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 وهمچنین ایجاد عوارض شدید و گاهاً مرگ، در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع، از اهمیت بسزایی برخوردارمی باشد.

اگر چه بیماری در نواحی شرقی وجنوب شرقی ایران خصوصا 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 می باشد . از آزمایشاتی نظیر یافتن آنتی‌بادی‌های ضد انگل مالاریا نیز می توان در برنامه‌های غربالگری و یا شناسایی خون‌های آلوده در دهندگان خون استفاده نمود. تهیه گسترشهای خونی در بیماری های بابزیازیس، مرحله حاد شاگاس، تریپانوزومیاز آفریقایی وبعضی ازانواع فیلاریازیس نیز قدم اولیه ومهم جهت تشخیص می باشد.

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.

- **جمع‌آوری نمونه خون**

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 می‌باشد و معمولابدلیل عدم امکان یافتن انگل در یک نوبت خونگیری، جمع‌آوری خون و تهیه گسترش می بایست تا سه روز متوالی هر ۶-۸ 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 امکانپذیرمی باشد، ولی استفاده از خون مویرگی ارجح است، زیرا مواد ضد انعقاد موجب تغییرات مرفولوژیکی در انگل شده بنا بر این استفاده ازخون وریدی محدود به شرایطی است که تهیه گسترش‌های مناسب با استفاده از خون مویرگی مسیر نباشد.در اینگونه موارد استفاده ازضد انعقادEDTA با رعایت نسبت دقیق با خون توصیه می گردد. در صورت عدم رعایت این نسبت امکان شسته شدن گسترش ضخیم از روی اسلاید هنگام رنگ‌آمیزی و یا عدم رنگ‌پذیری 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 نمونه‌گیری صورت گیرد. با گذشت یک ساعت از زمان نمونه گیری، تغییرات مرفولوژیکی در ساختمان انگل ایجاد شده و حالت منقوط شدن گلبول‌های قرمز نیز از بین می‌رود ولی شکل کلی انگل حداکثر تا دو ساعت قابل تشخیص باقی می‌ماند.

- **تهیه گسترش های خونی**

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.

گسترش‌های ضخیم امکان تشخیص عفونت‌های 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 گسترش‌های خونی نازک امکان تشخیص مراحل مختلف زندگی انگل و افتراق گونه‌های مختلف فراهم می گردد.

طرز تهیه گسترش های خونی نازک همانند تهیه گسترش‌های خونی معمول بوده که در آزمایشگاهها به منظور بررسی سلولهای خونی انجام می گردد. یک گسترش نازک مناسب می‌بایست در ناحیه مرکزی اسلاید واقع شده ،حاشیه‌های کناری آن آزاد ، در یک انتها ضخیم و در

انتهای دیگر نازک و طول قسمت نازک آن حداقل ۲ سانتی‌متر باشد . این گسترش‌ها در دمای اتاق خشک شده و پس از خشک شدن می بایست با متانول خالص ثابت گردند.

تهیه گسترشهای ضخیم بدو صورت امکانپذیر می‌باشد:

در روش اول می‌توان 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 ضخامتی که نوشته‌های 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.

در روش دوم چند قطره خون مویرگی یا وریدی بر روی اسلاید قرار داده و با انتهای سواپ مخلوط و پخش شده تا به قطر و ضخامت مناسب برسد. با چرخاندن دورانی اسلاید به مدت۳۰ ثانیه رشته‌های فیبرین ازبین رفته که این امر خطاهایی مانند جدا شدن گسترش از اسلاید و یا محو شدن انگل‌ها پس از رنگ‌آمیزی بدلیل وجود رشته های فیبرین را به حد اقل می رساند.

گسترش‌های ضخیم می‌بایست در سطح صاف افقی و دمای اتاق خشک شده ولی ثابت نگردند. در مناطق مرطوب می‌توان از انکوباتور ۲۵°C برای خشک کردن گسترشها استفاده نمود ولی استفاده از دمای ۳۷°C و یا حرارت بدلیل ثابت شدن گلبول‌های قرمز و عدم لیز کامل آنها توصیه نمی‌گردد. این گسترش‌ها در دمای اتاق در عرض ۱۲-۸ ساعت خشک می‌شوند ولی با استفاده از پنکه می‌توان این زمان را به حدود ۴-۱ 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 پلاسمای باقیمانده گسترش نازک تهیه می‌گردد. این روش باعث تغلیظ انگل‌ها و همچنین کاهش تعداد پلاکتها در گسترش می شود. کاهش پلاکتها امکان ایجاد خطاهای تشخیصیرا کاهش می دهد.گسترش‌های تهیه شده قبل از رنگ‌آمیزی می‌بایست با متانول خالص ثابت شوند.

