مجموعهٔ کمک آموزشی
تشخیص مالاریا

تهیه و تدوین:

سازمان جهانی بهداشت

ترجمه و گردآوری:

دکتر منصور رنجبر
مهندس مصطفی علیزاده
لیلا فرجی
دکتر احمد رئیسی



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی‌درمانی اصفهان
معاونت امور بهداشتی
مرکز بهداشت استان

مرکز نشر

عنوان و نام پدیدآور	: مجموعهٔ کمک‌آموزشی تشخیص مالاریا / سازمان جهانی بهداشت
ترجمه و گردآوری	: منصور رنجبر، مصطفی علیزاده، لیلا فرجی و احمد رئیسی
مشخصات نشر	: تهران: مرکز نشر صدا، ۱۳۸۶.
مشخصات ظاهری	: ۲۸ ص.
شابک	: ۹۷۸-۹۶۴-۳۵۹-۲۱۲-۷
وضعیت فهرست‌نویسی	: فیپا
موضوع	: مالاریا- تشخیص- دستنامه‌های آزمایشگاهی
شناسهٔ افزوده	: ایران. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت سلامت؛ مرکز مدیریت بیماری‌ها؛ دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی‌درمانی اصفهان.
رده‌بندی کنگره	: RC ۱۵۸/ر۲ ۱۳۸۶
رده‌بندی دیویی	: ۶۱۶/۹۳۶۲۰۷۵
شماره کتاب‌شناسی ملی	: ۱۰۳۵۷۵۴



مجموعهٔ کمک‌آموزشی تشخیص مالاریا

تهیه و تدوین:
سازمان جهانی بهداشت

ترجمه و گردآوری:
دکتر منصور رنجبر
مهندس مصطفی علیزاده
لیلا فرجی
دکتر احمد رئیسی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی‌درمانی اصفهان
(معاونت امور بهداشتی)

خدمات طراحی، چاپ و نشر: مرکز نشر صدا
طراح گرافیک: محمودرضا طالب‌زاده

نوبت چاپ: اول(۱۳۸۶)

شمارگان: ۵۰۰۰ نسخه

شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۳۵۹-۲۱۲-۷

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

«حق چاپ و نشر برای ناشر محفوظ است.»

مرکز نشر صدا

مرکز نشر صدا
تهران، تقاطع خیابان ولی‌عصر با مطهری،
خیابان منصور، شمارهٔ ۷۷
۸۸۵۵۳۴۲۹ و ۸۸۵۵۳۴۰۳ – دورنگار: ۸۸۷۱۳۶۵۳



سرآغاز

از نظر انتشار و میزان ابتلا و مرگ‌ومیر، مالاریا مهم‌ترین بیماری انگلی در جهان است. در کشور ما با وجود سال‌ها مبارزه، این بیماری هنوز یکی از معضلات مهم بهداشتی به‌ویژه در جنوب شرقی کشور محسوب می‌شود. بنابراین، بدیهی است ارتقای سطح علمی دست‌اندرکاران امور بهداشتی نقش مهمی در تشخیص، درمان و مبارزه با این بیماری ایفا می‌کند.

هر چند موارد بیماری در کشور از حدود پنج میلیون نفر در پنجاه سال پیش به ۱۵۷۵۳ مورد در سال ۱۳۸۵ کاهش یافته‌است، اما سهولت مسافرت و افزایش تبادلات جمعیتی، امکان مشاهدهٔ بیمار مبتلا به مالاریا و بازگشت انتقال بیماری در همهٔ مناطق دارای پتانسیل انتقال را فراهم نموده‌است.

به‌منظور آموزش روش‌های تهیهٔ نمونه و تشخیص انگل مالاریا، تدوین یک راهنمای مصور آزمایشگاهی که در دسترس همکاران گرامی باشد، ضروری می‌نمود. بنابراین، برآن شدیم تا مجموعهٔ کمک‌آموزشی تشخیص مالاریا را آماده کنیم که مورد استفادهٔ بیشتر علاقه‌مندان باشد.

در اینجا لازم می‌دانیم از مساعدت‌های بی‌شائبهٔ جناب آقای دکتر کمال حیدری معاون محترم امور بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی‌درمانی اصفهان و جناب آقای دکتر رضا فدایی نوبری مدیر محترم گروه مبارزه با بیماری‌های مرکز بهداشت استان اصفهان که زمینهٔ لازم برای نشر این مجموعه را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی نماییم. همچنین، از زحمات جناب آقای مهندس مصطفی علیزاده در ترجمهٔ متن اصلی سازمان جهانی بهداشت کمال تشکر را داریم.

امید است این مجموعه گامی هر چند کوچک درجهت اعتلای سطح علمی و آموزشی جامعهٔ بهداشتی کشور باشد.

ادارهٔ کنترل بیماری‌های منتقله توسط ناقلین(مالاریا)

فهرست

تمیز کردن و نگهداری لام‌های میکروسکوپی ۷

مراقبت از میکروسکوپ ۸

تهیهٔ محلول‌های بافر برای رنگ‌آمیزی انگل‌های مالاریا ۹

تهیهٔ محلول استوک رنگ گیمسا ۱۰

تکنیک‌های رنگ‌آمیزی گیمسا(روش رایج) ۱۱

تکنیک‌های رنگ‌آمیزی گیمسا(روش سریع) ۱۲

روش شمارش انگل‌های مالاریا در لام‌های گسترش ضخیم خون ۱۳

طرز تهیهٔ گسترش‌های ضخیم و نازک خون روی لام ۱۴

نکته‌های مهم در راستای تشخیص، درمان و پیگیری مالاریا ۲۴

دیاگرام درمان و پیگیری مبتلایان به مالاریا ۲۶

دیاگرام پیگیری بیمار مبتلا به مالاریای فالسیپاروم ۲۷

منابع ۲۸

تصویرها

تصویر شمارهٔ ۱ ..... ۱۶
شناسایی گونه‌های انگل مالاریا در گسترش‌های ضخیم خون، رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا

تصویر شمارهٔ ۲ ..... ۱۷
نمای ظاهری مراحل پلاسمودیوم فالسیپاروم در گسترش‌های ضخیم و نازک خون رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا

تصویر شمارهٔ ۳ ..... ۱۸
نمای ظاهری مراحل مختلف پلاسمودیوم ویواکس در گسترش‌های ضخیم و نازک خون رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا

تصویر شمارهٔ ۴ ..... ۱۹
نمای ظاهری مراحل پلاسمودیوم اوال در گسترش‌های ضخیم و نازک خون رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا

تصویر شمارهٔ ۵ ..... ۲۰
نمای ظاهری مراحل پلاسمودیوم مالاریه در گسترش‌های ضخیم و نازک خون رنگ‌آمیزی شده با گیمسا

تصویر شمارهٔ ۶ ..... ۲۱
اشکال عناصر سلولی در گسترش‌های ضخیم و نازک خون رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا

تصویر شمارهٔ ۷ ..... ۲۱
تأثیر pH روی انگل‌های مالاریا در رنگ‌آمیزی گیمسا

تصویر شمارهٔ ۸ ..... ۲۲
عناصر اشتباه‌برانگیز در تشخیص انگل



مجموعهٔ کمک‌آموزشی تشخیص مالاریا

این مجموعه را بخش مبارزه با مالاریای سازمان جهانی بهداشت به‌عنوان راهنمایی برای تشخیص میکروسکوپی مالاریای انسان تهیه‌کرده و شامل تصویرهای رنگی و نکته‌های تکنیکی ضروری به‌منظور فعالیت‌های آزمایشگاهی کنترل مالاریا است.

این راهنما برای میکروسکوپیست‌های تمام سطوح خدمات بهداشتی و دانشجویان پزشکی، طب‌گرمسیری و انگل‌شناسی مفید و ارزشمند است.

از صفحهٔ ۱۷ تا ۲۰ مشتمل بر تصویرهایی برای نمایش مراحل زندگی چهارگونه انگل مالاریای انسان در لام‌های گسترش ضخیم و نازک خون(که با گیمسا رنگ‌آمیزی‌شده) است.

در ابتدا، نکته‌های تکنیکی به‌منظور تمیزکردن، مراقبت و نگهداری از اسلایدهای میکروسکوپی و میکروسکوپ و همچنین، نحوهٔ تهیهٔ محلول‌های بافر برای رنگ‌آمیزی نمونه‌های مشکوک به مالاریا و چگونگی تهیهٔ محلول استوکِ رنگ گیمسا ارائه شده‌است.

در صفحه‌های ۱۴ و ۱۵ چگونگی تهیهٔ گسترش‌های ضخیم و نازک خون روی لام، همراه با تصویر توضیح‌داده شده‌است. صفحهٔ ۲۱ عناصر سلولی خون انسان را در گسترش‌های ضخیم و نازک رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا و تأثیرات pH را روی انگل‌های مالاریا(رنگ شده با گیمسا) نشان‌می‌دهد. صفحهٔ ۲۲ تعدادی از عواملی را نمایش‌می‌دهد که اغلب سبب اختلال در تشخیص گسترش ضخیم می‌شود.

نکته‌های تکنیکی برای تهیهٔ رنگ گیمسا به روش سریع و رایج در صفحه‌های ۱۱ و ۱۲ ارائه شده‌است. در صفحهٔ ۱۶ ویژگی‌های ظاهری گسترش ضخیم فاز خونی تروفوزوئیت، شیزونت و گامتوسیت چهارگونه پلاسمودیوم انسانی(به همراه یک متن خلاصه) با یکدیگر مقایسه شده‌است. در صفحهٔ ۱۳ دو روش شمارش انگل‌های مالاریا در لام‌های گسترش ضخیم شرح‌داده شده‌است.

نسخهٔ اصلی این جزوه به زبان‌های انگلیسی، فرانسه و اسپانیایی در دسترس است.

مطالبی دربارهٔ تهیه‌کنندهٔ تصویرها

این تصویرها را آقای یاپ لوی فونگ(Yap Loy Fong) تکنولوژیست علوم آزمایشگاهی انستیتو تحقیقات پزشکی در کوالالامپور مالزی (۱۹۸۱–۱۹۴۶) با همکاری دکتر جان دبلیو فیلد(John W.Field) تهیه کرده‌است. ایشان در زمینهٔ تهیهٔ یک مجموعه مصور کار می‌کردند که از مطالعات انجام‌شده روی مرفولوژی پلاسمودیوم‌های انسانی در گسترش‌های ضخیم و نازک خون رنگ‌آمیزی‌شده به روش رومانوفسکی به‌دست آمده‌بود.

حاصل ۳۵ سال تجربه و مهارت تشخیصی یاپ به‌عنوان تصویرگر و انگل‌شناس، در مجموعهٔ کمک‌آموزشی تشخیص مالاریا گرد آمده‌است.

