ORIGINAL ARTICLE

Frequency of Pneumocystis Jirovecii Colonization in Patients with Respiratory Failure Using Microscopic Methods

Mohammad Reza Jabbari Amiri[1],
Mahdi Abastabar[2],
Tahereh Shokohi[3],
Masoud Aliali[4],
Sasan Saber[5],
Mohammad Taghi Hedayati[3],
Seyed Reza Aghili[2],
Iman Haghani[6],
Mojtaba Taghizadeh Armaki[6],
Akbar Hoseinnejad[1]

[1] MSc Student in Medical Mycology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Medical Mycology, Invasive Fungal Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Professor, Department of Medical Mycology, Invasive Fungal Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Associate Professor, Department of Internal medicine, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences
[6] PhD Student in Medical Mycology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Iran

(Received January 31, 2014 ; Accepted March 4, 2015)

Abstract

Background and purpose: Respiratory failures are common diseases among different populations. *Pneumocystis jirovecii* colonization causes respiratory failure in children and adults with AIDS and patients with predisposing factors of immunosuppression including malignancies, organ transplant, inherited immune deficiencies and immunosuppressive agents. The aim of this study was to evaluate the efficacy of three staining methods including Calcofluor White, Giemsa and Gomori Methenamine Silver in identification of *Pneumosystis* colonization using Bronchoalveolar lavage (BAL).

Materials and methods: A cross sectional descriptive study was performed in 350 patients with respiratory failure who referred to Tehran Shariati Hospital and Sari Imam Khomeini Hospital during August 2013 to September 2014. Totally, 322 BAL samples, 26 induced sputa and 2 samples of sinus washing were evaluated for *Pneumocystis jirovecii* colonization after staining with the three specific staining methods. Data was then analyzed in SPSS V.16.

Results: The patients were 41.2% female and 58.8% male. The mean age of patients was 52 ± 4 years. Calcofluor White staining showed *Pneumocystis jirovecii* colonization in three patients (0.86%).

Conclusion: In this study, Calcofluor White staining presented higher efficacy in identifying *Pneumocystis jirovecii* in BAL samples compared to other two microscopic procedures.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii* Colonization, Calcofluor White, Giemsa, Gomori Methenamine Silver, Bronchoalveolar lavage, induced sputum, sinus washing

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(122): 23-31 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۲۲ اسفند سال ۱۳۹۳ (۳۱-۲۳)

تعیین فراوانی کلنیزاسیون پنوموسیستیس جیروسی در نمونه های تنفسی مبتلایان به نارسایی ریوی با روش های میکروسکوپی

محمدرضا جباری امیری[۱]
مهدی عباس تبار[۲]
طاهره شکوهی[۳]
مسعود علیالی[۴]
ساسان صابر[۵]
محمدتقی هدایتی[۳]
سیدرضا عقیلی[۵]
ایمان حقانی[۶]
مجتبی تقی زاده ارماکی[۶]
اکبر حسین نژاد[۱]

چکیده

سابقه و هدف: نارسایی ریوی ازجمله بیماری‌های شایع در افراد جوامع مختلف می‌باشد. کلونیزاسیون پنوموسیستیس جیروسی سبب نارسایی ریوی درکودکان و بزرگسالان مبتلا به ایدز و بیمارانی با سایر شرایط ایجاد کننده نقص ایمنی نظیر بدخیمی، پیوند عضو، نواقص وراثتی ایمنی و داروهای سرکوب گر ایمنی می‌شود. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی کارآیی سه روش رنگ‌آمیزی کالکوفلوئور سفید، گیمسا و گوموری متنامین سیلور در تشخیص کلنیزاسیون پنوموسیستیس جیروسی در نمونه لاواژ برانشی آلوئولی یا (BAL (Bronchoalveolar lavage می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه توصیفی- مقطعی حاضر، ۳۵۰ بیماران مبتلا به نارسایی ریوی مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی تهران و بیمارستان امام خمینی (ره) ساری از شهریور ۱۳۹۲ تا مهر ۱۳۹۳ مورد بررسی قرار گرفتند. در کل، ۳۲۲ نمونه تنفسی BAL، ۲۶ نمونه خلط القاء شده و ۲ نمونه شستشوی سینوس با سه روش رنگ‌آمیزی اختصاصی از نظر کلنیزاسیون پنوموسیستیس جیروسی بررسی گردید. در نهایت نتایج آزمایشات و اطلاعات پرسشنامه‌ها از طریق نرم‌افزار SPSS-version-16 آنالیز گردید.