- **رنگ‌آمیزی گسترش‌ها ی خونی**

گیمسا مناسب‌ترین رنگ جهت رنگ‌آمیزی انگل‌های خونی می‌باشد و امکان تشخیص دانه‌های شافنر،که در بعضی از گونه‌های پلاسمودیوم دیده می‌شود، را میسر می‌سازد. این دانه ها 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 رنگ آمیزی گسترش ها متناسب با شرایط بیمار و به منظور تشخیص سریع استفاده نمود بطور مثال در موارد اضطراری استفاده از رنگ با غلظت ۷/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه و در سایر موارد به منظور رنگ‌آمیزی بهتر ساختمان‌های داخلی انگل استفاده از غلظت‌های ۲/۵٪ به مدت ۴۵ دقیقه و یا ۲٪ به مدت ۶۰ دقیقه توصیه می گردد. در پایان رنگ آمیزی ، شستشوی اسلایدها با بافر دارای PH ۷/۲-۷ کیفیت نهایی رنگ را بهتر می‌نماید.

کنترل کیفی رنگ و بررسی کیفیت رنگ پذیری انگل‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی گسترش‌های خونی معمولی امکانپذیر می باشد که در صورت مناسب بودن رنگ پذیری گلبول‌های قرمز، سفید و پلاکت‌ها، می توان از رنگ‌آمیزی مناسب انگل‌ها نیز مطمئن گردید.

برای آگاهی از طرز تهیه رنگ و بافر رقیق کننده می توان از کتب مرجع یا دستورالعمل استاندارد CLSI(M15-A) استفاده نمود.

- **بررسی گسترش‌های خونی تهیه شده**

بطور کلی در بررسی گسترش‌های خونی جهت شناسایی و تشخیص انگل‌ها ابتدا از درشتنمایی کم و متوسط (×۱۰و ×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 می بایست 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

دانه‌های شافنر، 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 می گردد.

Infected RBCs		
Size	**Shape of Infected RBC**	**Schüffner's Dots**
<N, N:**PM** (<N=smaller than normal) N:**PF** (N=normal) >N:**PO** (>N=larger than normal) >>N:**PV** (>>N=much larger than normal)	Crescent:**PF** (gametocytes) Ameboid:**PV** Fimbriation:**PO** Elongated:**PO**	PV, PO

Parasites Found in Circulating Blood			
Rings	**Trophozoites**	**Schizonts (mature)**	**Gametocytes**
Rings only (± gametocytes):**PF** Numerous:**PF** Multiply infected RBCs:**PF** Accessory chromatin dots:**PF** Delicate:**PF**	Ameboid:**PV** Compact:**PO** **PM** **PF** (rarely seen) Band form:**PM**	6-12 nuclei:**PM** 6-14 nuclei:**PO** 12-24:**PV** 8-24:**PF** (rarely seen) Rosettes:**PM**	Crescent:**PF** Round:**PV** **PO** **PM**

Legend PF: *P. falciparum* PV: *P. vivax* PO: *P. ovale* PM: *P. malariae*

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.

Table 3: Morphological Characteristics of *Plasmodium falciparum* and *Babesia* species

Characteristic		*Plasmodium falciparum*	*Babesia* species
Appearance of parasite	Size	small (1/4 to 1/3 RBC diameter, 3-5 µm)	tiny to small (1/8 to 1/4 RBC diameter, 1-5 µm)
	Shape	consistent oval to round ring	pleomorphic; pear-shaped-to-round ring
	Appliqué forms	common, either marginal or bulging forms	common, either marginal or bulging forms
	Number of chromatin dots	1 to 2	1 to many ("string of pearls")
	Multiple rings/RBC	common	common; two adjacent parasites may appear to be split into mirror images
	Tetrads	no	rarely present
Appearance of RBC		normal size and shape	normal size and shape
Parasite stages present		ring; trophozoite with pigment (in heavy infections); banana-shaped gametocytes (rarely found)	ring; late ring or trophozoite with no pigment, may contain a white central vacuole not seen in *Plasmodium*
Other characteristics		ingested pigment found in WBC	

- **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 می باشد.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 ۰/۰۵٪ یا ۱٪)

در مواردی که تعداد انگل‌ها در خون کم است می توان 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.