«این مجموعه‌برای میکروسکوپیست‌های مجرب و مبتدیان ارزش زیادی دارد و در تلاش است برخی انگل‌های دارای مرفولوژی مشکوک را با تصاویر کامل مراحل نمویافتهٔ گونه‌های مختلف پلاسمودیوم مقایسه کند. این مجموعهٔ رنگی برای آموزش میکروسکوپی مالاریا مناسب خواهدبود.»

پزشک گرمسیری



تمیزکردن و نگهداری از لام‌های میکروسکوپی

۱. تمیز کردن

به‌منظور تهیهٔ نمونه‌های خونی برای مطالعات میکروسکوپی باید به استفاده از لام‌های شیشه‌ای تمیز و با کیفیت بالا اهمیت داده‌شود. همهٔ لام‌ها باید به دقت و وسواس زیادی تمیز و از رطوبت و چربی پاک شود. این عمل باعث برطرف‌شدن مواد زایدی می‌شود که موجب اختلال در رنگ‌آمیزی و تشخیص انگل می‌شوند.لام‌های معیوب زیر را کنار بگذارید:

الف) لام‌هایی که ظاهر شبنم‌زده یا زمینهٔ رنگین‌کمانی دارند؛

ب) لام‌هایی(اعم از قدیمی و جدید) که ناقص تمیز شده‌اند؛

ج) لام‌های قدیمی که لبه‌های مضرس یا سطح خراشیده دارند.

۱-۱. لام‌های جدید

لازم است با احتیاط همهٔ لام‌های جدید را تمیز کنید(حتی لام‌های تجاری که قبلاً تمیز شده است). لام‌ها را در آب حاوی یک مادهٔ پاک‌کنندهٔ[۱] مطمئن فروببرید و سپس به مدت چند ساعت در آب تمیز قراردهید. آب را چند نوبت عوض‌کنید و زیر آب لوله‌کشی جاری قراردهید. پس از آن، هر لام را با یک پارچهٔ نخی به‌خوبی خشک و تمیز نمایید. همیشه لبه‌های لام‌های تمیز را بگیرید تا اثر انگشت یا چربی روی آنها ایجادنشود.

۱-۲. لام‌های استفاده‌شده

توصیه شده‌است لام‌های استفاده‌شده را ابتدا در آب محتوی یک محلول پاک‌کننده قراردهید. وقتی لام‌ها به‌خوبی غوطه‌ور شدند، پس از خارج‌کردن از آب، یکی یکی به کمک قطعه‌ای گاز یا پنبه، پاک و تمیز کنید تا همهٔ اثرها و نشانه‌های گسترش خون یا روغن پاک شود. سپس لام‌ها را ابتدا در یک محلول پاک‌کنندهٔ تازه فروبرید و بعد از آن در زیر آب لوله‌کشی جاری بگیرید یا چند نوبت در آب تمیز قراردهید. در آخر، لام‌ها را با یک پارچهٔ تمیز خشک‌کنید.

لام‌هایی که به‌طور مختصر خراشیده شده‌اند(خش دارند) و برای تهیهٔ گسترش‌های خون نامناسب هستند، ممکن‌است هنوز برای کارهای معمول آزمایشگاهی در بخش حشره‌شناسی مفید و قابل استفاده باشند.

۲. نگهداری لام‌ها

لام‌های شیشه‌ای نباید بیش از چند هفته در شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب نگهداری شوند. در غیر این صورت، با جذب رطوبت به یکدیگر خواهند چسبید و شفافیت آنها به دلیل شبنم‌زدگی ازبین خواهدرفت. بهتر است لام‌ها بعد از تمیزشدن در یک مکان خشک یا یک کمد هوای گرم نگهداری‌شوند.

توصیه‌می‌شود لام‌های تمیزشده را در بسته‌های ده‌تایی در کاغذ نازک بپیچید و با چسب نواری سلولزی یا پلاستیکی بچسبانید، طوری که برای استفاده آماده باشند. می‌توان لام‌های بسته‌بندی‌شده را در جعبه‌های مقوایی مخصوص لام یا در جعبه‌های مناسب دیگر بگذارید و با قراردادن صفحه‌های مقوایی، پلی‌استرن یا پنبه‌ای بین آنها، برای پست‌کردن یا انتقال آنها اقدام‌کنید.

۱. کاربرد اسید بیکرومات به‌عنوان یک محلول تمیزکننده توصیه نمی‌شود.



مراقبت از میکروسکوپ

انجام‌دهید:

۱. هنگامی‌که از میکروسکوپ استفاده‌نمی‌کنید، آن را با یک پوشش پلاستیکی یا پارچه‌ای تمیز بپوشانید.

۲. در هوای گرم و خشک برای حفاظت از میکروسکوپ در مقابل گرد و غبار مراقبت بیشتری به‌عمل آورید.

۳. در هوای گرم و مرطوب، برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها روی عدسی‌ها و منشورهای میکروسکوپ مراقبت بیشتری شود.

به‌این منظور کارهای زیر انجام شود:

۳-۱. درصورت امکان، میکروسکوپ در اتاقی نگهداری شود که تهویهٔ مطبوع دارد.

۳-۲. میکروسکوپ در یک اتاق مخصوص و بدون رطوبت نگهداری‌شود. برای این کار می‌توان از یک دستگاه رطوبت‌زدای الکتریکی استفاده‌کرد که قیمت آن حدود نصف قیمت دستگاه تهویهٔ مطبوع است.

۳-۳. درون یک قفسه که درهای آن محکم بسته می‌شوند، تعدادی لامپ ۱۵ تا ۲۵ وات متصل به‌هم قراردهید.

۳-۴. در جعبهٔ میکروسکوپ‌های منفرد که مانند یک قفسهٔ گرم عمل می‌کند، یک لامپ ۱۵ وات قراردهید.

۳-۵. در مناطقی که برق ندارند، جعبهٔ میکروسکوپ را داخل یک قفسه و در ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری بالای دودکش یخچال‌ها یا فریزرهای نفتی قراردهید. بدین ترتیب، می‌توان از رشد قارچ‌ها روی عدسی‌های میکروسکوپ جلوگیری‌کرد.

۴. عدسی‌های شیئی آلوده به روغن ایمرسیون را هر روز تمیزکنید. برای این کار، ابتدا یک پارچهٔ نرم نمناک با گزیلل را به عدسی‌ها بکشید و سپس آنها را به کمک یک پارچهٔ کتانی تمیز جلادهید.

۵. عدسی‌های چشمی را با یک پارچهٔ کتانی نرم یا دستمال لنز تمیزکنید.

۶. پیچ محافظ میکروسکوپ را که در پایهٔ جعبهٔ آن تعبیه شده‌است، کامل ببندید تا میکروسکوپ در هنگام حمل‌ونقل و جابه‌جایی آسیب نبیند.

۷. شمارهٔ مدل و درصورت امکان، شمارهٔ قطعات و لوازم میکروسکوپ را یادداشت کنید تا در صورت نیاز به تعویض قطعات از آن استفاده‌کنید.

انجام‌ندهید:

۱. برای تمیزکردن عدسی‌های چشمی از پارچه‌هایی استفاده نکنید که برای تمیز کردن عدسی‌های شیئی به‌کار رفته و به روغن آغشته شده‌اند.

۲. برای تمیز کردن سطوح رنگ‌شدهٔ میکروسکوپ از الکل استفاده‌نکنید.

۳. از بازوبستن یا تمیزکردن قسمت‌هایی از میکروسکوپ که دسترسی به آنها دشوار است خودداری کنید؛ مگر در این زمینه آموزش دیده باشید.

۴. قطعات عدسی را بدون پوشش نگذارید و با پوشش مناسب یا پلاسترهای چسبان بپوشانید.

۵. عدسی میکروسکوپ‌های کارخانجات مختلف را با یکدیگر تعویض نکنید؛ زیرا حتی برخی مدل‌های ساخته شدهٔ یک کارخانه نیز مشخصات متفاوتی دارند.



تهیهٔ محلول‌های بافر برای رنگ‌آمیزی انگل‌های مالاریا

یک محلول بافر فسفات با pH صحیح برابر با ۷/۲ برای رنگ‌آمیزی انگل‌های مالاریا با رنگ گیمسا لازم است.

۱. تهیهٔ محلول بافر برای مصرف روزانه

۱-۱. یک گرم دی‌سدیم هیدروژن فسفات(Na_2HPO_4) خشک را با ۰/۷ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات(KH_2PO_4) در یک لیتر آب مقطر یا آب غیریونیزه یا آب باران صاف‌شده و درصورت در دسترس نبودن این آب‌ها، در آب لوله‌کشی شهری حل‌کنید.

۱-۲. pH محلول حاصل را بررسی‌کنید(ممکن‌است این کار با pH متر یا یک معرف رنگی مانند مقایسه‌گر لاوی‌باند (Lovibond) انجام‌شود).

۱-۳. pH محلول را با افزایش مقادیر کم از محلول ۲٪ Na_2HPO_4 تا ۷/۲ بالا ببرید و درصورت بالا بودن pH با افزایش مقادیری از محلول ۲٪ KH_2PO_4 آن را پایین بیاورید تا به pH ۷/۲ برسد.

۱-۴. وقتی pH محلول به ۷/۲ رسید، آن را در یک بطری بریزید که در آن محکم بسته شده‌است(بهتر است از بطری تیره رنگ استفاده‌شود). سپس آن را در مکانی خنک و دور از نور مستقیم خورشید نگهداری‌کنید. این محلول برای مصرف چند هفته مناسب است. ولی لازم است تا چند هفته به‌طور منظم کنترل‌شود تا مطمئن شوید کپک روی آن رشد نکرده‌است. محلول را تکان‌دهید و در صورت کدرشدن آن را دوربریزید.

۲.تهیهٔ یک محلول غلیظ استوک

این محلول برای مسافرت‌های صحرایی یا ارسال به مناطق دور مناسب است.

۲-۱. ۳ گرم Na_2HPO_4 خشک و ۲/۱ گرم KH_2Po_4 را در ۲۵ میلی‌گرم آب‌مقطر یا آب غیریونیزه حل‌کنید.

۲-۲. pH را طبق روش ۱-۳ تا ۷/۲ تنظیم‌کنید.

۲-۳. محلول تهیه‌شده را در یک بطری شیشه‌ای تیره و دور از نور مستقیم خورشید نگهداری‌کنید. این محلول تا چند هفته برای مصرف مناسب است.

۲-۴. برای تهیهٔ محلول، هنگام کار یک میلی‌لیتر از محلول غلیظ تهیه‌شده را با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر یا غیریونیزه رقیق‌کنید.

