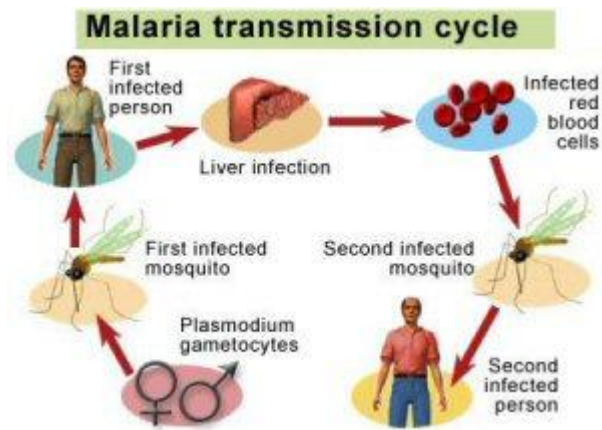


تشخیص آزمایشگاهی مالاریا



شناسایی و تشخیص انگل‌های خونی از وظایف مهم آزمایشگاهها به شمار می‌آید. در این میان تشخیص مالاریا به علت شیوع بیشتر در ایران و همچنین ایجاد عوارض شدید و گاهاً مرگ، در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع، از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد.

اگر چه بیماری در نواحی شرقی و جنوب شرقی ایران خصوصاً در مناطق غیر شهری شیوع بیشتری دارد ولی کلیه آزمایشگاهها می‌بایست در هر زمان آمادگی پذیرش و تشخیص نمونه مشکوک به این بیماری را داشته باشند.

با وجود پیشرفت آزمایشات تشخیصی و حتی دستیابی به روشهای دقیق جهت شناسایی آنتی ژن انگلها، کماکان روش تشخیصی قطعی بسیاری از انگلهای خونی از جمله پلاسمودیومها مشاهده آنها در گسترش خونی می‌باشد. از آزمایشاتی نظیر یافتن آنتی‌بادی‌های ضد انگل مالاریا نیز می‌توان در برنامه‌های غربالگری و یا شناسایی خون‌های آلوده در دهنندگان خون استفاده نمود. تهیه گسترش‌های خونی در بیماری‌های بابزیازیس، مرحله حاد شاگاس، تریپانوزومیاژ آفریقایی و بعضی از انواع فیلاریازیس نیز قدم اولیه و مهم جهت تشخیص می‌باشد.

بنابراین با توجه به اهمیت تشخیصی گسترش‌های خونی، کلیه کارکنان آزمایشگاهها می‌بایست از روش‌های صحیح جمع آوری نمونه و تهیه گسترش‌های خونی، تهیه رنگ و بافرهای لازم، رنگ‌آمیزی مناسب و در نهایت ویژگی‌های مرفولوژیکی انگل‌ها آگاه باشند.

جمع آوری نمونه خون برای تشخیص مالاریا

اگر چه به محض شک به مالاریا در هر زمان جمع آوری نمونه الزامی است ولی رعایت زمان خونگیری، شناسایی گونه و مرحله زندگی انگل را امکانپذیرتر می سازد. بهترین زمان خونگیری در فواصل بین حملات لرز و قبل از شروع تب می باشد و معمولاً بدلیل عدم امکان یافتن انگل در یک نوبت خونگیری، جمع آوری خون و تهیه گسترش می بایست تا سه روز متوالی هر ۸-۶ ساعت ادامه یابد. بدیهی است که تهیه نمونه قبل از استفاده از هرگونه داروی ضد مالاریا دارای ارزش تشخیصی می باشد.

تهیه نمونه خون از طریق خونگیری مویرگی و وریدی امکانپذیر می باشد، ولی استفاده از خون مویرگی ارجح است، زیرا مواد ضد انعقاد موجب تغییرات مرفولوژیکی در انگل شده بنا بر این استفاده از خون وریدی محدود به شرایطی است که تهیه گسترش های مناسب با استفاده از خون مویرگی مسیر نباشد. در اینگونه موارد استفاده از ضد انعقاد EDTA با رعایت نسبت دقیق با خون توصیه می گردد. در صورت عدم رعایت این نسبت امکان شسته شدن گسترش ضخیم از روی اسلاید هنگام رنگ آمیزی و یا عدم رنگ پذیری مناسب انگل وجود دارد. در هر حال در موارد خونگیری وریدی بهتر است تهیه گسترش از خون داخل سرنگ و قبل از مخلوط شدن با ماده ضد انعقاد و در صورت عدم امکان حداکثر ۱ ساعت پس از نمونه گیری صورت گیرد. با گذشت یک ساعت از زمان نمونه گیری، تغییرات مرفولوژیکی در ساختمان انگل ایجاد شده و حالت منقوط شدن گلبول های قرمز نیز از بین می رود ولی شکل کلی انگل حداکثر تا دو ساعت قابل تشخیص باقی می ماند.

