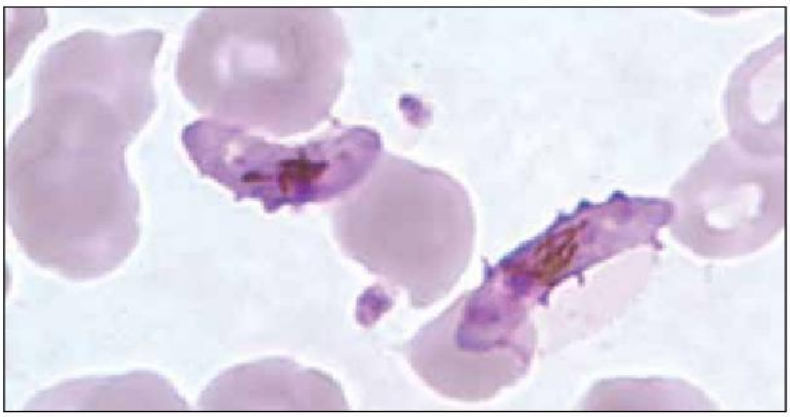
This is a translation into Farsi of an article originally published in English: Kutivanich kesine, Kamolrat Silamut, Nicholas PJ Day, Laboratory diagnosis of malaria infection: a short review of methods, NZJ Med Lab Sci , 61(1), 4-7, 2007.
The article was translated by: Reza bohloli khiavi ، ardebil university of medical Sciences.

روش‌های تشخیص آزمایشگاهی عفونت مالاریا

● رضا بهلولی خیاوی
کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی اردبیل، شبکه بهداشت و درمان شهرستان مشگین شهر
meshkinlab@yahoo.com



❑ چکیده

مالاریا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی گرمسیری است. میزان بروز مالاریا در جهان در هر سال حدود ۳۰۰ تا ۵۰۰ میلیون موارد بالینی را شامل شده و سالیانه با مرگ و میر ۱ تا ۳ میلیون نفر از مبتلایان همراه می‌باشد. تشخیص صحیح و به موقع مالاریا ضروری است تا از طریق درمان اختصاصی ضد مالاریا عوارض شدید و مرگ و میر ناشی از این بیماری کاهش یابد. این مقاله روش‌های تشخیص آزمایشگاهی عفونت مالاریا را شرح می‌دهد.

کلمات کلیدی: مالاریا، تشخیص، میکروسکوپی، سریع

❑ مقدمه

مالاریا مهم‌ترین بیماری انگلی و یکی از مسائل مهم بهداشتی تعدادی از کشورها به خصوص کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا است. بیماری مالاریا با نام‌های دیگری چون پالودیسم، تب و لرز، تب نوبه و تب متناوب نامیده می‌شود. این بیماری به صورت عفونت حاد در بیشتر موارد وخیم و گاهی طولانی و با ویژگی‌های تب متناوب و لرز، کم خونی و بزرگی طحال و گاه با ویژگی‌های ساده یا کشنده دیگر خودنمایی می‌کند. اهمیت این بیماری به خاطر شیوع زیاد و مرگ و میر قابل توجه است. انگل‌های مالاریا که گونه‌های پلاسمودیوم می‌باشند توسط یک تیره از پشه به نام آنوفل به انسان منتقل می‌شوند که شامل چندین گونه است. در کودکان مراجعه کننده به بیمارستان با مالاریای شدید، میزان مرگ و میر ۳۰-۱۰ درصد گزارش شده است. تشخیص صحیح و به موقع مالاریا ضروری است تا از طریق درمان اختصاصی ضد مالاریا عوارض شدید و مرگ و میر ناشی از این بیماری کاهش یابد. عفونت مالاریا را نمی‌توان با استفاده از علائم بالینی شناسایی کرد، به ویژه این که علائم آن با سایر بیماری‌های عفونی گرمسیری مشابه است، بنابراین بایستی از طریق آزمایشگاهی آن را تشخیص داده و تأیید کرد. این بررسی به روش‌های نوین موجود در آزمایشگاه‌های مختلف در دسترس برای تأیید عفونت مالاریا تمرکز دارد. اگر چه در افراد غیر ایمن حضور انگل مالاریا در خون به تشخیص عفونت مالاریا از لحاظ بالینی کمک می‌کند ولی در افراد ایمن که در مناطقی با میزان

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

انتقال بالای انگل بدون علامت زندگی می‌کنند ممکن است پارازیتمی بدون علامت وجود داشته باشد. تشخیص مالاریا توسط میکروسکوپ معمولی روش استاندارد طلایی برای تشخیص مالاریا باقی مانده است. اگر چه این روش نیازمند پرسنل بسیار ماهر بوده و ممکن است حساسیت پایین تر از تکنیک‌های مولکولی جدید را داشته باشد با این حال ارزان و قابل‌اعتماد می‌باشد. انتخاب یک تست تشخیصی مناسب برای تشخیص مالاریا باید با سطح بومی بودن گونه‌های مالاریا، ضرورت تشخیص و در دسترس بودن پرسنل و منابع مالی مشخص در نظر گرفته می‌شود.