۳. تهیهٔ بسته‌های از پیش توزین‌شده

می‌توانید دو نمک فسفات را از قبل توزین کنید و سپس داخل یک لوله یا کیسهٔ پلاستیکی قراردهید که در آن محکم بسته شده‌است. روی آن برچسب بزنید و آن را داخل یک شیشهٔ درپیچ‌دار نگهداری کنید. وقتی محتویات بسته به یک لیتر آب اضافه شود، pH آن را تا ۷/۲ برسانید و به روش معمول استفاده‌کنید.



تهیهٔ محلول استوک رنگ گیمسا

۱. مقدمه

در رنگ‌آمیزی معمول لام‌های خون به‌منظور تشخیص انگل مالاریا، گیمسا رنگ استاندارد و مطمئنی است. به‌هر حال، کیفیت این رنگ چه به‌صورت محلول آماده و چه به‌صورت پودر به منبع تهیهٔ آن بستگی دارد. ازاین رو، توصیه‌می‌شود که محلول گیمسا از یک سازندهٔ مطمئن فراهم‌شود. حتی لازم است قبل از رنگ‌آمیزی معمولی تعداد زیادی از لام‌ها، کیفیت هر بستهٔ رنگی را بررسی و آزمایش‌کنید و سپس رنگ ساخته‌شود.

۱-۱. فرمول رنگ

پودرگیمسا ۳/۸ گرم

متانول ۲۵۰ میلی‌لیتر

گلیسرول ۲۵۰ میلی‌لیتر

۱-۲. تهیه و ساخت

ترجیحاً یک بطری شیشه‌ای تیره و درصورت دسترسی نداشتن، یک بطری پلی‌اتیلن یا یک بطری شیشه‌ای شفاف، تمیز، خشک و عاری از مواد شیمیایی و در اندازهٔ مناسب تهیه‌کنید. علاوه بر آن لازم است حدود ۵۰ مهرهٔ شیشه‌ای با قطر حدود ۵ میلی‌متر تهیه نمایید.

الف) مهره‌های شیشه‌ای را داخل بطری قراردهید و مقداری متانول معین و اندازه‌گیری‌شده روی آن بریزید. سپس پودر گیمسا را به آن اضافه‌کنید.

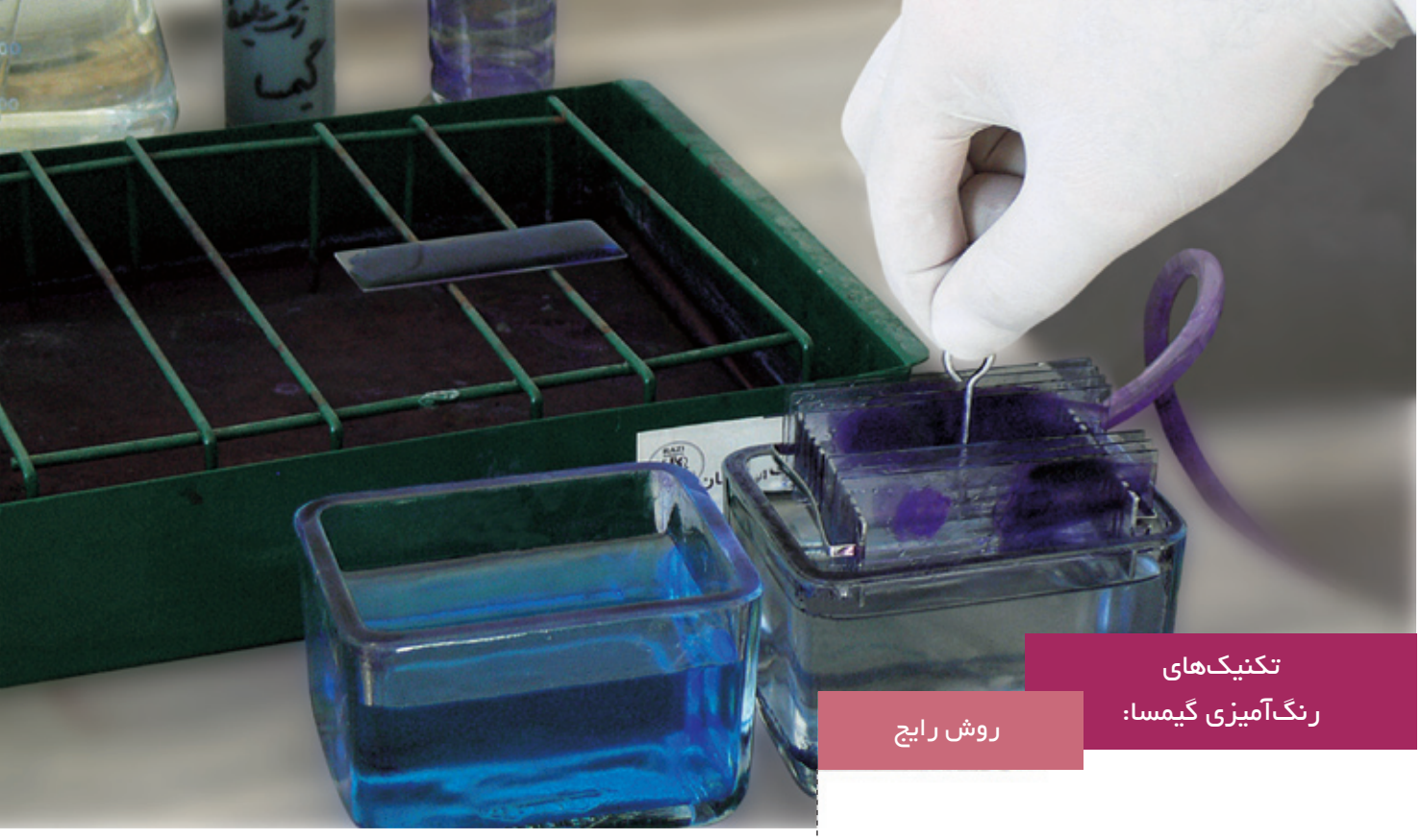
ب) در بطری را محکم ببندید و اجازه‌دهید پودر گیمسا به‌آرامی در متانول وارد و در کف بطری ته‌نشین شود. با حرکت چرخشی بطری را ۲ تا ۳ دقیقه تکان‌دهید.

ج) به این مخلوط مقداری گلیسرول اندازه‌گیری‌شده اضافه‌کنید و شیشه را دوباره تکان‌دهید. هر نیم ساعت به مدت ۲ تا ۳ دقیقه حداقل شش‌بار شیشه را تکان‌دهید.

د) بطری را ۲ تا ۳ روز در یک محل مناسب قراردهید. هر روز ۳ تا ۴ مرتبه آن را تکان‌دهید تا رنگ کامل مخلوط‌شود. بهتر است برای مصرف روزانه مقدار کمی از این محلول را در ظرف کوچک دیگری بریزید و از آن استفاده‌کنید تا محلول استوک از آلودگی محافظت شود.

هر سری محلول استوک تهیه‌شدهٔ جدید باید برچسب مناسب داشته‌باشد و زمان تهیهٔ محلول روی آن نوشته‌شود. همین‌طور زمان رنگ‌آمیزی و قدرت آن باید آزمایش‌شود.

ظرف استوک همیشه باید در جای خنک و دور از نور مستقیم خورشید در بطری‌هایی نگهداری شود که در آن محکم بسته شده‌است. در صورتی که بطری استوک شیشه‌ای شفاف باشد، بهتر است آن را با یک کاغذ تیرهٔ ضخیم بپوشانید تا از نور محافظت شود.



تکنیک‌های رنگ‌آمیزی گیمسا:

روش رایج

گسترش‌های ضخیم و نازک روی یک لام

برای رنگ‌آمیزی بهتر گسترش‌های ضخیم و نازک باید روی لام‌های مجزا تهیه‌شوند و غلظت متفاوت با زمان‌های مختلف برای رنگ‌آمیزی آن استفاده‌شود. البته غالباً این کار امکان‌پذیر نیست و معمولاً گسترش‌های ضخیم و نازک روی یک لام تهیه‌می‌شوند. در این‌صورت، رنگ‌آمیزی گسترش ضخیم با کیفیت خوب از اهمیت بیشتری برخوردار است. بهترین نتیجه هنگامی حاصل می‌شوند که گسترش‌های خون طی یک شب خشک‌شوند.

روش رنگ‌آمیزی ۲۰ لام یا بیشتر

۱. گسترش‌های نازک را به‌آرامی با یک پارچهٔ نازک کتانی آغشته با متانول مرطوب نموده یا به‌وسیلهٔ فروکردن آن برای چند ثانیه در یک ظرف متانول تثبیت کنید. تأخیر زمان تثبیت ممکن‌است نمایان‌شدن دانه‌های شوفنر(Schuffner's dots) و مارر(Maurer's spots) را دشوارسازد. به‌منظور ایجاد دهموگلوبینه‌شدن گسترش ضخیم نباید آن را تثبیت‌کرد؛ بنابراین، باید از تماس متانول یا بخار متانول با گسترش ضخیم خودداری نمود.

۲. لام‌ها را پشت‌سر هم در یک ظرف رنگ‌آمیزی قراردهید.

۳. یک محلول گیمسا ۳٪ در آب‌مقطر یا غیریونیزه با pH ۷/۲ به مقدار کافی برای چند ظرف مورد استفاده تهیه‌کنید. رنگ را به‌خوبی مخلوط کنید.

۴. رنگ را به‌آرامی داخل ظرف بریزید تا لام‌ها را کامل بپوشاند.

۵. اجازه دهید تا رنگ برای ۳۰ تا ۴۵ دقیقه دور از نور خورشید بماند.

۶. آب‌تمیز را به‌آرامی داخل ظرف بریزید تا کف‌های رنگین‌کمانی روی سطح رنگ شناور شود و همهٔ ظرف را داخل یک ظرف پر از آب تمیز قراردهید.

۷. به‌آرامی رنگ‌های باقی‌مانده در ظرف رنگ‌آمیزی را خالی و مجدد آبکشی نمایید و پس از چند ثانیه آب ظرف را خالی کنید.

۸. لام‌ها را یکی یکی بردارید و آنها را در یک ریل لام بگذارید تا آبگیری و خشک شوند. لام‌ها را به پایین متمایل کنید و مطمئن شوید که گسترش با ریل تماس پیدانکند.

توجه: ارزیابی یک گسترش ضخیم رنگ‌آمیزی‌شده با کیفیت مطلوب

الف) زمینهٔ لام باید تمیز و عاری از ذرات باشد و از لکه‌های خاکستری پررنگ ناشی از گلبول قرمز لیزشده پاک باشد.

ب) هسته‌های گلبول سفید به رنگ ارغوانی تیره باشد.

