

نگاهی اجمالی بر روش‌های تشخیص آزمایشگاهی مالاریا

- حسین براری دلاور- کارشناس علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی اردبیل
- دکتر اکبر گنجی- دکترای حرفه‌ای پزشکی عمومی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی اردبیل
- شهریار سیگاری- کارشناس علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی اردبیل
- کاظم محمدحسینی - کارشناس مبارزه با بیماری‌های دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی اردبیل
- نرگس پارسا- کارشناس علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی اردبیل
- سودا نظاره حاجی خواجه‌لو - کارشناس علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی اردبیل

مقدمه

مالاریا مهم‌ترین عفونت انگلی انسان بوده و باعث مرگ‌ومیر زیاد در بسیاری از مناطق گرمسیری جهان می‌شود. عفونت مالاریا را بدلیل مشابه بودن علائم بالینی آن با سایر بیماری‌های عفونی گرمسیری نمی‌توان با معاینه بالینی تشخیص داد، بنابراین بایستی از طریق آزمایشگاهی آن را تشخیص داده و تأیید کرد. تشخیص مالاریا توسط میکروسکوپی معمولی روش استاندارد طلایی برای تشخیص مالاریا باقی مانده است و ارزان و قابل اعتماد می‌باشد. تست‌های تشخیصی سریع، گران‌قیمت بوده ولی سریع و راحت هستند. تست‌های سرولوژیکی برای تشخیص عفونت مالاریا بر اساس شناسایی آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه مراحل غیرجنسی خونی از انگل مالاریا استوار می‌باشند. روش سرولوژی بهترین روشی است که به‌عنوان یک ابزار اپیدمیولوژیک استفاده می‌شود و مناسب برای تشخیص مالاریای حاد نیست. تکنیک‌های مولکولی بهتر است در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی مناسب، گسترش مقاومت به دارو و عود را بررسی نمایند و می‌توانند برای شناسایی گونه‌ها در زمانی که تعداد انگل بسیار کم است و یا در برخی از نمونه‌ها که در معرض از بین رفتن قرار گرفته‌اند مفید باشند.

روش‌های تشخیص آزمایشگاهی مالاریا

1- مشاهده مستقیم میکروسکوپی نمونه خون

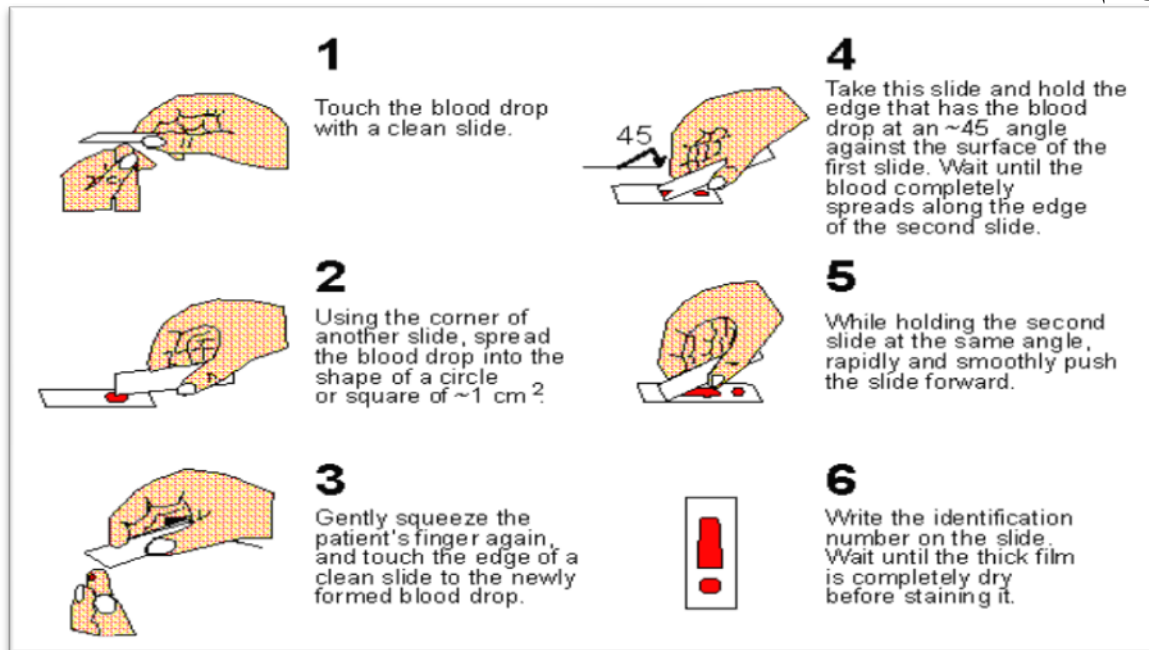
ساده‌ترین راه تشخیص انگل، مشاهده مستقیم میکروسکوپی نمونه خون برای دیدن انگل مالاریا بوده که هنوز استاندارد طلایی برای تشخیص مالاریا است. تشخیص میکروسکوپی مالاریا توسط رنگ‌آمیزی گسترش خون ضخیم و نازک روی اسلاید شیشه‌ای به دیدن انگل مالاریا منجر می‌شود.

