تشخیص پنومونی پنوموسیستیس کارینی با بکارگیری یافته‌های جدید

دکتر ناهید رحیمی‌فرد، عضو هیأت علمی آزمایشگاه کنترل مواد دارویی و غذایی و تشخیص طبی وزارت بهداشت و درمان
محمد آهی، عضو هیأت علمی بافت‌شناسی دانشکدهٔ پیراپزشکی شهید بهشتی
شادروان دکتر عبداله کهنمویی، استاد متوفی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

The Diagnosis of Pneumocystis Carinii Pneumonia by New Laboratory Methods

ABSTRACT

The object of this study was to find a suitable staining method for P. carinii. This parasite is not easily stained and clinical signs are not specific for the diagnosis of P. carinii pneumonia and therefore optimal laboratory methods for observing the organism are extremely valuable. In all 17 new conventional and modified staining techniques were used on lung impression smears and tissue section of sprague Dawley Rat treated with cortisone. Of these methods modified methylene blue 1 & 2, modified cresy violet 1,2,3,4 modified Gram, modified Giemsa 2 and modified Griedley techniques have not previously been reported. After comparing readability of the slides, ease of performances, rapidity, availablility and sensitivity of these 17 techniques for the diagnosis of P. carinii pneumonia, modified toluidine blue 01 & 2, modified methylene blue 1 & 2 and modified cresyl violet 3, 4 are suggested as the methods of choice for the rapid diagnosis of P. carinii pneumonia.

Key Words: Pneumocystis carinii; laboratory diagnosis; staining methods; Diagnosis

چکیده

در این بررسی تعداد ۲۰ موش صحرایی (رت) به مدت ۸ هفته و هر هفته ۲ بار، تحت تزریق یک میلی‌لیتر کورتیزون استات ۲۵ میلی‌گرم درصد قرار گرفتند و بدین ترتیب سیستم ایمنی آنها تضعیف شد. پس از آن رت‌ها اتوپسی شده و از ریه آنها گسترش‌های تماسی و برش‌های بافتی تهیه شد. سپس بیش از ۲۰ نوع روش رنگ‌آمیزی (ابداعی، تغییر داده شده و گزارش شده) بکار برده شد که از آنها ۱۷ تکنیک مناسب‌تر بوده و برای مقایسه در تشخیص پنوموسیتیس کارینی انتخاب شدند. در بین این رنگ‌آمیزی‌ها رنگ‌آمیزی ابداعی کرزیل ویوله برای دیدن اسپروزوآیت‌های پنوموسیستیس کارینی، روشهای رنگ‌آمیزی تغییر یافتهٔ متیلن‌بلو، کرزیل ویوله و گرم برای تشخیص سریع کیست پنوموسیستیس کارینی و چند تغییر جزئی برای اصلاح بعضی از روشهای دیگر تا کنون در هیچ مقاله‌ای گزارش نشده و تماماً حاصل پژوهش دو سالهٔ نگارندگان می‌باشد و با معرفی این تکنیک‌ها توسط مجلهٔ بین‌المللی ARMIS دانمارک (۱) هم اکنون در بیشتر بخش‌های تحقیقی دنیا از جمله در کشور عزیزمان ایران این روش‌ها به ویژه در ارتباط با بیماری AIDS مورد استفاده قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: پنوموسیستیس کارینی؛ تشخیص‌های آزمایشگاهی؛ روش‌های رنگ‌آمیزی؛ تشخیص

مقدمه

از مهمترین و متداولترین علل مرگ و میر افرادی که به صورت‌های مختلف دارای اختلال یا ضعف سیستم ایمنی هستند و همچنین بیماران مبتلا به ایدز، پنومونی پنوموسیستیس کارینی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

می‌باشد(۲). از آنجایی که علائم بالینی این بیماری، خاص پنومونی پنوموسیستیس کارینی نیست و تست‌های سرولوژیکی نیز بعلت وجود آنتی‌بادی سرمی در افراد دیگر مبتلا به بیماری‌های ریوی مورد استفاده می‌باشند(۳) و در نتیجه روش‌های تجربی ایمونوفلورسانس، بعنوان تشخیص اولیهٔ عمومی می‌تواند مطرح گردد(۴)، تشخیص اختصاصی مستلزم مشاهدهٔ ارگانیسم در نمونه‌های مختلف ریوی با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی است(۵).