ج) انگل‌های مالاریا باید با کروماتین کاملاً قرمز و سیتوپلاسم آبی ارغوانی کم‌رنگ به‌خوبی مشخص باشند. در عفونت‌های پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم اوال دانه‌های شوفنر در زمینهٔ گلبول‌های قرمز «میزبان» به‌ویژه در لبه‌های لام مشاهده‌شود.



تکنیک‌های رنگ‌آمیزی گیمسا:

روش سریع

گسترش‌های ضخیم و نازک خون روی یک لام

این روش برای رنگ‌آمیزی سریع گسترش‌های ضخیم در یک آزمایشگاه شلوغ و پرکار مناسب است؛ به‌ویژه موقعی که نتایج به‌سرعت نیاز باشد. اما در این روش رنگ بسیار زیادی مصرف می‌شود.

روش رنگ‌آمیزی لام‌های منفرد

۱. اجازه‌دهید لام‌های گسترش ضخیم کاملاً خشک شوند، ولی درصورتی که دستیابی سریع به نتایج ضروری باشد، می‌توان گسترش‌های ضخیم را به کمک بادزن یا قراردادن درمعرض گرمای ملایم(مثل گرمای لامپ میکروسکوپ یا هوای گرم سشوار) خشک‌کرد. البته مراقب‌باشید تا از گرمادادن بیش از حد پرهیزشود، درغیر این صورت، گسترش ضخیم به‌وسیلهٔ گرما تثبیت خواهد شد.

۲. لام‌های گسترش نازک از طریق مربوط‌کردن آرام آنها به کمک مالش یک پارچهٔ کتانی مرطوب‌شده با متانول یا غوطه‌ورکردن لام در یک ظرف حاوی متانول برای چند ثانیه تثبیت می‌شوند. به‌منظور هموگلوبینه شدن گسترش ضخیم نباید آن را تثبیت کرد، بنابراین باید از تماس متانول یا بخار آن با گسترش ضخیم خودداری نمود.

۳. یک محلول گیمسای ۱۰٪ را در بافری از آب مقطر یا غیریونیزه با pH ۷/۲ تهیه‌کنید. اگر مقدار کمی از آن محلول نیاز باشد، ۳ قطره از رنگ را به هر میلی‌لیتر آب بافر اضافه‌کنید تا غلظت مناسب محلول گیمسا به‌دست‌آید. هر لام حدود ۳ میلی‌لیتر از محلول رنگی تهیه‌شده را نیازدارد(۹ قطره گیمسا در ۳ میلی‌لیتر آب).

۴. به‌آرامی رنگ را روی لام بریزید. برای این کار می‌توان از یک پیپت استفاده‌کرد، یا می‌توان لام‌ها را رو به پایین در یک صفحهٔ مقعر رنگ‌آمیزی قرار داد و در زیر لام رنگ ریخت.

۵. رنگ تا ۱۰ دقیقه روی لام باقی بماند.

۶. با افزودن قطره‌های آب تمیز، رنگ را به‌آرامی از روی لام بشویید. در هنگام شستن لام، هیچ‌گاه لام رنگ‌شده را کج‌نکنید؛ زیرا باعث چسبیدن مقداری از بقایای رنگ روی نمونه می‌شود.

۷. به‌منظور چکیدن آب و خشک‌کردن لام‌ها، آنها را روی یک ریل و به سمت پایین قراردهید تا آب آن چکیده و خشک‌شوند. دقت‌کنید تا گسترش‌ها با ریل تماس نداشته‌باشند.

توجه: ارزیابی یک گسترش نازک رنگ‌آمیزی‌شده با کیفیت مطلوب

الف) زمینهٔ لام باید تمیز و عاری از هر گونه بقایای مواد باشد. رنگ گلبول‌های قرمز به رنگ صورتی مایل به خاکستری کم‌رنگ است.

ب) هسته‌های گلبول‌های سفید نوتروفیل به رنگ ارغوانی تیره و دانه‌ها(گرانول‌ها) به‌خوبی در آن مشخص هستند.

ج) کروماتین انگل‌های مالاریا به رنگ قرمز ارغوانی تیره و سیتوپلاسم آنها به رنگ آبی مایل به ارغوانی روشن است.

د) در گلبول‌های قرمز حاوی پلاسمودیوم ویواکس یا پلاسمودیوم اوال نقاطی به نام دانه‌های شوفنر و در گلبول‌های قرمز حاوی اشکال رینگ بزرگ پلاسمودیوم فالسیپاروم نقاطی به نام دانه‌های ماررِ به‌خوبی مشخص هستند.



روش شمارش انگل‌های مالاریا در لام‌های گسترش ضخیم خون

I. شمارش انگل‌ها در هر میکرولیتر خون

در اینجا یک روش عملی با دقت کافی ارائه می‌شود. این روش بر اساس شمارش تعداد انگل‌ها در هر میکرولیتر خون در یک گسترش ضخیم پایه‌گذاری شده‌است. این انگل‌ها در ارتباط با تعداد گلبول‌های سفید ازپیش تعیین‌شده شمارش می‌شوند.

به‌طور متوسط تعداد ۸۰۰۰ گلبول سفید در هر میکرولیتر به عنوان استاندارد درنظر گرفته شده‌است. با وجود تفاوت تعداد گلبول سفید بین اشخاص سالم و تغییر تعداد آنها در افراد بیمار این استاندارد امکان مقایسه را فراهم‌می‌کند. قبل از شروع شمارش مقدار ۰/۲۵ میکرولیتر خون(حدود ۱۰۰ فیلد میکروسکوپ با عدسی چشمی با بزرگ‌نمایی ۷ و عدسی شیئی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ با روغن ایمرسیون) را در گسترش ضخیم آزمایشی بررسی‌کنید تا گونه‌های انگل و مراحل انگلی موجود تعیین‌شود. سپس، روش مناسب شمارش انگل در لام‌های مثبت را براساس اصول زیر انجام‌دهید:

۱. دو شمارندهٔ مشابه برای شمارش جداگانهٔ تعداد انگل و گلبول‌های سفید نیاز است.

۲- الف) اگر پس از شمارش ۲۰۰ گلبول سفید، ۱۰ عدد یا بیشتر انگل وجود داشته‌باشد، نتایج در فرم ثبت مشخصات یادداشت می‌شود که بیان‌کنندهٔ تعداد انگل در هر ۲۰۰ گلبول سفید است.

۲- ب) اگر شمارندهٔ انگل پس از شمارش ۲۰۰ گلبول سفید، ۹ انگل یا تعداد کمتر را نشان‌دهد، شمارش گلبول سفید را تا ۵۰۰ عدد ادامه‌دهید. تعداد انگل‌های شمارش‌شده در هر ۵۰۰ گلبول را ثبت‌نمایید.

۳. می‌توان تعداد انگل‌های هر میکرولیتر خون را با فرمول سادهٔ زیر محاسبه‌کرد:

$$\text{تعداد انگل‌ها در هر میکرولیتر خون} = \frac{\text{تعداد انگل شمارش‌شده}}{\text{تعداد گلبول‌های سفید شمارش‌شده}} \times ۸۰۰۰$$

به‌عبارت دیگر، اگر ۲۰۰ گلبول سفید را شمرده‌اید، تعداد انگل‌ها را ضرب‌در ۴۰ و اگر ۵۰۰ گلبول سفید را شمرده‌اید، تعداد انگل‌ها را ضرب‌در ۱۶ کنید تا تعداد انگل‌ها در هرمیکرولیتر خون به‌دست آید.

۴. این روش برای شمارش تمام گونه‌های انگل و فرم‌های جنسی و غیرجنسی معمول است. البته گاهی گامتوسیت‌های پلاسمودیوم فالسیپاروم مجزا شمرده می‌شوند. در این صورت، باید جزء شمارش عمومی انگل نیز محسوب‌شود. به‌ندرت ممکن‌است گامتوسیت‌های پلاسمودیوم ویواکس یا پلاسمودیوم مالاریه از انگل‌های غیرجنسی، به‌طور مجزا شمارش‌شوند.

II. شمارش انگل‌ها به کمک سیستم جمع

سیستم جمع روشی ساده‌تر است که برای شمارش انگل‌ها در گسترش ضخیم خون به‌کار می‌رود. در این روش، انگل‌های شمارش‌شده را با یک تا چهار علامت(+) بر حسب تعداد انگل به شرح زیر نشان می‌دهیم:

\+ = ۱ـ۱۰ انگل در هر ۱۰۰ فیلد گسترش ضخیم

\+ + = ۱۱ـ۱۰۰ انگل در هر ۱۰۰ فیلد گسترش ضخیم

\+ + + = ۱ـ۱۰ انگل در یک فیلد گسترش ضخیم

\+ + + + = بیش از۱۰ انگل در یک فیلد گسترش ضخیم

این سیستم فقط زمانی استفاده‌می‌شود که روش مقبول‌تر شمارش تعداد انگل در هر میکرولیتر خون امکان‌پذیر نباشد.

طرز تهیهٔ گسترش‌های ضخیم و نازک خون روی لام



به‌منظور انجام کارهای میکروسکوپی معمول و رایج در تشخیص مالاریا، یک گسترش ضخیم و یک گسترش نازک روی یک لام تهیه‌می‌شوند، گسترش‌های نازک مانند برچسب به‌کار می‌رود، ولی اگر خوب تهیه شده‌باشند، برای تعیین گونه‌های انگل نیز کاربرد خواهنداشت. بهتر است به‌منظور بررسی انگل مالاریا از گسترش ضخیم استفاده‌شود.

وسایل و مواد لازم برای گسترش خون

- **لام‌های بسته‌بندی شدهٔ تمیز**
- **لانست‌های استریل**
  (از کاربرد سوزن‌های زیرجلدی یا لانست‌هایی که فقط با الکل استریل شده‌اند، خودداری شود)
- **متانول ۷۰٪**
- **پنبهٔ تمیز جاذب رطوبت**
- **پارچهٔ کتانی تمیز**
- **جعبهٔ لام با پوشش محافظ گسترش‌های خشک‌شدهٔ خون**
- **مداد نرم**
- **فرم ثبت یا بایگانی**
- **خودکار**

پس از ثبت اطلاعات بیمار در فرم پذیرش، گسترش‌های خون به روش زیر تهیه می‌شود:

۱. کف دست چپ بیمار را به طرف بالا نگه دارید و انگشت سوم را انتخاب‌کنید(برای نوزادان می‌توانید از انگشت شست پا استفاده کنید. هرگز نباید از انگشت شست دست نوزادان و بزرگسالان استفاده‌شود).

- نوک انگشت بیمار را با یک قطعه پنبهٔ آغشته به الکل تمیز کنید.
- پنبه را محکم روی انگشت بیمار بکشید تا جرم و چربی آن پاک شود.



۲. به‌وسیلهٔ لانست استریل و با یک حرکت سریع نوک انگشت را سوراخ‌کنید.

