

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



بسته آموزشی

اصول و مبانی تشخیص آزمایشگاهی مالاریا با تکیه بر تضمین کیفیت

تهیه و تدوین :

رضا باقری

کارشناس آزمایشگاه مرکز بهداشت استان

عضو گروه مرجع کشوری تشخیص میکروسکوپی مالاریا (NCG)

زیر نظر

دکتر مهدی پارسایی

دکترای تخصصی (PhD) انگل شناسی پزشکی

اردیبهشت ۱۴۰۲

بسته آموزشی

اصول و مبانی تشخیص آزمایشگاهی مالاریا با تکیه بر تضمین کیفیت

این مجموعه در راستای مبانی تشخیص مالاریا در آزمایشگاه، در گروه کارشناسان آزمایشگاه مرکز بهداشت استان آذربایجان شرقی با مشارکت و همکاری افراد زیر تهیه و تدوین گردیده است :

۱. دکتر مهدی پارسایی (کارشناس مسئول آزمایشگاه - پست سازمانی : کارشناس مسئول آزمایشگاه)

۲. رضا باقری (کارشناس آزمایشگاه - پست سازمانی : کارشناس آزمایشگاه)

با قدردانی از همکاری صمیمانه کارشناسان آزمایشگاه های تابعه معاونت بهداشتی استان آذربایجان شرقی

تاریخ تهیه بسته آموزشی : اردیبهشت ماه سال ۱۴۰۲

گروه های هدف:

کاردان، کارشناس، کارشناس ارشد، دکترای علوم آزمایشگاهی، دکترای تخصصی (PhD) رشته های مرتبط علوم آزمایشگاهی

اهداف آموزشی:

هدف کلی:

افزایش دانش و آگاهی پرسنل آزمایشگاه های بهداشتی در مورد اصول و مبانی تشخیص آزمایشگاهی مالاریا با تکیه بر تضمین کیفیت می باشد.

روش و نحوه اجرای آموزش:

با توجه به اینکه هدف این مجموعه آموزشی افزایش دانش و آگاهی کارکنان در مورد اصول تشخیص آزمایشگاهی مالاریا می باشد، بنابراین می تواند جهت ارائه بهتر مطالب به روش حضوری در قالب کارگاه آموزشی و عملی ارائه شود و یا جهت پوشش تعداد بیشتری از آموزش گیرندگان بصورت غیرحضوری و در قالب کتابخوانی انجام گیرد.

مدت دوره آموزشی : ۲۴ ساعت

ارزشیابی :

در پایان دوره بمنظور ارزیابی میزان حصول موفقیت و دستیابی به اهداف آموزشی و بررسی آگاهی، نگرش و عملکرد آموزش گیرندگان و بهبود مستمر فرآیند، یک ارزشیابی از شرکت کنندگان بصورت تست های چهارگزینه ای بعمل خواهدآمد.

فهرست

*فصل اول: مالاریا

تاریخچه.....	۶
چرخه زندگی.....	۹
چرخه زندگی انگل در بدن انسان.....	۱۰
پدیده ظهور مجدد.....	۱۱
چرخه زندگی انگل در بدن پشه.....	۱۲
جدول افتراقی گونه های مهم فالسی پاروم.....	۱۶
علائم و بیماری زایی.....	۲۲
عوارض پلاسمودیوم فالسی پاروم.....	۲۳
آسیب زایی مالاریا.....	۲۶
ایمنی.....	۲۶
اپیدمیولوژی.....	۲۷
اصطلاحات کاربردی مرتبط با اپیدمیولوژی مالاریا.....	۲۹
مالاریا در جهان.....	۳۰
گزارش سال ۲۰۲۲ سازمان بهداشت جهانی درباره مالاریا.....	۳۰
مالاریا در منطقه مدیترانه شرقی (EMR).....	۳۲
مالاریا در ایران.....	۳۲
برنامه حذف مالاریا.....	۳۵
تشخیص مالاریا.....	۳۶
روش های مختلف تشخیص مالاریا.....	۳۸
تشخیص بالینی مالاریا.....	۳۸
تشخیص میکروسکوپی مالاریا.....	۳۹
استفاده از فلوروکروم ها.....	۴۲
تست های تشخیص سریع (RDT).....	۴۳
روش های تشخیص سرولوژی.....	۴۶
روش PCR.....	۴۷
کاربرد PCR در مالاریا.....	۴۸
دیاگرام درمان مالاریا.....	۵۰
جدول داروهای ضد مالاریا.....	۵۱

- کنترل و پیشگیری مالاریا..... ۵۴
- پلاسمودیوم های حیوانی..... ۵۴

***فصل دوم: تشخیص و مورفولوژی انگل های مالاریا**

- مرحله تروفوزوئیت..... ۵۸
- مرحله شیزونت..... ۵۸
- مرحله گامتوسیت..... ۵۹
- مشخصات کلی پلاسمودیوم فالسی پاروم..... ۶۰
- مشخصات کلی پلاسمودیوم ویواکس..... ۶۲
- مشخصات کلی پلاسمودیوم مالاریه..... ۶۵
- مشخصات کلی پلاسمودیوم اووال..... ۶۶
- تشخیص آزمایشگاهی..... ۶۷
- شمارش انگل های مالاریا در گسترش خون..... ۸۱

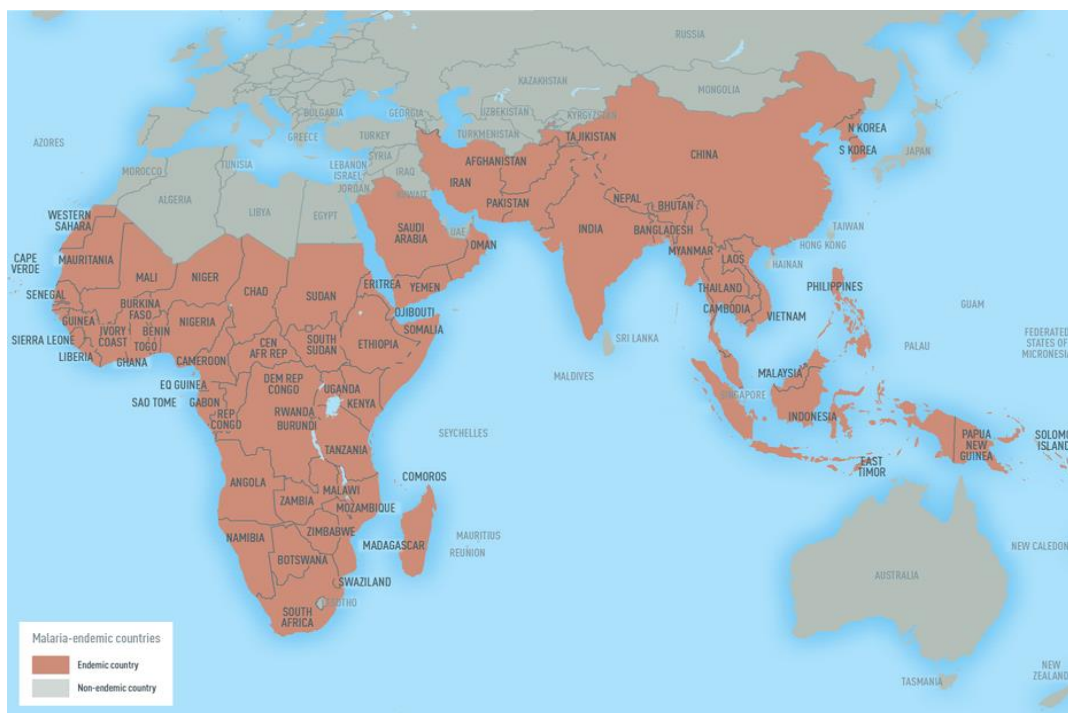
مالاریا (Malaria)

تاریخچه

کلمه مالاریا در قرن هفدهم در ایتالیا برای اولین بار بکار رفت که مرگ بیماران را ناشی از هوای بد مناطق باتلاقی می دانستند (بد = mal و هوا = Aria). از بیماری مالاریا تحت عناوین تب نوبه، پالودیسیم، تب گرمسیری، تب جنگل، تب مرداب یاد می شود.

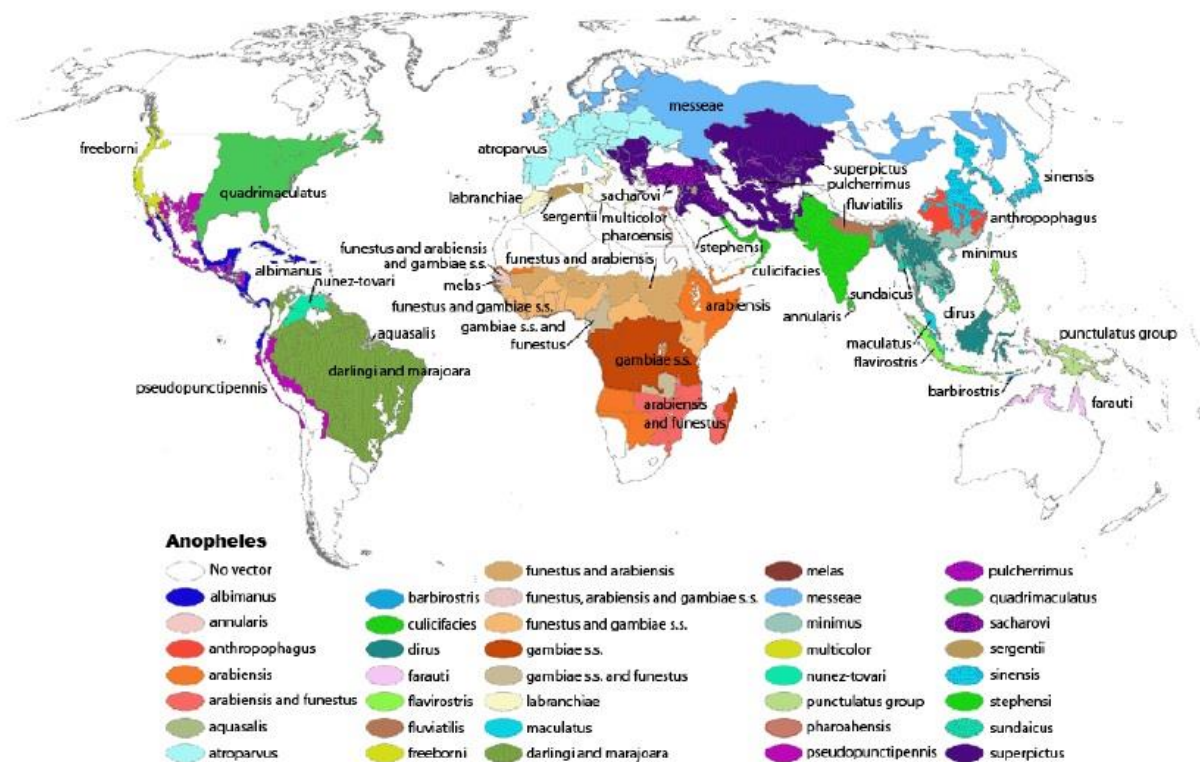
- ✓ در کتاب اوستا و هزار سال قبل ابوعلی سینا به تب و لرز و تب نوبه اشاره کرده است.
- ✓ واژه های سه یک خوش خیم و بدخیم اولین بار توسط بقراط بکار رفته است.
- ✓ پلاسمودیوم مالاریه برای اولین بار توسط Laveran، پلاسمودیوم فالسیپاروم توسط Celli و Marchiafava و پلاسمودیوم ویواکس توسط Golgy و پلاسمودیوم اووال توسط Stephens شرح داده شدند.
- ✓ انتقال بیماری مالاریا توسط پشه آنوفل به وسیله Patrich Manson آشکار شد.
- ✓ Shortt اشکال غیرجنسی پلاسمودیوم و ویواکس و فالسیپاروم را در داخل کبد انسان شرح داد.
- ✓ کشت مداوم پلاسمودیوم فالسیپاروم توسط Trager و Jensen انجام گرفت.
- ✓ کشف عود در پلاسمودیوم ها توسط Krotoski مطرح شد.

شکل ۳۶-۱: توزیع جغرافیایی مالاریا در جهان





توزیع جغرافیایی انواع پشه آنوفل در جهان



چهار گونه پلاسمودیوم انگل انسان هستند، که عبارتند از :

- (۱) پلاسمودیوم ویواکس (تب سه یک خوش خیم یا تب و لرز یک روز در میان)
- (۲) پلاسمودیوم مالاریه (تب چهار یک خوش خیم یا تب و لرز ۲ روز در میان)
- (۳) پلاسمودیوم فالسیپاروم (مالاریای تابستانی - پاییزی یا چهار یک بدخیم)
- (۴) پلاسمودیوم اووال (تب سه یک خوش خیم)

آمار آلودگی با پ. ویواکس از همه بیشتر و پس از آن پ. فالسیپاروم قرار دارد. گونه های دیگری از پلاسمودیوم در انواع میمونها و پرندگان و جوندگان ممکن است ایجاد بیماری نمایند که به قرار زیر است:

✓ مالاریای میمونها: *P.knowlesi*, *P.cynomolgi*, *P.inui*, *P.simum*, *P.rodhaini*, *P.brasilianum*, *P.coatneyi* (آلودگی انسان به نوع سینومولوژی تنها در سفید پوستان و نولزی، اینوئی و برازیلیانوم در سفید و سیاه پوستان و کوتنئی گزارش شده است).

✓ مالاریای پرندگان: *P.cathemerium*, *P.gallinaceum*, *P.relictum*, *P.lophure* و *P.elongatum*

✓ مالاریای جوندگان: *P.vinckeia*, *P.yoelli*, *P.chabaudi* و *P.berghei*

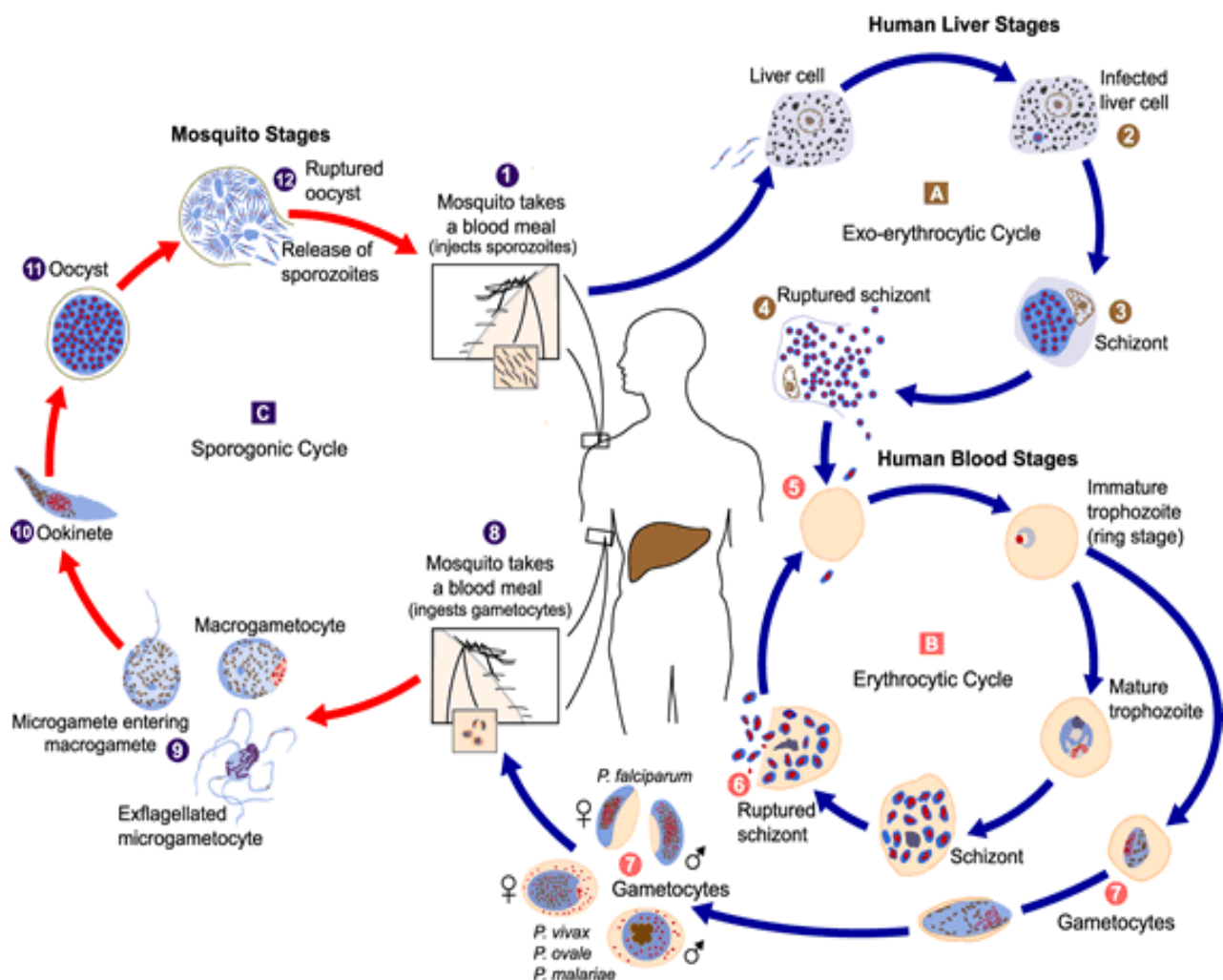
انگل مالاریا در شاخه ای کمپلکسا، تحت شاخه اسپوروزوآ تحت رده کوكسیدیا، راسته ائوكوكسیدیا، تحت راسته هموسپورینا و جنس پلاسمودیوم واقع شده است. جنس پلاسمودیوم به ۲ زیر جنس پلاسمودیوم و لاورانیا تقسیم می شود.

به غیر از پ. فالسیپاروم و پ. ریچینوری (انگل شپانزه) که در زیر جنس لاورانیا هستند بقیه در زیر جنس پلاسمودیوم طبقه بندی می شوند. در زیر راسته هموسپورینا علاوه بر خانواده پلاسمودییده خانواده هموپروتوئیده (هموپروتئوس با گامتوسیت موزی و هپاتوسیتیس با گامتوسیت گرد) و خانواده لکوسیتوزوئیده قرار دارند که تنها خانواده پلاسمودییده برای انسان بیماری زا است. انگل مالاریای پرندگان در زیر جنس هماموبا و مالاریای خزندگان در زیر جنس سائورابا قرار گرفته اند.

چرخه زندگی

مالاریای انسانی جزء انگل های ۲ میزبانه اجباری (اختصاصی) (Obligatory-heteroxenous-parasite) و در میزبان های مهره دار و بدون مهره (متازئوزوز) زندگی می کند. پلاسمودیوم برخلاف توکسوپلاسما از نظر میزبان تا حد زیادی اختصاصی عمل می کنند.

سیکل جنسی که فاز خارجی (Extrinsic phase) نامیده می شود در بدن پشه آنوفل ماده (میزبان بدون مهره) و سیکل غیرجنسی که فاز داخلی (Intrinsic phase) نامیده می شود در بدن انسان (میزبان مهره دار) انجام می شود. در بدن پشه آنوفل ماده که نقش میزبان نهایی و ناقل را دارد، انگل به روش اسپوروگونی (جنسی) تکثیر یافته و در بدن انسان که میزبان واسط است تکثیر به روش شیزوگونی (غیرجنسی) اتفاق می افتد.



شکل ۳۸-۱: چرخه زندگی پلاسمودیوم های انسانی

چرخه زندگی انگل در بدن انسان (سیکل غیرجنسی)

پشه آنوفل ماده در موقع خونخواری اشکال آلوده کننده (اسپوزوئیت) موجود در غدد بزاق را توسط نیش زدن وارد بدن میزبان واسط (انسان سالم) می کند. در حین نیش زدن همراه آنزیم اپی مراز مواد آنتی کواگولانت (ضد انعقاد) وارد خون محیطی شده، نیم الی یکساعت بعد اسپوزوئیتها از گردش خون خارج و خود را به سلولهای پارانشیم کبد (سلول های مکعبی شکل) می رسانند و شروع به انجام شیزوگونی (schizogony) (کبدی (نسجی) می نمایند. بسیاری از انگل ها در کبد دچار فاگوسیتوز شده و از بین می روند. رنگدانه های مالاریا در سلول های پارانشیم کبد دیده نمی شوند.

هنگام ورود، اسپوزوئیتها ابتدا شکل گرد به خود می گیرند که به آنها تروفوزوئیت جوان گویند. تقسیم هسته انگل به روش شیزوگونی آغاز شده و منجر به تشکیل شیزونت نارس می شود. در ادامه سیتوپلاسم تقسیم شده و شیزونت رسیده ایجاد می شود که حاوی ۲ الی ۱۰ هزار مروزوئیت است (تعداد مروزوئیت های نسجی در گونه پ. فالسیپاروم ۳۰ هزار، در پ. اوال، پ. مالاریه ۱۵ هزار و در پ. ویواکس حدود ۱۰ هزار). به این دوره از شیزوگونی نسجی مرحله پیش گلبول قرمزی (pre erythrocytic cycle) یا شیزوگونی خارج گلبولی اولیه (primary exorythrocytic schizogony) می گویند. به دوره شیزوگونی نسجی (کبدی) دوره نهفته نیز گویند. در پ. اووال و پ. ویواکس گاهاً ممکن است شیزوگونی خارج گلبولی (شیزوگونی نسجی ثانویه) دوباره اتفاق افتاده و منجر به بازگشت بیماری شود که به این حالت عود (relapse) یا ریکارنس گویند. به انگلی که در نسج کبد به کندی رشد کرده و عود می کنند سلول خفته یا شیزوزوئیت گویند. فاصله های عود مکرر در مناطق معتدله (سویه الیزابت) طولانی و تعداد موارد کمتر ولی در مناطق گرمسیر (سویه چسن) تعداد موارد عود زیاد و فاصله آنها کوتاهتر است.

شیزوگونی نسجی ثانویه ۲ هفته پس از آغاز عفونت شروع و تا ۹ ماه بعد نیز می تواند ادامه یابد. در مراحل شیزوگونی خونی، مروزوئیت ها در خون رها شده و توسط کونوئیدهای خاردار به سطح غشاء RBC متصل شده و وارد سلول می شوند. در محل اتصال انگل با غشای گلبول قرمز حفره انگلی به نام واکوئل پارازیتوفوروس در داخل گلبول قرمز در مدت زمان حدود ۱۰ تا ۳۰ ثانیه تشکیل می شود. با اتصال انگل به دیواره RBC اشکال آپلیکه یا آکول دیده می شوند. انگل پس از ورود به داخل گلبول قرمز شکل رینگ (انگستر) به خود می گیرد به طوری که با رنگ آمیزی رومانوفسکی هسته رینگ به رنگ قرمز و سیتوپلاسم (حلقه انگستر) به رنگ آبی مشاهده می شود. در وسط رینگ منطقه شفافی موسوم به واکوئل غذایی قرار دارد. به این نوع رینگ تروفوزوئیت جوان گویند. بعد از مدتی انگل داخل گلبول طی رشد به تروفوزوئیت پیر تبدیل و آماده تقسیم هسته (Segmentation) می شود. قبل از تولید مروزوئیت ها یک دسته از اجسام گرد یا تخم مرغی شکل موسوم به اجسام آبی که شامل رنگدانه های ارغوانی کروماتینی می باشند، ایجاد می شوند.

هسته موجود در انگل شروع به تقسیم کرده و در حالی که هنوز سیتوپلاسم تقسیم نشده تبدیل به شیزونت نارس می شود. سپس سیتوپلاسم قطعه قطعه شده و اطراف هسته های جدید را فراگرفته و به شیزونت رسیده تبدیل می شود. به انگل های داخل شیزونت مروزوئیت (merozoites) یا کریپتوزوئیت گفته می شود. بسته به گونه پلاسمودیوم تعداد مروزوئیت ها متفاوت می باشند. شیزونت پلاسمودیوم ویواکس حاوی ۱۲-۲۴ عدد، پلاسمودیوم فالسیپاروم حاوی ۱۶-۳۲ عدد، پلاسمودیوم مالاریه حاوی ۶-۱۲ عدد و پلاسمودیوم اووال حاوی ۶-۱۴ عدد مروزوئیت می باشد.

پدیده ظهور مجدد

در شیزوگونی خونی برخلاف شیزوگونی نسجی پدیده relapse یا عود اتفاق نمی افتد بلکه پدیده ای موسوم به بازگشت (ظهور مجدد) (Recrudescence) در ارتباط با پ. مالاریه و پ. فالسیپاروم وجود دارد. در این حالت به علت درمان ناقص یا مصونیت نسبی و مقاومت انگل، در خون تعداد انگل کم شده و به نظر می رسد که انگل از خون پاک شده است ولی تعدادی از انگل ها دوباره فعال و باعث بروز علائم می شوند. پدیده ظهور مجدد در پلاسمودیوم مالاریه در صورت عدم درمان یا درمان ناقص انگل ها، گاهی پس از ۲۰ سال اتفاق می افتد. در مالاریای اووال و ویواکس ممکن است علاوه بر عود، ظهور مجدد نیز اتفاق بیفتد. بعد از ۳ تا ۴ نسل شیزوگونی خونی، پدیده گامتوسیتوز رخ می دهد که در آن تعدادی از مروزوئیت ها وارد گلبول قرمز شده و به گامتوسیت ها تبدیل می شوند. گامتوسیت های موجود در خون شخص مبتلا به عنوان مخزن عفونت عمل کرده و زمانی که فرد مورد گزش پشه آنوفل ماده قرار می گیرد باعث ادامه سیکل جنسی یا اسپوروگونی در بدن پشه می شود.



شکل ۳۹-۱: سمت چپ مروزوئیت پلاسمودیوم در حال ورود به سلول خونی میزبان، سمت راست اووسیت پلاسمودیوم در پشه

ورود اسپروزوئیت ها بدخل سلولهای پارانشیم کبد توسط پروتئین موجود در بخش راپتری اسپروزوئیت (Circumsporozoite) صورت می گیرد. دوره شیزوگونی نسجی پ. پلاسمودیوم ویواکس ۷-۸ روز، پ. فالسیپاروم ۷-۵/۵ روز، پ. مالاریه ۱۶-۱۳ روز و پ. اووال ۹ روز می باشد. ظهور مجدد منشاء خونی دارد ولی عود منشاء نسجی

دارد. اشکال گامتوسیتی از وجوه افتراق گونه های پلاسمودیوم است. به گامتوسیت هایی که آمادگی لازم را جهت لقاح در میزبان نهایی دارند Good Infector و اگر قابلیت انجام لقاح را نداشته باشد Poor-Infector گویند.

