Archive of SID

● مقالات تحقیقی (۶)

بررسی تشخیص آزمایشگاهی دیسانتری آمیبی

حسین هوشیار
دانشجوی دکتری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، دانشکده بهداشت، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

دکتر مصطفی رضائیان
استاد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، دانشکده بهداشت، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، واحد تک یاخته‌های روده‌ای

چکیده

تشخیص آزمایشگاهی دیسانتری آمیبی و افتراق آن از سایر عوامل ایجاد کننده دیسانتری، یکی از مشکلات بخش انگل‌شناسی در آزمایشگاههای تشخیص طبی می‌باشد. تشخیص صحیح عامل بیماری به دقت و مهارت کارکنان آزمایشگاه، انتخاب تکنیک مناسب و آزمایش به موقع نمونه مدفوع بستگی دارد. مطابق این بررسی در طی نیمه دوم سال ۱۳۷۷ ضمن حضور در ۷ آزمایشگاه دولتی و بخش خصوصی در مناطق مختلف تهران و کرج جمعاً ۵۳ مورد دیسانتری آمیبی و ۱۸ مورد دیسانتری غیرآمیبی گزارش شده توسط بخش انگل‌شناسی آزمایشگاه، همزمان به سه روش بررسی گسترش مستقیم مدفوع، کشت نمونه در محیط سرم منعقده اسب و رنگ آمیزی تری کروم برای موارد مشکوک، مورد بررسی مجدد قرار گرفت. از ۵۳ مورد دیسانتری آمیبی گزارش شده ۱۲ مورد (۲۲/۶٪) مثبت واقعی و ۴۱ مورد (۷۷/۴٪) مثبت کاذب تشخیص داده شد. تمامی ۱۸ مورد دیسانتری غیرآمیبی از نظر وجود آنتامباهیستولیتیکا منفی واقعی بودند و منفی کاذب مشاهده نشد.

مهمترین عوامل در تشخیص مثبت کاذب اشتباه شدن آنتامباهیستولیتیکا با سلولهای ماکروفاژ و پلی‌مرفونکلئورها و در درجه دوم اشتباه شدن با ترفوزوئیت آنتامباکلی، اندولیماکس نانا، بلاستوسیستیس و دی‌آنتامبافراژیلیس بود.

واژه‌های کلیدی: آنتامباهیستولیتیکا، دیسانتری، تشخیص آزمایشگاهی

مقدمه

آنتامباهیستولیتیکا تک‌یاخته ساکن روده بزرگ انسان است که غالباً به صورت همزیست و بی‌آزار می‌باشد. اما حدوداً در ۱۰درصد افراد آلوده این تک‌یاخته مهاجم گشته و بیماریهای گسترده‌ای از دیسانتری تا

www.SID.ir

Archive of SID

آمیبیاز خارج روده‌ای نظیر آبسه‌های کبدی، ریوی و غیره می‌تواند ایجاد نماید. آمیبیازیس با ایجاد بیش از ۱۰۰ هزار مورد مرگ و میر سالیانه در جهان، دومین عامل مرگ و میر در اثر تک‌یاخته‌ها، پس از مالاریا محسوب می‌گردد[۴،۱]. در بعضی کشورها نظیر مکزیک آمیبیازیس یکی از ده علت اولیه مرگ ومیر است[۵].

دیسانتری آمیبی در اثر تهاجم این تک‌یاخته به بافت‌های روده انسان ایجاد می‌گردد. در مهاجم شدن این تک‌یاخته علاوه بر فاکتورهای مربوط به انگل نظیر ویرولانس آمیب، فاکتورهای میزبان از جمله وضع تغذیه و فلور باکتریایی روده نیز نقش دارند[۲]. تشخیص آزمایشگاهی دیسانتری آمیبی از دیسانتری‌های باکتریال، بالانتیدیال و عفونت‌های دیگر روده‌ای بسیار مشکل است و تشخیص و افتراق آنها از یکدیگر از مهمترین وظایف پرسنل آزمایشگاه محسوب می‌گردد. نتیجه آزمایش بطور قطع به دقت و مهارت پرسنل آزمایشگاه، انتخاب تکنیک مناسب و تکرار دفعات آزمایش مدفوع بستگی دارد. در غیر اینصورت موارد مثبت کاذب و منفی کاذب بسیار زیاد خواهد بود. ا ستفاده از روشهایی نظیر کشت نمونه یا رنگ‌آمیزی مناسب در موارد مشکوک می‌تواند کمک بزرگی در تشخیص قطعی باشد.

