مقاله پژوهشی
مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 7 (شماره پیاپی 66)، آذر 1391، 47-37

تشخیص کریپتوسپوریدیوم و میکروسپوریدیاهای روده‌ای در افراد مبتلا به HIV/AIDS با روش‌های رنگ آمیزی و PCR بر روی ژن 16srRNA میکروسپوریدیا

بهزاد قربان‌زاده[1]، جاوید صدرایی[2*]، حمید عمادی کوچک[3]

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد انگل شناسی، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
2- دانشیار، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- استادیار، گروه بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 90/7/6 تاریخ پذیرش: 91/2/13

چکیده

زمینه و هدف: روز به روز بر گزارش عفونت‌های میکروسپوریدیایی افزوده می‌شود و بعضی از جنس‌ها مانند انتروسیتوزون بینئوسی و انسفالیتوزون اینتستینالیس از عوامل مهم ایجاد کننده اسهال مزمن به ویژه در بیماران HIV مثبت می‌باشند. در این مطالعه از روش‌های رنگ آمیزی تریکروم-آبی اصلاح شده (MTS)، اسید فست تریکروم (AFT) و PCR جهت شناسایی میکروسپوریدیا در نمونه‌های مدفوع به کار گرفته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی تعداد 71 نمونه مدفوع از بیماران مبتلا به ایدز با اسهال مزمن جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال یافت. از هر نمونه مدفوع 2 عدد لام تهیه شده و با متانول فیکس شد و با روش‌های MTS و AFT رنگ‌آمیزی صورت گرفت و توسط سه نفر مشاهده شد. هم‌چنین از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ناحیه حفاظت شده 16srRNA میکروسپوریدیاهای روده‌ای استفاده شد.

یافته‌ها: 13 بیمار(18/30 درصد) از 71 بیمار، با استفاده از دو روش رنگ‌آمیزی ذکر شده از نظر میکروسپوریدیا مثبت شدند. هم‌چنین 9 بیمار(12/67 درصد) با استفاده از روش AFT از نظر کریپتوسپوریدیوم مثبت گزارش شدند که 4 مورد (5/63 درصد) از این افراد هم‌زمان از نظر میکروسپوریدیا مثبت شناخته شده بودند. در تکنیک PCR، 16 بیمار (22/53 درصد) از نظر میکروسپوریدیاهای روده‌ای مثبت شناخته شدند. لازم به ذکر است تمامی مواردی که از نظر میکروسپوریدیا با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی مثبت گزارش شده بودند در تکنیک PCR نیز مثبت شناخته شدند.

نتیجه‌گیری: مشاهده شد که تکنیک PCR حساسیت بالاتری نسبت به روش‌های رنگ‌آمیزی دارد. هم‌چنین مشاهده شد که هر دو روش رنگ‌آمیزی به یک میزان در تشخیص میکروسپوریدیا مفید می‌باشند.

واژگان کلیدی: ایدز، کریپتوسپوریدیوم، میکروسپوریدیا، PCR، رنگ‌آمیزی

[*]**نویسنده مسئول:** تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، گروه انگل شناسی پزشکی
Email: sadraeij@modares.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

میکروسپوریدیا (Microsporidia) از جمله انگل‌های یوکاریوتیک داخل سلولی اجباری است که قادر به تولید اسپور بوده و طیف وسیعی از مهره‌داران و بی‌مهره‌ها را آلوده می‌سازد. بر اساس توالی زیر واحد کوچک و بزرگ rRNA و توالی DNA کدکننده پروتئین در این شاخه بیش از 140 جنس و 1200 گونه وجود دارد که از این تعداد تنها 6 جنس در انسان‌ها عفونت‌زا می‌باشند(1، 2).

میکروسپوریدیازیس یک عفونت فرصت‌طلب در میان افراد مبتلا به سندرم نقص سیستم ایمنی است و روز به روز تعداد موارد شناسایی شده افزایش می‌یابد که به دلیل گسترش روش‌های تشخیصی مناسب می‌باشد. در دهه‌های اخیر چند گونه جدید میکروسپوریدیایی از جمله انتروسیتوزون بینئوسی (E.bieneusi) در سال 1985، انسفالیتوزون هلم (E.hellem) در 1991 و سپتاتا اینتستینالیس (S.intestinalis) در 1993 در بیماران ایدزی شناسایی شد(2).

احتمالاً بسیاری از عفونت‌های میکروسپوریدیازیس انسانی منشا زئونوز داشته و از طریق آب آلوده به فضولات حیوانی منتقل می‌شوند، با این وجود انتقال انسان به انسان نیز توصیف شده است(3). این عوامل اگر چه در میزبانان با ایمنی سالم به صورت خود محدود شونده می‌باشند ولی در افراد مبتلا به سندرم نقص سیستم ایمنی به خصوص بیماران ایدزی می‌تواند تهدید کننده حیات باشد(1، 3).