گامتوسیت های پلاسمودیوم فالسیپاروم نسبت به سایر پلاسمودیوم ها مدت طولانی تری در خون انسان باقی می ماند (حدوداً ۴ هفته). گامتوسیت های پلاسمودیوم اووال و فالسیپاروم دیرتر از بقیه در خون محیطی ظاهر می شوند (۱ هفته بعد شیزوگونی خونی). پدیده عود (relapse) گاهاً در پلاسمودیوم های یوئلی، سینومولگی، سیمی اووال و فیلدی نیز دیده می شود. پلاسمودیوم نولزی، پلاسمودیوم اینوئی، پلاسمودیوم رودهینی و برازیلیانوم شبیه پلاسمودیوم مالاریه انسانی هستند. پلاسمودیوم ریچنوری و پلاسمودیوم فیلدی شبیه پلاسمودیوم اواله هستند. پلاسمودیوم سینومولگی شبیه پلاسمودیوم ویواکس است. پلاسمودیوم لوفوره و پلاسمودیوم گالیناسئوم شبیه پلاسمودیوم فالسیپاروم است.

چرخه زندگی مالاریا در بدن پشه (سیکل جنسی)

تقریباً ۱۰ روز بعد از شروع حمله های مالاریایی (موسوم به پاروکسیسم، Paroxysm) شیزونت های خونی پاره و گامتوگونی شروع می شود. خونخواری توسط پشه آنوفل ماده هر ۳ تا ۵ روز یکبار انجام می گیرد. لازم به ذکر است تکثیر گامت ها (تولید گامتوسیت ها) در بدن انسان و تکامل گامت ها (تبدیل گامتوسیت ها به گامت نر و ماده) در بدن پشه انجام می گیرد. پشه آنوفل معمولاً شب هنگام اشکال آلوده (گامتوسیت ها) را از میزبان مبتلا وارد معده خود می کند. گامتوسیت ها به ۲ فرم میکروگامتوسیت و ماکروگامتوسیت در خون محیطی انسان وجود دارند که با ورود به بدن پشه دچار تغییراتی می شود.

گامتوسیت ها در پلاسمودیوم های اووال، مالاریه و ویواکس کروی و در پلاسمودیوم فالسیپاروم لوبیایی شکل هستند. در گامت نر (میکروگامت) کروماتین شبکه ای با سیتوپلاسم آبی کمرنگ و در گامت ماده (ماکروگامت) کروماتین متراکم با سیتوپلاسم پررنگ دیده می شود. میکروگامتوسیت ها طی ۱۰-۱۲ دقیقه به ۸-۶ موجود دوکی تاژکدار تغییر می یابند که به این پدیده زایش تاژک گویند. در این حالت طی یک فرایند کاهش کروموزومی، افزایش pH و فرار CO₂ نامحلول از داخل خون میکروگامتوسیت به میکروگامت (گامت نر) تبدیل می شود. گامتوسیت های ماده در اثر تغییراتی همراه با کاهش کروموزومی به گامت ماده (ماکروگامت) تبدیل می شوند. در اثر روند کموتاکسی، میکروگامت به سمت ماکروگامت کشیده می شود. در این حالت ابتدا تاژک میکروگامتوسیت از بین رفته و از ناحیه سر (API) خود را به ماکروگامت می رساند. در اثر لقاح (سینگامی) سلول تخم یازیکوت ایجاد می شود. بسته به میزان رطوبت و دما تشکیل زیگوت در عرض ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت انجام می گیرد. بعد از ۲۰ دقیقه زیگوت به شکل کشیده در آمده و توانایی حرکت را کسب کرده در این حالت به موجود کرمی (دوکی) شکل ۲n

کروموزومی به نام اووکینت تبدیل می شود. اووکینت ۲۴ ساعت پس از تشکیل، از جدار معده عبور کرده و در زیر غشای دیواره خارجی (غشای پری تروفیک) یک سلول گرد و کروی به نام اووسیست را ایجاد می کند. اندازه اوکینت حدود ۲۰ میکرون و اووسیست ۵۰ میکرون است. اووکینت فاقد میکرونم وراپتری و دارای میکروتوبول های زیر غشایی و حلقه قطبی است. اووسیست ها پس از رشد شروع به تقسیم هسته و سپس سیتوپلاسم و صدها سلول عفونت زای هلالی شکل موسوم به اسپوروزوئیت می کند. پس از پاره شدن اووسیست ها، اسپوروزوئیت های درون آن وارد هموسل پشه شده و در نهایت وارد غدد بزاقی پشه می گردد. غدد بزاقی در پشه آنوفل یک جفت غدد ۳ لوبه است (در کنه ۲ لوبه). دوره اسپوروگونی در دمای 25°C در پلاسمودیوم اووال ۱۸-۱۴ روز، پلاسمودیوم ویواکس ۱۰-۸ روز، پلاسمودیوم فالسیپاروم ۱۲-۱۰ روز و پلاسمودیوم مالاریه ۲۱-۱۸ روز است. در اسپوروگونی انتقال مالاریا در درجه حرارت 20°C تا 30°C و رطوبت نسبی بالای ۶۰٪ صورت می گیرد. اسپوروزوئیت قادر است به طور متوسط حدود ۵۵ روز در غدد بزاقی پشه به صورت فعال باقی بماند. از دیگر ویژگیهای اسپوروزوئیت داشتن میتوکندری و فقدان رنگدانه است.

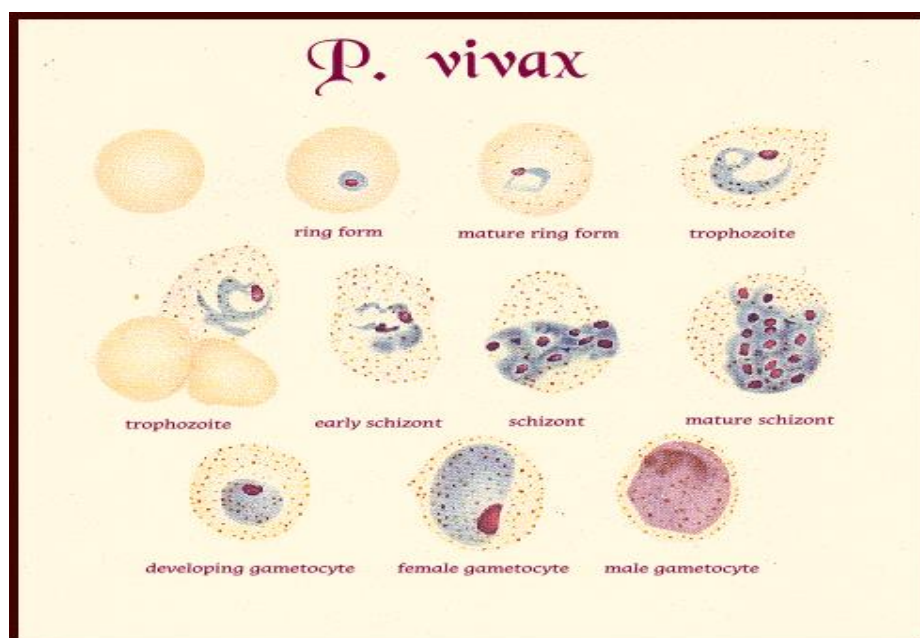
از زمان ورود اسپوروزوئیت تا ظهور اولین علائم بالینی را دوره کمون (Incubation period) گویند که به طور متوسط در پلاسمودیوم ویواکس ۱۴ روز، پلاسمودیوم فالسیپاروم ۱۲ روز و پلاسمودیوم مالاریه ۲۸ روز است. در شیزوگونی خونی در تمام مراحل زندگی پلاسمودیوم بعد از تروفوزوئیت در حال رشد (زمانی که گامتوسیت ها داخل RBC از Hb تغذیه می کنند) در سطح سیتوپلاسم یکسری رنگدانه ها یا هموزوئین (پیگمان) دیده می شود. این رنگدانه ها ناشی از تجزیه (کاتابولیسم) RBC بوده که باعث رسوب ذرات آهن روی سیتوپلاسم انگل می شود. رنگدانه ها خاصیت آنتی ژنی دارند.

اجزای تشکیل دهنده هموزوئین عبارتند از ۶۵٪ پروتئین (اغلب گلوبولین) و ۱۶٪ فری پروتوپورفیرین IX (هماتین) و مقدار کمی لیپید و اسیدهای نوکلئیک و آیرون پورفیرین. هماتین در عمل سوکسینیک دهیدروژناز به عنوان یک مانع محسوب می شود. دانه های هموزوئین به رنگ های سیاه براق یا زرد براق در زیر میکروسکوپ الکترونی دیده می شود. پس از خونخواری در پشه هموزوئین از بین می رود. کمترین میزان هموزوئین در زمان تشکیل رینگ و بیشترین میزان در مرحله تشکیل گامتوسیت ها دیده می شود.

پلاسمودیوم ویواکس (Plasmodium vivax)

این گونه، شایعترین پلاسمودیوم در اغلب نقاط جهان بوده و در تمامی مناطق بومی و مناطق معتدل گسترش یافته است. پلاسمودیوم ویواکس به گلبولهای نابالغ بزرگتر (رتیکولوسیت ها) و کم رنگ حمله می کند. به دلیل اشکال هیپنوزوئیت در کبد عود (relapse) بیماری دیده می شود. به بیماری حاصل از این انگل مالاریای سه یک خوش خیم گویند. در سطح سیتوپلاسم RBC آلوده تعداد زیادی دانه های نارنجی رنگ، نسبتاً درشت و صاف به نام دانه های شافنر (Schuffner) بوجود می آید. این دانه ها حاوی پروتئین های انگل بوده و در غشای گلبول قرمز ایجاد می شوند. افراد سیاه پوست به دلیل فقدان گروه خونی دافی به این انگل مقاومند. دانه های شافنر از ویژگیهای تشخیصی تروفوزوئیت انگل است که به اشکال نامنظم در می آید که به آن آمیپوئید گویند. گاهی اوقات انگل در ابتدا به صورت توده های هلالی در محیط RBC مشاهده می شود که به آن اشکال آپلیکه یا آکول گویند.

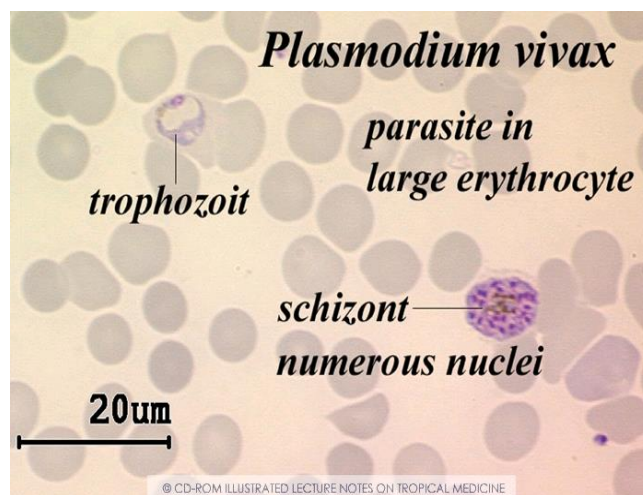
اشکال اولیه یا رینگ ظریف و بزرگ است به طوری که $\frac{1}{3}$ فضای گلبول قرمز را اشغال می کند. گامتوسیت ها گرد و تقریباً تمام گلبول قرمز را اشغال می کنند. میکروگامتوسیت با رنگ پذیری کمتر هسته و سیتوپلاسم و ماکروگامتوسیت با سیتوپلاسم آبی تیره و هسته متراکم دیده می شود. گامتوسیت شبیه تروفوزوئیت پیر قبل از تقسیم می باشد. شیزونت خونی بزرگ و حاوی ۱۶-۲۴ مروزوئیت است (به شکل دانه های انگور بهم چسبیده). هر مروزوئیت ۲-۱/۵ میکرون قطر دارد. تب خال و پارگی طحال در این گونه شایع است.



شکل ۴۰-۱: مراحل مختلف تکاملی پلاسمودیوم ویواکس

نکات مربوط به پ. ویواکس:

- (۱) در پلاسمودیوم ویواکس دانه های شافتر در فرورفتگیهای کوچکی به نام CVC قرار می گیرند.
- (۲) در شیزوگونی خونی هموزوئین ها داخل اجسام موسوم به Residual body قرار می گیرند.



شکل ۴۱-۱: مراحل مختلف تکاملی پلاسمودیوم ویواکس در گسترش نازک خون

پلاسمودیوم فالسیپاروم (Plasmodium falciparum)

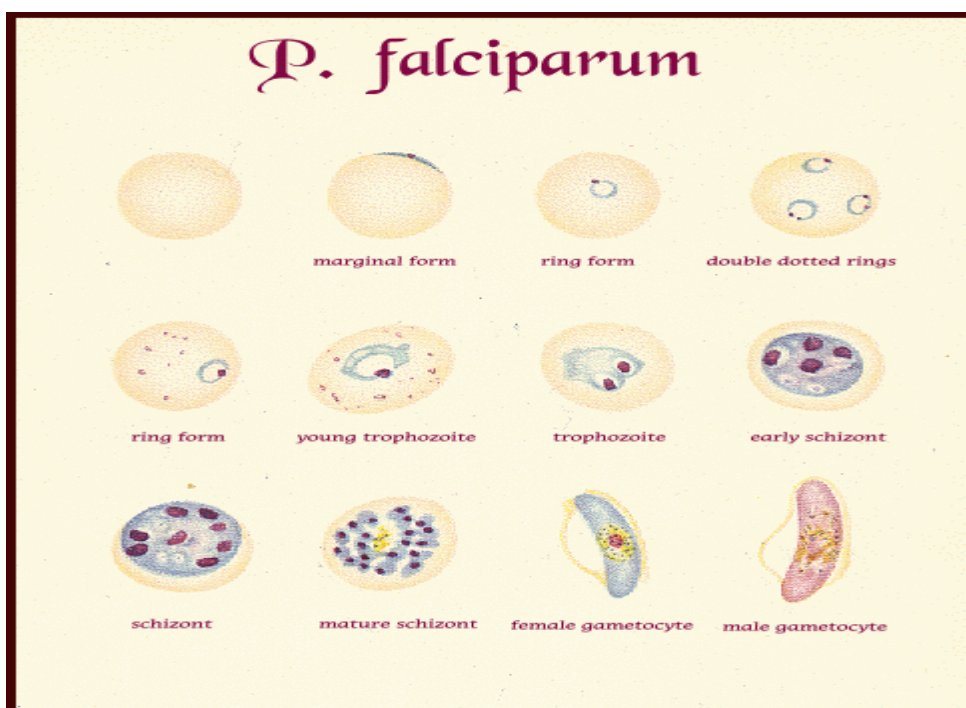
پلاسمودیوم فالسیپاروم به تمام رده های گلبول سرخ حمله می کند. در عفونت های شدید اشکال رینگ و گامتوسیت در خون محیطی دیده می شود. شیزوگونی عمدتاً در مویرگهای اندوتلیوم عضلات و احشاء رخ می دهد. از ویژگیهای این گونه وجود بیش از یک رینگ در هر گلبول (double Infection یا triple infection) و رینگ های ۲ کروماتینی است. مالاریای فالسیپاروم تقریباً به طور انحصاری در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری شایع است و سبب بیماری مالاریای سه یک بدخیم یا Estivoautumnal = تابستانی - پاییزی می شود.

گامتوسیت های فالسیپاروم برخلاف گونه های دیگر باریک و سوسپسی شکل و معمولاً یک هفته بعد از تروفوزوئیت های جوان در خون محیطی ظاهر می شوند. برخلاف سایر پلاسمودیوم ها به این گونه به همراه گونه ریچنوو در یک زیر جنس جداگانه موسوم به لاورانیا قرار می گیرد. در مراحل اولیه آلودگی، نظیر پ. ویواکس، انگل به شکل چسبیده به گلبول قرمز (Applique یا Acoole) دیده می شود. پدیده استپلینگ سبب تشکیل دانه های نامنظم قرمز تیره (خرمایی)، میله ای یا گوه ای شکل با سطح ناصاف می شود که به آن شکاف یا دانه های مورر گویند. این دانه ها بقایای کشیدگی حفره انگلی در سیتوپلاسم گلبول قرمز هستند. شیزونتها کوچک و کروی فشرده شده و به طور متوسط حاوی ۲۴ مروزوئیت می شوند. در پ. فالسیپاروم پدیده ظهور مجدد (Recrudescence) در شیزوگونی خونی انجام می پذیرد.

جدول ۷-۲: افتراق گونه های مهم پلاسمودیوم بر اساس ویژگی هایشان

گونه پلاسمودیوم	پفالسیپاروم	پمالاریه	پپالاله	پپوواکس
ظهور مجدد recrudescences	+	+	-/+	-/+
رنگ سیتوپلاسم انگل	نرمال، گاهی مایل به آبی	نرمال	بدون رنگ، رنگ پریده	بدون رنگ، رنگ پریده
رینگ های چند تایی	شایع	بندرت	کم و بیش	کم و بیش
حضور مراحل انگلی در خون محیطی	اشکال رینگ جوان با مقادیر بسیار کم گامتوسیت	اغلب رینگ های کم با شیزونت ها و گامتوسیت های فراوان	همه مراحل وجود دارد	همه مراحل انگلی وجود دارد
وجود تروفوزوئیت جوان (اشکال ابتدایی رینگ)	دارای رینگ ظریف و کوچک با نقاط کروماتینی کوچک و گاهی جدار گلبول در اثر چسبیدن انگل به شکل آپلیکه در می آید. (ظریف ترین رینگ)	رینگ اغلب کوچکتر از نوع ویواکس و ۱/۸ سلول را فرا گرفته و دارای نقاط کروماتینی بزرگ	به شکل آمیبوئید و بزرگتر از ویواکس است و رینگ بیشتر (ضخیم ترین رینگ)	رینگ ۱/۳ فضای گلبول قرمز را فرا گرفته و نقاط کروماتینی بزرگ
تعداد مزوزوئیت در شیزوگونی خونی	۸-۳۲ (۲۴)	۶-۱۲ عدد (۸) مزوزوئیت ها به شکل روزت	۶-۲۴ (۱۶)	۱۲-۲۴ (۱۶) مزوزوئیت ها به شکل دانه های انگور به هم چسبیده
ویژگی تشخیص تروفوزوئیت	فرم آپلیکه، دوپل کروماتین، چند انگل در RBC	اشکال نواری، تخم مرغی یا مستطیلی شکل	اشکال کشیده و بیضوی با لبه های ساییده شده با اشکال شبیه ستاره دنباله دار	آمیبوئید
مقاومت دارویی	+	-	-	+/-
طول اسپروگونی در ۲۵ درجه	۱۰-۱۲ روز	۲۵-۲۸ روز	۱۴-۱۶ روز	۹-۱۰ روز
دوره شیزوگونی نسجی و تعداد مزوزوئیت ها	۶ روز حاوی ۳۰/۰۰۰ مزوزوئیت	۱۵ روز حاوی ۱۵۰۰۰ مزوزوئیت	۹ روز و حاوی ۱۵۰۰۰ مزوزوئیت	۸ روز حاوی ۱۰/۰۰۰ مزوزوئیت
دوره آنکوباسیون (دوره همکمون) (۶ تا ۴۰ روز)	۸-۱۴ روز (۱۲)	۸-۴۰ روز (۳۰)	۱۰-۱۷ روز (۱۴)	۸-۱۷ روز (۱۴)
شدت بیماری	شدید	آرام تا متوسط	آرام	آرام تا متوسط
الگوی تب آغازی	متناوب - پیوسته (۴۸ ساعته)	منظم (۷۲ ساعته)	نامنظم (۴۸ ساعته)	نامنظم (۴۸ ساعته)
دوره علائم (شیزوگونی خونی)	۳۶-۴۸ ساعته	۷۲ ساعته	۴۸ ساعته	۴۸ ساعته
شدت حملات	شدید	متوسط تا شدید	خفیف	متوسط تا شدید

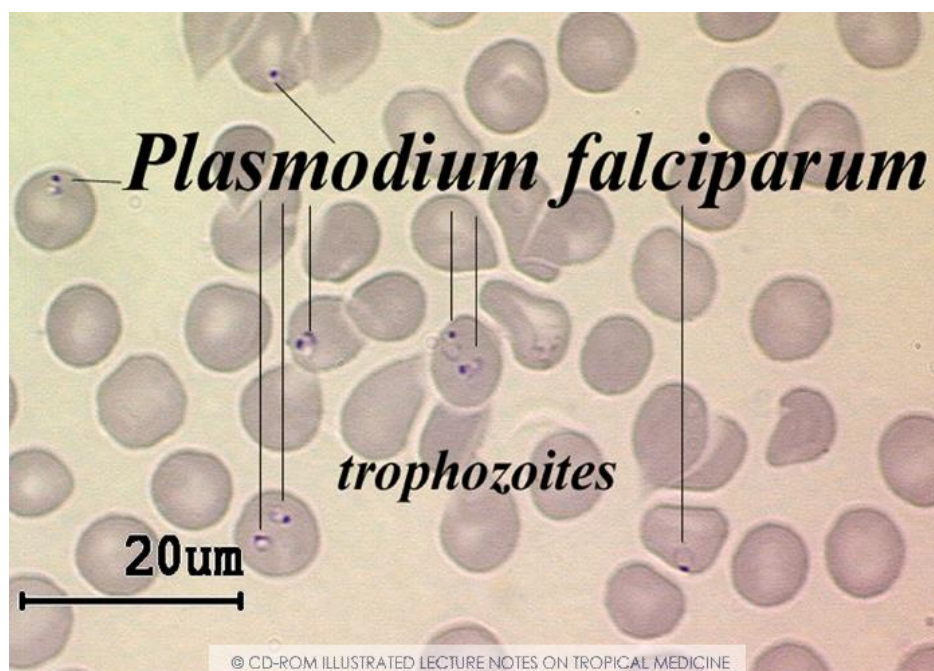
میانگین تداوم بیماری	۱۶-۳۶ ساعت	۱۰ ساعت	۱۰ ساعت	۱۰ ساعت
نوع RBC های درگیر	تمام رده RBC ها	RBC های پیر	RBC های جوان (Retic)	RBC های جوان (Retic)
نوع دانه های استپلینگ	دانه های مورر با سطح خشن	دانه های زمین با سطح صاف و ظریف	دانه های شافتر یا پیمز دات با سطح صاف و ظریف	دانه شافتر با سطح صاف و ظریف
آنمی (همولیتیک و نورموکروم)	شدید	خفیف تا متوسط	خفیف	خفیف تا متوسط
گونه پلاسمودیوم	پ. فالسیپاروم	پ. مالاریه	پ. اواله	پ. ویواکس
درگیری CNS	شایع	خیلی کم	گاهاً	خیلی کم
سندرومی نفروتیک (نفروز)	خیلی کم	شایع	خیلی کم	گاهاً
وجود سیکل خارجی گلبولی	-	-	+	+
عود (Rclapses) یا رکورنس	-	-	+	+



شکل ۴۲-۱: مراحل مختلف تکاملی پلاسمودیوم فالسیپاروم

ماکروگامتوسیت در فالسیپاروم Toxon-shape (کمانی) است. ماکروگامتوسیت نسبت به گامتوسیت نر بزرگتر، باریکتر و کشیده تر و هسته متراکم مرکزی با پیگمانهای تجمع یافته و سیتوپلاسم یکنواخت و غلیظ است. میکروگامتوسیت موزی شکل (banana-shape) یا کلیوی (kidney-form) است. میکروگامتوسیت از ماکروگامتوسیت کوتاهتر و پهن تر و هسته پخش و نامنظم دارد. در پ. فالسیپاروم به دلیل وجود برجستگیهایی به نام knob بر روی گلبول های قرمز همراه با اسید آمینه هیستیدین بعد از مرحله تروفوزوئیت جوان چسبندگی انگل به اندوتلیوم عروق مویرگی اتفاق

می افتد (Sequestration) که در نتیجه اشکال بینابینی شیزوگونی حدفاصل تروفوزوئیت جوان تا شیزونت رسیده در خون محیطی کمتر مشاهده می شود. به این پدیده Sticky گویند. در گامتوسیت‌های پ. فالسیپاروم برخلاف سایر پلاسمودیوم‌ها انتشار رنگدانه‌ها در اطراف کروماتین است. در اپی کمپلکسا اندامی به نام Apicoplast در زیر غشا واقع شده که وظایف آن عبارتند از رمزدهی پروتئین‌های هدف در پ. فالسیپاروم، انتقال و بقای پ. فالسیپاروم و متابولیسم چربی. اسیدهای آمینه‌های ضروری برای انواع پلاسمودیوم متیونین و ایزولوسین هستند.



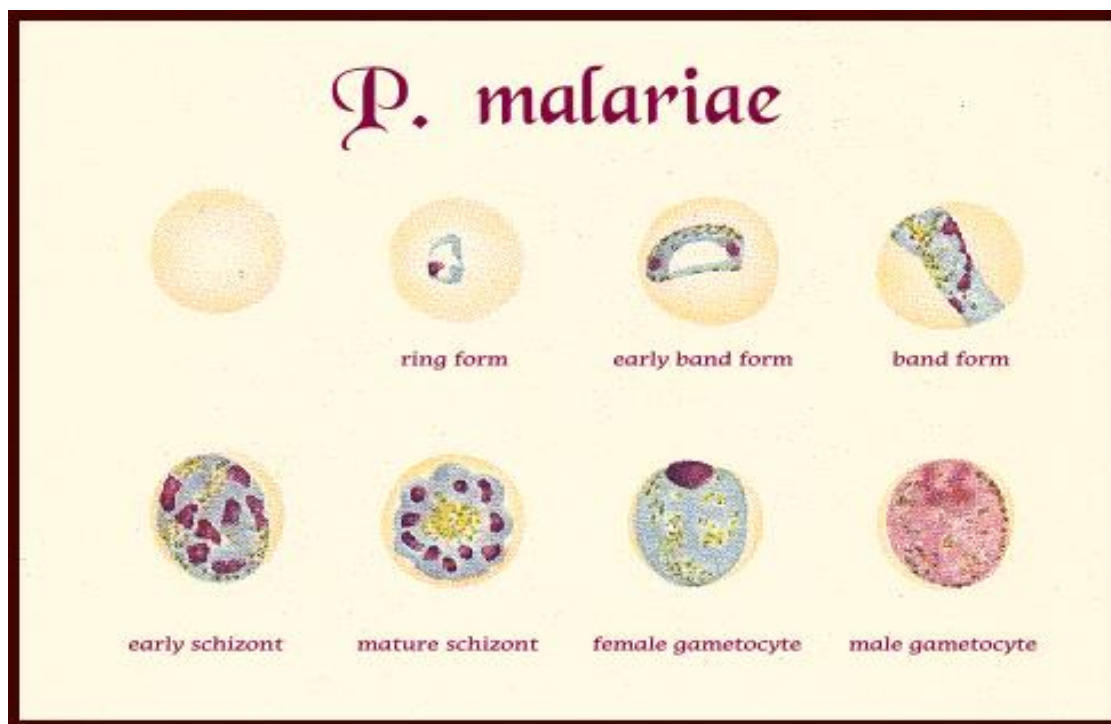
شکل ۴۳-۱: مراحل مختلف تکاملی پلاسمودیوم فالسیپاروم در گسترش نازک خون

پلاسمودیوم مالاریه (Plasmodium malariae)

این نوع پلاسمودیوم در مناطق نیمه گرمسیری و معتدل شایع است و نسبت به پ. فالسیپاروم و پ. ویواکس شیوع کمتری دارد. این انگل گلبول‌های سرخ کوچک (پیر) را بیشتر درگیر کرده مالاریای چهار یک خوش خیم (Quartan) ایجاد می نماید. شیزوگونی خونی پلاسمودیوم مالاریه ۷۲ ساعته و در سایر گونه‌ها ۴۸ ساعته است. رینگ جوان در پلاسمودیوم مالاریه شبیه پلاسمودیوم ویواکس ولی کوچکتر، نامنظم تر، متراکم تر باسیتوپلاسم آبی است. (رینگ مالاریه نسبت به گونه‌های دیگر کوچکتر است) برخلاف پ. فالسیپاروم پارازیتمی در این انگل پایین است. گاهی Knob در تروفوزوئیت مالاریه دیده می شود.

