

مقایسه دو روش انگل شناسی (فرمالین-اتر و کاتو) در تشخیص فاسیولیازیس انسانی

دکتر کامبیز فرقان پرست* - کیهان اشرفی**

* دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

** مربی گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

چکیده

فاسیولیازیس انسانی در استان گیلان یک بیماری اندمیک و بخصوص در بندر انزلی یک معضل بهداشتی است. در دو همه گیری سالهای ۱۳۶۸ و ۱۳۷۷ هجری، هزاران نفر از مردم این منطقه به این عفونت انگلی مبتلا شدند. در عفونت های کبدی وقتی که فاسیولای بالغ در کبد مستقر شد یافتن تخم انگل در مدفوع بیمار قابل اعتمادترین روش تشخیص محسوب می شود. بنابراین انتخاب حساسترین روش انگل شناسی در تشخیص و درمان بموقع این عفونت بسیار باارزش است. در این تحقیق فرمالین-اتر را که روش معمول در آزمایشگاههای تشخیص طبی است با روش کاتو که معمولاً برای شمارش تخم انگل ها بعنوان روشی کمی مورد استفاده قرار می گیرد ولی در تشخیص فاسیولیازیس نیز مفید گزارش شده مورد مقایسه قرار دادیم. نمونه مدفوع ۱۸۴ بیمار مشکوک به فاسیولیازیس که به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی ارجاع شده بودند بطور پی در پی گرفته شد. به بیماران حداقل از سه روز قبل از نمونه گیری رژیم غذایی بدون جگر داده شد. نمونه ها به دو روش فرمالین-اتر و کاتو (هر روش توسط یک کارشناس و بدون اطلاع از نتیجه کارشناس دیگر blind) مورد آزمایش قرار گرفت. بمنظور مشاهده نقش تکرار نمونه گیری در نتایج تحقیق از ۶۹ نفر از بیماران سه نمونه مدفوع ۲ تا ۳ روز درمیان گرفته شد. آماره کاپا میزان توافق دو روش را در مورد ۱۸۴ نمونه ۷۸/۰ (بسیار خوب) نشان داد. در بخش دوم تحقیق با سه بار تکرار نمونه گیری میزان توافق به ۹۸/۰ (عالی) افزایش یافت.

کلید واژه ها: آلودگی با فاسیولا / انگل شناسی - روشها / فاسیولا هپاتیکا

مقدمه

فاسیولا هپاتیکا یکی از مهمترین عوامل بیماریزای حیوانات اهلی در سراسر دنیاست و آلودگی دام ها به این ترماتود ضررهای اقتصادی زیادی را به انسان وارد می کند (۸ و ۱۰ و ۱۱).

با آنکه انسان میزبان تصادفی این انگل ذکر شده، فاسیولیازیس انسانی در بسیاری از نقاط دنیا مشاهده شده و در چند دهه اخیر اپیدمی های ناشی از این انگل در جمعیت های انسانی بعنوان یک معضل بهداشتی در برخی نقاط دنیا گزارش شده است (۵ و ۲). در مناطقی چون بولیوی، اکوادور، پرو، دلتای نیل (مصر) و مهمتر از همه در شمال ایران (بخصوص بندر انزلی) این عفونت اهمیت ویژه ای

پیدا کرده است. در حال حاضر افراد مبتلا را در دنیا ۲/۴ میلیون نفر و افراد در معرض ابتلا به این عفونت را ۱۸۰ میلیون نفر تخمین میزنند (۱۲). بر اساس شواهد موجود بنظر می رسد که بزرگترین اپیدمی فاسیولیازیس انسانی در ایران و در استان گیلان مشاهده شده باشد که تعداد مبتلایان را در سال ۱۳۷۰ ده تا پانزده هزار نفر تخمین زده اند.

تشخیص انگل شناختی فاسیولیازیس مزمن با آزمایش نمونه مدفوع بیماران صورت می گیرد. ساده ترین روش برای جستجوی تخم انگل ها در مدفوع روش مستقیم (Direct method) است ولی این روش حساسیت (Sensitivity) پائینی دارد. برای کسب نتایج مطلوب تر از

دانشکده پزشکی، پس از رعایت رژیم غذایی عاری از جگر بمدت حداقل سه روز، نمونه مدفوع در روزهای تعیین شده در ظرف مخصوص گرفته و تحویل آزمایشگاه شد. در آزمایشگاه هر نمونه توسط دو تکنولوژیست بطور جداگانه به روش های فرمالین-اتر و کاتو مورد آزمایش قرار گرفت. هیچکدام از دو تکنولوژیست از نتایج کار فرد دیگر اطلاع نداشت (Blind).