با توجه به اینکه اکثر مبتلایان به آمیبیاز خارج روده‌ای در تاریخچه خود سابقه اسهال خونی آمیبی دارند[۴]. و از طرفی کشور ما نیز از کانون‌های اندمیک آنتامباهیستولیتیکا محسوب می‌گردد، لذا تشیخص دقیق این بیماری باعث خواهد شد تا با درمان سریع و به موقع این بیماران، از عواقب و گرفتاری‌های بعدی آن جلوگیری بعمل آید. همچنین افتراق سایر عفونت‌های روده‌ای از آمیبیاز باعث می‌شود تا ضمن جلوگیری از سرگردانی بیماران، با توجه به عوارض جانبی زیاد داروهای ضد آمیب نظیر مترونیدازول و هزینه اقتصادی آن، از مصرف نابجای این داروها خودداری شود.

در این بررسی، با مراجعه به چند آزمایشگاه بیمارستانی و بخش خصوصی در مناطق مختلف تهران و کرج، از نمونه‌های مدفوع دیسانتریک که آلوده به آنتامباهیستولیتیکا گزارش می‌شدند در همان روز و از همان نمونه برداشت و به سه روش مختلف مورد بررسی مجدد قرار گرفت و مشکلات موجود در تشخیص صحیح و دقیق این بیماری بحث گردیده همچنین برای تشخیص بهتر و دقیق‌تر پیشنهاداتی ارایه گردیده است.

روش کار

طی شهریور تا اسفند ماه سال ۱۳۷۷ با انتخاب تصادفی ۷ آزمایشگاه در نقاط مختلف تهران و کرج (۴ آزمایشگاه بیمارستانی و ۳ آزمایشگاه بخش خصوصی) ضمن هماهنگی با مسئولین آزمایشگاهها، در بخش انگل‌شناسی حضور یافته و از کلیه نمونه‌هایی که به عنوان دیسانتری آمیبی گزارش می‌گردید در همان روز و از همان نمونه با روشهای تهیه گسترش مرطوب با سرم فیزیولوژی و محلول لوگل و کشت نمونه در محیط سرم منعقده اسب (Hsr+s)[1] آزمایش مجدد بعمل می‌آمد. گسترش‌های مرطوب بلافاصله مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت و محیط‌های کشت پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتن در انکوباتور ۳۷ درجه آزمایش می‌شدند. در این بررسی نمونه‌هایی مثبت تلقی می‌گردید که حداقل به یکی از روش‌های مذکور آمیب مشاهده گردد. برای افتراق آنتامباهیستولیتیکا از سایر آمیب‌های روده به وضعیت حرکت و نوع پاهای کاذب و نیز خصوصیات سیتوپلاسم در گسترش مستقیم تهیه شده از نمونه مدفوع یا برداشت شده از محیط کشت توجه می‌گردید همچنین چنانچه با موردی مشکوک در نمونه مدفوع بیمار یا گسترش تهیه شده از محیط کشت برخورد می‌شد، رنگ آمیزی تری کروم[۶] برای دیدن خصوصیات هسته و موقعیت کاریوزوم بعمل می‌آمد.

مشخصات فردی بیماران از قبیل سن، جنس و نیز اگر انگل دیگری در نمونه مشاهده می‌گردید، جداگانه ثبت می‌شد. در این مدت جمعاً ۷۱ مورد دیسانتری که ۵۳ مورد آن توسط آزمایشگاههای مذکور به عنوان دیسانتری آمیبی و ۱۸ مورد دیسانتری غیرآمیبی و با علل دیگر گزارش گردیده بود به روش‌های فوق بررسی مجدد شد.

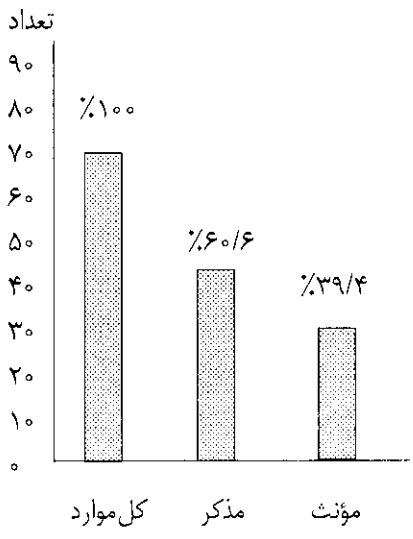
نتایج

از ۷۱ مورد دیسانتری مورد بررسی ۴۳ مورد (۶۰/۶٪) مربوط به مردان و ۲۸ مورد (۳۹/۴٪) مربوط به زنان می‌باشد (نمودار۱). در این بررسی از ۵۳ مورد دیسانتری که به عنوان دیسانتری‌آمیبی گزارش شده بود فقط در ۱۲ مورد (۲۲/۶٪) آنتامباهیستولیتیکا مشاهده شد و در ۴۱ مورد (۷۷/۴٪) با روش‌های مذکور به موردی از آنتامباهیستولیتیکا برخورد نشد لذا می‌بایست مثبت کاذب بوده باشد (جدول۱). از این ۴۱ مورد فوق در ۶ مورد حداقل یکی از انگل‌های آنتامبا کلی ـ اندولیماکس نانا، دی‌آنتامبافراژیلیس و بلاستوسیستیس