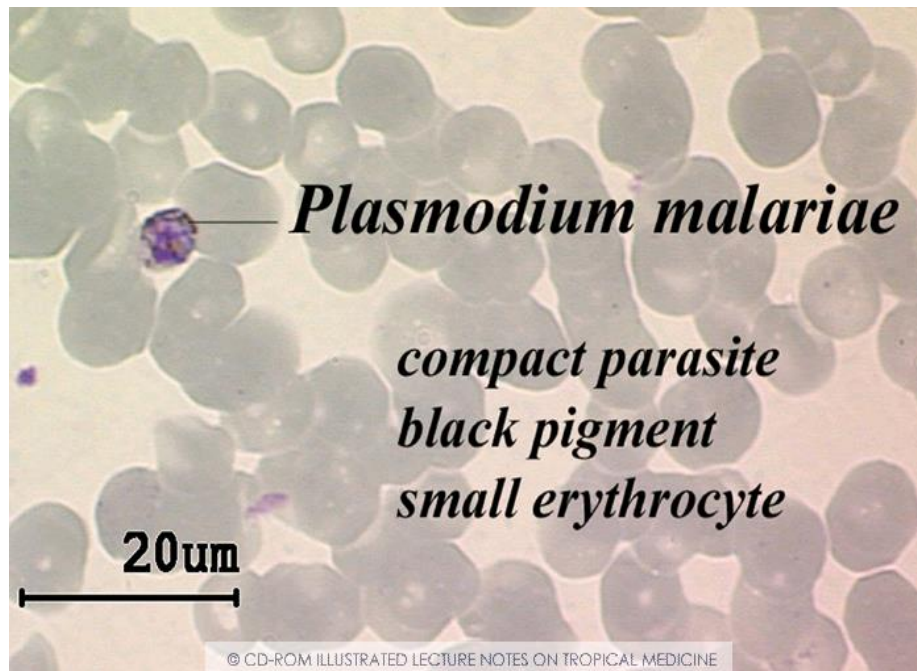
پس از مرحله رینگ فعالیت آمیبی انگل متوقف و انگل در طول RBC به فرم نواری و بلند (Band-form) یا اشکال تخم مرغی مشاهده می شود. بندرت ممکن است بر روی گلبولهای سرخ نقاط صورتی کم رنگ و ریز و غبار مانند موسوم به دانه‌های زیمن (Ziemann's dots) مشاهده شود. در شیزوگونی خونی تعداد مروزوئیت‌ها ۶-۱۲ (به طور

متوسط ۸ عدد) و شیزونت رسیده منظره منظم به شکل گل مینا به خود می گیرد. در مرکز این گل پیگمانهای سبز تیره و در اطراف آن مروزوئیت ها قرار دارند. گامتوسیت های مالاریه نسبت به ویواکس کوچکتر و تیره تر بوده ولی شبیه یکدیگرند.



شکل ۴۴-۱: مراحل مختلف تکاملی پلاسمودیوم مالاریه

دانه زمین با رنگ آمیزیهای حیاتی رومانوفسکی مشاهده نمی شود ولی با رنگ آمیزی های اختصاصی (آکریدین اورنج و آنتی بادی فلورسنت طولانی مدت) به رنگ زرد دیده می شود. گاهاً تروفوزوئیت مالاریه به اشکال چشم جغدی یا فرم سبدی نیز دیده می شود. در پلاسمودیوم مالاریه به علت افزایش pH سیتوپلاسم رنگ سلول آلوده پررنگ تر است. بعضی ها معتقدند پلاسمودیوم برازیلیانوم همان پلاسمودیوم مالاریه در دنیای جدید در میمونها می باشد. متقارن ترین شیزونت در پ. مالاریه و نامتقارن ترین شیزونت در پ. فالسیپاروم مشاهده می شود.

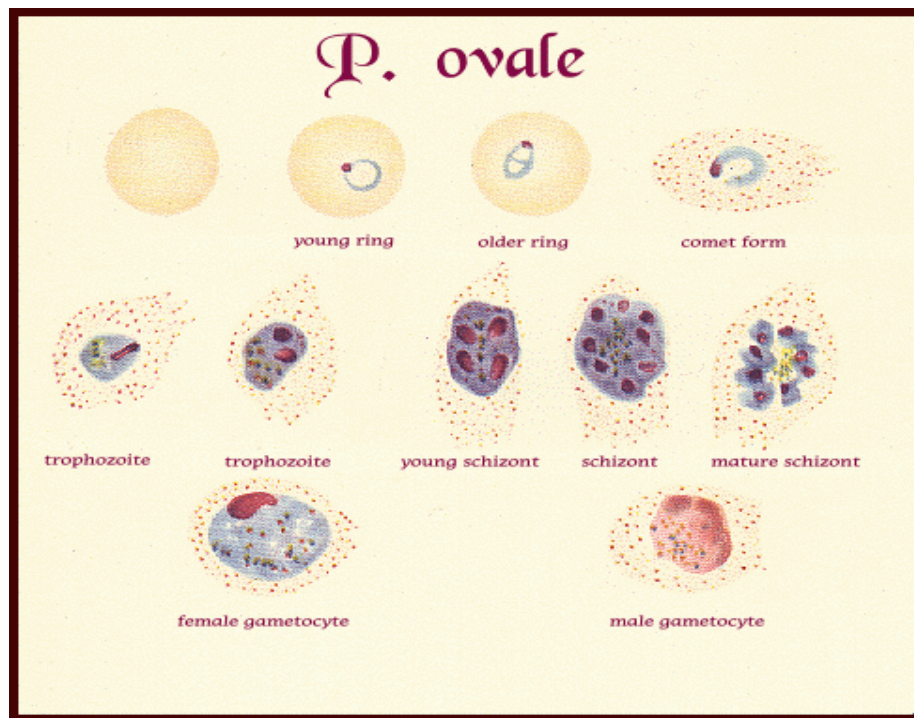


شکل ۴۵-۱: مراحل مختلف تکاملی پلاسمودیوم مالاریه در گسترش نازک خون

پلاسمودیوم اووال (Plasmodium ovale)

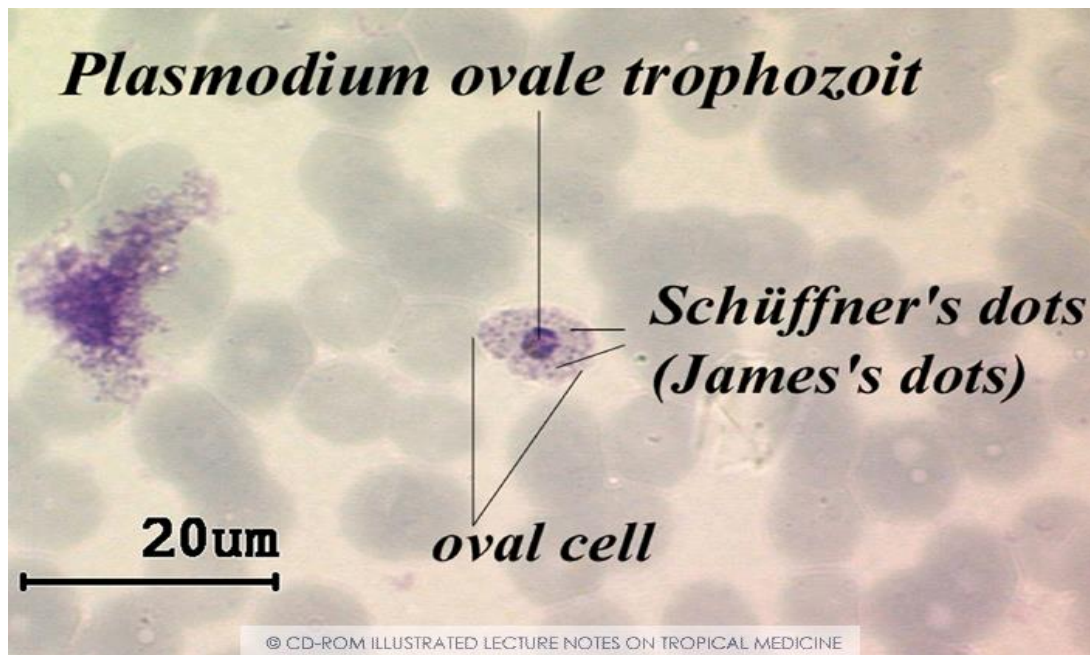
این پلاسمودیوم در ساحل آفریقای غربی شایع است. عامل تب مالاریای خوش خیم است. مانند ویواکس به گلبولهای نارس (بزرگ) ولی با درصدی پایین تر حمله و گلبول آلوده به شکل بیضی با لبه های رشته ای، ساییده و نامنظم (شبیه ستاره دنباله دار) دیده می شود (fimbriated margins) یا (Commet form). دانه های شافرنر که، گاهی james' dots نیز نامیده می شوند، نسبت به دانه های شافرنر پ. ویواکس تیره تر، درشت تر و زیادتر است. گلبولهای قرمز آلوده به صورت رنگ پریده مشاهده می شوند. طی شیزوگونی خونی ۸-۱۲ روزوئیت ایجاد می شود، هر چند گاهی شیزونتهایی با ۱۴-۱۶ و ۱۲-۱۸ روزوئیت هم دیده شده است. گامتوسیت همانند پ. فالسیپاروم دیرتر در خون محیطی ظاهر می شود. بهبودی خودبخودی ابتدایی در پلاسمودیوم اووال شایع تر است.

شکل ۴۶-۱: مراحل مختلف تکاملی پلاسمودیوم اووال



*نکته مهم:

درشت ترین رینگ و دانه ها در پلاسمودیوم اووال و کوچکترین رینگ و دانه ها در پلاسمودیوم مالاریه دیده می شود. ظریفترین رینگ مربوط به پلاسمودیوم فالسیپاروم است.



شکل ۴۷-۱: مراحل مختلف تکاملی پلاسمودیوم اووال در گسترش نازک خون

علائم و بیماری‌زایی

علائم بالینی مالاریا قرن‌ها قبل از کشف عامل بیماری شناخته شده است. حمله مالاریا (Paroxysm) دارای مراحل زیر است:

۱) مرحله لرز (Shiver-stage) یا (Cold stage):

اولین مرحله حمله مالاریایی (پاروکسیسم) است که در اثر پاره شدن شیزونتهای خونی و رها شدن مرزوزئیت‌ها در خون آغاز می‌شود. دمای سطحی بدن تا 32°C کاهش می‌یابد در حالی که دمای درونی بدن به بالای 40°C می‌رسد و نبض کوچک تند است. لرز ممکن است یک ربع تا یک ساعت طول بکشد. در این حالت پوست بدن رنگ پریده و سیانوزه (اندام‌های تحتانی) و شبیه مرغ پرکنده می‌شود. لرز ابتدا از ستون فقرات آغاز و منجر به دردهای کمری به همراه استفراغ صفراوی و تهوع می‌شود. در این مرحله بیشتر شیزونت‌های رسیده و تروفوزوئیت‌های جوان مشاهده می‌شوند.

۲) مرحله تب (fever stage) یا (hot stage):

پس از مرحله سرما و متصل به آن ایجاد می‌شود. بیمار که تا چند دقیقه پیش خود را زیر چندین پتو پوشانیده بود به اصطلاح صورتش گل می‌اندازد، دمای سطحی بدن بالا رفته و بیمار اغلب ناراحت و مضطرب است و هذیان می‌گوید. سردردهای شدید ناحیه پیشانی نیز دیده می‌شود. این مرحله توأم با آزاد شدن اسیدلاکتیک و وجود اشکال آپلیک و رینگ و آمیבוئید در خون بیمار است. این مرحله ۲-۶ ساعت به طول می‌انجامد. در پلاسمودیوم اووال و ویواکس ۲-۶ ساعت و پلاسمودیوم مالاریه بیشتر از ۶ ساعت و در پلاسمودیوم فالسیپاروم بیش از پلاسمودیوم مالاریه است. برخلاف لرز که بیشتر در اندام‌های تحتانی رخ می‌دهد، مرحله تب اندام‌های فوقانی بدن را درگیر می‌کند. در این مرحله نبض پر و سریع است.

۳) مرحله تعریق (Sweating stage):

بلافاصله بعد از تب، مرحله تعریق آغاز می‌شود. این مرحله همراه با خستگی و کوفتگی (Tiredness, sleeping) است. در این مرحله حرارت بدن کاملاً پایین آمده و معمولاً بیمار احساس بهبودی می‌کند. در این مرحله نیز به خاطر آزاد شدن اسیدلاکتیک بیمار احساس ضعف و تحلیل رفتگی میکند و تمایل به خواب دارد. این مرحله معمولاً ۱-۳ ساعت طول می‌کشد. در این فاز شیزونت‌های نارس و تروفوزوئیت‌های پیر مشاهده می‌شود. به طور متوسط یک حمله مالاریایی ۵-۱۱ ساعت طول می‌کشد.



شکل ۴۸-۱: سمت راست پشه آنوفل ماده، وسط و سمت چپ اسپوروزوئیت پلاسمودیوم

عوارض پلاسمودیوم فالسیپاروم

۱) مالاریای مغزی:

مالاریای مغزی شدیدترین عارضه عفونت با پ. فالسیپاروم و شایعترین علت مرگ است. تغییر در شارژ الکترونی RBC (پتانسیل زتا ζ) باعث پدیدار شدن knob در سطح RBC ها، چسبندگی در عروق اندوتلیوم و مسدود شدن مویرگهای مغزی می شود. در اثر اختلال در خون رسانی مغزی آنوکسی (قطع اکسیژن) ایجاد می شود. افراد مبتلا به این نوع مالاریا استفراغ های خونی می نمایند که اصطلاحاً Coffy green vomitous گویند. اغماء مشخص ترین علامت مالاریای مغزی است. جدیداً چند مورد از مالاریای مغزی بر اثر ابتلاء به مالاریای ویواکس گزارش شده است. در این نوع مالاریا لکوسیتوز نوتروفیل شایع است.

۲) کم خونی:

در مالاریای فالسیپاروم اگر هماتوکریت کمتر از ۲۰٪ کاهش یا تعداد انگل در خون به ۵٪ یا بیشتر برسد کم خونی شدید ایجاد می شود. آنمی از نوع نورموکروم و نورموسیتیک (مانند لیشمانیا) است، که به علل زیر پدیدار می شود؛

- پدیده sticky
- انعقاد منتشر داخل عروقی (DIC)
- ترمبوسیتوپنی (کاهش پلاکت ها) که تمایل به خونریزی در عروق دارد.
- همولیز گلبول های سرخ در اثر واکنش اتوایمیون نظیر تب پیشاب سیاه در فالسیپاروم (آنمی همولیتیک).
- بزرگی طحال: در مناطق اندمیک یکی از شاخص های بالینی مهم در بیماری مالاریا است که بدان کیک مالاریا گویند.

(۳) تب متناوب صفراوی (Bilious Remittent fever):

بروز این بیماری همراه با تهوع و استفراغ شدید و پیشرونده است. در این حالت یرقان در اثر تخریب RBC، تجزیه هم و تولید بیلی روبین ایجاد می شود.

یرقان به طور معمول از حدود روز دوم (یعنی زودتر از تب زرد و دیرتر از تب پیشاب سیاه) ظاهر می شود. در این حالت بیمار احساس ناراحتی در اپی گاستر میکند و گاهی خونریزی از معده و استفراغ سیاه رنگ دیده می شود.

(۴) مالاریای سرد:

در اثر حملات مالاریای فالسیپاروم افت سریع فشار خون و اختلال در خون رسانی و چسبناک شدن پوست بدن ایجاد می شود. در این حالت بیمار شروع به هذیان گویی (مثل تب در مالاریا) می نماید. این سندرم گاهی در نتیجه سپتی سمی های گرم منفی، خیزریوی، خونریزی وسیع گوارشی، پارگی طحال و یا کم آبی اصلاح نشده ایجاد می شود.

(۵) تب پیشاب سیاه:

این سندرم یک پدیده خود ایمن است که با تولید آنتی بادی علیه knob موجود در گلبول سرخ باعث تشکیل رسوبات کمپلکس ایمنی می شود. در این حالت همولیز داخل عروقی و هموگلوبینوری و تب و درد ناحیه کلیه ها، علائم زردی ایجاد می شود. گاهی درمان ناقص با داروی کینین (Kinin) و همولیز گلبول های قرمز در اثر اسیدهای چرب آزاد در پلاسما سبب ایجاد این سندرم می شود.

(۶) مالاریای دیسانتریک (مالاریای معده ای - روده ای):

این نوع مالاریا عارضه ناشایع اما بسیار خطرناک است که با تهوع و استفراغ و خونریزی در ناحیه دستگاه گوارش فوقانی مشخص می شود. نظیر بیماری تب نوسان دار صفراوی علائم همراه با زردی پوست، کبد بزرگ و حساس به لمس بوده و در موارد شدید عارضه سوء جذب روده ای و کاهش جریان خون کبدی دیده می شود.

(۷) مالاریای کلیوی:

این عارضه در نوع فالسیپاروم بیشتر به صورت گلومرولونفریت حاد همراه به نقص کلیوی است. در اثر نکروز توبولی به دلیل رسوب گوچه های سرخ و آنوکسی کلیوی رخ می دهد. در صورت عدم درمان پیش آگهی بدی دارد. در پلاسمودیوم مالاریه سندرم نفروتیک یا نفروپاتی مالاریایی (گلومرولیت نفریت مزمن) به علت رسوب کمپلکس های آنتی ژن - آنتی بادی در گلومرول ها و در وضعیت اضافی آنتی ژنها رخ می دهد. این سندرم که بیشتر در اطفال مشاهده می شود به درمان استروئیدها پاسخ نمی دهد. عارضه دیگر، نفروز گذرا است که در همه گونه های پلاسمودیوم دیده می شود.

۸) مالاریای ریوی:

در این حالت شش ها پیگمانته و مویرگ ها حامل پیگمان، لکوسیت های پیگمانته، فاگوسیت ها و اریتروسیت های آلوده هستند. ادم حاد ریوی در اثر آنمی شدید، پارازیتی شدید و مالاریای مغزی رخ داده و باعث افزایش سرعت تنفس و خیز (ادم) ریه می شود. ادم ریوی در پ. فالسیپاروم گاهاً به علل مختلفی نظیر سپتی سمی باکتریایی، مصرف بیش از حد مایعات یا علامت زجر ریوی در بالغین (ARDS) اتفاق می افتد.

۹) مالاریای کلراسی:

سبب استفراغ و سرفه می شود.

۱۰) سندروم بزرگی طحال مناطق گرمسیری (T.S.S):

این سندروم که در مناطق اندمیک مالاریا روی می دهد همراه با بزرگی مزمن طحال، افزایش چشمگیر سطح ایمونوگلوبولین IgM سرمی، کاهش لنفوسیت T، کمبود T سل سرکوبگر، ارتشاح لنفوسیتی در سینوزوئیدهای کبدی همراه با کم خونی، ترومبوسیتوپنی و رتیکولوسیتوز است. این سندروم به گونه خاصی از پلاسمودیوم ها اختصاصی ندارد. برخی ها معتقدند تظاهرات بالینی این سندروم به علت حضور کمپلکس های ایمنی در حال گردش است. برای جلوگیری از بزرگی طحال درمان باید تا آخر عمر ادامه یابد.

۱۱) آلودگی شدید خون به انگل:

موقعی که فراوانی انگل در خون به ۱۰ تا ۲۰٪ برسد علی رغم درمان سریع و شدید مرگ و میر بسیار بالا است. در صورتی که ۵٪ از RBC ها به انگل آلوده شوند تعویض سریع خون برای نجات جان بیمار بسیار مفید است.

۱۲) هیپوگلیسمی:

این عارضه در اثر درمان با کینین و کینیدین در افراد بزرگسال به علت افزایش انسولین خون ایجاد می شود و عامل مهم در زجر تنفسی و مرگ جنین در طی ۳ ماه سوم آبستنی است. نشانگان نفروتیک و بزرگی طحال گرمسیری (حاوی اجسام گاما - کندی) از اختلالات ناشی از مالاریای مزمن است.

آسیب زایی

آسیب زایی به علت همولیز گلبول های سرخ، آزادسازی متابولیت های انگل و پاسخ ایمنولوژیک میزبان به هموزوئین است. در اثر پدیده sticky زوائد (knob-like) همراه یک پروتئین غنی از هیستیدین به سطح RBC چسبیده و سبب اتصال RBC انگل زده به فرم رولو (سکه ای) در عروق اندوتلیال می شود. نتیجه این چسبندگی (سیتو ادهرنس) ایجاد ایسکمی است. این چسبندگی با کمک پدیده روزتینگ یعنی اجتماع RBC غیرانگل دار در اطراف RBC انگل دار اتفاق می افتد. به تجمع و توقف RBC انگل زده در مویرگها sequestration گویند. جدیداً یک گلیکوپروتئین چسبنده محلول به نام ترومبوسپوندين یافت شده است که احتمالاً عامل اتصال گلبول های سرخ به سلول های اندوتلیال است در این چسبندگی یکسری اینتگرین ها مثل ICAM-1 (CD54) نقش دارد. در اثر چسبندگی، سلول میزبان بر علیه انگل سایتوکاین هایی تولید می کنند. عمده ترین این سایتوکاین ها تومور نکروز فاکتور (TNF) می باشد که در ۲/۳ افراد مبتلا به مالاریا و کالآزار دیده می شود. یک ارتباط مستقیم بین سطح بالای TNF و مرگ ناشی از مالاریای مغزی به اثبات رسیده است. محققان نشان داده اند که TNF، اینترلوکین ۱، ۲ و آزاد شدن اکسید نیتريت در بروز علائم عصبی مهم است.

ایمنی

عوامل متعدد متابولیکی و ژنتیکی در ایجاد ایمنی بر علیه انگل مالاریا مفید است، که عبارتند از:

(۱) هموگلوبینوپاتی ها:

افرادی که آنمی داسی با هموگلوبین (Hbs)S یا تالاسمی دارند نسبت به مالاریای فالسیپاروم مقاوم اند. هموگلوبین های A2، E و C، در برابر مالاریای ویواکس و هموگلوبین F (جنینی) در برابر تمام مالاریاهای انسانی مقاوم هستند.

(۲) کمبود آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD):

کسانی که کمبود ژنتیکی این آنزیم را دارند در مقابل فالسیپاروم مقاوم اند. که مقاومت در افراد هتروزیگوت بیشتر از افراد هموزیگوت است.

(۳) گروه های خونی:

افرادی سیاه پوست به علت فقدان گروه خونی دافی (-)duffy در برابر پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم ناولزی مقاوم هستند. در انسان به دلیل وجود آنتی ژنهای مشترک بین گروه خونی A و مالاریا، این افراد به مالاریا حساس ترند در حالی که موارد ابتلا در افراد با گروه خونی O کمتر است. مطالعات نشان می دهد که آنتی ژن BW53 حاصل از کلاس HLA-1 تا ۴۰٪ فرد بیمار را در برابر مالاریای مغزی و کم خونی شدید محافظت می کند. آنتی ژن DRB1 حاصل از کلاس MHCII سبب جلوگیری از پیدایش کم خونی شدید می شود.

گلیکوفورین A: افرادی که فاقد گروه خونی GPA⁻ (GPA⁻) هستند در برابر پ. فالسیپاروم مقاوم اند. در گلیکوفورین A پروتئین خاص میکروتم موسوم به EBA-175 باعث تسهیل ورود انگل به داخل RBC می شود.

۴) اوالوسیتوز ارثی (الپیتوسیتوز):

این افراد به میزان کمتری به مالاریای ویواکس و مالاریه مبتلا می شوند. (احتمالاً به دلیل پروتئین نوار ۳ غیرطبیعی).

ایمنی در بیماری مالاریا بصورت توأم (Concomitant) است به این مفهوم که تا زمان وجود پارازیتمی در خون آنتی بادی‌هایی ظاهر می شوند که از تکثیر اشکال غیرجنسی در خون جلوگیری می کنند. به این نوع مصونیت، که بعد از شیزوگونی خونی مکرر اتفاق می افتد، مصونیت نسبی (premunity) نیز می گویند. ایمنی توأم در عفونت های مضاعف (پلاسمودیوم فالسیپاروم و ویواکس) و ایمنی نسبی در عفونت های اسپورادیک (تک گیر) مطرح است. در مناطق بومی نوزادان متولد شده از مادران دارای سابقه ابتلا به مالاریا تا حد زیادی مصون هستند. علل این مقاومت موارد زیر هستند:

۱) عبور IgG از طریق جفت در زمان جنینی و محافظت نوزاد تا ۶ ماه پس از تولد

۲) فقدان پاراآمینوبنزوئیک اسید در شیر مادر

۳) وجود Hbf در شیر

اپیدمیولوژی

بیماری مالاریا به جز در کشور نیوزلند که در آن پشه آنوفل مشاهده نشده است انتشار جهانی دارد. از نظر مرگ و میر مهمترین بیماری انگلی محسوب می شود. شیوع آن در مناطق مالاریا خیز به بیش از ۳۰۰ میلیون نفر در سال می رسد. جنوب شرقی ایران منطقه مالاریا خیز است. قسمت اعظم موارد فالسیپاروم مربوط به استان سیستان و بلوچستان است.

منطقه بومی مالاریا؛

هرگاه در یک منطقه بیماری مالاریا وجود داشته باشد و انتقال آن توسط پشه آنوفل حداقل ۳ سال متوالی رخ دهد آنجا را بومی گویند. جهت بررسی شیوع بومی بودن مالاریا در یک منطقه از روش های زیر استفاده می کنند.

۱- spleen rate (شاخص طحال)

۲- Adult spleen rate (شاخص طحال بزرگسالان)

۳- parasite rate (شاخص انگل)

۴- ایندکس انتقال؛ ایندکس انتقال علاوه بر شیوع انگل در خون محیطی بهترین نشانگر برای موثر بودن اقدامات کنترل است.

