

خلیل خندان، کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز بهداشت مشگین شهر، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
 داود کاظمی جیدرقی، کارشناس علوم آزمایشگاهی، بیمارستان ولیعصر مشگین شهر، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
 نادر نوری، کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز بهداشت مغان (گرمی)، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

روش‌های متداول تشخیص آزمایشگاهی عفونت مالاریا

که در بررسی اپیدمیولوژیک استفاده می‌شود، و مناسب برای تشخیص مالاریای حاد نیست.

مشاهده مستقیم میکروسکوپی نمونه خون

ساده‌ترین راه تشخیص انگل، مشاهده مستقیم میکروسکوپی نمونه خون برای دیدن انگل مالاریا بوده، که هنوز استاندارد طلایی برای تشخیص مالاریا است. تشخیص میکروسکوپی مالاریا با رنگ‌آمیزی گسترش خون ضخیم و نازک روی اسلاید شیشه‌ای، به دیدن انگل مالاریا منجر می‌شود. به‌طور خلاصه، انگشت بیمار با الکل تمیز، بعد خشک می‌شود و سپس در سمت نوک انگشتان با یک لانس استریل نوک‌تیز و یا سوزن، دو قطره خون بر روی یک لام شیشه‌ای قرار داده می‌شود. برای آماده‌سازی یک لام خون غلیظ، یک قطره خون در یک حرکت دایره‌ای با گوشه‌ای از لام هم زده می‌شود. باید مراقب بود تا هنگام آماده‌سازی، نمونه بیش‌ازحد ضخیم نباشد و نیز باید اجازه دهیم تا بدون افزودن مواد ثابت‌کننده خشک گردد. از آنجاکه گلبول‌های قرمز فیکس نشده‌اند با استفاده از قطره آب لیز می‌شوند. برای گسترش لام خونی نازک بلافاصله با لبه صاف از یک لام دیگر قطره خون را با زاویه ۴۵ درجه بین لام و سطح قطره بهم می‌زنیم و سپس لکه خون را با حرکات رفت و برگشت سریع و یکنواخت در امتداد سطح لام تهیه می‌کنیم. بعد از آن این لام باید در مقابل هوا خشک شده و با متانول فیکس گردد. از آنجا که حجم زیادی از خون روی گسترش ضخیم قرار می‌گیرد بنابراین گسترش ضخیم خیلی حساس‌تر از گسترش نازک است.

مالاریا مهم‌ترین عفونت انگلی انسان بوده و باعث مرگ‌ومیر زیاد در بسیاری از مناطق گرمسیری جهان می‌شود. در کودکان مراجعه‌کننده به بیمارستان با آلودگی شدید با مالاریا، میزان مرگ‌ومیر ۳۰-۱۰ درصد گزارش شده است، اگرچه این میزان در مناطق روستایی و دورافتاده که در آن تشخیص و درمان به‌آسانی در دسترس نیست بالاتر نیز هست. تشخیص دقیق عفونت مالاریا به‌منظور کاهش عوارض شدید و مرگ‌ومیر بسیار مهم است. عفونت مالاریا را نمی‌توان با استفاده از علائم بالینی شناسایی کرد، به‌ویژه اینکه علائم آن با سایر بیماری‌های عفونی گرمسیری مشابه است، بنابراین بایستی از روش آزمایشگاهی آن را تشخیص داده و تأیید کرد. این مقاله به روش‌های موجود در آزمایشگاه‌های مختلف در دسترس برای تأیید عفونت مالاریا تمرکز دارد. انتخاب یک تست تشخیصی مناسب برای تشخیص مالاریا باید با سطح بومی بودن گونه‌های انگل مالاریا، ضرورت تشخیص و در دسترس بودن پرسنل و منابع مالی مشخص در نظر گرفته شود. تشخیص مالاریا با میکروسکوپ معمولی روش استاندارد طلایی برای تشخیص مالاریا باقی مانده است. اگرچه این روش نیازمند پرسنل بسیار ماهر بوده و ممکن است حساسیت پایین‌تر از تکنیک‌های مولکولی جدید را داشته باشد با این حال ارزان و قابل‌اعتماد است. تست‌های تشخیصی سریع، گران‌قیمت بوده ولی سریع و راحت هستند. تکنیک‌های مولکولی بهتر است در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی مناسب، و نیز گسترش مقاومت به دارو و عود را بررسی نمایند و می‌توانند برای شناسایی گونه‌ها در زمانی که تعداد انگل بسیار کم است، و یا در برخی از نمونه‌ها که در معرض از بین رفتن قرار گرفته‌اند مفید باشند. روش سرولوژی بهترین روشی است

اسمیر داخل جلدی

یکی دیگر از روش‌های تشخیص عفونت با مالاریا اسمیر داخل جلدی است، که به وسیله سرسوزن اندازه ۲۵ سوراخ‌های باریکی در روی ساعد دست ایجاد می‌کنند. نباید از سوراخ خون تراوش کند ولی خونابه سرمی تحت تاثیر 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.

