , et al. *Improved microscopically diagnosis of pulmonary tuberculosis in developing countries.* Trans R Soc Trop Med Hyg .1995; 889: 191-193.

13. Bruchveld J, Aderaye G, Palme IB, Bjorvatn B, Kallenius G , Lindquist L. *Sputum concentration improves diagnosis of tuberculosis in a setting with a high prevalence of HIV*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000; 94:677-680

14. Bahador A, Etemadi H, Kazemi B, Hajiabdolbaghi M, Ghorbanzadeh R, Pajand O. *A comparison of direct and concentrated Flurochrome- stained smears for the detection of Mycobacterium sp. In clinical respiratory specimens*. Journal of Biological Sciences.2006; 6(1): 103-305.

15. Apers L, Mutsvangwa J, Magwenzi J, Chigara N, Butterworth A, Mason P, Van der Stuyft P. *A comparison of direct microscopy, the concentration method and the mycobacteria growth indicator tube for the examination of sputum for acid fast bacilli*. J Tuberc Lung Dis. 2003; 7: 376-381.

16. Kommareddi S, Abramowsky CR, Swinehart G , Hrabak L. *Nontuberculous mycobacterial infections: Comparison of the fluorescent auramine-O and Ziehl-Neelsen techniques in tissue diagnosis*. Humu Pathol. 2000;15:1085-1089.

17. Strumpf IJ, Tsang A, Sayre JW. *Revalution of sputum staining for the diagnosis of pulmonary tuberculosis.* Am Rev Respir Dis. 1999; 119:599-602.

18. Karuniawati A, Risdiyani E, Nilawati S, Rosana Y, Alisyahbana B, Parwati I, et al. *Comparison Tan Thiam Hok, Ziehl neelsen and Fluorochrom staining method for detect of acid fast bacil in sputum samples*. Makara Kesehatan JUNI. 2005; 9(1): 29-33.

19. Nakhjavani FA, Bahador A. *Direct detection of Mycobacterium sp in respiratory specimen with rpoB-PCR and comparison with concentration fluorochrome staining*. Journal of Medicine and Medical Science.2006;1(2): 68-71.

20. Narvaiz De Kantor I, Frieden T, Luelmo F, Rieder H, Weyer K, et al. *Laboratory services in tuberculosis control*. WHO/TB. 1998; 98(258): 46.

21. Pandey A, Madan M, Asthana A,Kansal R, Das A. *Cold acid fast staining method: Efficacy in diagnosis of Mycobacterium tuberculosis*. African Journal of Microbiology Research. 2009; 3(9): 546-549.

22. Gokhale S, Qadir S, Nagra JJS, Chakraborty AK. *Efficiency of cold staining method of AFB sputum a comparison with Ziehl neelsen method under field conditions*. Ind J Tub. 1990; 135-37.

23. Paul W, Richard JR, Nathan W, Barbara A, David EG. *Sensitivity of Fluorochrome Microscopy for Detection of Mycobacterium tuberculosis versus Nontuberculous Mycobacteria*. Journal of clinical Microbiology. 1998; 1046-1049.

Archive of SID

www.SID.ir