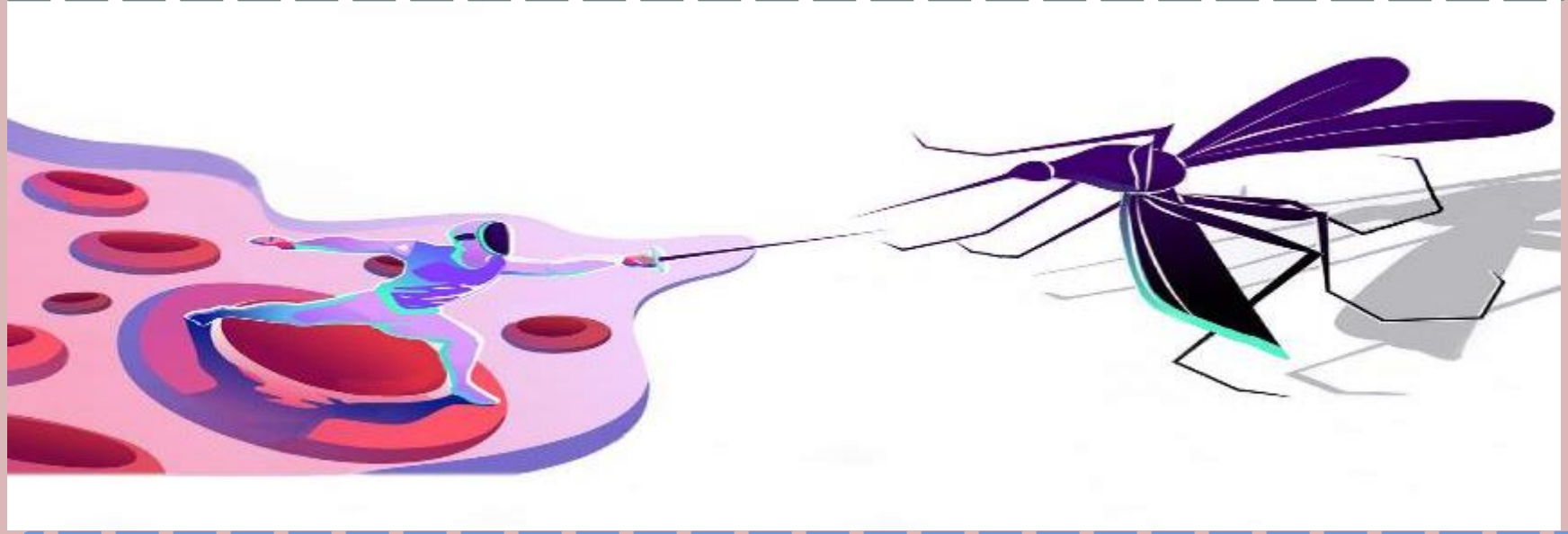
بسم الله الرحمن الرحيم

مالاریا و تغییرات مورفولوژیک گلبول قرمزدر انواع مختلف پلاسمودیوم



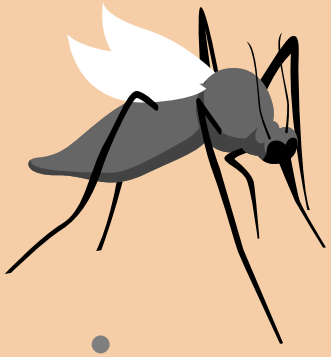
تهیه کننده گان:

اعضای گروه مرجع کشوری تشخیص میکروسکوپی مالاریا(NCG)

زمستان 1402

فهرست

1. چرخه زندگی انگل مالاریا
2. علائم بیماری و راههای انتقال
3. روش تشخیص میکروسکوپی
4. تهیه گسترش استاندارد
5. طریقه رنگ آمیزی گیمسا
6. روش تشخیصی RDT
7. روش مولکولی PCR
8. ویژگیهای مورفولوژیک انواع مختلف پلاسمودیوم
9. پلاسمودیوم فالسیپاروم
10. پلاسمودیوم ویواکس
11. پلاسمودیوم اوال
12. پلاسمودیوم مالاریه
13. پلاسمودیوم ناولزی
14. پیگیری موارد مثبت مالاریا
15. آرتیفکتها
16. سایر انگلهای خونی
17. شمارش انگلی



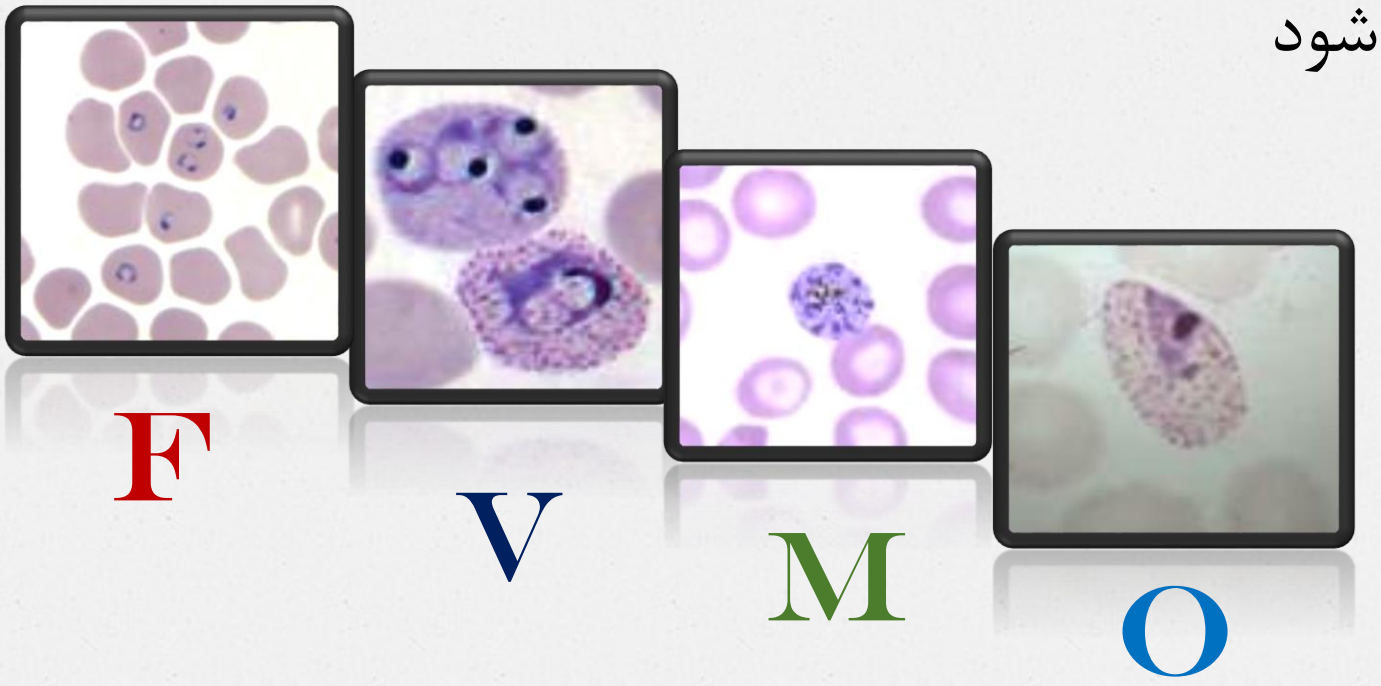
اهداف آموزشی

انتظار می رود فراگیر در انتهای دوره بتواند:

- انواع مختلف پلاسمودیوم را تشخیص دهد
- از نمونه بیمار یک لام استاندارد تهیه کند
- رنگ آمیزی استاندارد گیمسا را بداند و بتواند یک لام استاندارد رنگ آمیزی کند
- شمارش انگلی را در لامهای مثبت انجام دهد

مالاریا

یک بیماری انگلی است که توسط انواع پلاسمودیومها ایجاد می شود



مالاریا

- از مهم ترین بیماری های تک یاخته انگلی در جهان
- انتقال ازطریق *گزش پشه آنوفل ماده*
- کلمه مالاریا از دو بخش **mal** به معنای بد و **area** به معنای هوا
- دلیل نامگذاری به این عنوان: بروز بیماری اغلب در آب و هوای بد و باتلاقی

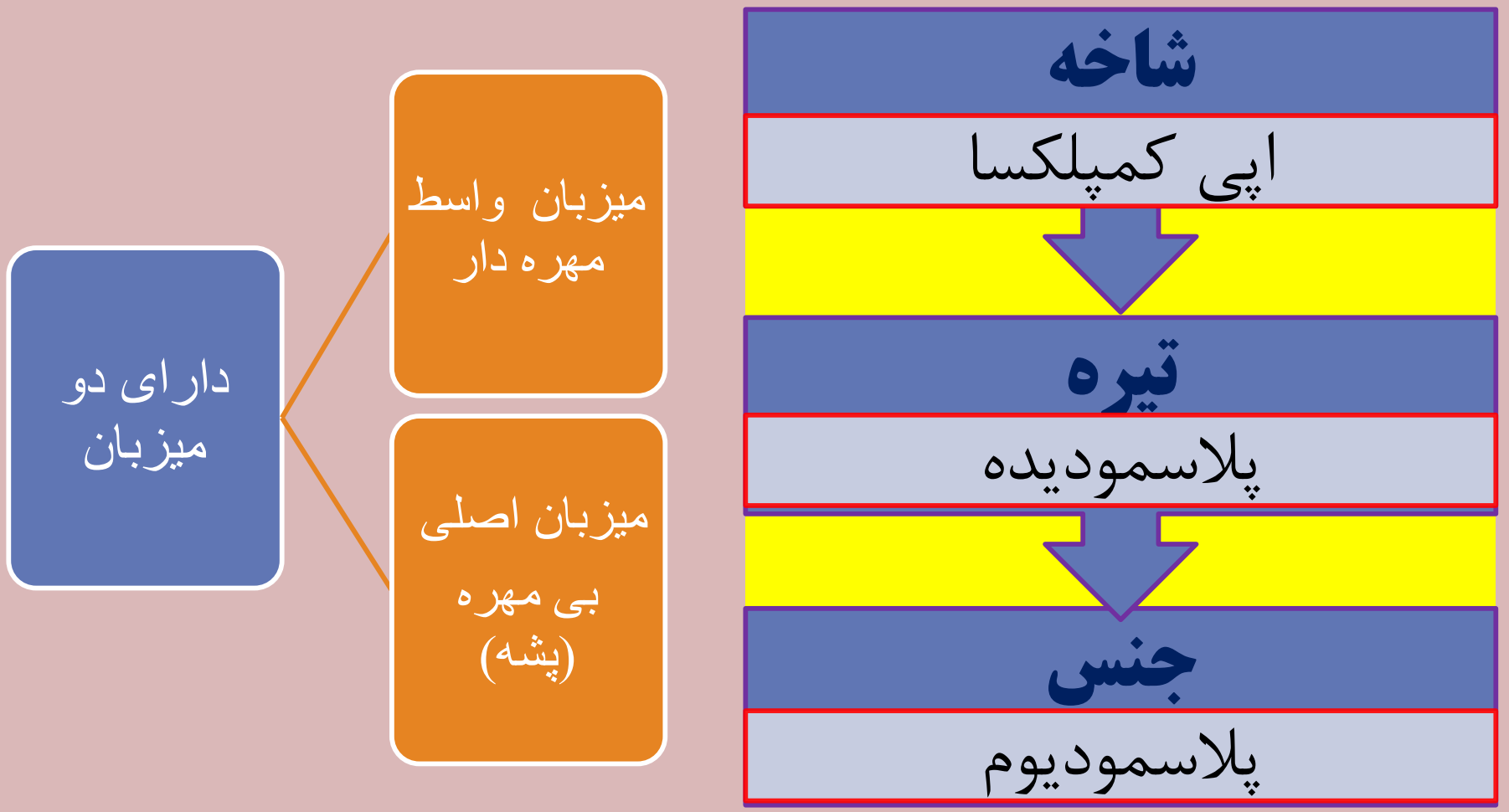
این بیماری بوسیله

آنوفل ماده (خونخوار) منتقل میگردد

شرایط مناسب برای رشد پشه

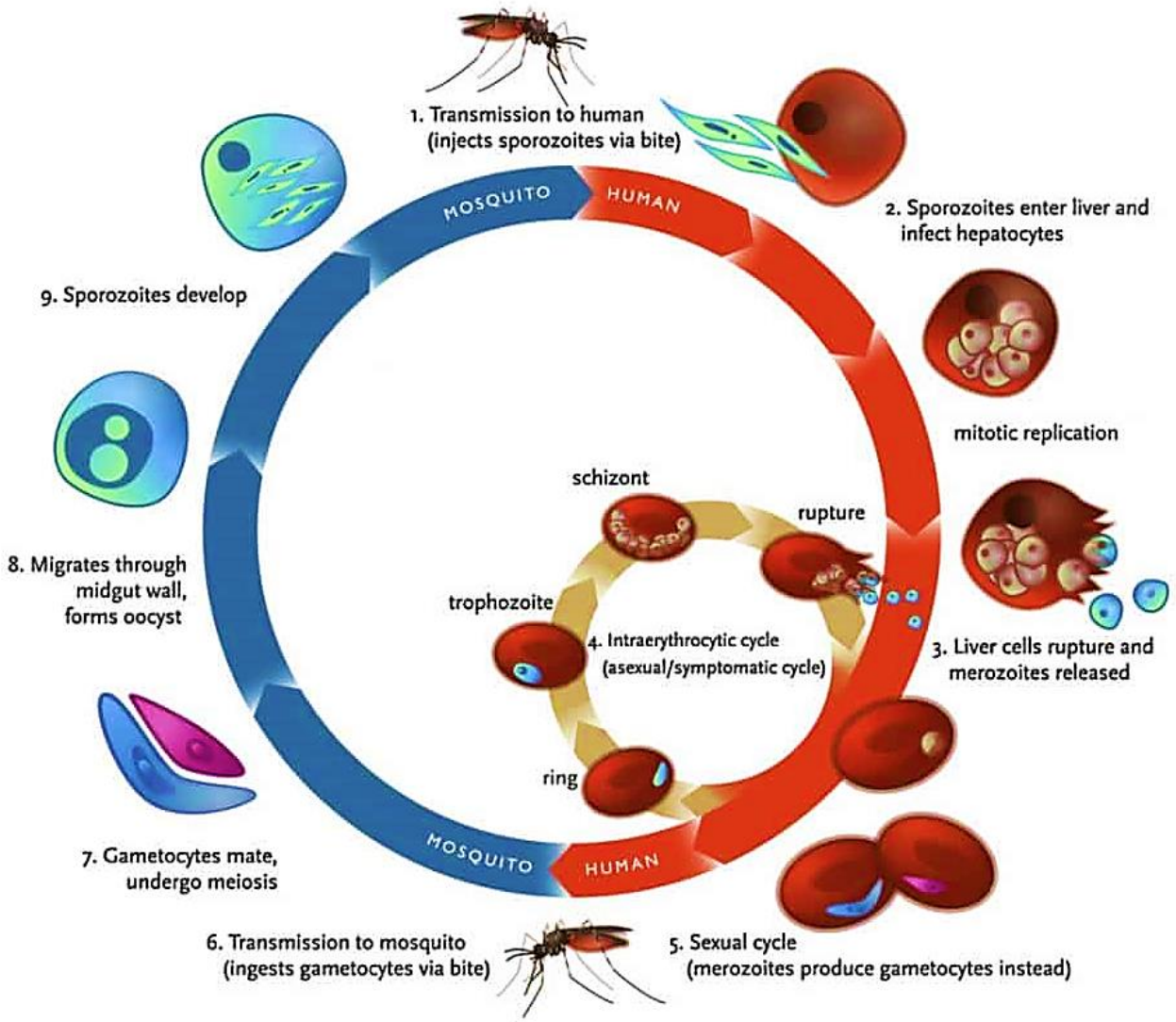
- درجه حرارت مناسب :۳۰-۱۶ درجه
- رطوبت مناسب :۶۰ ٪
- ارتفاع مناسب: زیر ۲۰۰۰ متر
- زمان مناسب گزش: غروب آفتاب تا سپیده صبح

تاکسونومی انگل مالاریا



چرخه زندگی انگل

چرخه زندگی *پلاسمودیوم* های انسانی



فاز جنسی اسپروگونی

1) ورود ماکرو گامتوسیت و میکروگامتوسیت در اثر مکیدن خون فرد بیمار
2) بعلت کاهش دمای معده پشه(۲۵درجه) تبدیل به ماکرو گامت و میکرو گامت
3) بارور شدن ماکروگامت و ایجاد سلول تخم یا زایگوت
4) دنباله دار شدن تخم و تبدیل به اووکینت
5) رسوخ اووکینت به درون سلولهای معده پشه و تکثیر آن و ایجاد اووسیست
6) پاره شدن اووسیست و مهاجرت اسپروزوئیت ها به غدد بزاقی
7) وارد شدن اسپروزوئیت ها به بدن میزبان ناقل و شروع چرخه شیزوگونی
8) طول دوره اسپروگونی با توجه به نوع پلاسمودیوم،حشره ناقل،درجه حرارت و رطوبت محیط از ۸ تا ۲۱ روز متفاوت است.مالاریه بیشترین زمان اسپروگونی و ویواکس و فالسیپاروم کمترین زمان

فاز غیر جنسی شیزوگونی

- ورود اسپروزوئیت ها در اثر گزش پشه
- ترک جریان خون و ورود به پارانشیم کبد در عرض ۴۰ دقیقه ابتدایی
- شیزوگونی نسجی و تولید هزاران مروزوئیت نسجی
- مدت زمان شیزوگونی نسجی اولیه ۵-۱۶ روز
- ورود مروزوئیتهای نسجی به گلبولهای قرمز و شروع شیزوگونی خونی
- ظهور گامتوسیتها در اوال و مالاریه و ویواکس ۲ تا ۳ روز بعد از شیزوگونی خونی و حذف از خون بعد از یکی دو روز
- ظهور گامتوسیتهای فالسیپاروم بعد از یک هفته و ماندگاری آنها تا چهار هفته

تعداد مروزوئیتها در شیزونت نسجی

- ویواکس : 10000 مروزوئیت
- فالسیپاروم: 30000 مروزوئیت
- اوال: 15000 مروزوئیت
- مالاریه: 15000 مروزوئیت

مدت زمان شیزوگونی نسجی

- ویواکس : 8-6 روز
- فالسیپاروم: 7-5.5 روز
- اوال: 9 روز
- مالاریه: 16-14 روز

تعداد مروزوئیتها در شیزونت خونی

- ویواکس : 12-24 مروزوئیت
- فالسیپاروم: 8-24 مروزوئیت
- اوال: 4-16 مروزوئیت
- مالاریه: 6-12 مروزوئیت

فاصله سیکل های انواع پلاسمودیوم

- ویواکس : 48ساعت
- فالسیپاروم: 48ساعت
- اوال: 48ساعت
- مالاریه: 72ساعت

انواع بازگشت در بیماری مالاریا

- **Relapse** : بازگشت بر مبنای وجود انگل در سلولهای کبد(فعال شدن انگلهای نهفته در سلولهای کبد (در پلاسمودیوم اوال و پلاسمودیوم ویواکس)
- **Recrudescence** : عود پارازیتمی غیرجنسی از همان ژنوتیپی که باعث بیماری اصلی شده است، به دلیل پاکسازی ناقص انگل های غیرجنسی پس از درمان ضد مالاریا.

  بیشتر در پلاسمودیوم فالسیپاروم و گاهی در ویواکس
- **Reinfection** : عفونت جدیدی که به دنبال عفونت اولیه می آید. عفونت با ژنوتیپی از انگل که اغلب (اما نه همیشه) با ژنوتیپ انگلی که باعث عفونت اولیه شده است متفاوت است.
- **Recurrence**: ظهور مجدد پارازیتمی غیرجنسی پس از درمان، به دلیل عود مجدد(**Recrudescence**)، عود (**Relapse**) یا عفونت جدید (**reinfection**).
- در پلاسمودیوم مالاریه زمانی که تعدادی از انگلها از سیستم ایمنی می گریزند و هرچند وقت شیزوگونی فعال می شود و مجدد توسط سیستم ایمنی سرکوب می شوند.

طبقه بندی بر حسب نوع بیماریزایی

- عامل مالاریا سه یک خوش خیم : *Plasmodium.Oval*
- عامل مالاریا سه یک خوش خیم : *Plasmodium.Vivax*
- عامل مالاریا سه یک بدخیم : *Plasmodium.Falciparum*
- عامل مالاریا چهار یک خوش خیم: *Plasmodium.Malariae*

بیماری شامل دو گروه علائم :**عمومی** و **حملات پاروکسیسم** می باشد

علائم عمومی در بیماری خفیف شامل :**سردرد ,دل درد, گاهی تب, لرز, بدخوابی , بیقراری**

(علائم یک آلودگی عفونی که با هر بیماری ممکن است اشتباه شود.)

حملات پاروکسیسم یا منظم و زمان بندی شده شامل:

مرحله لرز
بعلت آزاد شدن رنگدانه و مروزوئیت

مرحله تب
بعلت واکنش بدن به لرز

مرحله عرق

- انگل فالسیپاروم به دلیل شدت آلودگی از حملات پاروکسیسم منظم پیروی نمیکند.

علائم و نشانه های بالینی مالاریای شدید

- کاهش سطح هوشیاری یا کما
- بی حالی شدید به حدی که بیمار قادر به نشستن و ایستادن نباشد
- ناتوانی در خوردن و آشامیدن
- استفراغ مکرر
- تشنج های مکرر(بیش از 2 حمله در 24 ساعت)
- تنفس عمیق،دیسترس تنفسی
- کلاپس عروقی یا شوک(فشار پایین)
- ادرار تیره رنگ
- خونریزی خودبخودی
- رنگ پریدگی شدید پوست کف دست و مخاط

نشانه های پارا کلینیک مالاریای شدید

- هایپوگلیسمی(کاهش قند خون کمتر از 40 میلی گرم/دسی لیتر)
- آنمی نورموسیتیک شدید(Hg < 7 و HCT < 20)
- هموگلوبینوری
- هایپر پارازیتمی(بیش از 2 درصد) در خون محیطی
- نارسایی کلیه (کراتینین بیشتر از 3 mg/dl)
- وجود شیزونت در لام خون محیطی مالاریای فالسیپاروم

ترومبوسیتوپنی (PLT <50000) در موارد مالاریای شدید از جمله ویواکس شدید مشاهده می شود

گاهی بدلیل چسبندگی انگل به جداره عروق میزان انگل در خون بسیار پایین است.لذا تفسیر این موارد با توجه به نشانه های بالینی و آزمایشگاهی مالاریای شدید است

عواملی که در وخامت فالسیپاروم نقش دارند

- سرکوب ایمنی
- اسپلنکتومی
- بارداری
- شدت پارازیتمی

بدحال شدن بیمار در صورت عدم درمان اولیه ممکن است در کمتر از ۲۴ ساعت اتفاق بیوفتد

- **سوال:** چه موقع خون عفونت زاست:

- **پاسخ:** وقتی در هر میلی لیتر خون **سه گامتوسیت** موجود باشد.

نکات مهم:

در هر بیماری که با علائم تب،تشنج و یا اختلال هوشیاری بدون علت واضح مراجعه کند بایستی **سابقه سکونت،مسافرت و یا اشتغال** در مناطق مالاریا خیز در **یکسال گذشته** و یا **سابقه ابتلا به مالاریا در گذشته** سوال شود

ابتلا به مالاریا بدنبال **دریافت خون آلوده به انگل و یا تزریق مشترک** امکانپذیر است و بعنوان سایر روشهای ابتلا به مالاریا مد نظر قرار گیرد.

لام خون محیطی ممکن است در **موارد کم انگل منفی** گزارش شود **لذا یک لام منفی دلیل بر عدم ابتلا به مالاریا نیست** و تکرار آزمایش در مواردی که ظن قوی ابتلا به مالاریا وجود دارد توصیه میشود.

افراد در معرض مالاریا

- زنان باردار
- کودکان
- افراد مسن
- افراد غیر بومی (مسافرین به مناطق آلوده)

راههای انتقال مالاریا

گزش پشه آنوفل آلوده

ترانسفوزیون خون آلوده

انتقال از مادر به جنین

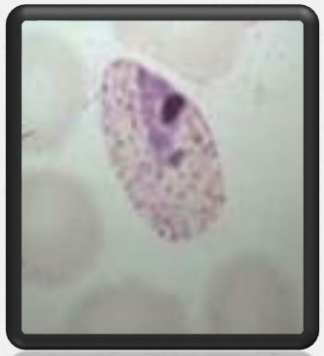
استفاده از سرنگ مشترک

توزیع جغرافیایی

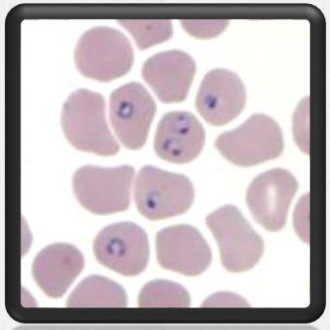
در ایران:در حال حاضر انتقال مالاریای ویواکس و فالسیپاروم در استان های جنوب شرقی کشور مثل سیستان و بلوچستان ، هرمزگان و قسمت گرمسیری کرمان و بوشهرانجام می گیرد.

Endemic

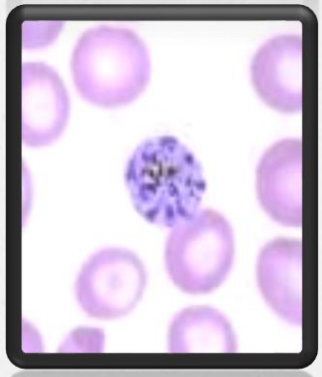
انواع گونه های پلاسمودیوم



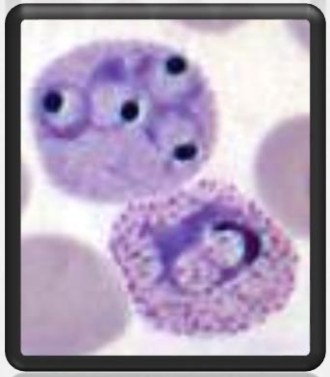
اوال



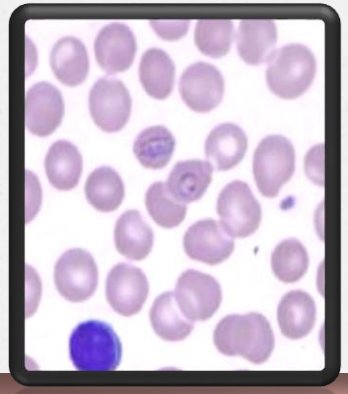
فالسیپاروم



مالاریه



ویواکس



ناولزی

دوره کمون و در انواع مختلف پلاسمودیوم

شامل یک دوره شیزوگونی نسجی و یک یا دو دوره سیکل خونی

- فالسیپاروم : ۱۲ روز
- ویواکس : ۱۵ روز
- اوال : ۱۷ روز
- مالاریه : ۲۸ روز

روشهای تشخیص آزمایشگاهی

روش تشخیص طلایی

اسمیر ضخیم: شناسایی وجود انگل

اسمیر نازک: شناسایی نوع مالاریا

روشهای تشخیص سریع RDT

روشهای تشخیص مولکولی PCR

نکات مهم در تشخیص مالاریا با استفاده از لام خون محیطی

- روشی حساس است و با وجود تکنیسین ماهر و دقیق تا حد **۵-۱۰ انگل در هر میکرولیتر خون** قابل تشخیص است
- تحت **شرایط محیطی** حد تشخیص لام **۱۰۰ انگل در هر میکرولیتر خون**
- در تمایز گونه های انگل مالاریا و مرحله سیر تکامل موثر است
- تعداد انگل به ازای WBC و RBC قابل تعیین شدن است
- برای اثبات هایپرپارازیتمی(در مالاریای شدید) و ارزیابی پاسخ انگل به درمان کاربرد دارد

روش میکروسکوپی

مزایا

- ✓ حساسیت بالا، نسبتا ارزان
- ✓ تمایز گونه ها ، مراحل تکامل و شدت بیماری انگل مالاریا
- ✓ شمارش تعداد انگل به ازای گلبول سفید و قرمز و ارزیابی پاسخ انگل به درمان دارویی
- ✓ تشخیص سایر بیماری های مشمول برنامه کنترلی مانند سل یا سایر بیماری های خونی و عفونت توام
- ✓ بایگانی دائمی از یافته های تشخیصی

معایب

- ✗ حساسیت کمتر از حد انتظار خصوصا موارد کم انگل
- ✗ متکی به مهارت و دقت انسانی
- ✗ زمان بر بودن آزمایش در فیلد، به خصوص در موارد تهیه لام در خارج از آزمایشگاه

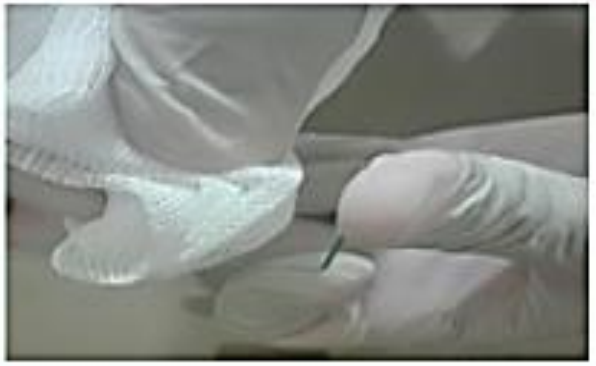
مراحل مختلف روش تشخیص میکروسکوپی

1. تهیه گسترش استاندارد
2. رنگ آمیزی گیمسا
3. روش استاندارد خواندن لام

روش تهیه لام مالاریا

- ثبت مشخصات در فرم بيماريابي (شماره1)
- انتخاب دست چپ،انگشت مياني يا انگشت اشاره
- در شيرخواران: پاشنه پا
- مالش پوست براي تسريع گردش خون
- ضدعفونی کردن انگشت با پنبه والکل
- سوراخ کردن پوست باحرکت سريع لانست
- پاك كردن اولين قطره
- فشار آرام انگشت و شكل گيري دومين قطره خون
- تهيه گسترش

تهیه گسترش استاندارد (ضخیم ونازک)

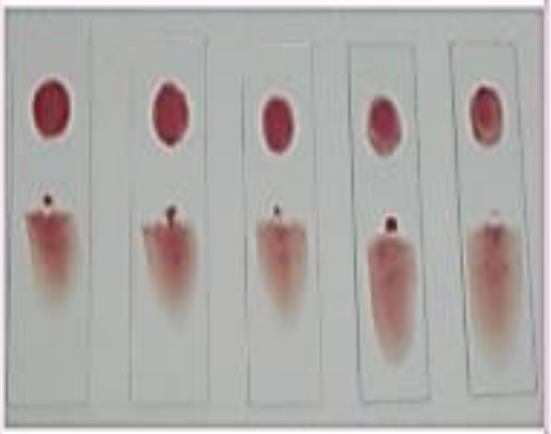


۱ - تمیز کردن لام

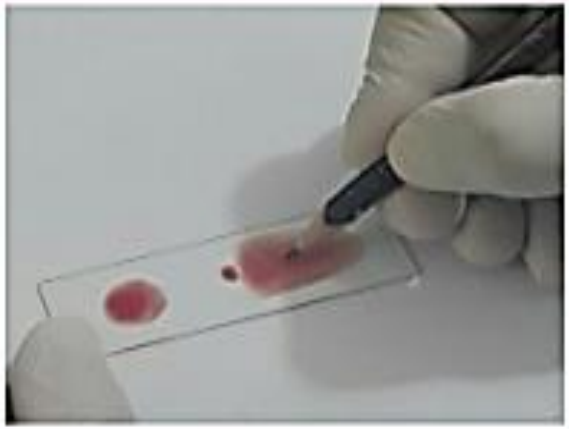
۲- ضدعفونی کردن محل نمونه گیری

۳- ضربه مناسب لانست به محل مورد نظر

۴- تهیه گسترش های خون



۵- تهیه شده گسترش های خون استاندارد



۶- نوشتن مشخصات بیمار

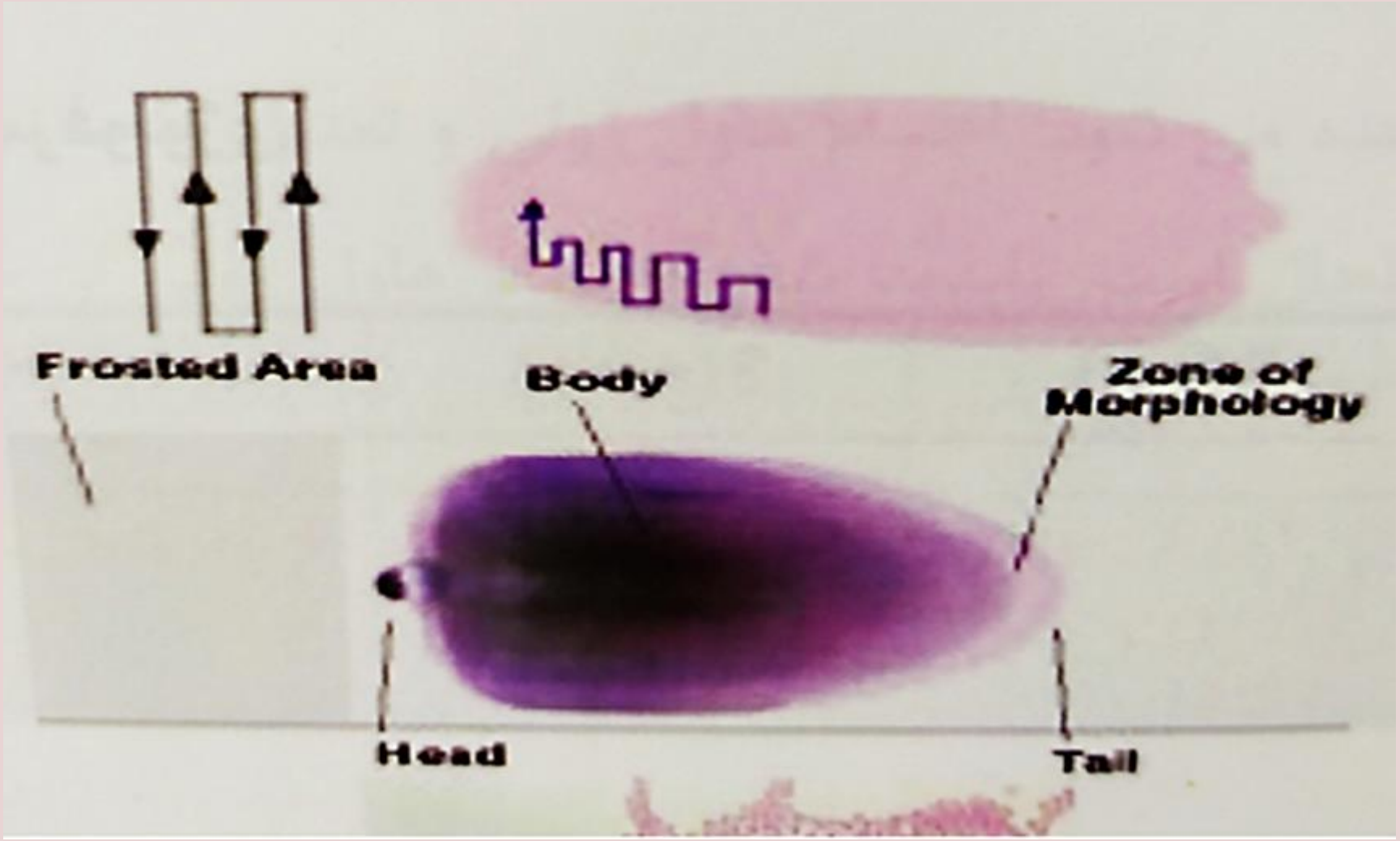
نکات مهم تهیه گسترش

- تمیز کردن لام قبل از تهیه گسترش
- خشک شدن کامل اتانل روی سطح پوست (ایجاد همولیز توسط اتانول)
- عدم تماس دست با سطح لام
- استفاده نکردن از مداد ژله ای یا خودکار جهت ثبت مشخصات بیمار روی لام
- فاصله گسترش ضخیم از لبه و از گسترش نازک 1 cm
- مناسب بودن ضخامت گسترش ضخیم

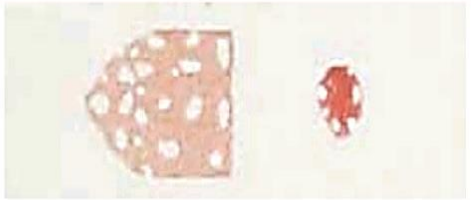
نکات مهم در تهیه گسترش از خون EDTA

- رعایت کردن نسبت خون و ضد انعقاد(در لوله حاوی EDTA با ظرفیت 5mL حجم خون اضافه شده نباید کمتر از 2mL باشد.)
- تهیه گسترش در زمان کمتر از ۴ ساعت از زمان نمونه گیری(به دلیل تاثیر EDTA بر روی مورفولوژی انگل؛ EDTA : چسبیدن خون به سطح لام و اختلال در رنگ آمیزی)
- ارسال نمونه EDTA در مدت زمان کمتر از ۱ ساعت و بدون سرد کردن و شرایط یخچالی(در موارد نمونه گیری غیرآزمایشگاهی)
- خون مورد نیاز برای تهیه گسترش ضخیم از خون EDTA ؛ ۶ میکرولیتر - گسترش نازک؛۲ میکرولیتر

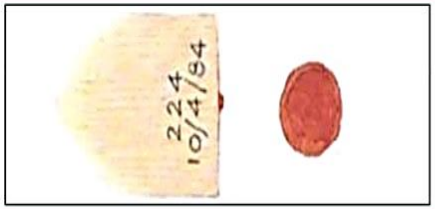
ناحیه مناسب جهت بررسی میکروسکوپی در گسترش نازک



گسترش های خونی غیراستاندارد

	
لامهای لبه پریده و یا دارای خراش،	لام‌های چرب که از روی لام شسته میشوند.
گسترش های با حجم زیاد خون	گسترشهای خون به علت موقعیت نامناسب روی لام

گسترش های خون غیر استاندارد



گسترش های خون استاندارد

ثبت مشخصات

- پس از خشك شدن لام (حداقل نيم تا يكساعت جهت جلوگيری از پاک شدن گسترش ضخيم) با مداد در **كناره ضخيمتر گسترش نازك** **شماره رديف** ، **نام ونام خانوادگي** بيمار يادداشت گردد.بهتر است تاريخ روز نيز روی لام درج گردد.(برای پيگيری و شمارش انگل و مشخص نمودن درمان يا شكست درمان(زودرس يا دير رس)
- قرار دادن لام دور از گردوخاك ، حرارت و حشرات

رنگ آمیزی گیمسا

مزایا

- ✓ سریع و راحت
- ✓ پایدار بودن حلال رنگ(متانول)
- ✓ کیفیت پایدار رنگ در برابر حرارت

معایب

- ✗ سمی بودن متانول
- ✗ گران بودن رنگ
- ✗ تاثیر pH بر روی کیفیت رنگ آمیزی

رنگ آمیزی گیمسا

رایج رین روش رنگ آمیزی گسترش های خونی

روش قابل اعتماد برای رنگ آمیزی گسترش های ضخیم و نازک مالاریا

محلول تجاری رنگ اماده گیمسا ⟸ ترکیبی از متانول و گلیسرول و پودر گیمسا

پودر گیمسا ⟸ ترکیبی از ائوزین و متیلن بلو(آژور)

ائوزین(جزء اسیدی)

متیلن بلو (جزء بازی)

کنترل کیفی رنگ گیمسا

- برای هر سری جدید یا هر مقداری از رنگ ذخیره تهیه شده
- پیش از ارسال رنگ ذخیره جهت استفاده آزمایشگاه ها
- در محل استفاده، بعد از دریافت رنگ ذخیره از آزمایشگاه مرجع کشوری
- پیش از استفاده از رنگ ذخیره جهت تهیه رنگ گیمسای رقیق شده آماده مصرف
- برای هر سری جدید آب بافر تهیه شده با pH= 7.2

جهت کنتری کیفی رنگ گیمسا ⟸ استفاده از یک لام مثبت ترجیحا *پلاسمودیوم ویواکس*

جهت کنترل کیفی گسترش نازک ⟸ تهیه خون تازه و فریز کردن در دمای ۲۰- با رطوبت گیر در کیسه زیپ دار

کنترل کیفی رنگ گیمسا

موجود بودن لام مثبت

- رنگ آمیزی گسترش نازک لام مثبت ترجیحا پلاسمودیوم ویواکس(به علت مورفولوژی خاص دانه های شافنر)
- استفاده از لام مثبت پلاسمودیوم فالسی پاروم در صورت نداشتن گونه ویواکس و بررسی شکاف های مورر(در صورت داشتن تروفوزوئیت در حال رشد)

موجود نبودن لام مثبت

- رنگ آمیزی گسترش نازک یک لام منفی و بررسی رنگ پذیری RBC و WBC
- جهت کنترل کیفی

روش های رنگ آمیزی گیمسا

رنگ آمیزی سریع :

- استفاده از محلول ۱۰٪ رقیق شده رنگ گیمسا به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه

مزایا ⟸ تشخیص سریع برای شروع درمان

معایب ⟸ نیاز به رنگ بیشتر جهت رنگ آمیزی و هزینه بر بودن

تعیین دقیق زمان رنگ آمیزی از طریق کنترل کیفی

طرز تهیه غلظت از ۱۰٪ رنگ گیمسا

10 cc رنگ گیمسا صاف شده

+

90 cc محلول بافر 7.2 PH :

(یا سه قطره رنگ + ۱ میلی لیتر بافر)

روش های رنگ آمیزی گیمسا

رنگ آمیزی آهسته :

استفاده از محلول ۳٪ رقیق شده رنگ گیمسا به مدت ۴۵-۶۰ دقیقه

رایج ترین روش برای رنگ آمیزی تعداد بیشتر از ۲۰ لام

مزیت ← نیاز به رنگ کمتر در مقایسه با روش سریع

عیب ← زمان بر

تعیین دقیق زمان رنگ آمیزی از طریق کنترل کیفی

طرز تهیه غلظت ۳٪ از رنگ گیمسا

3 cc رنگ گیمسا صاف شده ✚ 97 cc محلول بافر 7/2: PH

میزان رنگ مورد نیاز برای رنگ آمیزی هر لام :

3 -5 ml

مراحل آماده سازی قبل از رنگ آمیزی گیمسا

1. خشک کردن گسترش ضخیم و نازک -در موارد اورژانس خشک کردن با گرمای سشوار به مدت ۵ ثانیه در فاصله ۳۰cm یا گرمای ملایم (گرمای لامپ میکروسکوپ)
2. فیکس کردن گسترش نازک با استفاده از متانول ۱۰۰٪
3. صاف کردن رنگ گیمسا با استفاده از کاغذ صافی شماره۱ یا ۳
4. آماده سازی بافر با PH :7/2

مراحل رنگ آمیزی

- فیکس کردن گسترش نازک با متانول ۱۰۰ درصد

(از فیکس کردن گسترش ضخیم به شدت خودداری کنید.تاخیر در زمان فیکس کردن لام ها ممکن است دانه های شوفنر و شکاف مورر مشاهده نشود.)