روش نمونه‌گیری

1- تهیه اسمیر خونی مستقیم

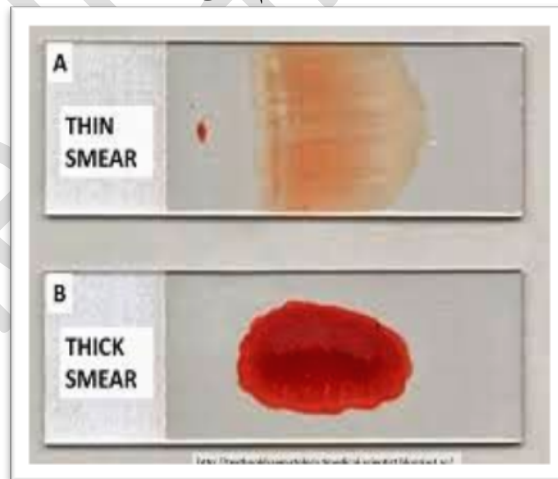
- انگشت بیمار با الکل تمیز، بعد خشک می‌شود.
- در سمت نوک انگشتان با یک لانت استریل نوکتیز و یا سوزن، دو قطره خون بر روی یک لام شیشه‌ای قرار داده می‌شود.
- برای تهیه یک اسمیر خونی ضخیم، یک قطره خون در یک حرکت دایره‌ای با گوشه‌ای از لام هم زده می‌شود. باید مراقب بود تا هنگام آماده‌سازی، نمونه بیش از حد ضخیم نباشد و نیز باید اجازه دهیم تا بدون افزودن مواد ثابت‌کننده، خشک گردد. از آنجاکه گلبول‌های قرمز فیکس نشده‌اند با استفاده از قطره آب لیز می‌شوند.

- برای تهیه اسمیر خونی نازک بلافاصله با لبه صاف از یک لام دیگر قطره خون را با زاویه 45 درجه بین لام و سطح قطره بهم می‌زنیم و سپس لکه خون را با حرکات رفت و برگشت سریع و یکنواخت در امتداد سطح لام تهیه می‌کنیم.



شکل 1- مراحل تهیه گسترش‌های خونی ضخیم و نازک از خون محیطی

- اسمیرها باید در مقابل هوا خشک شده و با متانول فیکس گردند. از آنجا که حجم زیادی از خون روی گسترش ضخیم قرار می‌گیرد، بنابراین گسترش ضخیم خیلی حساس‌تر از گسترش نازک است.