پارامترهای مهم مراقبت از مالاریا:

$$1000 \times \frac{\text{موارد تأیید شده در مدت یکسال}}{\text{جمعیت تحت مراقبت}} : \text{API) بروز سالانه انگل مالاریا}$$

$$1000 \times \frac{\text{شماره گستره های آزمایش شده}}{\text{جمعیت تحت مراقبت}} : \text{ABER) میزان آزمایش خون در سال}$$

بر اساس spleen rate و parasite rate در اطفال ۲ تا ۹ ساله تقسیم بندی مناطق مالاریا خیز به صورت زیر می باشند:

- ۱) مناطق هیپواندمیک: میزان طحال های بزرگ و لام خون محیطی مثبت از نظر انگل بین صفر تا ۱۰٪ است.
- ۲) مناطق مزواندمیک: میزان طحال های بزرگ و لام خون محیطی مثبت از نظر انگل بین ۱۱ تا ۵۰٪ است.
- ۳) مناطق هیپراندمیک: میزان طحال های بزرگ و لام خون محیطی مثبت از نظر انگل بیش از ۵۰٪ است.
- ۴) مناطق هولواندمیک: میزان طحال های بزرگ و لام خون محیطی مثبت از نظر انگل بیش از ۷۵٪ است.

مالاریای ناشی از انتقال خون:

پلاسمودیوم ویواکس در خون در دمای ۴۰C بیشتر از ۹۶ ساعت زنده نمی ماند در حالی که پلاسمودیوم مالاریه و پلاسمودیوم فالسیپاروم قادر به ادامه حیات اند. انتقال مالاریا از طریق سرنگ مشترک بین معتادان تزریقی نیز گزارش شده است.

از نظر جغرافیایی، آب و هوا و شرایط اپیدمیولوژیک مالاریا، ایران را می توان به ۳ منطقه تقسیم بندی نمود:

۱) منطقه دریای خزر:

در این منطقه آنوفل غالب از نوع ماکولی پنیس و انگل غالب منطقه از نوع پلاسمودیوم ویواکس است.

۲) فلات مرکزی:

به ۲ قسمت شرقی و غربی تقسیم می شود. در بخش شرقی فلات مرکزی که شامل مناطق کویری است، آنوفل غالب سوپر پیکتوس و انگل غالب پلاسمودیوم ویواکس است. در بخش غربی که شامل شمال غرب و غرب کشور است به ترتیب اهمیت، آنوفل غالب از نوع آنوفل ساکارووی (در آذربایجان)، آنوفل ماکولی پنیس، سوپر پیکتوس و انگل غالب از نوع پلاسمودیوم ویواکس است.

۳) منطقه جنوبی:

شامل دریای خلیج فارس، دشت خوزستان، بلوچستان است. آنوفل غالب به ترتیب اهمیت شامل: آنوفل استفنسی، کولیسیفاسیس (طریقه نشستن شبیه پشه کولکس)، فلویاتیلیس، سوپرپیکتوس، ساکارووی، دتالی می باشند، به طوری که در دشت ساحلی شایعترین مالاریا فالسیپاروم و سپس ویواکس است. اخیراً آنوفل پولکریموس به عنوان ناقل مشکوک در جنوب شرقی ایران مطرح است.

آنوفل استغفنی غالب ترین پشه در سطح کشور و بیشترین نقش را در انتقال مالاریا به عهده دارد. این پشه نسبت به D.D.T و دیلدرین به طور کامل مقاوم و بروز مقاومت آن به مالاتیون در سالهای اخیر گزارش شده است. آنوفل سوپرپیکتوس فراگیرترین پشه آنوفل کشور بوده ولی به اندازه آنوفل استغفنی در برقراری مالاریا نقش ندارد. آنوفل دتالی کوچکترین آنوفل در کشور است. انتقال سویه اروپایی پ. فالسیپاروم اختصاصاً توسط آنوفل آتروپاروس انجام می گیرد. دوره گامتوسیتمی پ. فالسیپاروم از همه و دوره پارازیتمی مالاریه از همه بیشتر است.

اصطلاحات کاربردی مرتبط با اپیدمیولوژی مالاریا

*مالاریای القاء شده (induced malaria):

اگر فردی به مالاریه مبتلا شود و بدون درمان بهبود یابد انگل به میزان کم شیزوگونی خونی را ادامه می دهد به طوری که از دید سیستم ایمنی پنهان مانده و تا ۳۰ سال قادر است این نوع چرخه را ادامه دهد.

*مالاریای مادرزادی (congenital malaria):

اگر انگل های مالاریا در اولین هفته پس از تولد در خون نوزاد دیده شود مالاریای مادرزادی گویند.

*مالاریای وارده (imported malaria):

اگر شخص آلوده، بیماری را از محل خاصی کسب نموده و آن را وارد محدوده خود نماید بدان مالاریای وارده گویند مثل مرزهای شرقی ایران.

*مالاریای ناپایدار (unstable malaria):

این نوع مالاریا مرتبط با فصل گرما به صورت همه گیر در آمده و از ویژگیهای مناطق معتدله می باشد. در این نوع مالاریا طول عمر پشه پایین، منطقه هایپراندیمیک و مبارزه با لارو آسان است. بروز اپیدمی محتمل و مصونیت نسبی جمعی پایین است.

*مالاریای پایدار (stable malaria):

اگر مواردی از بیماری در یک منطقه خاص بدون نوسان و تغییر باشد مالاریای پایدار گویند. در این حالت امکان اپیدمی غیرمحتمل و مصونیت نسبی جمعیت بالا است. بیماری بشکل هایپراندیمیک و هالواندیمیک است.

*مالاریای انتقال از وارده (introduced malaria):

مالاریا در منطقه پاک را گویند.

*دوره کمون (incubation period):

فاصله زمانی بین ورود اسپوروزوئیت به بدن و ظهور اولین علائم بالینی (۹ تا ۴۰ روز)

*دوره اختفاء (prepatent period):

فاصله زمانی بین ورود اسپوروزوئیت (عامل آلوده کننده) تا ظهور انگل در خون محیطی (۹ تا ۱۶ روز).

در افراد طبیعی $I.P = P.P$ ، در افراد حساس به مالاریا $I.P < P.P$ در افراد مقاوم به مالاریا $I.P > P.P$.
نکته: اپیدمی مالاریایی بیشتر در فصل تابستان و اوائل پاییز هر ۵ تا ۸ سال یکبار اتفاق می افتد.

مالاریا در جهان

مالاریا با بیش از ۳۰۰ میلیون نفر مبتلا و ۱-۲ میلیون مرگ سالانه مهمترین بیماری انگلی بشمار می آید. در قاره آفریقا حدود نیمی از امکانات بیمارستانها به بیماران مبتلا به مالاریا اختصاص یافته است و تعداد بیشماری از کودکان زیر ۵ سال جان خود را در اثر ابتلا به این بیماری از دست می دهند. در سال ۱۹۸۹ مجمع عمومی سازمان ملل از سازمان جهانی بهداشت خواست که در راه تحقق بهداشت برای همه تا سال ۲۰۰۰ میلادی به مسأله بسیار مهم مالاریا به عنوان یک اولویت جهانی توجه شود. این تأکید به برگزاری یک کنفرانس جهانی در اکتبر ۱۹۹۲ در آمستردام منجر شد که در آن وزیران بهداشت ۹۵ کشور جهان با بحث در باره ابعاد مختلف مالاریا نسبت به اجرای یک خط مشی برای کنترل مالاریا متعهد شدند. در سال ۱۹۹۸، WHO بر تعهد خود مبنی بر مبارزه با مالاریا با پیشنهاد ابتکار RBM با مشارکت برنامه توسعه سازمان ملل متحد، یونیسف و بانک جهانی مجدداً تأکید کرد. هدف RBM مبارزه با بیماری به شیوه ای هماهنگ و نظام مند است تا سیستمهای بهداشت در سطوح ملی نیز بتوانند به شکل مؤثرتری با بیماری مبارزه نمایند. RBM به دنبال اطمینان از ارائه بهتر مراقبت های بهداشتی، حمایت و تشویق تولید داروها و واکسن های جدید مؤثرتر بر علیه مالاریا است (رئیزی و همکاران، ۱۳۸۳).

*گزارش سال ۲۰۲۲ سازمان بهداشت جهانی در مورد مالاریا

- با توجه به گزارش WHO در سال ۲۰۲۱ حدود ۲۴۷ میلیون مورد مالاریا در ۸۴ کشور آندمیک مالاریا به ثبت رسید.
- این عدد نسبت به سال ۲۰۲۰ (۲۴۵ میلیون) بصورت افزایشی بوده است و بیشترین افزایش مربوط به کشورهای منطقه آفریقا می باشد.
- بر طبق این گزارش، از سال ۲۰۰۰ (۸۲ مورد در هر ۱۰۰۰ نفر جمعیت در معرض خطر) تا ۲۰۱۹ (۵۷ مورد در هر ۱۰۰۰ نفر جمعیت در معرض خطر) موارد بروز مالاریا بصورت کاهشی بوده و در سال ۲۰۲۰ (۵۹ مورد در هر ۱۰۰۰ نفر جمعیت در معرض خطر) مقداری افزایشی بوده است و علت این افزایش، بروز پاندمی کووید ۱۹ گزارش گردیده است.
- موارد بروز *P. Vivax* از ۰.۸٪ موارد (۲۰.۵ میلیون مورد) در سال ۲۰۰۰ به ۰.۲٪ (۴.۹ میلیون مورد) در سال ۲۰۲۱ کاهش یافته است.
- حدود ۲۹ کشور در جهان، ۹۶٪ موارد کل مالاریا را شامل می شوند که از این تعداد ۴ کشور آفریقایی، ۵۰٪

کل موارد را در بر میگیرند:

نیجریه (۲۷٪)

جمهوری دموکراتیک کنگو (۱۲٪)

اوگاندا (۵٪)

موزامبیک (۴٪)

- بر طبق گزارش WHO، موارد مرگ و میر مالاریا در جهان از سال ۲۰۰۰ - ۲۰۱۹ بطور پیوسته کاهش یافته و از ۸۹۷۰۰۰ مورد در ۲۰۰۰ به ۵۷۷۰۰۰ در ۲۰۱۵ و ۵۶۸۰۰۰ در ۲۰۱۹ کاهش یافت.
- موارد مرگ و میر در سال ۲۰۲۰ نسبت به ۲۰۱۹ حدود ۱۰٪ افزایش یافته و به ۶۲۵۰۰۰ مورد رسید.
- در دوره سالهای ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۱، از حدود ۲ میلیارد مورد و ۱۱.۷ میلیون مرگ مالاریا در سراسر جهان پیشگیری شده است.
- با افزایش دسترسی به تشخیص و درمان، توزیع گسترده تورهای تخت درمان شده با حشره کش ها و ارائه اقدامات شیمیایی برای گروه های پرخطر جلوگیری شد.
- کودکان و زنان باردار سال ۲۰۲۱ همچنین توصیه گسترده ای را برای اولین واکسن مالاریا در جهان (RTS, S) با برنامه ریزی گسترده تر در سراسر کشورهای بومی مالاریا از سال ۲۰۲۳ اعلام کرد.
- اگرچه تلاش های انجام شده توسط کشورهای بومی مالاریا برای جلوگیری از اختلال در ارائه خدمات مالاریا در طول همه گیری کووید-۱۹، بدون شک از بازگشت هایی که نگران آن بودند جلوگیری کرد، موارد و مرگ و میرها در این منطقه اکنون برای چندین سال ثابت مانده اند.
- پانزده کشور به کاهش در بروز مالاریا دست یافتند، از جمله دو کشوری که مالاریا بصورت هدف در آنها کار می کند (بورکینافاسو و غنا).
- کابو ورد در سال ۲۰۲۱ مرگ و میر ناشی از مالاریا را به صفر رساند و در مسیر اعلام عاری از مالاریا توسط WHO قرار دارد.
- با این حال، پیشرفت جهانی در کاهش بروز موارد مالاریا و مرگ و میر مالاریا برای برآورده کردن استراتژی فنی جهانی WHO برای مالاریا ۲۰۱۶-۲۰۳۰ خارج از مسیر باقی مانده است.
- این گزارش بر تهدیدهای مداوم برای مبارزه با مالاریا تاکید می کند. اینها شامل افزایش مقاومت در برابر حشره کش مورد استفاده در تورهای بستر، ظهور مقاومت دارویی ضد مالاریا در منطقه آفریقا، و معرفی و گسترش گونه پشه *Anopheles Stephensi* ساکن شهری است.
- با این حال، هنوز دلیلی برای خوش بین بودن به آینده وجود دارد. همانطور که این گزارش اشاره می کند، تحقیقات علمی به سرعت منجر به مسیرهای امیدوارکننده ای از ابزارهای جدید می شود که می تواند به

سرعت بخشیدن به پیشرفت در جهت از بین بردن مالاریا کمک کند.

➤ اینها شامل انواع جدیدی از فناوری های کنترل ناقل است که پشه هایی را که انگل را به خارج از خانه منتقل می کنند (از جمله اصلاح ژنتیکی پشه ها)، تشخیص، داروهای مالاریا، واکسن ها و آنتی بادی های مونوکلونال را هدف قرار می دهد. این نوآوری علمی - همراه با پیشرفت های هیجان انگیز در ایجاد قابلیت های تولید در قاره آفریقا - می تواند به ما کمک کند تا در مسیر دستیابی به اهداف SDG 2030 برگردیم.

مالاریا در منطقه مدیترانه شرقی (EMR)

بطور متوسط هر سال در این منطقه ۱۵ میلیون مورد بالینی مالاریا اتفاق می افتد که ۴۷۰۰۰ مورد آن منجر به مرگ می شود. ۶۰٪ از جمعیت منطقه مدیترانه شرقی (۲۸۷ میلیون نفر) در معرض خطر ابتلا به مالاریا هستند. ۱۵٪ جمعیت این منطقه در مناطق دارای انتقال پلاسمودیوم ویواکس و ۴۵٪ در مناطق دارای انتقال توأم پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسی پاروم زندگی می کنند. سودان، یمن، افغانستان و سومالی بیشترین موارد مالاریا را در این منطقه به خود اختصاص داده اند.

کشورهای منطقه مدیترانه شرقی بر اساس چگونگی اجرای برنامه کنترل مالاریا و وضعیت بیماری به شرح ذیل دسته بندی می شوند:

- کشور هایی که موفق به از بین بردن کامل بیماری شده اند شامل لبنان، فلسطین، اردن، قطر، لیبی، بحرین، تونس و کویت.
- کشور هایی که مشمول برنامه حذف مالاریا هستند شامل مصر، مراکش، عمان، امارات متحده عربی و سوریه.
- کشور های دارای آندمیسته متوسط شامل عربستان سعودی، ایران و عراق.
- کشور های دارای انتقال شدید مالاریا (موارد مزمن، سخت و عارضه دار) شامل افغانستان، پاکستان، جیبوتی، یمن، سودان و سومالی (رئیزی و همکاران، ۱۳۸۳).

مالاریادر ایران

مالاریا از قدیم در ایران بعنوان یکی از مشکلات مهم بهداشتی تلقی گردیده است و هیچ بیماری دیگری تا این اندازه زیانهای مالی و جانی جبران ناپذیری به بار نیاورده است. طی سالهای ۱۳۰۷ و ۱۳۱۱ شمسی نیمی از کارگرانی که برای تأسیس کارخانجات صنعتی شمال یا جاده سازی مشغول کار بودند به علت ابتلا به مالاریا جان خود را از دست دادند. طی این سالها مرگ و میر ناشی از مالاریا در سواحل دریای خزر و خوزستان ۳۰ تا ۴۰٪ کل موارد مرگ ومیر بوده است و برابر آمار و ارقام موجود ۲۵٪ از مراجعان به درمانگاه های وزارت بهداشتی در سال

۱۳۲۶ بیماران مالاریایی بوده اند.

از سال ۱۳۲۷ شمسی قسمت انگل شناسی دانشکده پزشکی تهران و سپس موسسه مالاریالوژی در مورد چگونگی اپیدمیولوژی مالاریا در کشور مطالعات مفصلی را آغاز نمود که اساس برنامه ریزی مبارزه با مالاریا در کشور بر نتایج مطالعات مذکور استوار گردید.

مسئله بازگشت مالاریا و اشاعه مجدد آن در برخی از نقاط ایران (به خصوص استان سیستان و بلوچستان و کرانه های خلیج فارس) مانند سایر نقاط دنیا معلول عوامل چندی است که در بین آنها می توان مقاوم شدن پشه های آنوفل در برابر حشره کشها، مقاوم شدن انگل مالاریا به داروهای ضد مالاریا، عدم اجرای دقیق برنامه سمپاشی و مبارزه جدی با مالاریا و ورود تعداد زیادی کارگر یا مهاجران غیر قانونی از کشور های همسایه را نام برد (صائی، ۱۳۸۴).

مقاومت انگل مالاریا به داروهای رایج ضد مالاریا از جمله عوامل تعیین کننده در تداوم حضور انگل در برخی مناطق می باشد و البته مطالعات وسیعی نیز در این زمینه به انجام رسیده است که نقش مهمی را در تدوین سیاستهای اجرایی برنامه کنترل مالاریا داشته اند.

شهبازی و همکاران طی یک طرح تحقیقاتی ملی که نتایج مرحله اول اجرای آن در سال ۸۳ منتشر گردید میزان مقاومت دارویی در انگل پلاسمودیوم فالسی پاروم به روش *In vivo* نسبت به داروی کلروکین در استانهای مالاریا خیز کشور را (بر اساس طبقه بندی جدید میزان حساسیت انگل به دارو) ۷۳.۹٪ گزارش نمودند (شهبازی و همکاران، ۱۳۸۳). در سال دوم اجرای طرح مذکور نیز ۷۸.۵٪ مقاومت در انگل پلاسمودیوم فالسی پاروم نسبت به داروی کلروکین گزارش گردید (Raeisi et al., 2006). بر اساس یافته های طرح مذکور در دو سال اجرای آن تنها ۲۱/۵٪ بیماران مبتلا به مالاریای فالسیپاروم به داروی کلروکین پاسخ بالینی و انگل شناسی مناسب و کافی دادند.

برطبق نتایج آن طرح تغییر داروی خط اول درمان مالاریای فالسیپاروم بدون عارضه، یعنی کلروکین، اجتناب ناپذیر بود. ادریسیان و همکاران نیز در سالهای پیش از آن میزانهای متفاوتی از مقاومت دارویی انگل پلاسمودیوم فالسی پاروم نسبت به داروهای ضد مالاریا را گزارش نمودند (Edrissian et al., 1999). زمان و همکاران با استفاده از روش PCR- RFLP هاپلوتایپهای واجد موتاسیونهای یک و دو نقطه ای بیانگر مقاومت در ایزوله های انگل ویواکس مناطق مالاریا خیز ایران نسبت به داروی پیریمتامین را گزارش نمودند (Zaman et al., 2011).

در همین راستا و با توجه به اهمیت بررسی دقیق و کامل میزان حساسیت انگل مالاریا نسبت به داروهای رایج کتاب " ارزیابی تأثیر درمانی داروهای ضد مالاریا روی مالاریای فالسیپاروم بدون عارضه (روش *Invivo*)" با حمایت مالی مرکز مدیریت بیماریهای کشور به چاپ رسیده است (شهبازی، ۱۳۸۱).

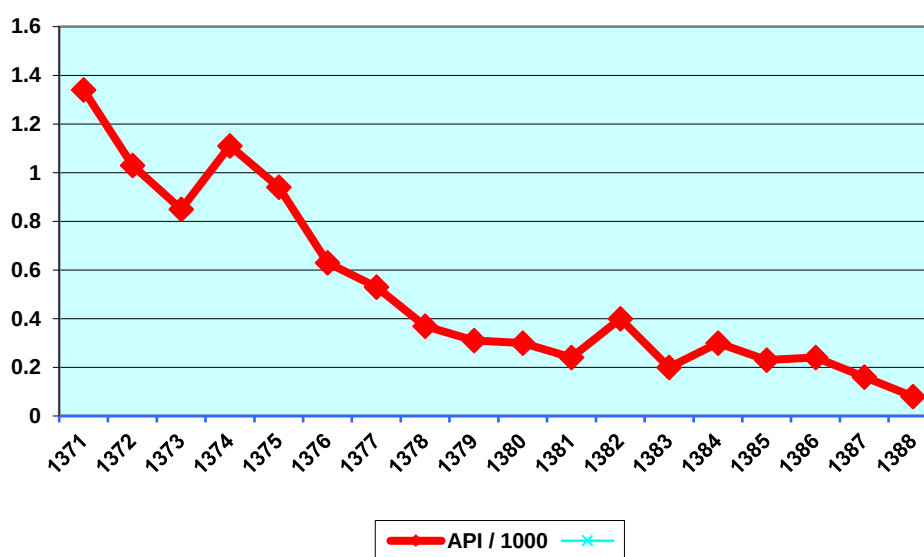
در طول سال ۱۳۸۸ مجموعاً ۵۹۷۰ مورد بیماری مالاریا با تأیید آزمایشگاهی در کشور گزارش شده است. بیشترین موارد مالاریا از استان سیستان و بلوچستان با ۷۴٪ کل موارد کشور گزارش شده است. ۸۷٪ کل موارد کشور از سه استان سیستان و بلوچستان، هرمزگان و کرمان گزارش شده است. مهمترین استانهای دارای مشکل مالاریا و دارای بیشترین موارد مالاریای بومی کشور سیستان و بلوچستان، هرمزگان، کرمان و فارس هستند.

از کل موارد مثبت سال ۱۳۸۸، ۶۸ درصد ایرانی بوده اند. استانهای تهران، فارس، اصفهان و قم بیشترین موارد مالاریای وارده کشور را بخود اختصاص داده اند. در سال ۱۳۸۸، ۹۰٪ موارد مالاریای کشور از نوع مالاریای ویواکس، ۸٪ از نوع مالاریای فالسیپاروم و ۲٪ باقیمانده ناشی از عفونت مخلوط (mix) (ناشی از پلاسمودیوم فالسیپاروم و پلاسمودیوم ویواکس) بوده است (اقتباس از مباحث ارائه شده توسط مدیر برنامه کشوری کنترل مالاریا در کارگاه بازآموزی تشخیص میکروسکوپی مالاریا در گیلان، سال ۱۳۸۹).

تردیدی وجود ندارد که اقتصاد استانهای مالاریا خیز کشور (سیستان و بلوچستان، هرمزگان، کرمان و بوشهر) از اپیدمیهای مالاریا بشدت متأثر گشته است و فعالیتهای کنترل مالاریا بار زیادی را به برنامه های توسعه ای استانها تحمیل می کند (Shahbazi et al., 2008 b).

در سال ۱۴۰۰ موارد مبتلا به ۱۰۱۲ نفر گزارش شده است. از این تعداد ۹۰ درصد موارد مالاریای ویواکس و ۱۰ درصد فالسیپاروم یا مالاریای توام (فالسیپاروم+ ویواکس) بوده است. البته کلیه موارد مالاریا «وارده از خارج کشور» بوده و مورد بومی گزارش نشده است.

موارد مالاریای ۵ ماهه نخست ۱۴۰۱ نیز ۱۸۹۴ نفر گزارش شده است. (اقتباس از گزارش اداره مدیریت بیماریهای قابل انتقال از ناقلین وزارت بهداشت)



شکل ۴۹-۱: روند مالاریا در کشور در سالهای گذشته (از مرکز مدیریت بیماریها)

برنامه حذف مالاریا

هدف حذف مالاریا در کشور قطع انتقال محلی فالسیپارم و کاهش انتقال ویواکس به کمتر از ۷۰۰ مورد طی ۵ تا ۷ سال تعیین شده است. انتظار می رود با تحقق هدف حذف بیماری ضمن قطع انتقال مالاریای بدخیم که می تواند موجب مرگ بیمار گردد با پاک شدن بخش وسیعی از کشور از انتقال مالاریا حجم فعالیت های کنترلی کاهش یابد و در حد جلوگیری از شیوع مجدد بیماری تداوم یابد.

چهارچوب برنامه حذف مالاریای کشور

برنامه حذف مالاریای کشور در سه مرحله انجام می شود که شامل:

مرحله نخست: فاز آمادگی

مرحله دوم: حذف مالاریای فالسیپارم

مرحله سوم: حذف مالاریای ویواکس

به این مراحل مرحله چهارم با هدف جلوگیری از شیوع مجدد بیماری در مناطق پاک نیز باید اضافه نمود.

* مرحله نخست: فاز آمادگی

این فاز بمنظور فراهم کردن تجهیزات، منابع مالی، تدارکاتی و نیروی انسانی مورد نیاز پیش بینی شده است. طول مدت این مرحله یک تا دو سال می باشد.

* مرحله دوم: حذف مالاریای فالسیپارم

هدف این مرحله حذف انتقال مالاریای فالسیپارم در کلیه مناطق کشور است. در پایان این مرحله تنها ممکن است موارد انتقال از وارده فالسیپارم مشاهده گردد. همچنین کاهش انتقال ویواکس نیز مورد نظر است. طول مدت این مرحله دو سال است.

* مرحله سوم: حذف مالاریای ویواکس

هدف این مرحله کاهش چشمگیر انتقال مالاریا در کانونهای فعال باقیمانده است، به نحوی که در پایان این مرحله موارد انتقال محلی به کمتر از ۷۰۰ مورد کاهش یابد. طول مدت این مرحله سه سال است (برنامه حذف مالاریا، اداره کنترل مالاریای وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی).

تشخیص مالاریا

بنظر می رسد به دلایلی همچون افزایش انتقال در مناطقی که کنترل مالاریا در آنها ضعیف شده است، افزایش میزان مقاومت دارویی در گونه های انگل و افزایش مسافرت ها و مهاجرت های بین المللی، سالانه به تعداد موارد ابتلا به مالاریا در سراسر جهان افزوده می شود (Pasvol, 2005) و به همین دلیل نیز نیاز برای تشخیص موثر و عملی مالاریا در سطح جهان در حال افزایش است (WHO, 2006)، زیرا تشخیص موثر موجب کاهش عوارض و مرگ و میر ناشی از مالاریا می گردد.

تشخیص صحیح بیماریها از ارکان اصلی مبارزه با انواع بیماریهاست. متأسفانه به خدمات آزمایشگاهی در بسیاری کشورهای در حال توسعه و یا کم درآمد توجه اندکی میشود در حالیکه خدمات آزمایشگاهی ضعیف بیشترین تاثیر منفی را روی مردم فقیر و آسیب پذیر دارد، زیرا همواره این گروه از مردم هستند که سنگین ترین بار بیماریها را بر دوش می کشند. ثابت شده است که سوءمدیریت مالاریا، منجمله خدمات تشخیصی آن، در یک دور باطل موجب افزایش فقر در جوامع آسیب پذیر می گردد (www.liv.ac.uk/lstm/majorprogs/malaria). تشخیص سریع و دقیق کلید مدیریت موثر مالاریا و از مداخلات اصلی GMCS یا Global Malaria Control Strategy است (WHO, 1993).