- با فشار ملایم و آرام به انگشت، اولین قطره خونی را که از آن خارج می‌شود، به کمک یک پنبهٔ خشک پاک‌کنید. مطمئن شوید رشته‌های پنبه روی انگشت باقی نماند تا با خون مخلوط شود.



۳. فوری عمل‌کنید و لام‌های تمیز را از لبه نگه‌دارید و مطابق روش زیر خون بگیرید:

- با فشار دادن ملایم انگشت، یک قطرهٔ کوچک و منفرد از خون به اندازهٔ ● در وسط قراردهید. این قطره برای گسترش نازک به‌کار می‌رود.
- فشار بیشتری به انگشت واردکنید تا خون بیشتری خارج شود. سپس ۲ تا ۳ قطرهٔ بزرگتر به اندازهٔ ● در فاصلهٔ یک سانتی‌متری از قطرهٔ خون منفرد روی لام قراردهید.
- بقایای خونی را که از انگشت خارج‌می‌شود، با یک تکه پنبه پاک‌کنید.



۴. **گسترش نازک**. از یک لام تمیز دیگر به‌عنوان پخش‌کننده استفاده‌کنید. لام حاوی خون را روی یک سطح صاف و سخت قراردهید. «پخش‌کننده» را با قطرهٔ کوچک خون تماس‌دهید تا خون در طول لبهٔ لایه پخش‌شود. سپس لام پخش‌کننده را با زاویهٔ ۴۵° نگه‌دارید و محکم به سطح لام بکشید(از سمت مخالف قطرات مخصوص گسترش ضخیم) تا خون در سطح لام پخش‌شود. مراقب باشید در حین تهیهٔ گسترش لبهٔ پخش‌کننده با سطح لام در تماس دائم باشد.



۵. **گسترش ضخیم**. همیشه لام را به‌وسیلهٔ لبه‌های آن یا یک گوشهٔ آن بردارید و بگذارید تا گسترش ضخیم مطابق روش زیر تهیه‌شود:

- با گوشهٔ لام پخش‌کننده به‌سرعت قطره‌های خون را به‌هم متصل و سپس آنها را پخش‌کنید تا گسترش ضخیم یکنواختی به‌دست‌آید. خون نباید با شدت و زیاد هم‌زده شود، بلکه با ۳ تا ۶ حرکت می‌تواند به شکل دایره یا مستطیل گسترش یابد.





۶. در عرض قسمت ضخیم‌تر گسترش نازک خشک، نام یا شمارهٔ بیمار و تاریخ تهیهٔ لام را با مداد نرم بنویسید. روی گسترش با خودکار ننویسید. لام را روی یک سطح صاف و دور از گرد و غبار، حشرات و گرمای شدید بگذارید تا خشک‌شود.

۷. این گسترش را در فرم پذیرش و ثبت بیمار پیچیده و در اولین فرصت به آزمایشگاه منتقل‌کنید.

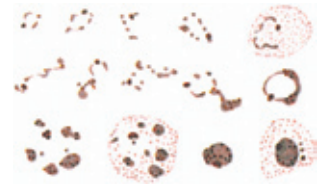
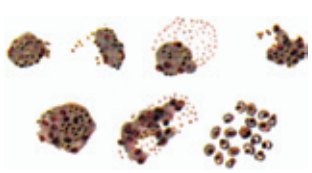
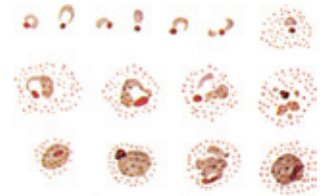
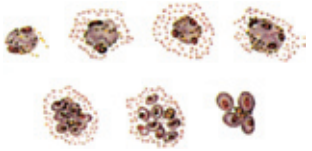
۸ . اکنون لام استفاده‌شده برای پخش‌کردن خون را می‌توان برای بیمار بعدی استفاده‌کرد و یک لام تمیز دیگر به‌عنوان پخش‌کننده استفاده خواهدشد.





نمونه‌ای از یک گسترش ضخیم و نازک که به‌طور صحیح تهیه شده‌است.

مراحل انگل در خون محیطی

گونه‌ها		تروفوزوئیت	شیزونت	گامتوسیت
پلاسمودیوم فالسیپاروم	به‌طور معمول تروفوزوئیت‌های در حال رشد جوان یا گامتوسیت‌های بالغ دیده‌می‌شوند.	 **اندازه:** کوچک تا متوسط **تعداد:** اغلب فراوان **شکل:** عموماً حلقوی کامل و کاماشکل **کروماتین:** اغلب دونقطه‌ای **سیتوپلاسم:** منظم، ظریف تا گوشتی **شکل‌های بالغ:** گاهی در مالاریای شدید وجوددارد، فشرده با رنگدانه به‌صورت یک توده یا چند دانهٔ پراکنده	 به‌طور معمول با تعدادی شکل‌های حلقوی جوان مرتبط است. **اندازه:** کوچک و فشرده **تعداد:** کم و ناشایع، به‌طور معمول در مالاریای شدید **شکل‌های بالغ:** ۱۲ تا ۳۰ مروزوئیت یا بیشتر به‌صورت خوشهٔ فشرده **رنگدانه:** تودهٔ تیرهٔ منفرد	 **شکل‌های نابالغ:** به شکل انتهای نوک‌تیز شایع نیست. **شکل‌های بالغ:** موزی‌شکل یا گرد **کروماتین:** منفرد و کاملاً واضح **رنگدانه:** پراکنده، درشت، شبیه دانهٔ برنج در برخی موارد زائدهٔ برجستهٔ صورتی‌رنگ وجود دارد. اغلب شکل‌های ساییده‌شده فقط با کروماتین و رنگدانه دیده‌می‌شوند.
پلاسمودیوم ویواکس	همهٔ مراحل دیده‌می‌شود؛ دانه‌های شوفنر در زمینهٔ گلبول‌های قرمز بزرگ‌شده و لبهٔ گسترش دیده‌می‌شود.	 **اندازه:** کوچک تا بزرگ **تعداد:** کم تا متوسط **شکل:** عموماً حلقوی شکسته تا شکل‌های نامنظم معمول است **کروماتین:** یک و گاهی دوتا **سیتوپلاسم:** نامنظم یا قطعه‌قطعه **شکل‌های بالغ:** فشرده و متراکم **رنگدانه:** پراکنده و ظریف	 **اندازه:** بزرگ تعداد: کم تا متوسط **شکل‌های بالغ:** ۱۲ تا ۲۴ مروزوئیت و به‌طور معمول ۱۶ عدد در خوشهٔ نامنظم **رنگدانه:** تودهٔ غیرمتراکم	 **شکل‌های نابالغ:** تشخیص تروفوزوئیت‌های بالغ از نابالغ دشوار است. **شکل‌های بالغ:** گرد و بزرگ **کروماتین:** منفرد و کاملاً واضح **رنگدانه:** پراکنده، ظریف و شکل‌های فرسوده با سیتوپلاسم کم یا بدون سیتوپلاسم و فقط کروماتین و رنگدانه وجوددارد.
پلاسمودیوم ۱وال	همهٔ مراحل دیده‌می‌شوند؛ دانه‌های شوفنر به‌طور مشهود و مشخص در گلبول‌های قرمز به‌ویژه در لبهٔ گسترش دیده‌می‌شود.	 **اندازه:** ممکن‌است از پلاسمودیوم ویواکس کوچک‌تر باشد. **تعداد:** به‌طور معمول کم **شکل:** حلقوی تا گرد و فشرده **کروماتین:** منفرد و برجسته **سیتوپلاسم:** نسبتاً واضح، منظم و گوشتی **رنگدانه:** پراکنده و ضخیم	 **اندازه:** بیشتر شبیه پلاسمودیوم مالاریه **تعداد:** کم **شکل‌های بالغ:** ۴ تا ۱۲ مروزوئیت و به‌طور معمول ۸ عدد در خوشهٔ غیرمتراکم **رنگدانه:** تودهٔ متمرکز	 **شکل‌های نابالغ:** تشخیص تروفوزوئیت‌های بالغ از نابالغ دشوار است. **شکل‌های بالغ:** گرد و ممکن‌است از پلاسمودیوم ویواکس کوچک‌تر باشد. **کروماتین:** منفرد و کاملاً واضح **رنگدانه:** پراکنده، ضخیم و شکل‌های فرسوده فقط با کروماتین و رنگدانه وجوددارد.
پلاسمودیوم مالاریه	همهٔ مراحل دیده‌می‌شود.	 **اندازه:** کوچک تعداد: به‌طور معمول کم **شکل:** حلقوی تا گرد و فشرده **کروماتین:** منفرد و بزرگ **سیتوپلاسم:** منظم و متراکم **رنگدانه:** پراکنده، فراوان، و در شکل‌های قدیمی‌تر زرد کم‌رنگ	 **اندازه:** کوچک و فشرده **تعداد:** به‌طور معمول کم **شکل‌های بالغ:** ۶ تا ۱۲ مروزوئیت و به‌طور معمول ۸ عدد شکل خوشه‌های غیرمتراکم و برخی ظاهراً بدون سیتوپلاسم **رنگدانه:** متمرکز	 تشخیص شکل‌های نابالغ و برخی شکل‌های واقعاً بالغ از تروفوزوئیت‌ها دشوار است. **شکل‌های بالغ:** گرد و فشرده **کروماتین:** منفرد و کاملاً واضح **رنگدانه:** پراکنده، ضخیم و ممکن‌است محیطی پراکنده شده‌باشد **شکل‌های فرسوده:** فقط با کروماتین و رنگدانه وجوددارد.