بهمین علت تصمیم گرفته شد تا برای اولین بار در جهت تشخیص پنوموسیستیس کارینی، مقایسه‌ای بین روش‌های رنگ‌آمیزی بعمل آید. در این بررسی سعی شد از روشهایی که تهیهٔ مواد و انجام آن آسان، ارزان و قابل دسترس باشد استفاده شود تا احتیاجی به استفاده از کیت‌های خارجی نباشد و مقایسه‌ای بین روشهای مختلف از نظر میزان حساسیت، اختصاصی بودن، سرعت و سهولت تکنیک رنگ‌آمیزی و سرعت و راحتی خواندن لامها در تشخیص ارگانیسم انجام شد تا بدینوسیله بتوانیم روشهای مناسب، که قابلیت انجام در آزمایشگاههای مختلف تشخیص طبی را داشته باشد برای این منظور ارائه نماییم.

روش و مواد

برای این بررسی ۳۰ رت در نظر گرفته شد که در طول مدت مطالعه تمامی آنها از نظر رژیم غذایی و محل نگهداری یکسان بودند. به ۲۰ رت (گروه نمونه) هفته‌ای دوبار و هر بار یک میلی‌لیتر کورتیزون استات ۲۰٪ به مدت ۸ هفته زیرجلدی تزریق انجام شد(۶). ده رت دیگر (گروه شاهد) تزریقی دریافت نکردند. پس از این مدت، رت‌ها اتوپسی و از ریهٔ آنها گسترش‌های تماسی تهیه و قطعاتی نیز در محلول فیکساتیو بوئن برای تهیه برشهای بافتی فیکس شد، سپس از ریهٔ هر رت چند گسترش تماسی و برش بافتی انتخاب و به روش رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو که توسط Linda L.Gosey et al. (۷) شرح داده شده، رنگ آمیزی شدند. تمام گروه نمونه از نظر پنوموسیستیس کارینی مثبت بودند و تمام ۱۰ رت گروه شاهد از این نظر منفی بودند. بعلاوه از قسمت‌های دیگر رت‌ها، (کلیه، کبد، قلب و طحال) نیز کنترل بعمل آمد که تمامی این اعضا از نظر پنوموسیستیس کارینی منفی بودند. بدین ترتیب ریه رت‌ها پنوموسیستیس مثبت بودند و بر روی گسترش‌های تماسی و برش‌های بافتی آنها روشهای رنگ‌آمیزی مختلفی انجام شد که شامل انواع زیر است :

۱ـ دو روش رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو او (TBO) :MTBO1 با سولفاته کردن لامها قبل از رنگ‌آمیزی (۹،۸)و MTBO2 که بدنبال MTBO1 لامها را به روش پریودیک اسید شیف رنگ‌آمیزی می‌کنند(۷).

۲ـ روش جدید رنگ‌آمیزی با متیلن‌بلو: برای تهیهٔ محلول متیلن بلو، ۰/۳ گرم پودر متیلن‌بلو را در ۳۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ حل کرده و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر اسید کلریدریک خالص اضافه می‌کنیم. در روش اول (MMB1) : لامها را قبل از رنگ‌آمیزی با محلول متیلن بلوی فوق سولفاته می‌کنیم (عمل سولفاته کردن به این ترتیب است که لامها را قبل از رنگ‌آمیزی به مدت ۱۰ دقیقه در محلول حاوی ۴۵ میلی‌لیتر اسید استیک و ۱۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ قرار می‌دهیم). در روش دوم (MMB2) : بدنبال رنگ‌آمیزی MMB1 لامها را به روش پریودیک اسید شیف رنگ‌آمیزی می‌کنیم، استفاده از رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف برای تفریق کیست پنوموسیستیس کارینی از مخمرها می‌باشد که ممکن است در عفونت‌های سبک در دو رنگ‌آمیزی (MMB1) و (MTBO1) با هم اشتباه شوند(۷).

۳ـ روش رنگ‌آمیزی با گیمسا: یکی، روشی که بطور معمول در هماتولوژی استفاده می‌شود، دیگری استفاده از سولفاته کردن لام‌ها قبل از رنگ‌آمیزی گیمسا (M.Giemsa)(۹) و دیگری (M.Giemsa3) که بدنبال رنگ‌آمیزی قبل، از رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف استفاده می‌شود.