در مناطق مالاریا خیز و بخصوص مناطق استوایی که سایر انواع بیماریهای تب دار و عفونی نیز شایع هستند تنها با تکیه بر علائم بالینی نمی توان عفونتهای تب دار را از هم متمایز نمود و تشخیص های تکمیلی با استفاده از فن آوریهای آزمایشگاهی مورد نیاز است. بطورکلی مدیریت موثر مالاریا بدون تشخیص دقیق مالاریا ممکن نیست. در حال حاضر گرایش به توسعه استراتژیهای تشخیص مالاریا منحصر به کشورهای شدیداً متأثر از مالاریا نیست بلکه در کشورهای توسعه یافته نیز، بدلیل فقدان مهارتهای تشخیصی کافی علیرغم وجود زیرساختارهای لازم، این تمایل وجود دارد (Bell et al., 2005; Reyburn et al., 2008). هرچند که ظاهراً تشخیص مالاریا از طریق شناسایی انگل مالاریا و یا آنتی ژنها / محصولات انگل در خون بیمار انجام می شود و اینکار بنظر ساده می آید، ولی تشخیص دقیق این بیماری به عوامل زیادی بستگی دارد که برخی از آنها عبارتند از :

- مراحل مختلف گونه های مختلف انگل شامل اسپوروزوئیت، مروزوئیت نسجی، مروزوئیت خونی و گامتوسیت
- آندمیسیته گونه های مختلف انگل مالاریا
- جابجایی جمعیت
- پارازیتمی
- ایمنی میزبان
- علائم و نشانه های بیماری

- مقاومت دارویی
 - مشکلات مربوط به عود بیماری
 - تثبیت انگل در بافتهای عمقی تر (sequestration)
 - پیشگیری دارویی
 - درمان بر اساس علائم بالینی
- همه عوامل فوق می توانند در تشخیص مالاریا و تفسیر نتایج آزمایشگاهی مؤثر باشند. مالاریا یک اورژانس پزشکی بالقوه است و باید سریعاً درمان شود. تأخیر در تشخیص و درمان این بیماری در بسیاری از کشورها منجر به مرگ تعداد زیادی بیمار می شود.
- تشخیص مالاریا در مناطقی که این بیماری بومی نیست می تواند مشکل باشد زیرا پزشکان آنرا بعنوان یک عامل بالقوه بروز تب از یاد می برند و تقاضای آزمایشات تشخیصی مربوطه را نمی کنند و تکنسینهای آزمایشگاهی نیز بدلیل عدم تجربه و دقت موفق به تشخیص انگل نمی شوند.
- در برخی مناطق دنیا، از جمله در آفریقا، انتقال مالاریا بحدی شدید است که بخش بزرگی از جمعیت به این انگل مبتلا هستند اما بدلیل توسعه سیستم ایمنی بدون علامت باقی می مانند. چنین افرادی علیرغم اینکه حامل انگل هستند علائم مالاریا را نشان نمی دهند. در چنین شرایطی ، یافتن انگل مالاریا در فرد علامت دار لزوماً به این معنا نیست که فرد یک بیمار مالاریایی است زیرا علائم موجود می تواند بوسیله سایر علل بیماریزا ایجاد شود.
- در بسیاری از کشورها که مالاریا در آنها بومی است کمبود منابع یک مانع عمده در تشخیص بموقع و قابل اعتماد مالاریا است. در این کشورها کارکنان آزمایشگاهها اغلب بخوبی آموزش ندیده، به تجهیزات کافی مجهز نگردیده، دریافتهای مالی اندکی داشته و تشخیص سایر بیماریها منجمله سل نیز بر دوششان است. لذا، افت کیفیت تشخیص در اینگونه موارد امری اجتناب ناپذیر است.

تشخیص دیر هنگام موارد مالاریا تحت تأثیر عوامل زیادی اتفاق می افتد منجمله:

- علائم بالینی غیر اختصاصی مالاریا
- اشکال بدون علائم مالاریا
- فقدان منابع و تسهیلات ناکافی
- عدم دسترسی به کارکنان و مدیران ماهر
- خود درمانی گسترده در برخی مناطق
- ضعف آموزش مالاریا در جامعه و آگاهی پایین جامعه و حساسیت پایین مردم به علایم مالاریا

تردیدی نیست که استفاده مناسب تر از میکروسکوپی مالاریا و نیز بکارگیری تکنیکهای جایگزین می تواند اساساً موجب بهبود کنترل بیماری شود (Oaks et al., 1991).

روشهای تشخیص مالاریا

تشخیص سریع و موثر مالاریا نه تنها باعث تخفیف درد و رنج از بیماری می شود بلکه انتقال بیماری را نیز در جامعه کاهش می دهد. ماهیت غیر اختصاصی نشانه ها و علائم بالینی مالاریا موجب درمان بیش از حد (over-treatment) این بیماری و یا عدم درمان سایر بیماریها در مناطق بومی مالاریا و عدم تشخیص مالاریا در مناطقی می گردد که مالاریا در آنها بومی نیست (Behandari et al., 2008). روشهای مختلفی در آزمایشگاه برای تشخیص مالاریا بکار می رود که مهمترین آنها عبارتند از تشخیص میکروسکوپی توسط رنگ آمیزی گسترشهای نازک و ضخیم لام خون محیطی (Negasala et al., 2008)، تکنیکهای تغلیظ منجمله بافی کوت کمی (quantitative buffy coat یا QBC) (Behandari et al., 2008)، تست های تشخیصی سریع از قبیل OptiMAL (Zerpa et al., 2008)، ICT (Ratsimbaoa et al., 2008)، Para- HIT-f، (Mcmorrow et al., 2008) ParaScreen، (Endeshaw et al., 2008) SD Bioline و روش تشخیصی مولکولی مانند واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) (VO et al., 2007). مزایا و کاستی هایی برای هریک از این روشها گزارش شده است که عمدتاً در ارتباط با حساسیت، ویژگی، دقت، صحت، زمان صرف شده برای آزمایش، مقرون به صرفه بودن، میزان سختی انجام کار، نیاز به میکروسکوپیست ماهر، و مشکل تکنسین های بی تجربه هستند.

تشخیص بالینی مالاریا

تشخیص بالینی مالاریا توسط پزشکان در مناطق مالاریا خیز با آندمیسیته بالا یک رویکرد سنتی است. این روش کم هزینه ترین روش تشخیص مالاریا است و در برخی کشورها بطور گسترده انجام می شود و انتخاب اول است. مردم مناطق مالاریا خیز با علائم اصلی مالاریا شامل لرز، تب، عرق و همچنین سردرد، بیحالی، درد استخوان و استفراغ آشنا هستند و معمولاً خودشان بیماری را تشخیص می دهند. تشخیص بالینی ارزان است و نیاز به منابع و تجهیزات ندارد. ولی مشکل اینجاست که نشانه های مالاریا غیراختصاصی هستند و با سایر بیماریهای تب دار همپوشانی دارند. همپوشانی علائم مالاریا با دیگر بیماری های گرمسیری باعث اختلال در تشخیص و در نتیجه استفاده بی رویه از داروهای ضد مالاریا و کاهش کیفیت مراقبت از بیماران تب دار غیر مالاریایی در مناطق بومی مالاریا می شود

(Reyburn, 2004). بنابراین، تشخیص مالاریا تنها براساس تشخیص بالینی غیرقابل اعتماد است و باید با تشخیص آزمایشگاهی تائید شود (WHO, 2000).

مدیریت یکپارچه بیماری های کودکان (IMCI) الگوریتم های بالینی را برای مدیریت و تشخیص بیماری های شایع دوران کودکی در کشورهای فاقد آزمایشگاههای تشخیصی ارائه نموده است که برای اجرای آن به حداقل مهارتهای تشخیصی نیاز است. الگوریتم مذکور در مورد تشخیص مالاریا در کشورهای آفریقایی در مقایسه با شرایط ایده آل آزمایشگاهی علیرغم ویژگی پایین دارای حساسیت ۱۰۰٪ است (Perkins et al., 1997). پایین بودن ویژگی نشان می دهد که الگوریتم مذکور به تنهایی قادر به تمایز مالاریا از سایر علل تب در کودکان نیست. اخیراً، نشان داده شد که استفاده از الگوریتم بالینی IMCI منجر به ۳۰٪ اضافه تشخیص مالاریا می گردد (Tarimo et al., 2001). بنابراین، ضروری است که دقت تشخیص مالاریا با ترکیب دو روش تشخیص بالینی و تشخیص مبتنی بر مشاهده انگل افزایش یابد (Kyabayinze et al., 2008).

*تشخیص میکروسکوپی با استفاده از رنگ آمیزی گسترشهای نازک و ضخیم خون محیطی (PBS)

در حال حاضر مالاریا در شکل مرسوم آن توسط آزمایش میکروسکوپی گسترشهای خونی رنگ آمیزی شده با رنگهای گیمسا (Giemsa)، رایت (Wright) یا رنگهای میدانی (Field) (Warhurst et al., 1996) تشخیص داده می شود. این روش از زمانی که لاوران برای اولین بار انگل مالاریا را کشف کرد و Romanowsky در قرن نوزدهم فنون رنگ آمیزی را بهبود بخشید تغییر چندانی نیافته است. تا بیش از یک قرن بعد، تشخیص میکروسکوپی گونه های پلاسمودیوم در گسترشهای خونی ضخیم رنگ آمیزی شده با گیمسا (تشخیص وجود انگل) و در گسترشهای نازک خون (برای تایید گونه ها) بعنوان استاندارد طلایی (Gold Standard) برای تشخیص آزمایشگاهی مالاریا باقی مانده است (Bhatri et al., 2007).

تشخیص دقیق با یک میکروسکوپیست ماهر و گسترش های خونی که بخوبی تهیه و رنگ آمیزی شده باشد همچنان یک استاندارد طلایی برای تشخیص و شناسایی انگل های مالاریا محسوب می شود. معمولاً این روش شامل برداشت خون از نوک انگشت بیمار، تهیه یک گسترش ضخیم و یک گسترش نازک، رنگ آمیزی (غالباً با گیمسا) و آزمایش گسترش خون با میکروسکوپ است (Payne, 1988).

مزایای تشخیص میکروسکوپی مالاریا عبارتند از:

- این روش حساس است و هرگاه با تکنسین های ماهر و دقیق انجام شود تا حد ۱۰-۵ انگل در هر میکرولیتر خون را میتوان تشخیص داد (WHO, 1990). تحت شرایط عمومی فیلدی حد تشخیص این روش ۱۰۰ انگل در هر میکرولیتر خون است.

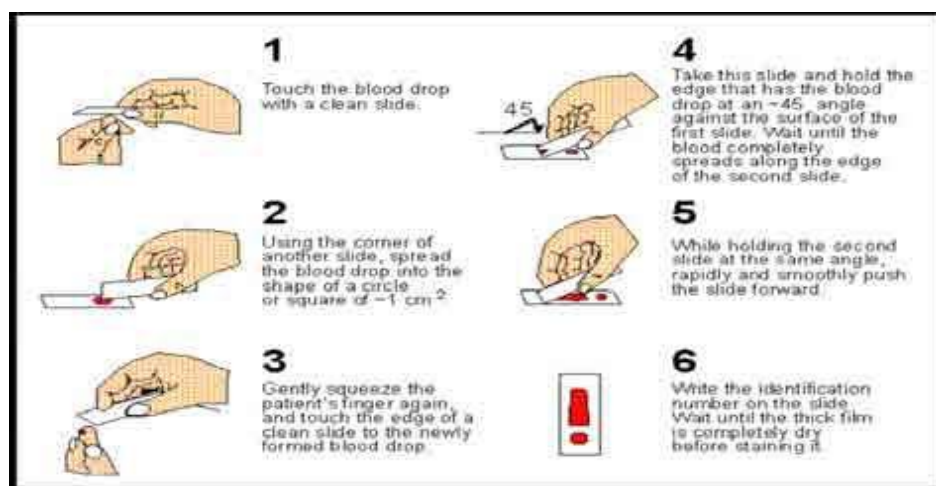
- برای تمایز گونه های انگل مالاریا و نیز مراحل تکامل انگل کاربرد دارد. گاهی میکروسکوپیست های ماهر می توانند تغییرات مورفولوژیک ناشی از درمان دارویی را نیز شناسایی کنند.
- تعداد انگل به ازای گلبول سفید و یا گلبول قرمز قابل تعیین شدن است. این کمیتهای برای اثبات هایپر پارازیتمی (در مالاریای شدید) و یا ارزیابی پاسخ انگل به درمان دارویی مورد نیاز هستند.
- این روش نسبتاً ارزان است. هزینه در کشورهای آندمیک مالاریا برای هر اسلاید ۰/۱۲ - ۰/۴ دلار آمریکا است. این هزینه در کشورهای مختلف برحسب شرایط نظام سلامت، استفاده انحصاری از میکروسکوپ برای تشخیص مالاریا و آزمایشگاه اختصاصی برای مالاریا متفاوت است.
- از این تکنیک میتوان برای تشخیص سایر بیماریهای مشمول برنامه های کنترلی مثل سل و یا بیماریهای آمیزشی نیز بهره برد.
- می تواند یک بایگانی دائمی از یافته های تشخیصی ایجاد کند که برای کنترل کیفیت کاربرد دارد.
- ضعف های تشخیص میکروسکوپی مالاریا عبارتند از:
 - حجم کار زیاد و زمان صرف شده جهت آزمایش طولانی است. حداقل ۳۰-۶ دقیقه زمان نیاز است تا نمونه جمع آوری شود و به نتیجه برسد.
 - انجام آن مشکل است و بستگی به تکنیک خوب، معرفها، نوع و وضعیت میکروسکوپ و بخصوص تکنسین های آموزش دیده و نظارت شده دارد، که متأسفانه همه این شرایط اغلب در سطوح محیطی تر وجود ندارد.
 - دلیل فرایند طولانی تشخیص، پزشکان معمولاً بدون دریافت نتیجه آزمایش درمان را انجام می دهند (WHO, 2000).
- کشف سریع موارد مالاریا در کمتر از 48 ساعت پس از بروز نخستین علائم، مهمترین استراتژی برنامه جامع کنترل مالاریا در ایران است. در حال حاضر بخش عظیمی از منابع انسانی و غیرانسانی برنامه کنترل مالاریا صرف خدمات تشخیصی می گردد که تقریباً بطور کامل مبتنی بر تشخیص میکروسکوپی انگل در گسترش های خونی است. بدیهی است در چنین شرایطی صحت و دقت تشخیص میکروسکوپی اهمیت قابل ملاحظه ای در اثربخشی برنامه پرهزینه کنترل مالاریا پیدا کرده است.
- تشخیص میکروسکوپی مالاریا همچنان بعنوان روش اصلی تشخیص آزمایشگاهی مالاریا در ایران باقی مانده است، اما همانگونه که اشاره شد این روش نقاط ضعفی هم دارد. مطالعه ای در انگلستان نشان داد که حدود ۱۰٪ لامها در این روش به اشتباه تشخیص داده می شوند.
- بر اساس راهنماهای موجود حداقل ۲۰۰ میدان گسترش ضخیم خون قبل از گزارش منفی بودن باید بررسی شود که این کار به حدود ۱۰-۵ دقیقه زمان توسط یک میکروسکوپیست متبحر نیاز دارد. اگر تنها گسترش نازک بررسی شود به حدود ۴۵ دقیقه نیاز است تا به حد تشخیص گسترش ضخیم برسد. در شرایط مناسب روش

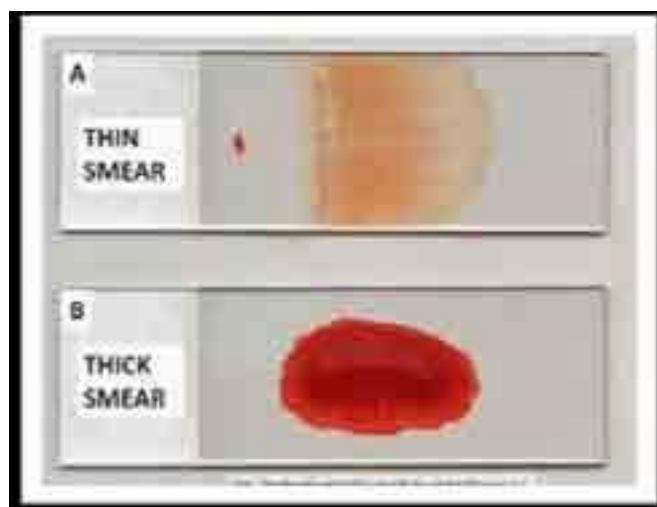
میکروسکوپی می تواند ۱۰-۵ انگل را در هر میکرولیتر خون تشخیص دهد اما این حساسیت بندرت در آزمایشگاهها قابل تحقق است و عوامل زیادی منجمله آموزش ناکافی میکروسکوپیست، فقدان مواد و تجهیزات با کیفیت مناسب و رنگ آمیزی و مشاهده تعداد زیادی لام خونی در زمان کوتاه بطور چشمگیری احتمال خطای تشخیصی را افزایش می دهد (شهبازی همکاران، بهار ۱۳۸۸).

متأسفانه اخیراً گزارشاتی مبنی بر میزان چشمگیر اشتباه در تشخیص انگل و اشتباه در تشخیص عفونت میکس مالاریا در ایران منتشر شده است. هرچند که اشتباه در تشخیص میکروسکوپی مالاریا در حد حساسیت و ویژگی این روش همچون سایر روش های تشخیصی قابل انتظار است ولی میزان بالای اشتباه در تشخیص گذشته از اینکه زنگ خطری برای برنامه کنترل مالاریا است، اعتبار بین المللی برنامه کنترل مالاریای ایران را نیز می تواند زیر سؤال ببرد .

ابراهیم زاده و همکاران میزان اشتباه در تشخیص انگل را در کشور ۴۳٪ و اشتباه در تشخیص عفونت میکس را حدود ۲۷٪ دانسته اند. همچنین ذاکری و همکاران نیز میزان اشتباه در تشخیص انگل را در مناطق مالاریا خیز کشور حدود ۳۴٪ و اشتباه در تشخیص عفونت میکس را حدود ۲۶٪ گزارش نمودند، در حالی که شهبازی در مطالعه ای به مقایسه تشخیص میکروسکوپی مالاریا در آزمایشگاههای فیلدی با تشخیص با PCR پرداخت که نتایج دو روش بر هم منطبق بودند و تنها یک مورد اشتباه در تشخیص عفونت میکس به روش میکروسکوپی مشاهده شد. به عبارت دیگر دقت تشخیص میکروسکوپی مالاریا در آزمایشگاههای صحرایی مالاریا در مناطق مالاریا خیز کشور قابل قبول است.

ضعف روش میکروسکوپی در تشخیص عفونت مخلوط (Mix) تا حد ۱۴٪ در سایر مطالعات نیز گزارش شده است که عمدتاً ناشی از کم دقتی و تعجیل میکروسکوپیست در گزارش مورد مثبت بوده است (شهبازی و همکاران، پاییز ۱۳۸۸).





استفاده از فلوروکرومها

روشهای میکروسکوپی بکار برنده فلوروکرومها نظیر اکریدین اورنج در اسمیر خون (Kawamoto, 1991) و یا در نمونه های خون سانتریفوژ شده (تکنیک QBC) گران و نیازمند تجهیزات خاص می باشد (Baird, 1992). تکنیک QBC ترکیبی از متدهای سانتریفوژ و رنگ آمیزی با اکریدین نارنجی است. روش QBC به منظور ارتقاء تشخیص میکروسکوپی انگل مالاریا و ساده تر نمودن تشخیص بیماری مالاریا طراحی شد (Clendennen et al., 1995). این روش شامل رنگ آمیزی DNA انگل با رنگهای فلورسنت از قبیل آکریدین اورنج در لوله های میکروهماتوکریت و متعاقب آن با میکروسکوپ اپی-فلوئورسنت است.

به طور خلاصه، خون نوک انگشت در یک لوله هماتوکریت حاوی اکریدین اورنج و ماده ضد انعقاد جمع آوری می گردد. لوله در ۱۲،۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و بلافاصله با استفاده از میکروسکوپ اپی-فلوئورسنت مورد بررسی قرار می گیرد. هسته انگل با فلورسانس سبز درخشان و سیتوپلاسم به رنگ زرد نارنجی دیده می شود. روش QBC بعنوان یک روش سریع و حساس برای تشخیص مالاریا در بسیاری از آزمایشگاه ها شناخته شده است. حساسیت این روش برای تشخیص پلاسمودیوم فالسی پاروم بیش از گونه های غیر پلاسمودیوم فالسی پاروم است و به دلیل رنگ آمیزی DNA گلبولهای سفید ویژگی آن نیز پایین است. اخیراً نشان داده شده است که روش اکریدین اورنج در مطالعات اپیدمیولوژیک در جمعیت های بومی از لحاظ مالاریا که در موارد زیادی بدون علامت هستند (در مقایسه با روشهای میکروسکوپ نوری و ایمونوکروماتوگرافی) روش تشخیصی ارجح است، که احتمالاً به دلیل بالا بودن حساسیت آن در پارازیتمی های اندک می باشد.

امروزه، میکروسکوپ فلورسنت قابل حمل با استفاده از فن آوری دیود ساطع کننده نور (LED)، و لامپهای شیشه ای از پیش آماده شده با معرف فلورسنت برای چسبیدن به انگل به صورت تجاری در دسترس هستند. با وجودی که روش QBC ساده، قابل اعتماد و سهل الاجرا است، ولی نیاز به تجهیزات خاص دارد، از روش معمول میکروسکوپی پرهزینه تر است و برای تعیین گونه و تعداد انگل ضعیف است (Adeoye et al., 2007).

تست های تشخیصی سریع (Rapid Diagnostic Tests, RDTs)

از زمانی که سازمان جهانی بهداشت (WHO)، برای غلبه بر کاستیهای تشخیص مالاریا با میکروسکوپ نوری، نیاز فوری به تست های تشخیصی جدید، ساده، سریع، دقیق و مقرون به صرفه را اعلام نموده است، تستهای تشخیصی سریع (RDTs) را می توان از مهمترین روشهای تشخیصی جایگزین دانست که سرعت و به راحتی قابل اجرا بوده و نیازی به جریان برق و تجهیزات ویژه ندارند. در حال حاضر، ۸۶ نوع از این تستها از ۲۸ شرکت تولید کننده برای تشخیص مالاریا به بازار عرضه شده است (WHO, 2008). بر خلاف تشخیص میکروسکوپی معمول که بوسیله آزمایش گسترشهای نازک و ضخیم خون محیطی رنگ آمیزی شده انجام می شود و یا روش QBC، همه تستهای تشخیصی سریع اساس یکسانی دارند و آنتی ژن مالاریا در جریان خون را در امتداد یک لایه حاوی آنتی بادی اختصاصی ضد مالاریا تشخیص می دهند. این آزمونها به تجهیزات آزمایشگاهی خاص نیاز ندارند و انجام آنها بسیار راحت است. مولکول هدف در بسیاری از این فرآورده ها یک پروتئین اختصاصی پلاسمودیوم فالسیپاروم، Histidine Rich Protein II (HRP II) و یا Lactate Dehydrogenase (LDH) است. اگر چه بیشتر محصولات RDT برای تشخیص مالاریای ناشی از پلاسمودیوم فالسی پاروم مناسب هستند، ولی برخی از تولید کنندگان ادعا می کنند که محصولاتشان میتوانند سرعت و بطور مؤثر مالاریای ویواکس را نیز تشخیص دهند (Kim et al., 2008).

به تازگی، یک روش RDT جدید برای تشخیص پلاسمودیوم ناولزی ارائه شده است. تستهای تشخیصی سریع امکان تشخیص مبتنی بر انگل بدون محدودیتهای تشخیص میکروسکوپی را فراهم آورده، فوائد چشمگیری را در مدیریت بیماریهای تب دار در مناطق دوردست به همراه داشته اند. هرچند که عملکرد RDT برای تشخیص مالاریا عالی گزارش شده است (Doderer et al., 2007)، ولی در برخی از گزارش ها از مناطق دوردست مالاریا خیز اختلاف چشمگیری در حساسیت این روش مشاهده شده است. به طور کلی، به نظر می رسد RDT ها یک ابزار تشخیصی بسیار با ارزش و سریع برای تشخیص مالاریا باشند، اما در حال حاضر از روشهای دیگر نیز بطور توأم برای تایید نتایج، تشخیص عفونت و پایش درمان باید استفاده نمود.

در حال حاضر سازمان جهانی بهداشت در حال تهیه راهنماهای کنترل کیفیت و تضمین کیفیت برای استفاده از تستهای تشخیصی سریع برای افزایش اعتماد جوامع به این فرآورده ها است. امروزه بدلیل سادگی و قابلیت اطمینان،

استفاده از RDT ها در مناطق مالاریا خیز روستایی، مناطق غیر بومی از لحاظ مالاریا و موارد مالاریای وارده افزایش یافته است (WHO, 2008).

این تستها بر اساس شناسایی آنتی ژنهای انگلهای مالاریا در خون لیز شده با استفاده از روشهای ایمنوکروماتوگرافی انجام می شوند. اکثر این تستها از یک dipstic یا استریپ پوشیده از مونوکلونال آنتی بادی فعال شده بر علیه Ag های هدف تشکیل شده اند و انجام آنها در مدت ۱۵ دقیقه ممکن است.

تستهای تجاری موجود از آنتی ژنهای زیر استفاده می کنند:

- Ag های رایج شامل Histidin-Rich Protein II قابل حل شدن در آب و تولید شده بوسیله تروفوزوئیت و گامتوسیت جوان پلاسمودیوم فالسی پاروم.
- لاکتات دهیدروژناز یا (pLDH) تولید شده توسط مراحل غیر جنسی و گامتوسیتهای انگلهای مالاریا.
- مخلوطی از HRP-II و آنتی ژنهای Pan-Malarian

ویژگیهای تستهای تشخیصی سریع

حساسیت بالای ۹۰٪ برای تشخیص پلاسمودیوم فالسی پاروم با تراکم بالای ۱۰۰ انگل در میکرولیتر خون. در تراکم زیر ۱۰۰ انگل در میکرولیتر خون حساسیت بشدت کاهش می یابد. برای سایر انگلها مطالعات کافی صورت نگرفته است.

