مریم لطفی، دانشجوی ارشد سلولی-تکوینی
دکتر طاهره ناجی، دانشیار گروه علوم پایه داروسازی دانشگاه ازاد اسلامی واحد علوم دارویی

مروری بر روش‌های تشخیص آزمایشگاهی مالاریا

شناسایی و تشخیص انگل‌های خونی از وظایف مهم آزمایشگاه به شمار می آید. در این میان تشخیص مالاریا به علت شیوع بیشتر در ایران به خصوص درنواحی شرقی وجنوب شرقی و ایجاد عوارض شدید و گاهیً مرگ، در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع، از اهمیت به سزایی برخوردار است. ازآنجایی که علایم عفونت مالاریا با سایر بیماری‌های عفونی گرمسیری مشابه است، نمی‌توان به تنهایی و با استفاده ازعلائم بالینی، آن را شناسایی کرد. بنابراین استفاده از انواع روش های آزمایشگاهی برای تشخیص و تأیید بیماری حایز اهمیت است. سعی بر آن شده در این مقاله به صورت مختصر و کاربردی، این روش ها مرور شود.

جمع آوری نمونه خون

به محض شک به بیماری مالاریا انجام خون گیری اهمیت دارد که توجه و رعایت زمان جمع آوری نمونه؛کمک شایانی به شناسایی گونه و مرحله زندگی انگل می کند.

بهترین زمان خونگیری قبل از شروع تب و فواصل بین حملات لرز است وبه دلیل عدم یافتن انگل در یک نوبت خونگیری، جمع آوری نمونه باید تا سه روز متوالی هر ٦-٨ ساعت ادامه پیدا کند. لازم به ذکر است تهیه نمونه قبل استفاده از هرگونه داروی ضد مالاریا دارای ارزش تشخیصی است. تهیه نمونه خون از دو طریق خونگیری مویرگی و وریدی امکانپذیراست، ولی استفاده از خون مویرگی ارجح است، زیرا مواد ضد انعقاد موجب تغییرات مرفولوژیکی در انگل شده به این دلیل استفاده ازخون وریدی محدود به شرایطی است که تهیه گسترش‌های مناسب با استفاده ازخون مویرگی مسیر نباشد.

در این موارد استفاده از ضد انعقاد با رعایت نسبت دقیق با خون توصیه می شود به دلیل اینکه صورت عدم رعایت این نسبت امکان شسته شدن گسترش ضخیم از روی اسلاید هنگام رنگ‌آمیزی و یا عدم رنگ‌پذیری مناسب انگل وجود دارد.

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 گیردزیرا 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.