بیش از 1000 مورد میکروسپوریدیازیس در بیماران HIV مثبت گزارش شده که به طور عمده ناشی از انتروسیتوزون بینئوسی بوده است. بین 2 الی 50 درصد بیماران، ضعف سیستم ایمنی شدیدی داشته و شمارش سلول‌های TCD4 آنها کمتر از 100 عدد در هر میکرولیتر و دچار اسهال شدید نیز بودند. آلودگی با سایر گونه‌های میکروسپوریدیایی دارای فراوانی کمتری می‌باشد ولی بیش از 100 مورد آلودگی انسانی با گونه‌های انسفالیتوزون گزارش شده است(1، 4، 5). عفونت‌های روده‌ای با میکروسپوریدیا به طور عمده در بیماران مبتلا به HIV مثبت مشاهده می‌شود و اغلب موارد بیماری در اثر انتروسیتوزون بینئوسی می‌باشد. این عفونت‌ها بیشتر در بیماران با ضعف سیستم ایمنی شدید و افرادی که شمارش CD4 آنها کمتر از 100 عدد در هر میکرولیتر باشد معمول است(6). اسهال ناشی از این انگل شدید، غیر خونی و غیر موکوئیدی بوده و روزانه 10 بار یا بیشتر دفع داریم، کاهش کند ولی پیشرونده وزن، سوء جذب چربی، D-گزیلوز و ویتامین B12 مشاهده می‌شود. بررسی‌ها نشان داده وجود سایتوکاین TNF-α در مدفوع بیماران ایدزی مبتلا به میکروسپوریدیازیس روده‌ای می‌تواند با از دست دادن آب بدن و کاهش وزن در ارتباط باشد(1، 9-7). عفونت روده‌ای معمولاً همراه با کمبود لاکتوز و کاهش فعالیت آلکالن فسفاتاز(ALP) و آلفا-گلوکوزیداز می‌باشد و هم‌چنین شاهد کاهش و آتروفی ویلی‌ها هستیم. اسهال به طور ناگهانی رخ داده و ممکن است برای چندین ماه ادامه یابد. گونه‌هایی که باعث عوارض روده‌ای می‌شوند عبارتند از: انتروسیتوزون بینئوسی، انسفالیتوزون اینتستینالیس، انسفالیتوزون کونیکولی (E.cuniculi) و انسفالیتوزون هلم که موارد اول و دوم شایع‌تر از گونه‌های دیگر می‌باشند. هدف از این مطالعه کاربرد روش‌هایی جهت تشخیص میکروسپوریدیازیس روده‌ای می‌باشد که ساده و قابل اعتماد باشد و در عین حال قادر به شناسایی سایر عفونت‌های فرصت طلب روده‌ای از جمله کریپتوسپوریدیوم نیز باشد. هم‌چنین ارتباط بین تعداد لنفوسیت‌های T CD4 در بیماران مبتلا به ایدز با حضور این عوامل انگلی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی تعداد 71 نمونه مدفوع از بیماران مبتلا به ایدز بیمارستان امام خمینی تهران که مبتلا به اسهال مزمن نیز بودند، به آزمایشگاه انتقال یافت. از هر نمونه مدفوع 2 عدد لام تهیه شده و با روش‌های تریکروم-آبی اصلاح شده(Modified Trichrome Stain-MTS) و اسید فست تریکروم (Acid-Fast Trichrome-AFT) رنگ‌آمیزی صورت گرفت. هم‌چنین

Archive of SID
www.SID.ir

از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ناحیه حفاظت شده 16srRNA میکروسپوریدیاهای روده‌ای استفاده شد. جهت آزمایش میکروسکوپی در ابتدا نمونه‌های فیکس شده در دی کرومات پتاسیم به مدت 5-10 دقیقه در مجاورت پتاس 10 درصد (KOH 10 درصد) قرار گرفت(جهت از بین رفتن موکوس موجود در نمونه) و سپس به مدت 10 دقیقه در دور 6000 سانتریفیوژ گردید. بعد اسمیر نازکی از نمونه‌ها تهیه شد و پس از خشک شدن در مجاورت هوا با متانول فیکس شد و با روش تریکروم آبی اصلاح شده و اسید فست تریکروم رنگ‌آمیزی شد(12-10). هر لام حداقل به مدت 15 دقیقه و با بزرگنمایی بالا بررسی گردید و موارد مثبت ثبت گردید. مراحل رنگ‌آمیزی تریکروم اصلاح شده در جدول 1 آمده است.