۴ـ روش رنگ‌آمیزی با کرزیل ویوله (Mcrvl) : در این روش محلول کرزیل ویوله توسط حل کردن یک گرم کرزیل ویوله در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ و افزودن ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر اسید کلریدریک خالص تهیه شد و لامها به مدت ۱۰ دقیقه با این محلول رنگ شدند. بر خلاف گزارشات Dr. Chandra et al. (۱۰) و PD Walzer (۱۱) و گزارشاتی که تا بحال در مورد رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله برای پنوموسیستیس کارینی شده بود و فقط کیست ارگانیسم مشاهده می‌شد، با استفاده از تغییر محلول در Mcrv2 براحتی اسپروزوآیت‌های درون کیست مشاهده می‌شود (Mcrv2) : در این روش یک گرم کرزیل ویوله را در ۲۵ میلی لیتر اتانل ۹۵٪ حل کرده و ۱۰۰ میلی‌لتیر آب مقطر می‌افزاییم. در روش سوم (Mcrv3) : لامها را قبل از (Mcrv2) سولفاته می‌کنیم که مجدداً کیست مشاهده می‌شود. (Mcrv4) : در این روش بدنبال (Mcrv2) زمینه را توسط لایت گرین ۰/۲ درصد سبز رنگ می‌کنیم

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

تاکیستها بهتر مشاهده گردند.

۵ـ دو نوع رنگ‌آمیزی گرم: یکی روشی که بطور معمول در باکتریولوژی استفاده می‌شود(۱۲) و دیگری، استفاده از عمل سولفاته کردن لامها قبل از رنگ‌آمیزی گرم که در این روش دیوارهٔ کیست رنگ‌پذیر شده و براحتی می‌توان ارگانیسم را مشاهده نمود.

۶ـ رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو: روش معمول در پاتولوژی استفاده شد و اسپروزوآیت‌ها به رنگ بنفش کم‌رنگ مشاهده شدند(۱۰).

۷ـ رنگ‌آمیزی گریدلی: با ایجاد تغییراتی در روش RP Lindley (۱۳) لام‌ها را به مدت ۵ دقیقه در اسید کرومیک ۱۰٪ در حرارت اطاق قرار داده، سپس زیر آب جاری به مدت ۵ دقیقه شستشو انجام می‌شود و ۱۵ دقیقه در محلول شیف قرار داده و مجدداً زیر آب جاری ۵ دقیقه شستشو می‌دهیم، سپس با لایت گرین ۰/۲ درصد زمینه رنگ می‌شود.

۸ـ رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین و ائوزین و تری کروم که به روش‌های معمول در پاتولوژی، استفاده گردیدند.

یافته‌ها

رنگ‌آمیزی‌های مختلفی برای تشخیص پنوموسیستیس کارینی استفاده می‌شوند که می‌توان آنها را به سه دسته تقسیم نمود:

۱ـ برای مطالعهٔ مرفولوژیکی ارگانیسم

۲ـ برای بررسی‌های اثرات پاتولوژیک ارگانیسم

۳ـ برای تشخیص سریع ارگانیسم در نمونه‌های میزبان

دسته اول :گیمسا، گرم، Mcrv2 و پاپانیکولائو می‌باشد، که قادر به رنگ‌آمیزی اسپروزوآیت پنوموسیستیس کارینی می‌باشند. این روش‌ها برای ارگانیسم اختصاصی بوده و ساختمان‌های دیگر در نمونه‌های ریوی میزبان با پنوموسیستیس کارینی اشتباه نمی‌شوند، اما این رنگ‌آمیزی‌ها به جهت رنگ کردن بافت میزبان برای تشخیص ارگانیسم از حساسیت کافی برخوردار نیستند، لذا برای تشخیص سریع مناسب نمی‌باشند.

دستهٔ دوم : هماتوکسیلین و ائوزین، تری‌کروم و پاپانیکولائو می‌باشد که بافت میزبان را خیلی خوب رنگ کرده و برای بررسی‌های پاتولوژیک مناسب هستند. در این دسته بجز رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو بقیه قادر به رنگ‌آمیزی پنوموسیستیس کارینی نبوده لذا برای تشخیص ارگانیسم و بیماری مناسب نیستند.