در روش فرمالین - اتر حدود ۱ - ۵ گرم از نمونه مدفوع بیمار را در ۱۰ میلی لیتر فرمالین ۱۰٪ بصورت سوسپانسیون در آورده و با استفاده از یک قیف و یک لایه گاز حدود ۷ میلی لیتر از سوسپانسیون را در یک لوله آزمایش با ابعاد $10 \times 100 \times 16$ میلی متر صاف کردیم. پس از اضافه کردن حدود ۳ میلی لیتر اتر، لوله را با درپوش پلاستیکی بسته و با تکان دادن محتویات آنرا مخلوط کردیم. لوله را با دور ۱۰۰۰ بمدت یک دقیقه سانتریفوژ نمودیم. مایع بالای رسوب را دور ریخته و رسوب ته لوله را فقط در یک تا دو قطره از مایع باقیمانده معلق نمودیم و تمام سوسپانسیون حاصل را بین لام و لامل در زیر میکروسکوپ بررسی کردیم.

در روش کاتو مقداری از نمونه مدفوع را بر روی کاغذ صافی قرار داده و بمنظور جدا کردن فیبرها و سایر مواد مدفوعی درشت، توری فلزی مخصوص را (105 mesh/ sqinch) بر روی آن فشار دادیم تا مدفوع صاف شود. قالب (Template) مخصوص آزمایش کاتو را بر روی لام قرار داده و آن را از مدفوع صاف شده پر کردیم. قالب را به آهستگی برداشته و یک قطعه نوار سلوفان 20×30 میلی متری، که حداقل بمدت ۲۴ ساعت در محلول گلیسرین - مالاشیت سبز غوطه ور شده بود، بر روی صاف شده روی لام قرار دادیم. لام را برگردانده و با فشار دادن آن بر روی یک سطح صاف، نمونه زیر سلوفان پخش شد و حداقل یک ساعت بعد با شیشی ۱۰ میکروسکوپ مطالعه گردید. برای بررسی تاثیر تکرار آزمایش مدفوع در تشخیص موارد فاسیولیازیس، نمونه مدفوع ۶۹ بیمار از کل ۱۸۴ بیمار در ۳ نوبت و در فاصله زمانی ۷ روزه تهیه شده و با هردو روش فرمالین-اتر و کاتو بررسی گردید.

روش آماری کاپا (KAPPA) برای بررسی نتایج در سطح اطمینان ۹۵٪ مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

در مجموع، ۱۸۴ بیمار مشکوک به فاسیولیازیس در این

روش های متراکم سازی (Concentration)، که از حساسیت بالاتری برخوردارند استفاده می شود. برای متراکم کردن معمولاً روش های شناور سازی (Flotation) و یا روش های رسوبی (sedimentation) بکار می رود. روش های شناور سازی، که بیشتر در مورد کرم هایی که تخم های سبک دارند و برای تک یاخته ها کاربرد دارد، برای تخم فاسیولا که از سایر تخم کرم ها بزرگتر و سنگین تر است مطلوب نیست (۷).
Teleman (۱۹۰۸) اولین روش رسوب دادن یعنی روش اسید - اتر را ابداع کرد ولی بعد ها اصلاح شده این روش با نام روش رسوبی فرمالین - اتر مورد استفاده قرار گرفت و برخی از محققین این روش را برای تشخیص تخم فاسیولا در مدفوع انتخاب می کنند (۹).

روش کاتو اولین بار در سال ۱۹۵۴ توسط Kato و Miura ابداع شد که اکنون با تغییراتی که در آن صورت گرفته بنام کاتوی تغییر یافته (Modiffied Kato) یا Kato Katz و بیشتر بمنظور بررسی نیمه کمی انگل شناسی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۰).