جدول 1. مراحل رنگ‌آمیزی تریکروم-آبی اصلاح شده

ردیف	مرحله	زمان
1	رنگ تریکروم	210 دقیقه
2	اسید الکل	کمتر از 10 ثانیه
3	الکل 95 درصد	کمتر از 10 ثانیه(چند بار)
4	الکل 95 درصد	5 دقیقه (2 بار)
5	الکل 100 درصد	10 دقیقه
6	گزیلول	10 دقیقه

جهت رنگ‌آمیزی اسید فست تریکروم ابتدا محلول کربول فوشین را برای 10 دقیقه روی لام ریخته و سپس با اسید الکل رنگ‌بری صورت گرفته و در ادامه مراحل رنگ‌آمیزی تریکروم- آبی اصلاح شده را انجام می‌دهیم. برای سرعت بخشیدن به فرایند می‌توان در این مرحله، رنگ‌آمیزی را در دمای 37 درجه انجام داد. با استفاده از این تکنیک‌های رنگ‌آمیزی، اسپورهای میکروسپوریدیایی به رنگ صورتی- قرمز در می‌آیند. دیواره اسپور، رنگ قرمز به خود می‌گیرد و در بعضی از اسپورها نوار کمربند مانند مشخصی دیده می‌شود که وجه تشخیصی دارد.

جهت استخراج DNA از روش پروتئیناز K، SDS، CTAB استفاده شد(13، 14). برای شناسایی گونه‌های روده‌ای میکروسپوریدیایی(انتروسیتوزون بینئوسی، انسفالیتوزون اینتستینالیس، انسفالیتوزون کونیکولی و انسفالیتوزون هلم) از یک جفت پرایمر طراحی شده بر اساس ژن 16srRNA استفاده شد(3، 15، 16) که در پایین توضیح داده شده است.

Forward(PMP1):5'-
CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3'
Reverse(PMP2):5'-
CCTCTCCGGAACCAAACCCTG-3'

طول قطعه تکثیر یافته با این پرایمر در چهار گونه میکروسپوریدیای ذکر شده به شرح زیر می‌باشد:

انتروسیتوزون بینئومی: 250 bp

انسفالیتوزون کونیکولی: 268 bp

انسفالیتوزون اینتستینالیس: 270 bp

انسفالیتوزون هلم: 279 bp

لازم به ذکر است که دمای اتصال برای این پرایمرها، 62 درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد و محصول PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد الکتروفورز گردید. مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR و برنامه‌زمان بندی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در جداول 2 و 3 آمده است.

جدول 2. مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

ترکیبات	غلظت معمول در محلول‌ها	نسبت لازم در هر واکنش	حجم مورد نیاز در هر واکنش
بافر واکنش	x 10	x 1/2	3/0 میکرولیتر
پرایمر اول	20 پیکومول بر میکرو لیتر	20 پیکومول	1/0 میکرولیتر
پرایمر دوم	20 پیکومول بر میکرو لیتر	20 پیکومول	1/0 میکرولیتر
مخلوط نوکلئوتیدها	10 میلی مول	1/2 میلی مول	1/0 میکرولیتر
کلرور منیزیم	50 میلی مول	3/0 میلی مول	1/5 میکرولیتر
Taq پلیمراز	5 واحد بر میکرولیتر	5 واحد	1/0 میکرولیتر
آب خالص	.....	.....	25 تا Fit میکرولیتر
DNA الگو	1 پیکوگرم تا 1 میکروگرم بر میکرولیتر	.....	1 تا 10 میکرولیتر

جدول 3. برنامه زمان بندی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مرحله	دما (درجه سانتی-گراد)	زمان
واسرشت اولیه	94	10 دقیقه

Archive of SID
www.SID.ir

3 مرحله اول از مراحل زیر برای 35 سیکل انجام پذیرفت		
واسرشت	94	30 ثانیه
اتصال پرایمرها	62	30 ثانیه
بازآرایی	72	30 ثانیه
بازآرایی نهایی	72	10 دقیقه
Soaking	4	0000

جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه 14 و جهت مقایسه بین گروه‌های مختلف از نظر تعداد لنفوسیت‌های T CD4 از آزمون آنووا و آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از 0/05 در نظر گرفته شد.