- ویژگی بالای ۹۰٪ برای تشخیص پلاسمودیوم فالسی پاروم
- مثبت کاذب برای فاکتور روماتوئید
- مثبت با HRP-II تا ۱۴ روز بعد از درمان
- Predictive value (مثبت و منفی قابل قبول)

فواید تستهای تشخیصی سریع :

- ساده
- سریع
- تفسیر ساده
- یادگیری ساده
- عدم تفسیر متفاوت توسط افراد مختلف
- عدم نیاز به تجهیزات مثل میکروسکوپ، فضا، برق و ...
- قابل نگهداری در شرایط معمولی
- مفید برای موارد جدا شده (Sequestered) پلاسمودیوم فالسی پاروم

معایب تستهای تشخیصی سریع:

- برخی فقط برای پلاسمودیوم فالسی پاروم ساخته شده اند
- در مورد پلاسمودیوم فالسی پاروم تا ۱۴ روز مثبت است که با مقاومت دارویی اشتباه می شود.
- گرانتز از روش میکروسکوپی
- مثبت کاذب برای فاکتور روماتوئید
- کیفی است
- قادر به تمایز سه گونه دیگر نیست.
- آنهایی که آنتی ژنهای های گامتوسیت های پلاسمودیوم فالسی پاروم را تشخیص می دهند ممکن است مثبت کاذب داشته باشند، چون گامتوسیت های فالسی پاروم مدت زیادی پس از درمان در خون باقی می ماند.
- در موارد زیر *RDTs* توصیه می شود:
- مناطق دور دست (مراقبت های با فاصله چند روز)
- جمعیت های بسیار متحرک
- رواج تشخیص بالینی
- هزینه بالای تشخیص میکروسکوپی بدلیل ضرورت پایش مقاومت دارویی
- برای مناطقی که احتمال مالاریای عارضه دار در آنها زیاد است. ۹۰٪ موارد مرگ در ویتنام در ۴-۶ روز اول بعد از شروع علائم اتفاق می افتد. در میانمار فقط ۵۰٪-۴۰٪ بیماران به کارکنان آموزش دیده و تسهیلات مناسب دسترسی دارند.
- برای تمایز مالاریای شدید از سایر بیماریهای عفونی
- وقتی برق بطور موقت قطع می شود
- هنگامیکه سوخت کافی موجود نیست
- هنگام تعطیلات
- در مراکز اورژانس
- در صورت فقدان کارکنان نمونه گیر آموزش دیده
- هنگام مرخصی میکروسکوپیست
- جهت مسافران حساس که به مناطق مالاریا خیز مسافرت می کنند
- مسافران باز گشته از مناطق پر خطر برای خود تشخیصی (self-diagnosis) و خود درمانی (self-treatment)
- برای نیروهای نظامی در حال عملیات که نیاز شدید به خود تشخیصی و خود درمانی وجود دارد

در شرایط اضطراری شامل:

- تغییرات محیطی منجر به تکثیر کنترل نشده ناقلین
 - نارسایی های شدید سیستم بهداشتی
- در این شرایط می توان از RDTs برای بررسی اولیه مقاومت دارویی، تایید تشخیص بالینی، ارزیابی اولیه شیوع مالاریا و تایید اپیدمی و ... استفاده کرد.
- برای انتخاب یک RDTs به نکات زیر هم باید توجه داشت:
- گونه انگل
 - ثبات درجه حرارت برای حمل و نقل (زنجیره سرما)
 - میزان سهولت مورد نظر
 - حساسیت مورد نظر
 - هزینه
- وجود طرح کار (Plan of action)، کارکنان آموزش دیده، برنامه کنترل کیفیت و هدف معین برای استفاده از RDTs ضروری است.

روشهای تشخیص سرولوژی

تشخیص مالاریا با روش سرولوژیک معمولاً مبتنی بر تشخیص آنتی بادی ها بر علیه مرحله غیر جنسی انگل مالاریا در خون است. در دهه های اخیر آزمایش آنتی بادی ایمنو فلئورسانس یا IFA (Immunofluorescence) (Antibody Test) یک آزمون سرولوژی قابل اعتماد برای مالاریا بوده است (She et al., 2007).

اگر چه این روش وقت گیر و نسبتاً وابسته به فرد آزمایش کننده است ولی دارای حساسیت و ویژگی بالا می باشد. قابلیت اعتماد بالای این روش بحدی است که اغلب آن را استاندارد طلایی برای تشخیص سرولوژیک مالاریا می دانند (Doderer et al., 2007). از روش IFA می توان در مطالعات همه گیری شناسی، برای غربالگری خون اهدا کنندگان، و گاهی بعنوان شاهدهی بر عفونت های اخیر در افراد غیر ایمن بهره برد.

تا همین اواخر، در بانک های خون از این روش برای تشخیص آنتی بادیهای اختصاصی جنس پلاسمودیوم بمنظور ممانعت از انتقال مالاریا از طریق خون استفاده می شد. به عنوان مثال، در فرانسه IFA بخشی از استراتژی غربالگری هدفمند در انتقال خون است. اساس IFA این است که پس از عفونت با هر کدام از انواع پلاسمودیوم، آنتی بادی های اختصاصی از دو هفته پس از آغاز عفونت اولیه تولید می شوند و ۶ - ۳ ماه پس از پاک شدن انگل

باقی می ماند. در این آزمون از آنتی ژن اختصاصی یا خام بر روی یک لام استفاده می شود که در حرارت ۳۰- درجه سانتیگراد نگهداری می شود. با این روش مقادیر آنتی بادیهای IgG و IgM در نمونه سرم بیماران اندازه گیری می شود. تیتراهای بزرگتر از ۱:۲۰ معمولاً مثبت و تیتراهای کمتر از ۱:۲۰ منفی تلقی می شوند. تیتراهای بزرگتر از ۱:۲۰۰ بعنوان عفونت جدید طبقه بندی می گردند (Chotivanich et al., 2006). در مجموع می توان گفت که IFA ساده و حساس اما وقت گیر است و در هر روز تعداد محدودی نمونه را می توان بررسی نمود. این روش نیاز به میکروسکوپ فلورسانس و کارکنان آموزش دیده دارد و در مواردی که تیترا آنتی بادی پایین است تکنسینهای آزمایشگاهی مبتدی ممکن است در تشخیص دچار اشتباه شوند. علاوه بر این، بدلیل فقدان استانداردسازی معرفها و مواد، عملاً امکان سازگار کردن (harmonizing) نتایج بین آزمایشگاهها و استفاده روتین از آن در مراکز انتقال خون وجود ندارد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

همانطور که در بالا اشاره شد، هر یک از روش های سنتی تشخیص مالاریا دارای محدودیتهایی هستند. به همین جهت نیاز به فنون جدید تشخیص آزمایشگاهی مالاریا با حساسیت و ویژگی بالا کاملاً احساس می شد. تحولات اخیر در فن آوری های بیولوژی مولکولی، از جمله PCR، LAMP (loop-mediated isothermal amplification)، microarray، mass spectrometry، و فلوسیتومتری استراتژیهای جدیدی را برای تشخیص مالاریا مطرح نموده اند.

ثابت شده است که روشهای مبتنی بر PCR را می توان جزو حساس ترین و اختصاصی ترین روشهای تشخیص مالاریا بخصوص در موارد عفونت مخلوط (Mix) و یا کم انگل دانست (Morassin et al., 2002).

امروزه از روشهای مولکولی مبتنی بر PCR بشكل گسترده در مواردی همچون تأیید تشخیصهای اولیه، پیگیری پاسخ درمانی و شناسایی موارد مقاوم به داروهای ضد مالاریا و حتی تعیین شدت مقاومت استفاده می شود. میزان حساسیت آن حتی بیش از روشهای QBC و RDTs گزارش شده است (Rakotonirina et al., 2008). با وجود آنکه آزمایش میکروسکوپی گسترشهای ضخیم و نازک خون از سوی سازمان جهانی بهداشت بعنوان روش استاندارد طلایی برای تشخیص مالاریا معرفی شده است، ولی روش PCR حساسیت و ویژگی بالاتری را نشان داده است بطوریکه میتوان آنرا بهترین روش تشخیص مالاریا دانست (Morassin et al., 2002). با PCR می توان ۱-۵ انگل را در هر میکرولیتر خون (یعنی آلودگی در $\geq 0.0001\%$ از گلبولهای قرمز خون) را تشخیص داد در حالیکه توان تشخیص روش میکروسکوپی یا RDT در حدود ۱۰۰-۵۰ انگل / میکرولیتر از خون است.

علاوه بر این، با روش PCR می توان تعداد زیادی از نمونه ها را همزمان بررسی نمود (شهبازی همکاران، پاییز ۱۳۸۸).

کاربرد PCR در مالاریا

امروزه تکنیک PCR کاربردهای فراوانی در تشخیص و مطالعات مربوط به ژنتیک مالاریا پیدا کرده است. اگر چه آزمایش میکروسکوپی گسترش ضخیم خون همچنان روش انتخابی برای تشخیص عفونت مالاریا است، ولی در موارد بدون علائم با اشتباه توأم است. عدم تشخیص مالاریا زمانی اتفاق می افتد که سطح پارزیتی پایین باشد (۱) الی ۲ گلبول قرمز حاوی انگل در هر میکرولیتر خون).

در این موارد توسعه روش جایگزین برای تشخیص موارد با پارزیتی پایین در برنامه کنترل مالاریا و بخصوص غربالگری خونها برای استفاده در انتقال خون به ویژه در مناطق مالاریا خیز ضروری است. از جمله این روشها تکنیک تشخیص DNA براساس تکثیر آن در مراحل PCR می باشد. براساس مطالعات انجام شده تکنیک PCR قادر به تشخیص یک انگل در هر میلیمتر مکعب خون است که این آستانه تشخیص حداقل ۵ برابر کمتر از آستانه تشخیص توسط آزمایش میکروسکوپی گسترش ضخیم خون است (Warrel and Gilles, 2002).

امروزه در زمینه شناسایی ژنتیکی انگل مالاریا و به ویژه تعیین میزان تنوع ژنتیکی و پلی مورفیسم انگل مطالعات بیشماری توسط روشهای مبتنی بر PCR صورت می گیرد که نقش تعیین کننده ای در توسعه واکسن ها و داروهای ضد مالاریا ایفا نموده و خواهند نمود. در یکی از همین گروه از مطالعات شهبازی و همکاران طی یک مطالعه بر روی ۱۰۰ نمونه مالاریای ویواکس از مناطق مالاریا خیز کشور بر اساس تنوع ژنتیکی ژن *PvMSP-3a* سه بیوتایپ از انگل را تشخیص دادند که بیوتایپ A با ۷۸٪ فراوانی شایعتر از دو بیوتایپ دیگر گزارش گردید (Shahbazi et al., 2008 b).

به طور کلی از PCR برای تعیین اختلاف بین گونه ها، استرین ها، کلون ها و پلی مورفیسم ژن های مورد استفاده در واکسن، تعیین پلی مورفیسم آلی و توزیع جغرافیایی واریانت ها، مقاومت دارویی و کنترل درمان، تعیین عفونت مجدد از عود، تشخیص انگل در پشه، تعیین عفونت های پنهان و عفونت های مخلوط و تعیین مارکرهای مربوط به شدت بیماری زایی استفاده شده است (حیدری، ۱۳۸۴).

در سالهای اخیر در ایران تحقیقات زیادی بر روی انگل مالاریا با استفاده از روشهای مبتنی بر PCR انجام گرفته و نتایج مهم و ارزشمندی بدست آمده است. شهبازی و همکاران (۱۳۸۸) با استفاده از روش nested PCR توانستند پلاسمودیوم ویواکس را در افراد دارای سابقه ابتلا به مالاریای ویواکس در مناطق مالاریا خیز شمال غرب کشور ردیابی نمایند در حالیکه با روش میکروسکوپی کلیه موارد بررسی شده منفی بودند (شهبازی و همکاران، بهار ۱۳۸۸).

در مطالعه دیگر شهبازی و همکاران با روش PCR نشان دادند که انگلهای ویواکس در مناطق مالاریا خیز کشور نیز همچون بسیاری از مناطق دنیا از لحاظ ژنتیکی بشدت متنوع هستند و همین تنوع مانع اصلی در تهیه یک

واکسن مؤثر بر علیه آنها است و به همین دلیل است که علیرغم سرمایه‌گذاری هنگفت و تلاش فراوان در زمینه تولید واکسن هنوز پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در این زمینه حاصل نگشته است، و طی همین مطالعه مشخص شد که از مارکر ژنتیکی *PvMSP-3β* (حتی بدون تعیین توالی) می‌توان برای مطالعات جمعیتی انگل مالاریا بهره‌برد (Shahbazi et al., 2007).

در گزارش دیگر شهبازی و همکاران با تعیین توالی ژن *PvMSP-3β* نشان دادند که ژن مذکور در ایزوله‌های ایرانی انگل پلاسمودیوم ویواکس بشدت پلی مورفیک است و پلی مورفیسم نقطه‌ای فراوان در نوکلئوتیدها مشاهده گردید که همین موضوع کارایی این ژن را در تولید واکسن زیر سؤال می‌برد (Shahbazi et al., 2010).

دیاگرام درمان و پیگیری مبتلایان به مالاریا



جدول ۸-۲: داروهای ضد مالاریا

نام عمومی دارو	محل اثر دارو	نام تجاری دارو
کینین و کینیدین به صورت داخل وریدی در درمان مالاریای مغزی تزریق می شود (آلکالوئیدهای سین کونا)	شیزونتوسید خونی	-
کیناکرین	شیزونتوسید خونی	-
کلروکین (مکانیسم: مهار تشکیل هموزوئین و بالا بودن PH وزیکول انگل) - آمودیاکین (۴- آمینو کینولین ها)	گامتوسیت گش نابالغ + شیزونتوسید خونی. توانایی نابودی گامتوسیت بالغ فالسیپاروم را ندارد.	آرلن - آزوشین - نیواکین
پریماکین - کینوسید (۸ آمینو کینولین ها) باعث مهار تنفس میتوکندریایی انگل می شود	ضد هیپنوزوئیت، گامیتوسیت گش، شیزونتوسید کبدی	پریماکین (در فالسیپاروم از انتقال مالاریا جلوگیری می کند)
پریمتامین (مهار اسیدفولیک ردوکتاز)	اسپورنتوسید شیزونتوسید اولیه کبدی	دارا پریم مالوسید
کلروگوانید یا پروگوانیل (مهار دهیدروفولات ردوکتاز)	شیزونتوسید نسجی اولیه و اسپورنتوسید	پالودرین
سولفونامیدها	شیزونتوسید خونی	-
پریمتامین + سولفادوکسن	در درمان مالاریای فالسیپاروم مقاوم به چند دارو	فنسیدار
مفلوکین	در درمان مالاریای فالسیپاروم مقاوم به چند دارو	لاریام
پریمتامین + داپسون	شیزونتوسید خونی	مالوپریم
تیترا سایکلین	شیزونتوسید خونی	-
داکسی سیکلین + کلیندامایسین	و نسجی	ویبرامایسین هالفان
هالوفانتین (هالوفان)	در درمان مالاریای ، فالسیپاروم مقاوم به چند دارو	هالفان
آرتمیزینین	شیزونتوسید خونی در مالاریای مغزی	کین گائوسو
پیریتامین + سولفادوکسین + مفلوکین (فانسیمف)	در درمان مالاریای فالسیپاروم مقاوم به چند دارو	فانسیمف
آتوواکون + پروگوانیل (مالارون)	در درمان مالاریای ، فالسیپاروم مقاوم به چند دارو	مالارون
نورفلوکسامین و سیپروفلوکسامین	داروی ضدباکتریایی در پلاسمودیوم فالسیپارومی مقاوم به کلروکین	-

داروهای موثر بر روی اشکال نهفته (Hypnozoite) پریماکین و کینوسید هستند. تجویز پریماکین در زنان حامله، کودکان زیر یکسال و کمبود G6PD، افراد مبتلا به لوپوس و آرتریت روماتوئید ممنوع است. پریماکین قادر است گامتوسیت تمام پلاسمودیوم های انسانی را از بین ببرد. در درمان مالاریای فالسیپاروم مقاوم به کلروکین از ترکیب فنسیدار + کینین استفاده می کنند. در صورت مقاومت به فنسیدار از داروی مفلوکین استفاده می شود. اخیراً مقاومت انگل به مفلوکین گزارش شده است و بجای آن از داروی آرتیمی سینین استفاده می کنند. موارد مقاومت انگل به آرتیمی سینین تا به حال گزارش نشده است.

در جنوب شرقی ایران جهت درمان مالاریای فالسیپاروم مقاوم به کلروکین از ترکیبات آرتیمی سینین استفاده می شود. با توجه به اهمیت درمان مالاریا ضروری است جهت درمان این بیماری از پروتکل های به روز شده درمان مالاریا که از سوی اداره کنترل مالاریای مرکز مدیریت بیماریهای وزارت بهداشت منتشر می گردد و منطبق با وضعیت مقاومت گونه های شایع در ایران به داروهای موجود است استفاده گردد.

درمان مالاریای ویواکس بدون عارضه

پریماکین	کلروکین	
* پریماکین بعنوان داروی ضد عود در راستای درمان اساسی در کسانی که ممنوعیت مصرف ندارند از روز سوم درمان تجویز می شود	روز اول: ۶۰۰ میلی گرم (۴ قرص) روز دوم: ۶۰۰ میلی گرم (۴ قرص) روز سوم: ۳۰۰ میلی گرم (۲ قرص)	بزرگسالان
** پریماکین بعنوان داروی ضد عود در راستای درمان اساسی در کودکانی که ممنوعیت مصرف ندارند از روز سوم درمان تجویز می شود	روز اول: ۱۰ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن روز دوم: ۱۰ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن روز سوم: ۵ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن	کودکان

* تجویز پریماکین در افرادی که سابقه همولیز بدلیل کمبود فعالیت G6PD دارند ممنوع است. تجویز پریماکین در زنان باردار و شیرده (تا ۶ ماهگی) ممنوع است. درمان ضد عود (درمان اساسی) در زنان شیرده بعد از پایان ۶ ماه دوره شیردهی انجام می شود.

** تجویز پریماکین در کودکان کمتر از ۶ ماه ممنوع است.

درمان مالاریای ویواکس بدون عارضه در زنان باردار

خط دوم		خط اول
کینین + کلیندامایسین		کلروکین
کلیندامایسین ۶۰۰ میلی گرم / ۱۲ ساعت برای ۷ روز	کینین ۱۰ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن / ۸ ساعت (حداکثر ۶۰۰ میلی گرم / ۸ ساعت) برای ۳ روز	روز اول: ۶۰۰ میلی گرم (۴ قرص) روز دوم: ۶۰۰ میلی گرم (۴ قرص) روز سوم: ۳۰۰ میلی گرم (۲ قرص)

درمان مالاریای فالسی پاروم بدون عارضه

کودکان		بزرگسالان (افراد بالای ۱۴ سال یا وزن بدن بیش از ۴۰ کیلوگرم)		روز / دارو
فنسیدار	آرتسونیت	فنسیدار	آرتسونیت	
۲۵ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن (بر اساس جزء سولفادوکسین)	۴ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن	۳ قرص	۲۰۰ میلی گرم	اول
–	۴ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن	–	۲۰۰ میلی گرم	دوم
–	۴ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن	–	۲۰۰ میلی گرم	سوم*

* قرص آرتسونیت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرمی و فنسیدار به شکل قرص (۵۰۰ میلی گرم سولفادوکسین و ۲۵ میلی گرم پیریمتامین) در دسترس است.

توجه: در افراد بزرگسال با وزن بیش از ۸۰ کیلوگرم دوز روزانه آرتسونیت ۳۰۰ میلی گرم توصیه می شود.

کنترل و پیشگیری

(۱) آموزش بهداشت

(۲) مبارزه با ناقلین: استفاده از سموم حشره کش که عمده‌تاً خاصیت ابقایی دارند. این راه، روش مناسبی جهت مبارزه با لیشمانیوز جلدی است. برای کنترل بیولوژیکی می‌توان از ماهی‌های لاروخور به نام گامبوزیا، گویی و یا از باکتری‌های باسیلوس اسفریکوس و باسیلوس تورین ژینسیس استفاده کرد. قارچ‌های آبی به نام *Lagenidium giganteum* نیز برای لاروها کشنده هستند. باسیلوس تورین ژینسیس سروتیپ H_{14} باسیلی گرم مثبت است که در هنگام تولید اسپور، کریستالی موسوم به دلتا اندوتوکسین تولید می‌کند که برای لاروها خاصیت کشندگی دارد.

(۳) کشف و درمان مخازن و تقویت نظام مراقبت بیماری

(۴) محافظت فردی که شامل استفاده از پشه بند آغشته به حشره کشهای ابقایی، استفاده از دورکننده‌های (رپلانتها) شیمیایی.

(۵) بهسازی محیط

(۶) پیشگیری دارویی با استفاده از داروهایی نظیر کلروکین، مفلوکین و داکسی سیکلین بر اساس پروتکل‌های استاندارد.

پلاسمودیوم‌های حیوانی

مالاریای جوندگان: برای مطالعات آزمایشگاهی از پلاسمودیوم برگئی استفاده می‌کنند زیرا برخلاف سایر مالاریاهای جوندگان توانایی آلوده کردن انسان را ندارد. ویژگیهای این نوع از انگل مالاریا عبارتند از:

(۱) در این نوع مالاریا پدیده استپلینگ دیده نمی‌شود.

(۲) شیزوگونی خونی در جوندگان بیشتر از ۲۴ ساعت طول نمی‌کشد.

(۳) تعداد مروزوئیت‌های خونی بیشتر از ۱۲ تجاوز نمی‌کند.

(۴) عفونت مضاعف بسیار رایج است.

(۵) در برخی از گونه‌ها شیزوگونی نسجی ثانویه بیشتر در کبد رخ می‌دهد.

(۶) گامتوسیت‌ها کروی هستند.

شامپانزه میزبان مناسبی برای پلاسمودیوم ویواکس و میمون‌های جغدی برای پلاسمودیوم فالسیپاروم محسوب می‌شوند.

از پلاسمودیوم ناولزی به عنوان مدلی جهت مطالعه پلاسمودیوم ویواکس و از پلاسمودیوم سمی اواله جهت مطالعه پلاسمودیوم اوال استفاده می‌کنند.

مالاریای پرندگان: از قدیمی‌ترین پلاسمودیوم‌های مورد مطالعه انسانی است (مثل مالاریای اردک).

ویژگی های مالاریای پرندگان:

- (۱) مرحله رینگ در خون مشاهده نمی شود.
 - (۲) ناقل برخلاف آنوفل، پشه های آئدس و کولکس هستند.
 - (۳) برخلاف نوع انسانی مرحله شیزوگونی خارج خونی به طور مکرر انجام پذیرفته و مروزوئیت ها بیشتر در بافتهای رتیکولو اندوتلیال (بافت مزودرمال) جای می گیرند.
 - (۴) در مالاریای پرندگان به اولین شیزونت تشکیل یافته شیزونت مادر گویند.
 - (۵) برخلاف گامتوسیت های انسانی، گامتوسیت های موزی شکل در بدن پشه بالغ می شوند نه میزبان واسط مهره دار.
 - (۶) تعداد مروزوئیت های نسجی از چند عدد تا ۱۰۰ عدد متغیر و در مورد مروزوئیت های خونی به ۳۵ عدد می رسد.
 - (۷) شیزوگونی خونی در پرندگان از ۱۲، ۲۴ تا ۳۶ ساعت متغیر است.
 - (۸) نظیر مالاریای جوندگان، پرندگان دارای RBC هسته دار بیضوی هستند.
- جنس هموپروتئوس:** گونه مهم این جنس هموپروتئوس کلمبه (مالاریای کبوتر) است. به دلیل اینکه عمدتاً شیزوگونی را به طور نسجی در اندوتلیوم ریه کبوتر سپری می کند، بدان مالاریای ناقص گویند. در هموپروتئوس شیزوگونی خونی دیده نمی شود. با پاره شدن هر شیزونت هزاران مروزوئیت یا سیتومر مشاهده می شود. در خون محیطی تنها گامتوسیتها مشاهده می شوند. گامتوسیت ها شبیه گامتوسیت فالسیپاروم می باشند. ناقل هموپروتئوس مگس های هیپوبوسیده هستند. اووکینت هموپروتئوس برخلاف پلاسمودیوم توده ای از پیگمان در انتهای خلفی دارد.
- جنس لکوسیتوزون:** انگل پرندگان بوده (اردک) و گامتوگونی در لکوسیت ها و گلبول های قرمز نارس انجام میگیرد. ناقل مگس سیاه سیمولیوم (مثل ناقل انکوسرکا و مانسونلا اوزاردی) است و همانند بابریا در هیچ یک از مراحل سیکل زندگی پیگمان تشکیل نمی شود. گاهاً شیزونت هایی به نام مگالوشیزونت ایجاد می کند که توانایی تولید بیش از یک میلیون مروزوئیت را دارد.

