

تشخیص آمیبیاز روده‌ای با استفاده از روش ایمنوفلوئورسانس غیرمستقیم

علی حقیقی* و دکتر مصطفی رضائیان**

خلاصه

سرم ۱۰۲ بیمار مبتلا به دیسانتري و اسهال آبکی و ۲۲ نفر شاهد سالم که به پنج مرکز درمانی شهر اهواز مراجعه کرده بودند، از نظر وجود آنتی‌کراتامبایستولیتیکا با روش IFA، در مقایسه با آزمایش مستقیم مدفوع، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که ۲۲ نفر (۲۱/۵ درصد) عیار $1/320$ و بالاتر داشتند ولی در آزمایش مستقیم در مدفوع ۹ نفر از این بیماران (۸/۸ درصد) تروفوزوئیت آنتامبایستولیتیکا مشاهده شد؛ در حالی که در گروه شاهد سالم عیار بالاتر از $1/40$ به دست نیامد. آزمون آماری در عیار کمتر از $1/320$ ، در مقایسه با عیار بالاتر از آن، اختلاف معنی‌داری را نشان‌داد ($P < 0/05$). بنابراین، عیار $1/320$ به بالا به عنوان مبنایی مناسب برای تشخیص آمیبیاز مهاجم پیشنهاد می‌شود. ضمناً ۲۵ نفر (۲۴/۲ درصد) از بیماران با عیار $1/80$ و $1/160$ نیز از نظر سرواپیدمیولوژی مثبت تلقی شدند، که ممکن است به علت آلودگی قبلی، فرم غیرمهاجم و یا تشابه احتمالی آنتی‌ژنیک باشد.

* مربی بخش انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی

** استاد بخش انگل‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

با پیشرفت علم ایمنولوژی، تازه‌هایی از مجهولات پزشکی برای دانشمندان روشن می‌شود و تعداد تکنیک‌های مهم تشخیصی فزونی یافته، کارایی مضاعف می‌یابند. از جمله روش‌های مفید تشخیصی، آزمون ایمنوفلوئورسانس غیرمستقیم IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test) است که جایگاه خود را در شناسایی انواع بیماری‌ها، از جمله بیماری‌های انگلی به خوبی پیدا کرده است. اولین بازجینز (Jeans) در سال ۱۹۶۴ برای تشخیص بیماری آمیبیاز از روش IFA استفاده کرد (۴). امروزه به وسیله تکنیک IFA می‌توان پادتن را در فواصل مختلف بیماری اندازه‌گیری کرد. این پادتن تا مدتی پس از بهبودی با کاهش در سرم وجود دارد (۱، ۳، ۶ و ۸)، و در بیماران مبتلا به آمیبیاز خارج روده‌ای حتی تا شش ماه باقی می‌ماند - هر چند نقش پیشگیری کننده ندارد؛ چرا که در افرادی که عیار پادتن بالاست، عفونت مجدد مشاهده شده است (۷). گزارش‌های متعدد از ایران و دیگر کشورهای جهان که IFA را با دیگر روش‌های سرولوژیک مقایسه کرده‌اند، حاکی از آن است که این آزمون جهت تشخیص آمیبیاز مهاجم روده‌ای، خارج روده‌ای و مطالعات سرواپیدمیولوژیک مفید می‌باشد (۸). در این بررسی تعیین وجود پادتن موجود در سرم بیماران مبتلا به آنتامباهیستولیتیکا، تعیین عیار پادتن آمیب در بیماران منفی با آزمایش مستقیم و پیشنهاد مبنایی مناسب برای تشخیص موارد جدید بیماری آمیبیاز مورد نظر بود.

روش بررسی

(۱) مدفوع و سرم ۱۰۲ بیمار مبتلا به اسهال آبکی و دیسانتری و ۲۲ نفر شاهد سالم از مهر ۱۳۶۷ تا آذر ۱۳۶۷ در پنج مرکز درمانی شهر اهواز جمع‌آوری شد. برای همه بیماران پرسشنامه تکمیل شد و نتایج کار

آزمایشگاه به ثبت رسید.