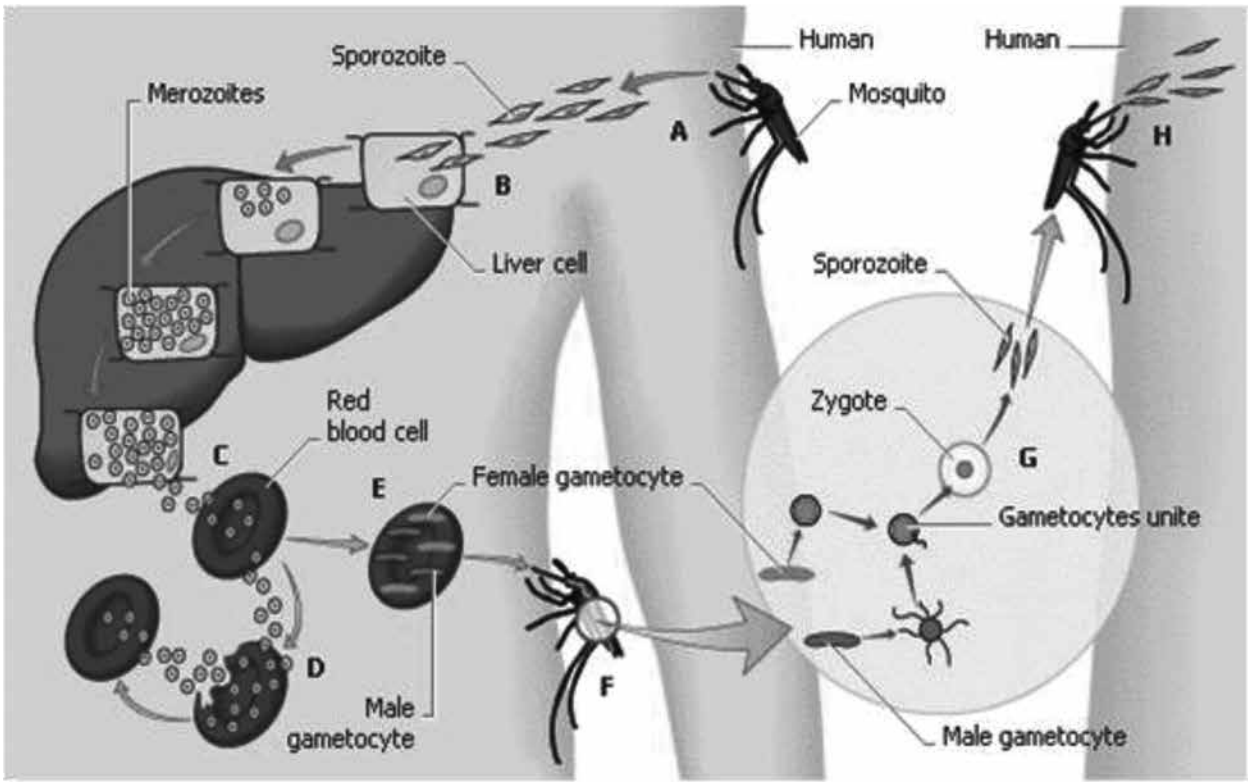
مشاهده مستقیم میکروسکوپی نمونه خون

ساده‌ترین و متداول ترین راه تشخیص انگل، مشاهده مستقیم میکروسکوپی نمونه خون است که هنوزبه عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص مالاریا کاربرد دارد. تشخیص میکروسکوپی مالاریا توسط رنگ‌آمیزی گسترش خون ضخیم و نازک روی اسلاید شیشه‌ای به دیدن انگل مالاریا منجر می‌شود.

تهیه گسترش های خونی در مالاریا به دو صورت انجام می پذیرد: ۱.ضخیم، ۲.نازک

طبق توصیه تهیه CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute) حداقل ٤ گسترش خونی از بیمار شامل دو گسترش خونی نازک و دو گسترش خونی ضخیم لازم است.

طرز تهیه گسترش های خونی نازک همانند تهیه گسترش‌های خونی معمول بوده که در آزمایشگاه ها به منظور بررسی سلول های خونی انجام می شود. 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 دردمای اتاق خشک شده و پس از خشک شدن می بایست با متانول خالص ثابت شود.

گسترش‌های خونی نازک امکان تشخیص مراحل مختلف زندگی انگل و افتراق گونه‌های مختلف فراهم می شود و در گسترش های ضخیم از آنجا که حجم زیادی از خون روی آن قرار می‌گیرد خیلی حساس‌تر از گسترش نازک است یا یک انگل بر ۲۰۰ گلبول سفید وجود دارد؛ با این وجود نیاز به تخصص و مهارت بیشتر برای مطالعه است.(μLحداقل حدود ٤٠)

گسترش‌های ضخیم می‌بایست در سطح صاف افقی و دمای اتاق خشک شده ولی ثابت نگردند.در مناطق مرطوب میتوان از انکوباکتور ۲۵سانتی گرادبرای خشک کردن گسترش ها استفاده کرد ولی استفاده از دمای ۳۷درجه سانتی گراد و حرارت به دلیل ثابت شدن گلبول های قرمز و عدم لیز کامل آنها توصیه نمی شود. در موارد اضطراری جهت تشخیص سریع می‌توان گسترش‌های ضخیم را اندکی نازک تر از معمول تهیه نمود تا در عرض یکساعت خشک شوند؛سانتریفیوز شده وبعد از برداشتن پلاسما و بافی کوت؛ از لایه های گلبولEDTAدر برخی از آزمایشگاه ها خون حاوی قرمز و پلاسمای باقیمانده گسترش نازک تهیه می شود که این روش باعث تلغیظ انگل ها و همچنین کاهش تعداد پلاکت ها در گسترش می شود. کاهش پلاکت ها امکان ایجاد خطاهای تشخیصی را کاهش می دهد.گسترش‌های تهیه شده قبل از رنگ‌آمیزی می‌بایست با متانول خالص ثابت شوند.

رنگ آمیزی گسترش‌ها ی خونی برای مالاریا

گیمسا مناسب‌ترین رنگ جهت رنگ‌آمیزی انگل‌های خونی است 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 به خوبی قابل تشخیص نیست. بافر رقیق کننده بوده که در جهت تشخیص افتراقی PH، نکته مهم در تهیه رنگ تنظیم انواع انگل های 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 گرد. به طور 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 ٤٥ دقیقه و یا ۲٪ به مدت ٦٠ دقیقه توصیه می شود.

۷/۲-۷ کیفیت نهایی PH درپایان رنگ آمیزی شستشوی اسلاید ها با بافر دارای رنگ آمیزی را بهتر می نماید.