۱- Hsr+s: Horse serum ringer

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره (۱): توزیع فراوانی جنسی ۷۱ مورد ابتلاء به دیسانتری در تهران و کرج در سال ۱۳۷۷

هومنیس مشاهده شد و در سایر موارد احتمالاً ماکروفاژها و پلی‌مرفونکلئورها با ترفوزوئیت هماتوفاژ اشتباه شده بودند.

در هیچکدام از ۱۸ مورد دیسانتری که از نظر آنتامباهیستولیتیکا منفی گزارش شده بودند با روش‌های فوق آمیب مشاهده نشد لذا میزان منفی واقعی ۱۰۰درصد بود و منفی کاذب مشاهده نگردید (جدول ۲).

بحث

آنتامباهیستولیتیکا تک‌یاخته‌ای است با پراکندگی جهانی و در ایران از همه مناطق گزارش شده است . میزان آلودگی به این انگل در نقاط مختلف کشور متفاوت است. شیوع آلودگی به کیست این انگل از ۲/۲درصد در مناطق مرکزی تا بیش از ۳۰درصد در بعضی مناطق جنوب کشور گزارش شده است[۱]. قسمت اعظم موارد آلودگی به آنتامباهیستولیتیکا بدون علایم است و فرد آلوده فقط کیست دفع می‌کند. تقریباً در ۱۰درصد موارد با تهاجم آمیب به بافت‌های روده میزبان علایم بیماری ظاهر می‌گردد که در اکثر موارد به صورت دیسانتری ظاهر می‌شود. در عده کمتری آمیب خود را به سایر ارگانها می‌رساند و ایجاد آمیبیاز خارج روده‌ای می‌کند[۲].

در تشخیص آزمایشگاهی ، دیسانتری آمیبی اغلب با دیسانتری‌های ایجاد شده در اثر سایر عوامل خصوصاً با دیسانتری با سیلر اشتباه می‌شود که منجر به گزارش‌های مثبت کاذب یا منفی کاذب می‌گردد[۷]. تشخیص دیسانتری آمیبی در آزمایشگاههای تشخیص طبی مبتنی بر جستجو و یافتن آمیب در گسترش مرطوب تهیه شده از نمونه مدفوع فرد مبتلا می‌باشد. در این روش مهمترین فاکتور در شناسایی صحیح و دقیق آمیب مهارت فرد در استفاده از میکروسکوپ می‌باشد. حتی در کشورهایی که آمیبیاز و دیگر آلودگیهای انگلی شایع‌تر از سایر مناطق است موارد تشخیص غلط به وفور مشاهده می‌گردد. برای مثال در یک مطالعه مشابه که توسط مرکز کنترل بیماریها (CDC)[1] در السالوادر صورت گرفته از ۲۶۸ مورد دیسانتری آمیبی گزارش شده توسط آزمایشگاهها تنها ۲۵درصد آنها مورد تأیید قرار گرفته است[۸].

جدول شماره (۱): بررسی مجدد ۵۳ نمونه مورد دیسانتری آمیبی گزارش شده در تهران و کرج از نظر وجود آمیب

فراوانی / بررسی مجدد	تعداد	درصد
مثبت واقعی	۱۲	۲۲/۶
مثبت کاذب	۴۱	۷۷/۴
جمع	۵۳	۱۰۰

جدول شماره (۲): بررسی مجدد ۱۸ نمونه مورد دیسانتری غیر آمیبی گزارش شده در تهران و کرج از نظر وجود آمیب