شکل 2- اسمیر خونی نازک (A) و ضخیم (B) از خون محیطی برای تشخیص مالاریا

2- تهیه اسمیر داخل جلدی

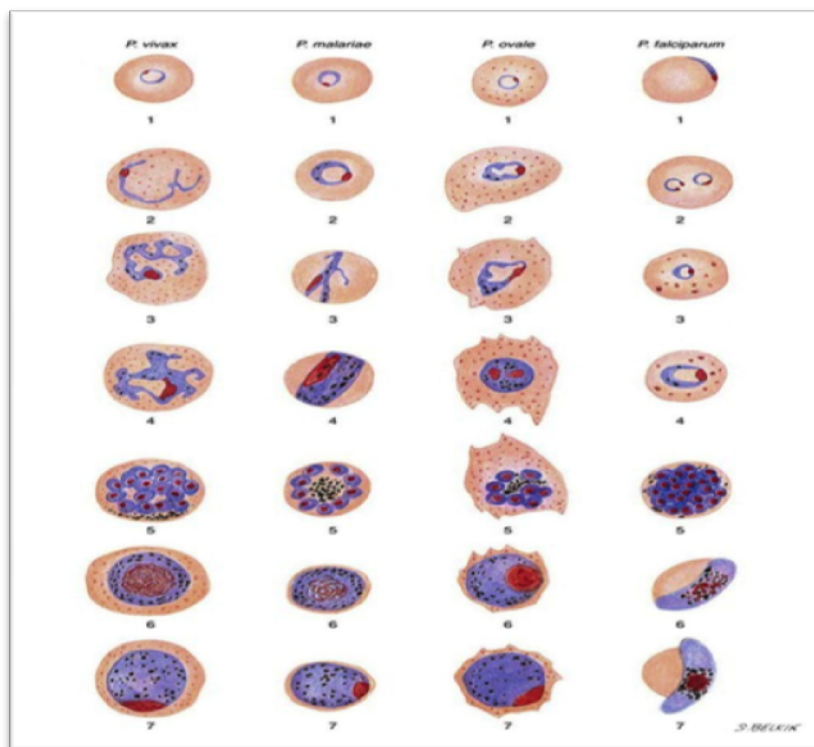
یکی دیگر از روش‌های تشخیص عفونت با مالاریا اسمیر داخل جلدی است که به وسیله سرسوزن اندازه 25 سوراخ‌های باریکی در روی ساعد دست ایجاد می‌کنند. نباید از سوراخ خون تراوش کند ولی خونابه سرمی تحت تأثیر فشار روی یک لام شیشه‌ای قرار داده شده و اجازه می‌دهند تا در معرض هوا خشک شده و سپس با متانول فیکس می‌نمایند. این اسمیر ممکن است لکوسیت‌های حاوی رنگدانه را نشان داده و نیز اشکال بالغ‌تری از پلاسمودیوم فالسیپاروم را مشخص می‌کند.

روش‌های رنگ‌آمیزی برای تشخیص مالاریا

- رنگ‌آمیزی گیمسا به مدت 20-30 دقیقه
- رنگ‌آمیزی لیشمن به مدت 45 دقیقه
- روش سریع صحرائی به مدت 10 ثانیه

نتایج و تفسیر مشاهدات میکروسکوپی

- با استفاده از میکروسکوپ‌های نوری تعداد باند‌های خونی، گونه‌ها و مراحل مرفولوژیکی از انگل گزارش شده است.
- گاهی اوقات انگل‌ها در گستره خون محیطی بیماران مبتلا به مالاریا یافت نمی‌شوند، اما رنگدانه مالاریا ممکن است در چرخه فاگوسیتوز در لکوسیت‌ها دیده شود، این یک نشانه شاخص از عفونت جدید مالاریا است و در مورد عفونتی که درمان کامل یا نسبی شده در غیاب انگل مشاهده می‌گردد.
- حضور رنگدانه در لکوسیت از نظر کمی و کیفی با بار انگل در ارتباط است و بنابراین نشان‌دهنده یک عفونت بالینی قابل‌توجه به‌ویژه در مناطقی است که انتقال بیماری کم است.
- زمانی که در اسمیر نازک از خون محیطی انگل وجود ندارد، ممکن است در آسپیراسیون مغز استخوان یافت شود.
- اسمیر خون علاوه بر تشخیص مالاریا می‌تواند به لحاظ پیش‌آگهی بیماری هم اطلاعات مفیدی را ارائه دهد؛ تعداد انگل، تعداد فاگوسیت‌های حاوی رنگدانه و وجود اواخر مرحله غیرجنسی انگل همگی با پیش‌آگهی مرگبار بیماری رابطه مستقیم دارند.