بررسی گسترش‌های خونی تهیه شده جهت تشخیص مالاریا

تشخیص انگل‌های خونی، خصوصاً چهارگونه پلاسمودیوم که در انسان ایجاد عفونت کرده 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 شافنر، شکل و تعداد تروفوزوئیت ها 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 شود. نکته مهم در امر تشخیص، افتراق انگل از مواردی مانند پلاکت،رسوب رنگ، قارچ و یا باکتریهایی است که برروی گلبول قرمز قرار گرفته‌اند.

تعیین میزان پارازیتمی

تعیین میزان پارازیتمی قبل از شروع درمان و جهت پیگیری اثر دارو بر روی عفونت و تعیین سوش های مقاوم به داروی پلاسمودیوم فالسی پاروم ضروری است که به طور معمول قبل از درمان و ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از درمان انجام می‌گیرد. در صورت موفقیت درمان میزان پارازیتمی در عرض ٢٤ ساعت اول درمان بطور مشخص کاهش می‌یابد (تا ٥٠٪ یا بیشتر). تعیین میزان پارازیتمی به دو روش امکانپذیر است. در روش اول که فقط در گسترش‌های نازک قابل انجام بوده با حداقل مشاهده ۱۰ میدان میکروسکوپی درصدگلبول‌های قرمز آلوده به ازای شمارش ۱۰۰ گلبول قرمز گزارش می‌شود. (مثلاً ۰۵/۰٪یا۱٪). در مواردی که تعداد انگل‌ها در خون کم است می توان از روش دیگری استفاده کرد که بر روی هر دو گسترش ضخیم و نازک قابل انجام است. در این روش تعداد انگل برحسب شمارش ۱۰۰ گلبول سفید اعلام می شود. همچنین می‌توان مقدار انگل را در یک میکرولیتر خون نیز محاسبه کرد 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 انگل ها می‌توان تعداد آنها را به ازای ۲۰۰ گلبول سفید شمارش کرد.

اسمیر داخل جلدی

یکی دیگر از روش‌های تشخیص عفونت با مالاریا اسمیر داخل جلدی است که به‌وسیله سرسوزن سوراخ‌های باریکی در روی ساعد دست ایجاد می‌کنند. نباید از سوراخ خون تراوش کند ولی خونابه سرمی تحت‌تاثیر فشار روی یک لام شیشه‌ای قرار داده شده و اجازه می‌دهند، تا در معرض هوا خشک شده و سپس با متانول فیکس می‌نمایند. این اسمیر ممکن است لکوسیت‌های حاوی رنگدانه را نشان داده و نیز اشکال بالغ‌تری از پلاسمودیوم فالسیپاروم را مشخص می‌کند. گاهی اوقات انگل‌ها در گستره خون محیطی بیماران مبتلا به مالاریا یافت نمی‌شوند، اما رنگدانه مالاریا ممکن است در چرخه فاگوسیتوز در لکوسیت‌ها دیده شود، این یک نشانه شاخص از عفونت جدید مالاریا است و درمورد عفونتی که درمان کامل یا نسبی شده درغیاب انگل مشاهده می‌شود. حضور رنگدانه درلکوسیت از نظر کمی و کیفی با بار انگل در ارتباط است و ممکن نشان‌دهنده یک عفونت بالینی قابل‌توجه به‌ویژه در مناطقی که انتقال بیماری کم است باشد. زمانی که در اسمیر نازک از خون محیطی انگل وجود ندارد ممکن است در آسپیراسیون مغز استخوان یافت شود. اسمیر خون علاوه بر تشخیص مالاریا می‌تواند به لحاظ پیش آگهی بیماری هم اطلاعات مفیدی را ارائه دهد؛ تعداد انگل، تعداد فاگوسیت‌های حاوی رنگدانه و وجود اواخر مرحله غیرجنسی انگل همگی با پیش آگهی مرگبار رابطه مستقیم دارند.

روش‌های مولکولی

اجازه می دهد تا قسمت خاصی ازیک منطقه انتخاب شده از ژنوم مالاریا تکثیر یابد.این روش بسیار PCR واکنش زنجیره پلیمراز اختصاصی و حساس است و قادر به تعیین زنوتایپ است.

افزون بر این آنالیزاستفاده PCR(SNP) ،تشخیص انگل های مقاوم به دارو و نیزعفونت های مخلوط را ممکن می سازد.