دسته سوم : 2-M,Gram _ M.Gridley-Mcrv3,4- MMB1,2 - M.Giemsal -2 و MTBO1 است که قادر به رنگ‌آمیزی دیوارهٔ کیست بوده لذا از حساسیت بالایی برخوردارند و احتیاجی به مهارت و تجربهٔ زیاد در تشخیص ارگانیسم وجود ندارد(۱۴). اما در عفونت‌های سبک وجود مخمرها ممکن است باعث اشتباه در تشخیص با این دسته از رنگ‌آمیزی‌ها گردد. برای جلوگیری از این مسأله از روش اصلاحی Ronaldj. Cohen(۱۵) استفاده شد که در مورد M.Giemsa2- MMB2- MTBO2 موفقیت‌آمیز بود و مخمرها به رنگ قرمز ولی کیست پنوموسیستیس کارینی بنفش کمرنگ مشاهده می‌شود.

برای مقایسهٔ ۱۷ روش رنگ‌آمیزی، برای هر روش ۱۰ لام مثبت انتخاب و رنگ‌آمیزی بر روی آنها صورت گرفت، سپس به مدت ۵ دقیقه با بزرگنمایی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون به بررسی میکروسکپی پرداخته و در جدول ۱ مقایسه انجام شد. سپس رنگ‌آمیزی‌های دارای حساسیت ۱۰۰٪ انتخاب و در جدول شمارهٔ ۲ با هم مقایسه شدند. فاکتورهایی که برای انتخاب بهترین رنگ‌آمیزی‌ها در نظر گرفته شدند عبارت بودند از :

۱ـ سرعت و سهولت تکنیک رنگ‌آمیزی

۲ـ سرعت در خواندن لام (تشخیص سریع ارگانیسم در بافت و یا ترحشات میزبان)

۳ـ قابل دسترس بودن مواد مصرفی

بحث

بر طبق این بررسی سه دسته رنگ‌آمیزی برای تشخیص پنوموسیستیس کارینی وجود دارد، اول برای بررسی‌های مرفولوژیک، دوم برای بررسی‌های پاتولوژیک و سوم برای بررسی و تشخیص سریع ارگانیسم(جدول ۱ و۲).

دستهٔ اول قادرند اسپروزوآیت و تروفوزوآیت پنوموسیستیس کارینی را رنگ کنند، این دسته کاملاً اختصاصی بوده اما از حساسیت کافی در تشخیص برخوردار نیستند.

دسته دوم اغلب قادر به رنگ کردن ارگانیسم نمی‌باشند.

دستهٔ سوم دیواره کیست پنوموسیستیس کارینی را رنگ کرده و دارای حساسیت بالایی در تشخیص ارگانیسم هستند.

با تفسیرهای ذکر شدهٔ فوق به نظر می‌رسد که برای دیدن ارگانیسم و تشخیص سریع آن از دسته رنگ‌های نوع سوم می‌توان استفاده کرد که از بین آنها روش‌های MBO1,2-و M/Crv3,4-MMB1,2 بعلت سرعت و سهولت تکنیک، تشخیص سریع ارگانیسم و قابل دسترس بودن مواد مصرفی مناسبتر بوده لذا برای تشخیص سریع ارگانیسم و در نتیجه تشخیص سریع پنومونی پنوموسیستیس کارینی پیشنهاد می‌گردد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

جدول ۱ـ مقایسه رنگ‌آمیزی‌های مختلف جهت ارگانیسم پنوموسیستیس کارینی در برش‌های بافتی و گسترش‌های تماسی

A comparison of the stains for visualizing P.Carinii.

1: In impression smear				
Stain	a/n	time (min)	form of p.carini	Cost & availablity of the materials
Gram	50/100	4	sporozoite	+3
M.Gram	100/100	14	cyst wall	+3
M.TBO1,2	100/100	13-20	cyst wall	+2
M.MB1,2	100/100	11-18	cyst wall	+3
Geimsa	80/100	20	troph. & spotozoite	+3
M.Geimsa 1,2	100/100	30-37	cyst wall	+3
M.Crv1	90/100	10	cyst wall	+3
M.CrV2	80/100	10	troph. & sporozoite	+3
M.crv3,4	100/100	20-21	cyst wall	+3
Papanicolaue	70-100	60	troph. & sporozoite	+1
2. In tissue section				
M.Gridley	100/100	90	cyst	+1
M.TBO1,2	100/100	18-25	cyst	+2
M.Crv1	80/100	15	cyst	+3
M.Crv3,4	100/100	25-26	cyst	+3

a: Number of positive - pneumocystis slides during 5 min. microscopic examination X10.

n: Number of total positive - pneumocystis slides that were studied X10.