(۲) بلافاصله از کلیه نمونه‌های مدفوع، آزمایش مستقیم با سرم فیزیولوژیک به عمل آمد و نتایج انگل‌های روده‌ای در پرسشنامه ثبت شد.

(۳) سرم‌های جدا شده در فریز یخچال نگهداری و در پایان نمونه‌گیری به تهران منتقل شد.

(۴) برای تهیه پادگن پیکره‌ای آنتامباهیستولیتیکا، نمونه‌های مدفوع مثبت و مشکوک در محیط سرم منعقد شده (Hsr+S) کشت داده شد (۳ و ۸). نمونه‌های مثبت در محیط کشت هفته‌ای دو نوبت پاساژ داده می‌شدند.

(۵) پس از انتقال محیط‌های کشت به تهران، با پاساژهای متعدد در محیط‌های دی‌فازیک مختلف، زمانیکه تعداد آنتامباهیستولیتیکا به میزان هشتصد هزار در میلی‌لیتر می‌رسید، فاز مایع محیط کشت سانتریفوژ می‌شد و رسوب حاوی پادگن، مورد استفاده قرار می‌گرفت: بدین ترتیب که روی هر لام شش قطره از رسوب چکانده می‌شد و پس از خشک شدن در حرارت آزمایشگاه، با پیچیدن لام‌ها بین کاغذ پوستی در فریز ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند (۸).

(۶) آزمون IFA با روش ۱، ۳، ۴، ۵، ۹ و با استفاده از سرم بیماران، آنتی‌هیومن گلوبولین کونژوگه* و اوانس بلو** (Evans blue) در دانشکده بهداشت انجام گرفت.

یافته‌ها

نتایج حاصل از این آزمون در ۱۰۲ بیمار در زیر توضیح داده می‌شود:

تعداد ۲۲ نفر (۵/۲۱ درصد) عیار ۱/۳۲۰ و بالاتر

* بخش تک یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

** بهرینگ (O tku 04/04, O uhv 14/15) تهران، شرکت رامیساک

(۴۳/۲ درصد) عیار زیر ۱/۸۰ داشتند که منفی محسوب می‌شوند. همچنین ۲۵ نفر (۲۴/۳ درصد) دارای عیار ۱/۸۰ و ۱/۱۶۰ بودند. گروه کنترل (۲۲ نفر) که نمونه مدفوع آنان طبیعی بود و از نظر وجود تروفوزوئیت آنتامباهیستولیتیکا نیز منفی بودند، تماماً "عیار پادتن منفی و یا زیر ۱/۴۰ داشتند."

داشتند. اما تروفوزوئیت آنتامباهیستولیتیکا فقط در مدفوع ۹ نفر (۸/۸ درصد) از این بیماران با روشهای مستقیم با سرم فیزیولوژیک و کشت در محیط سرم منعقد شده مشاهده شد. بنابراین، ۱۲ نفر دیگر (۱۲/۷ درصد) عیار بالاتر از ۱/۳۲۰ داشتند (جدول ۱)؛ ۱۸ نفر (۱۷/۶ درصد) بیماران منفی بودند و ۴۴ نفر

جدول ۱) مقایسه نتایج آزمون IFA از نظر وجود پادتن آنتامباهیستولیتیکا در سرم ۱۰۲ بیمار مبتلا به اسهال شدید و ۲۲ نفر شاهد سالم با نتیجه آزمایش مستقیم (اهواز ۱۳۶۸)

نتیجه		عیار آنتی‌بادی در بیماران		عیار آنتی‌بادی در گروه کنترل		مشاهده تروفوزوئیت آمیب	
عیار	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	درصد
منفی	۱۸	۱۷/۶	۳	۱۲/۶	۰	۰	۰
۱/۱۰	۶	۵/۹	۹	۴۰/۹	۰	۰	۰
۱/۲۰	۹	۸/۸	۶	۲۷/۲	۰	۰	۰
۱/۴۰	۱۲	۱۱/۸	۴	۱۸/۲	۰	۰	۰
۱/۸۰	۱۷	۱۶/۷	۰	۰	۰	۰	۰
۱/۱۶۰	۱۸	۱۷/۶	۰	۰	۰	۰	۰
۱/۳۲۰	۱۵	۱۴/۷	۰	۰	۴	۳/۹۵	۳/۹۵
۱/۶۴۰	۶	۵/۹	۰	۰	۴	۳/۹۵	۳/۹۵
۱/۱۲۸۰	۱	۰/۹۸	۰	۰	۱	۰/۹	۰/۹
جمع	۱۰۲	۱۰۰	۲۲	۱۰۰	۹	۸/۸	۸/۸