روش بافی کوت کمی

یک روش برای شناسایی انگل مالاریا در خون محیطی

اســـت. این روش شـــامل رنگ‌آمیزی لایه ســـلول‌های قرمز سانتریفوژشـــده و فشرده کردن با آکریدین نارنجی تحت یک منبع نور ماوراءبنفش اســـت. به‌طـــور خلاصه خون از طریق سوراخ کردن انگشت در یک لوله هماتوکریت حاوی آکریدین نارنجـــی وضدانعقاد جمع‌آوری می‌گـــردد. لوله هماتوکریت را ۱۲۰۰۰ دور در ۵ دقیقـــه ســـانتریفیوژ می‌کنند و بلافاصله با استفاده ازمیکروسکوپ مجهز به یک منبع نور یو وی مورد بررسی قرار می دهند. هســـته انگل به رنگ فلورسانس سبز روشن و سیتوپلاسم آن به رنگ زرد نارنجی مشاهده می‌شود. این آزمایش از لحاظ حساسیت شبیه به روش میکروسکوپی اســـلاید خون ضخیم معمولی است و باید همراه با گسترش ضخیم خون برای غربالگری استفاده شود.

QBCابزار دقیق تخصصی بوده و در تعیین گونه و تعداد انگل ضعیف عمل می کند.

روش‌های سرولوژی

تست‌های سرولوژیکی برای تشخیص عفونت مالاریا بر اساس شناسایی آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه مراحل غیرجنسی خونی از انگل مالاریا استوار می‌باشند. اولین آزمون سرولوژیکی مورد استفاده برای تشخیص آنتی‌بادی مالاریا روش ایمونوفلورسانس است. در این روش از آنتی‌ژن ویژه و یا آنتی‌ژن خام آماده چسبانده شده درروی یک اسلاید که در ۳۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه داشته شده است استفاده می‌شود و به روش کمی هردو انتی بادی IgM وIgG در نمونه های سرم بیمار را بررسی می کنند. تیتر بالاتر از ۱:۲۰ مثبت و آنهائی‌که کمتر از ۱:۲۰ هستند مشکوک و یا با اهمیت کم طبقه‌بندی می‌شوند. تیترهای بالاتر از ۱:۲۰ دلیل محکمی بر عفونت جدید می‌باشد. تست‌های سرولوژی عفونت مالاریا یا سابقه عفونت را تأیید می‌کند ودر بررسی‌های اپیدمیولوژی و غربالگری نمونه‌های خون جمع‌آوری‌شده برای بانک‌های خون مفید هستند، بااین وجود، ابزارهای لازم برای روش‌های سرولوژیکی جهت تشخیص عفونت حاد مالاریا محدود بوده و با توجه به تأخیر درتولید آنتی‌بادی‌ها، عدم تأیید گونه و نیاز به میکروسکوپ فلورسنس مشکل است.

روش‌های سریع

(HRP-II) تشخیص آنتی‌ژن‌های انگل مالاریا در نمونه‌های انسانی مالاریا، نظیر هیستیدین غنی از پروتیین ۲ که بر اساس روش ایمونوکروماتوگراف point-of-careرا می توان با آزمایش سریع (pLDH) یا لاکتات دهیدروژناز پلاسمودیوم می باشد را انجام داد.

به صورت تجاری در Para Sight F Paracheck NOW, Binax و OptiMALبیشتر آزمایش های سریع دسترس است.

مزایای استفاده از این تست‌ها، سریع بودن و حساسیت بالای آنها است. معایب آن‌ها نیز هزینه کما بیش بالا، ناتوانی در تشخیص بعضی از گونه‌های مالاریا و تنوع زیاد محصولات آن‌ها است.

کشت انگل مالاریا

از روش‌های دیگر تشخیصی بیماری مالاریا می‌توان به کشت انگل مالاریا به صورت زنده و تشخیص پس از مرگ از طریق تشخیص انگل‌های مالاریا و یا مشاهده رنگدانه در لوکوسیت‌ها در کالبدشکافی از طریق بیوپسی بافت‌ها از نمونه مغز، طحال و اسمیر نازک استخوان اشاره کرد.

نتیجه گیری

تشخیص مالاریا توسط میکروسکوپ معمولی روش استاندارد طلایی برای تشخیص مالاریا باقی مانده، اگرچه این روش نیازمند پرسنل ماهر بوده و ممکن است حساسیت پایین‌تر ازتکنیک‌های مولکولی را داشته باشد اما ارزان و قابل‌اعتماد است.

تست‌های تشخیصی سریع، گران می‌باشند.تکنیک‌های مولکولی بهتر است در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی برای شناسایی گونه‌ها ودر زمانی که تعداد انگل بسیار کم است و یا نمونه‌ها که در معرض از بین رفتن قرار گرفته‌اند مفید باشند. روش سرولوژی بهترین روشی است که به‌عنوان یک ابزار اپیدمیولوژیک استفاده می‌شود و مناسب برای تشخیص مالاریای حاد نیست. انتخاب یک تست تشخیصی مناسب برای مالاریا؛ با سطح بومی بودن مالاریا،ضرورت تشخیص و دردسترس بودن پرسنل و منابع مالی مشخص در نظر گرفته شود.