- دادن زمان برای خشک شدن الکل و فیکس شدن لام(تقریبا ۲ دقیقه)
- رقیق کردن رنگ گیمسا با استفاده از آب بافر دارای PH:7/2
- رنگ آمیزی لام با غلظت ۳٪ گیمسا بمدت ۶۰ تا ۴۵ دقیقه و با غلظت ۱۰٪ گیمسا بمدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه.

نکات فیکساسیون

- خشک شدن کامل گسترش ضخیم و نازک قبل از رنگ آمیزی
- خشک کردن لام در فضایی دور از پشه و گرد و غبار
- فیکس نکردن لام با استفاده از حرارت
- عدم تماس بخار متانول با گسترش ضخیم (ترجیحا استفاده از سطح شیب دار جهت فیکس کردن)

نکات رنگ آمیزی

- تنظیم pH آب بافر با استفاده از pH متر(pH ۷/۲ مناسب برای ظهور رنگدانه های انگل)
- شستن لام با استفاده از آب بافر یا آب شهر با pH ۷/۲(بلند نکردن لام از روی راک رنگ آمیزی)
- صاف کردن رنگ با استفاده از کاغذ صافی گرید ۱ یا ۳
- در صورت استفاده از جار رنگ آمیزی؛ قرار دادن لام ها به صورت پشت به پشت(همه ی گسترش های ضخیم در یک سمت جار)

نکات رنگ آمیزی

- خشک و تمیز بودن کلیه لوازم مورد استفاده در رنگ آمیزی(تاثیر مواد شوینده روی pH آب و رنگ)
- جهت خشک کردن لام ⟸ لام ها به صورت عمودی؛ گسترش های ضخیم رو به پایین
- رنگ آمیزی گسترش های خونی بلافاصله بعد از تهیه گسترش(جهت تهیه لام های آموزشی و اسلاید بانک حداقل ۲ ساعت فاصله)
- نگهداری طولانی مدت در محیط گرم و مرطوب ⟸ فیکس خود به خودی
- جلوگیری از شسته شدن گسترش ضخیم ⟸ اضافه کردن آب بافر از سمت گسترش نازک در زمان شست و شو

کنترل کیفیت رنگ گیمسای ذخیره

تهیه کردن یک گسترش نازک

درست کردن رنگ گیمسای رقیق شده ۳٪ و ۱۰٪ از رنگ گیمسای ذخیره جدید

فیکس کردن لام ها با متانول و رنگ کردن با رنگ گیمسا و بررسی لام ها

در صورت لزوم، تنظیم زمان رنگ آمیزی و تکرار مراحل ۱ تا ۴

ثبت کردن نتایج در دفتر عملکرد کنترل کیفیت

نکات تهیه آب بافر

- طرز تهیه آب بافر ⟸ حل کردن یک قرص بافر در یک لیتر آب مقطر
- نگهداری آب بافر در مکان خنک و دور از نور مستقیم خورشید
- نگهداری در ظرف تیره جهت جلوگیری از رشد باکتری و قارچ و جلبک
- جلوگیری از تغییر pH و آلودگی ⟸ نگهداری آب بافر کمتر از ۷ روز
- چک کردن pH روزانه آب بافر
- مقدار آب مقطر مصرفی در تهیه آب بافر طبق دستور العمل شرکت سازنده
- نگهداری قرص های بافری ⟸ در ظروف در بسته، دور از هوا و نور خورشید و رطوبت همراه با رطوبت گیر یا بسته ژل سیلیکا(بدون کلرید کبالت)

کنترل کیفیت آب بافر با pH= 7.2

آماده کردن یک گسترش نازک

درست کردن رنگ رقیق شده ۳٪ یا ۱۰٪ از رنگ گیمسای ذخیره جدید

فیکس کردن لام ها با متانول و رنگ گردن با رنگ گیمسا

بررسی لام ها

ثبت کردن نتایج در دفتر عملکرد کنترل کیفیت(QC log-book)

مراحل رنگ آمیزی لام های تهیه شده

تهیه محلول بافر به مقدار مورد نیاز

تهیه رنگ رقیق شده

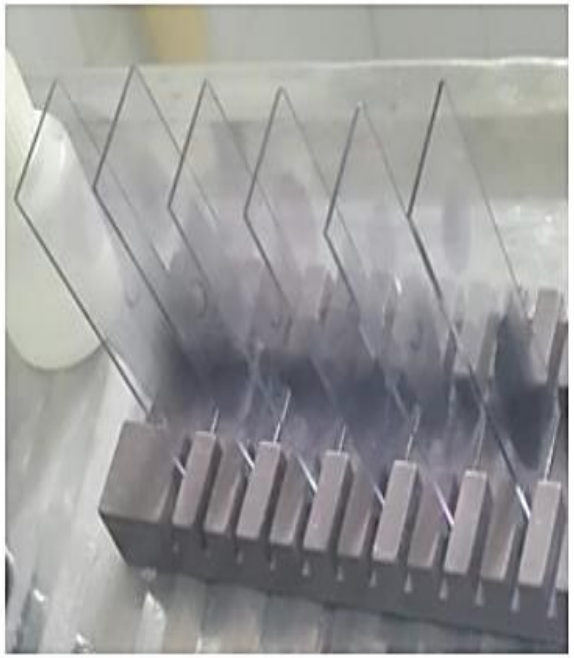
مراحل رنگ آمیزی لام های تهیه شده

تثبیت گسترش نازک خون با متانول

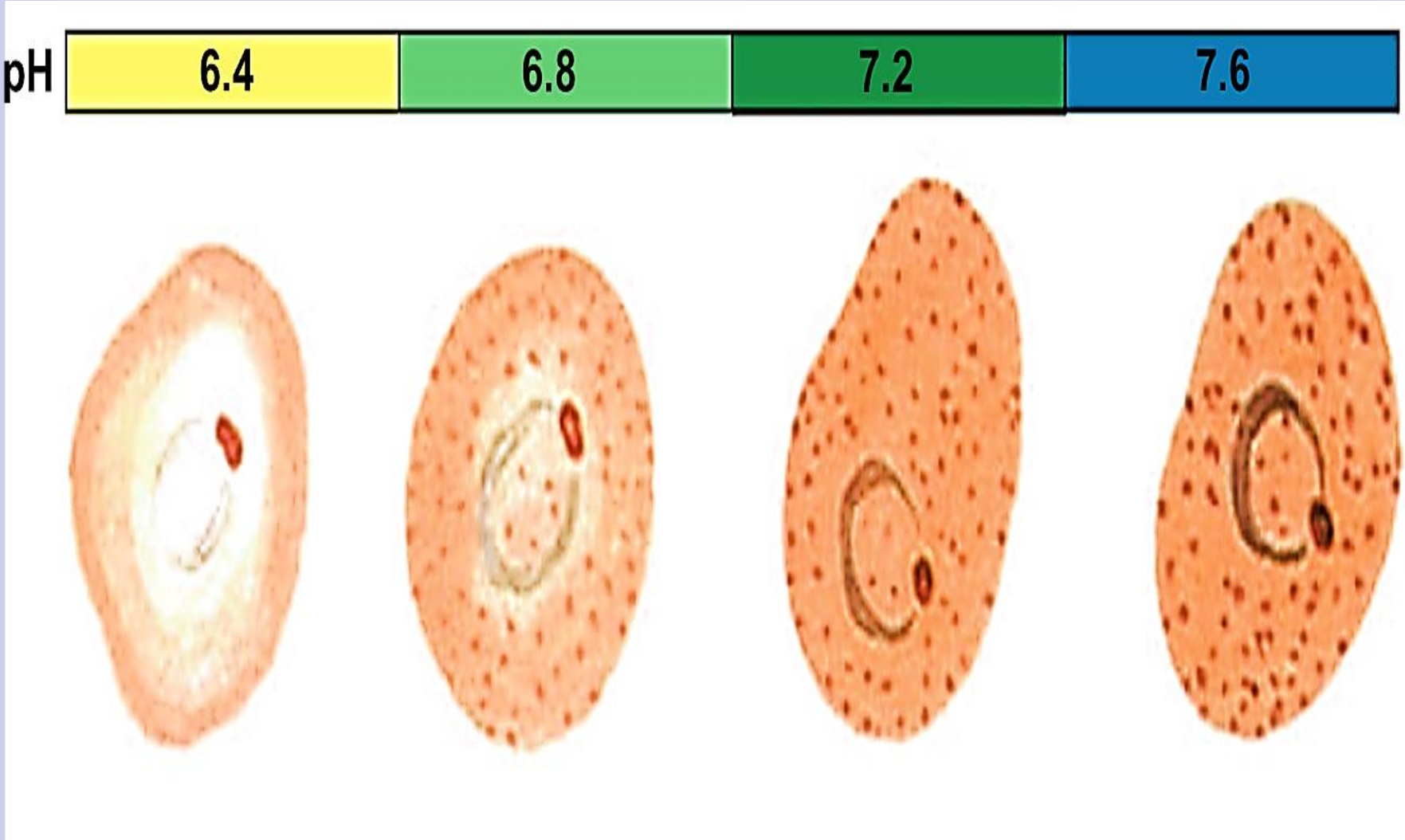
مراحل رنگ آمیزی لام های تهیه شده

مراحل صاف کردن رنگ

تصاویر روش رنگ آمیزی گسترش های خون

		
مرحله خشک کردن لام ها،	رنگ آمیزی رایج لام ها	رنگ آمیزی در جار رنگ آمیزی

تاثیر PH برروی انگل مالاریا در رنگ آمیزی گیمسا



ارزیابی گسترش نازک رنگ
آمیزی شده با کیفیت استاندارد

- **زمینه لام به رنگ آبی آسمانی و عاری از هرگونه رسوب**
- **گلبول های قرمز به رنگ صورتی مایل به خاکستری کمرنگ**
- **هسته گلبول های سفید به رنگ ارغوانی تیره**
- **کروماتین انگل مالاریا به رنگ قرمز ارغوانی تیره و سیتوپلاسم به رنگ آبی مایل به ارغوانی**
- **اگر گسترش نازک یک لام روی یک روزنامه یا نوشته قرار داده شود،انتهای لام که معمولا گلبول های قرمز تک لایه هستند نوشته ها قابل دیدن و خوانده شدن باشند.**

ارزیابی گسترش ضخیم رنگ آمیزی شده با کیفیت استاندارد

- زمینه لام به رنگ آبی آسمانی و عاری از بقایای رنگ
- هسته گلبول های سفید به رنگ ارغوانی تیره
- کروماتین انگل به رنگ قرمز و سیتوپلاسم آن به رنگ آبی ارغوانی
- ضخامت استاندارد گسترش ضخیم ۲۰ لایه گلبول قرمز
- در هر میدان میکروسکوپی حدودا ۱۰-۱۵ گلبول سفید دیده شود.
- پلاکت ها صورتی رنگ به صورت منفرد یا خوشه مانند
- اگر لام بر روی یک نوشته (روزنامه) قرار داده شود ،نوشته ها به سختی قابل خواندن باشند.

خطای رنگ آمیزی	علت احتمالی
✕ قرمز صورتی شدن گسترش نازک	۱. اسیدی بودن پی اچ آب بافر ۲. اسیدی بودن آب شست و شوی لام
✕ لیز شدن گلبول های قرمز در گسترش نازک	فیکس شدن ناکافی گسترش نازک به دلیل بی کیفیت بودن متانول (جذب رطوبت هوا : کاهش خاصیت فیکساسیون)(درب بطری را ببندید)
✕ عدم همولیز شدن گسترش ضخیم	فیکس شدن گسترش در اثر بخار متانول یا فیکساسیون خودبه خودی در نتیجه تماس طولانی مدت لام با حرارت بالا و رطوبت
✕ سطح گسترش پوشیده از رسوب	۱. بی کیفیت بودن رنگ ۲. بی کیفیت بودن متانول یاگلیسرول ۳. صاف نکردن رنگ گیمسا قبل از استفاده ۴. نگهداری نامناسب رنگ ۵. آلوده شدن رنگ ذخیره با آب ۶. عدم شست و شوی صحیح لام در پایان رنگ آمیزی ۷. کهنه بودن رنگ
✕ گلبول های قرمز به رنگ قرمز-صورتی و ارغوانی نبودن هسته گلبول های سفید	اسیدی بودن پی اچ آب بافر اسیدی بودن آب مورد استفاده جهت آبکشی
✕ عدم رنگ آمیزی دانه های شافنر ✕ رنگ آمیزی کم رنگ یا خیلی تیره	مناسب نبودن زمان رنگ آمیزی تاخیر در فیکساسیون اسیدی بودن پی اچ آب بافر (تعیین زمان رنگ آمیزی از طریق کنترل کیفی)

رنگ آمیزی

- لام باید در عرض ۲۴ تا ۴۸ ساعت رنگ گردد (تعلل باعث خراب شدن لام بخصوص در مناطقی که رطوبت و حرارت بالاست)
- فیکس کردن گسترش نازک با متانول

(از فیکس کردن گسترش ضخیم به شدت خودداری کنید)

- دادن زمان برای خشک شدن الکل و فیکس شدن لام
- رقیق کردن رنگ گیمسا با استفاده از آب بافر دارای PH:7/2
- رنگ آمیزی لام با غلظت ۳٪ گیمسا بمدت ۳۰تا ۴۵ دقیقه وبا غلظت ۱۰٪ گیمسا بمدت ۱۵-۲۰ دقیقه

آماده سازی گسترش های خونی مثبت مالاریا برای QC (کنترل کیفیت)

تهیه گسترش های خونی از خون مالاریا مثبت

فیکس نمودن گسترش نازک با متانول و خشک کردن در دمای محیط

بسته بندی کردن لام ها و برچسب نویسی

قرار دادن جعبه لام در یک جعبه دیگر یا کیسه زیپ دار پلاستیکی با رطوبت گیر و نگهداری در دمای ۲۰-

در هنگام نیاز بیرون آوردن لام ها و به دما رساندن یا قرار دادن در یک خشک کننده

RDTروش تشخیص سریع

Rapid Diagnostic Test

عدم دیدن جسم انگل

بر پایه واکنش
ایمونوکروماتوگرافی
Abبا Ag

مکانیسم عمل RDT

- در این روش یکسری آنتی بادی اختصاصی شناسایی شده است که با آنتی ژنهای موجود در انگل واکنش میدهند.و تولید یک خط میکند که نشان دهنده وجود انگل است.
- 1-پروتئین *PLDH* پلاسمودیوم لاکتات دهیدروژناز که در تمامی انگلهای مالاریا وجود دارد.
- HRP -2 هیستیدین ریچ پروتئین که فقط در فالسیپاروم وجود دارد

حساسیت تست RDT

- **حساسیت** برای **عفونت های شدید** فالسیپاروم و ویواکس **در حد ۱۰۰٪**
- **حساسیت** برای **عفونتهای کم انگل** با کمتر از ۲۰۰ انگل در میکرولیتر **۹۶٪** بخصوص در سوش ویواکس
- ویژگی کیتهای مورد استفاده در کشور **در حد ۹۸٪** میباشد و **با تشخیص میکروسکوپی برابری** می کند. در مواردی که تعداد انگل کم است آزمایش مولکولی میتواند تعیین کننده باشد.

(دقت آزمایش مولکولیPCR یک انگل در میکرولیتر خون)

مزایا RDT

- ساده
- سریع
- تفسیر ساده
- عدم تفسیر متفاوت توسط افراد مختلف
- عدم نیاز به تجهیزات مثل میکروسکوپ و فضا و برق
- قابل نگهداری در شرایط معمولی

معایب RDT

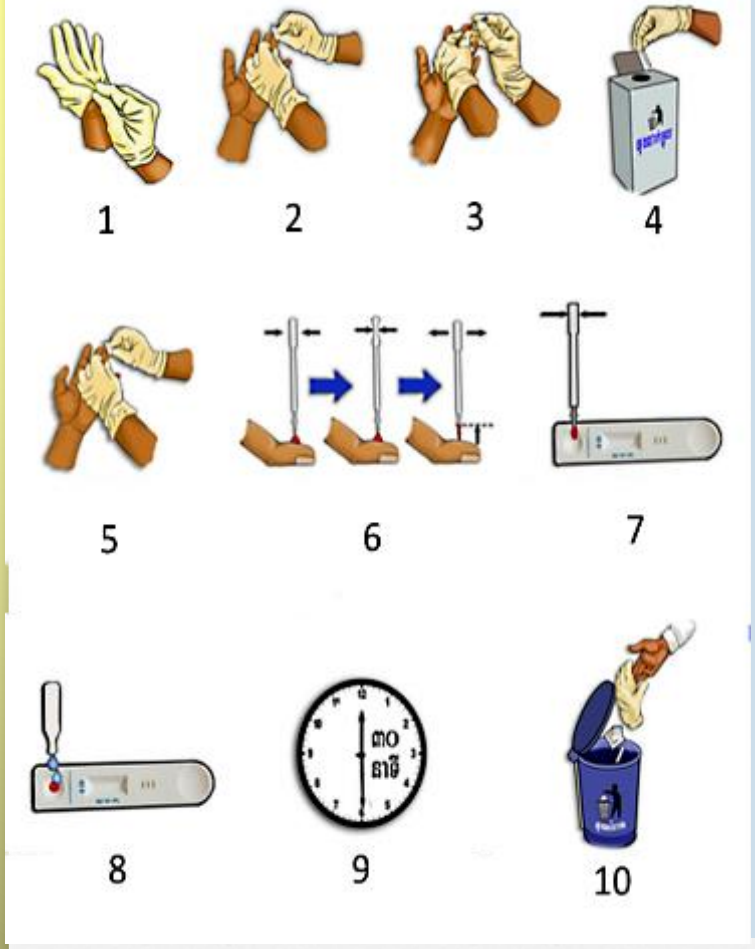
- در صورت وجود فاکتور روماتوئید کیت تشخیص سریع مثبت کاذب میشود.
- کیفی است و شمارش انگلی را نشان نمیدهد
- قادر به تمایز عفونت میکس نیست. اما با توجه به شرایط موجود در ایران میتوان به میکس فالسیپاروم و ویواکس شک کرد.اما در نهایت با استفاده از لام باید تشخیص نهایی را داد
- در شناسایی اشکال مختلف انگلی در خون ناتوان است

نمونه های مورد استفاده جهت انجام روش تشخیص سریع

- نمونه سر انگشت بیمار
- نمونه EDTA

در موارد استفاده از نمونه های تازه جواب تست را به مدت ۲۰ دقیقه و در مورد نمونه هایی که در ضدانعقاد در یخچال نگهداری می شوند عمل ایمونوکروماتوگرافی کندتر انجام میگیرد و نمونه خون دیرتر از زمینه کیت محو می گردد. در این صورت بایستی بعد از ۳۰ دقیقه خوانش گردد.

مراحل انجام تست سریع



1. انتخاب انگشت وسط یا انگشت حلقه دست چپ (نوزادان انگشت شصت پا)
2. ضدعفونی کردن بند انتهایی انگشت با استفاده از الکل ٪۷۰
3. ضربه زدن به لبه انگشت با استفاده از لانست یکبار مصرف استریل
4. برداشت حدود ۵ میکرولیتر خون با استفاده از پیپت پوار یکبار مصرف استریل
5. اضافه کردن خون به حفره مربوط به نمونه خون روی کاست
6. افزودن بافر موجود در کیت به حفره مختص به بافر
7. خوانش نتیجه بعد از مدت زمان ۲۰ دقیقه

تفسیر نتایج

رد نتیجه	عدم تشکیل خط
منفی	یک خط :فقط خط کنترل
مالاریا غیر فالسیپاروم	دو تا خط :یکی در کنترل و دیگری در PLDH
فالسیپاروم یا میکس	سه تا خط:چون با پروتئین اختصاصی فالسیپاروم واکنش داده

موارد خطا در کیت های تشخیص تست سریع

False Negative

- تعداد کم انگل
- تعداد زیاد انگل
- خرابی کیت

False posetive

- روماتوییید فاکتور
- در موارد فالسیپاروم تا بعد از ۱۴ روز نتیجه مثبت می شود

نکات مهم

- یک کیت منفی مؤید عدم ابتلا به مالاریا نیست.لام خون محیطی در موارد شک شدید باید تهیه شود.
- درمان بیمار با نتیجه مثبت کیت باید بلافاصله شروع شود نباید منتظر نتیجه لام ماند.
- اگر کیت مثبت و لام منفی بود هم باید درمان انجام شود. **با توجه به اینکه کیت با تعداد انگل کمتر به نسبت لام تشخیص را انجام میدهد.**
- کیت تعداد **۶۰انگل در میکرولیتر** را تشخیص میدهد.

برای پیگیری پاسخ به درمان RDT روش مناسبی نیست و حتما باید از لام خون محیطی استفاده شود

روش مولکولی (PCR)

مزایا

- ✓ حساسیت بالا ،دقت و اختصاصیت بالا
- ✓ افتراق عفونت های ناشی از انتقال محلی و موارد وارده
- ✓ تشخیص قطعی گونه انگل
- ✓ بررسی یا تشخیص قطعی عفونت میکس

معایب

- ✗ گران بودن
- ✗ نیاز به تجهیزات اختصاصی
- ✗ نیاز به نیروی متخصص

نمونه های مورد استفاده جهت انجام PCR

- خون کامل تازه
- خون همراه ضد انعقاد EDTA، سدیم سیترات ، سیترات دکستروز یا هپارین
- کاغذ فیلتر آغشته به خون

پایداری نمونه:

در دمای ۴ درجه : ۴ هفته

فریزر ۲۰- درجه: ۳ ماه

فریزر ۸۰- درجه : به مدت بیش از یک سال

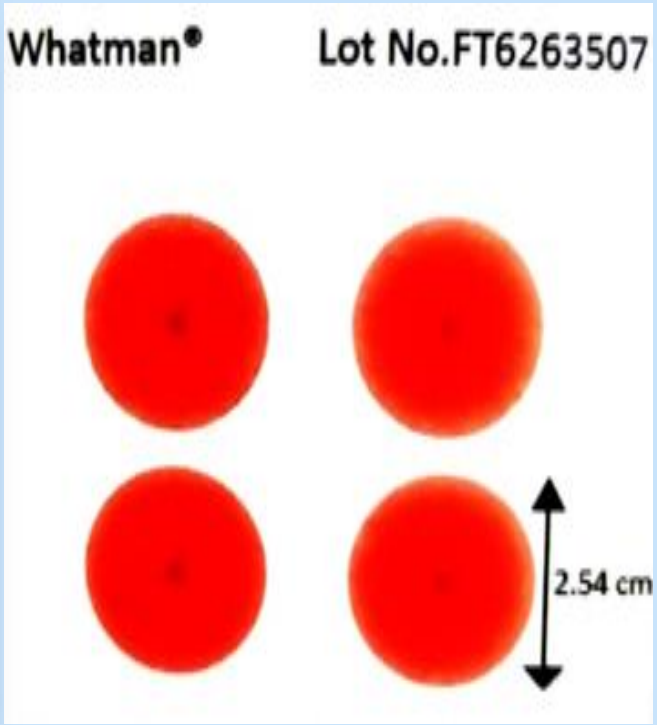
PCRنحوه آماده سازی نمونه، جهت ارسال برای انجام آزمایش

1. ثبت مشخصات بیمار و تاریخ نمونه گیری روی کاغذ فیلتر
2. بر اساس نوع کاغذ واتمن مورد استفاده (مقدار ۱۲۵ µl برای دایره cm ۲/۵۴ در کاغذ واتمن FTA)
3. حرکت دایره ای از مرکز به سمت بیرون
4. در نظر گرفتن حداقل دو دایره برای هر بیمار
5. خشک کردن در دمای اتاق به مدت حداقل ۱ ساعت
6. قرار دادن در در کیسه های حاوی رطوبت گیر زیپ دار

نکته : ۱) اجتناب از لخته شدن خون روی کاغذ

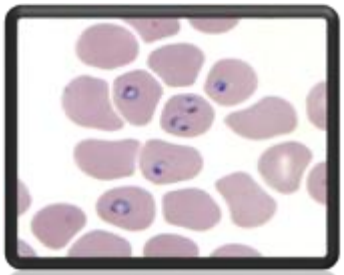
۲) اجتناب از مالیدن خون روی کاغذ

لکه های خون خشک شده بر روی کاغذ فیلترواتمن (FTA)

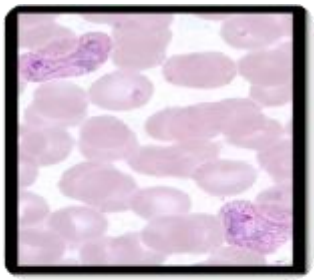


ویژگیهای مورفولوژیک گلبولهای قرمز در آلودگی با گونه های مختلف پلاسمودیوم های مالاریا

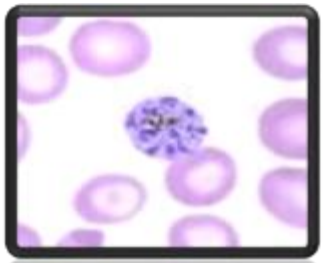
گونه های پلاسمودیوم انسانی



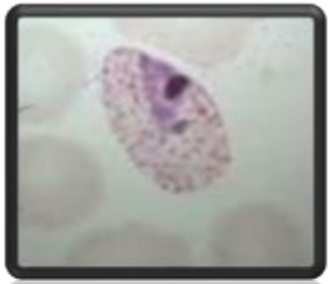
P.F



P.V

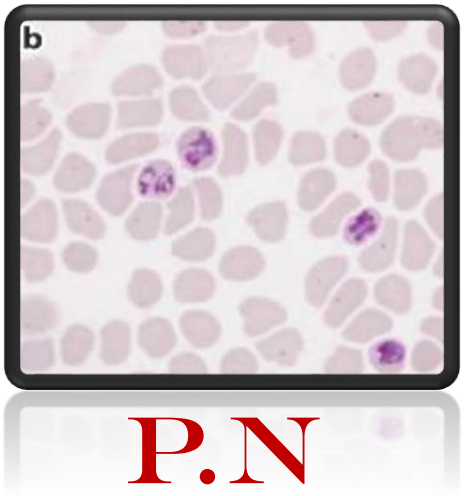


P.M



P.O

پلاسمودیوم مشترک بین انسان و حیوان



گونه مشترک بین انسان و میمون (حیوان میزبان: ماکاک های دم دراز و ماکاک های دم خوکی)

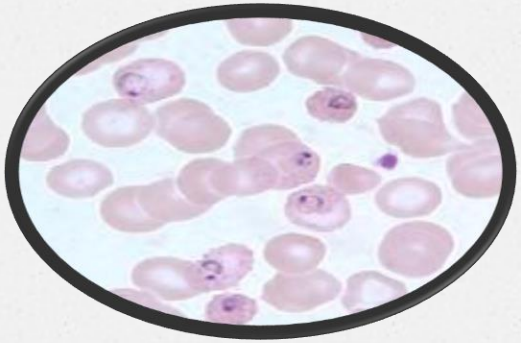
بخش های مورد توجه در تشخیص انگل

کلیدهای 5گانه تشخیص انگل مالاریا

هسته	• رنگ هسته
سیتوپلاسم	• رنگ سیتوپلاسم و اشکال آن
واکوئل غذایی	• عدم رنگ پذیری واکوئل
Stippling	• شافنر-مورر-جیمز-زیمن
پیگمنت(رنگدانه)	• سبز یا سیاه بدلیل تغذیه انگل از گلبول قرمز

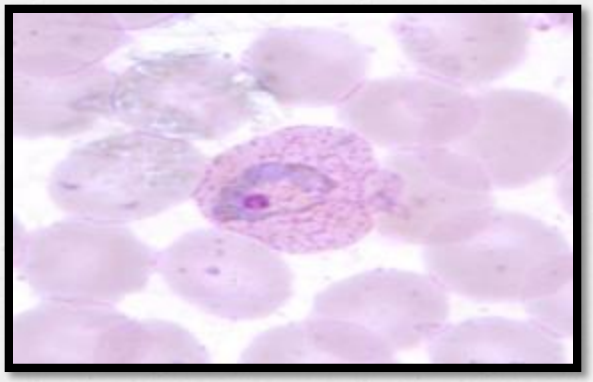
تغییرات RBC در اثر ابتلا به فالسیپاروم

- توانایی آلوده کردن **تمام انواع گلبول قرمز از جوان تا پیر**
- **شکافهای مورر** در داخل RBC نقاط درشت تر و پررنگ تر به تعداد کمتر بصورت نقطه یا خطوط کوتاه سیتوپلاسم
- این شکافها در واقع بقایای کشیدگی حفرهٔ انگلی در سیتوپلاسم RBC هستند.



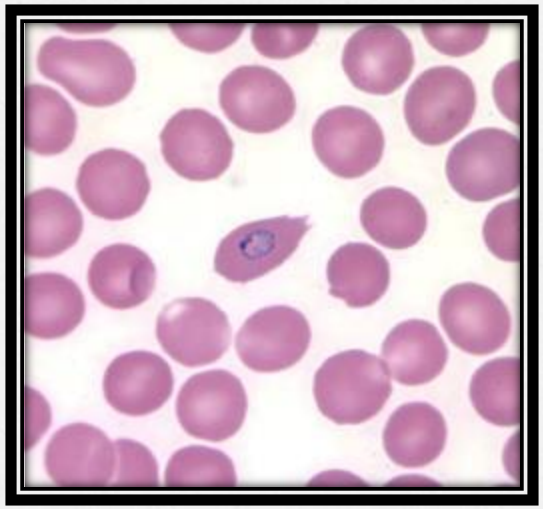
تغییرات RBC در اثر ابتلا به ویواکس

- بزرگ شدن
- نامنظم شدن و کم رنگ شدن RBCها بعلت مصرف HB
- بروز نقاط صورتی، نارنجی و یا خرمایی بر روی RBCبنام **دانه های شافنر** که حفرات ریزی در غشای RBCحاوی پروتئینهای انگل هستند.



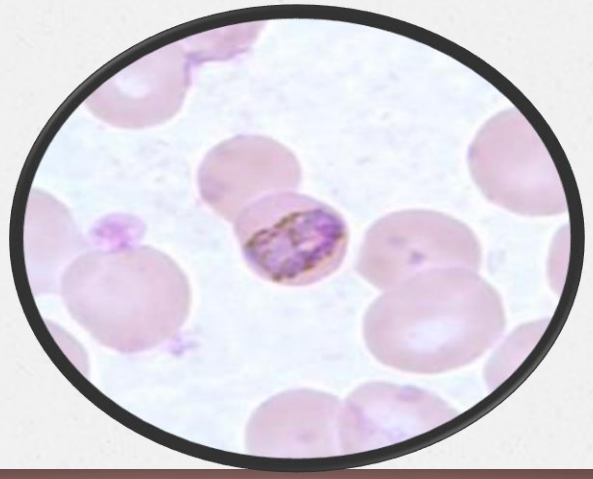
تغییرات RBC در اثر ابتلا به اوال

- RBC تخم مرغی و ریشه دار (Fimbriated margins)
- دانه های جیمز که شبیه شافنر هستند اما پررنگترو درشت تر



تغییرات RBC در اثر ابتلا به مالاریه

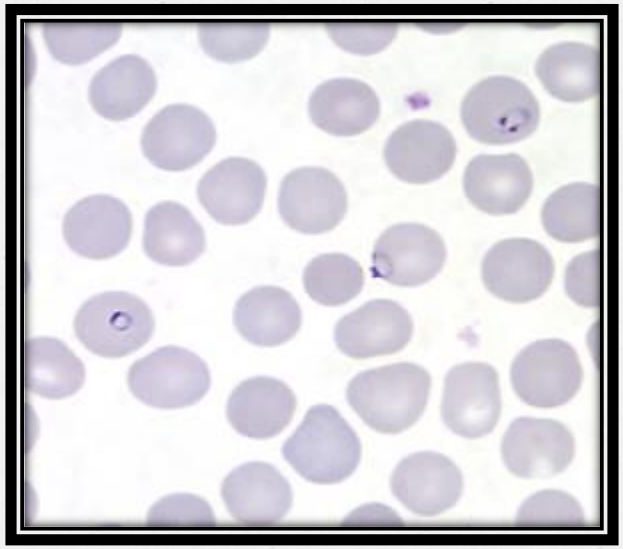
- حمله به RBCهای پیر در نتیجه **RBC کوچکتر از معمول**
- پررنگ تر شدن RBC بعلت تغییرات PH در آن.
- دانه های زیمن که با رنگ آمیزی معمولی دیده نمی شود

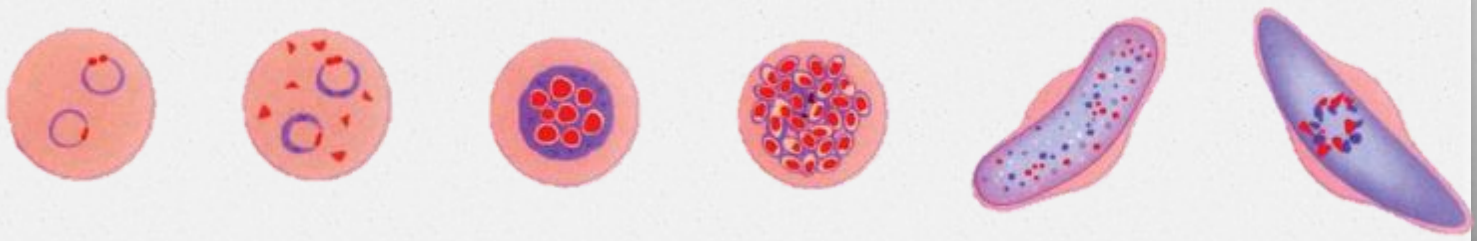


پلاسمودیوم فالسیپاروم

Plasmodium

falciparum



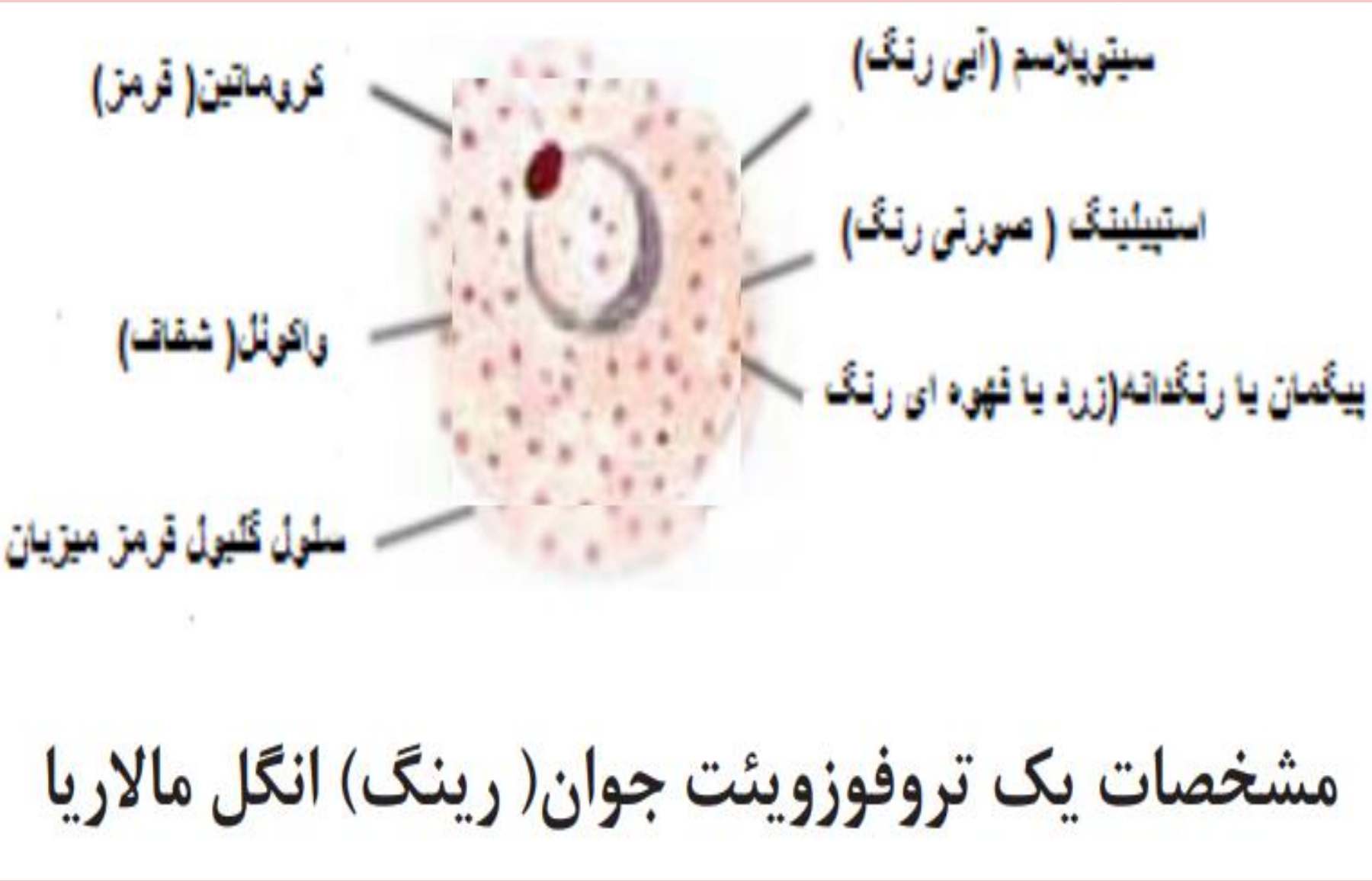


نکاتی چند در مورد فالسیپاروم

- ایجاد Knob روی سطح گلبول قرمز بعنوان گیرنده اپیتلیال عروق باعث چسبیدن RBC به دیواره عروق شده و فقط اشکال رینگ که هنوز چسبنده نیستند در خون باقی میمانند
- در پارازیتمی بالا و عفونتهای شدید تمامی اشکال دیده میشود . در زمان حملات بیشتر اشکال رینگ و در فاصله دو حمله اشکال پیر و شیزونت دیده میشوند
- بعلت حمله فالسیپاروم به تمامی گلبولها پارازیتمی تا حد ۵٪ ممکن است اتفاق بیوفتد