شکل 3- اشکال مختلف زیستی 4 گونه انگل مالاریا

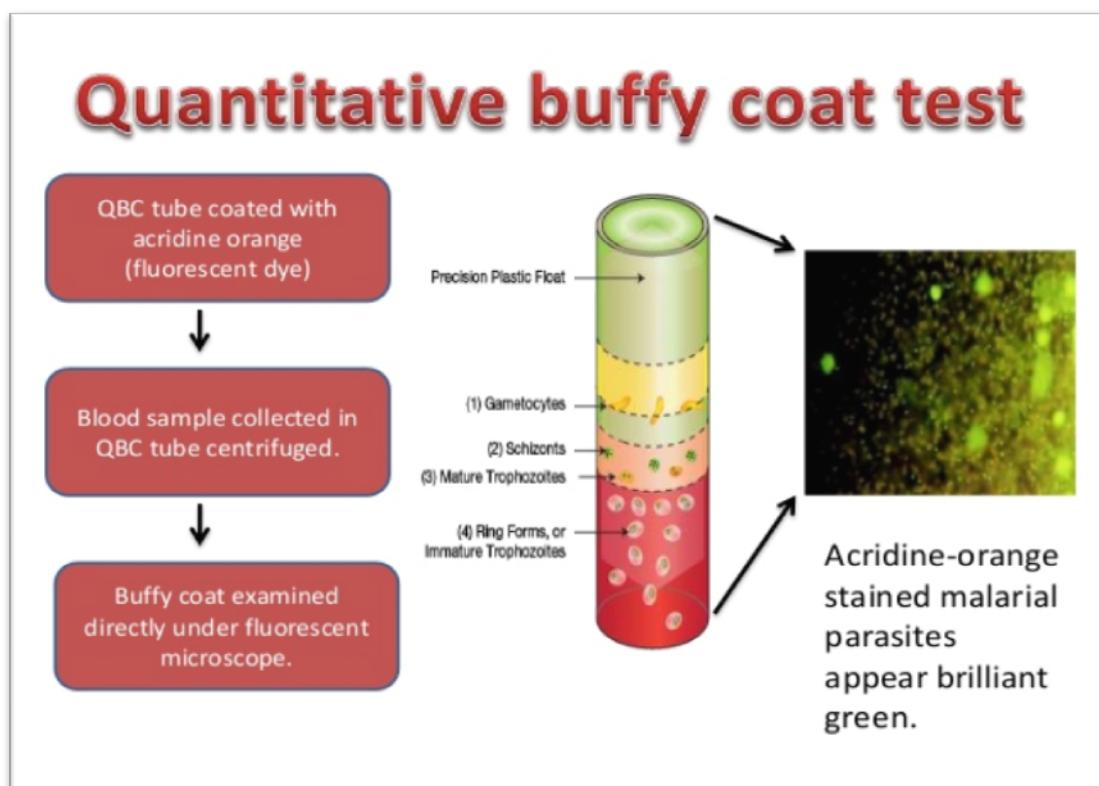
2- روش‌های مولکولی

- تکنیک‌های مولکولی بهتر است در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی مناسب، گسترش مقاومت به دارو و عود را بررسی نمایند و می‌توانند برای شناسایی گونه‌ها در زمانی که تعداد انگل بسیار کم است و یا در برخی از نمونه‌ها که در معرض از بین رفتن قرار گرفته‌اند، مفید باشند.
- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) اجازه می‌دهد تا قسمت خاصی از یک منطقه انتخاب‌شده از ژنوم مالاریا تکثیر یابد. این روش بسیار اختصاصی و حساس است و قادر به تعیین ژنوتایپ می‌باشد.
- علاوه بر این آنالیز، استفاده از PCR (SNP) تشخیص انگل‌هایی مقاوم به دارو و نیز عفونت‌های مخلوط را ممکن می‌سازد، با این حال PCR گران بوده و نیازمند یک آزمایشگاه پیشرفته همراه با کارکنان مجرب و دورمدیده است.