در سال ۱۳۶۹ بدنبال اپیدمی فاسیولیازیس در استان گیلان روش فرمالین - اتر با روش مستقیم، شناور سازی و کاتو مقایسه شد که نتایج حاصله نشان از ارجحیت کاتو به فرمالین - اتر داشت (۳) ولی در آن تحقیق فقط بخشی از رسوب موجود در لوله آزمایش که با روش فرمالین - اتر تهیه می شد مورد آزمایش قرار گرفته بود (حداکثر ۳ لام) و ممکن است که پائین بودن درصد موارد مثبت روش فرمالین - اتر در تحقیق مذکور (۱۹٪) ناشی از عدم مشاهده تمام رسوب موجود در لوله آزمایش باشد.

با توجه به آنکه میک بودن فاسیولیازیس و استرونیلوئیدیازیس در استان گیلان (۴ و ۱) و لزوم یافتن روش و یا روش های انگل شناسی مناسب و حساس، بر آن شدیم تا با بکارگیری دقیق روش فرمالین - اتر و بررسی تمام رسوب بدست آمده در لوله آزمایش نتایج آن را با نتایج روش کاتو مقایسه نموده و روش حساس تر را معرفی نمائیم. با توجه باینکه در صورت رعایت پیش شرط های لازم آزمایش یعنی رعایت رژیم غذایی بدون جگر حداقل سه روز قبل از گرفتن نمونه، هیچکدام از روش های مورد بررسی موارد مثبت کاذب ندارد، لذا یافتن حساسترین روش تشخیصی بسیار ارزشمند است.

مواد و روش ها

بدنبال ارجاع بیماران به آزمایشگاه انگل شناسی

بحث و نتیجه گیری

یک روش انگل شناسی ایده آل بایستی دارای خصوصیات زیر باشد:

- ۱- قابلیت اجرا در آزمایشگاه و در شرایط صحرایی
- ۲- سهولت انجام آزمایش
- ۳- قابلیت انجام با حداقل وسایل و تجهیزات
- ۴- وقت گیر نبودن
- ۵- ایجاد حداقل آلودگی در محیط کار
- ۶- مقرون به صرفه بودن

۷- قابلیت استفاده برای تشخیص انواع بیشتری از تخم انگل ها، لاروها و تک یاخته ها

۸- قابلیت نگهداری نمونه های تهیه شده به مدت طولانی

تربودن تغییر فاحش در عوامل انگلی

با توجه به خصوصیات فوق هر دو روش فرمالین - اتر و کاتو دارای نقاط ضعف و قوت خاص خود می باشند. در روش کاتو امکان مشاهده تک یاخته ها و لارو کرم ها وجود نداشته کاربرد آن در مورد نمونه های اسهالی و یا خیلی سفت مشکل است و نمونه های تهیه شده قبل از بررسی میکروسکوپی باید حداقل ۱ ساعت بماند تا شفاف شود. مراحل تهیه نمونه در روش فرمالین - اتر وقت گیرتر بوده و به تجهیزات بیشتری نیاز است. استفاده از اتر یکی از معایب این روش است. امکان آماده کردن نمونه ها در شرایط خارج از آزمایشگاه وجود نداشته و نمونه های تهیه شده برای مدت طولانی قابل نگهداری نیست و بایستی در کوتاه ترین زمان ممکن مورد بررسی قرار گیرند. بعلاوه شستشو و ضد عفونی کردن وسایل مورد استفاده در این روش نیازمند صرف وقت بیشتری از کارکنان است و احتمال آلودگی محیط آزمایشگاه در این روش بیشتر است.

آماره کاپا در این تحقیق نشان داد که برای یکبار آزمایش مدفوع با ۹۵٪ اطمینان می توان ادعا نمود که توافق تشخیص مثبت دو روش بین ۶۳ تا ۸۳ درصد و توافق تشخیص منفی دو روش بین ۸۵ تا ۹۳ درصد است "بسیار خوب". زمانی که نتایج سه بار آزمایش با دو روش مورد مقایسه قرار گرفت آماره کاپای محاسبه شده نشان داد که "توافق عالی" وجود دارد یعنی با ۹۵٪ اطمینان می توان ادعا نمود که توافق تشخیص مثبت دو روش بین ۸۸ تا ۱۰۰ درصد و برای تشخیص منفی بین ۹۴ تا ۱۰۰ درصد است. چنانچه هدف از انجام آزمایش صرفاً جستجوی تخم فاسیولا در مدفوع باشد در صورت فراهم بودن امکانات از هریک از

تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد افرادی که در مدفوع آنان تخم انگل با یکی از دو روش آزمایش یا با هر دو روش مشاهده گردید ۶۰ نفر بود. بدین معنی که بی تردید در این ۶۰ مورد کرم بالغ فاسیولا در مجاری صفراوی بیماران مستقر بوده و تخم ریزی کرده است. جدول ۱ توزیع فراوانی موارد مثبت و منفی دو روش را نشان می دهد.