از روش‌های رنگ‌آمیزی برای اسلاید خون شرح داده شده برای تشخیص مالاریا، رنگ‌آمیزی گیمسا به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه، رنگ‌آمیزی لیشمن به مدت ۴۵ دقیقه،

و روش سریع صحرائی به مدت ۱۰

ثانیه طول می‌کشد. با استفاده

از میکروسکوپ‌های

نوری، گونه‌ها و مراحل

مرفولوژیکی از انگل

گزارش شده است.

گاهی 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. حضور رنگدانه در لکوسیت از نظر

کمی و کیفی با بار انگل در ارتباط است و بنابراین نشان‌دهنده

یک عفونت بالینی قابل توجه به‌ویژه در مناطقی می‌باشد که

انتقال بیماری کم است. نیز زمانی که در اسمیر نازک از خون

محیطی انگل وجود ندارد ممکن است در اسپیراسیون مغز

استخوان یافت شود. اسمیر خون علاوه بر تشخیص مالاریا

می‌تواند به لحاظ پیش‌آگهی بیماری هم اطلاعات مفیدی را

ارائه دهد؛ تعداد انگل، تعداد فاگوسیت‌های حاوی رنگدانه

و وجود اواخر مرحله غیرجنسی انگل همگی با پیش‌آگهی

مرگبار رابطه مستقیم دارند.

روش‌های مولکولی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) اجازه می‌دهد تا قسمت خاصی از یک منطقه انتخاب‌شده از ژنوم مالاریا تکثیر یابد. این روش بسیار اختصاصی و حساس است (۵-۱ انگل بر یک میلی‌لیتر خون) و قادر به تعیین ژنوتایپ است. علاوه بر این آنالیز استفاده از PCR(SNP) تشخیص انگل‌های مقاوم به دارو و نیز عفونت‌های مخلوط را ممکن می‌سازد.

روش‌های سریع

تشخیص آنتی‌ژن‌های انگل مالاریا در نمونه‌های انسانی مالاریا، نظیر هیستیدین غنی از پروتئین ۲ (HRP-II) یا لاکتات دهیدروژناز پلاسمودیوم (pLDH) را می‌توان با آزمایش سریع point-of-care انجام داد، که

بر اساس روش ایمونوکروماتوگرافی

می‌باشد. بسیاری از آزمایش‌های

سریع به صورت کیت تجاری

در دسترس می‌باشد.

از این میان، می‌توان از

Para- Para Sight F

check ,Binax ,NOW

و OptiMAL ، نام برد.

مزایای استفاده از این

تست‌ها سریع بودن و

حساسیت بالای آنها است.

معایب آنها نیز هزینه‌ی

بالا، ناتوانی در تشخیص بعضی

از گونه‌های مالاریا و تنوع زیاد فرآورده‌ها

است. تست‌های بر پایه تشخیصی HRP II، می‌تواند

نتایج مثبت در فاز نقاهت بیماری بدهد، انهم به دلیل باقی

ماندن HRP II در خون بعد از پاک شدن انگل است.

روش بافی کوت کمی

(Quantitative buffy coat method =QBC)

یک روش برای شناسایی انگل مالاریا در خون محیطی

است. این روش شامل رنگ‌آمیزی لایه سلول‌های قرمز

سانتریفوژشده، و فشرده کردن با آکریدین نارنجی تحت

یک منبع نور ماوراءبنفش می‌باشد. به‌طور خلاصه خون از

طریق سوراخ کردن انگشت در یک لوله هماتوکریت حاوی



در لوکوسیت‌ها در کالبدشکافی از طریق بیوپسی بافت‌ها از نمونه مغز، طحال و اسمیر نازک استخوان اشاره کرد.