تشخیص و مورفولوژی انگل های مالاریا

✱ کلیدهای تشخیص افتراقی گونه های مختلف مالاریا در گسترش خونی

- نکات ضروری مورد بررسی برای تشخیص انگل در گسترش نازک

✓ اندازه گلبولهای قرمز سالم

✓ اندازه و شکل گلبولهای قرمز آلوده

✓ مراحل مختلف انگل مالاریا در گلبولهای قرمز

✓ رنگدانه (پیگمان) در گسترش خون

✓ دانه های استیپلینگ در گسترش خون

- نکات ضروری مورد بررسی برای تشخیص انگل در گسترش ضخیم

➤ مراحل مختلف انگل مالاریا در گسترش خون

➤ رنگدانه (پیگمان) در گسترش خون

➤ دانه های استیپلینگ در گسترش خون

✱ تفاوت گونه های مختلف مالاریا در گسترش نازک

شکل ظاهری	P.f	P.v	P.o	P.m
بزرگ شدن گلبول قرمز آلوده	-	+	+	-
شکل گلبولهای انگل دار	گرد	گرد، از شکل طبیعی خارج شده	بیضی، ریشه دار	گرد
استیپلینگ گلبول قرمز آلوده	شکاف های مورر	دانه های شوفر	دانه های شوفر	دانه های زمین (مشاهده نمی شود)
شکل تروفوزوئیت	رینگ کوچک تکه تکه	رینگ بزرگ آمیبوئید	رینگ بزرگ متراکم	رینگ کوچک متراکم
نقطه کروماتین	اغلب دوتایی (دوبل)	تک (بندرت دوتایی)	درشت و تک	تک
شیزونت بالغ	۱۲-۳۰ روزوئیت (بندرت)	۱۲-۲۴ روزوئیت	۴-۱۲ روزوئیت (پراکنده)	۶-۱۲ روزوئیت (روزت فرم)
گامتوسیت	هلالی موزی شکل	بزرگ ، گرد	بزرگ ، گرد	متراکم ، گرد

* تفاوت گونه های مختلف مالاریا در گسترش ضخیم

اشکال اختصاصی گونه های مالاریا	تروفوزوئیت	شیزونت	گامتوسیت
P.F مشاهده تروفوزوئیت جوان، در حال رشد و گامتوسیت بالغ	اندازه کوچک تا متوسط، اغلب فراوان کاما یا حلقوی کروماتین ۱-۲ عدد سیتوپلاسم منظم، ظریف یا بندرت گوشتالو رنگدانه متراکم یا پراکنده	اندازه کوچک و فشرده بندرت دیده می شود اشکال بالغ ۳۰-۱۲ مروزوئیت اغلب خوشه متراکم رنگدانه توده تیره	اشکال هلالی کروماتین یکی رنگدانه پراکنده، زردرنگ اشکال پیر فقط کروماتین و رنگدانه دیده می شود
P.V مشاهده همه مراحل انگل، دانه های شوفر واضح بویژه در لبه گسترش	اندازه کوچک تا بزرگ، تعداد متوسط شکل حلقوی و نامنظم کروماتین ۱-۲ عدد سیتوپلاسم نامنظم یا تکه تکه رنگدانه پراکنده و ظریف و زردرنگ	اندازه بزرگ تعداد کم تا متوسط اشکال بالغ ۲۴-۱۲ مروزوئیت و متوسط ۱۶ عدد، خوشه ای، نامنظم رنگدانه توده پراکنده	اشکال گرد و بزرگ، کروماتین یکی و واضح رنگدانه پراکنده و ظریف در صورت رنگ آمیزی مناسب اشکال پیر فقط کروماتین و رنگدانه دیده می شود
P.O مشاهده همه مراحل انگل، دانه های شوفر واضح بویژه در لبه گسترش	اندازه ممکن است از P.V کوچکتر باشد تعداد معمولاً کم شکل حلقوی و فشرده کروماتین یک عدد و درشت سیتوپلاسم نسبتاً واضح، منظم و گوشتالو رنگدانه پراکنده و ضخیم	اندازه اغلب شبیه P.m تعداد کم اشکال بالغ ۱۲-۴ مروزوئیت و اغلب ۸ عدد پراکنده، رنگدانه توده متمرکز زرد رنگ	اشکال گرد و کوچکتر از P.v کروماتین یکی و واضح رنگدانه پراکنده و درشت در صورت رنگ آمیزی مناسب اشکال پیر فقط کروماتین و رنگدانه دیده می شود
P.M مشاهده همه مراحل انگل	اندازه کوچک، تعداد کم، گرد و فشرده کروماتین یک عدد و اشکال چشم پرنده، بزرگ سیتوپلاسم منظم و متراکم رنگدانه پراکنده و فراوان و زرد یا تیره رنگ	اندازه کوچک و فشرده تعداد کم اشکال بالغ ۱۲-۶ مروزوئیت و معمولاً ۸ عدد پراکنده، رنگدانه متمرکز	اشکال گرد و فشرده، کروماتین یکی رنگدانه پراکنده و درشت در صورت رنگ آمیزی مناسب اشکال پیر فقط کروماتین و رنگدانه دیده می شود

* مرحله تروفوزوئیت

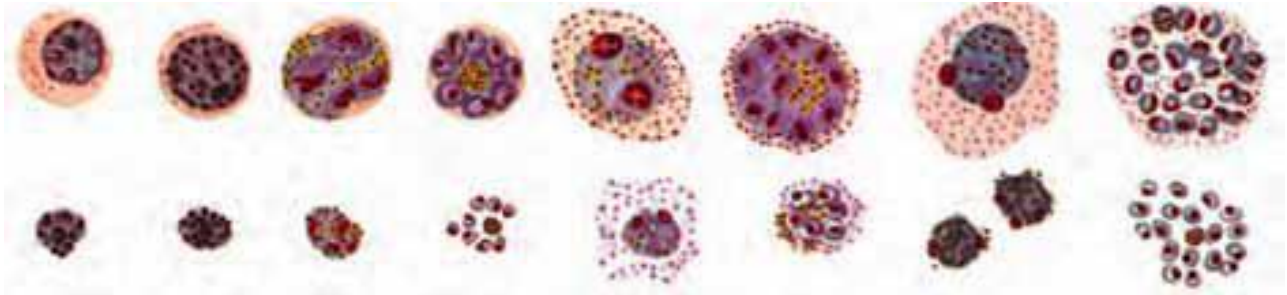
- ❖ این مرحله رایج ترین مرحله است.
- ❖ "حلقه" که اغلب مرحله رینگ نامیده می شود، ممکن است در گسترش های ضخیم ناقص به نظر برسد.
- ❖ تروفوزوئیت می تواند از کوچک تا کاملاً بزرگ در سلول میزبان متفاوت باشد.
- ❖ معمولاً یک نقطه کروماتین وجود دارد.
- ❖ کروماتین دو نقطه ای (دابل) در *P. falciparum* شایع است.
- ❖ سیتوپلاسم اشکال مختلفی دارد، از یک حلقه مشخص و ظریف گرفته تا اشکالی نامنظم یا عجیب و غریب که گاهی اوقات "آمیبوئید" نامیده می شود.
- ❖ با رشد انگل، رنگدانه ظاهر می شود. معمولاً رنگ نمی گیرد اما رنگ آن از قهوه ای طلایی تا قهوه ای تیره یا حتی سیاه متغیر است.



* مرحله شیزونت

- این مرحله به راحتی قابل تشخیص است.
- زمانی شروع می شود که تروفوزوئیت به ظرفیت کامل خود رسیده و کروماتین به دو قسمت تقسیم می شود.
- انگل شروع به تولید مثل غیرجنسی می کند، یعنی سلول با تقسیم ساده به "سلول های دختر" (مروزویت ها) تقسیم می شود.
- چندین تقسیم دیگر از کروماتین ادامه می یابد که نشان دهنده رشد شیزونت است، تا زمانی که اجسام کروماتین زیادی بوجود آید که هر کدام سیتوپلاسم همراه خود را دارند.
- تعداد تقسیمات کروماتین و مروزویت به شناسایی گونه کمک می کند.

➤ این انگل‌های جدید که به وضوح مشخص شده‌اند (مروژوئیت)، اکنون آماده خروج از سلول میزبان برای حمله به گلبول‌های قرمز جدید هستند.



* مرحله گامتوسیت

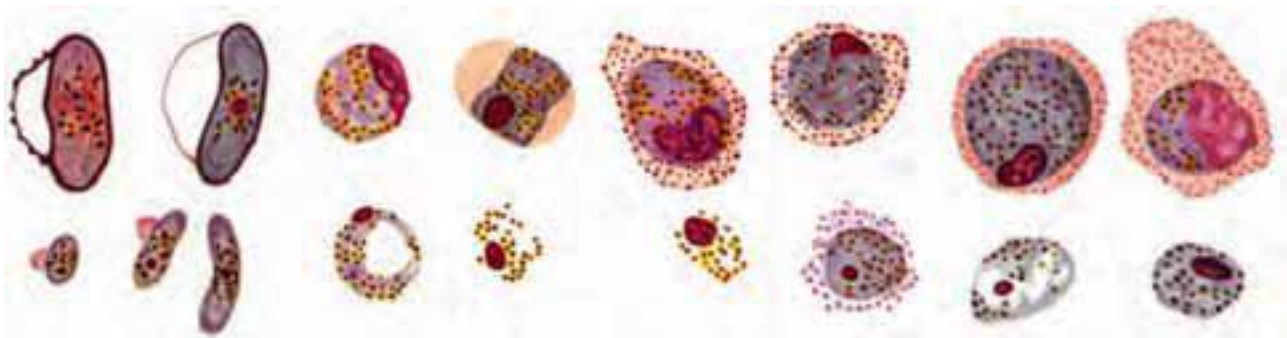
✓ انگل در این مرحله جهت انجام مرحله جنسی در ناقل پشه آنوفل ماده، به گامتوسیت نر یا ماده تبدیل می‌شود.

✓ گامتوسیت‌ها بسته به گونه، گرد یا موزی شکل هستند.

✓ روشی که انگل رنگ را می‌گیرد به تشخیص جنسیت انگل در گسترش نازک کمک می‌کند:

نر (میکروگامتوسیت) یا ماده (ماکروگامتوسیت).

✓ تمایز بین گامتوسیت‌های نر و ماده در گسترش ضخیم دشوار است.



*پلاسمودیوم فالسی پاروم (P.Falciparum)

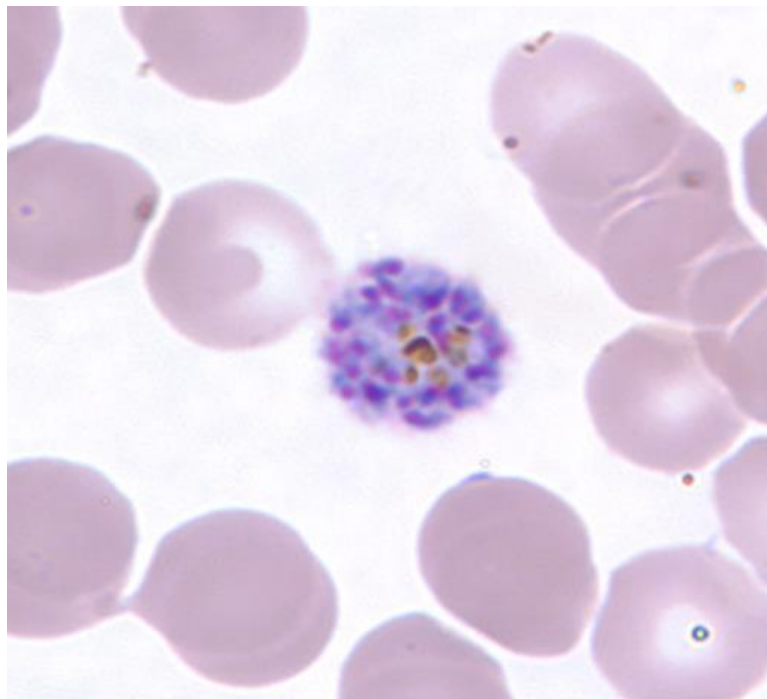
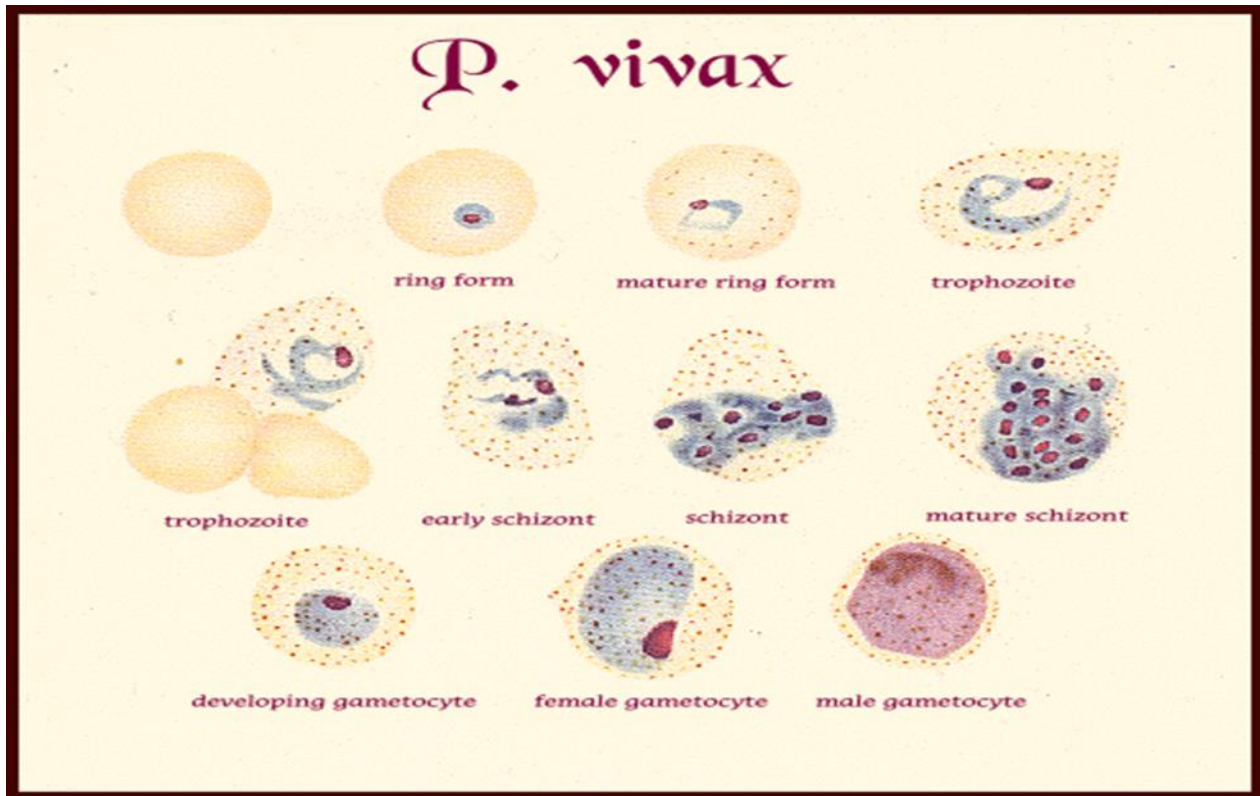
- پلاسمودیوم فالسیپاروم به تمام رده های گلبول سرخ حمله می کند.
- در عفونت های شدید اشکال رینگ و گامتوسیت در خون محیطی دیده می شود.
- شیزوگونی عمدتاً در مویرگهای اندوتلیوم عضلات و احشاء رخ می دهد.
- از ویژگیهای این گونه وجود بیش از یک رینگ در هر گلبول (double Infection یا triple infection) و رینگ های ۲ کروماتینی است.
- مالاریای فالسیپاروم تقریباً به طور انحصاری در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری شایع است و سبب بیماری مالاریای سه یک بدخیم یا Estivoautumnal = تابستانی - پاییزی می شود.
- گامتوسیت های فالسیپاروم برخلاف گونه های دیگر باریک و سوسپسی شکل و معمولاً یک هفته بعد از تروفوزوئیت های جوان در خون محیطی ظاهر می شوند.
- به همراه گونه ریچنووی، در زیر جنس لاورانیا قرار می گیرد.
- پدیده استپلینگ سبب تشکیل دانه های نامنظم قرمز تیره (خرمایی)، میله ای یا گوه ای شکل با سطح ناصاف می شود که به آن شکاف یا دانه های مورر گویند.
- این دانه ها بقایای کشیدگی حفره انگلی در سیتوپلاسم گلبول قرمز هستند.
- شیزونتها کوچک و کروی فشرده شده و به طور متوسط حاوی ۲۴ مروزوئیت می شوند.
- در پ. فالسیپاروم پدیده ظهور مجدد (Recrudescence) در شیزوگونی خونی انجام می پذیرد.
- ماکروگامتوسیت در فالسیپاروم Toxon-shape (کمانی) است.
- ماکروگامتوسیت نسبت به گامتوسیت نر بزرگتر، باریکتر و کشیده تر و هسته متراکم مرکزی با پیگمانهای تجمع یافته و سیتوپلاسم یکنواخت و غلیظ است.
- میکروگامتوسیت موزی شکل (banana-shape) یا کلیوی (kidney-from) است.
- میکروگامتوسیت از ماکروگامتوسیت کوتاهتر و پهن تر و هسته پخش و نامنظم دارد.
- در پ. فالسیپاروم به دلیل وجود برجستگیهایی به نام knob بر روی گلبول های قرمز همراه با اسیدآمین هیسیتیدین بعد از مرحله تروفوزوئیت جوان چسبندگی انگل به اندوتلیوم عروق مویرگی اتفاق می افتد (Sequestration) که در نتیجه اشکال بینابینی شیزوگونی حدفاصل تروفوزوئیت جوان تا شیزونت رسیده در خون محیطی کمتر مشاهده می شود. به این پدیده Sticky گویند.

□ در گامتوسیت‌های پ. فالسیپاروم برخلاف سایر پلاسمودیوم‌ها انتشار رنگدانه‌ها در اطراف کروماتین است.

گونه پلاسمودیوم	پ. فالسیپاروم	پ. مالاریه	پ. اواله	پ. ویواکس
ظهور مجدد recrudescences	+	+	-/+	-/+
رنگ سیتوپلاسم انگل	نرمال، گاهی مایل به آبی	نرمال	بدون رنگ، رنگ پریده	بدون رنگ، رنگ پریده
رینگ‌های چند تایی	شایع	بندرت	کم و بیش	کم و بیش
حضور مراحل انگلی در خون محیطی	اشکال رینگ جوان با مقادیر بسیار کم گامتوسیت	اغلب رینگ‌های کم با شیزونت‌ها و گامتوسیت‌های فراوان	همه مراحل وجود دارد	همه مراحل انگلی وجود دارد
وجود تروفوزوئیت جوان (اشکال ابتدایی رینگ)	دارای رینگ ظریف و کوچک با نقاط کروماتینی کوچک و گاهی جدار گلبول در اثر چسبیدن انگل به شکل آپلیکه در می‌آید. (ظریف ترین رینگ)	رینگ اغلب کوچکتر از نوع ویواکس و ۱/۸ سلول را فرا گرفته و دارای نقاط کروماتینی بزرگ	به شکل آمیوئید و بزرگتر از ویواکس است و رینگ بیشتر (ضخیم ترین رینگ)	رینگ ۱/۳ فضای گلبول قرمز را فرا گرفته و نقاط کروماتینی بزرگ
تعداد مزوزوئیت در شیزوگونی خونی	۸-۳۲ (۲۴)	۶-۱۲ عدد (۸) مزوزوئیت‌ها به شکل روزت	۶-۲۴	۱۲-۲۴ (۱۶) مزوزوئیت‌ها به شکل دانه‌های انگور به هم چسبیده

*پلاسمودیوم ویواکس (P.Vivax)

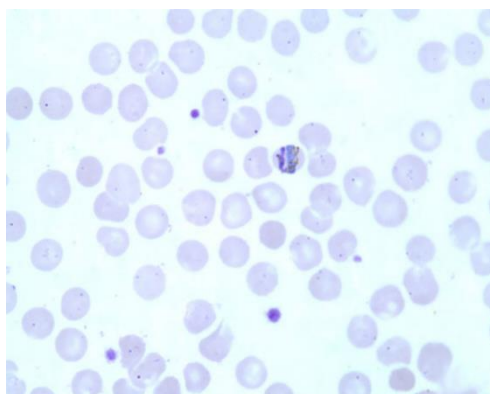
- این گونه، شایعترین پلاسمودیوم در اغلب نقاط جهان بوده و در تمامی مناطق بومی و مناطق معتدل گسترش یافته است.
- پلاسمودیوم ویواکس به گلبولهای نابالغ بزرگتر (رتیکولوسیت ها) و کم رنگ حمله می کند.
- به دلیل اشکال هیپنوزوئیت در کبد عود (relapse) بیماری دیده می شود.
- به بیماری حاصل از این انگل مالاریای سه یک خوش خیم گویند.
- در سطح سیتوپلاسم RBC آلوده تعداد زیادی دانه های نارنجی رنگ، نسبتاً درشت و صاف به نام دانه های شافنر (Schuffner) بوجود می آید. این دانه ها حاوی پروتئین های انگل بوده و در غشای گلبول قرمز ایجاد می شوند.
- افراد سیاه پوست به دلیل فقدان گروه خونی دافی به این انگل مقاومند.
- دانه های شافنر از ویژگیهای تشخیصی تروفوزوئیت انگل است.
- تروفوزوئیت انگل به شکل نامنظم دیده می شود که به آن حالت آمیوئید گویند.
- گاهی اوقات انگل در ابتدا به صورت توده های هلالی در محیط RBC مشاهده می شود که به آن اشکال آپلیکه یا آکول گویند.
- اشکال اولیه یا رینگ ظریف و بزرگ است به طوری که یک سوم فضای گلبول سرخ را اشغال می کند.
- گامتوسیت ها گرد و تقریباً تمام گلبول قرمز را اشغال می کنند.
- میکروگامتوسیت با رنگ پذیری کمتر هسته و سیتوپلاسم و ماکروگامتوسیت با سیتوپلاسم آبی تیره و هسته متراکم دیده می شود.
- شیزونت خونی بزرگ و حاوی ۲۴-۱۶ مروزوئیت است (به شکل دانه های انگور بهم چسبیده).
- هر مروزوئیت ۲-۵/۱ میکرون قطر دارد.



پ.فالسپاروم	پ.مالاریه	پ.اواله	پ.ویواکس
فرم آپلیکه، دوبل کروماتین، چند انگل در RBC	اشکال نواری، تخم مرغی یا مستطیلی شکل	اشکال کشیده و بیضوی با لبه های ساییده شده با اشکال شبیه ستاره دنباله دار	آمیوئید
مقاومت دارویی	–	–	+/-
طول اسپروگونی در ۲۵ درجه	۲۵-۲۸ روز	۱۴-۱۶ روز	۹-۱۰ روز
دوره شیزوگونی نسبی و تعداد مروزوئیت ها	۱۵ روز حاوی ۱۵۰۰۰ مروزوئیت	۹ روز و حاوی ۱۵۰۰۰ مروزوئیت	۸ روز حاوی ۱۰۰۰۰ مروزوئیت
دوره انکوباسیون (دوره کمون) (۶ تا ۴۰ روز)	۸-۴۰ روز (۳۰)	۱۰-۱۷ روز (۱۴)	۸-۱۷ روز (۱۴)
شدت بیماری	شدید	آرام	آرام تا متوسط
الگوی تب آغازی	متناوب – پیوسته (۴۸ ساعته)	نامنظم (۴۸ ساعته)	نامنظم (۴۸ ساعته)
دوره علائم (شیزوگونی خونی)	۳۶-۴۸ ساعته	۴۸ ساعته	۴۸ ساعته
شدت حملات	شدید	متوسط تا شدید	متوسط تا شدید
میانگین تداوم بیماری	۱۶-۳۶ ساعت	۱۰ ساعت	۱۰ ساعت
نوع RBC های درگیر	تمام رده های RBC	RBC های جوان (Retic)	RBC های جوان (Retic)
نوع دانه های استپلینگ	دانه های مورر با سطح خشن	دانه های شافتر یا جیمز دات با سطح صاف و ظریف	دانه شافتر با سطح صاف و ظریف
آئمی (همولیتیک و نورموکروم)	شدید	خفیف	خفیف تا متوسط
درگیری CNS	شایع	گاهاً	خیلی کم
سندروم نفروتیک (نفروز)	خیلی کم	خیلی کم	گاهاً
وجود سیکل خارجی گلبولی	–	+	+
عود (Relapses) یا رکورنس	–	+	+

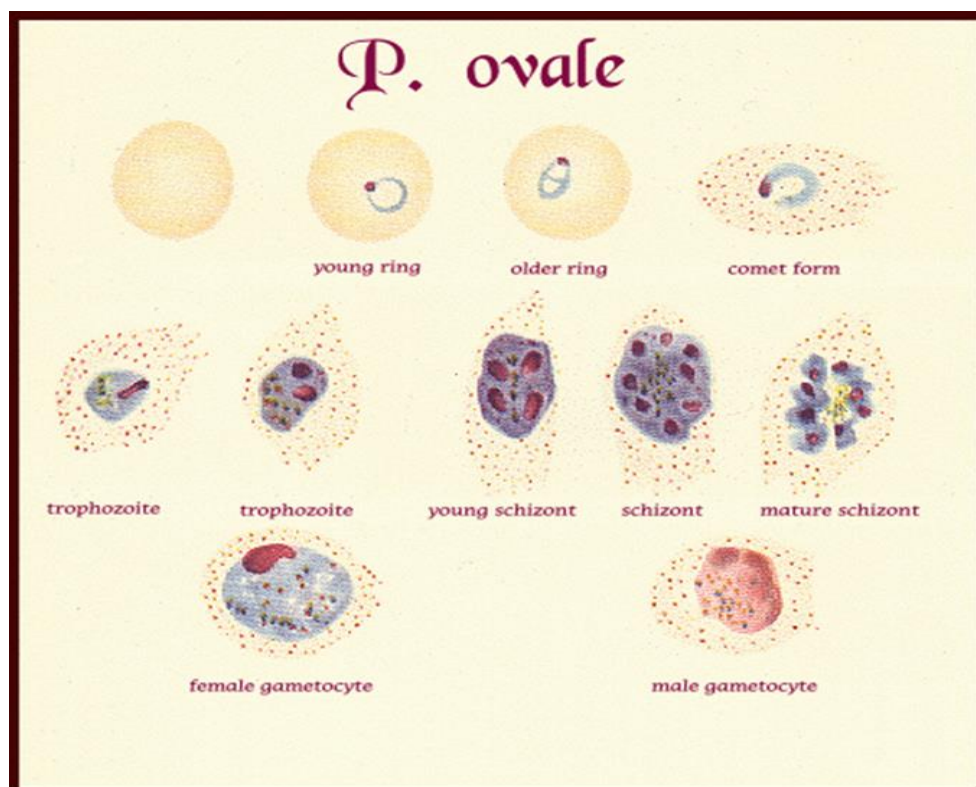
* پلاسمودیوم مالاریه Plasmodium malariae

- این نوع پلاسمودیوم در مناطق نیمه گرمسیری و معتدل شایع است و نسبت به پ. فالسیپاروم و پ. ویواکس شیوع کمتری دارد.
- این انگل گلبول های سرخ کوچک (پیر) را بیشتر درگیر کرده مالاریای چهار یک خوش خیم (Quartan) ایجاد می نماید.
- شیزوگونی خونی پلاسمودیوم مالاریه ۷۲ ساعته و در سایر گونه ها ۴۸ ساعته است.
- رینگ جوان در پلاسمودیوم مالاریه شبیه پلاسمودیوم ویواکس ولی کوچکتر، نامنظم تر، متراکم تر باسیتوپلاسم آبی است. (رینگ مالاریه نسبت به گونه های دیگر کوچکتر است)
- برخلاف پ. فالسیپاروم پارازیتمی در این انگل پایین است.
- گاهی Knob در تروفوزوئیت مالاریه دیده می شود.
- پس از مرحله رینگ فعالیت آمیبی انگل متوقف و انگل در طول RBC به فرم نواری و بلند (Band-form) یا اشکال تخم مرغی مشاهده می شود.
- بندرت ممکن است بر روی گلبولهای سرخ نقاط صورتی کم رنگ و ریز و غبار مانند موسوم به دانه های زیمن (Ziemann's dots) مشاهده شود.
- گاهی تروفوزوئیت مالاریه به اشکال چشم جغدی یا فرم سبدی نیز دیده می شود.
- در پلاسمودیوم مالاریه به علت افزایش pH سیتوپلاسم رنگ سلول آلوده پررنگ تر است.
- بعضی ها معتقدند پلاسمودیوم برازیلیانوم همان پلاسمودیوم مالاریه در دنیای جدید در میمونها می باشد.
- متقارن ترین شیزونت در پ. مالاریه و نامتقارن ترین شیزونت در پ. فالسیپاروم مشاهده می شود.



* پلاسمودیوم اووال Plasmodium ovale

- ❖ این پلاسمودیوم در ساحل آفریقای غربی شایع است.
- ❖ عامل تب مالاریای خوش خیم است.
- ❖ مانند ویواکس به گلبولهای نارس (بزرگ) ولی با درصدی پایین تر حمله می کند.
- ❖ گلبول آلوده به شکل بیضی با لبه های رشته ای، ساییده و نامنظم (شبیه ستاره دنباله دار) دیده می شود (Fimbriated margins) یا (Commet form).
- ❖ دانه های شافرن که، گاهی 'dots james' نیز نامیده می شوند، نسبت به دانه های شافرن پ. ویواکس تیره تر، درشت تر و زیادتر است.
- ❖ گلبولهای قرمز آلوده به صورت رنگ پریده مشاهده می شوند.
- ❖ طی شیزوگونی خونی ۸-۱۲ روزوئیت ایجاد می شود، هر چند گاهی شیزونتهایی با ۱۶-۱۴ و ۱۸-۱۲ روزوئیت هم دیده شده است.
- ❖ گامتوسیت همانند پ. فالسیپاروم دیرتر در خون محیطی ظاهر می شود.
- ❖ بهبودی خودبخودی ابتدایی در پلاسمودیوم اووال شایع تر است.