بحث

آزمون سرولوژیک IFA برای تشخیص آمیبیاز مهاجم روده‌ای و خارج روده‌ای قابل استفاده است اما جهت تشخیص آمیبیاز روده‌ای (Cyst Passer) مفید نیست. اگرچه ممکن است درصدی از بیماران در مراحل اولیه بیماری به دلیل عدم تشکیل پادتن با روشهای سرولوژیک منفی شوند ولی ذکر این نکته لازم است که تعدادی از بیماران مبتلا به آمیبیاز مهاجم نیز به دلیل عدم استفاده صحیح از روشهای انگل‌شناختی و یا دلایل دیگر منفی گزارش می‌شوند، در حالی که با روش IFA مثبت می‌شوند؛ لذا باید به این نکته توجه داشت که استفاده از روشهای سرولوژیک به تنهایی توصیه نمی‌شود و کاربرد آنها تنها به عنوان یک شیوه تکمیلی همراه با روشهای انگل‌شناختی - دستکم در آزمایشگاههای رفرانس و مراکز تحقیقاتی - پیشنهاد می‌شود. لازم به ذکر است که عیار پادتن برای آنتامباہ ستولیتیکا معمولاً "چند ماه باقی می‌ماند و به تدریج کاهش می‌یابد (۱، ۳، ۶ و ۸) و لذا نتایج، افرادی را که پیشینه ابتلا به آمیبیاز مهاجم داشتند و یا مدتی طولانی به آمیب مبتلا بودند را نیز در بر می‌گیرد.

با توجه به مطالعات محققان مختلف جینز (Jeans، 1996)، اشتوم (Stomm، 1976)، توماس (Thomas، 1981) که عیار $1/64$ به بالا را مثبت گزارش کرده‌اند و هیچ واکنش متقاطع با سایر آلودگیهای انگلی، ویروسی و میکروبی مشاهده نکرده‌اند

(۸، ۴، ۱ و ۹) ما نیز در این بررسی، از نظر سرواپیدمیولوژیکی عیار $1/80$ به بالا را به عنوان وجود آنتی‌بادی آنتامباہیستولیتیکا در سرم تلقی کردیم؛ که این موضوع علل مختلفی دارد که از جمله می‌توان به سابقه برخورد با این تک‌یاخته، وجود فرم غیرمهاجم آمیب و آمیبیاز مهاجم روده‌ای یا خارج روده‌ای اشاره کرد. بر این اساس، $55/9$ درصد بیماران عیار بالاتر از $1/80$ داشتند. در مقایسه با تحقیقات انجام شده در برخی کشورها از جمله کلمبیا با 25 الی 30 درصد، مالزی $6/1$ درصد (۶) و ایران 25 درصد (۸) میزان آلودگی نسبتاً بالاست. البته میزان بالاتر در 69 تا 76 درصد از مردم کلکته (۱ و ۶) و 54 تا 58 درصد از مردم بانکوک (۶) نیز گزارش شده است. دلیلی که برای آن می‌توان بیان کرد، فقر اقتصادی و بهداشتی، آلودگی آب و برخورد زیاد مردم اهواز با این عامل بیماریزا، با توجه به تعداد زیاد حاملان کیست (Cyst passer) می‌تواند باشد. همچنین با توجه به نتایج جدول ۱ که تروفوزوئیت آنتامباہیستولیتیکا تنها در مدفوع بیمارانی که عیار بالاتر از $1/320$ داشتند، مشاهده شد و نتیجه آزمون آماری مجذور خی با $P < 0/05$ ، در عیار کمتر از $1/320$ و مقایسه با عیار بیشتر از آن، اختلاف معنی‌دار مشاهده شد؛ عیار $1/320$ به بالا به عنوان مبنایی مناسب برای موارد مثبت ابتلا به آمیبیاز مهاجم پیشنهاد می‌شود. بخصوص برای بیمارانی که مبتلا به اشکالی از بیماری از جمله آمیبیاز خارج روده‌ای می‌باشند و آمیب در نمونه مدفوع آنان مشاهده نمی‌شود.