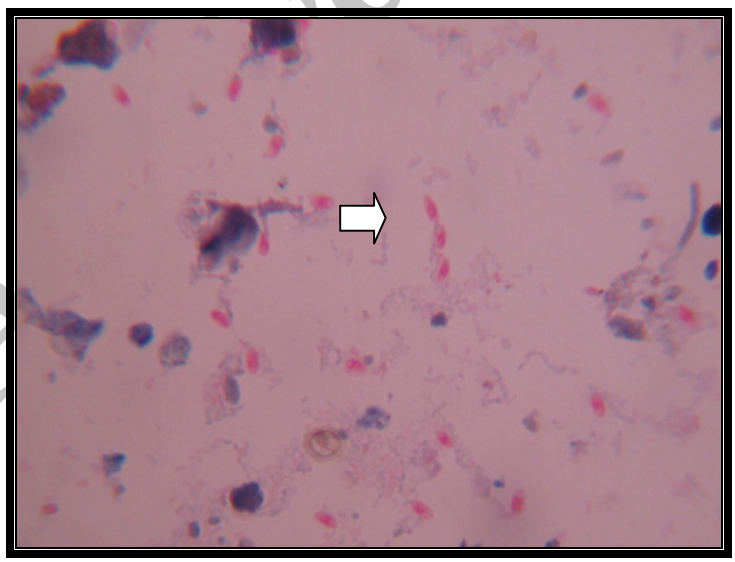
یافته‌ها

تمامی نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه از نظر وجود اسپورهای میکروسپوریدیایی بررسی شدند. بدین منظور برای بالا بردن احتمال مشاهده اسپورها از روش‌های تخلیص استفاده می‌شود ولی به دلیل کوچک و سبک بودن اسپورها و به دلایل تکنیکی، روش‌های تخلیص باعث از دست دادن اسپورها و در نتیجه ایجاد نتایج منفی کاذب می‌شود. بنابراین، فقط نمونه‌ها را از صافی فلزی عبور داده و سانتریفیوژ کردیم.

نتایج مربوط به رنگ‌آمیزی تریکروم آبی اصلاح شده

جهت بهینه‌سازی این تکنیک از نمونه‌های میکروسپوریدیایی نوزما استفاده گردیدکه از گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس و آقای دکتر دلیمی دریافت شد(شکل 1). بهترین زمان رنگ گرفتن اسپورهای میکروسپوریدیایی در نمونه مدفوع 210 دقیقه بود.

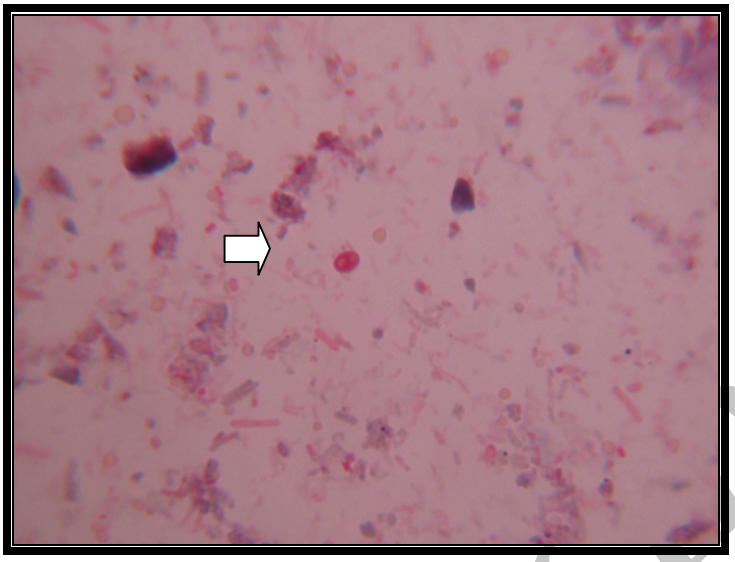
با استفاده از این تکنیک تمام نمونه‌ها رنگ‌آمیزی شد و نتایج مثبت ثبت گردید(شکل 2). تعداد نمونه‌های مثبت از نظر اسپورهای میکروسپوریدیایی با این روش 13 مورد(18/30درصد) گزارش شد.



شکل 1. رنگ‌آمیزی تریکروم آبی اصلاح شده. تصویر مربوط به جنس نوزما جهت بهینه‌سازی زمان رنگ‌آمیزی

Archive of SID

www.SID.ir

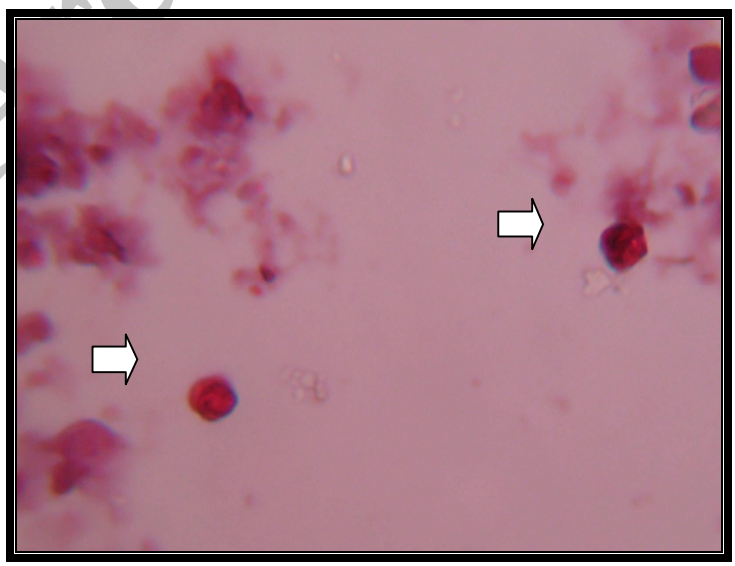


شکل2. رنگ‌آمیزی تریکروم آبی اصلاح شده. تصویر مربوط به میکروسپوریدیای روده‌ای از نمونه بیمار

نتایج مربوط به رنگ‌آمیزی اسید فست تریکروم

این تکنیک روش مناسبی برای بررسی تک یاخته‌های فرصت طلب (میکروسپوریدیا، کریپتوسپوریدیوم، ایزوسپورا و سیکلوسپورا) می‌باشد.