تشخیص مالاریا

*اهمیت تشخیص مالاریا

- ❖ یکی از استراتژی های کاربردی برای کاهش مرگ و میر ناشی از بیماری مالاریا در جهان تشخیص سریع و درمان کامل و موثر است.
- ❖ بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، اگر بیمار مبتلا به مالاریا در مدت ۲۴ ساعت درمان نشود این بیماری می تواند به نوبه خود به بیماری شدید تبدیل گردد که اغلب منجر به مرگ می شود.
- ❖ همچنین براساس توصیه این سازمان لازم است تمام موارد مشکوک به مالاریا، قبل از درمان تحت بررسی تشخیص میکروسکوپی توسط میکروسکوپیست آموزش دیده و یا روش تشخیص سریع مالاریا قرار گیرند.
- ❖ وجود شواهد آزمایشگاهی برای تمام موارد مشکوک و موارد قطعی مالاریا از الزامات حذف بیماری و پیش نیاز اخذ گواهی حذف مالاریا از سوی سازمان جهانی بهداشت می باشد.
- ❖ به این منظور در سالیان اخیر علاوه بر تقویت کیفی و کمی دوره های بازآموزی، نظام تضمین کیفیت و ارزشیابی آزمایشگاه های مالاریا توسط ناظر مستقل، برنامه ریزی و اجرا شد که بهبود کیفیت خدمات تشخیص در سراسر کشور را به ارمغان آورد.
- ❖ تشخیص فقط براساس علایم بالینی و بدون انجام آزمایش توصیه نمی شود

*تشخیص میکروسکوپی مالاریا

- مواد و وسایل لازم جهت رنگ آمیزی گسترش های لام خون محیطی بیمار
- برای پذیرش بیمار، لازم است وسایل و مواد لازم مانند لام های تمیز، لانست یک بار مصرف، همچنین محلول بافر و رنگ گیمسا از قبل در آزمایشگاه در دسترس باشد.

توجه:

- (۱) استفاده از دستکش در تمام مراحل کار در آزمایشگاه ضروری است.
- (۲) از نگهداری لامها در محلول شوینده برای بیش از یک روز جدا خودداری شود. زیرا، تبخیر آب سبب لکه در لامها شده و از روی لام پاک نخواهد شد.
- (۳) هنگام شستشو، خشک کردن، و بسته بندی لام ها، از تماس دست با سطح لام شدیداً خودداری شود.

کیفیت لام های مورد استفاده در آزمایشگاه مالاریا

- به منظور تهیه گسترشهای نازک و ضخیم خون ضروری است که از لامهای تمیز و استاندارد استفاده شود.
- از بکارگیری لامهایی که ظاهر شبنم زده یا زمینه رنگین کمانی دارند، لامهایی که کاملاً تمیز نشده اند و یا از لامهایی که لبه های مضرس و یا سطح خراشیده یا چرب دارند جدا خودداری شود زیرا موجب اختلال در تهیه گسترش های خونی، رنگ آمیزی و تشخیص انگل میشوند.

مراحل شستشو و تمیز کردن لام های استفاده نشده

- جهت شستشو و تمیز کردن این گونه لامها لازم است نکات زیر مرحله به مرحله انجام شود:
- A. غوطه ور کردن آهسته لامها در یک سطل پلاستیکی متوسط دارای آب گرم و ماده شوینده به مدت ۲-۴ ساعت.
 - B. شستن جداگانه هر لام با پارچه نرم و بدون پرز با آب تمیز برای حذف کامل ماده شوینده از روی لام.
 - C. قرار دادن لام ها در یک سطل دارای آب مقطر و یا آب تمیز به مدت ۲۴ ساعت.
 - D. خشک کردن جداگانه هر لام با پارچه تمیز نرم و بدون پرز و یا قرار دادن عمودی لام ها روی جای لام شیاردار.

E. بسته بندی ۱۰ تایی لام ها در کاغذ سفید نو با ابعاد 15×11 سانتی متر، با نوار چسب و قرار دادن لام ها در جعبه لام و بستن درب آن.

F. نگهداری لامها در یک مکان خشک، یک کمد گرم و یا در یک دسیکاتور دارای مواد جذب کننده رطوبت.

G. برای کنترل کیفیت لام ها، روی هر جعبه لام ذکر نام فرد تهیه کننده و تاریخ بسته بندی لام ها ضروری است.

تهیه محلول بافر جهت رقیق کردن رنگ گیمسا

محلول بافر کاربرد بسیار برای تشخیص مالاریا دارد. معمولاً برای تهیه محلول بافر از قرص های بافر آماده در مراکز بهداشتی و آزمایشگاهها استفاده می شود.

روش دیگر تهیه محلول بافر با استفاده از پودر بافر می باشد که به شرح زیر است:

وسایل و مواد لازم برای تهیه بافر با $\text{PH} = 7.2$ در آزمایشگاه

○ ارلن مایر شیشه ای درب دار ۱۰۰۰ میلی لیتر

○ نوار PH و یا دستگاه PH متر

○ ترازوی حساس یا دیجیتال

○ یک گرم دی سدیم هیدروژن فسفات خشک (Na_2HPO_4)

○ ۷/۰ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)

* طرز تهیه محلول بافر $\text{PH} = 7.2$

یک گرم دی سدیم هیدروژن فسفات خشک و ۷/۰ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات خشک با ترازو وزن شود:

□ مواد فوق را ابتدا در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر یا آب خالص در ارلن مایر درب دار حل کرده،

سپس حجم آن با آب مقطر یا آب خالص به یک لیتر رسانده شود و درب آن را محکم بسته و

با چند بار حرکت دورانی، نمک ها ی فوق در آب مقطر حل شده، سپس در یخچال معمولی

نگهداری شود.

□ محلول بافر به مدت یک ماه و تا زمانی که رنگ آن کدر نشده، قابل استفاده است. در صورتی که تهیه محلول بافر در شرایط استریل تهیه و نگهداری شود، مدت زمان استفاده از آن طولانی تر (حدوداً یکسال) خواهد بود.

□ بعد از تهیه بافر لازم است PH آن اندازه گیری شود. باید محلول بافر تهیه شده دارای $PH=7.2$ باشد. و نیز تاریخ تهیه و نام تهیه کننده بر روی ارلن مایردارای محلول بافر، ذکر شود.

*تهیه محلول تنظیم PH (محلول تصحیح کننده ۲ درصد)

محلول تصحیح کننده در واقع برای تنظیم PH محلول بافر که به هردلیلی تغییر کرده باشد، استفاده می شود:

✓ مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از بافرهای پتاسیم دی هیدروژن فسفات و دی سدیم هیدروژن فسفات با غلظت ۲درصد ساخته و در شرایط خنک و دور از نور نگهداری شود.

✓ استفاده از نور یا دستگاه PH متر برای تنظیم $PH=7.2$ محلول بافر

✓ اگر محلول بافر با PH کمتر از ۲/۷ (اسیدی) باشد، برای تنظیم بافر از فسفات دی سدیک ۲ درصد (Na_2PO_4) استفاده شود.

✓ اگر محلول بافر با PH بیشتر از ۲/۷ (قلیایی) باشد، برای تنظیم بافر از فسفات منو پتاسیک ۲ درصد (KH_2PO_4) استفاده شود.

✓ این محلول بافر تا زمانی که رنگ آن کدر نشده است قابل استفاده می باشد.

*تهیه محلول استوک بافر

تهیه این نوع محلول بافر برای مسافرت های صحرایی یا ارسال به مناطق دور مناسب است:

• ۳ گرم Na_2HPO_4 خشک

• ۱/۲ گرم KH_2PO_4

• مواد فوق را در ۲۵ میلی لیتر آب مقطر یا آب غیر یونیزه حل کرده، محلول غلیظ تهیه شده در یک بطری شیشه ای تیره رنگ درب پیچ دار و دور از نور نگهداری شود. این محلول تا چند هفته برای مصرف مناسب است.

* تهیه محلول بافر برای کار روزانه

- یک میلی لیتر از محلول غلیظ تهیه شده در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر یا آب خالص رقیق شود.
- ضروری است قبل از مصرف روزانه PH بافر اندازه گیری شود.

* تهیه بسته های پودر بافر آماده

- میتوان دو نمک فسفات وزن شده را داخل یک لوله یا ظرف پلاستیکی قرارداد و درب آن را محکم بست. بایستی بر روی برچسب آن مشخصات پودر داخل لوله یا ظرف، تاریخ تهیه و نام تهیه کننده را ذکر نمود.
- درموقع نیاز، محتویات بسته به یک لیتر آب مقطر اضافه و مخلوط شود، سپس $PH=7/2$ آن را تنظیم کرده و به روش معمول استفاده شود.

* تهیه محلول استوک رنگ گیمسا

- ❖ معمولا از میان رنگهای رومانوفسکی، رنگ گیمسا برای رنگ آمیزی لامهای خون به منظور تشخیص انگل مالاریا، رنگ مطمئن و استاندارد است و کیفیت پایداری در برابر حرارت دارد.
- ❖ این رنگ هم به صورت محلول آماده و هم به صورت پودر در بازار موجود است و کیفیت رنگ به شرکت تولید کننده آن بستگی دارد.
- ❖ ازاین رو توصیه میشود که محلول گیمسا از یک تولید کننده مطمئن خریداری شود.
- ❖ لازم است تعدادی لام گسترش نازک و ضخیم خون با رنگ گیمسای خریداری شده با رقت ها و زمان های مختلف رنگ آمیزی شود تا کیفیت رنگ مورد بررسی قرار گیرد.

* تهیه رنگ گیمسا:

(۱) پودر گیمسا ۸/۳ گرم (۲) متانول ۲۵۰ میلی لیتر (۳) گلیسرول ۲۵۰ میلی لیتر

- ابتدا پودر گیمسا ساخت Sigma در هاون چینی قرار داده شود و با دسته هاون پودر را به مدت یک تا دو ساعت ساییده تا پودر کاملاً نرم شود.
- سپس گلیسرین را کم کم به پودر اضافه کرده و با دسته هاون هم زدن ادامه یابد تا خوب با هم مخلوط شوند.
- سپس متانول خالص کم کم به آن اضافه شده و همزده شود تا مواد کاملاً باهم مخلوط گردد.
- در نهایت محلول گیمسای استوک تهیه شده را در شیشه تمیز و خشک قهوه ای رنگ قرار داده و درب آن محکم بسته شود.
- سپس در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شود.
- هر روز، روزی ۳ بار (هر بار ۵ دقیقه) با حرکت دورانی به آرامی چرخانده شود.
- بعد از ۱۵ روز رنگ آماده مصرف است. البته لازم است قبل از مصرف، رنگ از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ عبور داده شود.
- حدود ۵۰ میلی لیتر از این محلول را در شیشه قهوه ای رنگ درب سمباده ای قطره چکانی قرار داده و از آن می توان برای مصرف روزانه استفاده کرد.

*توجه:

- ✓ با توجه به امکان تغییر در تولید هر سری رنگ ، لازم است قبل از اتمام رنگ و استفاده از سری جدید رنگ خریداری شده، با آزمایش کنترل کیفی، (تعدادی لام با رقت ها و زمان های متفاوت رنگ آمیزی شود) و مناسب بودن رنگ تایید شود.
- ✓ هر سری رنگ دارای برچسب مناسب با تاریخ مصرف باشد.
- ✓ رنگ استوک گیمسا بایستی در بطری های قهوه ای رنگ، در جای خنک و دور از نور نگهداری شود و درب آن محکم بسته شده باشد و از باز و بست کردن غیر ضروری درب شیشه خودداری شود.
- ✓ چنانچه شیشه قهوه ای رنگ موجود نباشد، بهتر است ظروف شیشه شفاف دارای رنگ گیمسا، با کاغذ تیره ضخیم پوشانده شود تا از نور محفوظ بماند.

* تهیه گسترش نازک و ضخیم خون بر روی یک لام

گرفتن نمونه خون از بیمار:

لازم است تمام وسایل نمونه گیری از قبل آماده و در دسترس باشد. تا بعد از پذیرش بیمار، مشخصات بیمار در فرم مخصوص ثبت شود و مرحله خونگیری و تهیه گسترشهای خون، سریع و با دقت انجام گیرد.

پس از نشانیدن بیمار روی صندلی دسته دارمشمایی، ثبت مشخصات و اطلاعات بیمار در فرم مخصوص، تهیه گسترشهای خون به روش زیرانجام گیرد :

(۱) معمولاً انگشت وسط و یا انگشت حلقه دست چپ (انگشت سوم و یا چهارم مراجعه کننده) از سمت انگشت شست دست، برای نمونه گیری انتخاب و بند انتهایی انگشت مورد نظر با یک گلوله پنبه آغشته به الکل اتیلیک ۷۰ درصد کاملاً تمیز و ضدعفونی شود.

برای نوزادان انگشت شست پا انتخاب گردد (هرگز نباید از انگشت شست دست نوزادان و بزرگسالان برای گرفتن نمونه استفاده شود).

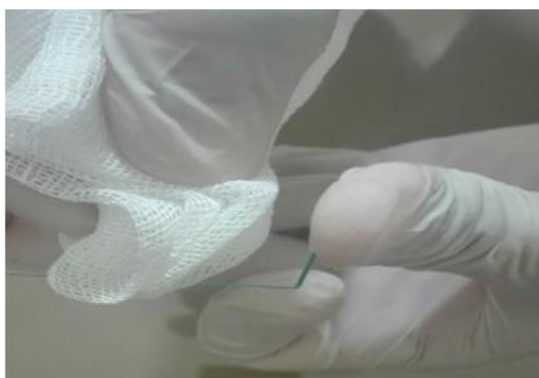
(۲) با لانست یک بار مصرف استریل به لبه کناری نوک انگشت مورد نظر با یک حرکت سریع ضربه ای ملایم وارد شود و با فشار ملایم و آرام به قاعده بند انگشت، اولین قطره خون خارج شده را با یک گلوله پنبه خشک پاک شود. از قطرات بعدی خون برای تهیه گسترشهای نازک و ضخیم خون استفاده شود.

(۳) بند انتهایی انگشت بیمار را فشار داده و ۳ قطره خون به صورت سه راس مثلث در وسط قسمت یک سوم ابتدای لام اول جهت تهیه گسترش ضخیم و یک قطره خون هم به فاصله دو سانتی متر در پایین سه قطره، در قسمت دو سوم لام قرار داده و سپس یک لام لبه صاف دیگر را برداشته و لبه لام دوم (لام پخش کننده) را در جلوی یک قطره قرار داده و با زاویه حدود ۴۵ درجه لام را به سمت یک قطره حرکت داده تا با قطره تماس پیدا کند تا قطره به دو طرف لام پخش شود.

قبل از رسیدن خون به دو طرف لام اولی (لام گسترش های خون)، لام دومی را با حرکت یکنواخت و آرام به سمت انگشت شست حرکت داده و با این عمل، خون روی سطح لام اول پخش می شود.

با گوشه همین لام، سه قطره خون را در جهت عقربه ساعت به صورت دورانی بهم زده می شود تا از خون، یک دایره به قطر ۱/۵ - ۱ سانتی متر تهیه شود و با این عمل هم زدن، خون نیز دفیبرینه می‌گردد.

لازم به ذکر است معمولا گسترش نازک در مدت چند ثانیه و گسترش ضخیم در حداقل ۶۰ - ۱۵ دقیقه خشک می‌شود. در ناحیه عرض ضخیم تر گسترش نازک خشک شده، نام، شماره بیمار و تاریخ تهیه لام فقط با مداد سیاه نرم نوشته شود.



(۱) تمیز کردن لام



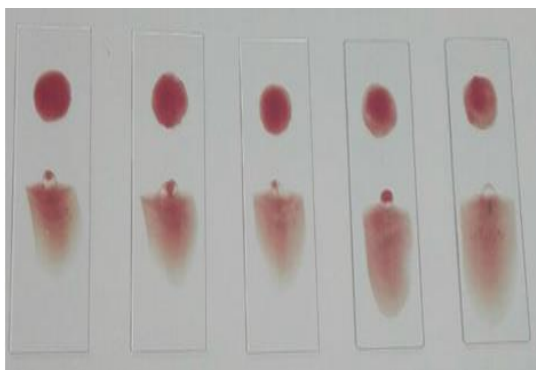
(۲) ضد عفونی کردن محل نمونه گیری



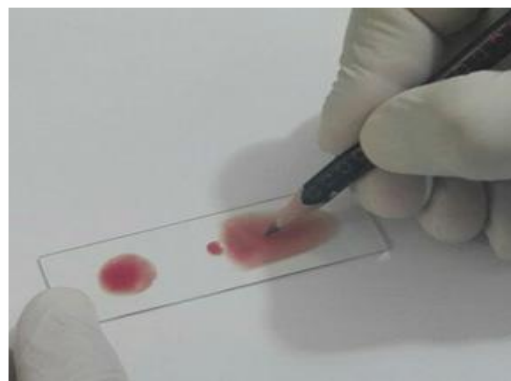
(۳) ضربه مناسب لانتست به محل مورد نظر



(۴) تهیه گسترش های خون



(۵) گسترش های خون استاندارد



(۶) نوشتن مشخصات بیمار

*توجه:

- ✓ جداً از استفاده از خودکار برای نوشتن مشخصات بیمار روی گسترش خون خودداری گردد.
- ✓ برای خشک شدن لام از جعبه لام سفری و یا یک قفسه سطح صاف و افقی استفاده شود.
- ✓ برای محفوظ ماندن از گرد و غبار، حشرات، گرمای شدید و رطوبت، ضروری است در اولین فرصت پس از خشک شدن نمونه، لام در فرم پذیرش و ثبت بیمار، بسته بندی شود و به آزمایشگاه منتقل گردد.
- ✓ باید مراقب بود تا انگشتان با سطوح لام تماس پیدا نکند.

* تاکید می شود از گسترش های خونی غیراستاندارد نشان داده شده در تصاویر زیر، برای رنگ آمیزی گسترش های خون در آزمایشگاه مالاریا استفاده نشود:



گسترش های با حجم زیاد خون



لامهای چرب که از روی لام شسته می شوند



لامهای لبه پریده یا دارای خراش



گسترش خون בעلت محل نامناسب خون روی لام



گسترش خون استاندارد

*معمولا گسترش های استاندارد خون دارای، یک گسترش ضخیم با ۲۰ طبقه گلبول قرمز و به قطر ۱/۵ - ۱ سانتی متر، و یک گسترش نازک معمولا دارای یک طبقه یا لایه گلبول قرمز است. فاصله گسترش ها از کناره های لام چند میلیمتر باید باشد و مشخصات بیمار در قاعده یا قسمت ضخیم تر گسترش نازک با مداد مشکی نوشته شود.

تفسیر گسترش های نازک و ضخیم خون

گسترش نازک خون	گسترش ضخیم خون
گلبول های قرمز تک لایه فیکس شده	گلبول های قرمز لیز شده
دارای حجم کمتر خون	دارای حجم بیشتر خون
۰/۰۰۵ میکرولیتر خون / ۱۰۰ میدان	۰/۲۵ میکرولیتر خون / ۱۰۰ میدان
تشخیص افتراقی گونه ها امکانپذیر است	تشخیص افتراقی گونه ها مشکل است
برای خواندن تست به زمان بیشتری مورد نیاز است	روش خوبی برای غربالگری در زمان کم است
امکان مشاهده انگل با حجم کم خون مشکل است	امکان مشاهده انگل بیشتر است



*وسایل و مواد لازم جهت رنگ آمیزی گسترش های خون

- جالام شیاردار
- دستکش لاتکس بدون پودر
- پل رنگ آمیزی
- شیشه قهوه ای درب سمباده ای قطره چکانی، ۵۰ میلی لیتری
- متانول خالص

توجه:

- ❖ برای رنگ آمیزی بهتر، لازم است گسترشهای ضخیم و نازک روی لامهای مجزا تهیه شوند و از غلظت های متفاوت با زمانهای متفاوت برای رنگ آمیزی آنها استفاده شود. البته غالبا این کار امکان پذیر نیست و معمولا گسترشهای ضخیم و نازک روی یک لام تهیه میشود.
 - ❖ رنگ آمیزی گسترش ضخیم با کیفیت خوب از اهمیت بیشتری برخوردار است. بهترین نتیجه هنگامی بدست می آید که گسترشهای خون طی یک شب خشک شوند.
 - ❖ تهیه رنگ ۳ درصد با محلول بافر رقیق شده و صاف کردن رنگ با استفاده از کاغذ صافی شماره ۲ به منظور حذف رسوب رنگ ضروری است.
 - ❖ برای هر لام بین ۵-۳ میلی لیتر رنگ رقیق شده نیاز است.
 - ❖ زمان رنگ آمیزی استاندارد به مدت ۴۵ - ۳۰ دقیقه است. البته زمان دقیق رنگ آمیزی به صورت تجربی در فرآیند رنگ آمیزی بدست می آید.
 - ❖ لازم است قبل از رنگ آمیزی، از ثبت مشخصات بیمار بر روی لام و در دفتر ثبت مشخصات بیمار مطمئن شوید.
- در صورت عدم مشاهده آن، کارشناس مربوطه را مطلع و لام بیمار از لیست حذف گردد.

*روش رنگ آمیزی رایج گسترش های خون

- ✓ ابتدا باید اجازه داده شود تا گسترش ضخیم لامها کاملا خشک شود، در صورتی که دستیابی سریع به نتایج ضروری باشد، میتوان گسترش های ضخیم را به کمک بادبزن یا قرار دادن در معرض گرمای ملایم (مثل گرمای لامپ میکروسکوپ) خشک کرد. البته باید مراقب بود تا از گرم نمودن بیش از حد پرهیز شود، در غیر این صورت، گسترش ضخیم به وسیله گرما تثبیت خواهد شد و قابل استفاده نخواهد بود.
- ✓ روی سطح گسترش نازک چند قطره متانول خالص اضافه کرده که بعد از چند ثانیه لام فیکس میشود. باید گسترش ضخیم را همولیز کرد بنابراین نباید با الکل یا بخار آن فیکس شود. و باید از تماس آن با متانول یا بخار آن جلوگیری نمود.
- ✓ برای رنگ آمیزی گسترشهای خون به تعداد بیماران مراجعه کننده روشهای متفاوتی اعمال می شود.
- ✓ در صورتی که تعداد بیماران کم باشد از روش معمولی یا روتین رنگ آمیزی به مدت ۴۵ - ۳۰ دقیقه و از رنگ گیمسا ۳ درصد استفاده می شود.
- ✓ برای تهیه رنگ گیمسا ۳ درصد از محلول بافر استفاده می شود. سه قطره از رنگ به هر میلی لیتر بافر اضافه شود تا غلظت مناسب محلول گیمسا بدست آید.
- ✓ برای هر لام حدود ۵-۳ میلی لیتر از محلول رنگ تهیه شده نیاز است (۱۵ - ۹ قطره گیمسا برای ۵-۳ میلی لیتر بافر)، به آرامی رنگ روی لام ها اضافه شده تا کاملا سطح لام ها از رنگ پوشیده شود. برای این کار می توان از یک پیپت پاستوراستفاده کرد.
- ✓ بعد از پایان زمان رنگ آمیزی، بطور آهسته قطره های بافر از گوشه سمت گسترش نازک اضافه شود، تا رنگ کاملا از روی لام شسته شود.

*ارزیابی یک گسترش نازک رنگ آمیزی شده با کیفیت استاندارد

- (۱) زمینه لام بایستی آبی آسمانی و عاری از هرگونه بقایای مواد و رسوب رنگ باشد.
- (۲) همچنین گلبول های قرمز به رنگ صورتی مایل به خاکستری کمرنگ باشد.
- (۳) هسته های گلبول های سفید نوتروفیل به رنگ ارغوانی تیره و دانه های گرانول به خوبی در آن مشخص باشد.
- (۴) کروماتین انگل های مالاریا به رنگ قرمز ارغوانی تیره و سیتوپلاسم آن ها به رنگ آبی مایل به ارغوانی روشن است.
- (۵) در گلبول های قرمز آلوده به پلاسمودیم ویواکس یا پلاسمودیم اووال اغلب مشاهده نقاطی به نام دانه های شوفر و دارای رینگ بزرگ است.
- (۶) در پلاسمودیم فالسیپارم امکان مشاهده شکاف های مورر وجود دارد که بیشتر در گلبولهای قرمز در لبه های گسترش مشاهده می شود.
- (۷) اگر گسترش نازک یک لام روی یک روز نامه یا نوشته قرار داده شود، در انتهای لام که معمولا گلبول های قرمز تک لایه هستند نوشته ها قابل دیدن و خوانده شدن باشند.

* ارزیابی یک گسترش ضخیم رنگ آمیزی شده با کیفیت استاندارد

(a) زمینه لام بایستی آبی آسمانی و عاری از بقایای رنگ و بدون لکه های خاکستری پررنگ ناشی از گلبول قرمز لیز شده باشد.

(b) هسته های گلبول های سفید نوتروفیل به رنگ ارغوانی تیره و دانه های گرانول به خوبی در آن مشخص باشد .

(c) انگل های مالاریا دارای کروماتین کاملاً قرمز و سیتوپلاسم آبی ارغوانی کمرنگ باشد.

(d) یک گسترش ضخیم بایستی دارای ۲۰ لایه گلبول قرمز باشد. و در هر میدان میکروسکوپی حدوداً ۱۵ - ۱۰ گلبول سفید دیده شود و اگر لام روی یک روزنامه یا نوشته قرار داده شود ، نوشته ها دیده می شود ولی به سختی قابل خواندن باشد .

(e) معمولاً پلاکت های صورتی رنگ به صورت منفرد، چندتایی یا خوشه مانند در کنار هم دیده می شوند.

* لازم به ذکر است دیدن گسترش های نازک و ضخیم خون هر دو برای تشخیص مالاریا ضروری است.

* لازم است برای دادن گزارش یک لام خون محیطی، ابتدا گسترش ضخیم هر لام برای جستجو انگل مورد بررسی قرار گیرد. سپس برای تعیین نوع انگل و مراحل آن گسترش نازک را جستجو کرد. از این طریق می توان به جواب مطمئن تری دسترسی پیدا کرد.

* باید توجه داشت در موارد نتیجه منفی لام به تنهایی به گسترش نازک نباید اکتفا شود. لازم است نتیجه قطعی لام نیز با گسترش ضخیم تایید گردد.

* شمارش انگل های مالاریا در گسترش خون

شمارش انگل مالاریا در لام خون محیطی برای پیگیری اثر درمان اهمیت بسزایی دارد و به پزشک برای تصمیم گیری و تجویز دارو کمک اساسی می کند.

* نحوه شمارش انگل ها در هر میکرولیتر خون

□ شمارش انگل بر اساس شمارش تعداد انگل ها در هر میکرولیتر خون در گسترش ضخیم انجام می شود. این انگل ها در مقایسه با تعداد گلبول های سفید فرد بیمار که از قبل مشخص شده است، تعیین شده شمارش می شوند.

□ البته بطور متوسط تعداد ۸۰۰۰ هزار گلبول سفید در هر میکرولیتر به عنوان تعداد استاندارد در نظر گرفته می شود.

با استفاده از فرمول زیر می شد تعداد انگل ها را در هر میکرولیتر خون محاسبه نمود:

$$\frac{\text{تعداد انگل های شمارش شده} \times 8000}{\text{تعداد گلبول های سفید شمارش شده}} = \text{تعداد انگل در هر میکرولیتر خون}$$