مراجع

- 1) Ambrois T, Truong TK: Fluorescent antibody test in amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 21(6): 907-912, 1972
- 2) Goldman in beaver PC: Clinical parasitology. 9th, Lea & Febiger, 1984, P 119
- 3) حقیقی، علی: "بررسی اسهالهای شدید آبکی و دیسانتری آمیبی در بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر اهواز." پایان نامه برای دریافت دانشنامه کارشناسی ارشد مدرسی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ۱۳۶۸
- 4) Jeans AL: Immunofluor diagnosis of hepatic amebiasis. *Brit Med J* 29: 1531, 1964
- 5) Jeans AL: Indirect fluorescent antibody test in diagnosis of hepatic amebiasis. *Brit Med J* 1:1464, 1966
- 6) Martinez P: Human parasitic diseases. (Volum 2), Amebiasis Elsevier, 1985
- 7) Merroritch E, Chadee K: Immunology and immunopathology of amebiasis in soulsby EJK (eds) Immune responses in parasitic infection. Vol 4, CRC, 1987, PP 81-99
- 8) معتمدیان، محمدحسین: "کشت آنتامباهیستولیتیکا در محیطهای مختلف کشت و ارزشیابی آنتی ژنهای تهیه شده به روشهای IFAT، IGD و CIE." پایان نامه برای دریافت درجه تخصصی در رشته انگل شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۶۸
- 9) Thomas V, Sinniab B: Assessment of the sensitivity, specificity and reproductibility of the indirect immunofluorescent technique for the diagnosis of amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 30(1): 57-62, 1981

Evaluation of epidemiology of anencephaly of 149408 deliveries

Hatami M, Valaei N

Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services

SUMMARY

Anencephaly is one of the major congenital neurologic malformations whose incidence had been reported to be of 0.3 to 6 per 1000 births. Due to its importance and indefinite incidence, and the role of certain significant factors that cause the disease in Iran, this study was carried out on 149498 live born and stillborn infants, born in Tehran Medical University centers from 1988 through 1991 using retrospective study, existing data study.

The results indicate that the incidence of anencephaly is 0.23 per 1000 total births (23 per

10,000). The incidences varied widely from of least 0.17 to 1.26 per 1000 in different Medical Centers. Thirty-four percent of the infants with anencephaly had been diagnosed after birth, and only 66 percent had been diagnosed in antenatal screening programs. Numbers of pregnancies in mothers with anencephalic infants were 38% and the condition of giving birth to in relatives of the mothers with anencephalic infants has been twice of that in the control another (P<0.05). There has also been no relationship between anencephaly and maternal age.

Diagnosis of Intestinal Amoebiasis with Indirect Fluorescent Antibody Test

Haghighi A, Rezaeian M

Shaheed Beheshti University of Medical Sciences & Tehran University of Medical Sciences

SUMMARY

The results of direct stool examination in 102 watery and bloody diarrhea patients were compared with the presence of antibodies against *Entamoeba histolytica* with Indirect Fluorescent Antibody Test. Besides 22 healthy individuals included in this study as control group. It was found that 22 patients (21.5%) with a sera titre higher than 1/320 had only 9 (8.8%) positive *E. Histolytica* in direct microscopic exam.

The control group showed a titre of 1/40 or less with this organism. It was found that the finding at a titre 1/320 to *E. Histolytica* would be of clinical value for diagnosis of Amoebiasis among diarrheal patients. Also among 35 of patients (34.3%) the antibody titre were found to be 1/80 and 1/60 while may be related to them past infection, non invasive amoebic or cross reaction.