3- روش بافی‌کوت کمی (Quantitative buffy coat method)

این روش شامل رنگ‌آمیزی لایه سلول‌های قرمز سانتریفوژ شده و فشرده کردن با آکریدین نارنجی تحت یک منبع نور ماوراءبنفش می‌باشد که یک روش برای شناسایی انگل مالاریا در خون محیطی است و از لحاظ حساسیت شبیه به روش میکروسکوپی اسلاید خون ضخیم معمولی است و باید همراه با گسترش ضخیم خون برای غربالگری استفاده شود و طی مراحل زیر انجام می‌گردد:

- خون از طریق سوراخ کردن انگشت در یک لوله هماتوکریت حاوی آکریدین نارنجی و ضد انعقاد جمع‌آوری می‌گردد.
- لوله هماتوکریت را در دور 12000 در مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ می‌کنند.
- بلافاصله با استفاده از میکروسکوپ مجهز به یک منبع نور UV مورد بررسی قرار می‌دهند. هسته انگل به رنگ فلورسانس سبز روشن و سیتوپلاسم آن به رنگ زرد نارنجی مشاهده می‌شود.



شکل 4- روش بافی کوت نیمه کمی (QBC) برای تشخیص انگل‌های مالاریا

4- روش‌های سرولوژی

تست‌های سرولوژیکی برای تشخیص عفونت مالاریا بر اساس شناسایی آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه مراحل غیرجنسی خونی از انگل مالاریا استوار می‌باشند. روش سرولوژی بهترین روشی است که به‌عنوان یک ابزار اپیدمیولوژیک استفاده می‌شود و مناسب برای تشخیص مالاریای حاد نیست.

روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم (IFA)

- اولین آزمون سرولوژیکی مورد استفاده برای تشخیص آنتی‌بادی مالاریا می‌باشد.
- در این روش از آنتی‌ژن ویژه و یا آنتی‌ژن خام آماده متصل‌شده در روی یک اسلاید که در دمای 30- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگه داشته شده است، استفاده می‌شود و به روش کمی هر دو آنتی‌بادی IgM و IgG در نمونه‌های سرم بیمار را بررسی می‌کنند.
- تیترا بالاتر از 1:20 مثبت و آنهایی که کمتر از 1:20 هستند مشکوک و یا با اهمیت کم طبقه‌بندی می‌شوند.
- تیتراهای بالاتر از 1:20 دلیل محکمی بر عفونت جدید می‌باشد.
- تست‌های سرولوژی عفونت مالاریای سابق یا سابقه عفونت را تأیید می‌کنند و در بررسی‌های اپیدمیولوژی و غربالگری نمونه‌های خون جمع‌آوری‌شده برای بانک‌های خون مفید هستند.
- ابزارهای لازم برای روش‌های سرولوژیکی جهت تشخیص عفونت حاد مالاریا محدود بوده و با توجه به تأخیر در تولید آنتی‌بادی‌ها، عدم تأیید گونه و نیاز به میکروسکوپ فلورسنس (UV) مشکل است.

5- کشت انگل مالاریا

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

6- روش‌های سریع

تشخیص آنتی‌ژن‌های انگل مالاریا در نمونه‌های انسانی مالاریا، نظیر هیستیدین غنی از پروتئین 2 (HRP-II) یا لاکتات دهیدروژناز پلاسمودیوم (pLDH) را می‌توان با آزمایش سریع point-of-care که بر اساس روش ایمونوکروماتوگراف می‌باشد، انجام داد. مزایای استفاده از این تست‌ها سریع بودن و حساسیت بالای آنها است. معایب آنها نیز هزینه نسبتاً بالا، عدم کارایی کافی در تشخیص بعضی از گونه‌های مالاریا و تنوع زیاد محصولات آنها می‌باشد. تست‌های بر پایه تشخیصی HRP II نتایج مثبت در فاز نقاهت بیماری به دلیل باقی ماندن HRP II در خون بعد از پاک شدن انگل را ارائه می‌کنند.