عوارض فالسیپاروم

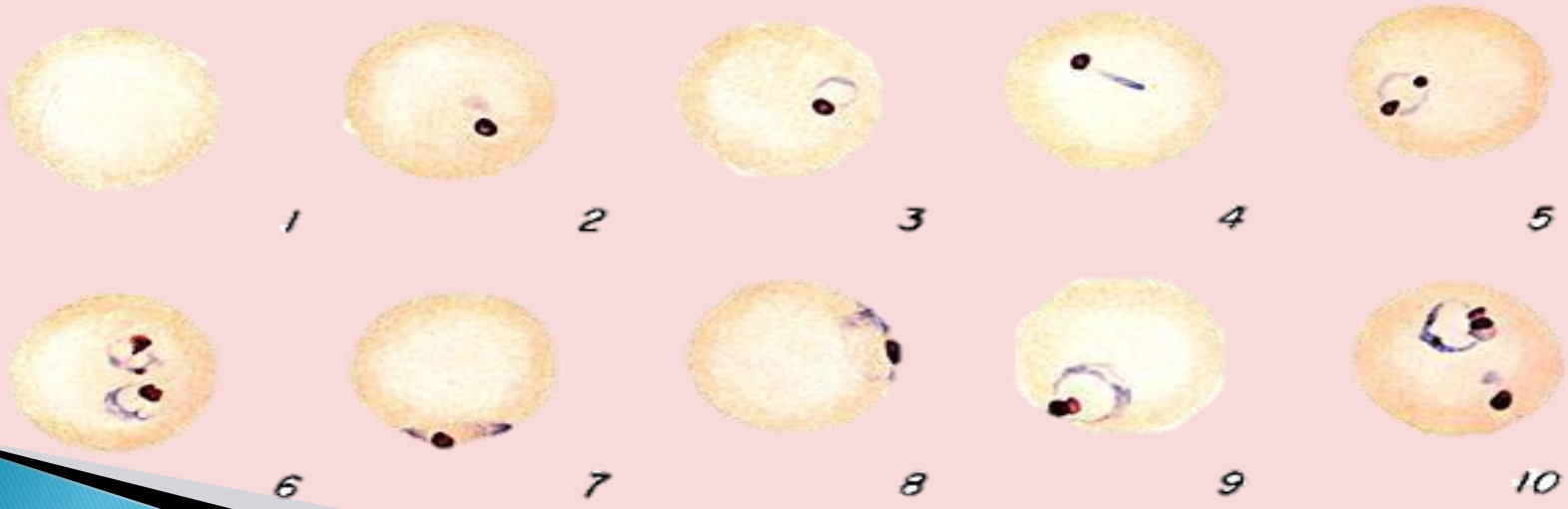
- مالاریای مغزی
- تب پیشاب سیاه
- مالاریای سرد
- اسهال خونی مالاریایی



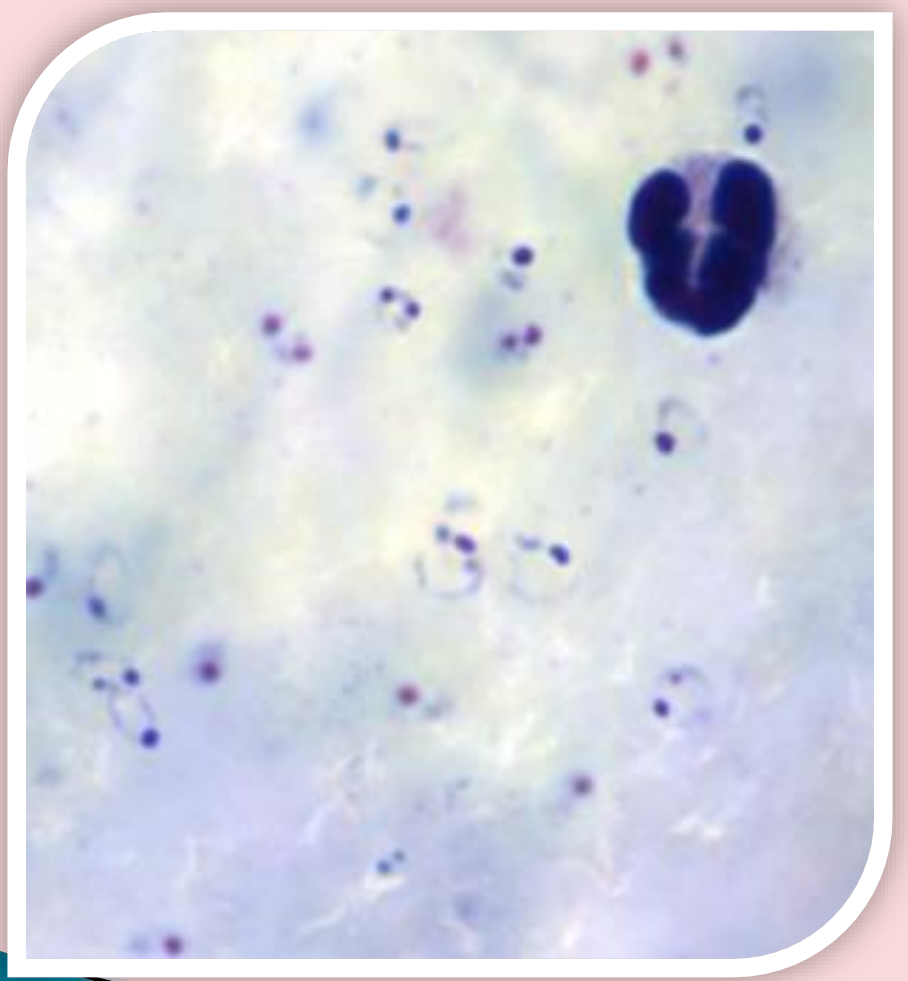
مشخصات یک تروفوزوئیت جوان(رینگ) انگل مالاریا

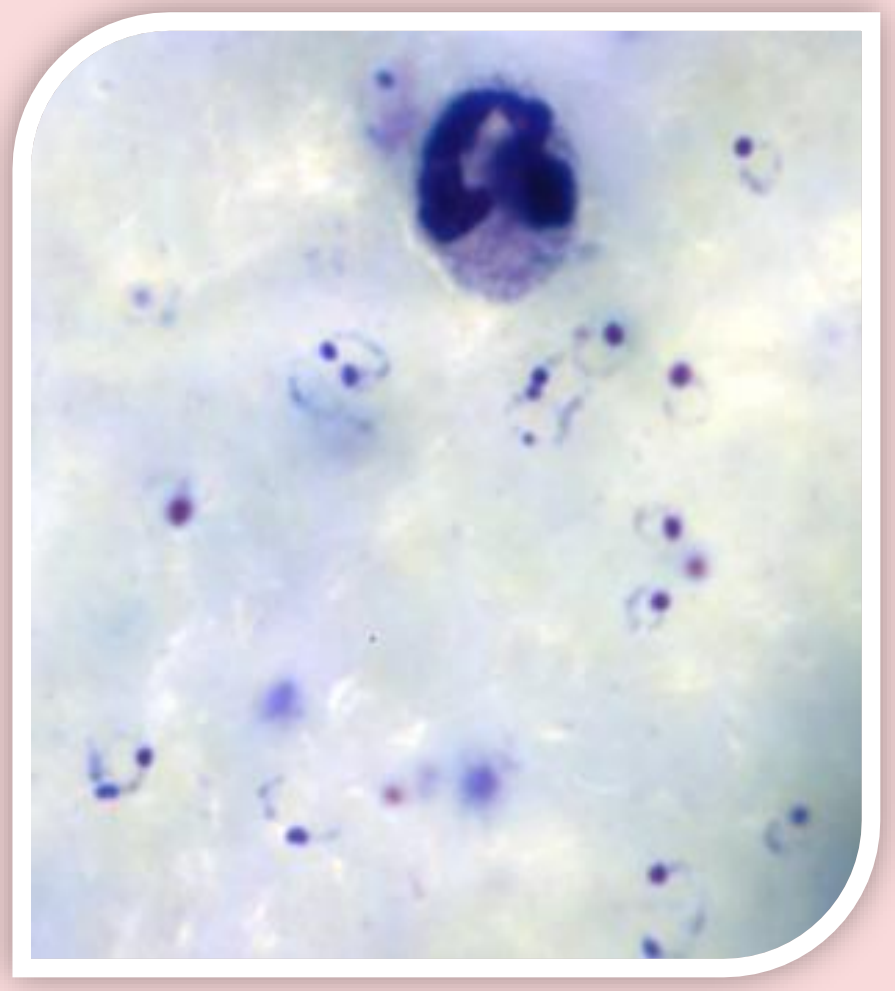
خصوصیات رینگ فالسیپاروم

- اندازه RBC طبیعی
- رینگ نازک و ظریف
- دارای یک یا دو کروماتین
- اشکال *Accole* (در حاشیهٔ گلبول قرمز)(۷-۸-۹)
- عفونت مضاعف رایج (۶-۱۰)

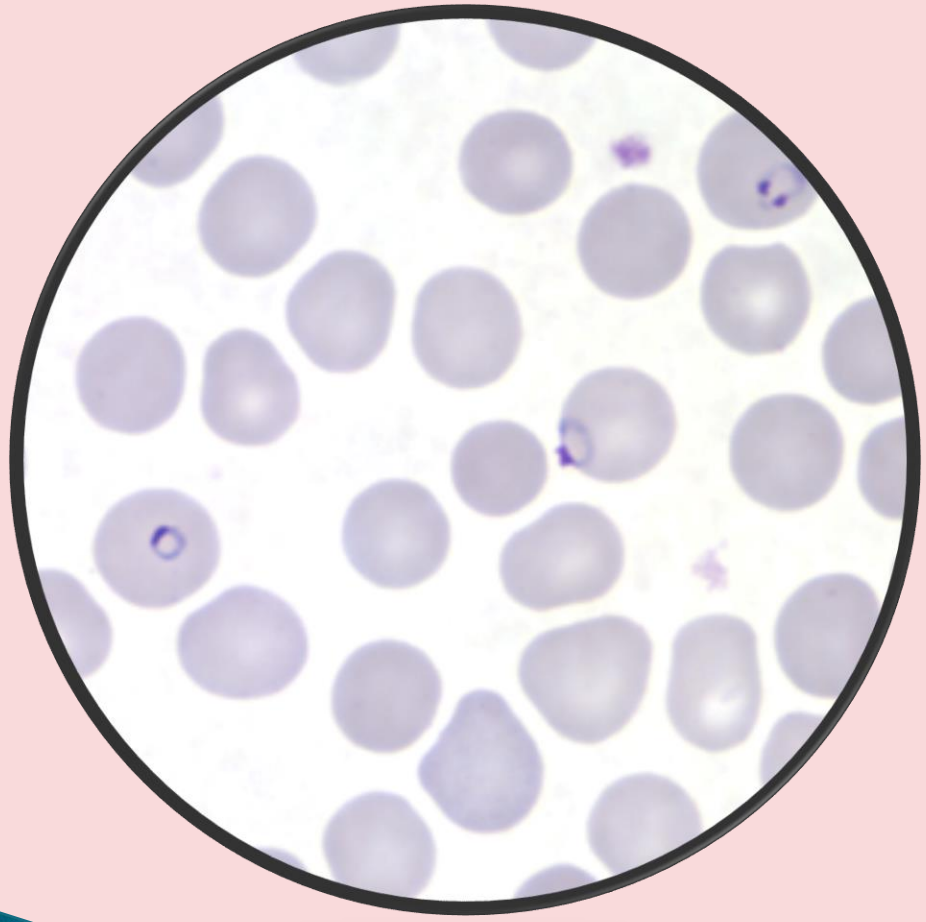


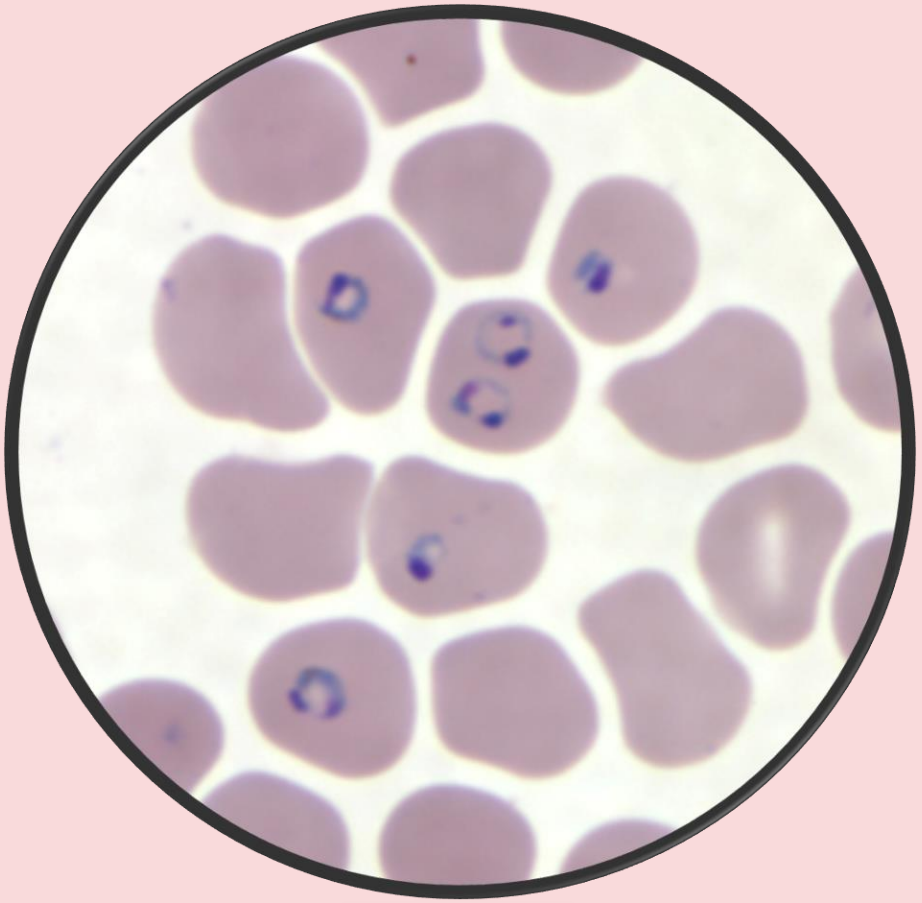
رینگ فالسیپاروم در گسترش ضخیم





رینگ فالسیپاروم در گسترش نازک

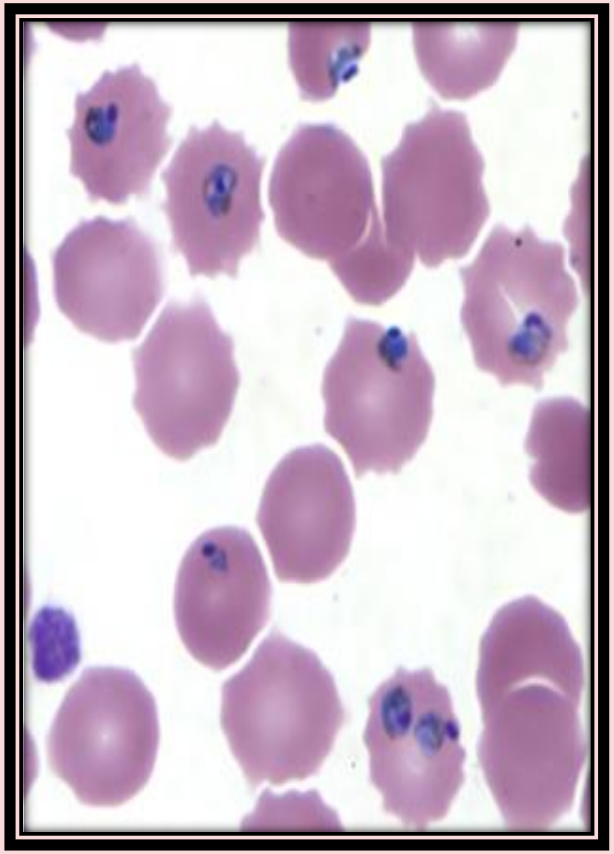


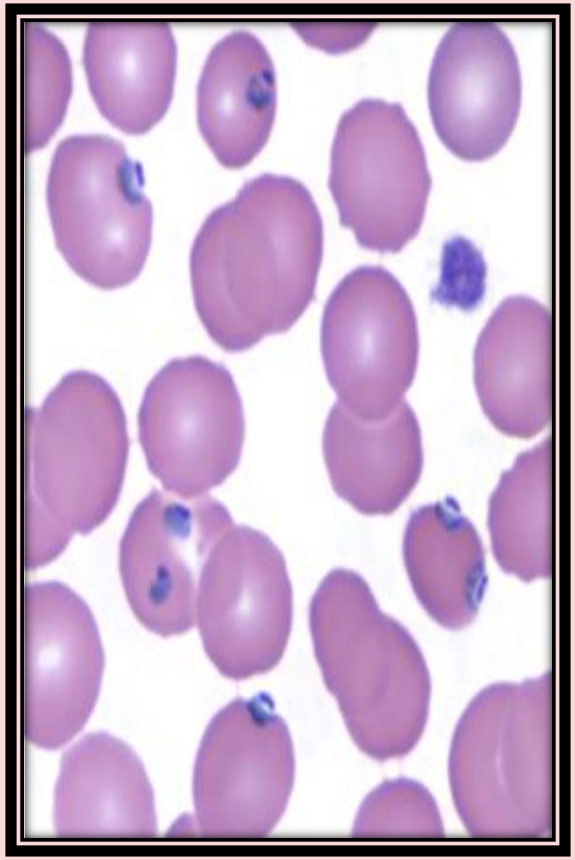


تروفوزوئیت فالسیپاروم

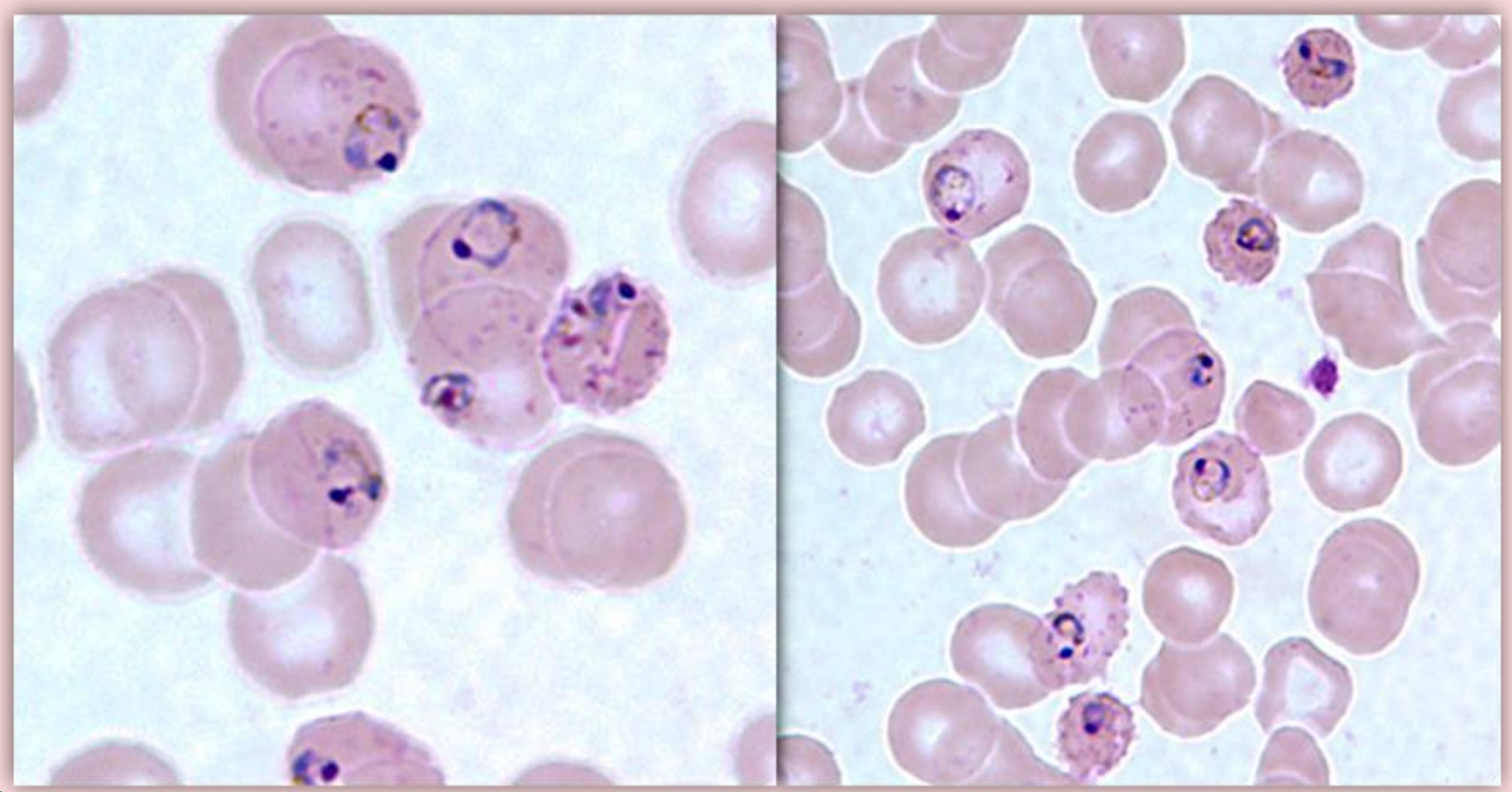
- مقدار پیگمان و کروماتین در ترفوزوئیت در حال رشد در حال افزایش است.
- اشکال فشرده و یا آمیبوئیدی بسته به نحوهٔ نمونه گیری و رنگ آمیزی دیده میشود

ترفوزوئیت فالسیپاروم در گسترشهای ضخیم و نازک





شکافهای مورر در RBCآلوده به فالسیپاروم

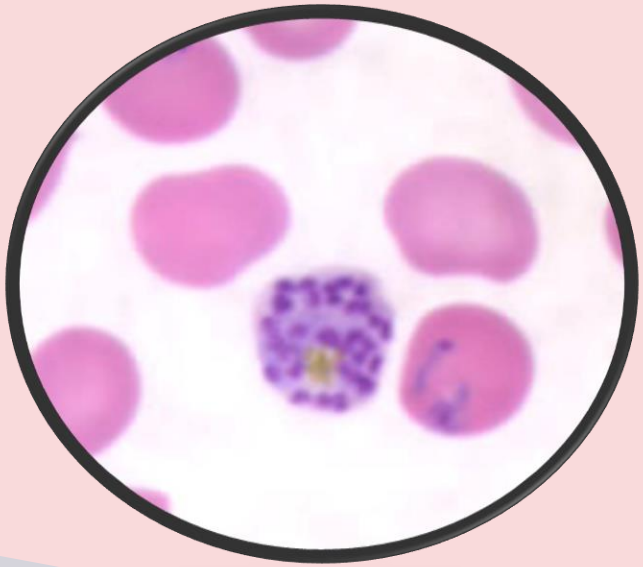


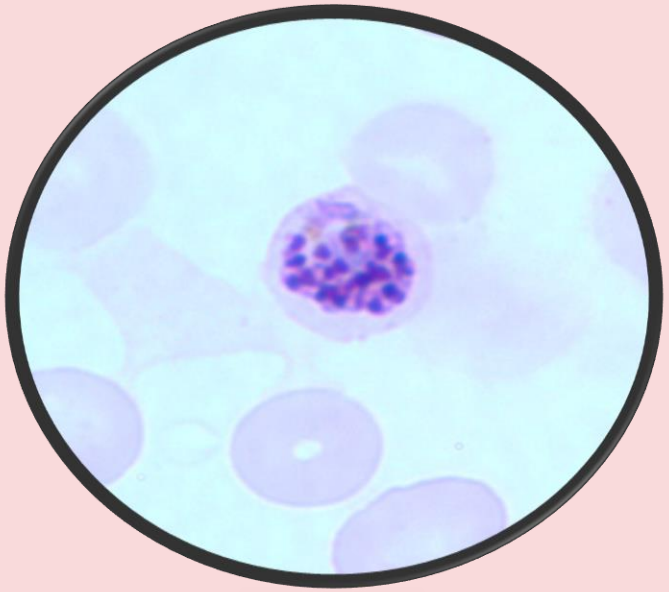
شیزونت فالسیپاروم

☺بندرت در خون محیطی دیده می شوند ، در موارد سخت و عارضه دار.

☺ اغلب حاوی ۸-۲۴ مروزوئیت هستند.

☺یک شیزونت رسیده معمولا دو سوم RBC را پر می کند





گامتوسیت پلاسمودیوم فالسیپاروم

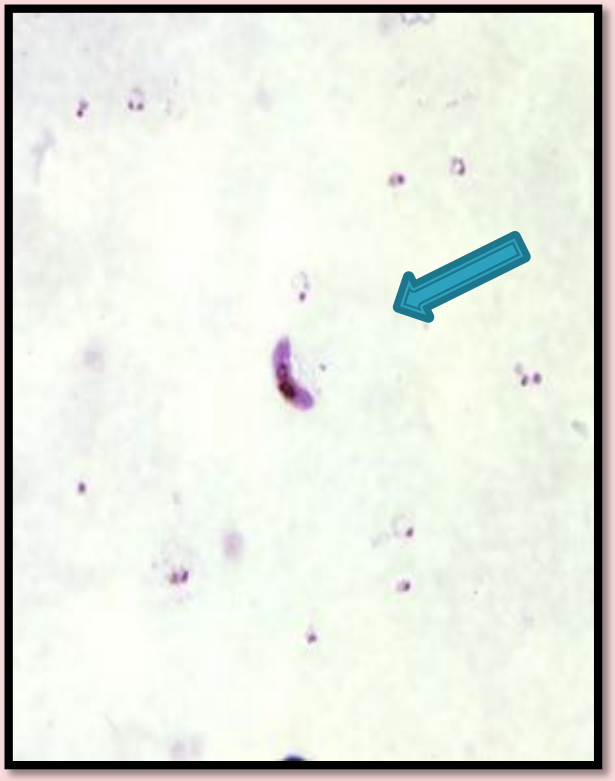
ماکروگامتوسیت

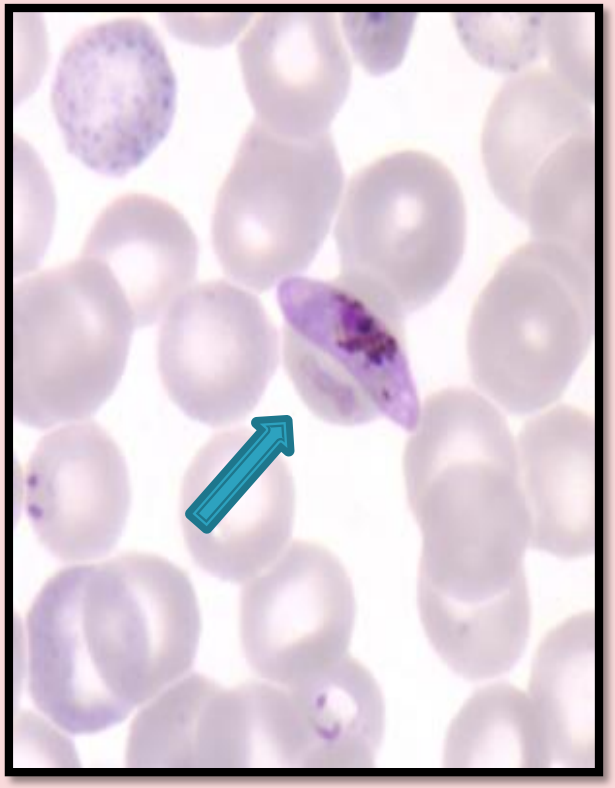
- رنگدانه های درشت و متراکم
- سیتوپلاسم آبی تیره
- هلالی شکل است و اندازه آن یک و نیم برابر گلبول قرمز

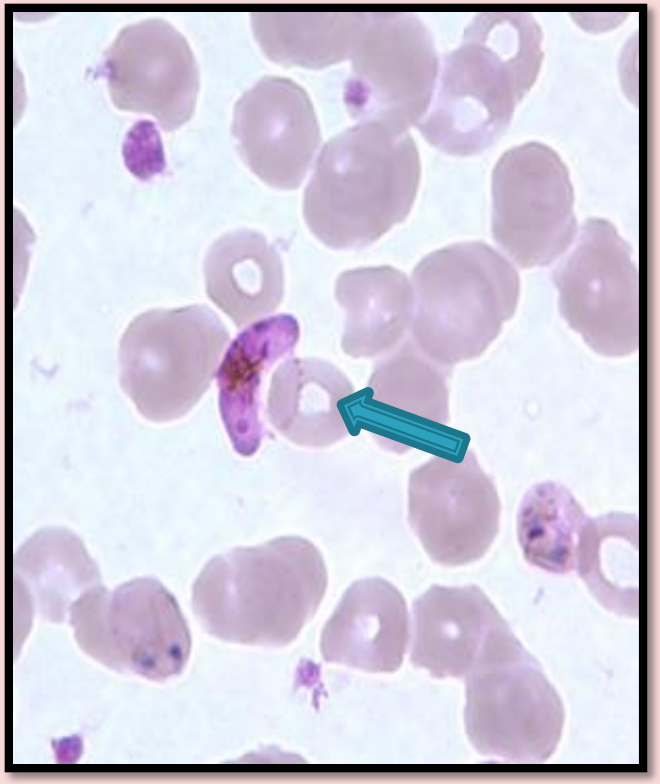
میکرگامتوسیت

- سیتوپلاسم کمرنگ تر نسبت به ماکروگامتوسیت
- رنگدانه ها در سطح سیتوپلاسم پراکنده میباشد
- هلالی شکل و اندازه آن یک و نیم برابر گلبول قرمز

گامتوسیتهای فالسیپاروم در گسترش نازک و ضخیم



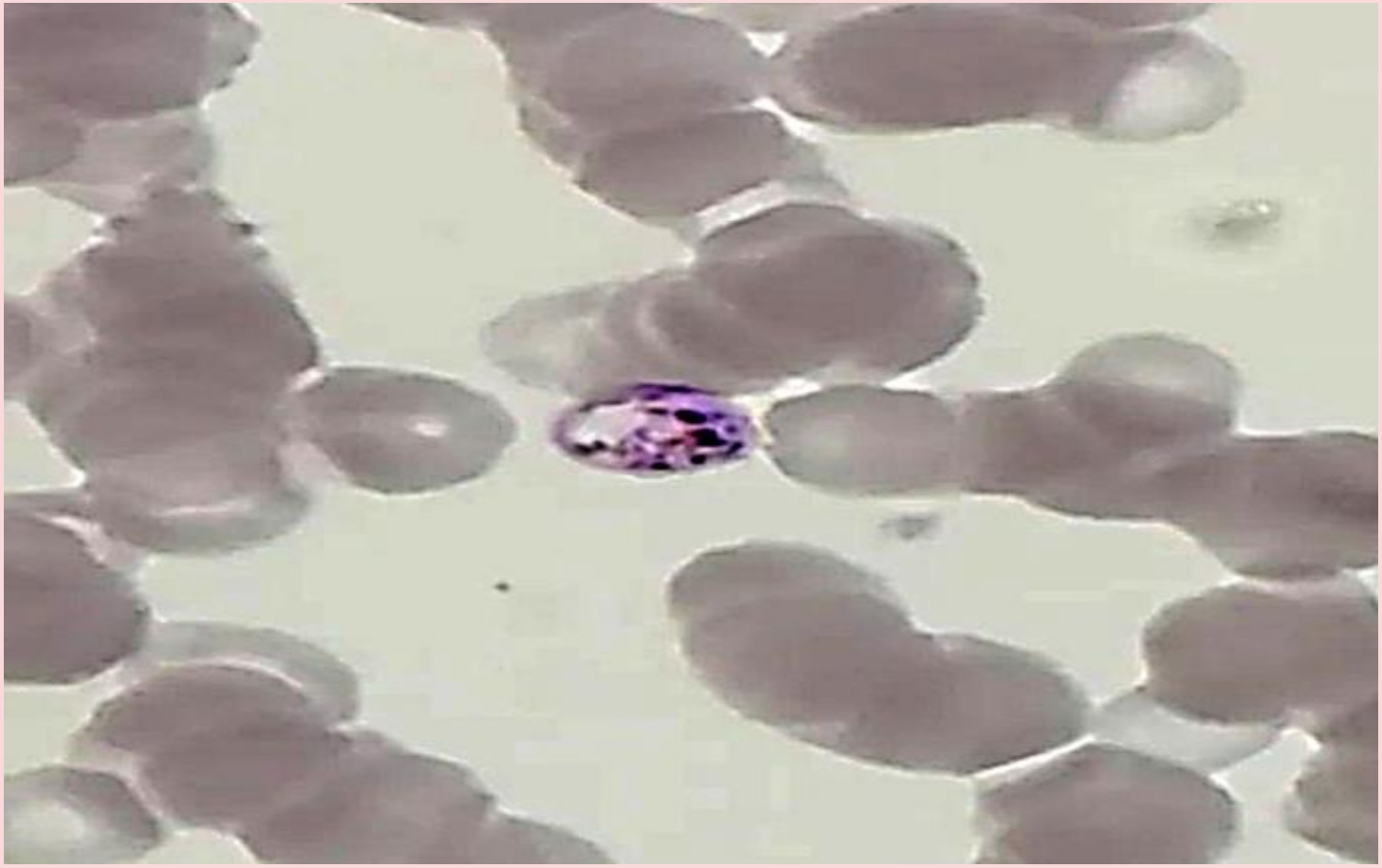




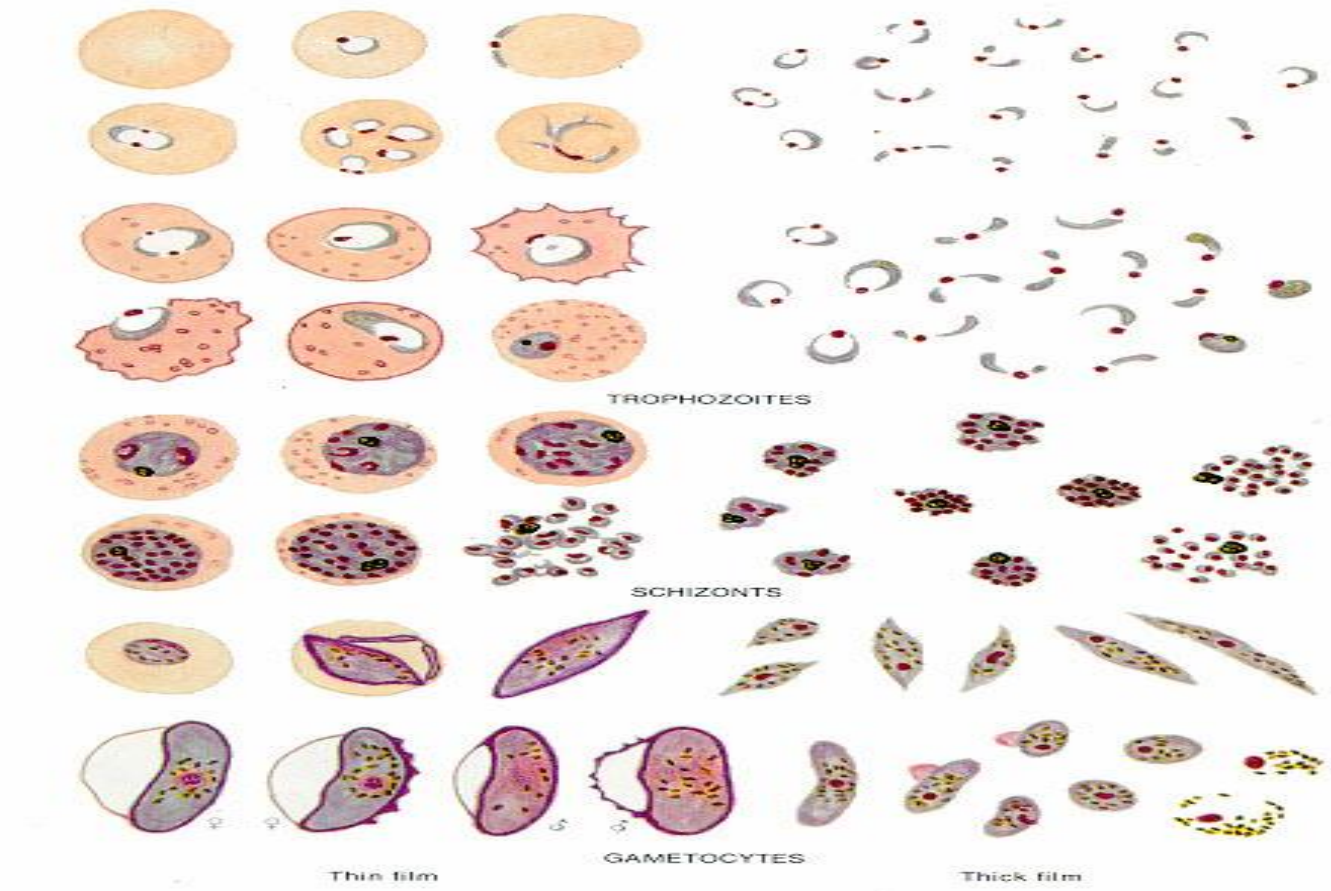
ماکروگامتوسیت

میکروگامتوسیت

گامتوسیت نارس پلاسمودیوم فالسیپاروم



اشکال شماتیک پلاسمودیوم فالسیپاروم



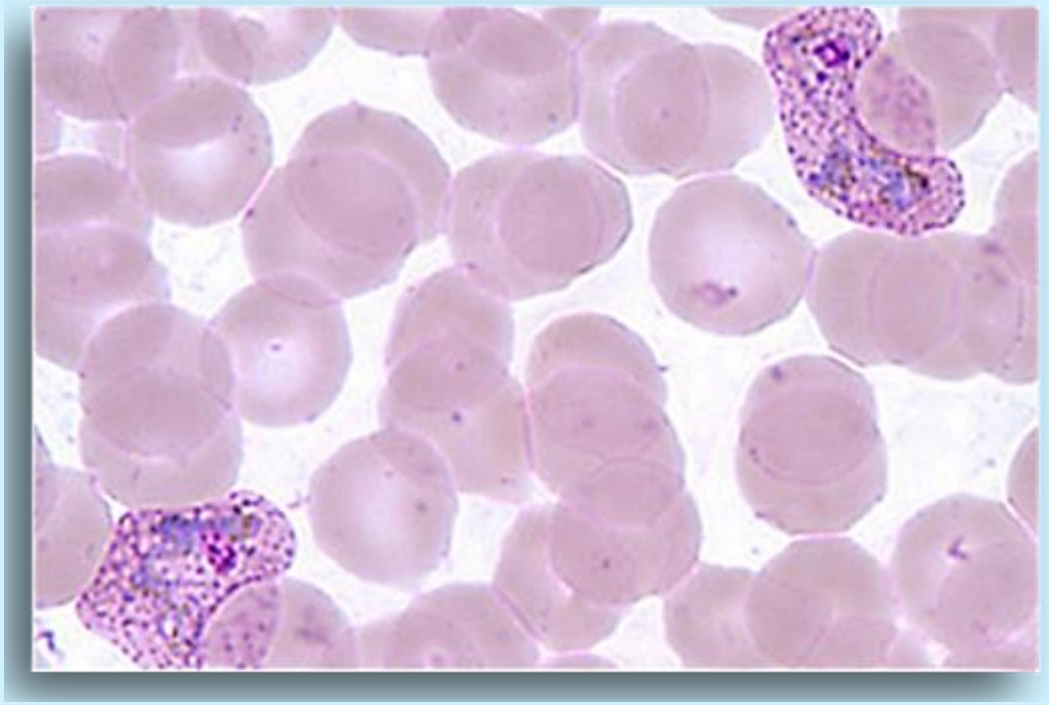
Thin film

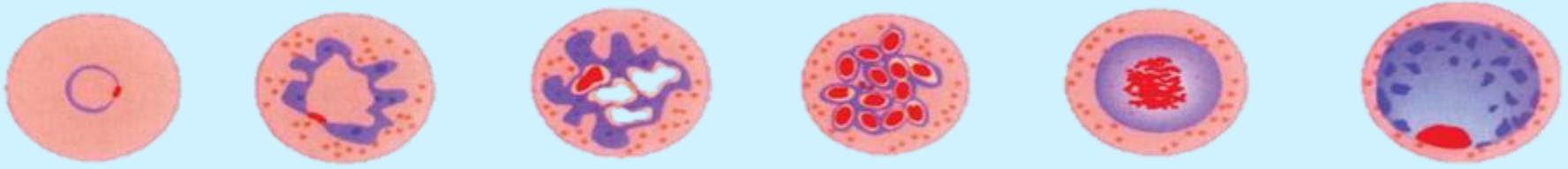
Thick film

پلاسمودیوم ویواکس

PLASMODIUM

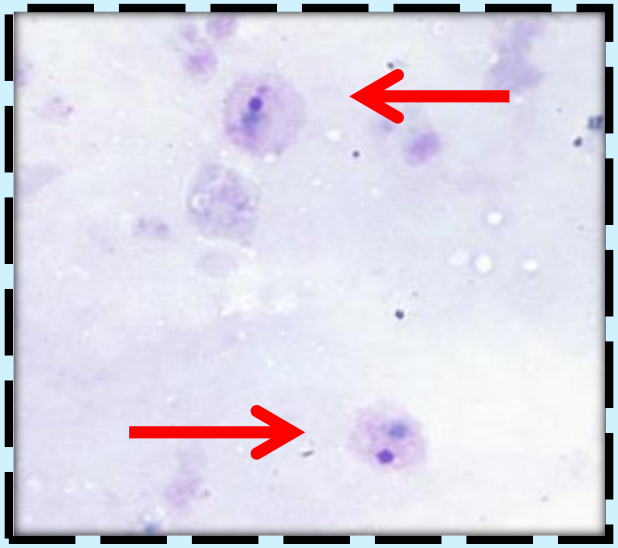
VIVAX



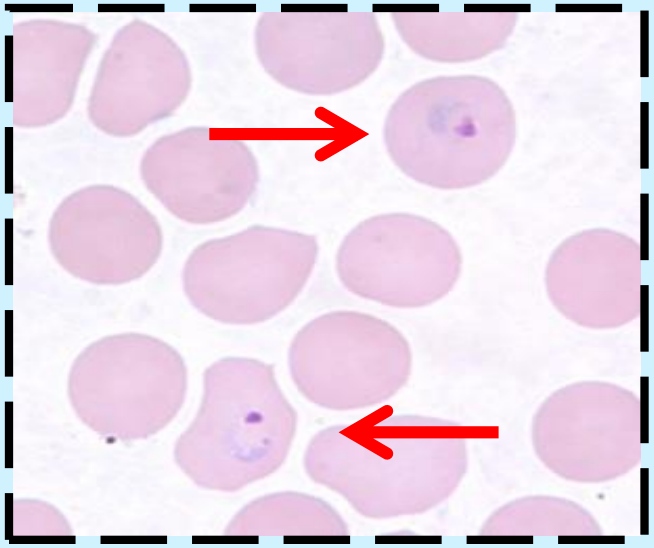


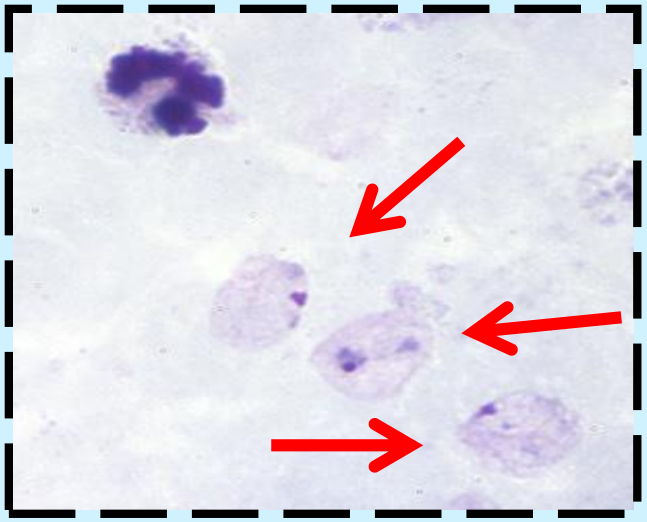
خصوصیات رینگ ویواکس

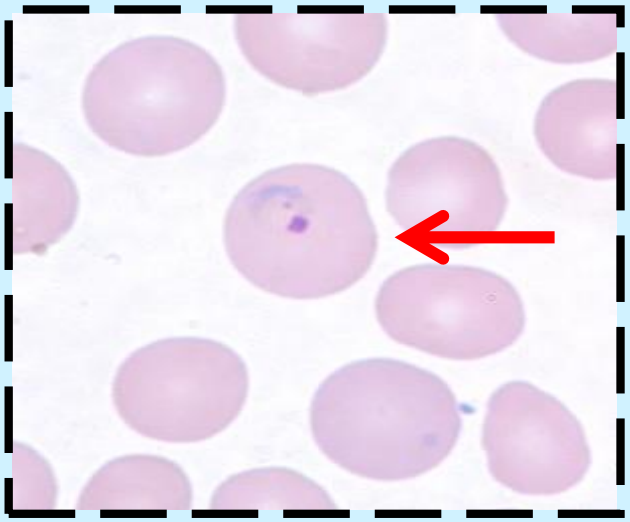
- **گلبولهای قرمز آلوده بزرگتر** از اندازه نرمال RBC (حمله به سلولهای جوان)
- سیتوپلاسم ضخیم با دانهٔ کروماتینی بزرگ و منفرد(تمایز از رینگ اوال مشکل)
- **دانه های شافنر** در تروفوزوئیت رسیده دیده میشود.
- عفونت مضاعف ممکن است دیده شود