تهیه گسترش های خونی مالاریا

جهت تشخیص انگل از گسترش های ضخیم و نازک استفاده شده و طبق توصیه CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) در زمان پذیرش بیمار تهیه حداقل ۴ گسترش خونی شامل دو گسترش ضخیم و دو گسترش نازک ضروری می باشد.

گسترش های ضخیم امکان تشخیص عفونت های خفیف را فراهم ساخته و در واقع حجم زیادی از خون در زمان کمی بررسی می گردد، اگرچه تشخیص گونه پلاسمودیوم در این نوع گسترش ها به مهارت کافی نیاز دارد. با بررسی گسترش های خونی نازک امکان تشخیص مراحل مختلف زندگی انگل و افتراق گونه های مختلف فراهم می گردد. طرز تهیه گسترش های خونی نازک همانند تهیه گسترش های خونی معمول بوده که در آزمایشگاهها به منظور بررسی سلولهای خونی انجام می گردد. یک گسترش نازک مناسب می بایست در ناحیه مرکزی اسلاید واقع شده، حاشیه های کناری آن آزاد، در یک انتها ضخیم و در انتهای دیگر نازک و طول قسمت نازک آن حداقل ۲ سانتی متر باشد. این گسترش ها در دمای اتاق خشک شده و پس از خشک شدن می بایست با متانول خالص ثابت گردند.

تهیه گسترش های ضخیم بدو صورت امکانپذیر می باشد:

در روش اول می توان پس از تماس اسلاید با قطره خون حاصل از خونگیری مویرگی با چرخاندن اسلاید (یا با استفاده از انتهای سواپ) خون را پخش کرده تا به قطر و ضخامت مناسب برسد (قطر سکه دو ریالی و ضخامت که نوشته های روزنامه از پشت آن

براحتی قابل خواندن نباشد) در صورت بزرگ نبودن قطره خون و یا لخته شدن آن استفاده از این روش مناسب نمی‌باشد. گسترش‌های ضخیم می‌بایست در سطح صاف افقی و دمای اتاق خشک شده ولی ثابت نگردند. در مناطق مرطوب می‌توان از انکوباتور C ۲۵ برای خشک کردن گسترشها استفاده نمود ولی استفاده از دمای C ۳۷ و یا حرارت بدلیل ثابت شدن گلبول‌های قرمز و عدم لیز کامل آنها توصیه نمی‌گردد. این گسترش‌ها در دمای اتاق در عرض ۸-۱۲ ساعت خشک می‌شوند ولی با استفاده از پنکه می‌توان این زمان را به حدود ۱-۴ ساعت تقلیل داد. در موارد اضطراری جهت تشخیص سریع می‌توان گسترش‌ها ضخیم را اندکی نازکتر از معمول تهیه نمود تا در عرض یکساعت خشک شوند.

در بعضی از آزمایشگاهها خون حاوی EDTA سانتریفوژ شده و پس از برداشتن پلاسما و بافی کوت ، از لایه‌های فوقانی گلبول‌های قرمز و پلاسما باقیمانده گسترش نازک تهیه می‌گردد. این روش باعث تغلیظ انگل‌ها و همچنین کاهش تعداد پلاکتها در گسترش می‌شود. کاهش پلاکتها امکان ایجاد خطاهای تشخیصی را کاهش می‌دهد. گسترش‌های تهیه شده قبل از رنگ‌آمیزی می‌بایست با متانول خالص ثابت شوند.

رنگ آمیزی گسترش‌های خونی برای مالاریا

گیمسا مناسب‌ترین رنگ جهت رنگ‌آمیزی انگل‌های خونی می‌باشد و امکان تشخیص دانه‌های شافرن، که در بعضی از گونه‌های پلاسمودیوم دیده می‌شود، را میسر می‌سازد. این دانه‌ها در رنگ‌آمیزی‌های رایت یا رایت گیمسا بخوبی قابل تشخیص نمی‌باشند. نکته مهم در تهیه رنگ، تنظیم PH بافر رقیق‌کننده (بافر فسفات) بوده که جهت تشخیص افتراقی انواع انگل‌های خونی می‌بایست در حد ۷-۲/۷ حفظ شود. از رنگ گیمسا با غلظت‌های مختلف می‌توان جهت رنگ‌آمیزی گسترش‌ها متناسب با شرایط بیمار و به منظور تشخیص سریع استفاده نمود بطور مثال در موارد اضطراری استفاده از رنگ با غلظت ۵/۷٪ به مدت ۱۵ دقیقه و در سایر موارد به منظور رنگ‌آمیزی بهتر ساختمان‌های داخلی انگل استفاده از غلظت‌های ۵/۲٪ به مدت ۴۵ دقیقه و یا ۲٪ به مدت ۶۰ دقیقه توصیه می‌گردد. در پایان رنگ‌آمیزی ، شستشوی اسلایدها با بافر دارای PH 7-2/7 کیفیت نهایی رنگ را بهتر می‌نماید. کنترل کیفی رنگ و بررسی کیفیت رنگ پذیری انگل‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی گسترش‌های خونی معمولی امکانپذیر می‌باشد که در صورت مناسب بودن رنگ پذیری گلبول‌های قرمز، سفید و پلاکت‌ها، می‌توان از رنگ‌آمیزی مناسب انگل‌ها نیز مطمئن گردید. برای آگاهی از طرز تهیه رنگ و بافر رقیق‌کننده می‌توان از کتب مرجع یا دستورالعمل استاندارد CLSI(M15-A) استفاده نمود.