با استفاده از این تکنیک نیز تمام نمونه‌ها رنگ‌آمیزی شد و موارد مثبت ثبت گردید. تمامی نمونه‌هایی که با استفاده از روش رنگ‌آمیزی تریکروم آبی اصلاح شده، از نظر اسپورهای میکروسپوریدیایی مثبت بودند با این تکنیک (Acid-Fast Trichrome) نیز مثبت گزارش شدند. هم‌چنین تعداد 9 (12/67درصد) نمونه بالینی با استفاده از این تکنیک رنگ‌آمیزی از نظر کریپتوسپوریدیوم مثبت گزارش گردید(شکل 3). لازم به ذکر است که 4 (5/63 درصد) مورد از این موارد ذکر شده دارای عفونت هم‌زمان از نظر میکروسپوریدیا و کریپتوسپوریدیوم بودند.



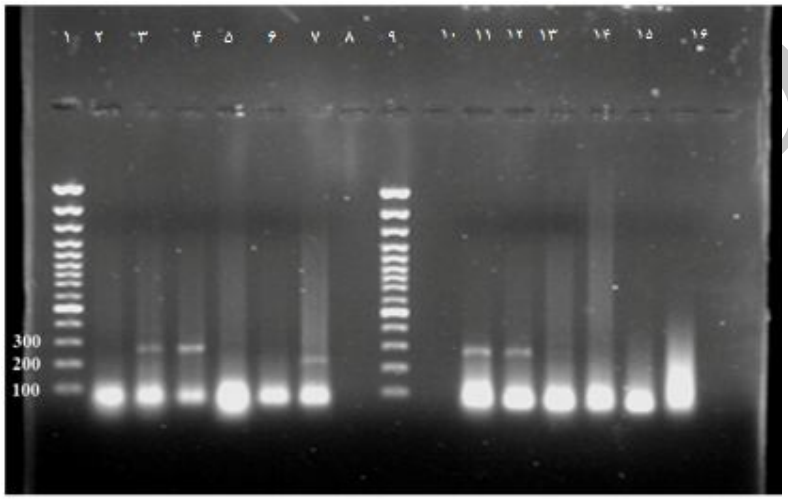
شکل 3.رنگ‌آمیزی اسید فست تریکروم. تصویر مربوط به تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج مربوط به PCR نمونه‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده از گرادیان دمایی و غلظتی، بر روی تمامی نمونه‌ها، PCR انجام شد و نتایج مثبت از نظر حضور میکروسپوریدیاهای روده‌ای ثبت گردید. از تعداد 71 نمونه بالینی، تعداد 16 (22/53درصد) مورد از نظر میکروسپوریدیاهای روده‌ای مثبت بود. باندهای 250bp و 270bp نشان دهنده عفونت با گونه‌های انتروسیتوزون و انسفالیتوزون می‌باشد(شکل 4).

لازم به ذکر است تمام موارد مثبت ثبت شده از نظر میکروسپوریدیا در تکنیک‌های رنگ‌آمیزی، در آزمایش PCR نیز نتایج مثبت نشان دادند(جدول 4).



شکل 4 . الکتروفورز محصول PCR بر روی تعدادی از نمونه‌ها.
از چپ به راست: باند اول و نهم: مارکر 100 جفت بازی، باند دوم: کنترل منفی، باند سوم: کنترل مثبت، باند های 4، ۷،۱۱ و 12: نمونه های مثبت شده از نظر میکروسپوریدیاها

جدول 4. تعداد موارد مثبت میکروسپوریدیا به تفکیک تکنیک‌های مورد استفاده

تکنیک مورد استفاده	تعداد موارد	درصد موارد مثبت
رنگ‌آمیزی تریکروم آبی	13	18/30 درصد
رنگ‌آمیزی اسید فست تریکروم	13	18/30 درصد
PCR	16	22/53 درصد

ارتباط میکروسپوریدیازیس و کریپتوسپوریدیوزیس با تعداد لنفوسیت‌های T.CD4

با توجه به این که عفونت میکروسپوریدیازیس و کریپتوسپوریدیوزیس از جمله انگل‌های فرصت‌طلب به شمار می‌روند، انتظار می‌رود این میکروارگانیسم‌ها بیشتر در افراد با ضعف سیستم ایمنی بروز یابند و پایداری بیشتری داشته باشند. از این رو میانگین تعداد لنفوسیت‌های T.CD4 چهار گروه از بیماران به تفکیک با هم مقایسه شد. این چهار گروه عبارتند از:

- بیماران HIV مثبتی که تنها از نظر میکروسپوریدیا مثبت باشند.
- بیماران HIV مثبتی که تنها از نظر کریپتوسپوریدیوم مثبت باشند.
- بیماران HIV مثبتی که دارای عفونت همزمان میکروسپوریدیا و کریپتوسپوریدیوم بودند.
- بیماران HIV مثبتی که فاقد این دو عفونت باشند.