رینگهای ویواکس
در گسترشهای
ضخیم و نازک

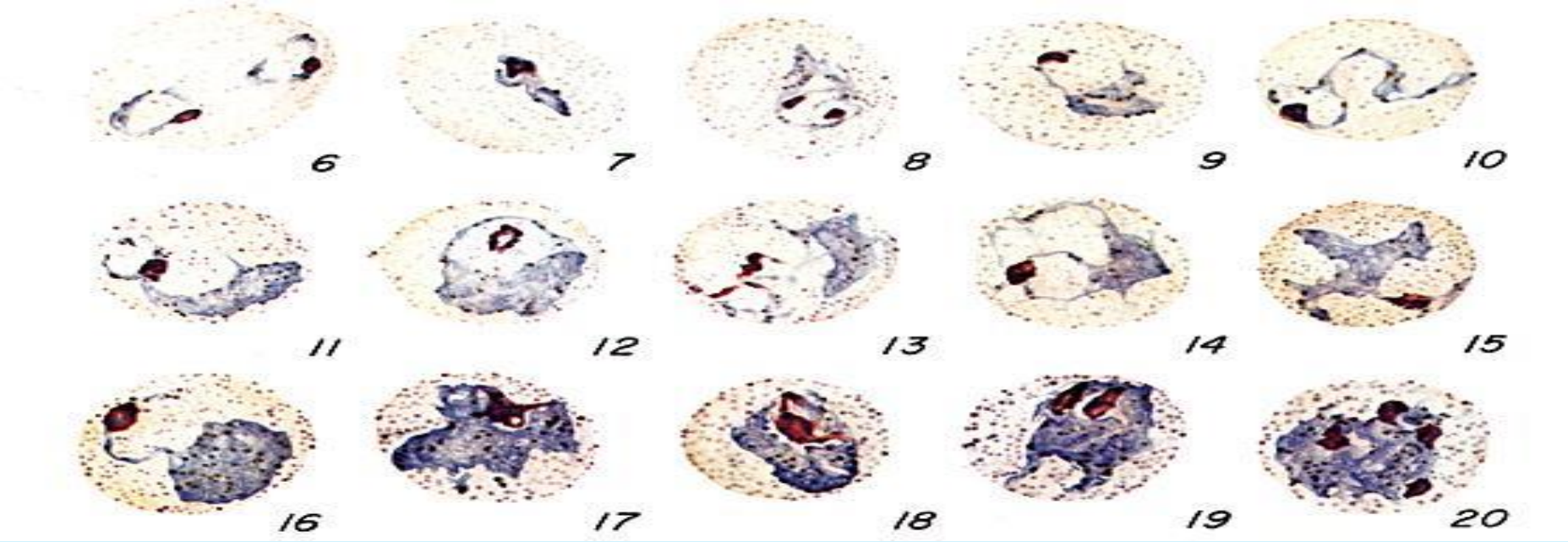






تروفوزوئیت ویواکس

- گلبولهای قرمز آلوده بزرگتر از اندازه نرمال RBC
- سیتوپلاسم آمیبوئید با پاهای کاذب ظریف و واکوئولهای بزرگ
- دانه های شافنر با رنگ آمیزی صحیح دیده می شوند
- رنگدانه ظریف و قهوه ای رنگ



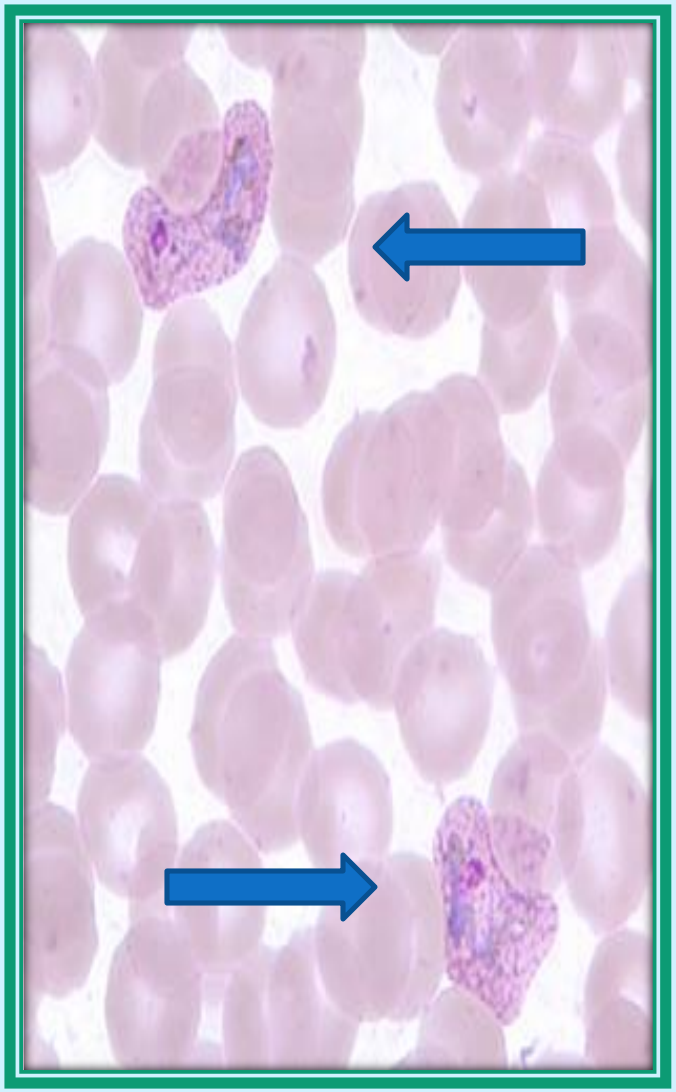
به موارد زیر توجه کنید:

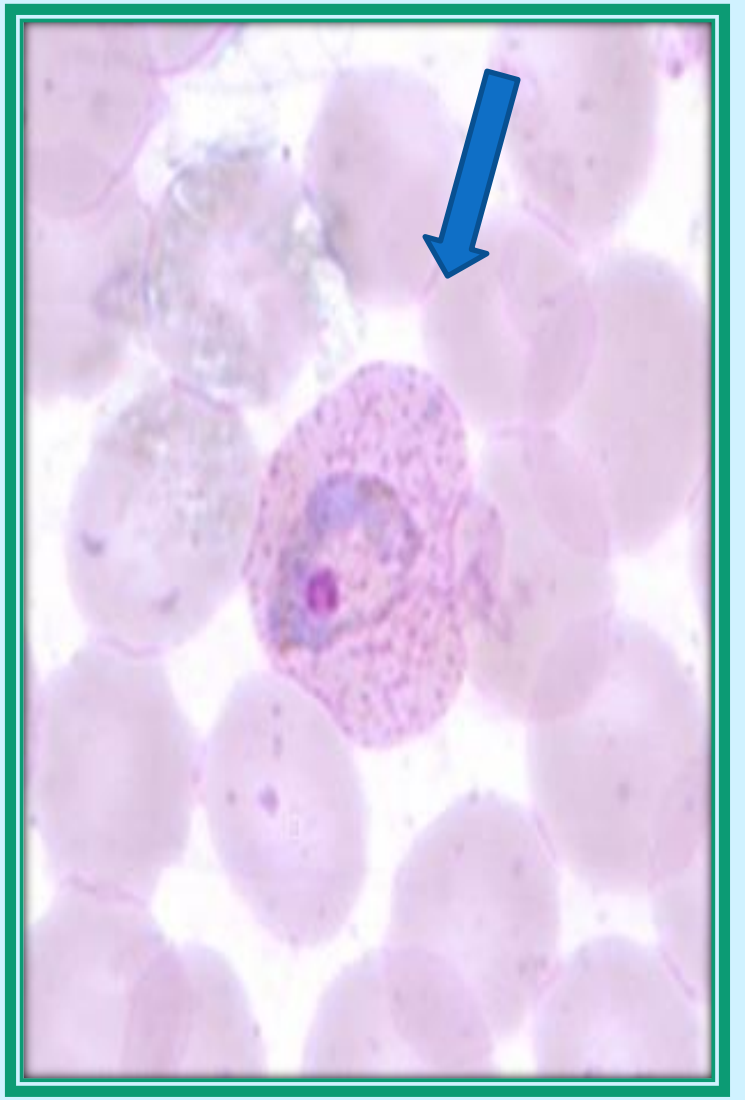
☺آمیبوئیدها

☺دانه های شافنر

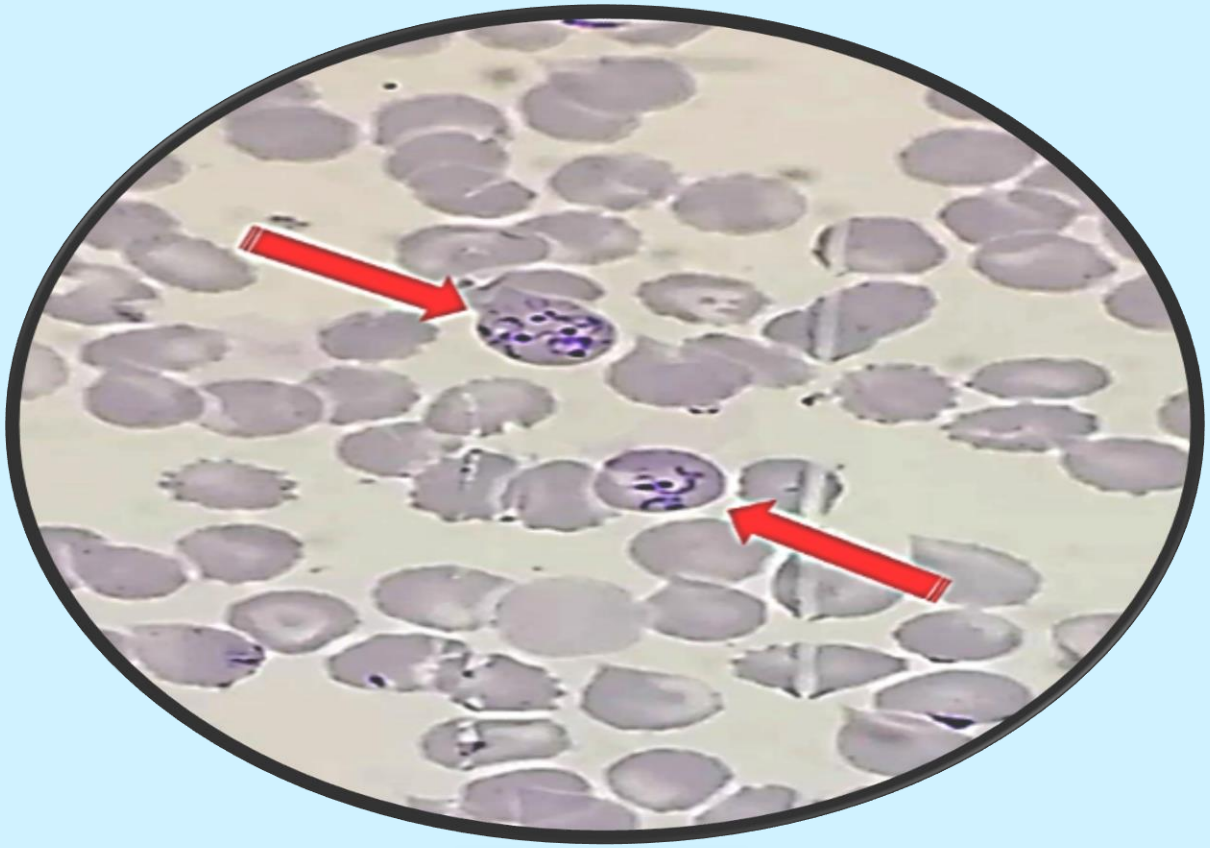
و

☺گلبولهای قرمز آلوده بزرگتر





آلودگی مضاعف (Multiple infection) در پلاسمودیوم ویواکس



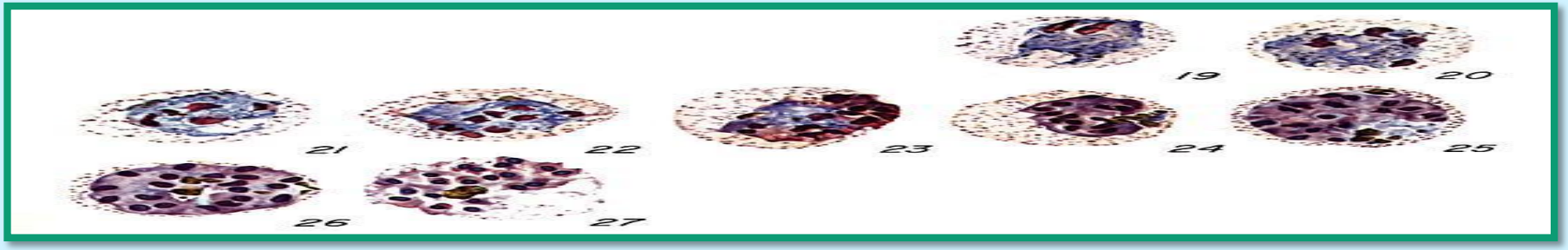
شیزونت پلاسمودیوم ویواکس

شیزونت در حال رشد

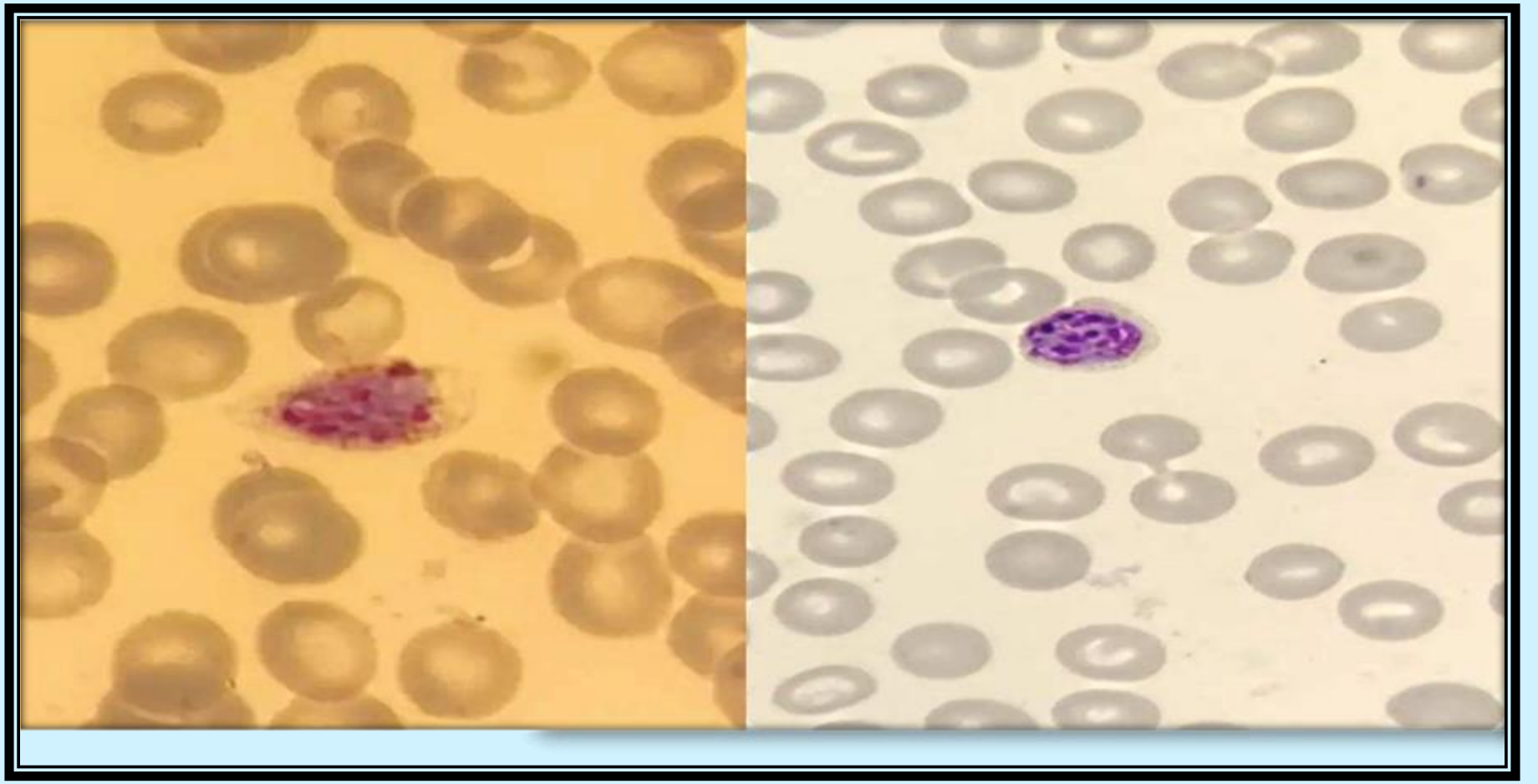
- سایز گلبول قرمز آلوده بزرگتر از گلبول قرمز سالم
- دارای دو یا چند توده کروماتینی و پیگمان بزرگ وآمیبوئیدی

شیزونت رسیده

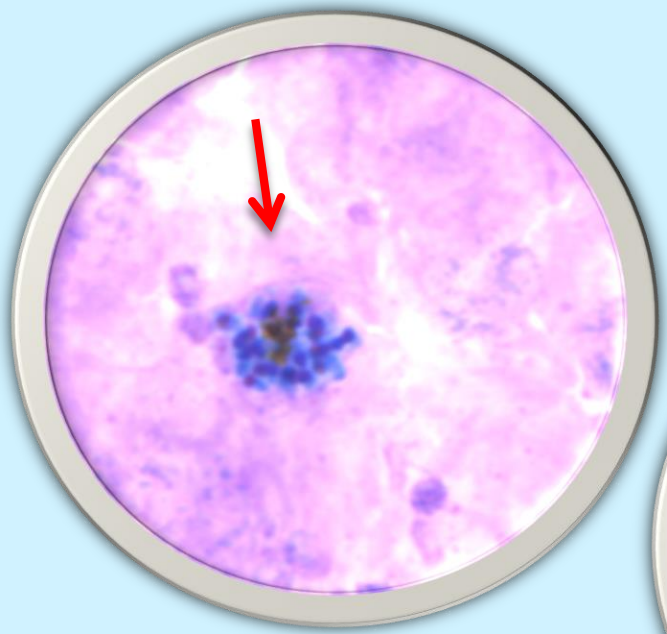
- سایز گلبول قرمز آلوده بزرگتر از گلبول قرمز سالم
- ۱۲-۲۴ مروزوئیت
- پیگمان در یک یا دو توده

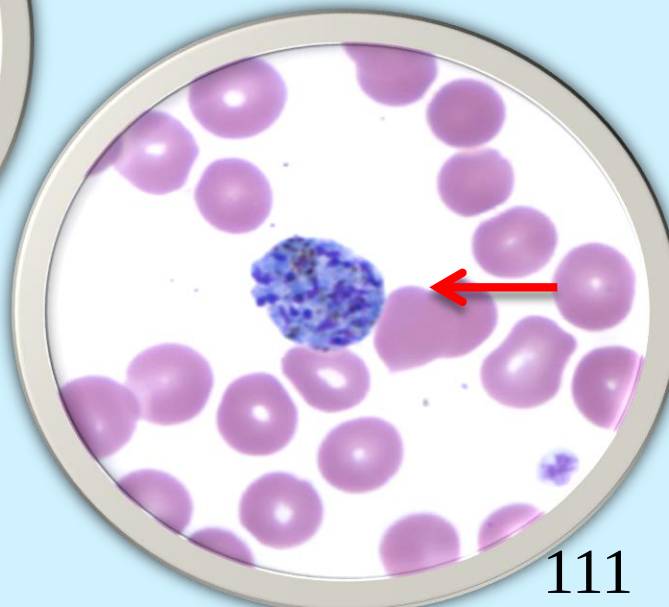


شیزونت نارس پلاسمودیوم ویواکس



شیزونت ویواکس در گسترش ضخیم و نازک





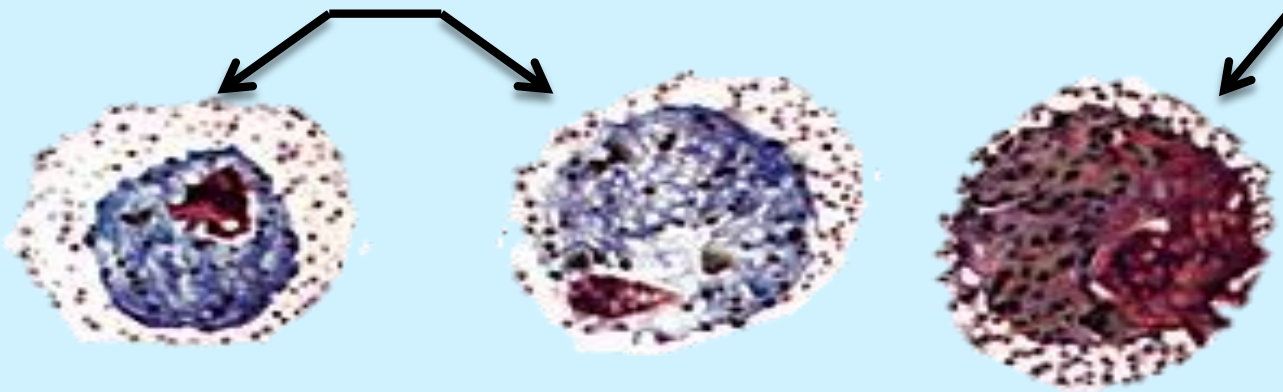
گامتوسیت ویواکس

میکروگامتوسیت

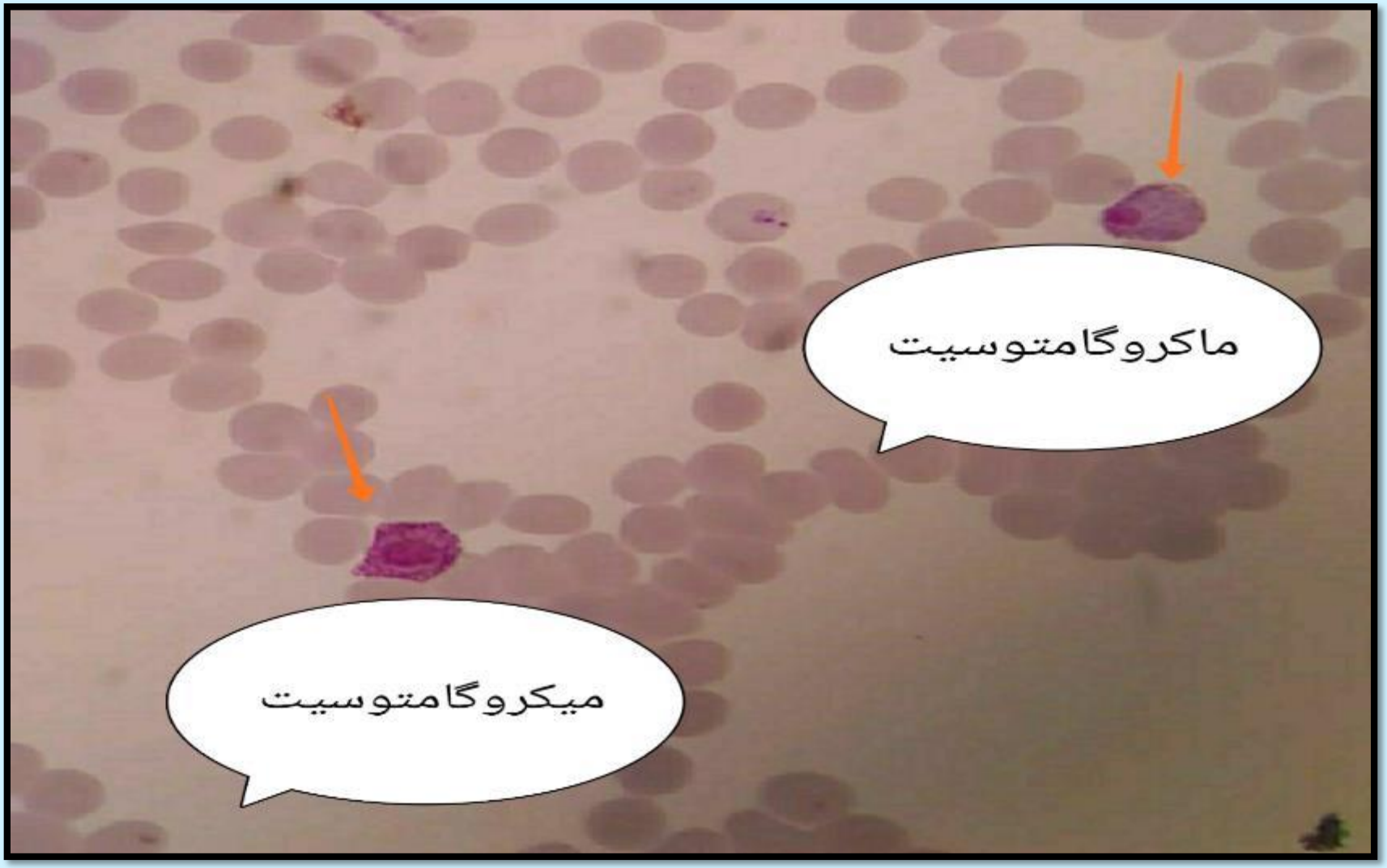
- هسته کم رنگ بزرگی که بیشتر فضای انگل را اشغال کرده است
- سیتوپلاسم آبی کم رنگ
- هسته در مرکز

ماکروگامتوسیت

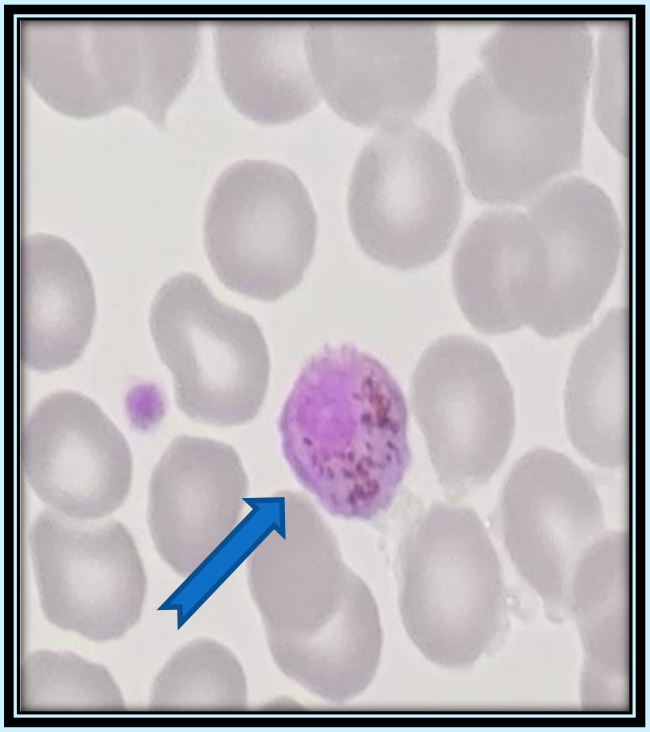
- گرد تا بیضی شکل
- معمولا گلبول قرمز را پر میکند
- هسته فشرده قرمز پررنگ در گوشه ای از انگل
- شبیه تروفوزوئیت پیر اما فاقد واکوئل