فراوانی / بررسی مجدد	تعداد	درصد
منفی واقعی	۱۸	۱۰۰
منفی کاذب	-	-
جمع	۱۸	۱۰۰

در بررسی حاضر نیز از ۵۳ مورد دیسانتری آمیبی گزارش شده فقط ۱۲ مورد (۲۲/۶٪) مثبت واقعی بودند که در آنها حداقل با یکی از سه روش مذکور آنتامباهیستولیتیکا مشاهده گردید و ۷۷/۴ موارد مثبت کاذب بودند. لازم به ذکر است که تمام موارد مثبت گزارش شده آزمایشگاهها با استفاده از روش تهیه گسترش مستقیم با سرم فیزیولوژی و محلول لوگل تشخیص داده شده بود. مهمترین عامل در تشخیص مثبت کاذب اشتباه شدن سلولهایی مانند لوکوسیت‌ها و خصوصاً ماکروفاژها با ترفوزویت آنتامباهیستولیتکا می‌باشد. ماکروفاژها چون قادر به بلع گلبولهای قرمز هستند و اندازه نسبتاً بزرگی دارند بطور شایعی به غلط ترفوزوئیت هماتوفاژ قلمداد می‌گردند. در این مورد دقت در سیتوپلاسم، هسته، و نیز حرکت می‌تواند از موارد اشتباه بکاهد. لوکوسیت‌ها نیز گاهی اوقات به اشتباه آمیب فرض می‌شوند. قابل ذکر است که لوکوسیت‌ها تقریباً هیچ حرکتی ندارند و سیتوپلاسم و حتی اندازه آنها بطور مشخصی با آمیب متفاوت است. پلی‌مورفونوکلئرها خصوصاً در حال تحلیل شدن که هسته آنها بصورت وزیکولر و گرانوله دیده می‌شود بسیار شبیه کیست آنتامباهیستولیتیکا می‌شوند و

1-CDC: Center of Disease Control

www.SID.ir

Archive of SID

بعلت عدم آگاهی بعضی از این موضوع که در حالت دیسانتری آمیبی غالباً کیست مشاهده نمی‌شود به غلط گزارش می‌گردد که کیست و ترفوزوئیت آمیب دیده شد.

در این بررسی همچنین مشخص گردید که تک‌یاخته‌هایی نظیر آنتامباکلی با ترفوزوئیت آنتامباهیستولیتیکا و تک‌یاخته‌هایی نظیر دی‌آنتامبافراژیلیس، اندولیماکس نانا و بلاستوسیستیس مهمترین ارگانیسمهایی هستند که با کیست آنتامباهیستولیتیکا اشتباه می‌شوند وعامل دیگری در تشخیص مثبت کاذب هستند. توجه به وضعیت حرکت و نوع پاهای کاذب، وضعیت سیتوپلاسم، موقعیت و اندازه کاریوزوم و نیز آرایشهای دیواره هسته می‌تواند راهگشای بسیار مفیدی در تشخیص و افتراق این تک‌یاخته‌ها از آنتامباهیستولیتیکا باشد.

استفاده به موقع از تکنیک مناسب جایگاه ویژه‌ای در تشخیص صحیح دارد. در دیسانتری آمیبی چون بطور معمول فقط ترفوزئیت دفع می‌شود و کیستهای آمیب مشاهده نمی‌شود لذا بکار گیری روش‌های تغلیظ مدفوع نظیر روش رسوبی فرمالین - اتر در این مورد نه تنها سودبخش نمی‌باشد بلکه می‌تواند ترفوزوئیتها را تحلیل یا از بین ببرد. تهیه گسترش مستقیم با سرم فیزیولوژی برای دیدن ترفوزوئیتها و حرکت آنها در موارد دیسانتری روش بسیار مناسبی می‌باشد. توصیه می‌شود برای افزایش کارآیی تشخیص، بیش از یک گسترش تهیه گردد و گسترشها با دقت، صرف وقت و حوصله تمام بصورت کامل بررسی گردد.

لازم به ذکر است چون در این مطالعه هدف بررسی موارد دیسانتری‌آمیبی و بدست آوردن آمیب بوده است، تنها ۱۸ مورد دیسانتری غیرآمیبی مورد بررسی قرار گرفت که با این تعداد نمی‌توان قضاوت قطعی کرد و برای ارزیابی موارد منفی کاذب، احتیاج به تعداد بیشتری نمونه است.