+1 : Expensive and specific matrials.

+2: Reasonable.

+3: Proper & available materials.

جدول ۲ـ مقایسه رنگ‌آمیزی‌های بکارگیری شده با حساسیت زیاد

Stain	a/n**	time (min)	specimen	Color of	
				P.Carinii	Background
M.Gram	100/100	14	Diret S.*	Fast red	red-orange
M.MB1,2	100/100	11-18	Direct S.	Lavender	Light blue or red
M.Geimsa 1,2	100/100	30-37	Direct S.	Lvendar	Light lave - nder or red
M.TBO1,2	100/100	13-25	Direct S. & tissue section	Lavender	Colorless or red
M.Crv3,4	100/100	20-26	Direct S. & tissue section	Magenta	Colorless or green
M.Gridley	100/100	90	tissue section	Magenta	Green

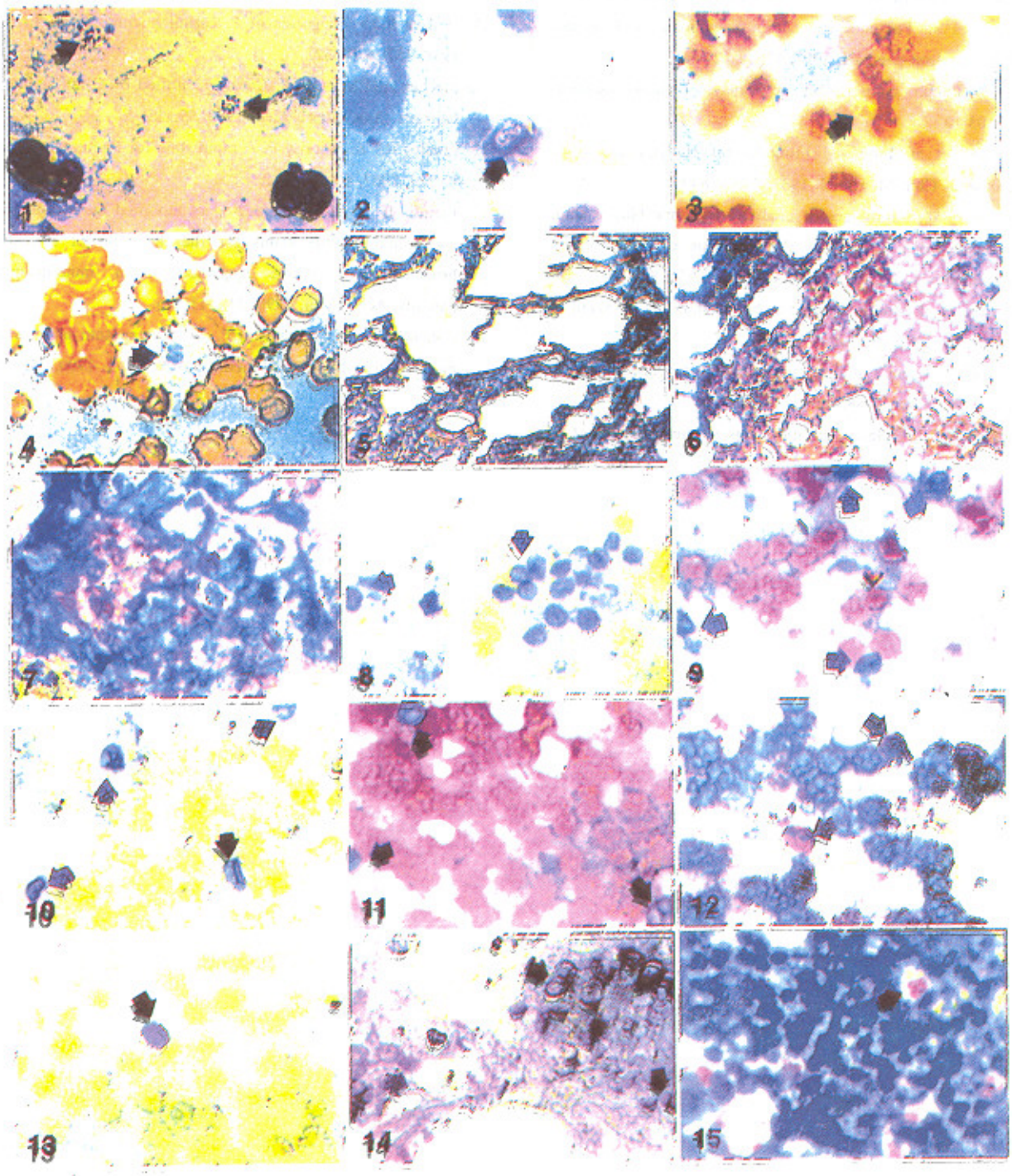
* Direct S. : (Direct smear) either impression smear or lavage smear.