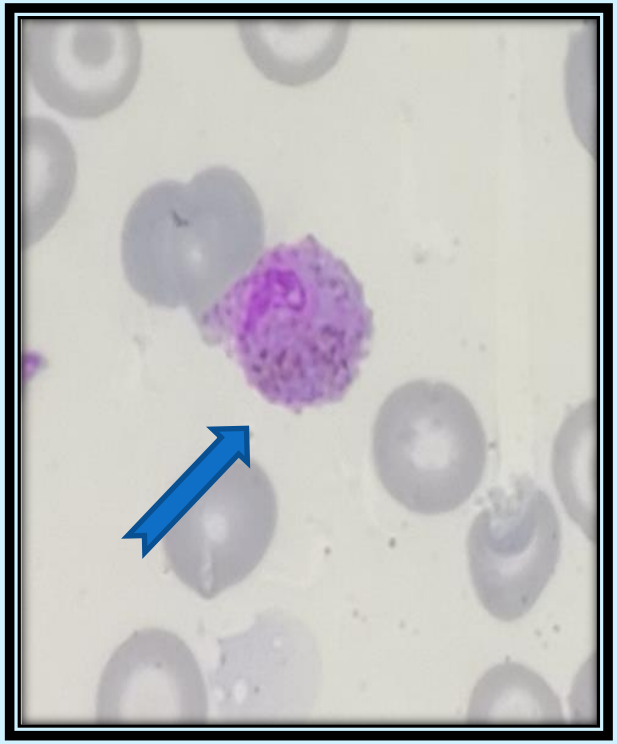


تفاوت میکرو و ماکروگامتوسیت

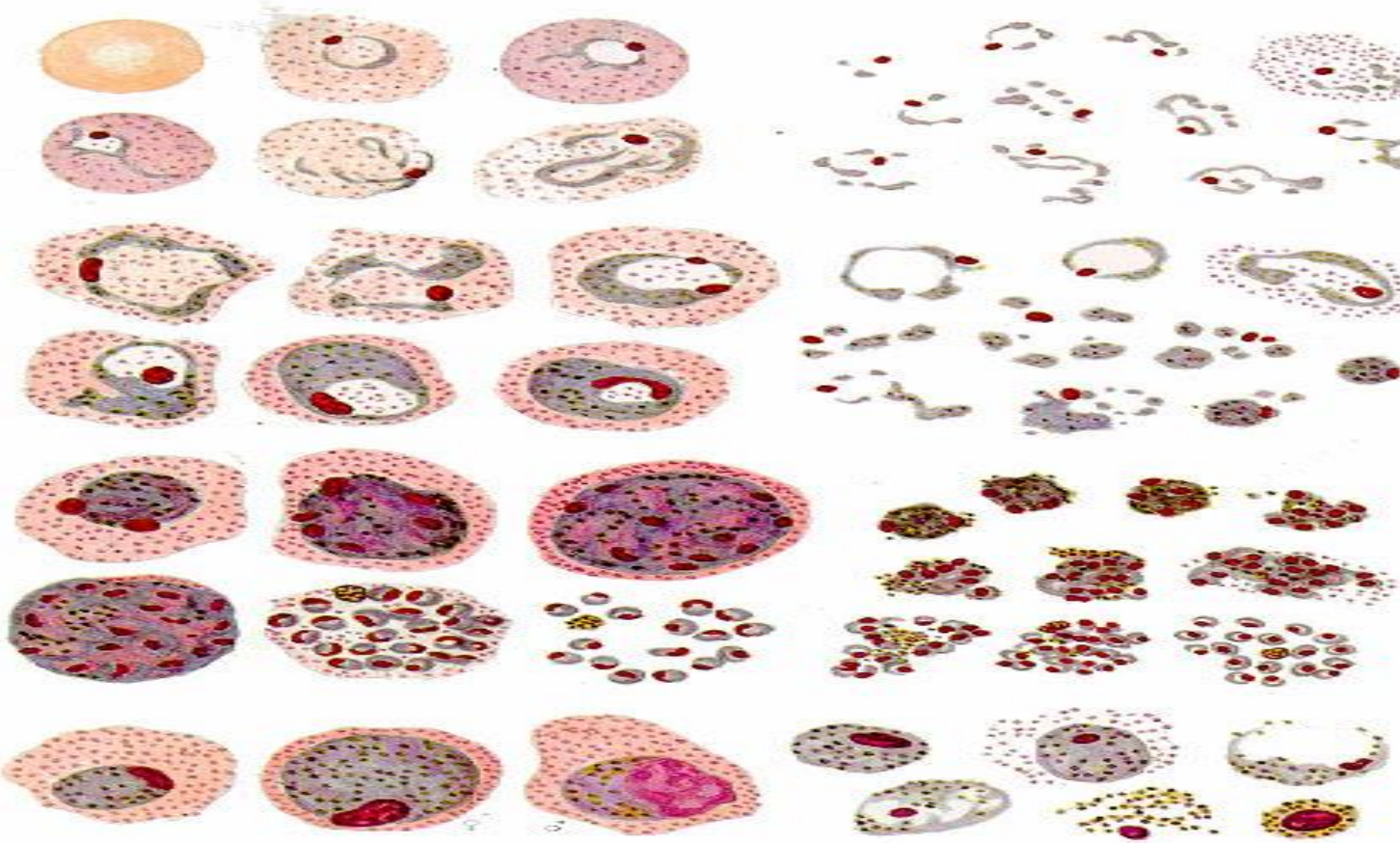


گامتوسیتهای ویواکس در گسترش ضخیم و نازک





اشکال شماتیک پلاسمودیوم ویواکس



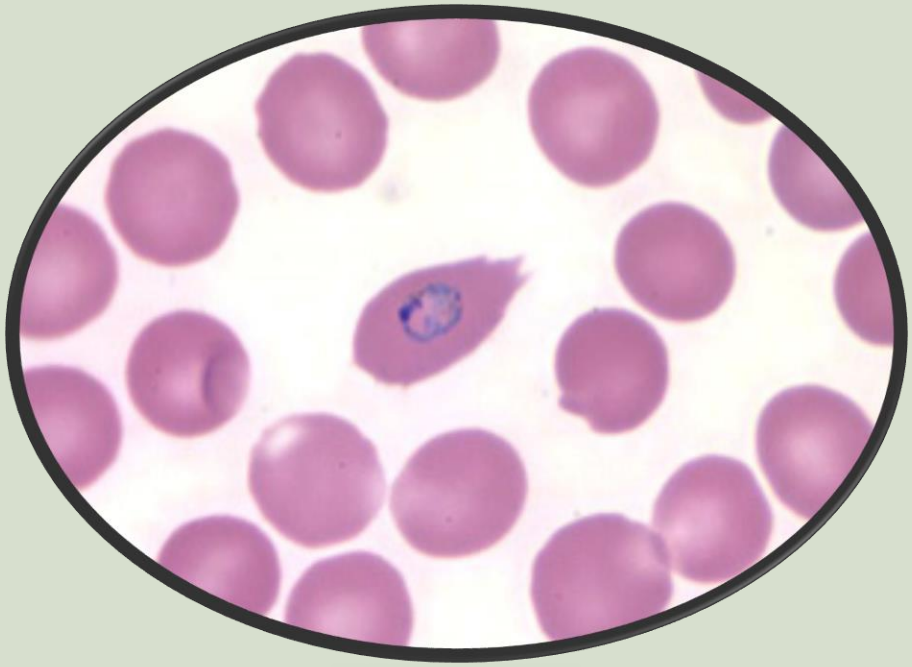
Thin film

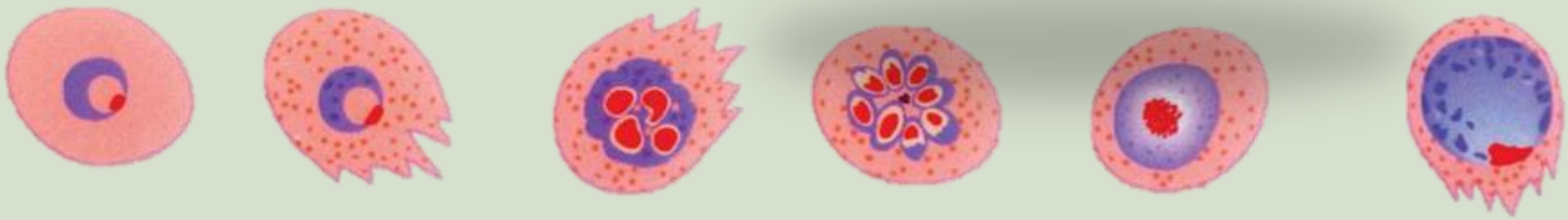
Thick film

پلاسمودیوم اوال

Plasmodium

Ovale

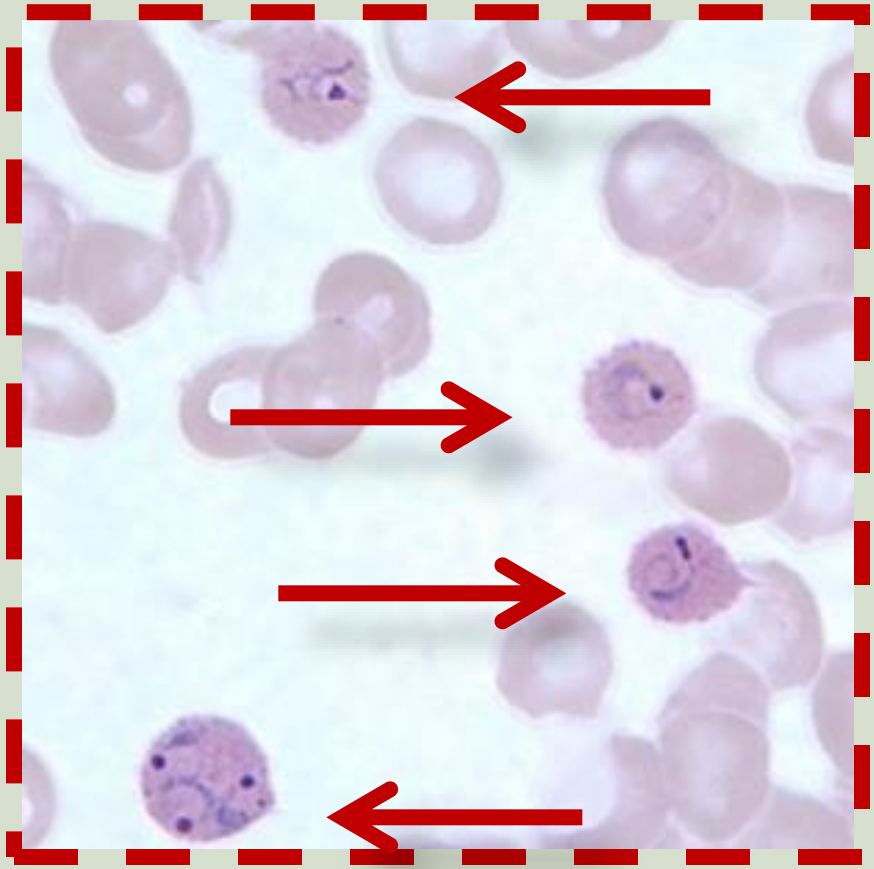


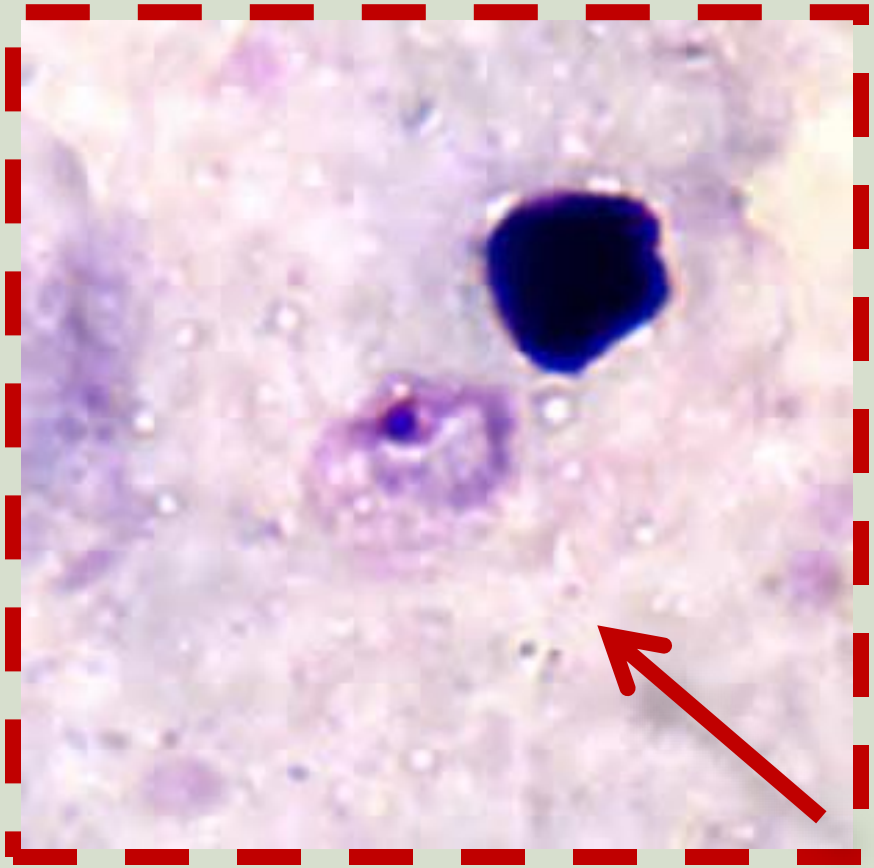


خصوصیات رینگ اوال

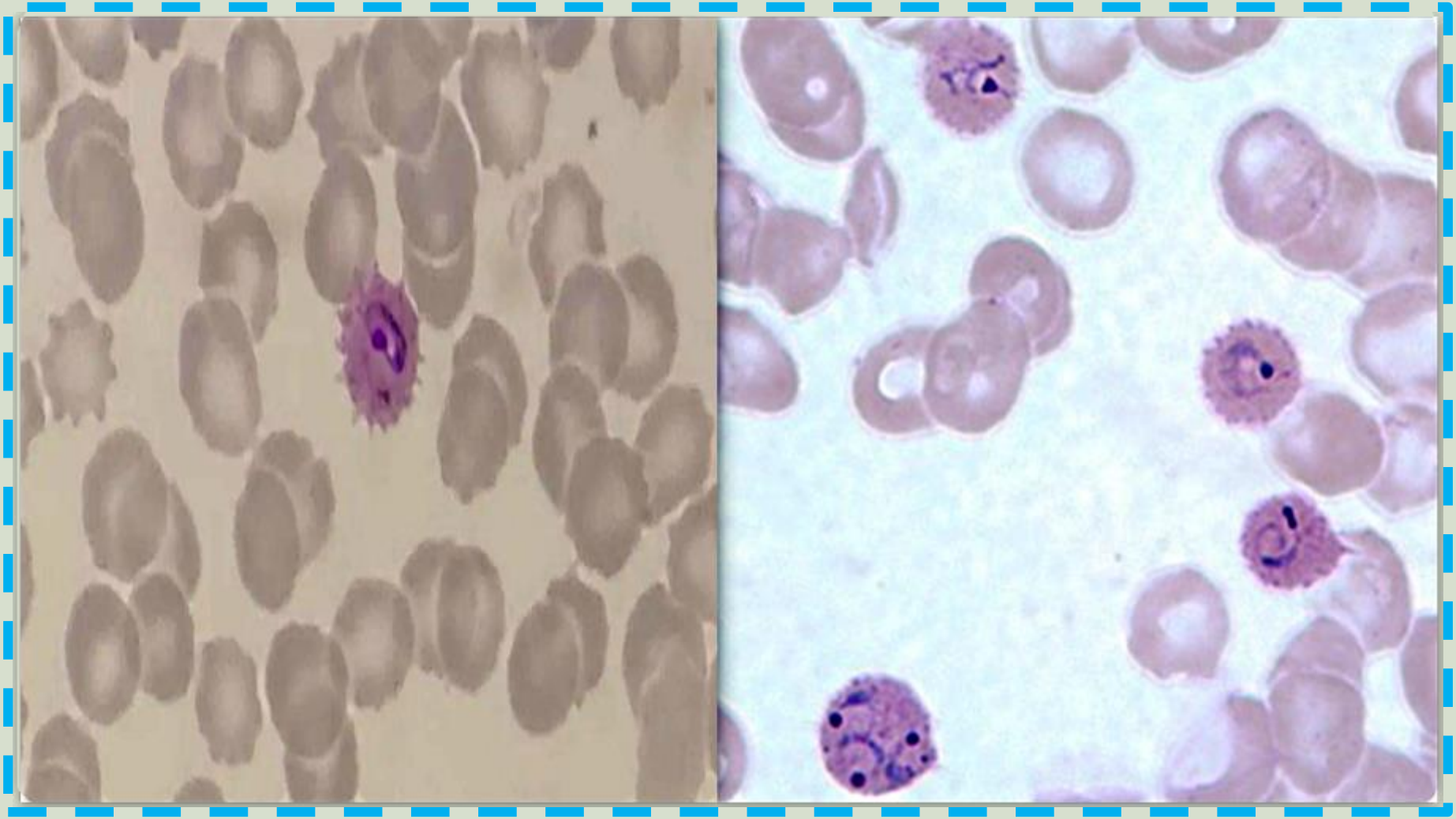
- حاوی کروماتین تک نقطه وگاهی دو نقطه ای
- حضور گلبول قرمز چند انگلی که مانع افتراق آن از فالسیپاروم
- افتراق حلقه منفرد از ویواکس مشکل است زیرا در هردو سیتوپلاسم معمولا ضخیم با کروماتین بزرگ نقطه ای است
- بزرگی گلبول قرمز معمولا کمتر از ویواکس

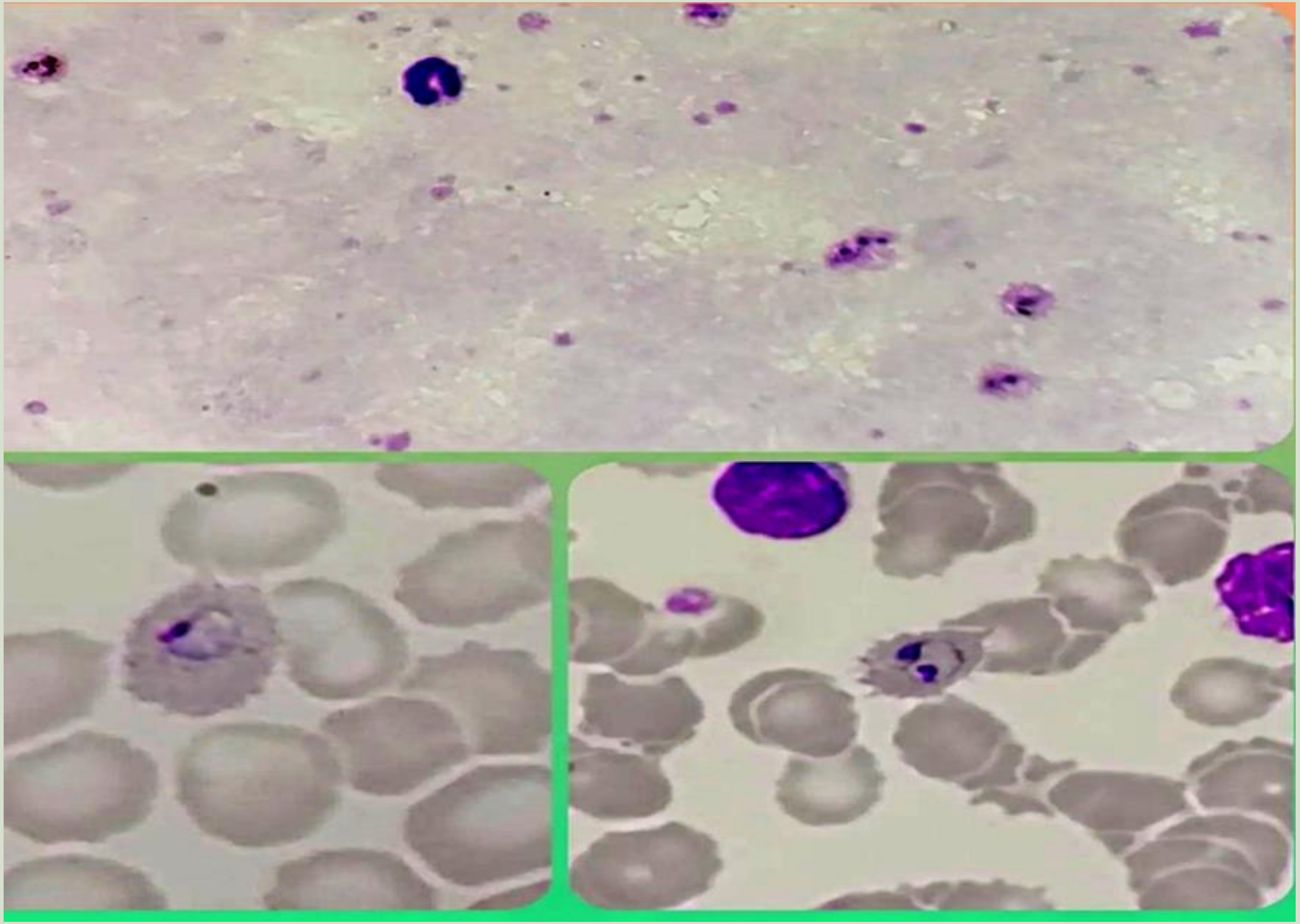
رینگ اوال در گسترش ضخیم و نازک





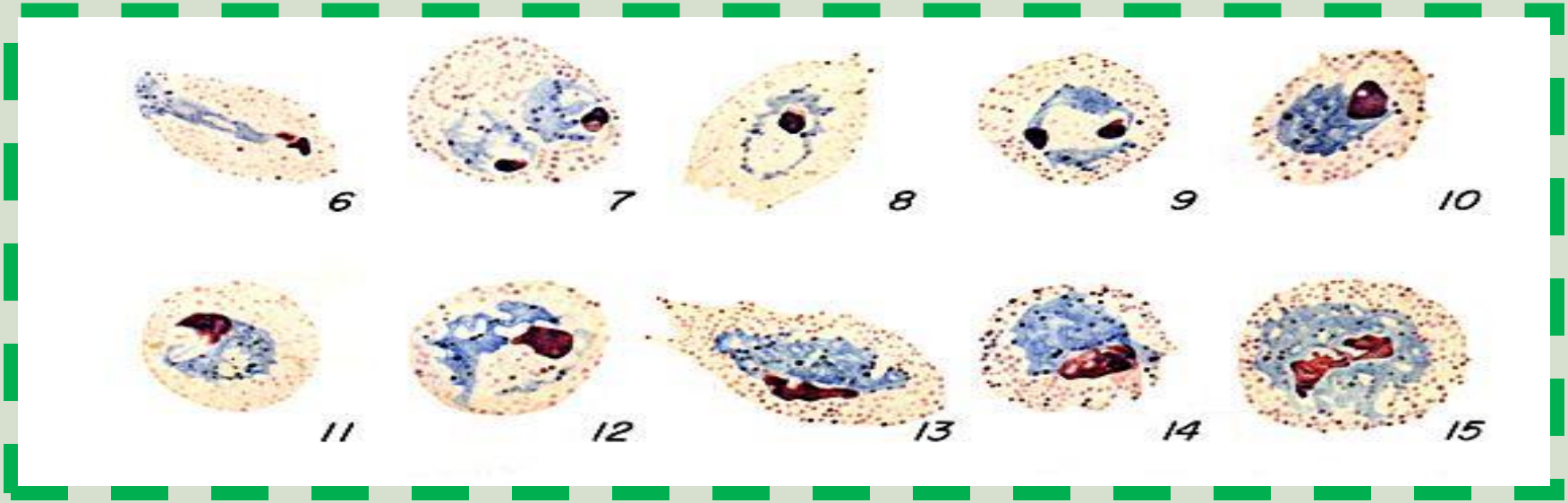
تروفوزوئیت های پلاسمودیوم اوال



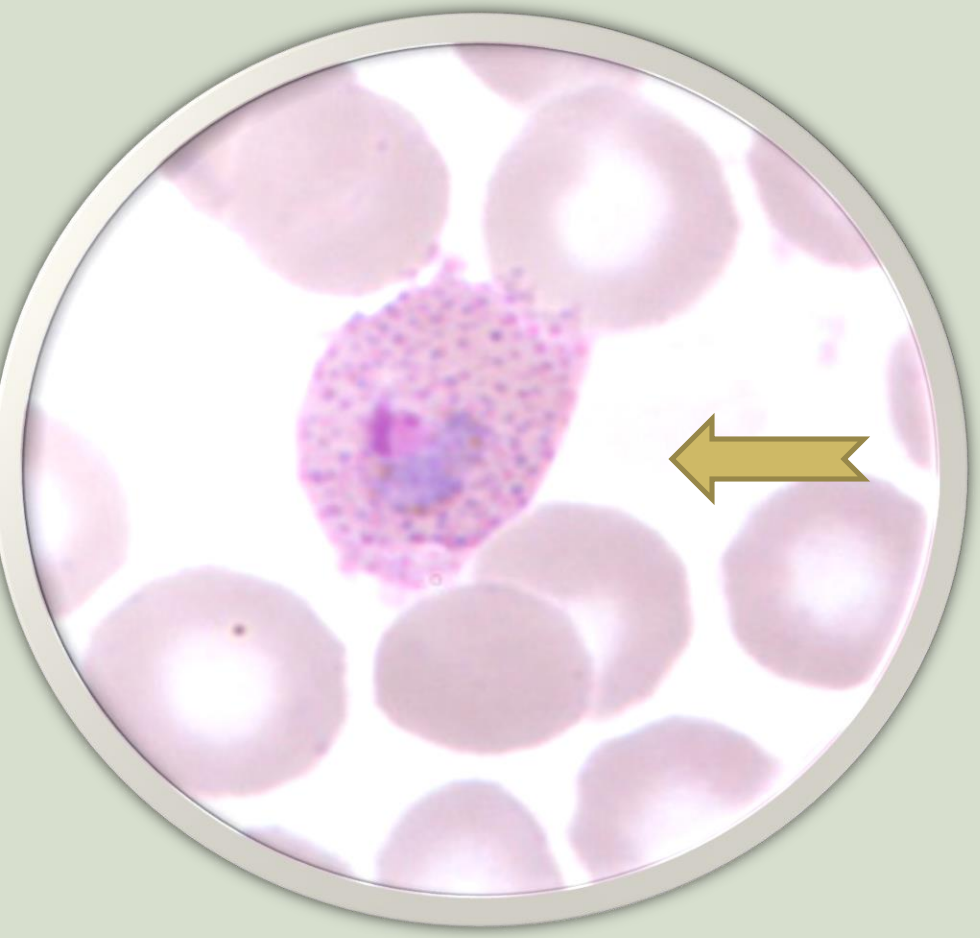


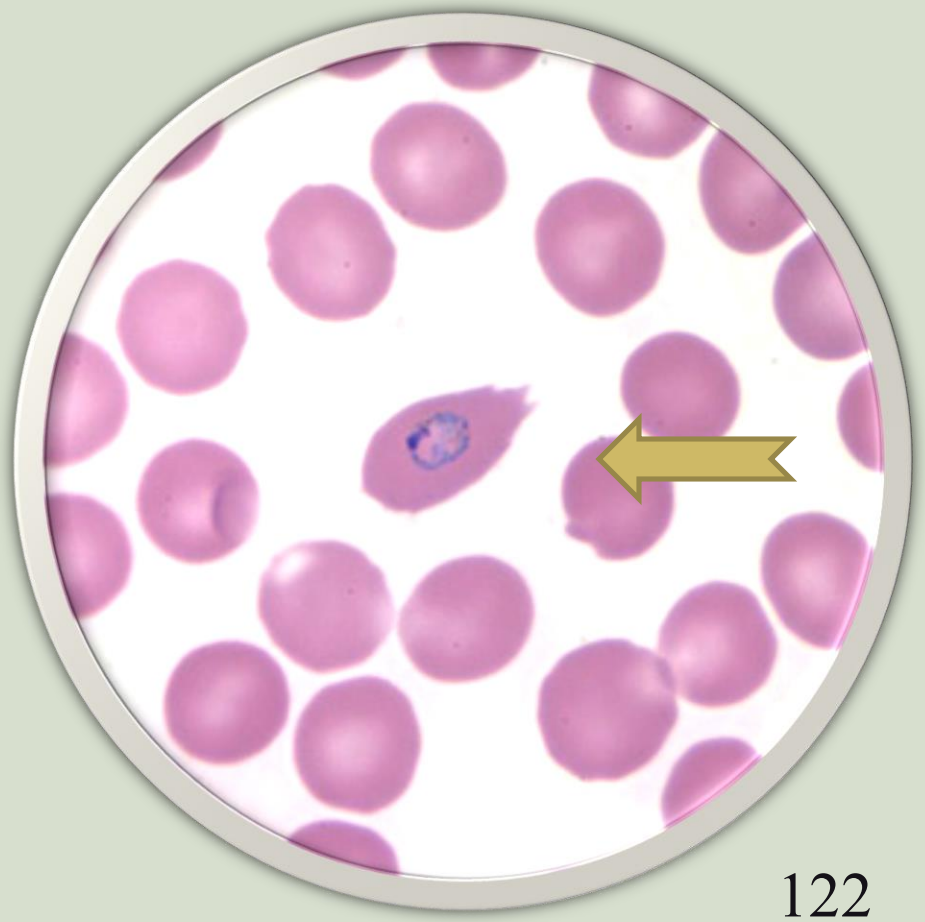
خصوصیات تروفوزوئیت اوال

- تروفوزوئیت در حال رشد اووال **فشرده و کمی واکوئولدار**
- گلبول قرمز آلوده اغلب کمی بزرگتر
- ممکن است **زوائد خارجی** (fimbriation) و **دانه های جیمز** نیز دیده شود
- رنگدانه کمی خشن و پراکنده



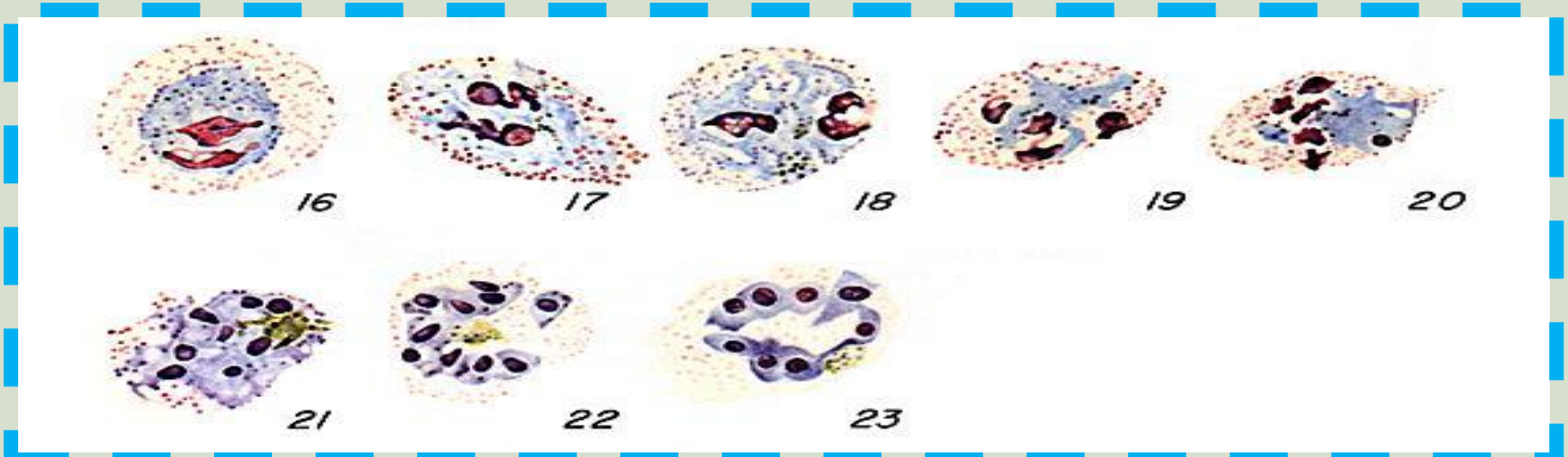
تروفوزوئیت اوال در گسترش نازک



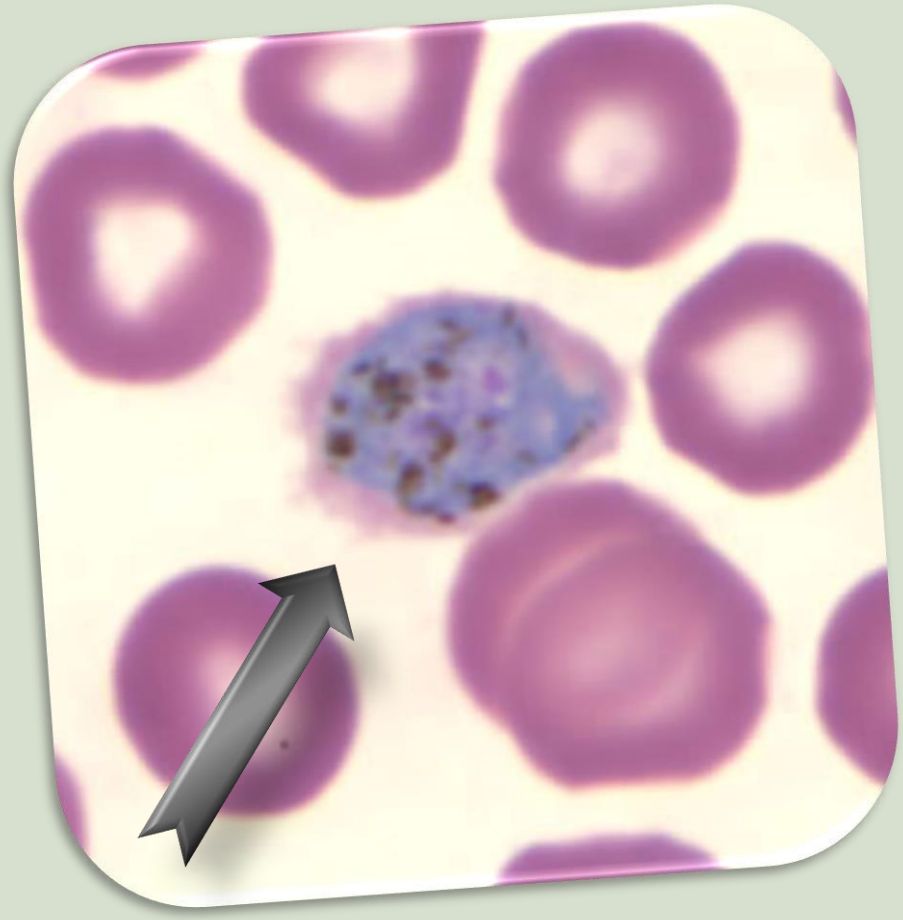


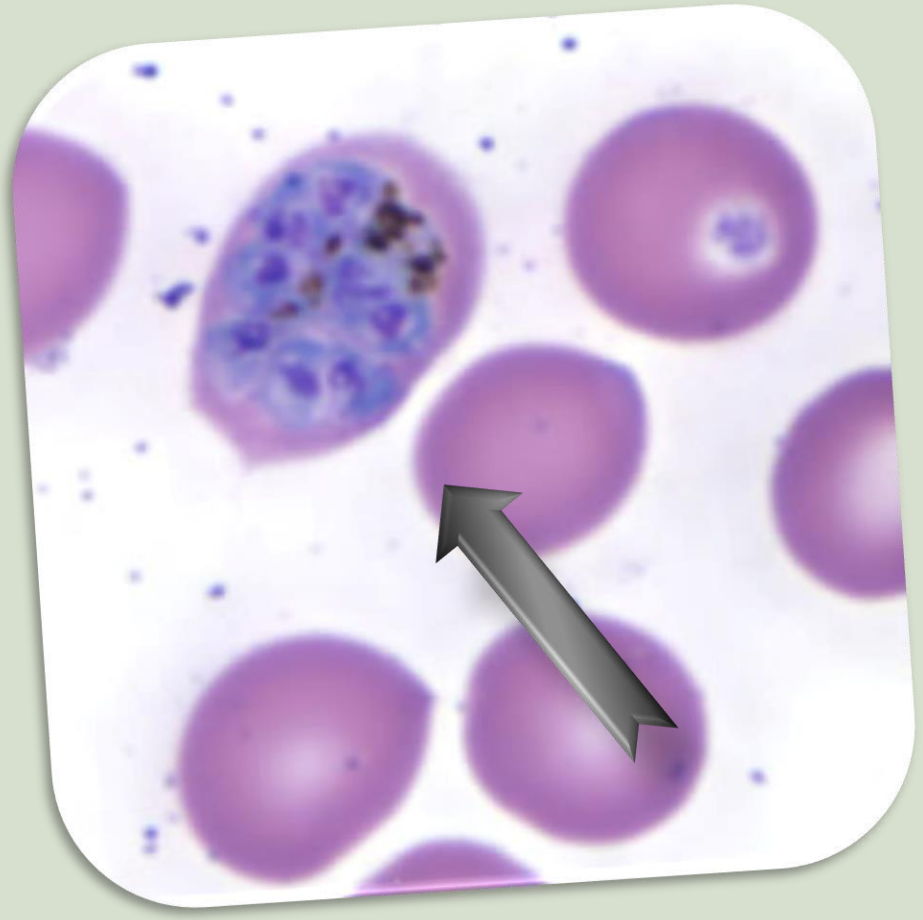
شیزونت اوال

- شیزونتهای اوال می تواند شبیه ویواکس باشد اگرچه شاید کمی کوچکتر
- **تعداد مروزوئیت:** **۱۶-۴ (بطور متوسط ۸ مروزوئیت)**
- **کشیده شدن به شکل بیضی و fimbriation رایج**
- با رنگ آمیزی صحیح می توان **دانه های جیمز** را دید
- پیگمان مشابه ویواکس روشنتر و ظریفتر



شیزونت اوال

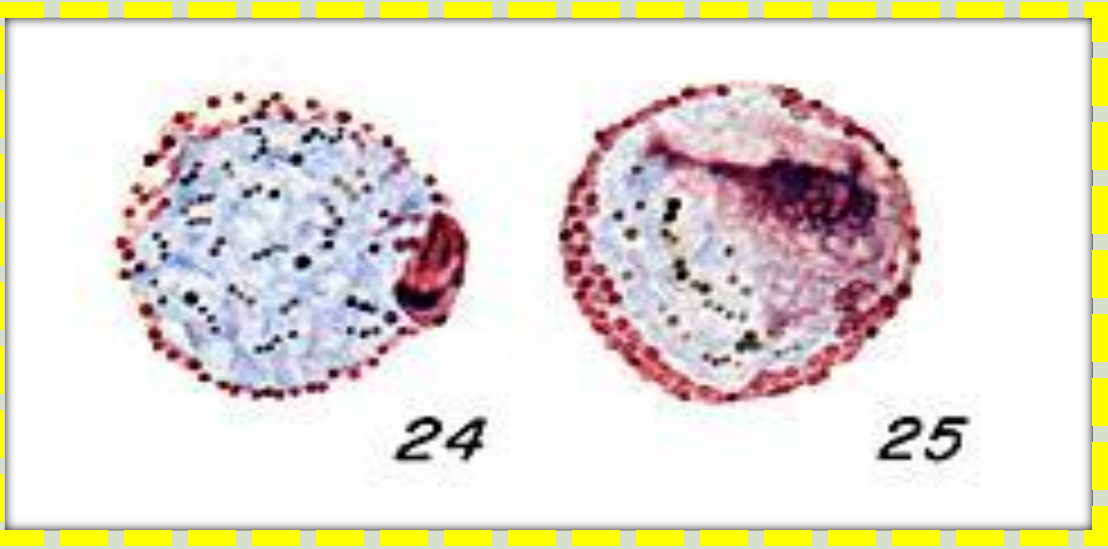




گامتوسیت اوال

- تمایزگامتوسیتهای اووال از ویواکس تا حدی مشکل است ، اگرچه بزرگ شدن گلبولهای قرمز در اووال کمتر دیده می شود
- **ماکروگامتوسیتها** گلبولهای قرمزآلوده را پر می کنند.
- **میکروگامتوسیتها** کوچکترند.
- با رنگ آمیزی صحیح می توان دانه های جیمز را دید.

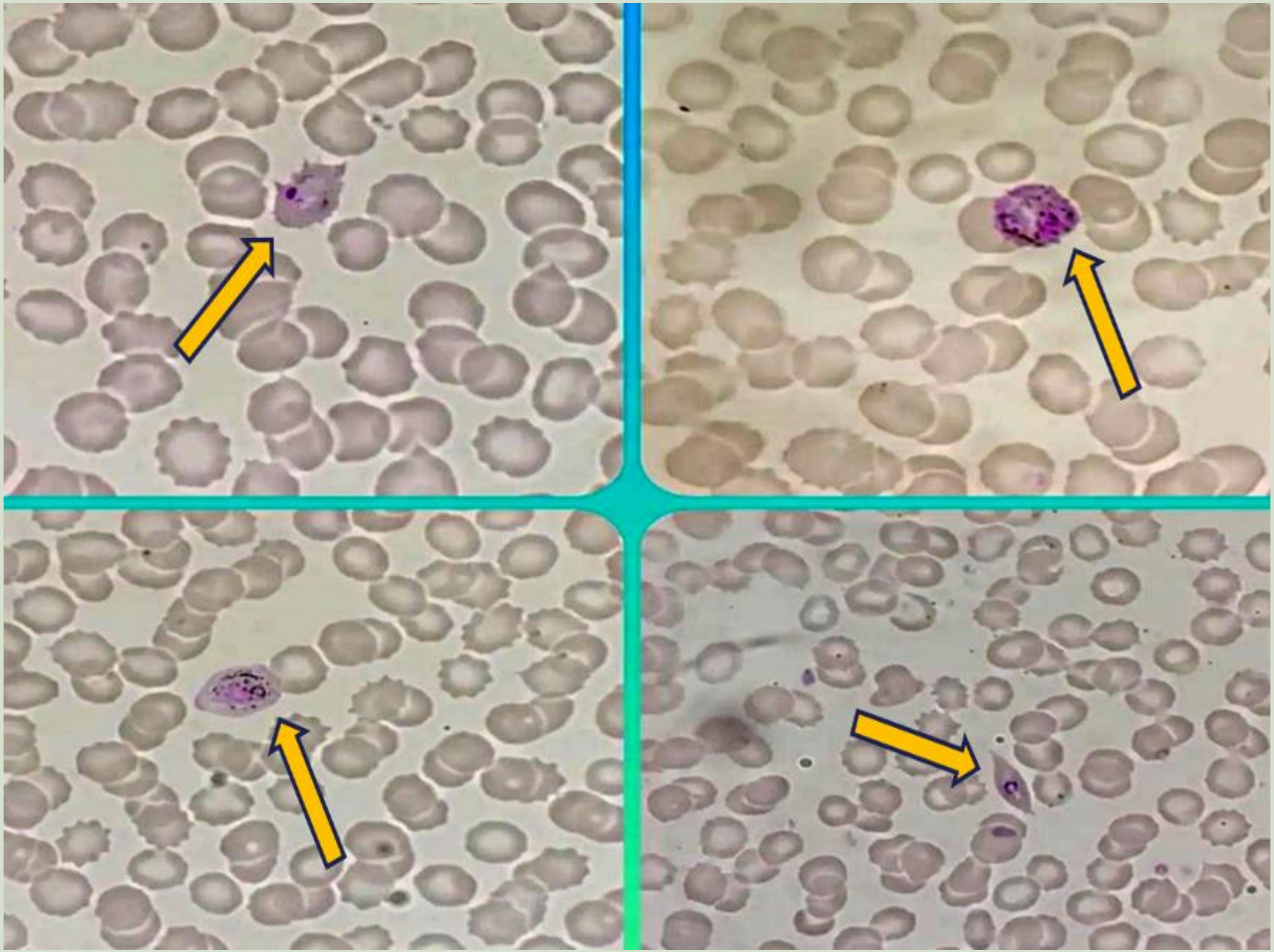
ماکرو گامتوسیت



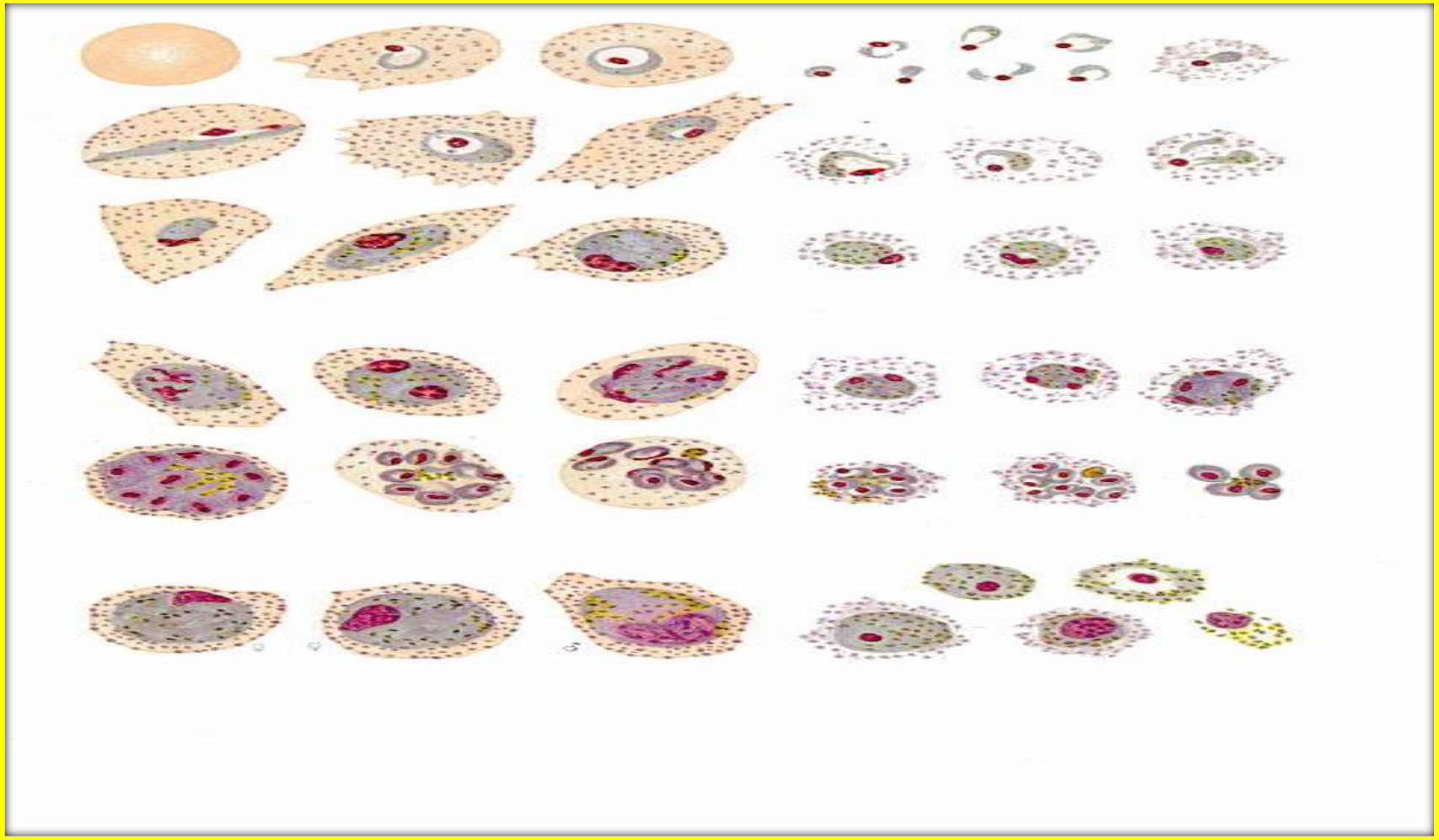
میکرو گامتوسیت

گامتوسیت پلاسمودیوم اوال

میکروگامتوسیت	ماکروگامتوسیت



اشکال شماتیک پلاسمودیوم اوال



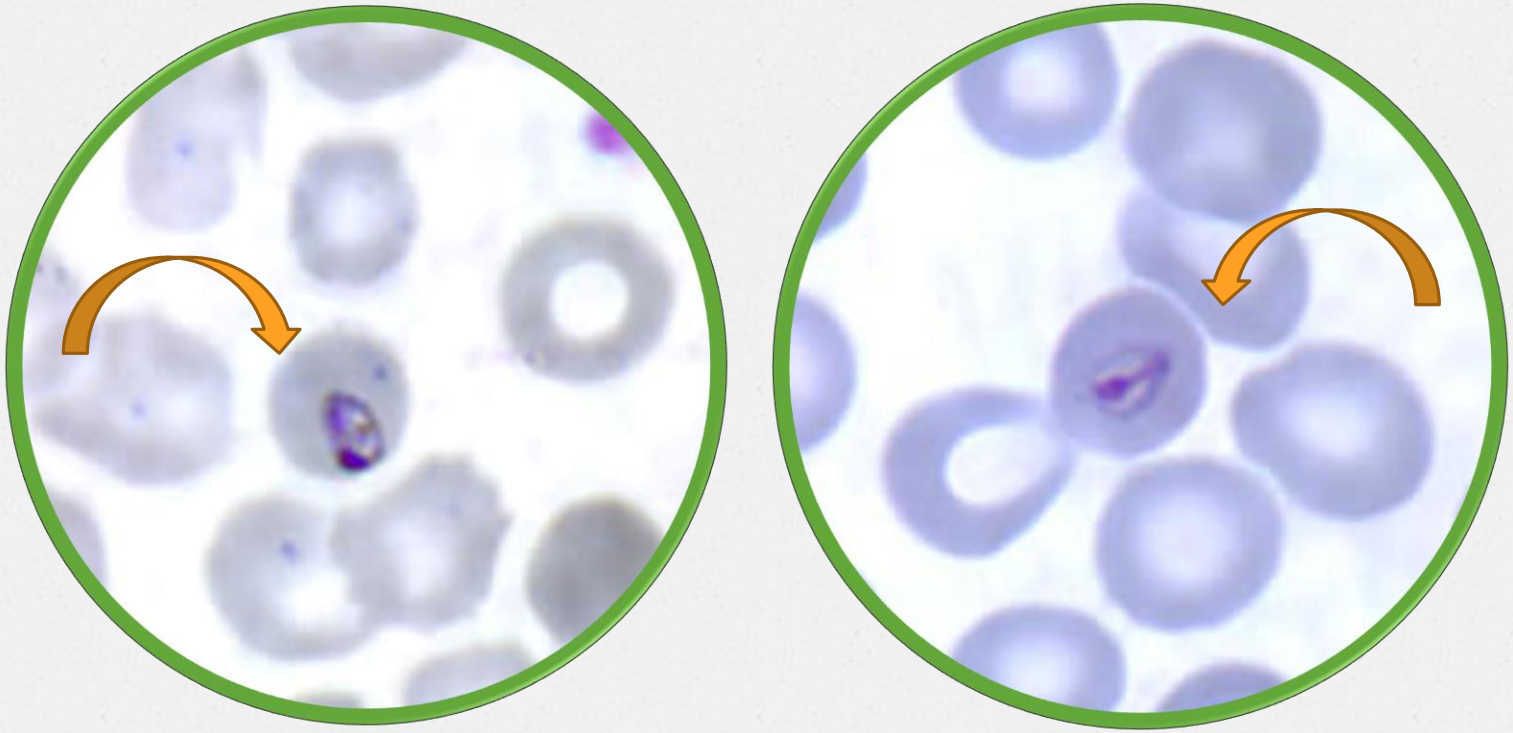
پلاسمودیوم مالاریه

Plasmodium malariae

رینگ مالاریه

- رینگ های مالاریه دارای یک (به ندرت دو) نقطهٔ کروماتین و یک حلقه سیتوپلاسم (**ضخیمتر از فالسی پاروم**)
- اشکال " **چشم پرنده** 'Bird's-eye' forms " ممکن است ظاهر شوند.
- بعلت حمله به گلبولهای پیر **گلبولهای قرمز کوچکتر از نرمال**