تصویر شمارهٔ ۱
شناسایی گونه‌های انگل مالاریا در گسترش‌های ضخیم خون رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا

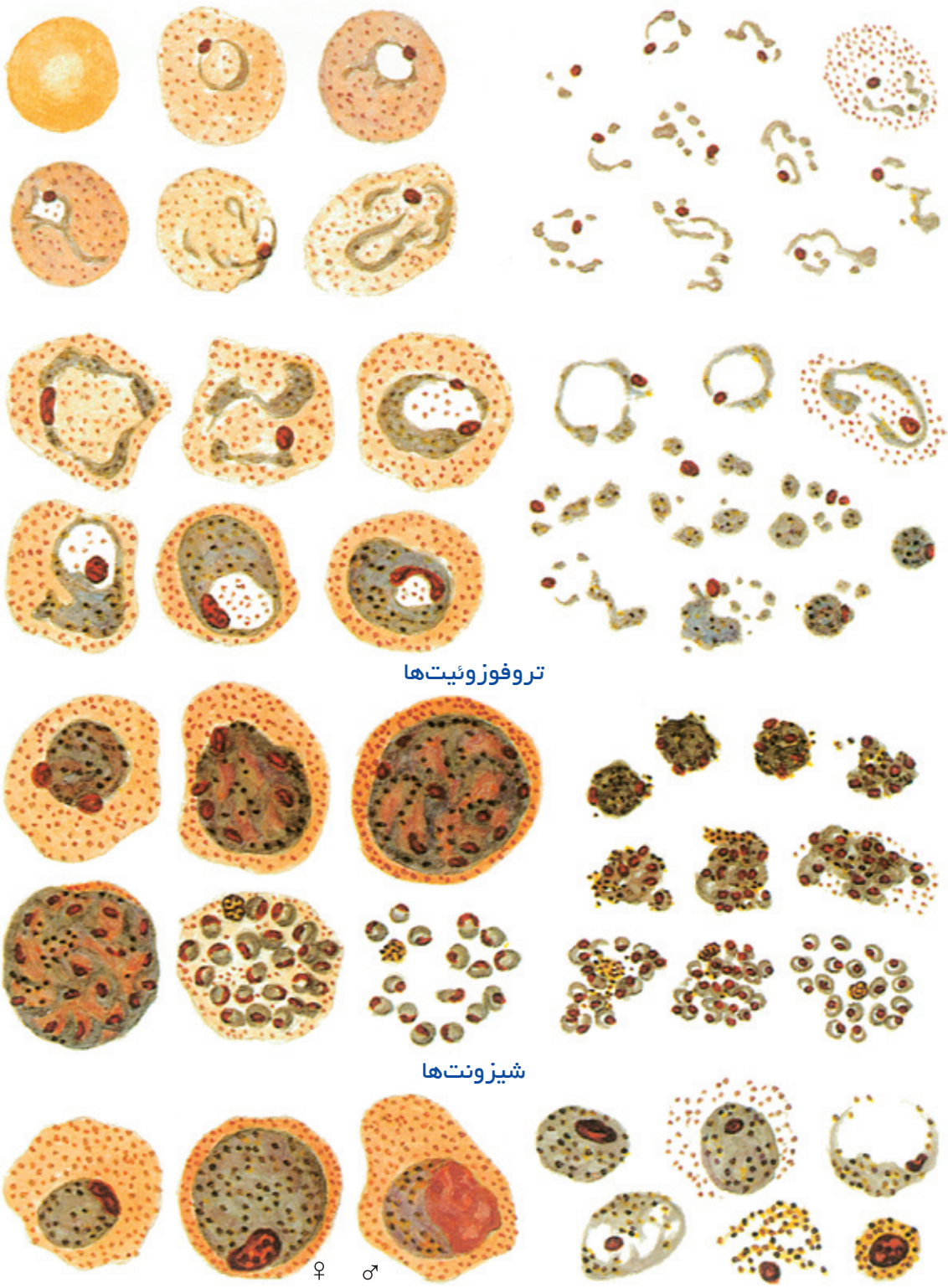


گسترش ضخیم

گسترش نازک

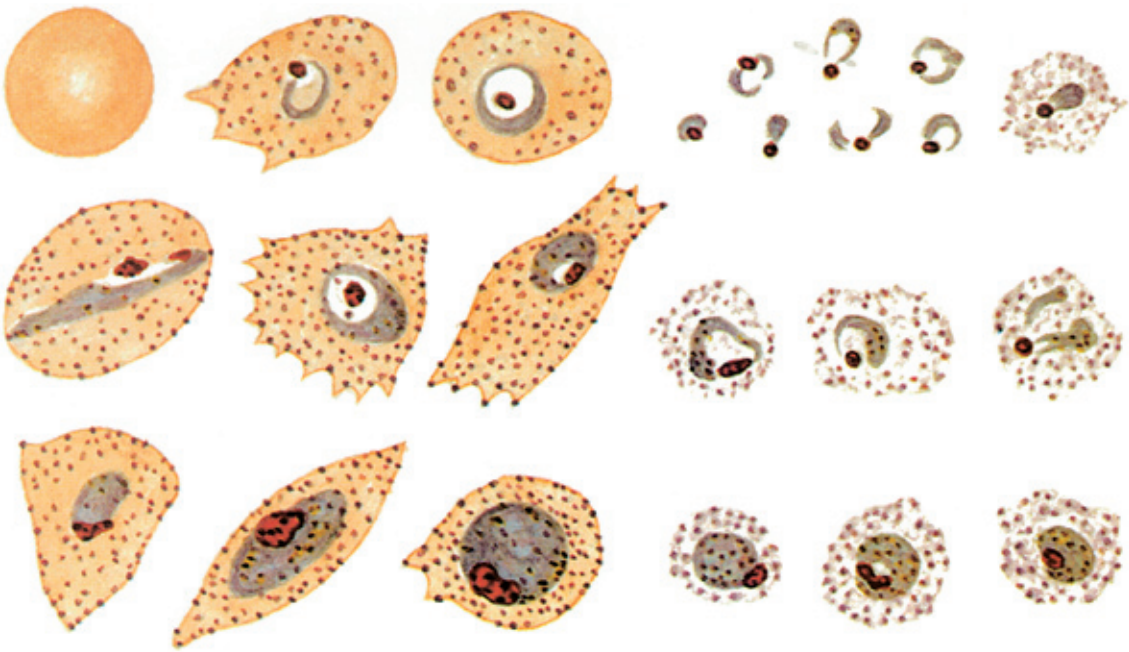
پلاسمودیوم فالسیپاروم

تصویر شمارهٔ ۲
نمای ظاهری مراحل مختلف در
گسترش‌های ضخیم و نازک خون رنگ‌آمیزی شده با گیمسا

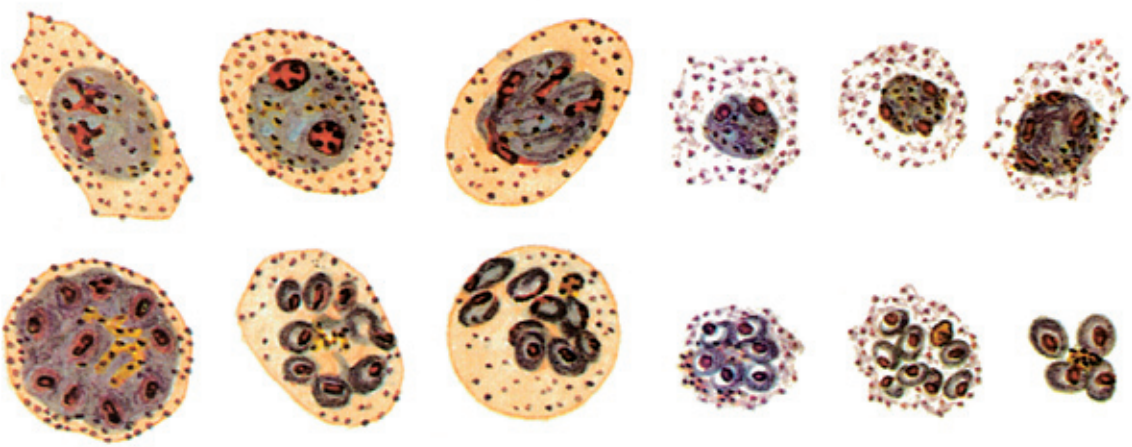


پلاسمودیوم ویواکس

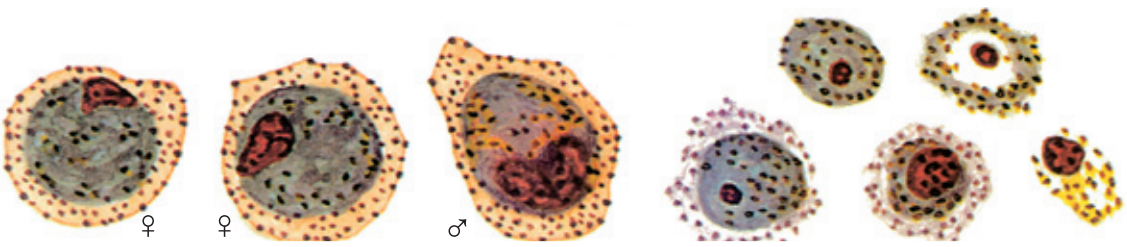
تصویر شمارهٔ ۳
نمای ظاهری مراحل مختلف در
گسترش‌های ضخیم و نازک خون رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا



تروفوزوئیت‌ها



شیزونت‌ها



گامتوسیت‌ها

گسترش ضخیم

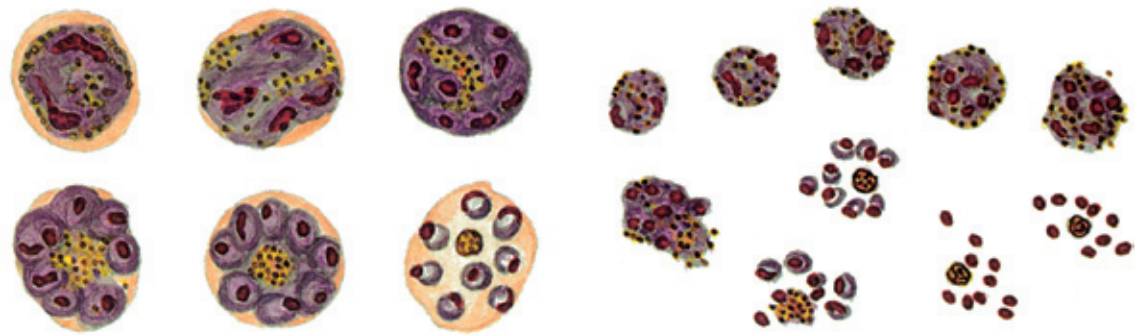
گسترش نازک

پلاسمودیوم اوال

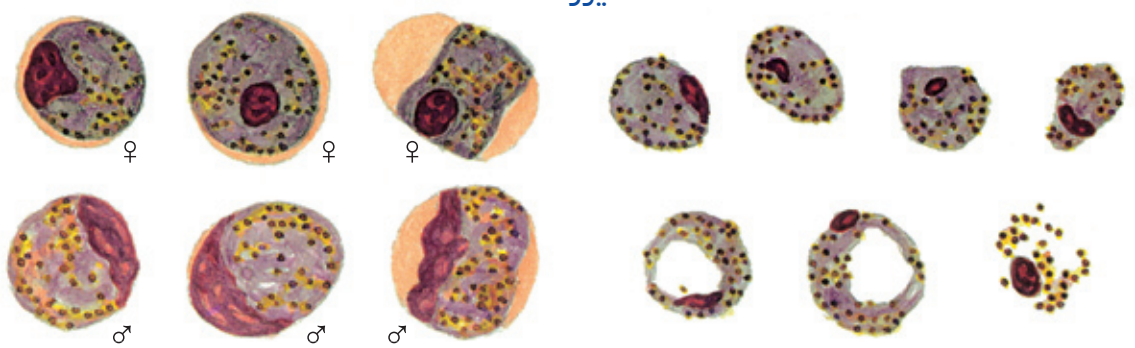
تصویر شمارهٔ ۴
نمای ظاهری مراحل مختلف در
گسترش‌های ضخیم و نازک خون رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا



تروفوزوئیت‌ها



شیزونت‌ها



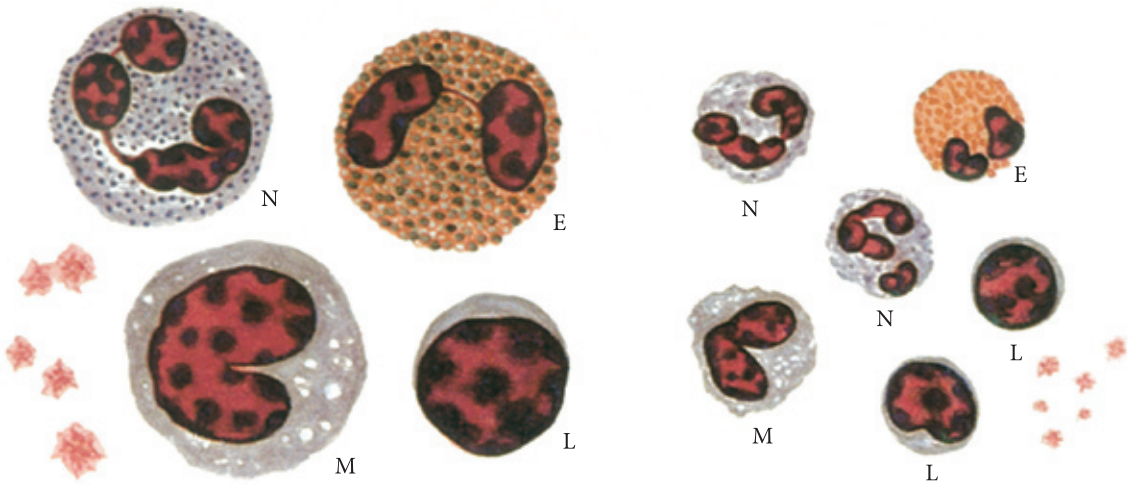
گامتوسیت‌ها

گسترش نازک

گسترش ضخیم

پلاسمودیوم مالاریه

تصویر شمارهٔ ۵
نمای ظاهری مراحل مختلف در
گسترش‌های ضخیم و نازک خون رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا



گلبول‌های سفید

گسترش نازک　　گسترش ضخیم

P = پلاکت　　L = لنفوسیت　　M = مونوسیت　　E = ائوزینوفیل　　N = نوتروفیل



گلبول‌های قرمز

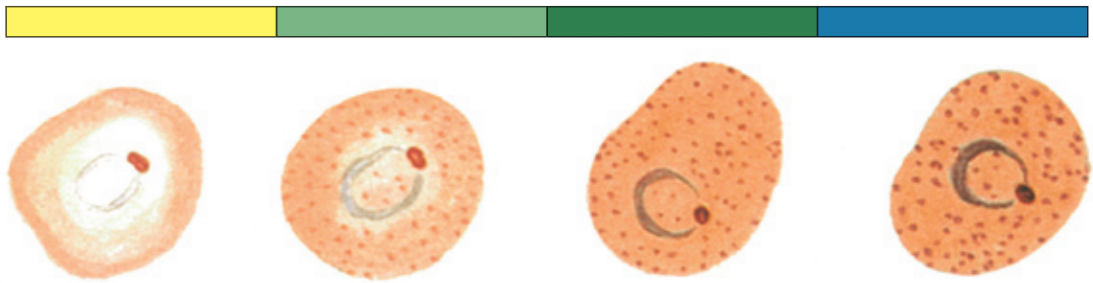
گسترش نازک　　گسترش ضخیم

PB = بازوفیلیای نقطه‌ای　　PC = پویکیلوسیت　　PM = ماکروسیت پلی‌کروماتیک　　MC = میکروسیت

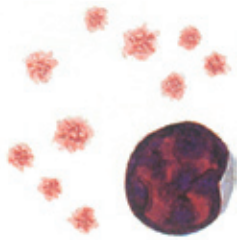
NC = نورموسیت(گلبول قرمز طبیعی)　　RC = ابرهای شبکه‌ای و اجسام کروماتوئید در کم‌خونی شدید

HJ = اجسام هاول جولی　　CR = رینگ کابوت

تصویر شمارهٔ ۶
اشکال عناصر سلولی در گسترش‌های ضخیم و
نازک خون رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا

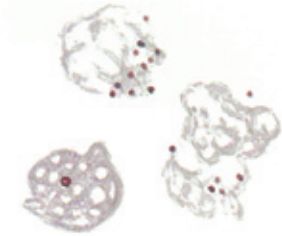


تصویر شمارهٔ ۷
تأثیر pH روی انگل‌های مالاریا در رنگ‌آمیزی گیمسا

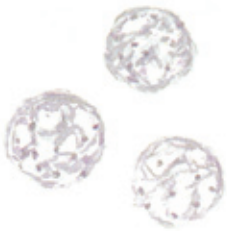


پلاکت‌های خون لنفوسیت
برای مقایسهٔ اندازهٔ آن
با پلاکت





گروه‌های مجزا از
گرانول‌های ائوزینوفیل



توده‌ها و زواید کروماتوئید
حاصل از گلبول‌های قرمز نابالغ
در کم‌خونی شدید

عناصر خونی





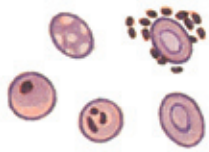




باکتری‌ها









هاگ‌ها



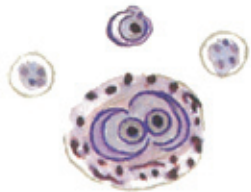






ریسه و اسپورهای قارچ

سلول‌های گیاهی









حفره‌های کریستالین
در لام بلوری

خراش‌های دنده‌ای‌شکل در
لام‌های شیشه‌ای

کریستال‌های
رنگ‌آمیزی گیمسا

ذرات گرد و خاک

منابع مختلف

تصویر شمارهٔ ۸
عناصر اشتباه‌برانگیز در تشخیص انگل


CHB
OLYMPUS
CH
اتانول ۷۰ درجه
ETHANOL
SLIDES



نکته‌های مهم در راستای تشخیص، درمان و پیگیری مالاریا

الف) تشخیص

- آزمایش لام خون محیطی بهترین راه تشخیص آزمایشگاهی مالاریا است.
- یک لام خون منفی نمی‌تواند نشانهٔ مبتلانبودن به مالاریا باشد. توصیه‌می‌شود در مواردی که بیمار به ابتلا به مالاریا مشکوک است، ولی لام خون محیطی منفی است(به‌ویژه در گروه‌های پرخطر)، روزهای بعد نیز آزمایش لام خون محیطی تکرارشود.
- نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه حتماً باید در همان روز آزمایش‌شوند.
- آموزش مسئولان مراقب و بهورزان برای لام‌گیری از وظایف میکروسکوپیست است.
- کنترل مجدد ۱۰٪ تا ۳۰٪ لام‌های منفی، تمام لام‌های مثبت و تمام لام‌های تعقیب ضروری است.
- لازم است تمام لام‌های آزمایش‌شده(منفی و مثبت) در بیمارستان‌ها به مدت ۲۴ ساعت پس از تهیه توسط یک میکروسکوپیست دیگر دوباره کنترل‌شود.
- در مواجهه با موارد تب‌دار و بیماران با اختلال هوشیاری احتمال ابتلا به مالاریا را مدنظر داشته‌باشید.

گروه‌های پرخطر که نیازمند توجه بیشتر برای تشخیص هستند:

- اتباع افغانستان و پاکستان،
- بیماران با سابقهٔ ابتلا به مالاریا،
- افراد با سابقهٔ مسافرت به مناطق مالاریاخیز در **یک‌سال** گذشته،
- ساکنان مناطق مالاریاخیز.

ب) درمان

- درمان بیمار مبتلا به مالاریا باید در کمتر از ۲۴ ساعت پس از تشخیص شروع‌شود.
- درمان موارد مالاریا براساس راهنمای کشوری درمان مالاریا و تجویز برنامهٔ دارویی توصیه‌شده ضروری است.
- ثبت اطلاعات مربوط و تکمیل دقیق فرم درمان مالاریا ضروری است.

مالاریای شدید

- برای پرهیز از هرگونه اشتباه توصیه‌می‌شود هر بیمار مبتلا به مالاریا به‌ویژه مالاریای فالسیپاروم ترجیحاً توسط پزشک معاینه‌شود.
- وجود علائم مالاریای شدید را در هر بیمار مبتلا به مالاریا در هر مرحله از درمان یا در زمان تهیهٔ لام تعقیب بررسی‌کنید و موارد مشکوک به مالاریای شدید را سریع به پزشک ارجاع‌دهید.



نشانه‌های خطر در بیماری مالاریا(بالینی و آزمایشگاهی)

بالینی

- ناتوانی در خوردن، آشامیدن، نشستن و ایستادن؛
- استفراغ مکرر؛
- اختلال هوشیاری و گیجی؛
- تشنج؛
- اختلال تنفسی(افزایش تعداد تنفس)؛
- کلاپس عروقی و شوک؛
- هایپرپیرکسی؛
(حرارت رکتال بالاتر از ۴۰ یا زیربغل بیش از ۳۹/۵ درجهٔ سانتی‌گراد)؛
- ایکتر(زردی اسکلرا)؛
- رنگ‌پریدگی کف دست یا ناخن‌ها؛
- ادرار تیره‌رنگ؛
- خونریزی غیرعادی، پتشی، پورپورا و خونریزی لثه و بینی.

آزمایشگاهی

- پارازیتمی بیشتر از ۴ درصد در لام خون محیطی؛
- کاهش قندخون(کمتر از ۴۰ میلی‌گرم/ دسی‌لیتر یا ۲/۲ میلی‌مول/ لیتر)؛
- کم‌خونی شدید نورموسیتیک(هموگلوبین کمتر از ۵ گرم/ دسی‌لیتر و هماتوکریت کمتر از ۱۵ درصد)؛
- اسیدوز(بی‌کربنات کمتر از ۱۵ میلی‌مول/ لیتر)؛
- افزایش لاکتات خون(بیشتر از ۵ میلی‌مول/ لیتر)؛
- نارسایی کلیه(کراتینین بیشتر از ۳ میلی‌گرم/ دسی‌لیتر)؛
- هموگلوبینوری؛
- وجود شواهد رادیولوژیک از اِدِم‌ریوی.