بررسی گسترش‌های خونی تهیه شده جهت تشخیص مالاریا

بطور کلی در بررسی گسترش‌های خونی جهت شناسایی و تشخیص انگل‌ها ابتدا از درشتنمایی کم و متوسط (۱۰× و ۴۰×) میکروسکوپ جهت یافتن اجزا درشت‌تر نظیر شیزونت و گامتوسیت و نهایتاً از درشتنمایی زیاد (۱۰۰×) جهت بررسی کامل گسترش استفاده می‌گردد. برای بررسی کامل گسترش می‌بایست حداقل ۳۰۰ میدان با درشتنمایی زیاد (۱۰۰×) مشاهده گردد.

تشخیص انگل‌های خونی، خصوصاً چهارگونه پلاسمودیوم که در انسان ایجاد عفونت نموده و همچنین افتراق صحیح آنها از هم

جهت انتخاب درمان مناسب ضروری است. افتراق این گونه‌ها با استفاده از مشخصاتی نظیر اندازه و شکل گلبول‌های قرمز آلوده، وجود یا عدم وجود

دانه های شافرنر، شکل و تعداد تروفوزوئیتها در داخل گلبول قرمز و شکل گامتوسیت‌ها امکانپذیر بوده که معمولاً تشخیص قطعی با استفاده از کنار هم قرار دادن چند یافته فوق امکانپذیر می‌گردد.

نکته مهم در امر تشخیص، افتراق انگل از مواردی مانند پلاکت، رسوب رنگ، قارچ و یا باکتریهایی است که بر روی گلبول قرمز قرار گرفته‌اند. افتراق پلاسمودیوم فالسی پاروم از بابز یا نیز جهت انتخاب درمان مناسب، دارای اهمیت بوده که اگرچه این امر گاهاً در بررسی میکروسکوپی به سختی صورت گرفته، بدلیل عدم دسترسی تمامی آزمایشگاه‌ها به آزمایشهای اختصاصی نظیر تلقیح نمونه مشکوک به حیوانات آزمایشگاهی، آزمایشات سرولوژی و یا PCR کماکان تشخیص افتراقی میکروسکوپی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

تعیین میزان پارازیتمی

تعیین میزان پارازیتمی قبل از شروع درمان و جهت پیگیری اثر دارو بر روی عفونت و تعیین سوشهای مقاوم به داروی پلاسمودیوم فالسی پاروم ضروری می‌باشد که بطور معمول قبل از درمان و ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از درمان انجام می‌گیرد. در صورت موفقیت درمان میزان پارازیتمی در عرض ۲۴ ساعت اول درمان بطور مشخص کاهش می‌یابد. (تا ۵۰٪ یا بیشتر)
تعیین میزان پارازیتمی به دو روش امکانپذیر می‌باشد. در روش اول که فقط در گسترش‌های نازک قابل انجام بوده با حداقل مشاهده ۱۰ میدان میکروسکوپی درصد گلبول‌های قرمز آلوده به ازای شمارش ۱۰۰ گلبول قرمز گزارش می‌گردد. (مثلاً ۰۵/۰٪ یا ۱٪)

در مواردی که تعداد انگل‌ها در خون کم است می‌توان از روش دیگری استفاده نمود که بر روی هر دو گسترش ضخیم و نازک قابل انجام است. در این روش تعداد انگل برحسب شمارش ۱۰۰ گلبول سفید اعلام می‌گردد. همچنین می‌توان مقدار انگل را در یک میکرولیتر خون نیز محاسبه نمود که برای اینکار تعداد انگل شمرده شده بر حسب ۱۰۰ گلبول سفید در تعداد کل گلبول‌های سفید خون ضرب شده و نتیجه بر عدد ۱۰۰ تقسیم می‌گردد. قابل ذکر است که در صورت کم بودن تعداد انگلها می‌توان تعداد آنها را به ازای ۲۰۰ گلبول سفید شمارش نمود.

منبع : مجله اینترنتی آزمایشگاه مثبت