پلاسمودیوم مالاریه در گسترش نازک



چشم پرنده

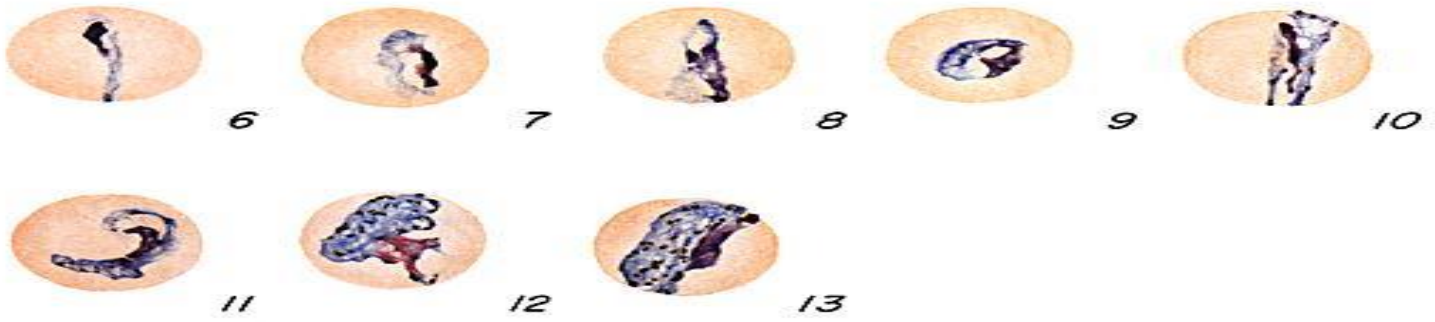
تروفوزوئیت مالاریه

تروفوزوئیت در حال رشد

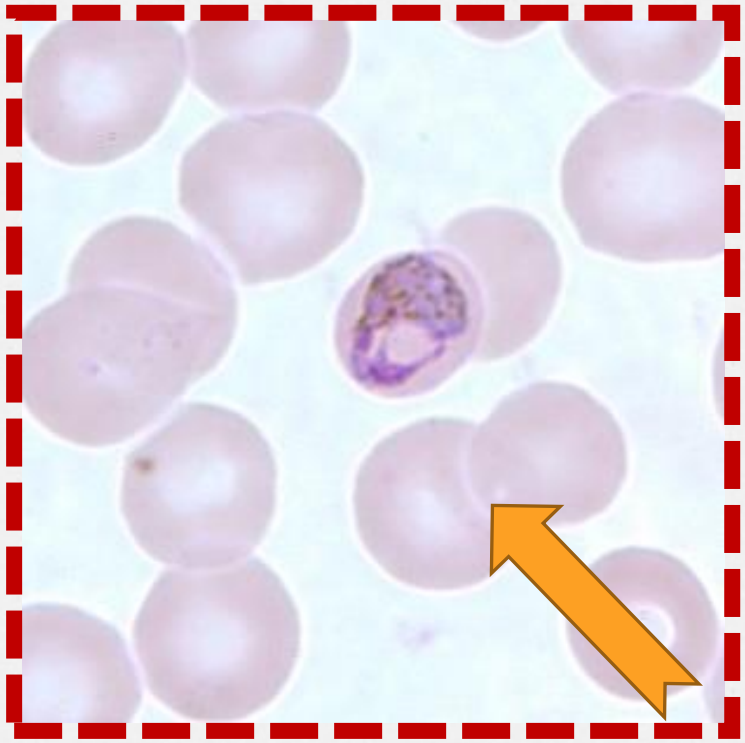
- کروماتین گرد یا ناصاف
- سیتوپلاسم فشرده و بدون واکوئول
- پیگمان درشت و محیطی

تروفوزوئیت رسیده

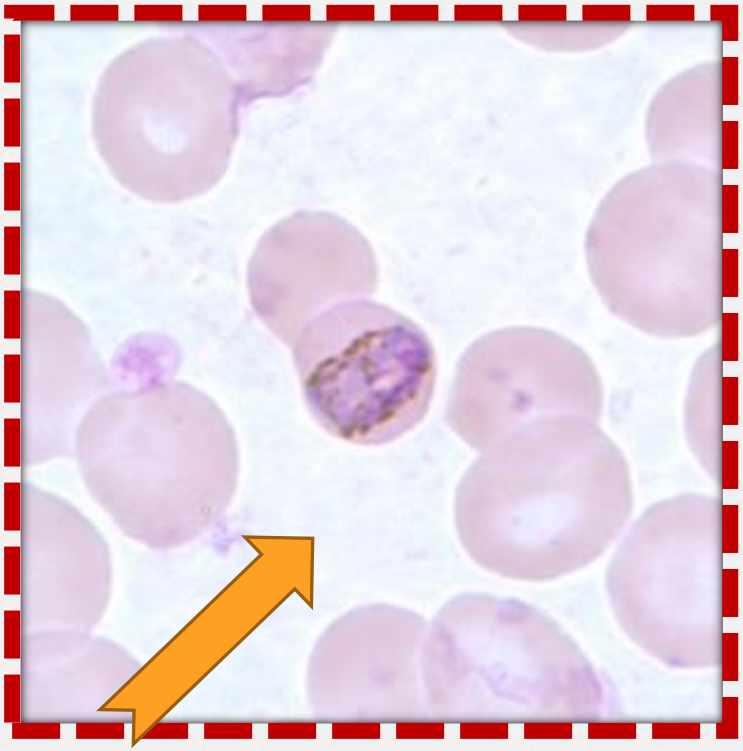
- سیتوپلاسم ممکن است طویل و به شکل نواری باشد.
- یا بیضوی شده با یک واکوئول به شکل سبد شود.
- کروماتین معمولاً یک تودهٔ منفرد



تروفوزوئیت پلاسمودیوم مالاریه در گسترش نازک

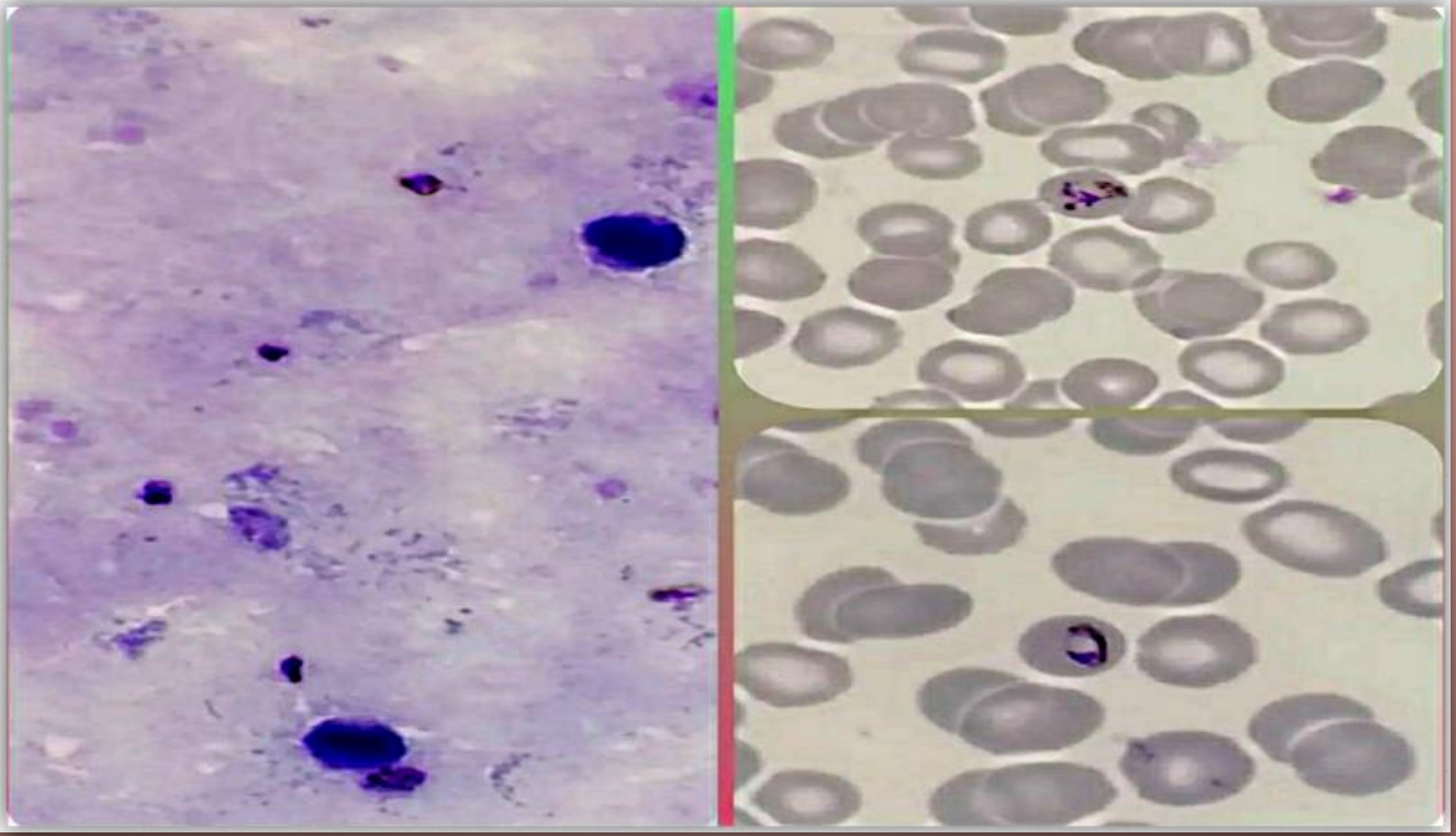


فرم سبدی

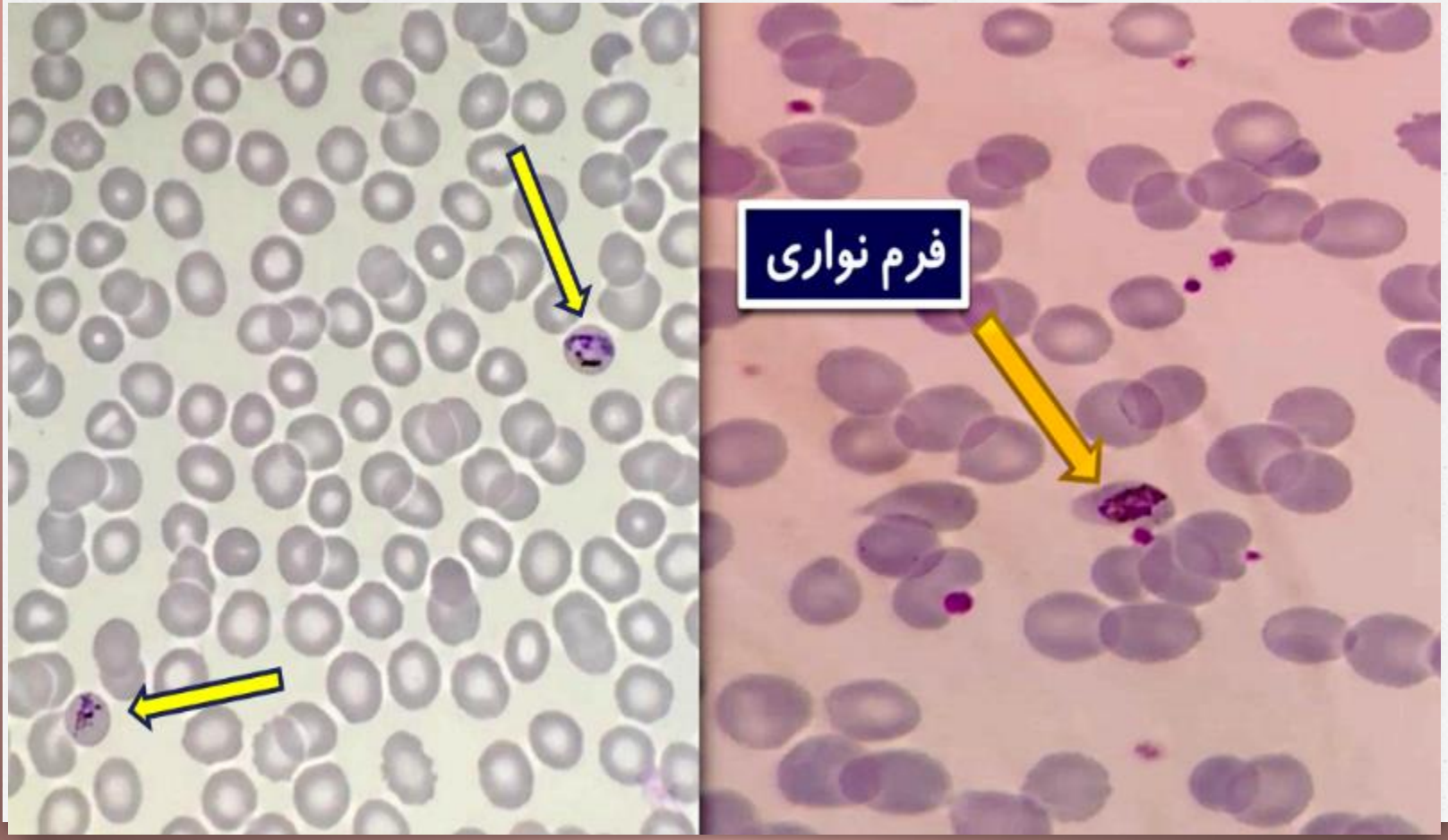


فرم نواری

پلاسمودیوم مالاریه



تروفوزوئیت پلاسمودیوم مالاریه

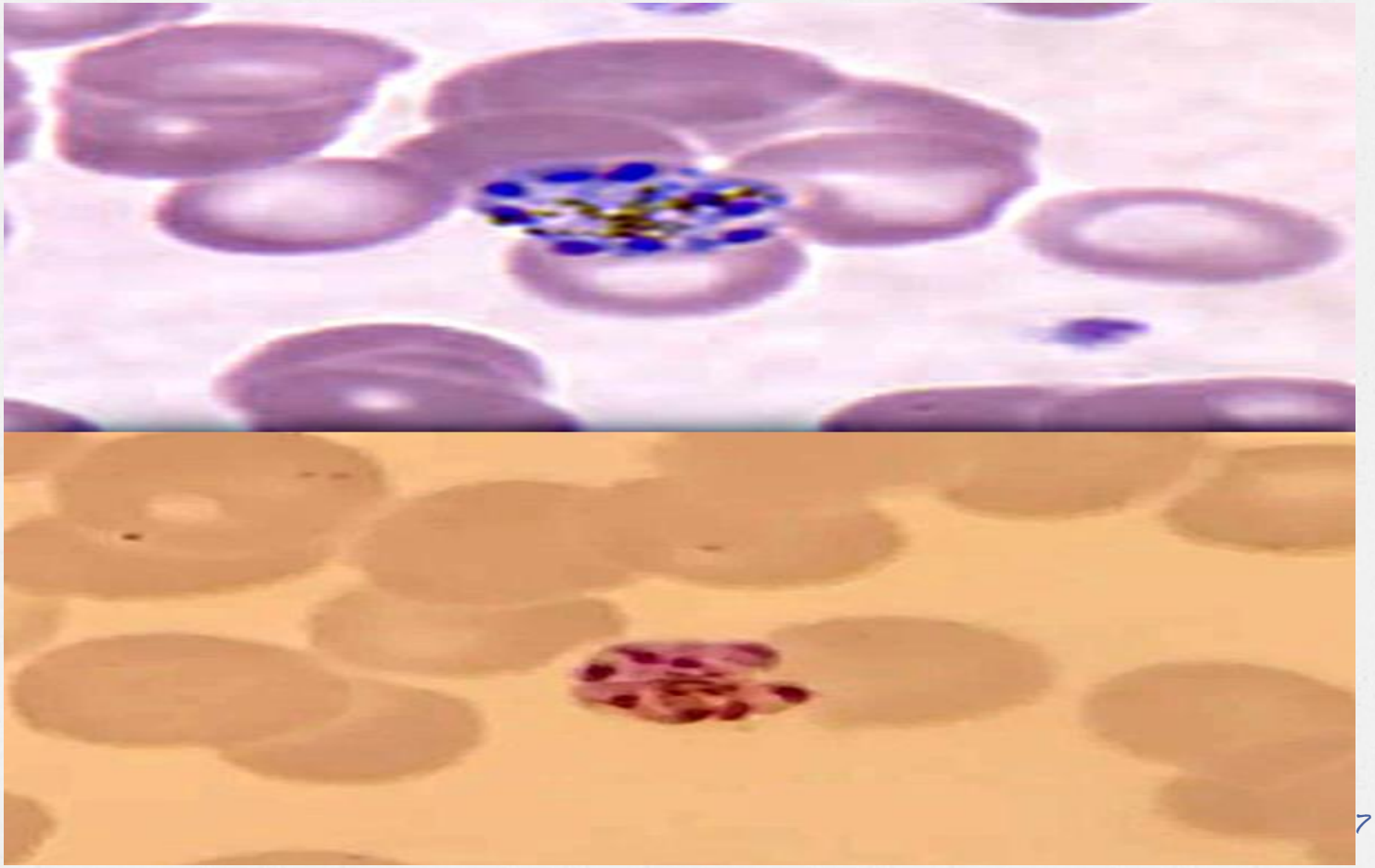


شیزونت مالاریه

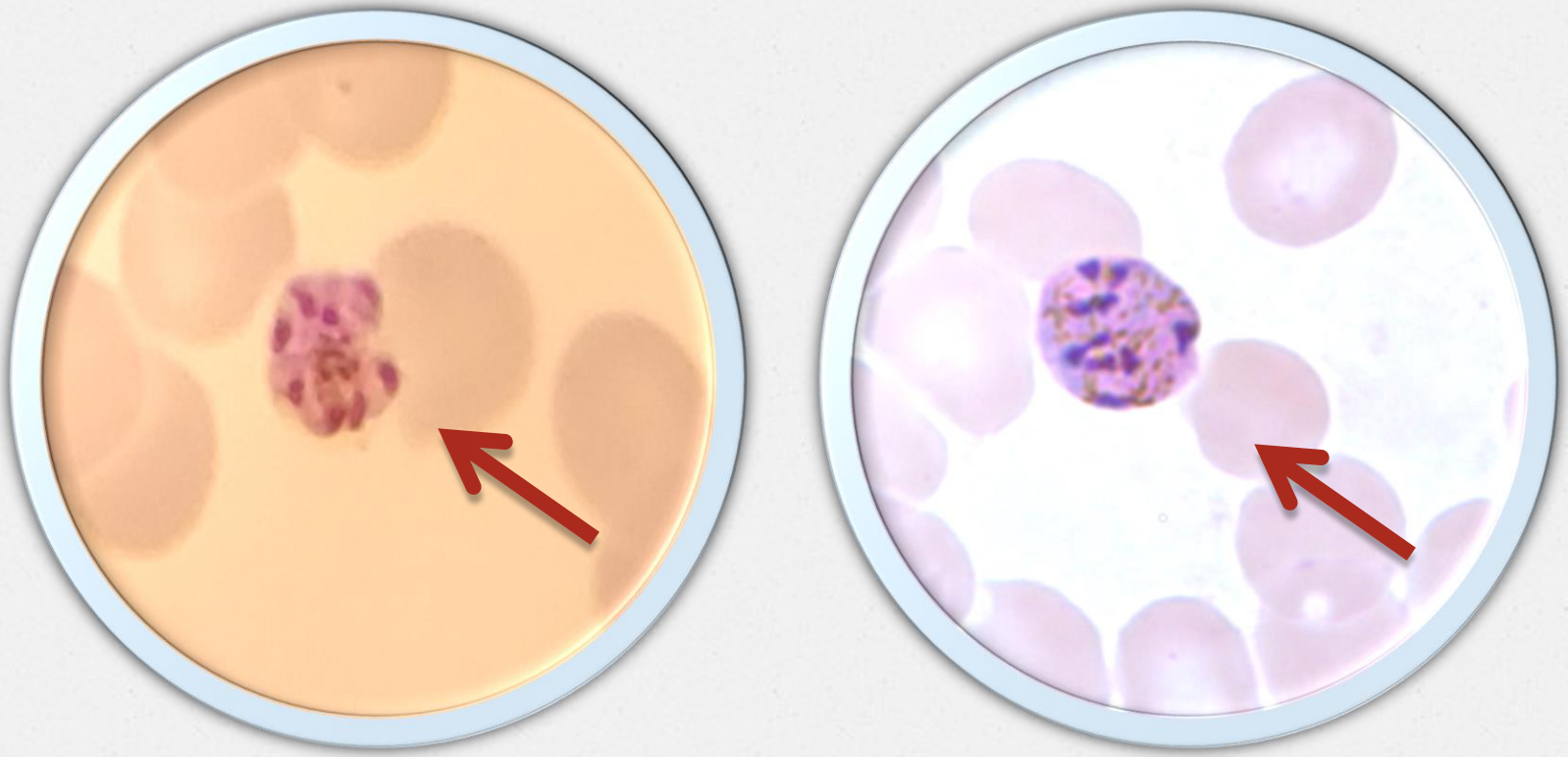
- ۶-۱۲ مروزوئیت دارند(معمولا ۸-۱۰)
- اغلب به شکل روزت و یا خوشه های نامنظم چیده شده اند.
- شیزونتهای بالغ تقریبا گلبولهای قرمز میزبان را پر می کنند.
- رنگدانه اغلب **جانبی** است.
- شیزونتها می تواند در خون محیطی **فراوان** باشند.

سلول کلیدی:
شیزونت گل مینایی

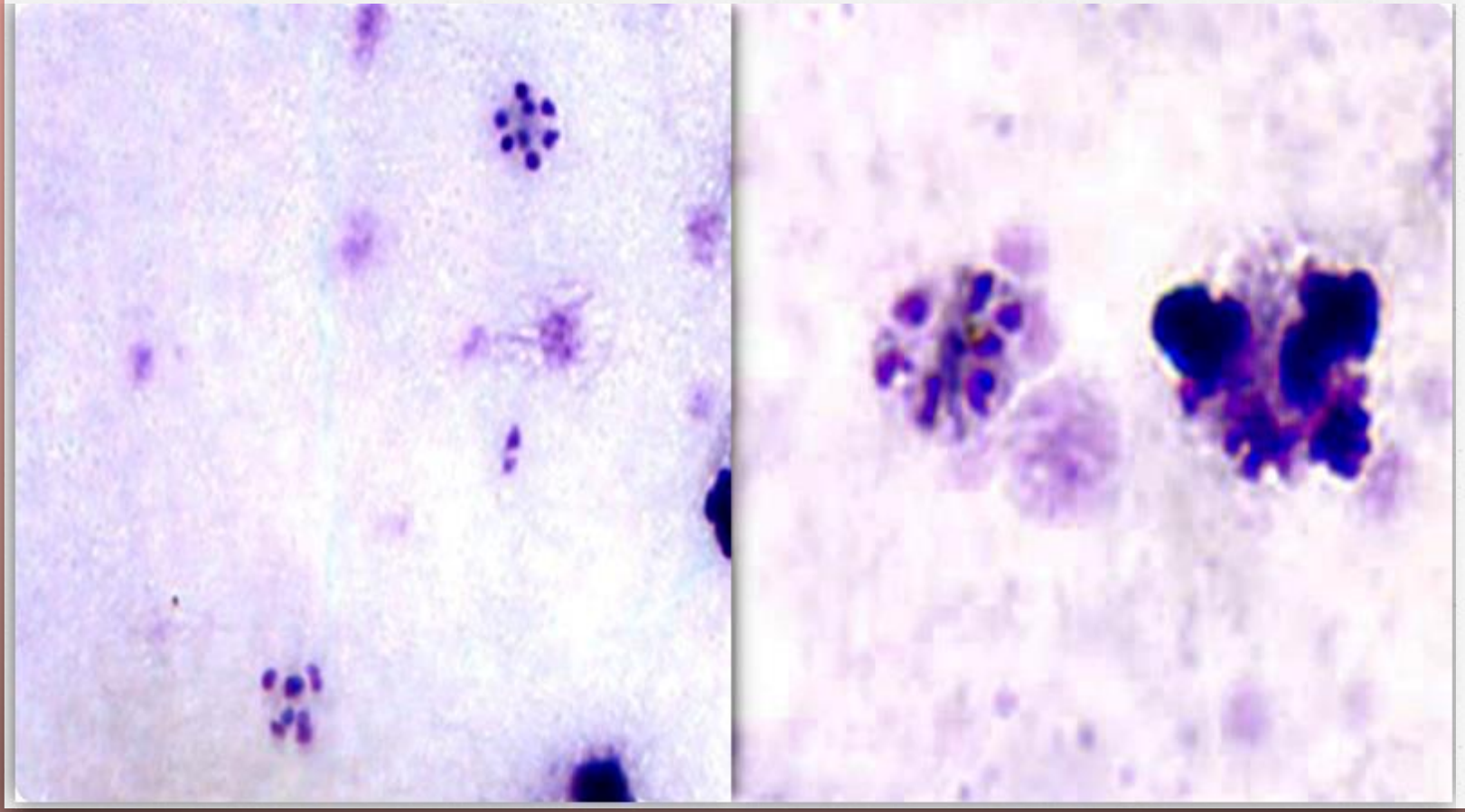
شیزونت پلاسمودیوم مالاریه در گسترش نازک



شیزونت پلاسمودیوم مالاریه در گسترش نازک



شیزونت *پلاسمودیوم مالاریه* در گسترش ضخیم



گامتوسیت مالاریه

- جمع و جور هستند و تمایل به پر کردن گلبولهای قرمز میزبان دارند.
- گلبولهای قرمز آلوده **بزرگ نمی شوند** و در برخی موارد کاهش در حجم
- سیتوپلاسم آبی و کروماتین صورتی تا قرمز رنگ
- ممکن است رنگدانه های تیره در سراسر سیتوپلاسم پراکنده شوند.

23

24

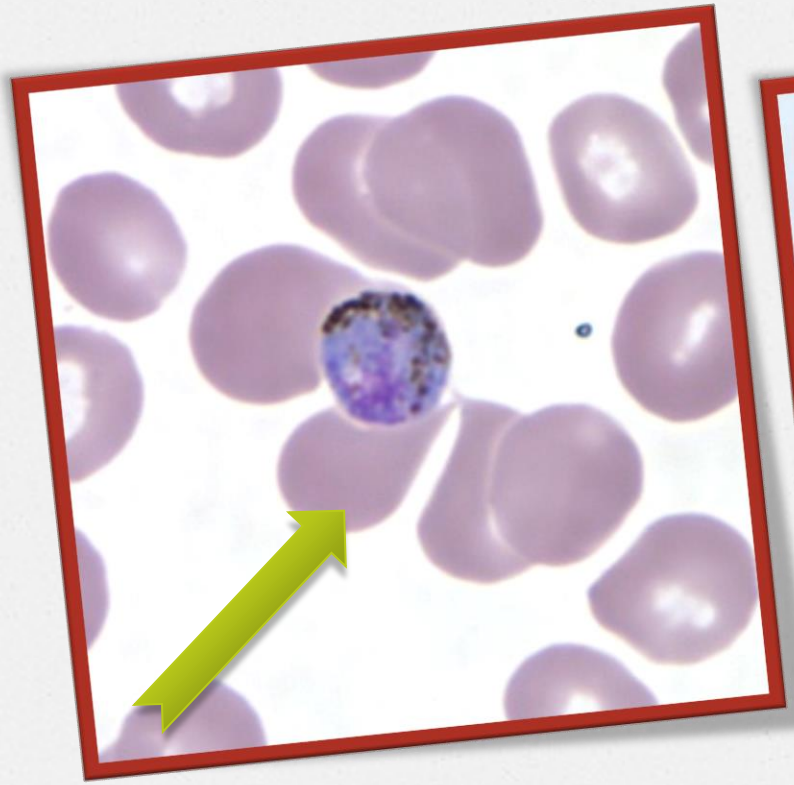
25

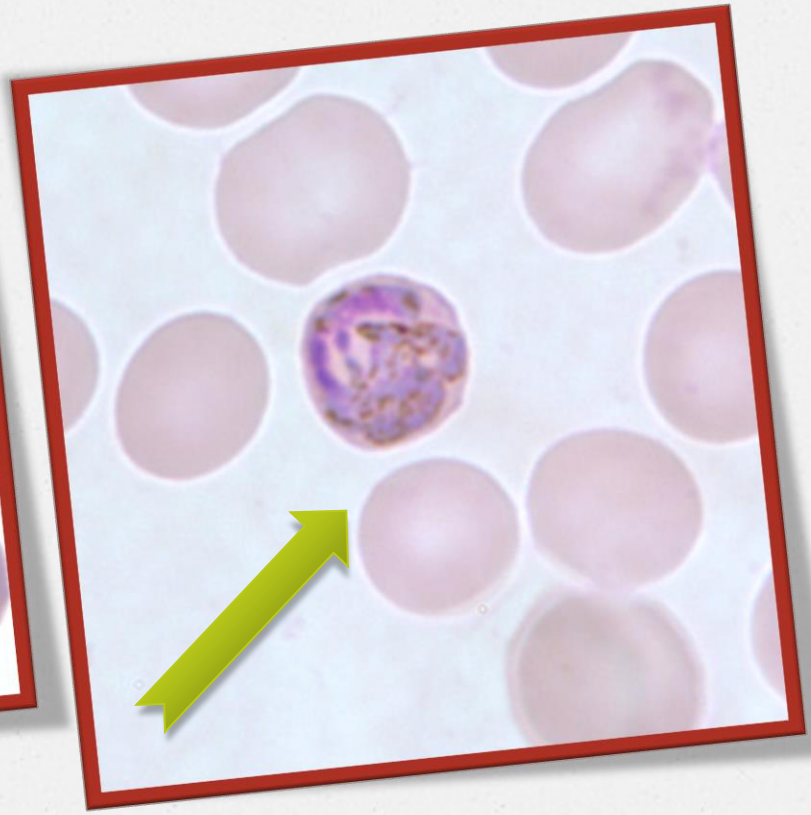
گامتوسیت در حال رشد

ماکرو گامتوسیت

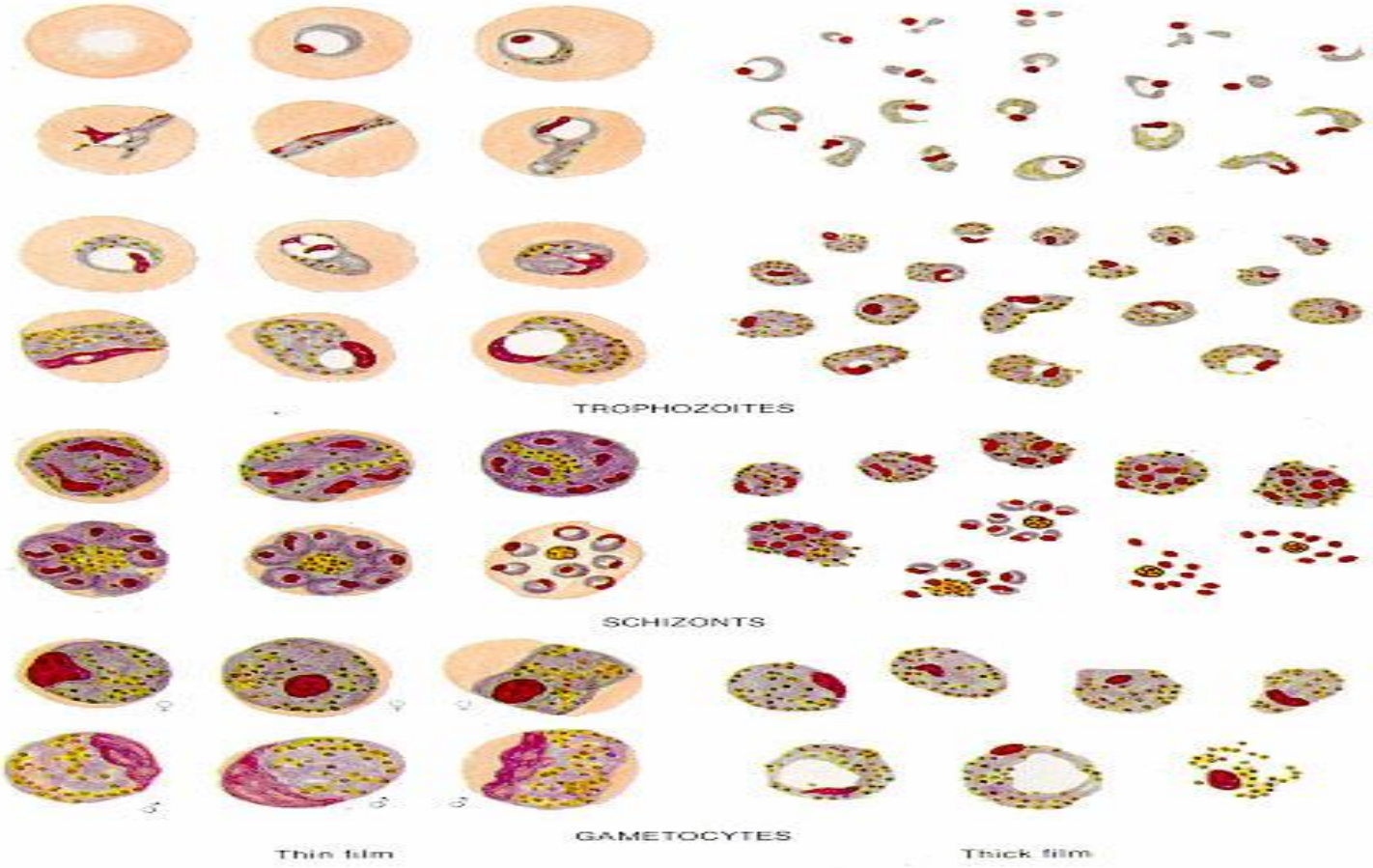
میکرو گامتوسیت

گامتوسیت پلاسمودیوم مالاریه در گسترش نازک



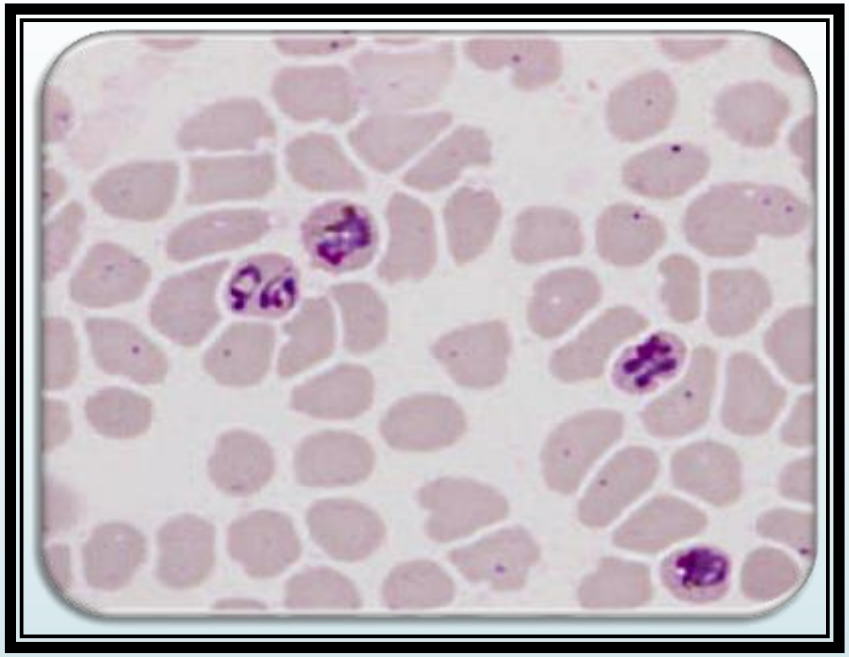


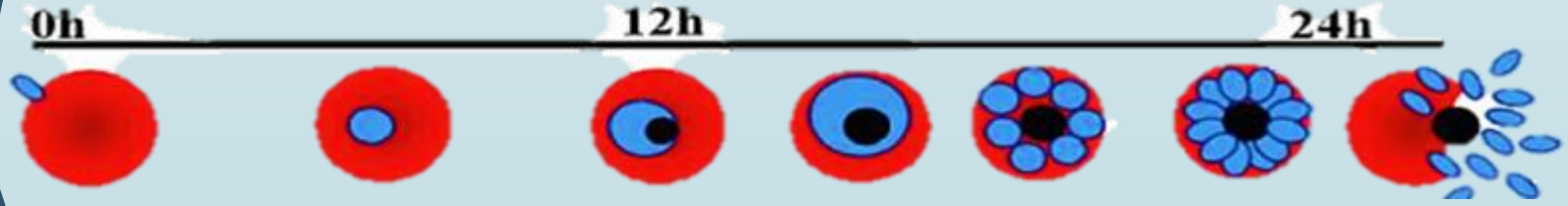
اشکال شماتیک پلاسمودیوم مالاریه



پلاسمودیوم ناولزی

Plasmodium knowlesi





پلاسمودیوم ناولزی (Plasmodium knowlesi)

- شایعترین عامل مالاریا مشترک بین انسان و دام
- شایعترین عامل مرگ و میر ناشی از مالاریا در مالزی
- شناسایی ماکاک دم دراز در مالزی،سنگاپور، تایلند و ماکاک دم خوکی در مالزی و تایلند
- تا حد زیادی محدود به جنگل های جنوب شرقی آسیا
- پشه ناقل Anopheles leucosphyrus
- هایپرپارازیتمی از ویژگی های مهم بیماریزایی در این گونه (ویژگی مشترک با پلاسمودیوم فالسیپاروم)