** a & n : Like the table 1

نتایج بدست آمده در این بررسی نشان می‌دهد در صورتی که متخصص امر نمونه‌های مختلف ریوی بصورت خلط و ترشحات و یا بیوپسی از ریهٔ افراد مشکوک، به آزمایشگاههای تشخیص طبی ارسال نمایند با روش‌های آزمایشگاهی فوق می‌توان وجود ارگانیسم را براحتی مشاهده و اثبات نمود و در نتیجه بیماری را تشخیص داد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

شکل ۱ گروه‌بندی مختلف رنگ‌آمیزی‌های بکارگیری شده جهت رؤیت ارگانیسم پنوموسیستیس کاریئی



First group: P. carinii **cyst containing eight circular or banana-shaped sporozoites in impression smear. Fig. 1=Giemsa stain, Fig. 2=M.CrV2 stain, Fig. 3=Gram stain, Fig. 4=Papanicolaou.**

Second group: Fig. 5=Interstitial pneumonia pattern (H&E stain in tissue section), Fig. 6=Interstitial pneumonia and honeycomb pattern (trichrome stain in the tissue section).

Third group: *P. carinii* cyst. Fig. 7=M. Gridley, Fig. 8=M.TBO1, Fig. 9=M.TBO2, Fig. 10=M.MB1, Fig. 11=M.MB2, Fig. 12=M. Giemsa, Fig. 13=M.CrVI, Fig. 14=M.CrV3, Fig. 15=M.CrV4.

منابع

1- Rahimard N, Ahi M, Kahnamouei A. A comparison of modified cytological & histological staining methods for the diagnosis of P. carinni pneumonia. APMIS1997, 105: 904-908.

2- Paradis IL et al. A comparison of modified methen amine silver and toluidine blue stains for the detection of P. carinii in bronohoalveoplar lavage specimens from immunosuppressed

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

patients. Act. cytol. 1990, 34(4): 511-516.

3- Shelhamer JH et al. The laboratory evaluation of opportunistic pulmonary infections. Ann-intern - Med. 1996, 124(6): 585-99.

4- Kamiya Y et al. Pneumocystis carinii pneumonia in Malavian children. Ann-trop-paediatr, 1997, 17(2): 121-6.

5- Walzer PD, Pneumocystis carinii. in: Mandell. Douglas, Bennett. 1990: 2103-10.

6- Bartlett MS et al. Improved ratmodel for studying P. carinii pneumonia. J. Clin. Microbiol. 1987, 25(3): 840-4.

7- Gossey LL et al. Advantages of modified toluidine blue 0 stain and broncolaveolar lavage for the diagnosis of pneumocystis carinii pneumonia. J. Clin Microboil. 1995, 22(5): 803-806.

8- Witebsky FG et al. Modified toluidine blue 0 stain for P. carinii. J. clin. Micobiol. 1988, 26: 774-5.

9- Walker J et al. Giemsa staining for cysts and trophozoites of P. carinii. J. Clin. Path. 1988, 42(4): 432-4.

10- Chandra P et al. Role of specific stains in the diagnosis of P. carinii infection from bronchial washing specimens in patients with the acquired immune deficiency sundrom. Acta Cytol. 1988, 32: 105-108.

11- Walzer PD> Diagnosis of P. carinii pneumonia. J. Infec. Dis. 1988, 157: 629-632.

12- Macher ABEM et al. P. Carinii identified by Gram stain of lung imprints. Ann Intern. Med. 1983, 99: 484-5.

13- Lindley RP & Mooney P. A rapid stain for Pneumocystis. J. Clin Pathol. 1987, 40: 811-812.

14- Paradis IL et al. A comparison of modified methenamine silver and toluidine blue stains for the detection of P. carinii in bronchoalveolar lavage specimens from immunosuppresed patients. Acta Cytol. 1990, 34: 511-516.

15- Cohen RJ et al. Diagnosis of P. carinii in sputum samples using a modified toluidine blue 0 method. Acta Cytol. 1990, 34: 583-585.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]