بر اساس این آزمون، برابری میانگینT.CD4 چهار گروه رد شد(p=0/038). آزمون تعقیبی (LSD) حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های T.CD4 افراد مبتلا به کریپتوسپوریدیوم و افراد مبتلا به عفونت

www.SID.ir

همزمان با افراد مبتلا به ایدز بدون عفونت‌های فوق (p به ترتیب 0/045 و 0/027) بود. لازم به ذکر است، با این که میانگین تعداد لنفوسیت‌های T.CD4 بیمارانی که تنها از نظر میکروسپوریدیا مثبت بودند، پایین بود(182/33) ولی از لحاظ آماری با هیچ کدام از گروه‌های ذکر شده اختلاف معنی‌داری وجود نداشت(جدول 5 و 6).

جدول 5. آماره‌های توصیفی لنفوسیت‌های T.CD4 برای چهار گروه توصیف شده

گروه‌های بیماران	تعداد بیماران	میانگین CD4	انحراف معیار	فاصله اطمینان 95 درصد برای میانگین	
				محدوده پایین	محدوده بالا
مبتلا به میکروسپوریدیا	12	182/33	93/67	122/81	241/84
مبتلا به کریپتوسپوریدیوم	5	113	45/95	55/93	170/06
مبتلا به عفونت همزمان	4	89	36/67	30/63	147/36
فاقد عفونت	50	219/82	121/52	185/28	254/35
کل بیماران	71	198/59	116/07	171/11	226/06

جدول6. مقایسه‌های چندگانه‌ای لنفوسیت‌های T.CD4 بین چهار گروه توصیف شده (متغیر وابسته: CD4)

گروه(الف)	گروه(ب)	میانگین اختلاف CD4 (گروه الف و ب)	p
مبتلا به میکروسپوریدیا	مبتلا به کریپتوسپوریدیوم	69/33	0/247
	مبتلا به عفونت همزمان	93/33	0/152
	فاقد عفونت	-37/48	0/299
مبتلا به کریپتوسپوریدیوم	مبتلا به میکروسپوریدیا	-69/33	0/247
	مبتلا به عفونت همزمان	24	0/749
	فاقد عفونت	-106/82	*0/045
مبتلا به عفونت همزمان	مبتلا به میکروسپوریدیا	-93/33	0/152
	مبتلا به کریپتوسپوریدیوم	-24	0/749
	فاقد عفونت	-130/82	*0/027
فاقد عفونت	مبتلا به میکروسپوریدیا	37/48	0/299
	مبتلا به کریپتوسپوریدیوم	106/82	*0/045
	مبتلا به عفونت همزمان	130/82	*0/027

* سطح معنی‌داری برای اختلاف میانگین T.CD4 برابر 0/05 در نظر گرفته شد

بحث

عفونت‌های فرصت طلب یکی از عوامل عمده در مرگ و میر بیماران مبتلا به سندرم نقص سیستم ایمنی می‌باشد. از این رو گزارشات مربوط به عفونت‌های میکروسپوریدیایی در بیماران مبتلا به اسهال مزمن روز به روز در حال افزایش بوده و شیوع آن از 22 درصد در کشورهای پیشرفته تا 32 درصد نیز رسیده است(3، 12). از طرفی سایر علائم بالینی از جمله کراتیت، میوزیت، سینوزیت، نفریت و غیره در بیماران مبتلا به ایدز می‌تواند در ارتباط با میکروسپوریدیازیس باشد. در کشورهای در حال توسعه عفونت‌های توام میکروسپوریدیایی و کریپتوسپوریدیوم در اغلب موارد در کنار هم دیده می‌شوند و یکی از عوامل عمده در ایجاد اسهال و کاهش وزن در بیماران مبتلا به ایدز به شمار می‌روند(12). بنابراین سعی ما بر این بود که در کنار تشخیص عفونت‌های میکروسپوریدیایی روده‌ای سایر تک یاخته‌های فرصت طلب و به ویژه کریپتوسپوریدیوم را نیز شناسایی کنیم. در این راستا ما به دنبال روش‌های نوین، مقرون به صرفه و قابل اعتماد بودیم تا بتوانیم عفونت‌های میکروسپوریدیازیس روده‌ای را همراه با سایر عوامل شناسایی کنیم.