یافته‌ها: از ۳۵۰ بیمار ۴۱/۲ درصد زن و ۵۸/۸ درصد مرد بودند. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه ۴ ±۵۲ سال بود. در نهایت ۳ بیمار (۰/۸۶درصد) با استفاده از رنگ آمیزی کالکوفلوئور سفید کلنیزاسیون پنوموسیستیس جیروسی را نشان دادند.

استنتاج: در مطالعه حاضر رنگ‌آمیزی کالکوفلوئور سفید در مقایسه با دو روش میکروسکوپی دیگر کارایی بالاتری برای شناسایی پنوموسیتیس جیروسی در نمونه‌های تنفسی BAL نشان داد.

واژه‌های کلیدی: کلنیزاسیون پنوموسیستیس جیروسی، کالکوفلوئور سفید، گیمسا، گوموری متنامین سیلور، لاواژ برانشی آلوئولی، خلط القاء شده، شستشوی سینوس

مقدمه

پنوموسیستیس جیروسی به عنوان یک پاتوژن قارچی، یکی از عوامل مهم ایجادکننده پنومونی پنوموسیستیس(PCP) در بیماران دچار نقص ایمنی نظیر گیرندگان شیمی درمانی و اشعه درمانی، دریافت‌کنندگان

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۹۹۲ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.
مولف مسئول: مهدی عباس تبار- ساری: یلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail:mabastabar@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استاد، گروه قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ساری، ایران
۶. دانشجوی دکتری قارچ شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۱۱/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱۲/۱۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۱۲/۱۳

داروهـای سـرکوبگر ایمنـی، مصـرف‌کننـدگان طـولانی مدت کورتیکواستروئیدها، افراد دچـار سـوء تغذیـه و یـا مبتلایـان بـه ایـدز مـی‌باشـد(۱). جـنس پنوموسیسـتیس در برگیرنده گونه‌هایی است که تقریبا" قابلیت کلنیزاسـیون و ایجاد عفونـت در هـر پسـتانداری را دارا مـی‌باشـند(۲). بروز بیماری در کشورهای توسعه یافتـه از زمـان معرفـی داروهای ضد ویروس ایـدز (HAART) و بـه‌کـارگیری پروفیلاکسی کاهش داشته است ولیکن هم‌چنان یکی از عوامل اصلی بستری شدن در بیمارستان و مـرگ ومیـر در کودکان آلوده به ویروس می‌باشد. ایـن در حـالی اسـت که در جوامع در حال توسعه این عفونت هـم‌چنـان یـک مشـکل جـدی محسـوب مـی‌شـود و شـیوع آن در کشورهای مختلف متفاوت است برای مثـال ۴۰ درصـد از جمعیت HIV مثبت تایلندی و بـیش از ۵۰ درصـد افـراد HIV مثبت برزیلی با این عامل درگیر می شوند(۳). قابـل توجه آن که هم‌اکنون میزان مرگ ومیر ناشی ازپنومونی ناشی از پنوموسیستیس جیرووسی در ایـن بیمـاران ۲۰ تـا ۴۰ درصد بوده که اخیرا" این میزان مرگ و میر به دلیـل درمان‌های ضد ویـروس ایـدز (HAART) بـه ۱۰ تـا ۲۰ درصد کاهش یافته اسـت(۴). بـه طـورکلی میـزان شـیوع کلنیزاسـیون پنوموسیسـتیس در افـراد سـالم ۱۱ تـا ۱۰۰ درصد و در بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک در اروپا ۱/۳تا ۲۱/۶ درصد و در برزیل ۳۸/۲درصد می‌باشد(۵). از آن‌جاکه عفونت ناشی از پنوموسیستیس جیرووسی در بیماران HIV منفی به صورت حاد تظاهر یافته، پیش‌آگهی بدتری را در مقایسه با بیماران HIV مثبت به دنبال دارد بنابراین تشخیص بیماری یـا کلنیزاسـیون در مراحـل اولیـه بیمـاری اهمیـت فراوانی دارد(۵-۳).