منابع:

1. Chotivanich Kesinee, Silamut Kamolrat, Day Nicholas: Laboratory diagnosis of malaria infection- A short review of methods. N Z J Med Lab Sci 61 (1)2007.
2. Silamut K, White NJ. Relation of the stage of parasite development in the peripheral blood to prognosis in severe falciparum malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993; 87: 436-43.
3. White NJ, Silamut K. Rapid diagnosis of malaria. Lancet 1989; 8635: 435.
4. Sheikh NS, Sheikh AS, Hussain SI, Sheikh AA. Utility of thick smears of bone marrow aspirate in pyrexia of unknown origin. J Coll Physicians Surg Pak 2003; 13: 577-80.
5. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1993; 61: 315-20.
6. Färnert A, Arez AP, Babiker HA, Beck HP, Benito A, Björkman A, et al. Genotyping of Plasmodium falciparum infections by PCR: a comparative multicentre study. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95: 225-32.
7. Imwong M, Pukrittakayamee S, Looareesuwan S, Pasvol G, Poirreiz J, White NJ, et al. Association of genetic mutations in Plasmodium vivax dhfr with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine: geographical and clinical correlates. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 3122-7.
8. Shiff CJ, Minjas J, Premji Z. The ParaSight-F test: a simple rapid manual dipstick test to detect Plasmodium falciparum infection. Parasitol Today 1994; 10: 494-5.
9. Shiff CJ, Premji Z, Minjas JN. The rapid manual ParaSight-F test. A new diagnostic tool for Plasmodium falciparum infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993; 87: 646-8.
10. Moody A, Hunt-Cooke A, Gabbett E, Chiodini P. Performance of the OptiMAL malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. Br J Haematol 2000; 109:891-4.
11. Moody AH, Chiodini PL. Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. Br J Biomed Sci 2002; 59: 228- 31.
12. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 66-78.
13. Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C. Rapid diagnostic testing for malaria. Trop Med Int Health 2003; 8: 876-83.
14. Baird JK, Purnomo, Jones TR. Diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy of QBC capillary tubes. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86: 3-5.
15. Voller A. The immunodiagnosis in malaria. In: Wernsdorfer WH, Mc Gregor I. eds. Malaria Principles and practise of malariology. Churchill Livingstone, Edinburgh, Scotland; 1998, 815-25.
16. Chotivanich K, Silamut K, Udomsangpetch R, Stepniewska KA, Pukrittakayamee S, Looareesuwan S, et al. Ex-vivo short-term culture and developmental assessment of Plasmodium vivax. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95: 677-80.

آکریدین نارنجی و ضدانعقاد جمع‌آوری می‌گردد. لوله هماتوکریت را ۱۲۰۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنند، و بی درنگ با استفاده از میکروسکوپ مجهز به یک منبع نور UV بررسی می‌شود. هسته انگل به رنگ فلورسانس سبز روشن و سیتوپلاسم آن به رنگ زرد نارنجی مشاهده می‌شود. این آزمایش از نظر حساسیت همسان روش میکروسکوپی اسلاید خون ضخیم معمولی است، و باید همراه با گسترش ضخیم خون برای غربالگری استفاده شود، با این حال QBC نیازمند ابزار دقیق تخصصی است، و با اینکه دارای هزینه بسیار بالاتری از روش‌های میکروسکوپی، ولی ضعیف‌تر در تعیین گونه و تعداد انگل است.

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 (IFA) می‌باشد. در این روش از آنتی‌ژن ویژه و یا آنتی‌ژن خام آماده چسبانده شده در روی یک اسلاید، که در ۳۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه داشته شده است، استفاده می‌شود و به روش کمی هر دو آنتی‌بادی IgG و IgM در نمونه‌های سرم بیمار را بررسی می‌کنند. تیترا بالاتر از ۱:۲۰ مثبت، و آنهایی که کمتر از ۱:۲۰ هستند مشکوک و یا با اهمیت کم طبقه‌بندی می‌شوند. تیتراهای بالاتر از ۱:۲۰ نشان استواری بر عفونت تازه است. تست‌های سرولوژی عفونت مالاریای سابق، یا سابقه عفونت را تأیید می‌کند، و در بررسی‌های اپیدمیولوژی و غربالگری نمونه‌های خون جمع‌آوری شده برای بانک‌های خون مفید هستند. با این وجود، ابزارهای لازم برای روش‌های سرولوژیکی جهت تشخیص عفونت حاد مالاریا محدود است. تأخیر در تولید آنتی‌بادی‌ها، ناتوانی در شناخت گونه، و نیاز به میکروسکوپ فلورسانس (UV)، چالش‌های تشخیص 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