References:

1. World Health Organization Expert Committee Report on Malaria: 20th Report; 2000. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. Gilles HM, Warrell DA. Diagnostic methods in malaria. In: BruceChwatt's Essential Malariology, 3rd ed., 1993. Edward Arnold; 78- 95.
3. World Health Organization. Basic malaria microscopy. Geneva, Switzerland, 1991, 67-8.
4. Silamut K, White NJ. Relation of the stage of parasite development in the peripheral blood to prognosis in severe falciparum malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993; 87: 436-43.
5. White NJ, Silamut K. Rapid diagnosis of malaria. Lancet 1989; 8635: 435.
6. Nguyen PH, Day N, Pram TD, Ferguson DJ, White NJ. Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89: 200-4.
7. Sheikh NS, Sheikh AS, Hussain SI, Sheikh AA. Utility of thick smears of bone marrow aspirate in pyrexia of unknown origin. J Coll Physicians Surg Pak 2003; 13: 577-80.
8. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1993; 61: 315-20.
9. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. NZ J Med Lab Science 2007 Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol Biochem Parasitol 1993; 58: 283-92. 10. Färnert A, Arez AP, Babiker HA, Beck HP, Benito A, Björkman A, et al. Genotyping of Plasmodium falciparum infections by PCR: a comparative multicentre study. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95: 225-32.
11. Imwong M, Pukrittakayamee S, Looareesuwan S, Pasvol G, Poirreiz J, White NJ, et al. Association of genetic mutations in Plasmodium vivax dhfr with resistance to sulfadoxine-

pyrimethamine: geographical and clinical correlates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3122-7.

12. Imwong M, Pukrittayakamee S, Rénia L, Letourneur F, Charlier JP, Leartsakulpanich U, et al. Novel point mutations in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium vivax*: evidence for sequential selection by drug pressure. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1514-21.

13. Shiff CJ, Minjas J, Premji Z. The ParaSight-F test: a simple rapid manual dipstick test to detect *Plasmodium falciparum* infection. *Parasitol Today* 1994; 10: 494-5.

14. Shiff CJ, Premji Z, Minjas JN. The rapid manual ParaSight-F test. A new diagnostic tool for *Plasmodium falciparum* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 646-8.

15. Moody A, Hunt-Cooke A, Gabbett E, Chiodini P. Performance of the OptiMAL malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. *Br J Haematol* 2000; 109:891-4.

16. Moody AH, Chiodini PL. Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. *Br J Biomed Sci* 2002; 59: 228- 31.

17. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 66-78.

18. Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C. Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 876-83.

19. Srinivasan S, Moody AH, Chiodini PL. Comparison of blood-film microscopy, the OptiMAL dipstick, Rhodamine-123 fluorescence staining and PCR, for monitoring antimalarial treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 227-32.

20. Mayxay M, Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Looareesuwan S, White NJ. Persistence of *Plasmodium falciparum* HRP-2 in successfully treated acute falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 179-82.

21. Baird JK, Purnomo, Jones TR. Diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy of QBC capillary tubes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 3-5.

22. Voller A. The immunodiagnosis in malaria. In: Wernsdorfer WH, Mc Gregor I. eds. *Malaria Principles and practise of malariology*. Churchill Livingstone, Edinburgh, Scotland; 1998, 815-25.

23. Chotivanich K, Silamut K, Udomsangpetch R, Stepniewska KA, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, et al. Ex-vivo short-term culture and developmental assessment of *Plasmodium vivax*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 677-80.

24. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193: 673-5.

25. Silamut K, Phu NH, Whitty C, Turner GD, Louwrier K, Mai NT, et al. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am J Pathol* 1999; 155: 395- 410

medlabnews.ir