یکـی از تظـاهرات بـالینی مهـم عفونـت بـا پنوموسیسـتیس جیرووسـی درگیـری سیسـتم تنفسـی می‌باشد کـه در ۱۵ درصـد افـراد ۱۵ تـا ۸۰ سـال جامعـه اتفاق می‌افتد و باعث صرف وقت و تحمیـل هزینـه‌هـای درمانی زیادی می‌شود(۶). ازآن‌جا که ارگانیسم فرصـت طلب است، تشخیص زمانی انجام می‌گیـرد کـه بیمـاری در مرحله حاد بوده و درمان بی‌فایده یا بـا موفقیـت کمـی همـراه اسـت(۷). تشـخیص قطعـی پنومـونی ناشـی از پنوموسیستیس جیرووسی بـه علـت فقـدان روش کشـت آزمایشگاهی، به طور معمول بـا مشـاهده میکروسـکوپی ارگانیسم در نمونه‌های تنفسی هـم چـون خلـط، BAL و بیوپسی با استفاده از متدهای رنگ‌آمیـزی نظیـر گیمسـا، GMS، تولوئیدین بلـو، کـالکوفلوئور سـفید و گـرم کـه حساسیت و ویژگی بالایی دارند و از سوی دیگر سـریع، آسان و دقیق می‌باشند، صورت مـی‌گیـرد(۱۰-۸). درایـن میان کالکوفلوئور سفید و ایمونوفلورسـنت (ماننـد IFA) ازجمله بهتـرین روش هـایی اسـت کـه اغلـب بـه عنـوان استاندارد طلایـی تشـخیص پنوموسیسـتیس مـدنظر قـرار گرفتـــه و دارای حساســیت و ویژگـــی بـــالایی نیـــز می‌باشند(۱۱). هرچند روش‌های مولکولی متعددی بـرای شناسایی این ارگانیسـم و تشـخیص بیمـاری ناشـی از آن وجـود دارنـد کـه مـی‌تواننـد جـایگزین مناسـبی بـرای روش‌هـای رنـگ‌آمیـزی و کشـت باشـد ولـی بـه دلیـل نیازمندی به دستگاه، تجهیـزات پیشـرفته و مـواد، هزینـه بـر بـودن صـرفا" درآزمایشـگاه‌هـای پیشـرفته قابـل انجـام می‌باشد. هـدف از انجـام مطالعـه حاضـر تعیـین فراوانـی کلنیزاسـیون پنوموسیسـتیس جیرووسـی و تعیـین‌کـارایی روش‌های مشاهده مستقیم میکروسکوپی با اسـتفاده از سـه روش رنـگ‌آمیـزی گیمسـا، گومـوری متنـامین سـیلور (GMS) و کالکوفلوئورسـفید در تشـخیص نمونـه‌هـای تنفسـی بـه دسـت آمـده از مبتلایـان بـه نارسـائی ریـوی مراجعـه‌کننـده بـه بیمارسـتان امـام خمینـی (ره) سـاری و بیمارستان شـریعتی تهـران در فاصـله سـال‌هـای ۱۳۹۲ تـا ۱۳۹۳ بوده است. با توجـه بـه ایـن کـه تـاکنون در ایـران مطالعه کمی در خصوص فراوانی PCP(pneumocystis carinii pneumonia) صـورت گرفتـه اسـت، بـا انجـام مطالعـه حاضـر ضـمن بـرآورد میـزان کلنیزاسـیون ایـن ارگانیسم در بیماران مبتلا به نارسـایی تنفسـی، اطلاعـات ارزنـده‌ای را در زمینـه اپیـدمیولوژی و عوامـل خطـر بـه متخصصین بالینی خواهد داد و با راه انـدازی روش‌هـای

مشاهده مستقیم میکروسکوپی و تعیین کارایی آن، به تشخیص صحیح آن و انتخاب داروهای موثر برای درمان فرضی و درمان پروفیلاکتیک در بیماران در معرض خطر کمک خواهد کرد.

مواد و روش ها

مطالعه توصیفی- مقطعی حاضر روی افراد مبتلا به نارسایی ریوی که در فاصله سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۳ به مرکز آموزشی- درمانی بیمارستان امام خمینی (ره) ساری و شریعتی تهران مراجعه کرده بودند، انجام پذیرفت. از بیمارانی که براساس علائم کلینیکی به تشخیص پزشک فوق تخصص ریه مبتلا به نارسایی ریوی بوده‌اند بسته به شرایط بیمار، پس از اخذ رضایت آگاهانه از بیمار و یا همراهان نمونه تنفسی مناسب مطابق با ضوابط دقیق نمونه برداری و رعایت شرایط آسپتیک به صورتی که کم‌ترین صدمه به بیمار وارد آید، کسب گردید. قابل ذکر است درمواردی که بیماران تمایل به شرکت در طرح را نداشتند و نیز بیمارانی که تحت درمان جراحی قرار گرفته بودند و یا به تشخیص پزشک معالج به علت وخامت بیماری نمونه گیری جایز نبود، از مطالعه حذف شدند.

جمع آوری نمونه ها

ازمجموع ۳۵۰ بیمار تعداد ۳۲۲ نمونه لاواژبرانشی آلوئولی (BAL)، تعداد ۲۶ نمونه خلط القاء شده و تعداد ۲ نمونه شستشوی سینوس بینی از شهریور ۹۲ تا مهر ۹۳ جمع آوری گردید. نمونه BAL بیماران با برونکوسکوپ توسط پزشک متخصص گرفته شد.