علاوه بر مهارت فرد آزمایش کننده، اهمیت دادن به بخش انگل‌شناسی و صرف وقت برای بررسی نمونه‌ها که گاه احتیاج به آزمایش مکرر یک نمونه می‌شود، در تشخیص صحیح و کاهش موارد منفی کاذب نقش به سزایی دارد. از مشکلاتی که در آزمایشگاههای مورد بررسی ما مشاهده گردید و به نظر می‌رسد عمومیت داشته باشد، انجام آزمایش مدفوع در آخرین ساعات کار می‌باشد. از آنجایی که ترفوزوئیتها سریع پس از دفع بی‌حرکت و یا اتولیز می‌گردند باید تلاش گردد تا اولاً در صورت امکان نمونه‌گیری از بیمار در محیط آزمایشگاه صورت گیرد یا سریعاً نمونه به آزمایشگاه منتقل گردد و ثانیاً نمونه‌ها در حداقل زمان ممکن پس از دفع آزمایش گردند تا حرکت آمبوئید ویژه ترفوزوئیتهای آنتامباهیستولیتیکا مشاهده گردد. اگر تأخیر اجتناب ناپذیر باشد، نمونه بایستی سرد نگه داشته شود. حتی پس از ۴ ساعت نگه‌داری نمونه در یخچال ۴ درجه، ترفوزوئیت‌ها دوباره پس از گرم کردن فعال خواهند شد[۵].

حقیقی و رضائیان(۳) استفاده از محیط کشت سرم منعقده اصلاح شده (Hsr+s) را برای تشخیص دیسانتری آمیبی دارای اعتبار قابل توجهی دانسته‌اند. این محققین حساسیت و ویژگی این روش را به ترتیب ۸۵ و ۱۰۰درصد گزارش کرده‌اند . با توجه به ساده بودن ساخت و تهیه این محیط، حساسیت و ویژگی بالای آن و امکان تهیه آن در آزمایشگاههای تشخیص طبی پیشنهاد می‌شود استفاده از این محیط همراه با روش تهیه گسترش مستقیم به عنوان یک استراتژی مناسب در تشخیص آزمایشگاهی دیسانتری آمیبی مدنظر قرار گیرد.

وضعیت نمونه مدفوع فرد مبتلا به دیسانتری نیز در تشخیص آمیبیاز می‌تواند تا حدودی راهنما باشد برای مثال حداقل در ۲۵درصد موارد دیسانتری آمیبی کریستالهای شارکوت لیدن قابل مشاهده است. در حالیکه این کریستالها در دیسانتریهای باکتریال دیده نمی‌شود و یا pH مدفوع در دیسانتری آمیبی حالت اسیدی دارد و گلبولهای قرمز بصورت آگلوتینه و به مقدار زیاد مشاهده می‌شوند[۲].

استفاده از روشهای سرولوژی نظیر IFA(۱) و الیزا برای جستجوی آنتی‌بادیهای ضدآمیب در سرم افراد مبتلا به دیسانتری نیز به عنوان یک روش توصیه شده است اما در حال حاضر این روش بجز در مراکز تحقیقاتی در سایر آزمایشگاهها قابل اجرا و مقرون به صرفه نمی‌باشد.

در پایان علاوه بر موارد یاد شده فوق پیشنهاد می‌گردد جهت افزایش مهارت، ارتقاء اطلاعات و آشنایی با تکنیک‌ها و روشهای جدید، دوره‌های تئوری و عملی بازآموزی به طور مرتب برای شاغلین آزمایشگاههای تشخیص طبی برگزار گردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری صمیمانه مسئولین و کارمندان محترم آزمایشگاههای مورد بررسی و نیز از سرکار خانم فرنیا و سرکار خانم بابایی در واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت تشکر و قدردانی می‌گردد. ■

۱- IFA: Indirect Immunoflurscent Assay

www.SID.ir

Archive of SID

مراجع

۱. عزیزی فریدون. اپیدمیولوژی بیماریهای شایع در ایران. چاپ اول، تهران: مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز. ۱۳۷۲؛ صفحات ۱۷۲-۱۵۵.

۲. رضائیان مصطفی. آمیبیاز. مجله آمیبیاز ۱۳۶۶؛ شماره ۲۰۹۷، صفحات ۲۱-۱۸.

۳. حقیقی علی، رضائیان مصطفی. کشت و نگهداری آنتامباهیستولیتیکا در محیط کشت سرم اسب، رینگر و نشاسته برنج (Hsr+s)، مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. ۱۳۷۰؛ دوره ۵، شماره ۲، صفحات ۶۴-۶۰.

4. Markell E, Voge M. Medical Parasitology. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992; P. 22-42.

5. Walsh, JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Rev Infect Dis 1986; 8(2): 228-238.

6. WHO. Basis Laboratory Method in Medical Parasitology. 1st ed. Geneva: World Health Organization, 1991; p. 71-76.

7. Ruebush TK. Diagnosis of intestinal parasite by state and territorial public health laboratories. J Infect Dis 1978;1: 114-117.

8. Spencel HC. Serologic and parasitologic studies of Entamoeba histolytica in Elsarvador 1974-1978. Am J Trop Med Hyg 1981; 30(1): 63-68. ■

www.SID.ir