Archive of SID

www.SID.ir

چندین حالت رنگ‌آمیزی تریکروم جهت تشخیص میکروسپوریدیاها طراحی شده که اولین آنها رنگ‌آمیزی Modified Trichrome Stain بود که اولین بار توسط وبر و همکاران به کار برده شد. سپس این روش توسط رایان اصلاح شد که از آنیلین بلو به جای فست‌گرین جهت رنگ زمینه استفاده شد. پس از آن اصلاحات بیشتر توسط کوکوسکین و همکاران ایجاد شد که از رنگ‌آمیزی Modified Trichrome-Blue در دمای بالا استفاده کرد(17).

در این مطالعه ما از رنگ‌آمیزی Modified Trichrome-Blue بر اساس تحقیقات رایان و همکاران استفاده کردیم زیرا رنگ زمینه آنیلین بلو دارای پایداری زیادی بوده و کانتراست بهتری با سایر عوامل باکتریایی و قارچی ایجاد می‌کند. از طرف دیگر میزان فسفوتنگستیک اسید آن پایین آورده شده است که تاثیر بسزایی در بهتر شدن رنگ زمینه دارد(10). در این مطالعه تغییر جزئی در این روش رنگ‌آمیزی صورت دادیم و طی آن زمان رنگ‌آمیزی را از 90 دقیقه به 210 دقیقه افزایش دادیم که در بهتر رنگ گرفتن اسپورهای میکروسپوریدیایی نقش بسزایی داشت. هم‌چنین از KOH به عنوان یک عامل موکولیتیک استفاده کردیم تا موکوس و سایر عوامل مزاحم از بین برود.

یکی دیگر از اهداف مهم ما در این مطالعه شناسایی سایر تک یاخته‌های فرصت طلب به ویژه کریپتوسپوریدیوم در کنار میکروسپوریدیازیس روده‌ای بود. با توجه به این که در بسیاری از کشورها این ارگانیسم (کریپتوسپوریدیوم) در کنار میکروسپوریدیاها در ایجاد اسهال و کاهش وزن بیماران دارای نقص سیستم ایمنی نقش مهمی ایفا می‌کند، بنابراین استفاده از روشی که هر دو ارگانیسم را شناسایی کند، ضروری به نظر می‌رسد. از این رو در این مطالعه از رنگ‌آمیزی Acid-Fast Trichrome استفاده گردید که با استفاده از این روش توانستیم علاوه بر اسپورهای میکروسپوریدیایی، 9 مورد عفونت با کریپتوسپوریدیوم را در این بیماران شناسایی کنیم. از این 9 مورد عفونت کریپتوسپوریدیومی تعداد 4 مورد در همراهی با عفونت میکروسپوریدیایی بودند. نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی با مطالعات ایگناتیوس و همکاران(12) مطابقت داشت و تمام نمونه‌هایی که در رنگ‌آمیزی Modified Trichrome-Blue مثبت بودند در این رنگ‌آمیزی نیز مثبت گزارش شدند. هم‌چنین مطالعه ما با تحقیقات ریسنر و همکاران مطابقت داشت و نشان داد که روش AFT روشی مناسب در تشخیص میکروسپوریدیا و سایر عفونت‌های فرصت طلب روده‌ای می‌باشد(11).

هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط دیدر و همکاران صورت گرفت مشاهده شد که رنگ‌آمیزی‌های مبتنی بر تریکروم نسبت به سایر روش‌های رنگ‌آمیزی نتایج قابل اعتمادتر و اختصاصی‌تری جهت تشخیص میکروسپوریدی‌ها به دست می‌دهند(18). این مطالعه با نتایج مطالعه ما نیز هم‌خوانی داشت و مشاهده کردیم که اکثر نمونه‌های مثبت شده در روش مولکولی با این روش‌های رنگ‌آمیزی نیز مثبت می‌شود و نتایج مثبت کاذب نیز ایجاد نمی‌کند. بنابراین با توجه به نتایج قابل اعتماد و اختصاصی رنگ‌آمیزی‌های AET و MTS و کم هزینه بودن آنها می‌توان از این روش‌ها به جای روش‌های مولکولی جهت تشخیص اختصاصی میکروسپوریدیاها و سایر تک یاخته‌های فرصت طلب روده‌ای در آزمایشگاه‌های تشخیصی طبی استفاده کرد.