جدول ۱- مقایسه موارد مثبت و منفی آزمایش های کاتو و فرمالین - اتر

کاتو	مثبت	منفی	جمع
فرمالین - اتر			
مثبت	۴۴ (۰/۲۴)	۹ (۰/۰۵)	۵۳ (۰/۲۹)
منفی	۷ (۰/۰۴)	۱۲۴ (۰/۶۷)	۱۳۱ (۰/۷۱)
جمع	۵۱ (۰/۲۸)	۱۳۳ (۰/۷۲)	۱۸۴ (۱)

K = ۰/۷۸ "بسیار خوب"

P = ۰/۷۳ توافق مثبت S.E. = ۰/۰۵

۹۵٪ CI = ۰/۷۳ ± ۰/۰۹۸

P = ۰/۸۹ توافق منفی S.E. = ۰/۰۲

۹۵٪ CI = ۰/۸۹ ± ۰/۰۴

برای نشان دادن نقش تکرار آزمایش در تشخیص موارد فاسیولیازیس، نمونه مدفوع ۶۹ نفر از بیماران فوق در ۳ نوبت با هر دو روش کاتو و فرمالین - اتر مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این بخش در جدول ۲ نشان داده شده است. با روش فرمالین اتر در مدفوع ۴ بیمار لارو استرونژیلوئیدس استرکورالیس (Strongyloides stercoralis) مشاهده شد.

جدول ۲- مقایسه موارد مثبت و منفی ۳ نوبت آزمایش های کاتو و فرمالین - اتر

کاتو	مثبت	منفی	جمع
فرمالین - اتر			
مثبت	۲۲ (۰/۳۲)	۰ (۰/۰۰)	۲۲ (۰/۳۲)
منفی	۱ (۰/۰۱)	۴۶ (۰/۶۷)	۴۷ (۰/۶۸)
جمع	۲۳ (۰/۳۳)	۴۶ (۰/۶۷)	۶۹ (۱)

K = ۰/۹۸ "عالی"

P = ۰/۹۶ توافق مثبت S.E. = ۰/۰۴

۹۵٪ CI = ۰/۹۶ ± ۰/۰۷۸

P = ۰/۹۸ توافق منفی S.E. = ۰/۰۲

۹۵٪ CI = ۰/۹۸ ± ۰/۰۴

تخم فاسیولا و لارو استرونژیلوئیدس با روش فرمالین - اتربررسی شده و در صورت منفی بودن، نمونه به روش کاتو نیز آزمایش شود. برای تحقیقات اپیدمیولوژیک در خصوص فاسیولیازیس فقط اجرای کاتو مقرون بصره و با کفایت است.

سپاسگزاری:

از خانم بهناز رحمتی کارشناس آزمایشگاه انگل شناسی و خانم حسینی همکار آزمایشگاه بخاطر همکاری بی شائبه‌ای که در اجرای این تحقیق داشته اند سپاسگزاریم.

دو روش می توان از آنها استفاده نمود. ولی اگر بررسی بیمار برای تخم و لارو انگل های دیگر بخصوص استرنژیلوئیدز و تک یاخته ها هم مورد درخواست پزشک معالج باشد روش فرمالین اترارجحیت خاص خود را دارد.