چالش های تشخیصی پلاسمودیوم ناولزی

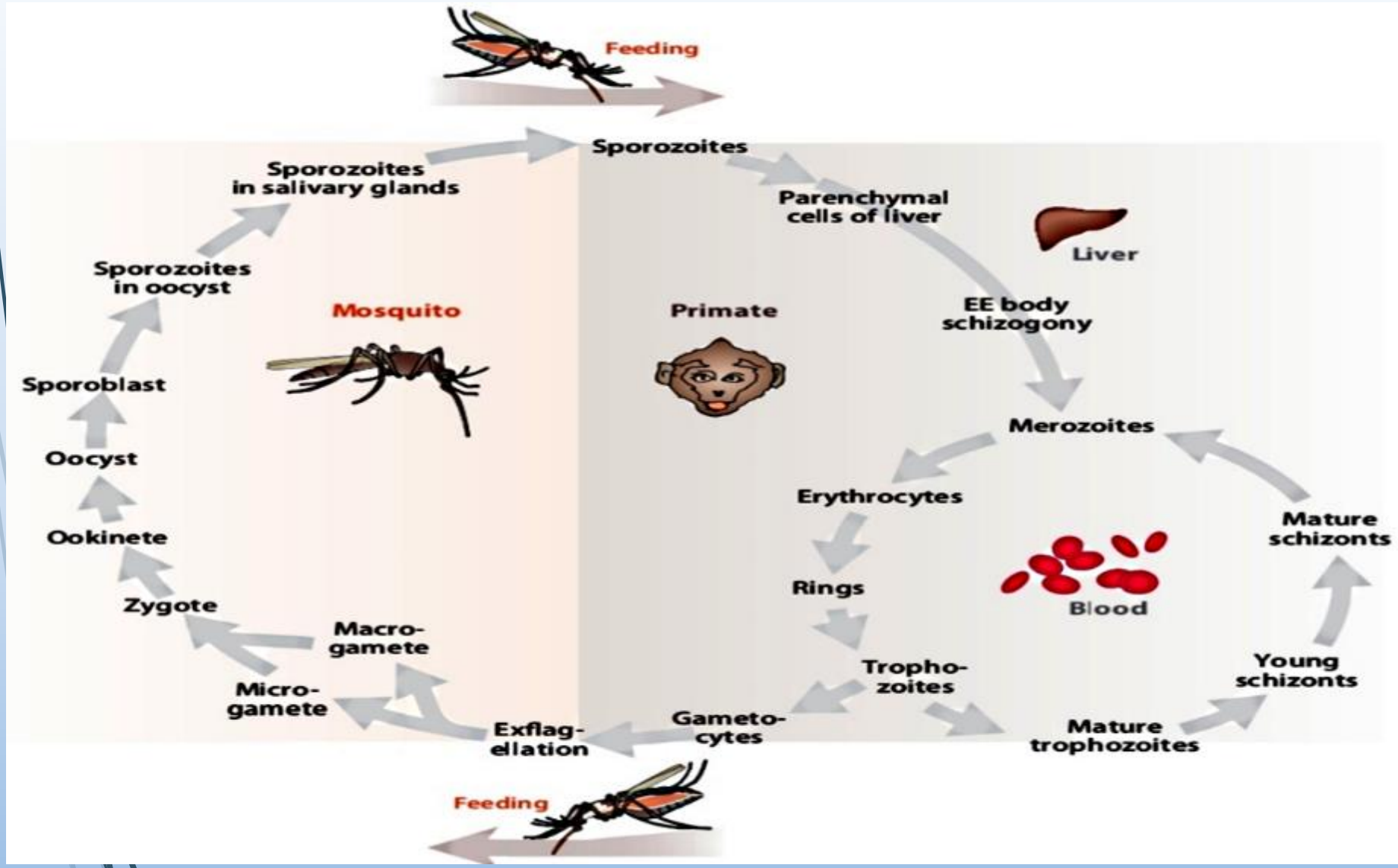
- **تشخیص میکروسکوپی:**
  - در ۹۰٪ موارد نادرست
  - ۶۹٪ به عنوان پلاسمودیوم مالاریه
  - ۱۴٪ موارد با پلاسمودیوم فالسیپاروم
  - ۷٪ موارد با پلاسمودیوم ویواکس
- PCR قطعی ترین روش تشخیصی
- خصوصیات مورفولوژیکی مشترک در گونه های پلاسمودیوم *مالاریه و پلاسمودیوم ناولزی*

افتراق از پلاسمودیوم مالاریه (از لحاظ مدت شیزوگونی)

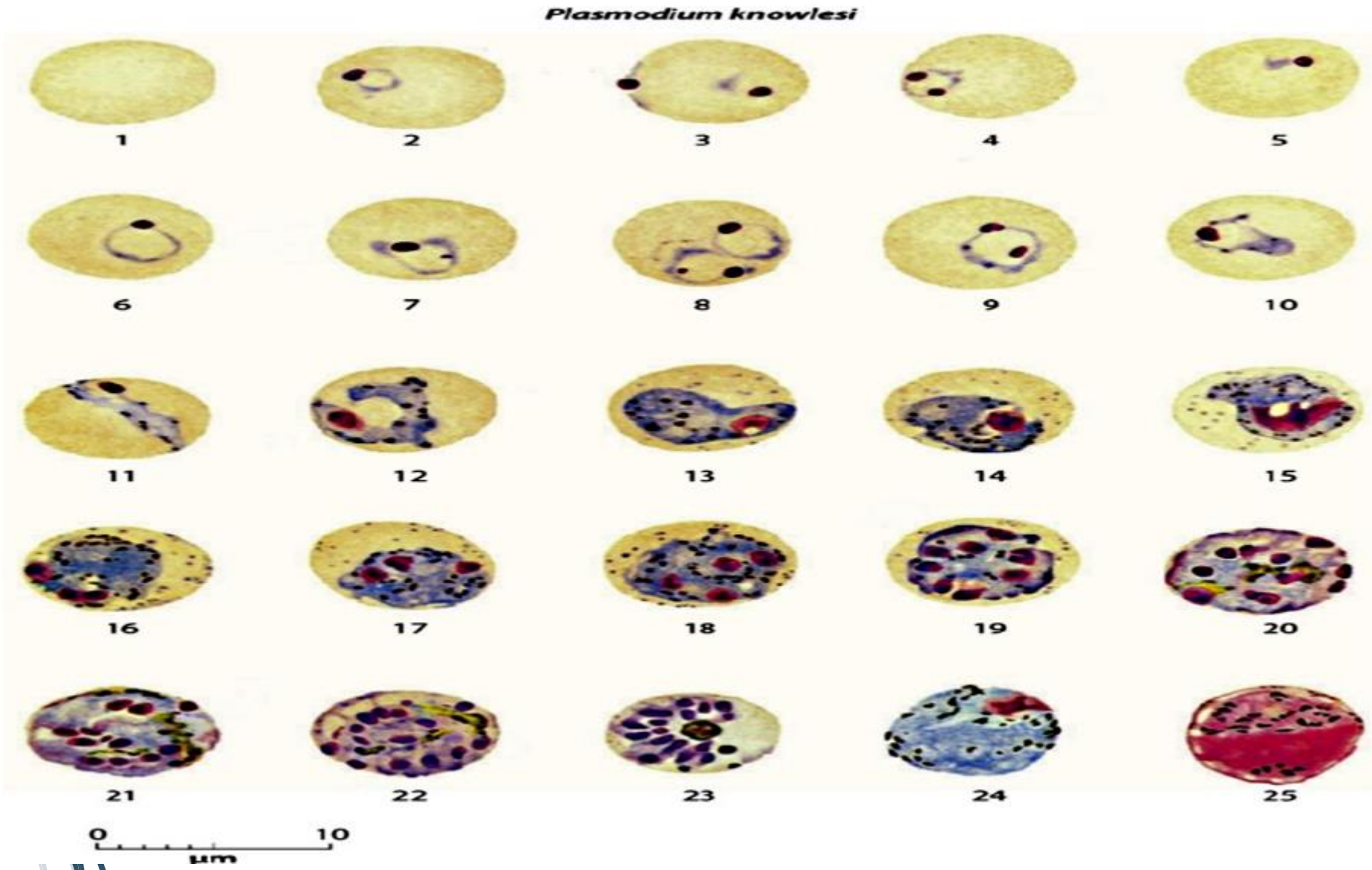
- مدت زمان شیزوگونی خونی *پلاسمودیوم مالاریه*: **۷۲ ساعت**
- مدت زمان شیزوگونی خونی *پلاسمودیوم ناولزی*: **۲۴ ساعت**

(پارازیتمی بالا و کشنده)

چرخه زندگی پلاسمودیوم ناولزی



اشکال شماتیک پلاسمودیوم ناولزی



پلاسمودیوم ناولزی

تروفوزوئیت

- تروفوزوئیت جوان مانند *پلاسمودیوم فالسیپاروم* دارای اشکال آکول، آلودگی مضاعف وکروماتین دوتایی
- تروفوزوئیت در حال رشد شبیه *پلاسمودیوم ویواکس*
- تروفوزوئیت بالغ کاملا شبیه *پلاسمودیوم مالاریه*

شیزونت

- کاملا شبیه شیزونت *پلاسمودیوم مالاریه*
- شیزونت بالغ حاوی ۱۶ مروزوئیت با میانگین ۱۰ عدد

گامتوسیت پلاسمودیوم ناولزی

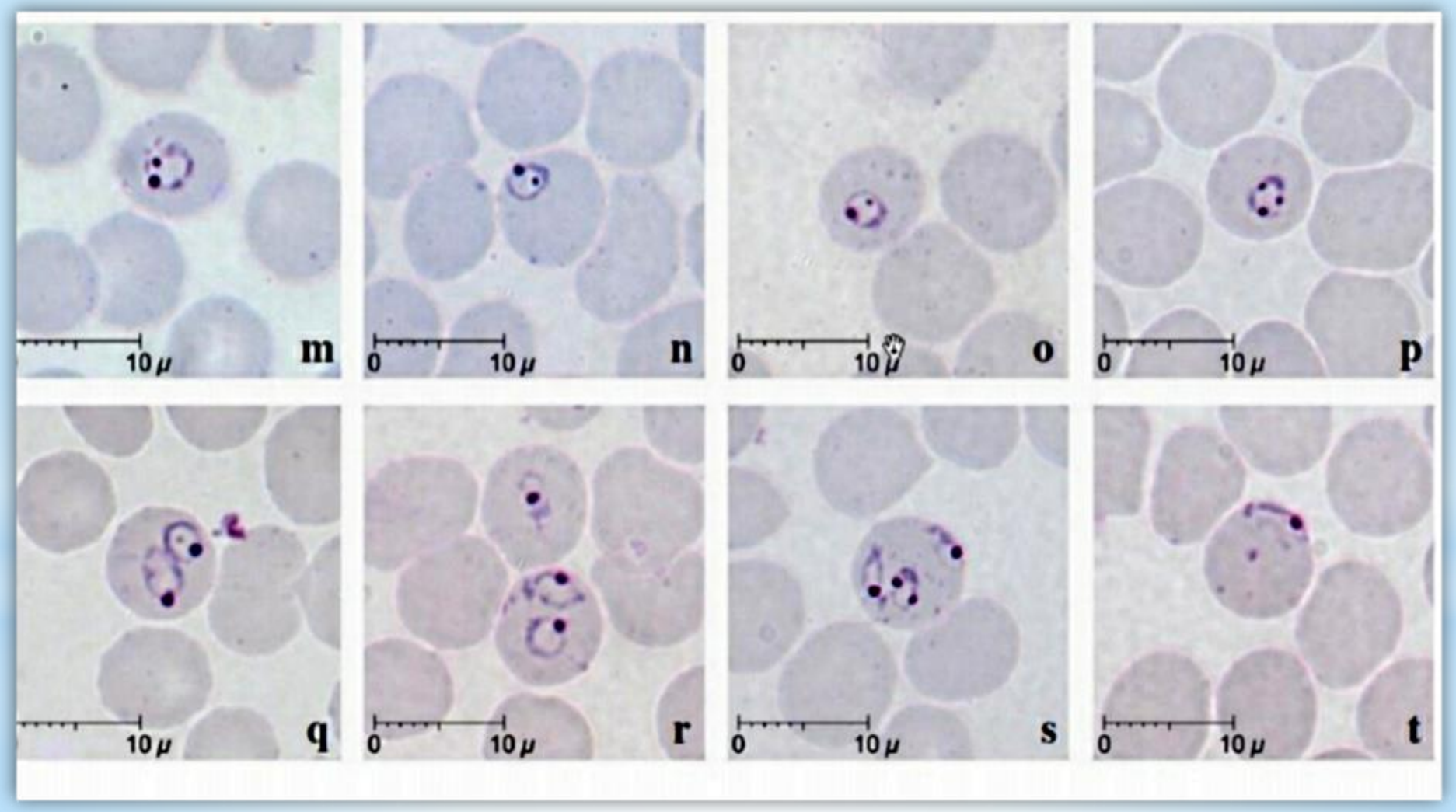
ماکروگامتوسیت

- کاملا گرد و کل گلبول قرمز را پر می کند.
- سیتوپلاسم به رنگ آبی
- هسته به رنگ صورتی
- پیگمان سیاه روی سطح سلول پراکنده میباشد.

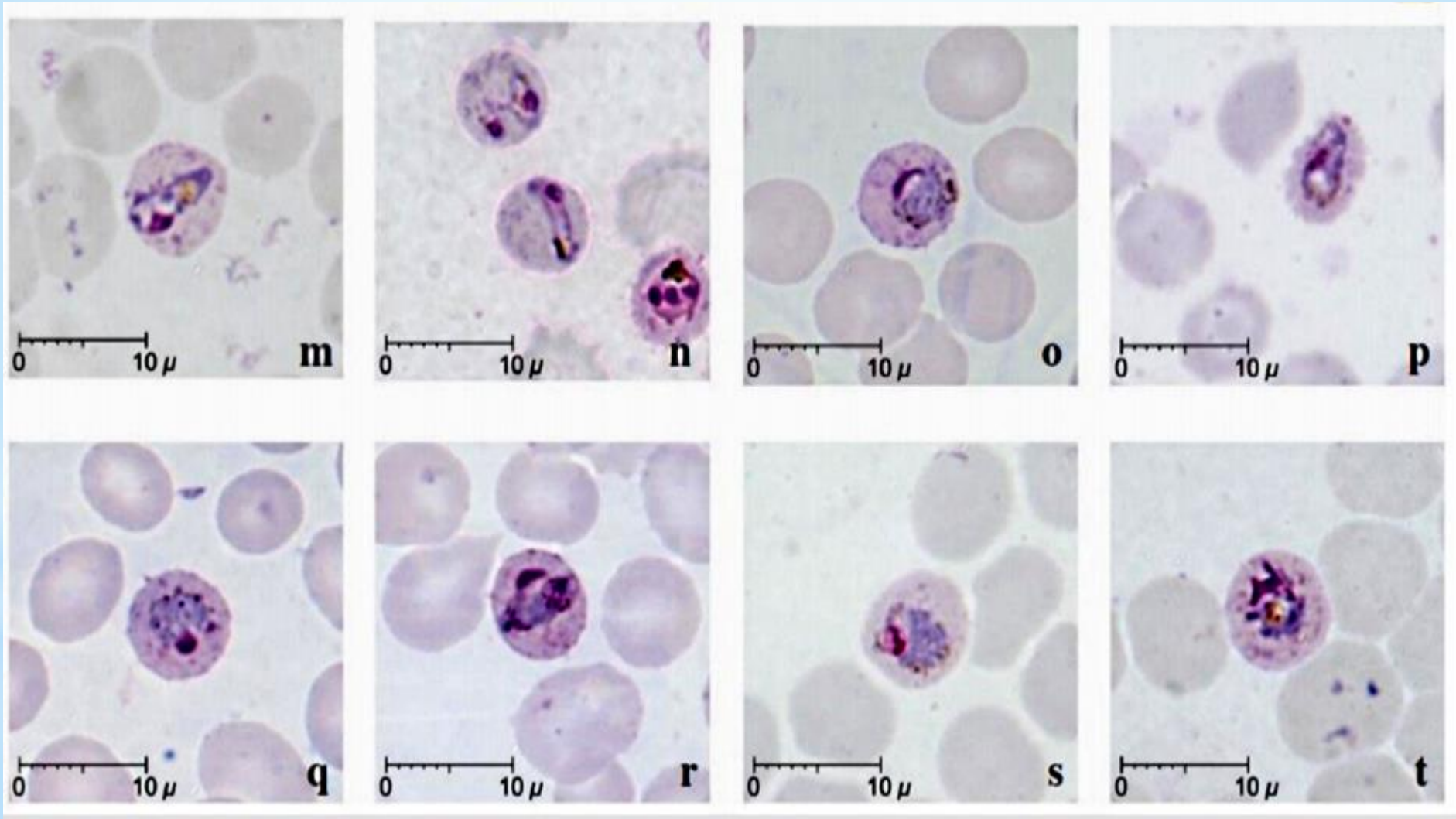
میکروگامتوسیت

- کوچکتر است.
- سیتوپلاسم به رنگ صورتی روشن
- هسته به رنگ صورتی تیره
- پیگمان سیاه روی سطح سلول پراکنده

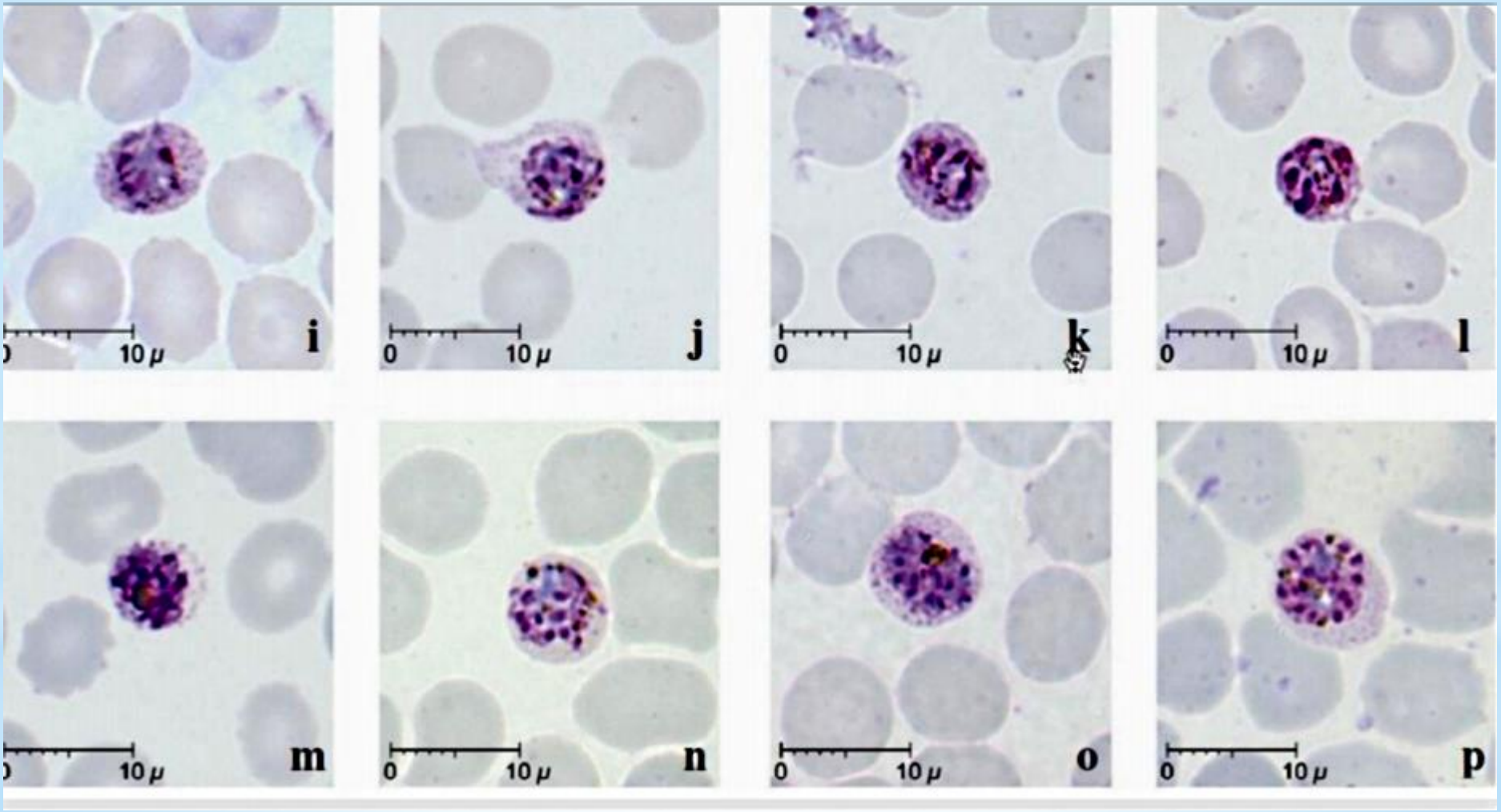
تروفوزوئیت های جوان پلاسمودیوم ناولزیَ



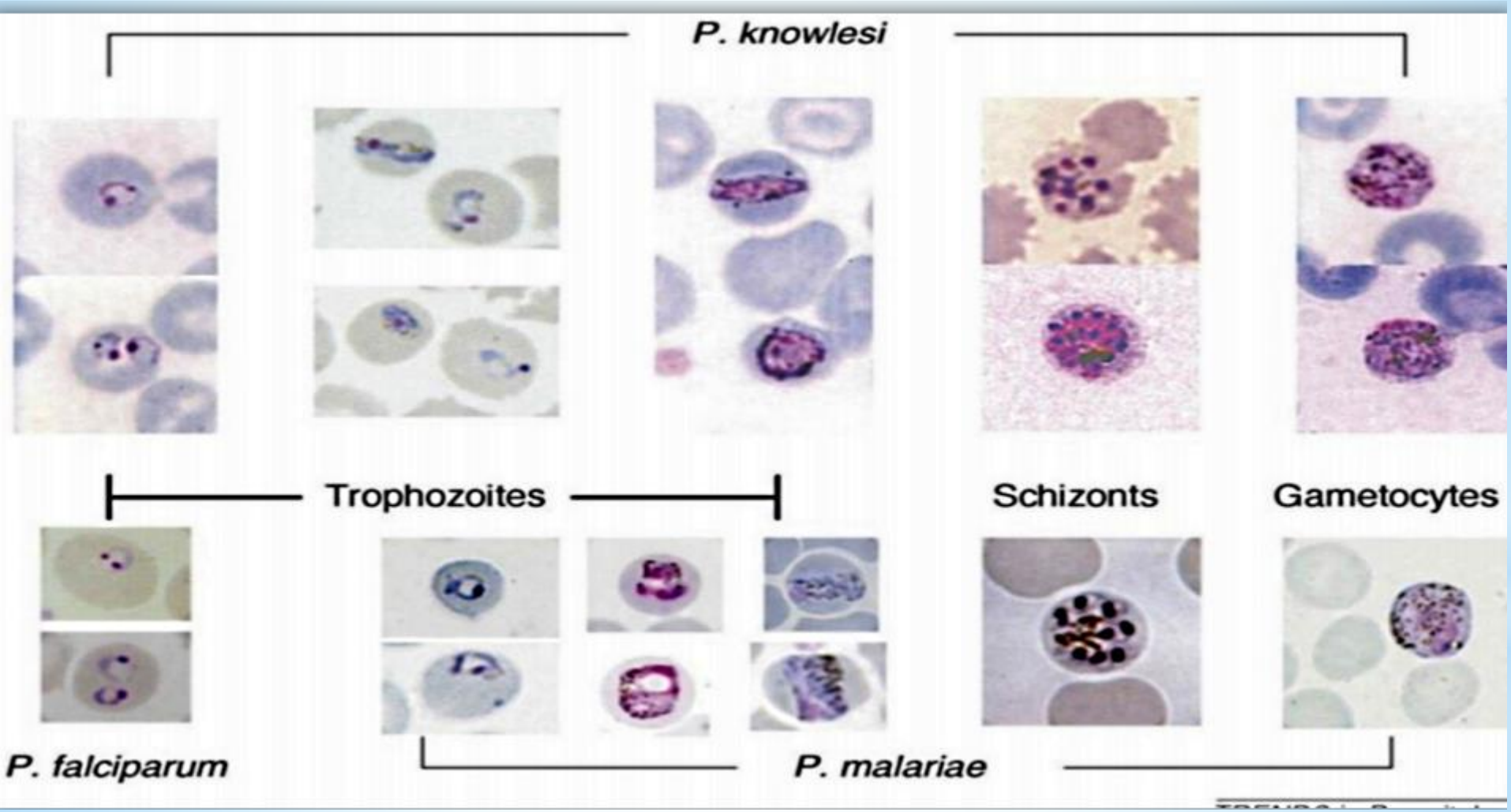
تروفوزوئیت های در حال رشد پلاسمودیوم ناولزی



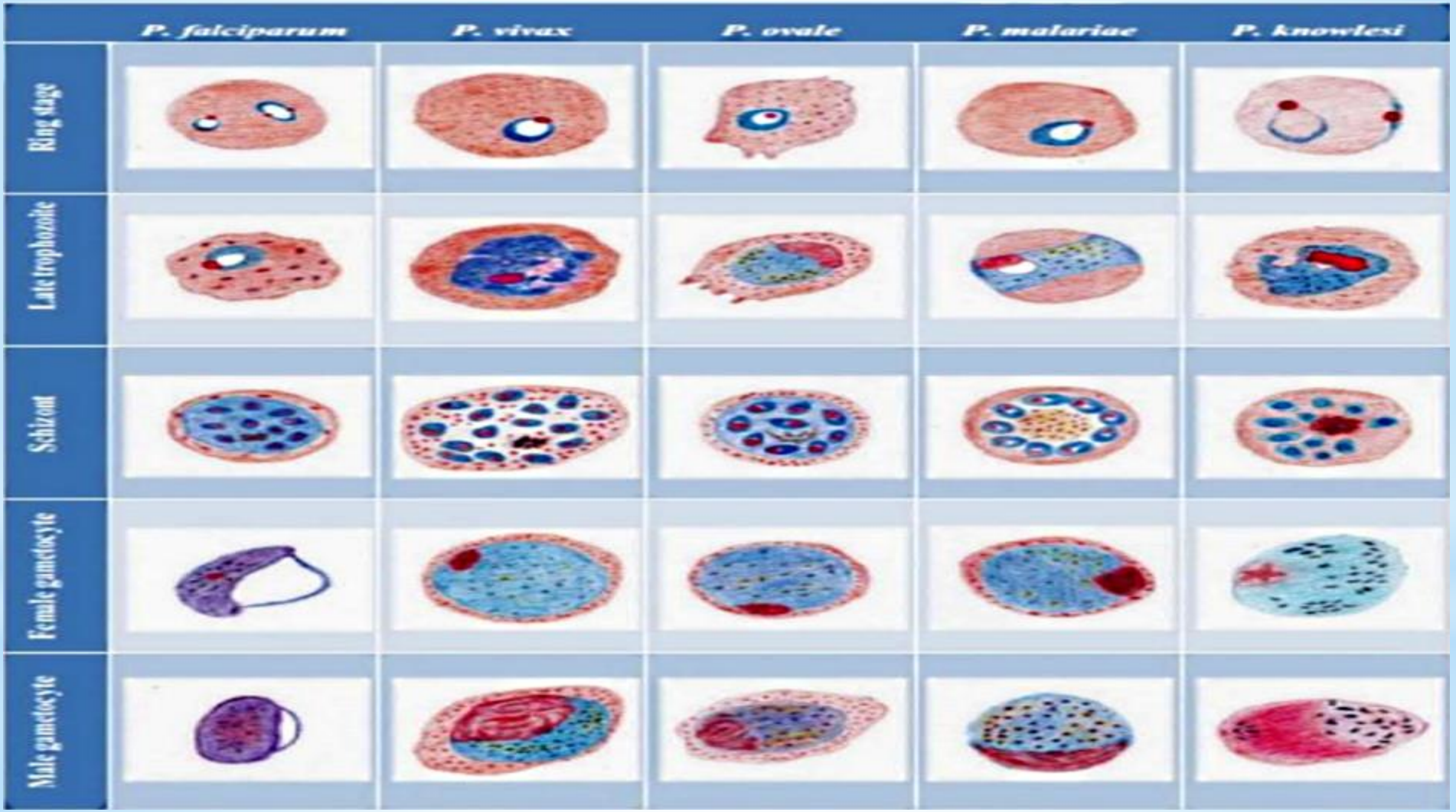
شیزونت پلاسمودیوم ناولزی



شباهت پلاسمودیوم ناولزی با PF و PM

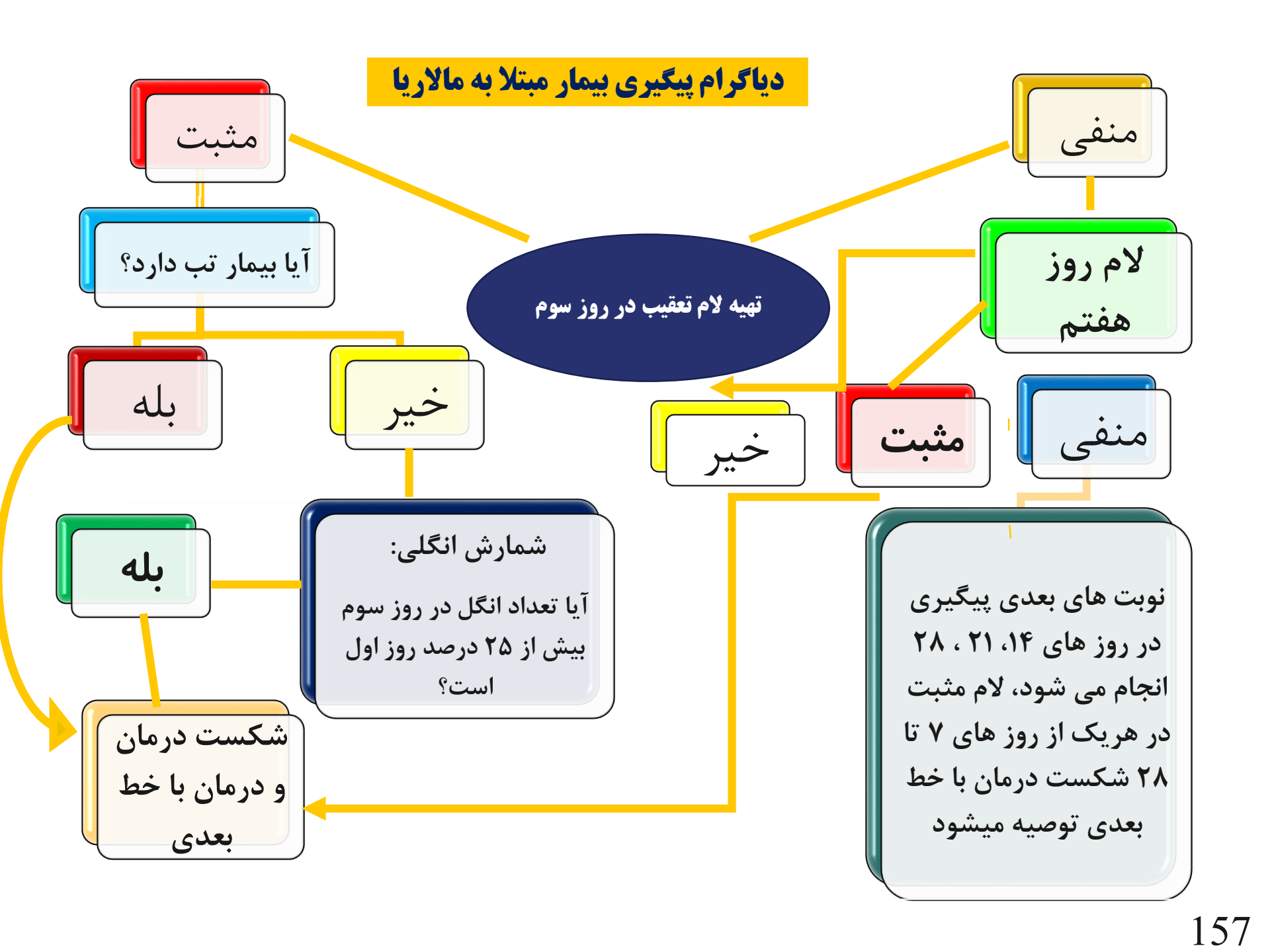


مقایسه مراحل انگلی در پلاسمودیوم ها



نکات پیگیری موارد مالاریا مثبت

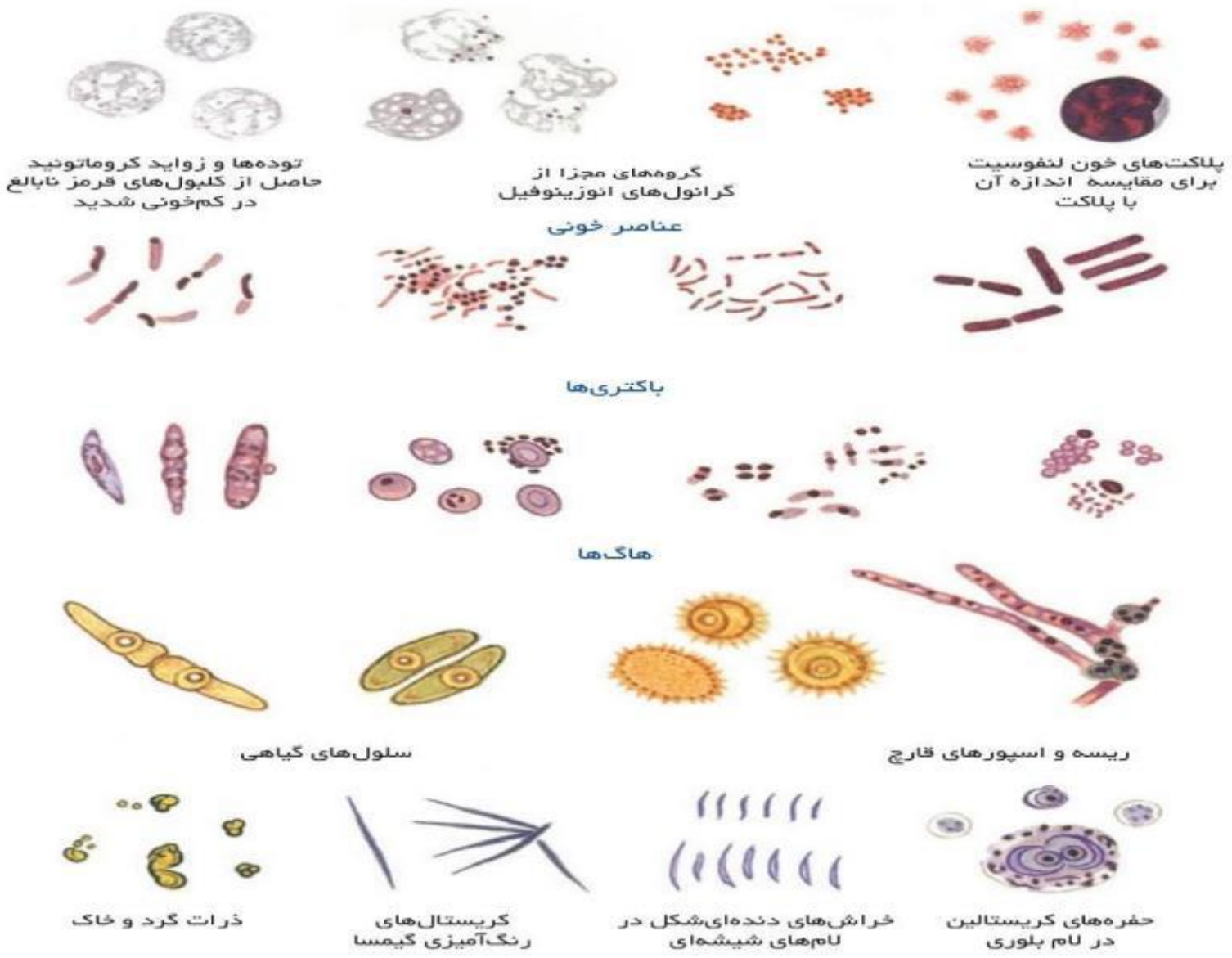
- تهیه لام خون محیطی از بیماران مبتلا به پلاسمودیوم **فالسی پاروم** و عفونت میکس در **روزهای سوم، هفتم، چهاردهم، بیست و یکم و بیست و هشتم**
- تهیه لام خون در **روزهای چهلم** و **شصتم** از **شروع درمان**
- تهیه لام تعقیب از موارد **ویواکس** در فاصله **روز های بیست و یکم** تا **بیست و هشتم**
- **در صورت بروز تب** در **روزهای سوم تا بیست و هشتم درمان** ، تهیه لام خون محیطی در همان روز


دیاگرام پیگیری بیمار مبتلا به مالاریا
تهیه لام تعقیب در روز سوم
مثبت
آیا بیمار تب دارد؟
بله
خیر
بله
شمارش انگلی:
آیا تعداد انگل در روز سوم بیش از ۲۵ درصد روز اول است؟
شکست درمان و درمان با خط بعدی
منفی
لام روز هفتم
مثبت
خیر
منفی
نوبت های بعدی پیگیری در روز های ۱۴، ۲۱ ، ۲۸ انجام می شود، لام مثبت در هریک از روز های ۷ تا ۲۸ شکست درمان با خط بعدی توصیه میشود

آرتیفکت ARTEFACTS

- اجزای مصنوعی در لام خون محیطی
- فاقد ارتباط با مشکل فعلی
- منشا : منابع بسیار (انگشت ، لام ، لکه ، بافر ، هوا و غیره)
- رسوب رنگ و باکتری ها (آرتیفکت) رایج
- رایج ترین آرتیفکت ها :

خاک ، گرد و غبار ، باکتری ها، رسوبات لکه ، قارچ ها ، مخمر ، گرده ، سلول ها یا هاک های گیاهی ، جلبک ها ، پشم پنبه ، کریستال های گیمسا


پلاکت‌های خون لنفوسیت
برای مقایسه اندازه آن
با پلاکت
گروه‌های مجزا از
گرانول‌های انوزینوفیل
توده‌ها و زواید کروماتونید
حاصل از کلبول‌های قرمز نابالغ
در کم‌خونی شدید
عناصر خونی
باکتری‌ها
هاگ‌ها
ریسه و اسپورهای قارچ
سلول‌های گیاهی
حفره‌های کریستالین
در لام بلوری
خراش‌های دنده‌ای‌شکل در
لام‌های شیشه‌ای
کریستال‌های
رنگ‌آمیزی گیمسا
ذرات گرد و خاک

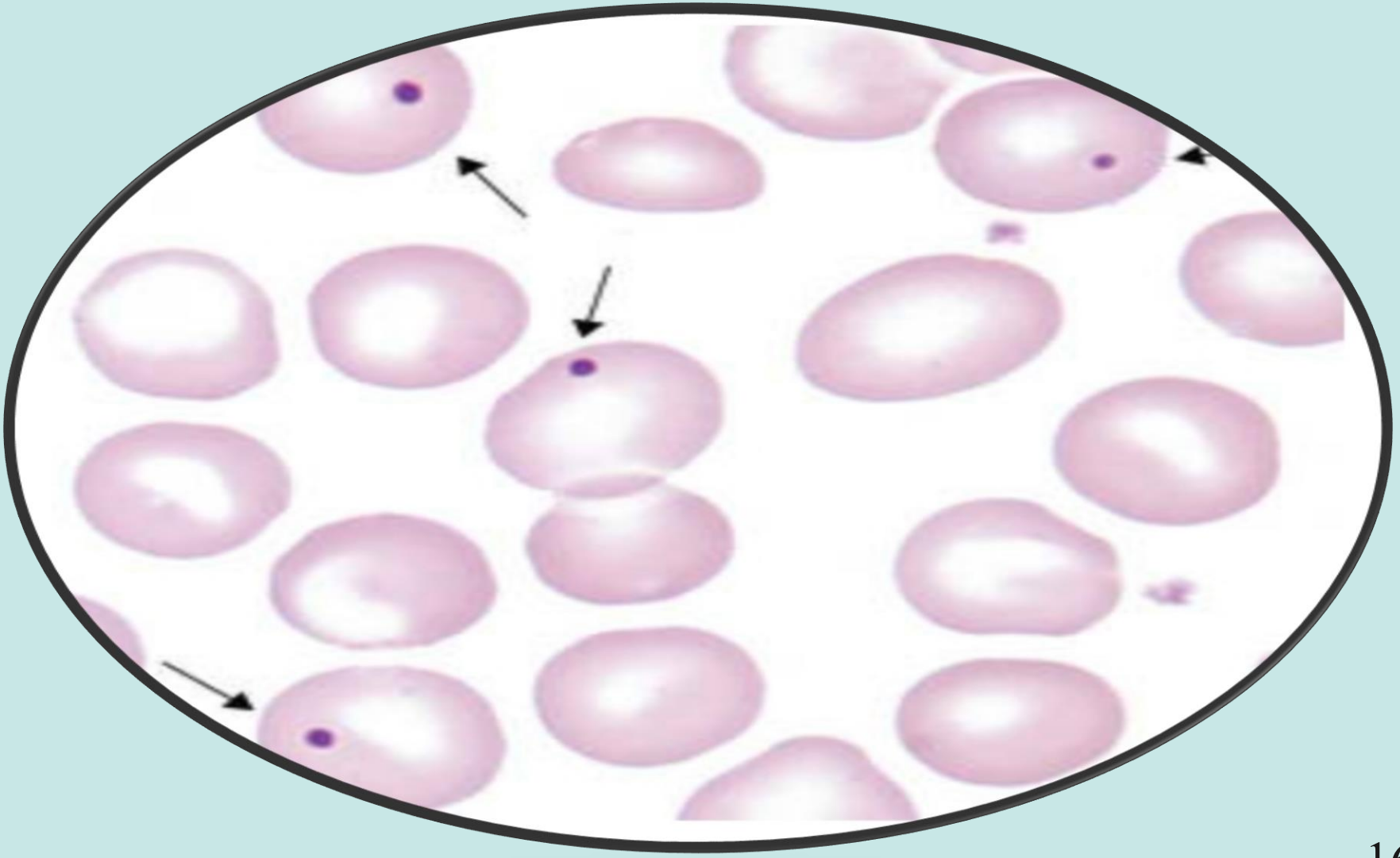
آرتیفکت های ناشی از آب و خشک شدن

- گلبول های قرمز با کناره های خورد شده (شبیه خوردن موریانه)
- حضور هاله مرکزی واضح به علامت قرار گرفتن واکوئل در وسط گلبول قرمز به علت آرتیفکت آب
- ایجاد مورفلوژی اکینوسیت در ناحیه ای از گستره که دیرتر خشک شده باشد
- ایجاد مورفولوژی اکینوسیت به علت هوای مرطوب