ج) پیگیری

- به بیماران مبتلا به مالاریا توصیه‌کنید که در اسرع وقت به آزمایشگاه مراجعه‌نمایند.
- تمام بیماران مبتلا به مالاریای فالیسپاروم یا عفونت میکس برای اطمینان از بهبودی کامل پیگیری‌شوند و در روزهای سوم، هفتم، چهاردهم، بیست‌ویکم و بیست‌وهشتم از آنها لام خون محیطی تهیه‌شود.
- درصورت بروز تب در روزهای سوم تا بیست‌وهشتم درمان تهیهٔ لام خون محیطی در همان روز الزامی است.
- تهیهٔ لام خون محیطی در فاصلهٔ روزهای چهلم و شصتم شروع درمان توصیه‌می‌شود.
- توصیه‌می‌شود از تمام موارد ویواکس در فاصلهٔ روزهای چهاردهم تا بیست‌وهشتم پس از شروع درمان یک نوبت لام تعقیب تهیه‌شود.

مراقبت بررسی کانون

توصیه‌می‌شود درصورت کشف موارد مالاریا، برای کشف موارد احتمالی در منطقه مراقبت بررسی کانون برای تهیهٔ لام بررسی انجام‌شود.

دفعات زمانی بیماریابی مراقبت بررسی کانون:

- حداقل ۴ نوبت مراقبت بیماریابی فعال به فاصلهٔ یک هفته انجام‌شود.
- اولین نوبت بیماریابی باید در فاصلهٔ ۲۴ ساعت پس از کشف مورد مالاریا باشد.

محدودهٔ جغرافیایی مراقبت بررسی کانون:

- در روستاهای با جمعیت کمتر از ۵۰ خانوار، تمام روستا و در شهر و روستاهای دارای بالای ۵۰ خانوار، حداقل ۵۰ خانوار در مجاورت مالاریا مراقبت شوند.

در مراقبت بررسی کانون از چه افرادی لام بررسی تهیه‌شود؟

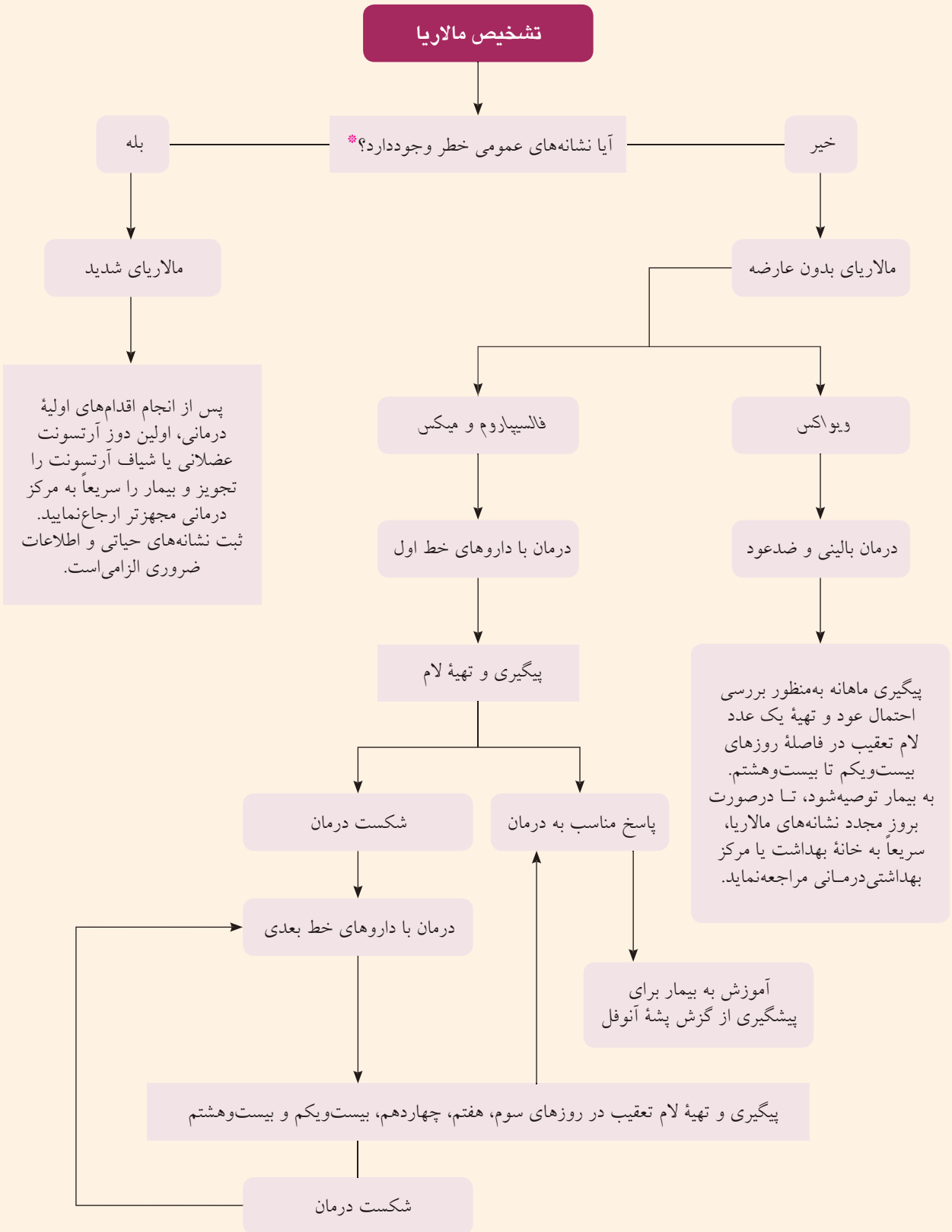
- از کسانی که احساس کسالت می‌کنند و علائم مالاریا دارند.
- از کسانی که در یک ماه گذشته بیمار بوده‌اند.
- از کسانی که سابقهٔ ابتلا به مالاریا دارند، حتی چنانچه درحال حاضر علائم ندارند.
- از اتباع افغانستان و پاکستان حتی اگر علائم ندارند.

مالاریای ویواکس

درصورت مواجهه با بیمار مبتلا به ویواکس که لام تعقیب آن مثبت بوده یا علائم بهبودی نداشته‌است:

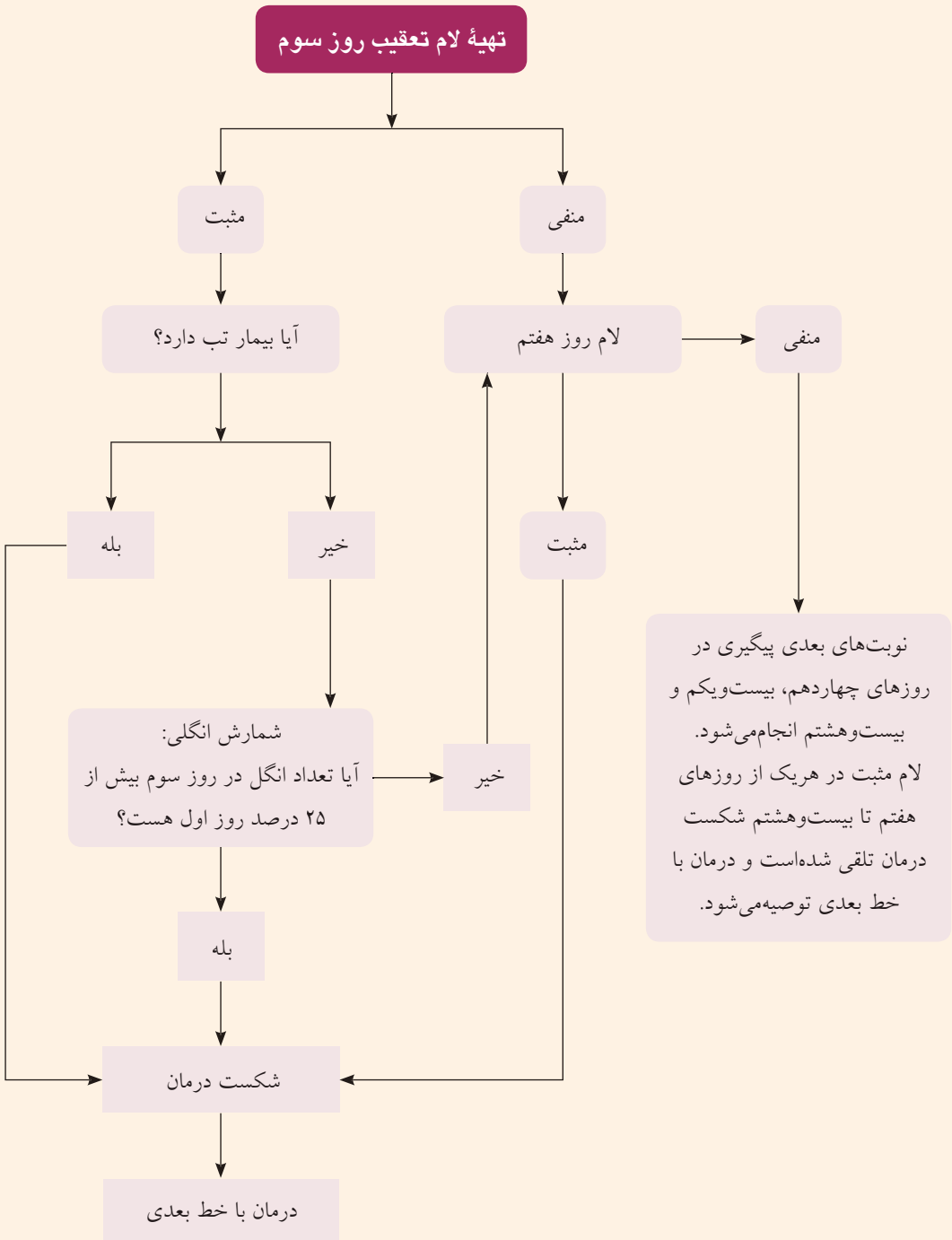
- امکان عفونت میکس را بررسی‌کنید.
- سریع مورد را برای پیگیری‌های بیشتر به واحد پیشگیری و کنترل مالاریای شهرستان و دانشگاه گزارش‌کنید.

دیاگرام درمان و پیگیری مبتلایان به مالاریا



* در هر نوبت درمان یا پیگیری، ضروری است بیمار ازنظر نشانه‌های عمومی خطر ارزیابی‌شود و درصورت مشاهدهٔ هر یک از نشانه‌های خطر، طبق توصیهٔ مذکور اقدام‌شود.

دیاگرام پیگیری بیمار مبتلا به مالاریای فالسیپاروم



منابع

1. WHO; *Bench aids for the diagnosis of malaria*; Malaysia; 1995.

۲. صائبی، اسماعیل و دیگران؛ راهنمای درمان مالاریا (در جمهوری اسلامی ایران)؛ صدا؛ چاپ دوم؛ تهران؛ ۱۳۸۵.