آماده سازی نمونه ها ی تنفسی، رنگ آمیزی و بررسی میکروسکوپی نمونه ها

برای رقیق‌سازی نمونه‌های تنفسی دارای ویسکوزیته بالا، هم حجم نمونه، پانکراتین ۰/۵ درصد اضافه و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه نگه‌داری گردید و سپس با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۵۰ میکرولیتر از ته‌نشین را بر روی لام قرار داده و به منظور تقویت چسبندگی نمونه در رنگ‌آمیزی روش‌های گیمسا (Giemsa) و گوموری متامین سیلور (GMS) ۵۰ میکرولیتر سرم اسب یا سرم آلبومین جنین گاوی را اضافه و نمونه خوب همگن گردید و یا با اسپری فیکساتور پاتولوژی نمونه‌ها تثبیت شد. پس از تهیه گسترش، نمونه‌ها با رنگ‌های گیمسا (شرکت پژوهش آسیا، تهران، ایران) با رقت ۱:۲۰، گوموری متامین سیلور (شرکت پژوهش آسیا، تهران، ایران) و کالکوفلوئور سفید (Germany, Sigma-Aldrich, Flourescent brightner 28) با رقت ۱:۱۰۰۰ (محلول ۰/۰۱درصد با آب مقطر) به همراه هیدروکسید پتاسیم (KOH+CFW) طبق دستورالعمل کارخانه سازنده رنگ‌آمیزی گردید. گسترش نمونه‌های تهیه شده با کالکوفلوئور سفید، زیر میکروسکوپ فلورسنت و نمونه‌های آماده شده با گیمسا و گوموری متامین سیلور زیر میکروسکوپ نوری از نظر وجود یا عدم وجود عوامل قارچی مورد بررسی قرار گرفت. در هر یک از روش‌های رنگ‌آمیزی چنان چه مورفولوژی مشخصه کیست همراه با ساختمان‌های شبه پرانتزی و تروفوزوییت مشهود گردید، مثبت تلقی و میزان نسبی ارگانیسم در نمونه‌ها در اسلاید به صورت هیچ، نادر (۵ ارگانیسم یا کم‌تر) متوسط (بیش‌تر از ۵ و کم‌تر از ۲۰ ارگانیسم، فراوان (بیش از ۲۰ ارگانیسم) تعیین شد(۱۰-۸). در نهایت نتایج آزمایشات و اطلاعات پرسشنامه‌ها از طریق نرم‌افزار SPSS-version-16 آنالیز گردید. در نهایت نتایج آزمایشات و اطلاعات پرسشنامه‌ها از طریق نرم‌افزار SPSS-version-16 آنالیز گردید.

یافته ها

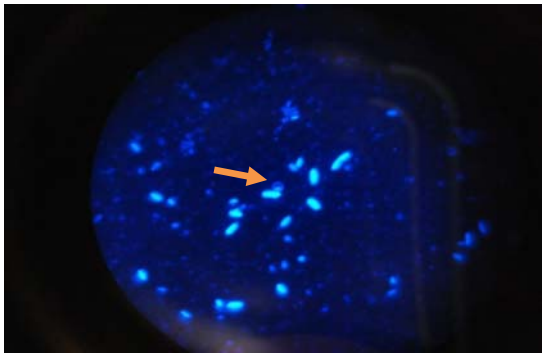
درمطالعه حاضر ۳۵۰ بیمار دارای نارسایی تنفسی مورد ارزیابی قرار گرفتند که از این تعداد ۱۴۴ نفر زن (۴۱/۲ درصد) و ۲۰۶ نفر مرد (۵۸/۸ درصد) بودند. سن افراد بین ۱۲ تا ۸۲ سال متغیر بود و میانگین سنی بیماران مورد

مطالعه ۴ ± ۵۲ سال بود (جدول شماره ۱). ازمجموع ۳۵۰ نمونه، ۱۷۵ نمونه مربوط به بیماران با ایمنی مختل شده (Immunocompromised) و ۱۷۵ نمونه مربوط به بیماران با ایمنی سالم (Immunocompetent) بودند. براساس نتایج مشاهده مستقیم میکروسکوپی از ۳۵۰ بیمار، ۳ نفر (۰/۸۶درصد) و هر سه فقط با روش کالکوفلوئور سفید کلنیزاسیون پنوموسیستیس جیروسی را نشان دادند (تصویرشماره ۱). میانگین سنی این سه بیمار (۱ نفر مرد و ۲ نفر زن) ۴۰ سال بود. در نمونه‌های BAL رنگ‌آمیزی شده با کالکوفلوئور سفید هر سه این بیماران، کیست‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت به شکل گرد، با سایز تقریباً ۵ تا ۸ میکرون مشاهده شدند.