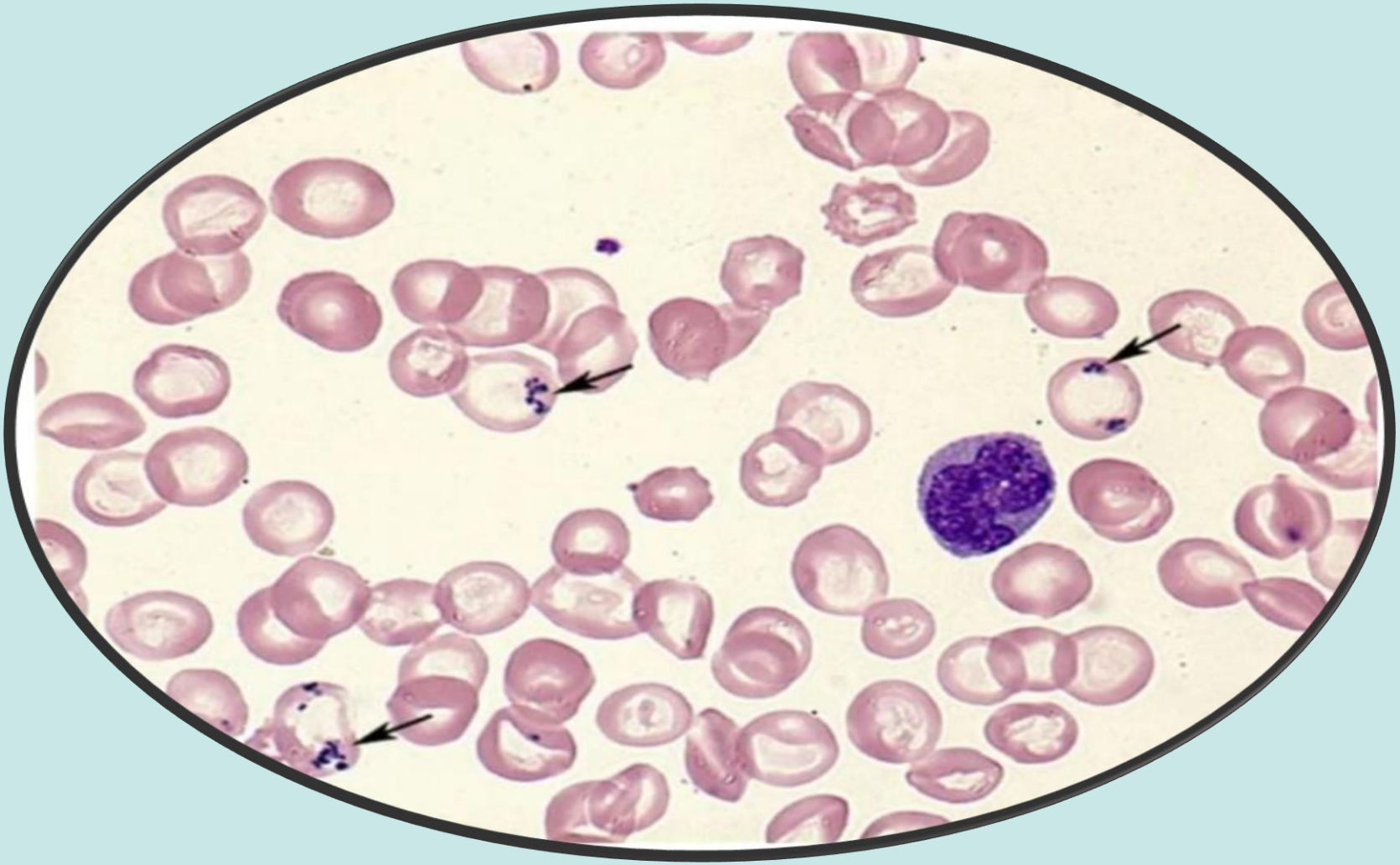
عناصر خونی شبه انگل

- اجسام هاول ژولی
- پاپن هایمر
- کابوت رینگ
- تجمع پلاکتی
- جاینت پلاکت
- بازوفیلیک استیپلینگ

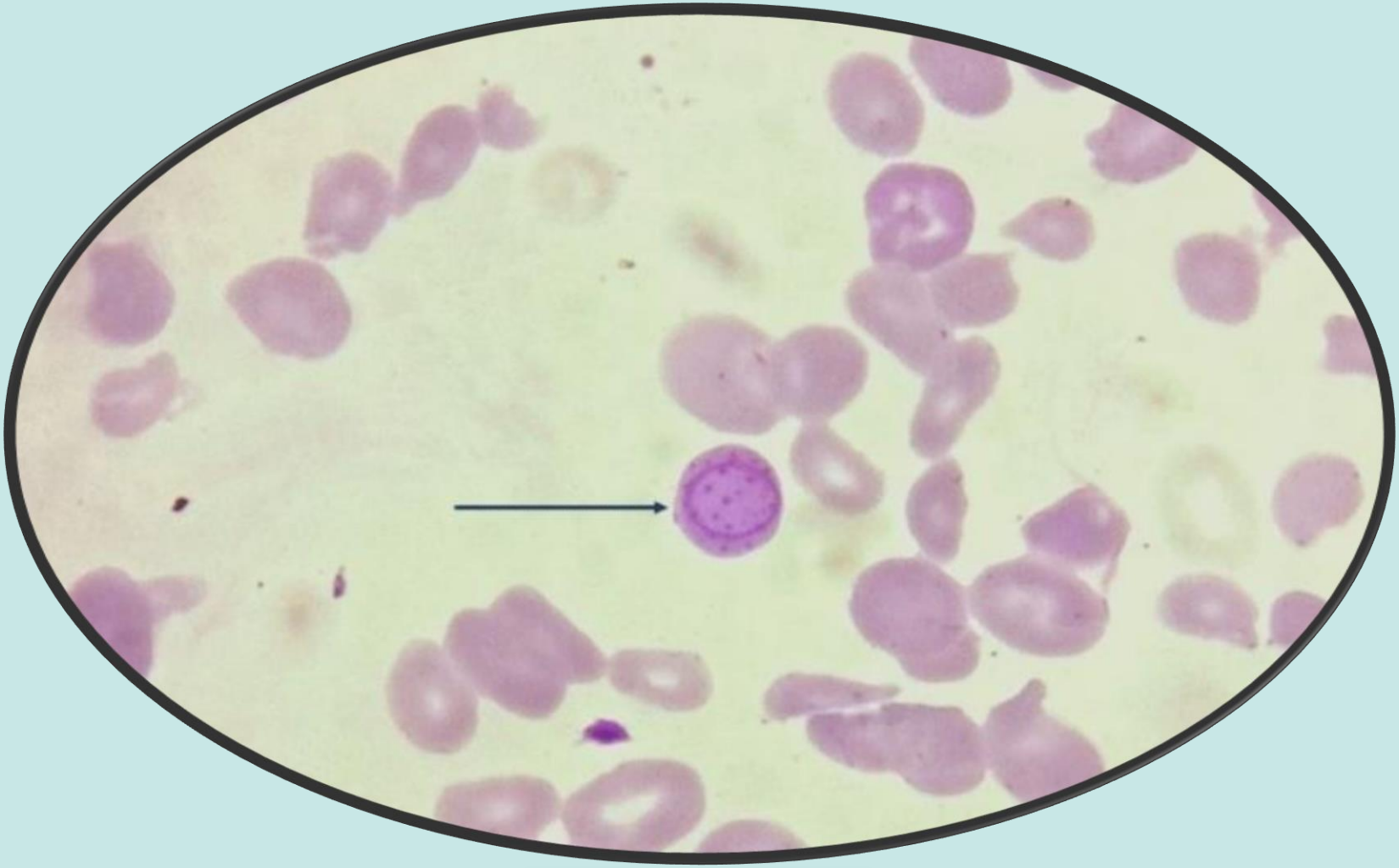
اجسام هاول ژولی



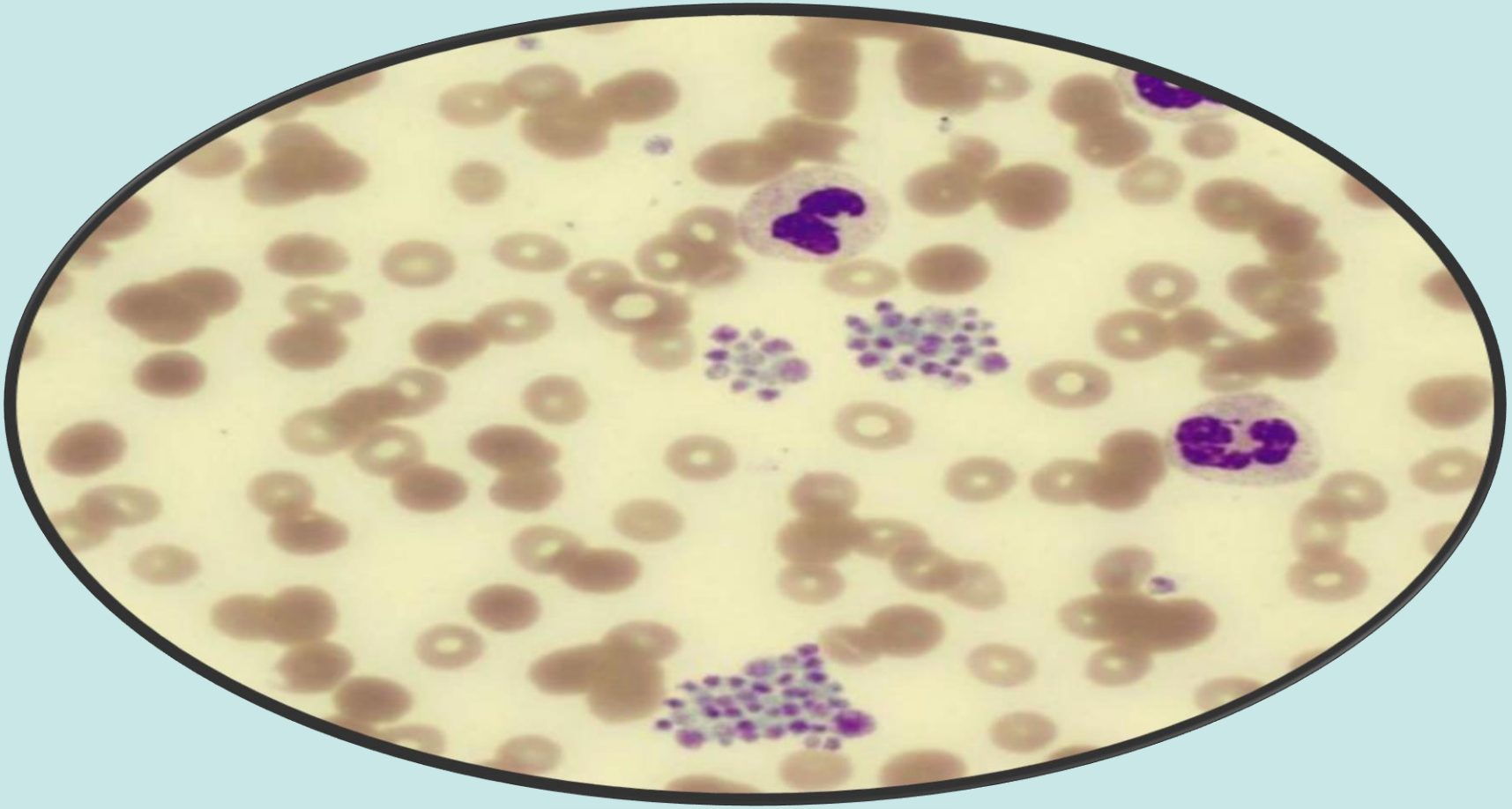
پاپن هایمر



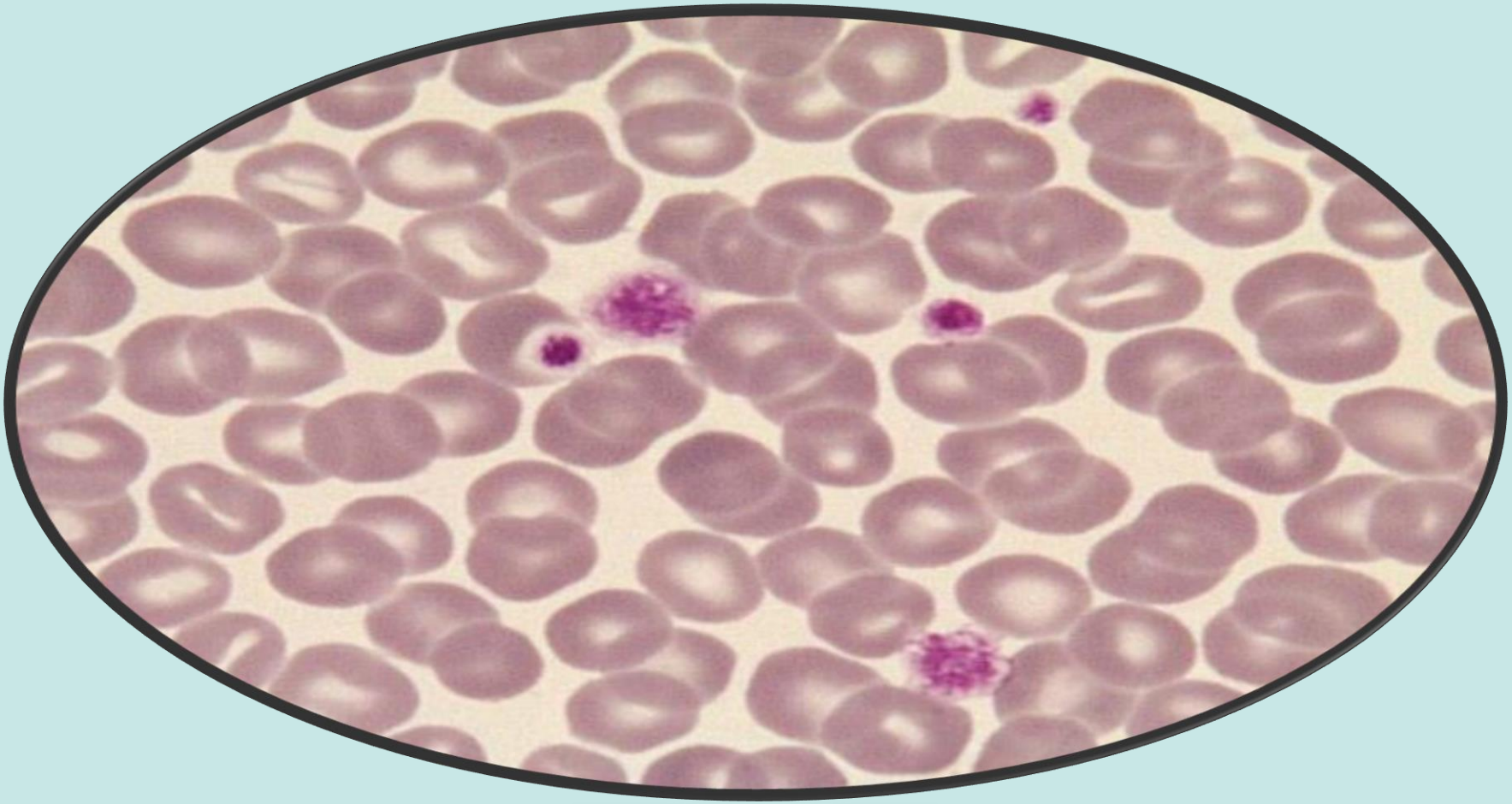
کابوت رینگ همراه با بازوفیلیک استیپلینگ



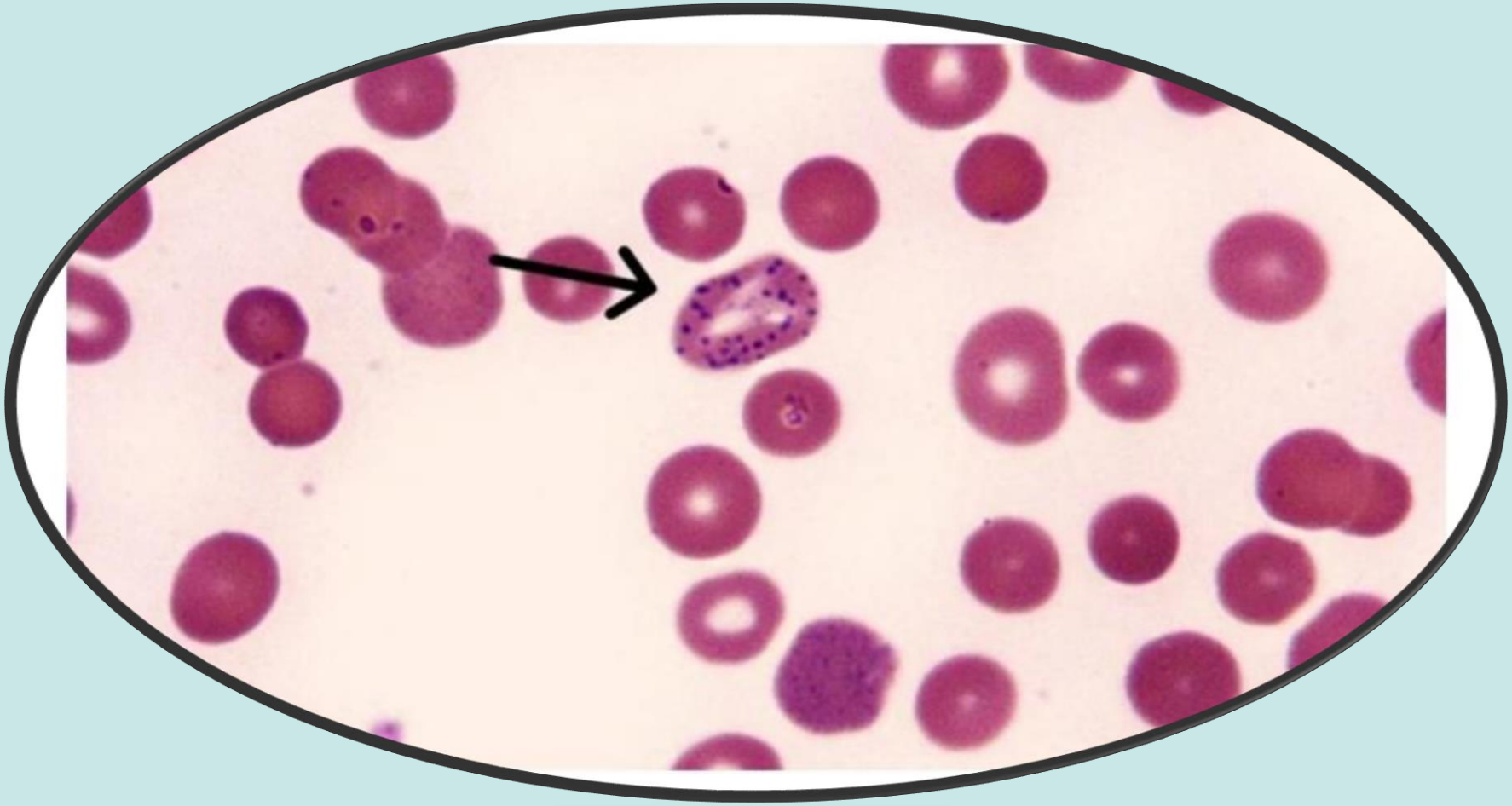
تجمع پلاکتی



جاینت پلاکت



بازوفیلیک استیپلینگ



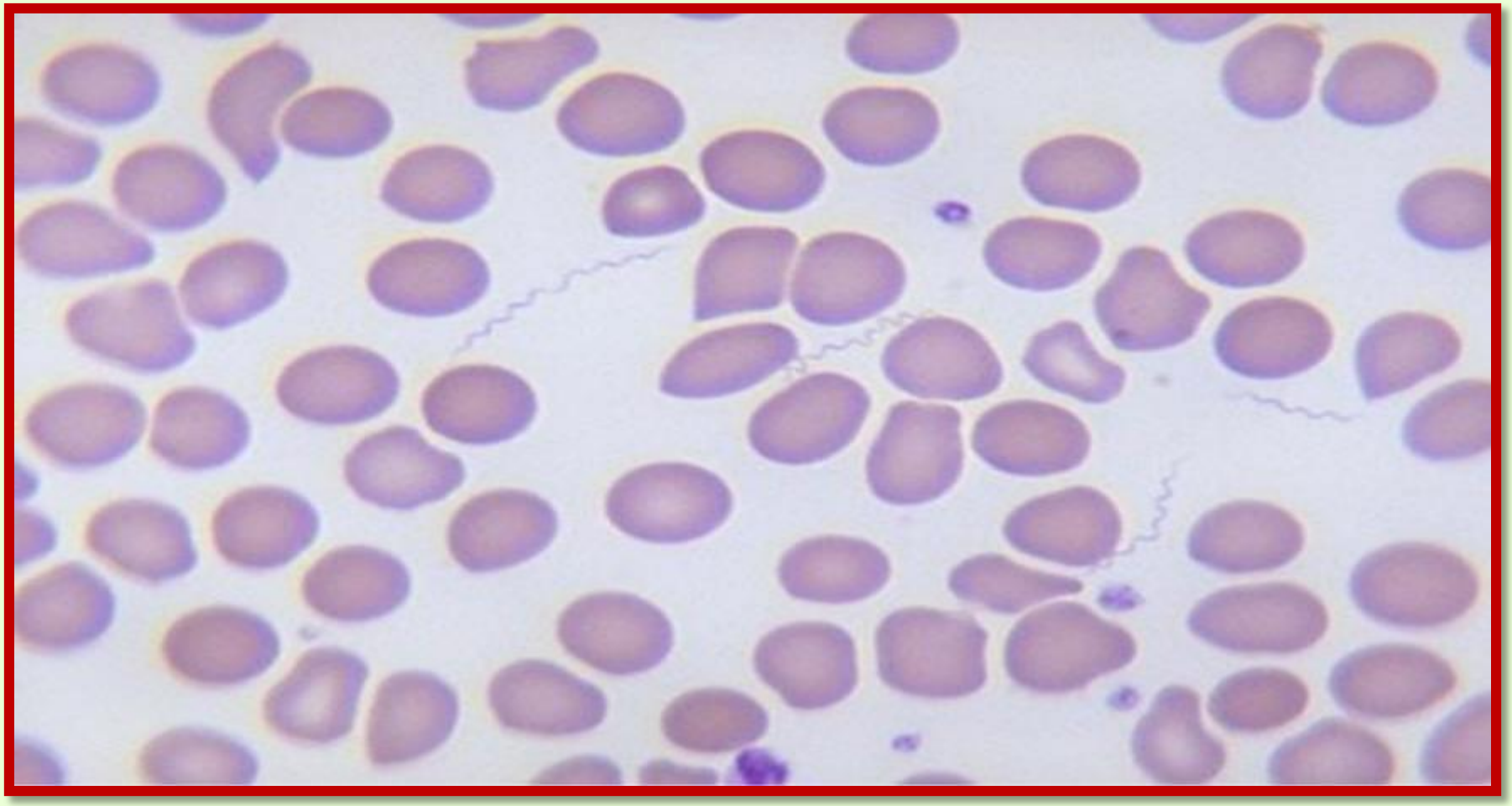
اکینوسیت

انگل های خونی

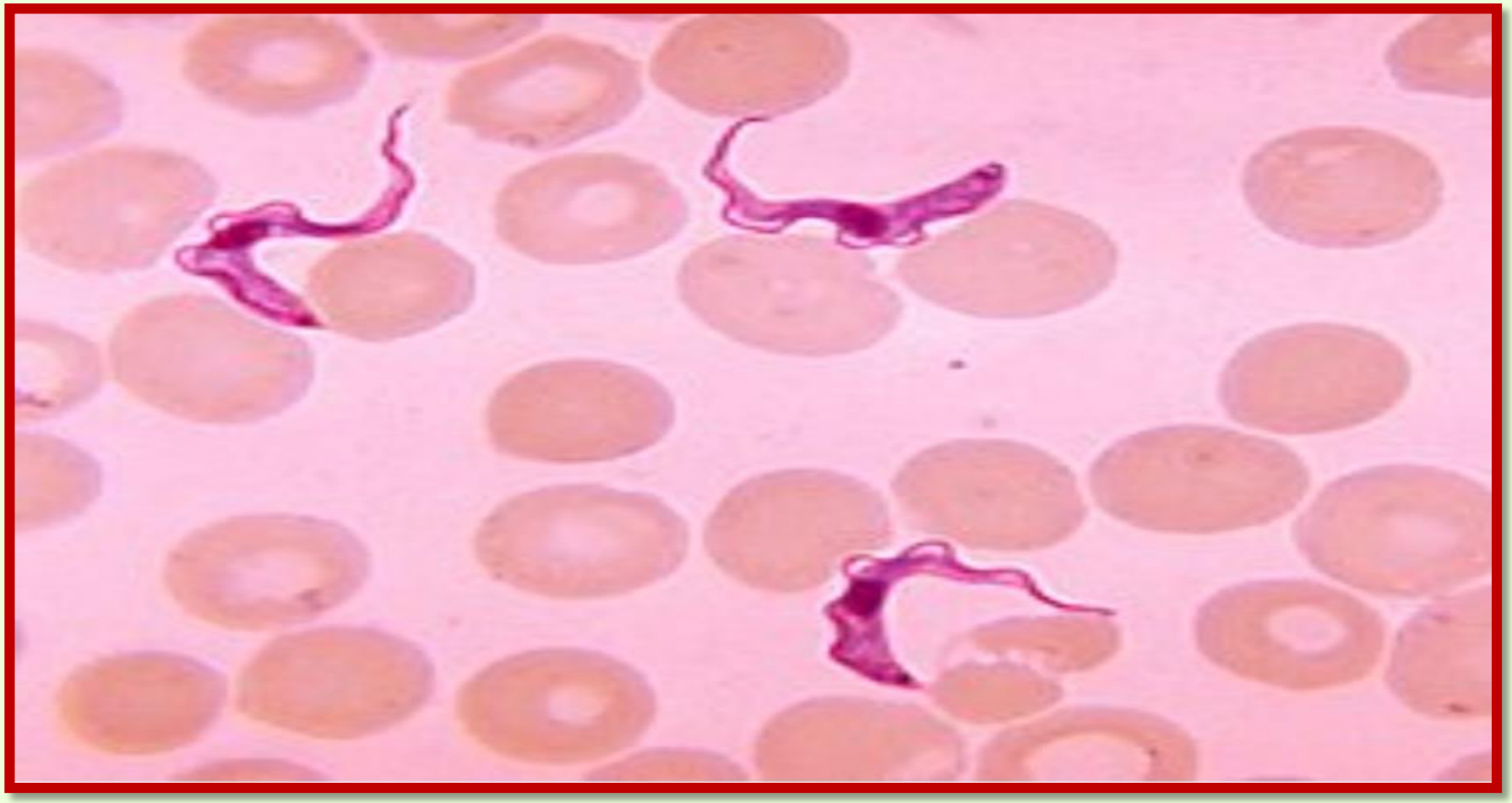
- لیشمانیا
- بورلیا
- تریپانوزوم
- میکروفیلاریا
- بابزیا
- توکسوپلاسما

لیشمانیا

بورليا

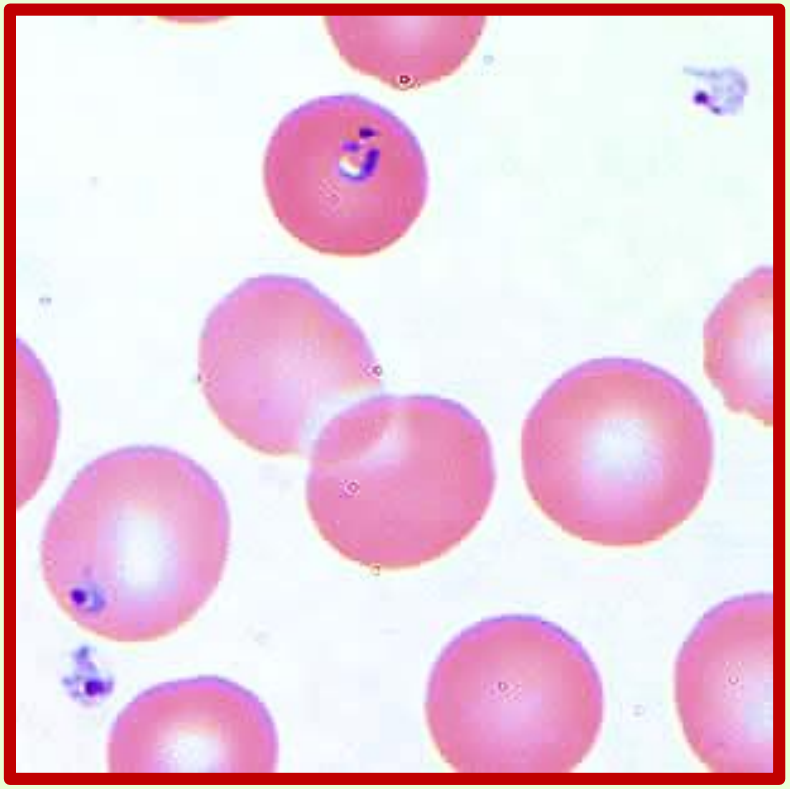


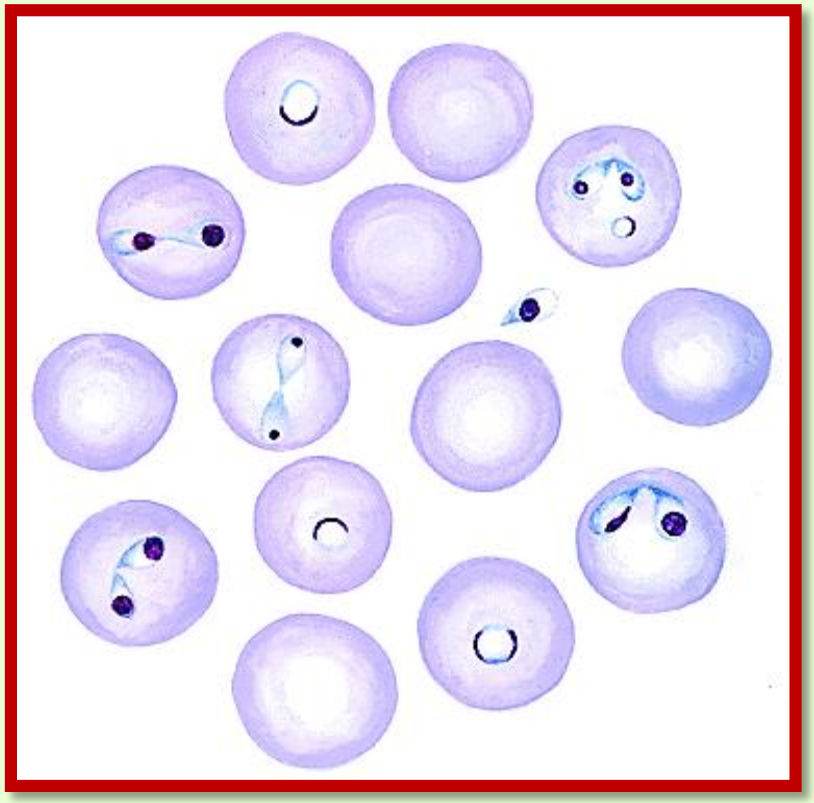
تریپانوزوم



میکروفیلاریا

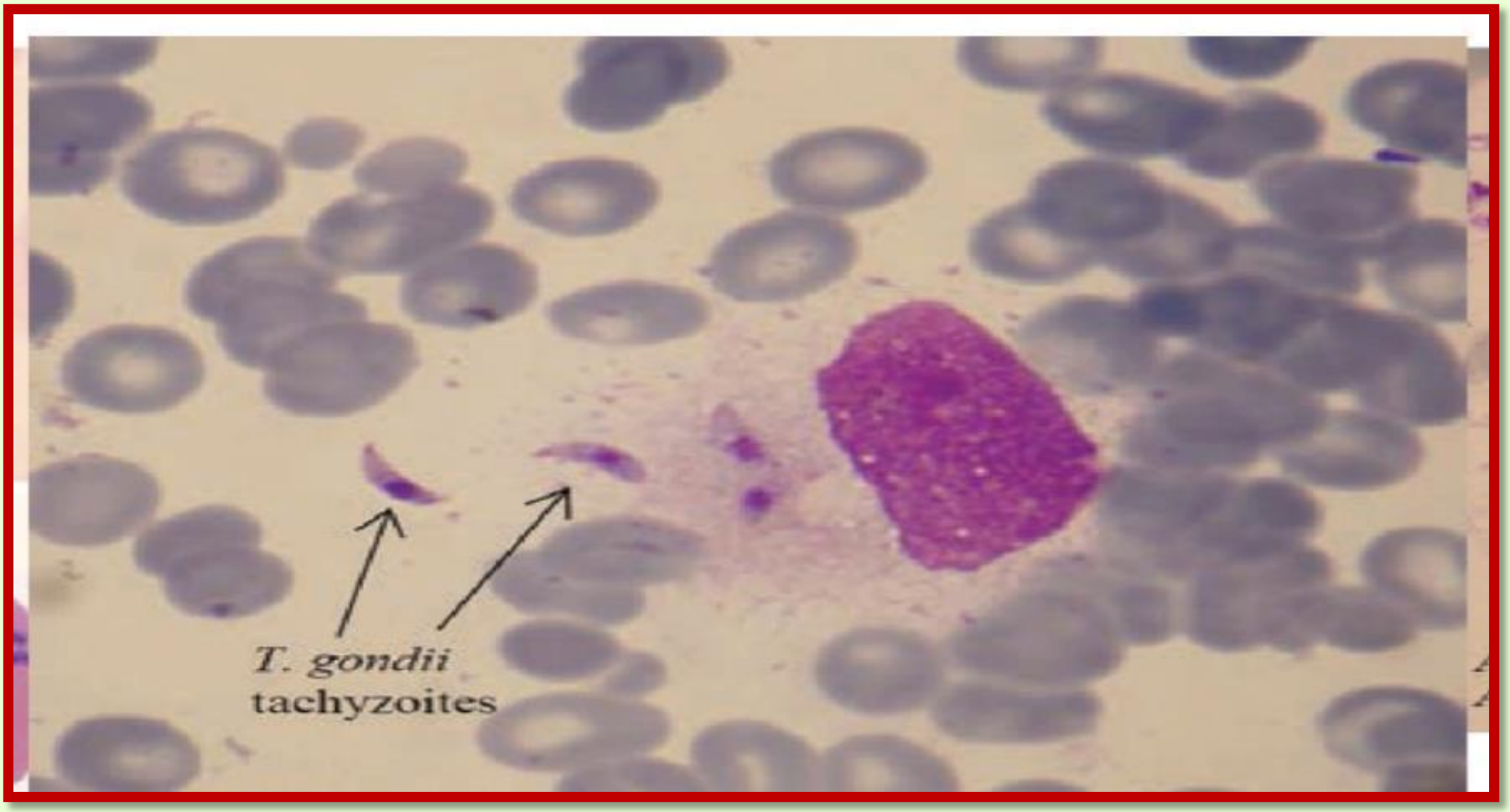
بابزیا





Thin blood smear showing a cluster of extracellular rings.

توکسوپلاسما



شمارش انگلی

اهداف:

- تعیین شدت پارازیتمی
- تعیین اثر دارو

نحوه شمارش انگل در گسترش ضخیم

1) بررسی گسترش ضخیم زیر میکروسکوپ و پیدا کردن محلی که بخوبی رنگ گرفته است(یک گسترش خوِب گسترشی است که در هر شان گسترش ضخیم ۲۰ گلبول سفید دیده شود.)

2) آماده کردن یک جدول که در یک ستون تعداد انگل (غیر جنسی) و در ستون دیگر تعداد گلبول سفید یادداشت گردد یا دو شمارنده متفاوت یکی برای شمارش انگل و دیگری شمارش گلبول سفید.

3) بررسی هر شان میکروسکوپ به گونه ای که شان بعدی مماس شان قبلی باشد

4) تعداد شانها را تا شمارش ۲۰۰ گلبول سفید و در موارد کم انگل (**کمتر از ۱۰ انگل در ۲۰۰ شان**) شمارش را تا **۵۰۰ گلبول سفید** ادامه میدهیم. عدد بدست آمده تعداد انگل در برابر تعداد گلبول سفید شمارش شده است.

شمارش انگل روی گسترش ضخیم و محاسبه تراکم انگل

قرار دادن لام روی میکروسکوپ به شکلی که لیبل آن سمت چپ باشد

معین و ثبت کردن حضور انگل مالاریا و نوع گونه و مراحل آن

شروع کردن شمارش از بالاترین نقطه سمت چپ گسترش برای یک میدان مناسب از نظر انگل و گلبول سفید

فشردن دکمه های انتخاب شده شمارش گر برای هریک انگل و گلبول سفید

بعد از شمارش تمام انگل و گلبول های سفید؛ رفتن به میدان بعدی و تکرار روش شمارش الی آخر

روش محاسبه تعداد انگل با استفاده از گسترش ضخیم در هر میکرولیتر خون:

$$\text{تعداد انگل در میکرولیترخون} = \frac{\text{تعداد انگل شمارش شده} \times 8000}{\text{تعداد گلبول سفید شمارش شده}}$$

بجای عدد ۸۰۰۰ میتوان از شمارش WBC خود بیمار استفاده کرد

درصد آلودگی: بررسی گسترش نازک(بررسی حداقل ۱۰۰۰۰ RBC)
شمارش انگلی: بررسی گسترش ضخیم

نحوه شمارش انگل در گسترش نازک

اگر فقط گسترش نازک در دسترس بود

- از قسمت بالای گسترش نازک شروع کنید و دنبال یک میدان تیپیک با RBCآلوده بگردید
- با استفاده از دو شمارنده تعداد گلبولهای قرمز آلوده و گلبولهای قرمزسالم را بشمارید.
- بعد از دیدن 20میدان گسترش نازک شمارش را متوقف کنید

$$\text{تعداد انگل در میکرولیتر خون} = \frac{\text{تعداد گلبول قرمز آلوده} \times 5000000}{\text{تعداد گلبول قرمز شمارش شده}}$$

بجای ۵۰۰۰۰۰۰ میتوان شمارش RBCخود بیمار را قرار داد تا نتایج دقیقتری بدست آید

شمارش انگل روی گسترش نازک و محاسبه تراکم انگل

در صورت موجود بودن گلبول های قرمز آلوده؛ شمردن و ثبت تمام گلبول های قرمز آلوده

شروع کردن از قسمت بالای گسترش و یافتن یک میدان تیپیک با گلبول های قرمز آلوده و دیگر گلبول های قرمز

فشردن دکمه در نظر گرفته شده برای هرکدام از گلبول های آلوده و غیر آلوده

ثبت نتایج بعد از شمردن تمام گلبول های قرمز آلوده و غیرآلوده در یک میدان و حرکت به میدان بعدی و ادامه روش

توقف شمارش بعد از دیدن ۲۰ میدان گسترش نازک و ثبت تمام گلبول های آلوده و غیرآلوده

مثال 1

تمام مراحل شمارش شده فالسیپاروم=155

WBC شمارش شده متناسب با انگل=208

$$\frac{155 \times 8000}{208} = {}^{5962}/_{\gamma l}$$

مثال 2

تمام مراحل شمارش شده ویواکس=88

WBC شمارش شده متناسب با انگل=505

WBCشمارش شده بیمار=6500

$$\frac{88 \times 6500}{505} = {}^{1133}/_{\gamma l}$$

مثال 3

تمام مراحل انگل فالسیپاروم+تمام مراحل انگل ویواکس = 360

WBC شمارش شده متناسب با انگل = 208

$$\frac{360 \times 8000}{208} = {}^{14257}/_{\gamma l}$$

نکته: در عفونتهای میکس تمامی مراحل جنسی و غیر جنسی شمرده میشود

ثبت و گزارش نتایج میکروسکوپی

نتایج مثبت

1) گزارش نوع انگل

2) گزارش مراحل مختلف انگل

3) گزارش شمارش انگلی

نتایج منفی

Not Seen

منابع:

- انگل شناسی پزشکی ، نویسنده : نوا براون,مترجم عمید اطهری,نوبت چهارده۱۳۹۵
- مالاریا(با مروری بر مباحث ژنتیک,روشهای تشخیص و تضمین کیفیت تشخیص میکروسکوپی) نویسندگان: دکتر عباس شهبازی,دکتر احمد رئیسی, نوبت اول ۱۳۹۰
- درمان مالاریا در جمهوری اسلامی ایران،نویسندگان: دکتر مسعود صالحی، دکتر منصور رنجبر،دکتر محمود نبوی ،دکتر محسن مقدمی، ویرایش چهارم۱۳۹۳
- مجموعه روشهای اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا، نویسنده :علیرضا صادقی نوبت اول ۱۳۹۷

سپاس از توجه شما