تکنیک مولکولی PCR روش موفقی است که با استفاده از آن می‌توان عفونت میکروسپوریدیایی با تعداد کم اسپور در نمونه‌های بالینی و محیطی را شناسایی کرد. طبق تحقیقات مختلف آستانه تشخیص میکروسپوریدیاها در نمونه‌های مدفوع به روش PCR و میکروسکوپ نوری به ترتیب 100 و 10000-1000000 اسپور در هر گرم مدفوع می‌باشد که این نشان دهنده حساسیت بالای این تکنیک در مقایسه با روش‌های رنگ‌آمیزی است(4، 19). با توجه به این که در مطالعه ما نیز با روش PCR قادر به شناسایی 16 مورد مثبت از نظر میکروسپوریدیا در مقابل 13 مورد مثبت

Archive of SID
www.SID.ir

رنگ‌آمیزی بودیم بنابراین مطالعات ما نیز این یافته محققان را تایید می‌کند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و این که روش‌های رنگ‌آمیزی نتایج قابل قبولی را ارائه می‌دهند، می‌توان از این روش‌ها (رنگ‌آمیزی‌های تغییر یافته) در آزمایشگاه‌های روتین جهت تشخیص میکروسپوریدیاها استفاده کرد. هم‌چنین با توجه به زمان بر نبودن و مقرون به صرفه بودن روش اسید فست تریکروم و این که قادر به تشخیص چندین ارگانیسم فرصت‌طلب می‌باشد می‌توان از آن در آزمایشگاه‌های روتین جهت تشخیص میکروسپوریدیازیس، کریپتوسپوریدیوزیس، ایزوسپوریوزیس و غیره استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر نتیجه پایان نامه دانشجویی بهزاد قربان زاده تحت عنوان " تشخیص میکروسپوریدیاهای روده‌ای در افراد مبتلا به HIV/AIDS با روش‌های رنگ‌آمیزی و PCR " می‌باشد که بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تهران و کارکنان بخش عفونی بیمارستان امام خمینی تهران و تمامی کسانی که در این تحقیق ما را یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Franzen C, Müller A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. Clinical Microbiology Reviews. 1999;12(2):243-85.
2. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. Clinical Microbiology Reviews. 1994;7(4):426-61.
3. Samie A, Obi C, Tzipori S, Weiss L, Guerrant R. Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV-positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2007;101(6):547-54.
4. Garcia LS. Laboratory identification of the microsporidia. Journal of clinical microbiology. 2002;40(6):1892-901.
5. Chu P, West AB. Encephalitozoon (Septata) intestinalis: cytologic, histologic, and electron microscopic features of a systemic intestinal pathogen. American journal of clinical pathology. 1996;106(5):606-14.
6. Brasil P, Paiva DD, Lobo MSC, Sodre FC, Silva SP, Villela EV, et al. Clinical and diagnostic aspects of intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2000; 42(6): 299-304.
7. Didier ES. Microsporidiosis. Clinical infectious diseases. 1998;27:1-7.
8. Cornet M, Romand S, Warszawski J, Bouree P. Factors associated with microsporidial and cryptosporidial diarrhea in HIV infected patients. Parasite. 1996;3(4):397-401.
9. Hoffman RM, Marshall MM, Polchert DM, Jost BH. Identification and characterization of two subpopulations of Encephalitozoon intestinalis. Applied and environmental microbiology. 2003; 69(8):4966-70.
10. Ryan NJ, Sutherland G, Coughlan K, Globan M, Doultree J, Marshall J, et al. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. Journal of clinical microbiology. 1993;31(12):3264-9.
11. Reisner BS, Spring J. Evaluation of a combined acid-fast-trichrome stain for detection of microsporidia and Cryptosporidium parvum. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 2000;124(5):777-9.
12. Ignatius R, Lehmann M, Miksits K, Regnath T, Arvand M, Engelmann E, et al. A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of Cryptosporidium parvum and microsporidial species in stool specimens. Journal of clinical microbiology. 1997;35(2):446-9.
13. Asgharzadeh M, Kafil HS, Khakpour M. Comparison of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat and IS6110-RFLP methods in identifying

Archive of SID

www.SID.ir

epidemiological links in patients with tuberculosis in Northwest of Iran. Annals of microbiology. 2008;58(2):333-9.
14. Asgharzadeh M, Kafil HS. Comparing mannose binding lectin genetic diversity in intracellular and extracellular pathogens. African Journal of Biotechnology. 2010;6(17):2028-32.
15. Fedorko DP, Nelson NA, Cartwright CP. Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. Journal of clinical microbiology. 1995;33(7):1739-41.
16. Muller A, Stellermann K, Hartmann P, Schrappe M, Fätkenheuer G, Salzberger B, et al. A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporidia in clinical stool specimens. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 1999;6(2):243-6.
17. Kokoskin E, Gyorkos TW, Camus A, Cedilotte L, Purtill T, Ward B. Modified technique for efficient detection of microsporidia. Journal of clinical microbiology. 1994;32(4):1074-5.
18. Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. Journal of clinical microbiology. 1995;33(12):3138-45.
19. Müller A, Bialek R, Kämper A, Fätkenheuer G, Salzberger B, Franzen C. Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. Journal of clinical microbiology. 2001;39(4):1630-2.

Archive of SID

www.SID.ir