از آن‌جاکه طبق تعریف، کلنیزاسیون به حضور پنوموسیستیس جیروسی در نمونه‌های تنفسی افرادی که هیچ نوع علائم پنومونی مختص این میکروارگانیسم را ندارند اطلاق می‌شود و این بیماران نیز هیچ‌گونه علایم مربوطه را نداشتند این موارد به عنوان کلنیزاسیون تلقی گردید. قابل توجه این که علایم بالینی شامل مشاهده سرفه‌های خشک به همراه تنگی نفس شدید و رال‌های خفیف مرطوب در قسمت لوب‌های تحتانی ریه می‌باشد. در عکس‌برداری از قفسه سینه سایه‌های اینتراستیشیل منتشر و درمطالعات میکروسکوپی نیزترشحات کف آلود، چرکی و لانه زنبوری مشاهده می‌شوند(۲). در سه مورد مثبت کلنیزاسیون، تعداد ارگانیسم مشاهده شده در اسلاید تقریبا" بیش‌تر از ۵ و کم‌تر از ۲۰ ارگانیسم بوده است که طبق اصول پذیرفته شده روش کار، میزان نسبی ارگانیسم، متوسط در نظر گرفته شد. از این تعداد ۲ مورد از بیماران مبتلا به پنومونی و ۱ مورد نیز مبتلا به لوسمی لنفوییدی حاد (ALL) بودند. دو مورد پنومونی مربوط هستند به یک مرد ۳۸ ساله با پنومونی باکتریایی و دیگری یک زن ۳۱ ساله با پنومونی ناشناخته که به بیمارستان شریعتی تهران مراجعه کرده بودند. یک مورد از موارد کلنیزاسیون نیز به یک زن ۵۱ ساله متعلق می‌باشد که با لوسمی لنفوییدی حاد (ALL) به بیمارستان امام خمینی (ره) ساری مراجعه کرده بود. با استناد به پرونده پزشکی آنان، در مورد هیچ‌کدام از بیماران تشخیص قطعی پنومونی پنوموسیستیس (PCP) از نظر تشخیص بالینی و جواب به درمان یا تشخیص با مطالعات میکروسکوپی صورت نپذیرفته بود.

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی سنی و جنسی بیماران مبتلا به نارسایی ریوی به همراه بیماری زمینه ای

گروه بیماران	تعداد نمونه	سن (انحراف معیار±میانگین)	محدوده سنی (سال)	زن (تعداد)	مرد (تعداد)
بیماران با ایمنی سالم	۱۷۷	۵۲ ± ۱/۱۷	۱۱-۹۰	۶۹	۱۰۶
بیماران با نواقص اولیه یا اکتسابی ایمنی	۱۳۶	۵۱ ± ۱/۲	۲۶-۸۰	۵۷	۷۹
بیماران مبتلا به بدخیمی	۲۳	۵۳ ± ۱/۱	۲۰-۷۴	۱۱	۱۲
بیماران دریافت کننده پیوند اعضا	۱۶	۵۰ ± ۰/۸	۳۰-۸۲	۷	۹
تعداد کل بیماران	۳۵۰	۵۲ ± ۴	۱۱-۹۰	۱۴۴	۲۰۶



تصویر شماره ۱: پنوموسیستیس جیروسی در نمونه BAL با رنگ‌آمیزی کالکوفلوئورسفید

بحث

روش‌های تشخیصی متکی بر رنگ‌آمیزی برای شناسایی عوامل عفونی به‌طور روز افزونی گسترش یافته‌اند(۱۲). این روش‌ها مزایا و جذابیت‌های خاص خود را دارند برای مثال این روش‌ها تحت تاثیر مورفولوژی ارگانیسم یا تغییرات آنتی‌ژنی آن قرار نمی‌گیرند و حساسیت و ویژگی آن‌ها نسبت به روش‌های مرسوم مثل بافت شناسی و سرولوژی به مراتب بیش‌تر است(۱۵-۱۳). در حال حاضر روش‌های متعدد آزمایشگاهی برای تشخیص عفونت با