تکرار آزمایش، در صورت منفی شدن، تا سه بار در مدت ۷ تا ۱۰ روز موارد منفی کاذب را بطور اطمینان بخشی کاهش می دهد. هرکدام از دو روش اگر سه بار منفی بود کفایت خواهد کرد ولی با توجه به اهمیت بیماری استرونژیلوئیدزیس و شباهت های بالینی آن با فاسیولیازیس توصیه می شود که ابتدا نمونه بیماران از نظر

منابع

۱. سجادی، سید محمود؛ مسعود، جعفر: مقایسه شیوع و شدت آلودگی به کرم های روده ای در مناطق شرقی و غربی بحر خزر: خلاصه مقالات اولین کنگره سراسری بیماریهای انگلی در ایران. رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، ۱۳۶۹، صص: ۵۷.
۲. فرقان پرست، کامبیز؛ [و دیگران]: مطالعه اپیدمیولوژی بالینی فاسیولیازیس انسانی در گیلان. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، ۱۳۷۲، سال دوم شماره ۶ و ۷، صص: ۱۱-۴.
۳. فرقان پرست، کامبیز؛ [و دیگران]: روش انتخابی برای جستجوی تخم فاسیولا در مدفوع: خلاصه مقالات اولین کنگره سراسری بیماریهای انگلی در ایران. رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، ۱۳۶۹، صص: ۸۲.
۴. سرایی، مهرزاد؛ رضائیان، مصطفی: بررسی میزان شیوع انگل های روده ای در شهرستان لاهیجان. خلاصه مقالات دومین کنگره سراسری بیماریهای انگلی در ایران. تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۷، صص: ۱۲۸.
5. Hardman EW, Jones RL, Davies AH. Fascioliasis a Large Outbreak. B M J 1970; 3: 502-5 .
6. WHO. Technical Report Series: The Control of Schistosomiasis. Geneva: WHO, 1985: No.728.
7. American Society of Parasitology. Procedures Suggested for use in Examination of Clinical Specimens for Parasitic Infections. J. Parasitol 1977: 63: 959-60.
8. Srikim S, Pholpark M. Problem of Fascioliasis in Animal Husbandry in Bangkok. In: Cross JH (editor). Emerging Problems in Food Borne Parasitic Zoonosis: Impact on Agriculture and Public Health. Bangkok: Thai Watana Panich Press, 1991: 352-5.
9. Subash C Pariya. Text Book of Medical Parasitology. Delhi Rajendra, 1996: 249-253.
10. Gillespie SH, Hawkey PM. Medical Parasitology a Practical Approach. London: Oxford University, 1995: 82-83, 201-3.
11. Cook GC. Manson's Tropical Diseases. London: WB Saunders 1996: 1461-4.
12. WHO. Fact Sheet: Triclabendazole and Fascioliasis, A New Drug to Combat an Age-old Disease. Geneva: WHO, 1998: No.191.

Comparison of the Formalin- Ether and the Katz Kato in The Parasitological Diagnosis of Human Fascioliasis

Forghanparast K., Ashrafi K.

ABSTRACT

Human fascioliasis is an endemic disease in the Guilan province and it has become a public health problem in the port of Anzali. Thousands of people in this area were infected during the two outbreaks in 1987 and 1998. If the mature worm settles in the liver, finding the ova in the stool is the most reliable diagnosis of the infection. Therefore selecting the most sensitive parasitological method is of value in prompt diagnosis and treatment of the disease. The Formalin-Ether method which is a routine procedure in the clinical laboratories is compared to Katz-Kato which is usually used for quantitative parasitological assessments, but is also reported as being useful in the diagnosis of human fascioliasis. Stool samples of 184 suspected patients, referred to the parasitology lab of the Guilan university of medical sciences, were consecutively collected. Patients had liver-free diets at least 3 days prior to specimen collection. Each sample was examined by both the formalin-ether and the Katz-Kato methods, performed separately by two technologists neither of whom knew the results of the other one (blinding). In order to see the outcomes of the tests on the repeated samples, 3 stool samples were collected at 2 - 3 days intervals from 69 patients and examined as before. For the first part, 44 samples were positive and 124 were negative with both methods. 9 samples were only positive with the formalin-ether and 7 samples were exclusively positive with the Katz-Kato. For the second part (3 samples for each patient) 22 patients were diagnosed as positive and 46 patients as negative with both methods. Only one patient was exclusively positive with Katz-Kato. Comparing the results of 184 samples with Kappa statistics an agreement of 0.78 (very good) was found. This agreement increased to 0.98 (excellent) for repeated samples of 69 patients.

Key Words: *Fasciola hepatica* / Fascioliasis / Parasitology- Methods