پنوموسیستیس جیروسی موجود است که دراین بین روش‌های مشاهده مستقیم میکروسکوپی متکی بر رنگ‌آمیزی به عنوان روش استاندارد طلایی (gold standard) در تشخیص مورد پذیرش قرار گرفته است. چندین نوع روش رنگ‌آمیزی برای پنوموسیستیس جیروسی معرفی شده است، رنگ‌هایی نظیر گوموری منتامین نقره (GMS)، تولوئیدین آبی، کالکوفلوئور سفید و کریستال ویوله که به طور اختصاصی دیواره کیست را رنگ می‌کنند و به دلیل تفسیر ساده و کاربرد چندگانه معمول هستند(۱۶). حساسیت این رنگ‌آمیزی‌ها برای تشخیص پنوموسیستیس جیروسی متغیر و معمولاً بین ۴۹ تا ۶۰ درصد برآورد شده است که در این میان بیش‌ترین حساسیت برای رنگ‌آمیزی کالکوفلوئور سفید ذکر شده است(۱۸،۱۷). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که حساسیت روش‌های رنگ‌آمیزی کالکوفلوئور سفید، گوموری منتامین سیلور و گیمسا به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۸۶ درصد و ۵۱درصد می‌باشد(۱۹). تاکنون مطالعات گوناگونی با استفاده از روش رنگ‌آمیزی روی پنوموسیستیس انجام شده است با این حال به دلیل تفاوت‌های موجود در طراحی مطالعات، میزان مهارت تکنسین و تبحر شناسایی این میکروارگانیسم و روش رنگ‌آمیزی مورد استفاده، تفسیر و مقایسه این مطالعات را با مشکل روبرو ساخته است. در مطالعه‌های انجام شده در ایران توسط محبعلی و همکاران از مدل حیوانی rat به منظور بررسی حساسیت و ویژگی روش‌های رنگ‌آمیزی کالکوفلوئور سفید، گیمسا و تولوئیدین بلو استفاده شد که نشان دادند روش رنگ‌آمیزی کالکوفلوئور سفید جهت تشخیص پنوموسیستیس در نمونه‌های بالینی از حساسیت و ویژگی بیش‌تری نسبت به رنگ‌آمیزی با گیمسا یا تولوئیدین بلو برخوردار است(۲۰). Harrhington و همکاران در مطالعه خود روی نمونه‌های BAL به این نتیجه رسیدند که رنگ‌آمیزی کالکوفلوئور سفید بیش از دو روش ایمونوفلورسنت (آنتی بادی فلورسنت مستقیم IFA و غیر مستقیم DAF) و رنگ‌آمیزی گوموری منتامین سیلور درامر تشخیص کارایی، سرعت و سهولت دارد(۲۱).

مطالعه حاضر، مطابق با نتایج مطالعات مذکور نشان داد که رنگ‌آمیزی کالکوفلوئور سفید در مقایسه با دیگر رنگ‌ها کارآیی بیش‌تری داشته است به طوری که سه مورد آزمایش مستقیم مثبت با روش کالکوفلوئور سفید با دیگر رنگ‌ها منفی گردید. این درحالی است که در مطالعه انجام شده توسط دیگرمحققان در نمونه‌های خلط القا شده میزان حساسیت تکنیک‌های رنگ‌آمیزی با روش گیمسا و گوموری- منتامین سیلور ۳۵ تا ۷۸ درصد گزارش شد(۲۲).

در مطالعه انجام گرفته توسط خدادادی و همکاران روی افراد غیرایدزی، میانگین کلنیزاسیون در بیماران با استفاده از nested-PCR، ۱۲/۵ درصد گزارش شد ولیکن در رنگ‌آمیزی کالکوفلوئور سفید در ۶۱۰ نمونه ۲ کیست (۰/۳۲ درصد) یافت گردید(۲۳). از دلایل مهم تفاوت در این نتایج می‌توان به استفاده از روش مولکولی Nested-PCR اشاره کرد که نسبت به روش های مورفولوژی حساسیت بیش تری دارد)(۲۴).

در مطالعه حاضر میزان کلنیزاسیون قارچی کم‌تر از ۱درصد بوده که این نتیجه با برخی از نتایج بررسی‌هایی که تا کنون انجام گرفته است مطابقت و با برخی دیگر نیز تفاوت دارد.

در مطالعه موریس و همکاران که با استفاده ازمتد PCR روی بیماران مبتلا به ایدز صورت گرفته است میزان کلنیزاسیون ۲/۶درصد تا ۵۵درصد گزارش شد(۲۵).

به‌طور کلی مطالعات محدودی در ایران به منظور بررسی کلنیزاسیون با پنوموسیستیس در بیماران مختلف صورت گرفته است. از جمله این موارد معدود مطالعه شیخ الاسلامی و همکاران بوده است که در آن با استفاده از تکنیک Nested-PCR میزان کلنیزاسیون در بیماران مبتلا به بدخیمی ۰/۶ درصد گزارش گردید(۲۶).

در مطالعه سروی و همکاران در ۶۰ نمونه لاواژ ریه میزان کلنیزاسیون با پنوموسیستیس با رنگ‌آمیزی گیمسا ۰ درصد گزارش شد(۲۷).

این امر نشان از آن دارد که میزان شیوع کلنیزاسیون به عوامل متعددی وابسته است که از آن جمله می‌توان به جمعیت مورد مطالعه، وجود عوامل و بیماری‌های زمینه‌ای در آن جمعیت، ناحیه جغرافیایی، روش تشخیصی مورد استفاده، پروفیلاکسی با داروها نظیر سولفامتاکسازول و تری متوپریم (SMT)، مهارت و تبحر محقق در شناسایی ارگانیسم اشاره کرد. برای مثال در بررسی میزان کلنیزاسیون پنوموسیستیس در افراد سیستیک فیبروزیس (CF) با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس (IF) با وجود استفاده از روش معتبر و دقیق، میزان کلنیزاسیون ۰ درصد گزارش شد(۲۸). قابل توجه است که مطالعه حاضر نشان داد رنگ‌آمیزی نمونه‌های BAL با کالکوفلوئور سفید درمقایسه با دو روش رنگ‌آمیزی GMS و گیمسا کارایی بالاتری برای شناسایی پنوموسیستیس جیرووسی در نمونه‌های تنفسی دارد. این مطالعه کاربردی می‌تواند آغاز مناسبی برای استفاده از این روش‌های رنگ آمیزی جهت تشخیص PCP در آزمایشگاه‌های بالینی کشور باشد. در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که از آن‌جاکه تشخیص بیماری PCP صرفاً با تکیه برعلایم بالینی بسیار دشوار بوده و از سوی دیگربه دلیل فقدان روش کشت آزمایشگاهی، اختصاصی نبودن روش‌های سرولوژیکی و واکنش‌های متقاطع آن، به کارگیری روش‌های مشاهده مستقیم میکروسکوپی ساده، سریع و قابل اعتماد اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. این مطالعه نشان داد که روش رنگ‌آمیزی کالکوفلوئور سفید بسیار ساده و کاربردی بوده و در هر آزمایشگاه بالینی با ضریب اطمینان بالا قابلیت استفاده خواهد داشت. لذا پیشنهاد می‌شود که با توجه به سادگی وسهولت انجام روش‌های رنگ‌آمیزی مختلف خصوصاً کالکوفلوئور سفید، این مطالعات در مناطق دیگر کشور و در ابعاد وسیع‌تر انجام شود. در عین حال توصیه می‌شود با توجه به حساسیت و کارایی بالای روش PCR در تشخیص پنومونی پنوموسیستیس جیرووسی مطالعات گسترده‌تری در جوامع مختلف بیماران و افراد سالم صورت پذیرد تا اطلاعات جامع‌تری در مورد میزان کلنیزاسیون یا عفونت پنوموسیستیس جیرووسی در ایران به دست آید.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۹۹۲ می‌باشد که با حمایت مرکز تحقیقات قارچ‌های تهاجمی و گروه قارچ‌شناسی وانگل شناسی دانشکده پزشکی انجام شده است.

References

1. Procop GW, Haddad S, Quinn J, Wilson ML, Henshaw NG, Reller LB. Detection of *Pneumocystis jiroveci* in respiratory specimens by four staining methods. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3333-3335.
2. Carmona EM, Limper AH. Update on the diagnosis and treatment of Pneumocystis pneumonia. Ther Adv Respir Dis 2011; 5(1): 41-59.
3. Totet A, Latouche S, Lacube P, Pautard JC, Jounieaux V, Raccurt C, et al. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, Amiens, France. Emerg Infect Dis 2004; 10(4): 667-673.
4. Guerrant RL, Walker DH, Weller PF. Tropical infectious diseases: principles, pathogens and practice. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone; 2006. p. 1257-1264.

5. Thomas CF, Limper AH. Pneumocystis Pneumonia. N Engl J Med 2004; 350(24): 2487-2498.
6. Fisk DT, Meshnick S, Kazanjian PH. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. Clin Infect Dis 2003; 36(1): 70-78.
7. Demanche C, Berthelemy M, Petit T, Polack B, Wakefield AE, Dei-Cas E, et al. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2126-2133.
8. Probst M, Ries H, Schmidt-Wieland T, Serr A. Detection of Pneumocystis carinii DNA in patients with chronic lung diseases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19(8): 644-645.
9. Armbruster C, Pokieser L, Hassl A. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by bronchoalveolar lavage in AIDS patients: comparison of Diff-Quik, fungifluor stain, direct immunofluorescence test and polymerase chain reaction. Acta Cytol 1995; 39(6): 1089-1093.
10. Gigliotti F, Haidaris CG, Wright TW, Harmsen AG. Passive Intranasal Monoclonal Antibody Prophylaxis against Murine *Pneumocystis carinii* Pneumonia. Infect Immun 2002; 70(3): 1069-1074.
11. Grocott RL. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori methenamine silver nitrate technique. Am J Clin Pathol 1955; 25(8): 975-979.
12. Kim YK, Parulekar S, Yu PK, Pisani RJ, Smith TF, Anhalt JP. Evaluation of calcofluor white stain for detection of Pneumocystis carinii. Diagn Microbiol Infect Dis 1990; 13(4): 307-310.
13. Khan MA, Farrag N, Butcher P. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: Immunofluorescence staining, simple PCR or nPCR. J Infect 1999; 39(1): 77-80.
14. Turner D, Schwarz Y, Yust I. Induced sputum for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV patients: New data, new issues. Eur Respir J 2003; 21(2): 204-208.
15. Kaiser K, Rabodonirina M, Picot S. Real time quantitative PCR and RT-PCR for analysis of *Pneumocystis carinii* hominis. J Microbiol Methods 2001; 45(2): 113-118.
16. Huang L, Hecht FM, Stansell JD, Montanti R, Hadley WK, Hopewell PC. Suspected *Pneumocystis carinii* pneumonia with a negative induced sputum examination. Is early bronchoscopy useful? Am J Respir Crit Care Med 1995; 151(6): 1866-1871.
17. Naimey GL, Wuerker RB. Comparison of histologic stains in the diagnosis of *Pneumocystis carinii*. Acta Cytol 1995; 39(6): 1124-1127.
18. Zaman MK, Wooten OJ, Suprahmanya B, Ankobiah W, Finch PJ, Kamholz SL. Rapid noninvasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* from induced liquefied sputum. Ann Intern Med 1988; 109(1): 7-10.
19. AL-Za'abi AM, MacDonald S, Geddie W, Boerner SL. Cytologic examination of bronchoalveolar lavage fluid from immunosuppressed patients. Diagn Cytopathol 2007; 35(11): 710-714.
20. Mohebali M, Mirbakhsh M, Keshavarz H. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens of rats by using calcofluor white staining. Iranian J Publ Health 2002; 31(1-2): 108-110.
21. Harrington BJ. Staining of cysts of Pneumocystis jiroveci (P. carinii) with the fluorescent brighteners calcofluor white and

uvitex 2b: A Review. Lab Medicine 2008; 39: 731-735.

22. Rahimifard N, Ahi M, Kahnamooei A. The diagnosis of Pneumocystis Carinii pneumonia by new laboratory methods. Tehran Univ Med J (TUMJ) 1999; 57(4): 17-22.
23. Khodadadi H, Mirhendi H, Mohebali M, Kordbacheh P, Zarrinfar H, Makimura K. Pneumocystis jirovecii colonization in non-HIV-infected patients based on nested-PCR detection in bronchoalveolar lavage samples. Iran J Public Health 2013; 42(3): 298-305.
24. Rohner P, Jacomo V, Studer R, Schrenzel J, Graf JD. Detection of Pneumocystis jirovecii by Two Staining Methods and Two Quantitative PCR Assays. Infection 2009; 37(3): 261-265.
25. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and Clinical Significance of Pneumocystis Colonization. J Infect Dis 2008; 197(1):10-17.
26. Sheikholeslami MF, Sadraei J, Farnia P, Forozandeh M, Emadi kochak H, Tabarsi P, et al. Colonization of Pneumocystis jirovecii in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) patients and the rate of Pneumocystis pneumonia in Iranian non-HIV immunocompromised patients. Iran J Microbiol 2013; 5(4): 411-417.
27. Sarvi MR, Noroozi H, Razmjoo E, Memar A, Mohammadi F, Yazdanparast A, et al. Isolation of Pneumocystis jirovecii from bronchoalveolar lavage (BAL) samples of patients referred to Masih Daneshvari hospital using PCR method. Iran J Infec Dis Trop Med 2010; 15(51): 37-41.
28. Varela JM, Respaldiza N, Sanchez B, de la Horra C, Montes-Cano M, Rincón M, et al. Lymphocyte response in subjects with chronic pulmonary disease colonized by *Pneumocystis jirovecii*. J Eukaryot Microbiol 2003; 5(suppl): 672-673.