❑ روش‌های تشخیص مرسوم عفونت مالاریا

۱- 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 رنگ آمیزی گسترش خون ضخیم و نازک روی اسلاید شیشه ای به دیدن انگل مالاریا منجر می‌شود. به طور خلاصه، انگشت بیمار با الکل تمیز، بعد خشک می‌شود و سپس در سمت نوک انگشتان با یک لانست استریل نوک تیز و یا سوزن، دو قطره خون بر روی یک لام شیشه ای قرار داده می‌شود. برای آماده سازی یک لام خون غلیظ، یک قطره خون در یک حرکت دایره ای با گوشه ای از لام هم زده می‌شود. برای گسترش لام خونی نازک بلافاصله با لبه صاف از یک لام دیگر قطره خون را با زاویه ۴۵ درجه بین لام و سطح قطره به هم می‌زنیم و سپس لکه خون را با حرکات رفت و برگشت سریع و یکنواخت در امتداد سطح لام تهیه می‌کنیم. بعد از آن این لام باید در مقابل هوا خشک شده و با متانول فیکس گردد. از آنجا که حجم زیادی از خون روی گسترش ضخیم قرار می‌گیرد بنابراین گسترش ضخیم خیلی حساس تر از گسترش نازک است.

۲- اسمیر داخل جلدی

یکی دیگر از روش‌های مرسوم تشخیص عفونت با مالاریا اسمیر داخل جلدی است. در این روش به وسیله سر سوزن اندازه ۲۵ سوراخ‌های باریکی در روی ساعد دست ایجاد می‌کنند. نباید از سوراخ خون تراوش کند، فقط خونابه سرمی تحت تأثیر فشار روی یک لام شیشه ای قرار داده شده و اجازه می‌دهند تا در معرض هوا خشک شده و سپس با متانول فیکس می‌نمایند. این اسمیر ممکن است لکوسیت‌های حاوی رنگدانه را نشان داده و نیز اشکال بالغ‌تری از پلاسمودیوم فالسیپاروم را مشخص می‌کند.

از روش‌های رنگ آمیزی برای اسلاید خون شرح داده شده برای تشخیص مالاریا، رنگ‌آمیزی گیمسا به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه، رنگ آمیزی لیشمن به مدت ۴۵ دقیقه و روش سریع صحرایی به مدت ۱۰ ثانیه طول می‌کشد. با استفاده از میکروسکوپ‌های نوری تعداد باندهای خونی، گونه‌ها و مراحل مورفولوژیکی 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 لکوسیت ها 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 نشان دهنده یک عفونت بالینی قابل توجه به ویژه 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 پیش آگهی بیماری هم اطلاعات مفیدی را ارائه دهد؛ تعداد انگل، تعداد فاگوسیت‌های حاوی رنگدانه و وجود اواخر مرحله غیرجنسی انگل همگی با پیش آگهی مرگبار عفونت مالاریا رابطه مستقیم دارند.

❑ روش‌های پیشرفته تشخیص عفونت مالاریا

۱- روش‌های مولکولی

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) اجازه می‌دهد تا قسمت خاصی از یک منطقه انتخاب شده از ژنوم مالاریا تکثیر یابد.

- PCR بسیار اختصاصی و حساس است طوری که

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

وجود حتـــی ۱ تا ۵ عدد انگل در یک میلـــی لیتر خون را نشان می‌دهد.

- واکنش زنجیره ای پلیمراز قادر به تعیین ژنوتیپ انگل نیز می‌باشد.

- روش PCR با استفاده از آنالیز پلی مورفیسم نوکلئوتید منفرد SNP= single nucleotide polymorphism تشخیص انگل‌هایی مقاوم به دارو و نیز عفونت‌های مخلوط را ممکن می‌سازد.

- گران بودن PCR یکی از معایب این روش می‌باشـــد و نیازمند یک آزمایشگاه پیشرفته همراه با کارکنان مجرب و دوره دیده است.

- تکنیک‌های مولکولی بهتر اســـت در آزمایشـــگاه‌های 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.

۲- روش‌های سریع

- تشخیص آنتی ژن‌های انگل مالاریا در نمونه‌های انسانی مالاریا، نظیر هیســـتیدین غنـــی از پروتئین ۲ (HRP-II) یا لاکتات دهیدروژناز پلاســـمودیوم (pLDH) را می‌توان با آزمایش ســـریع point-of-care که بر اســـاس روش ایمونوکروماتوگراف می‌باشد انجام داد.

- بســـیاری از آزمایش‌هـــای ســـریع بـــه صـــورت تجـــاری در دســـترس می‌باشـــند کـــه از آن جملـــه NOW Para Sight F, Paracheck,Binax و OptiMAL می‌باشند.

- تســـت‌های تشـــخیصی ســـریع، گران قیمت بوده ولی سریع، حساس و راحت می‌باشند.

- معایب روش‌های ســـریع هزینه نســـبتاً بالا، ناتوانی در تشـــخیص بعضی از گونه‌های مالاریا و تنوع زیاد محصولات آن‌ها می‌باشد.

- تست‌های بر پایه تشخیصی HRP II ممکن است نتایج مثبت در فاز نقاهت بیماری به دلیل باقی ماندن HRP II در خون بعد از پاک شدن انگل را بدهد.

۳- روش بافی‌کوت کمی

(QBC= Quantitative Buffy Coat method)

- QBC یک روش برای شناســـایی انگل مالاریا در خون محیطی است.

- ایـــن روش شـــامل رنگ آمیزی لایه ســـلول‌های قرمز ســـانتریفوژ شده و فشرده شده با آکریدین نارنجی تحت اثر یک منبع نور ماوراء بنفش می‌باشد.

- در این روش خون از طریق ســـوراخ کردن انگشـــت در یک لوله هماتوکریت حـــاوی آکریدین نارنجی و ضد انعقاد جمع آوری می‌گردد و لوله هماتوکریت را ۱۲۰۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنند.

- 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.

- روش بافی کوت کمی از لحاظ حساسیت شبیه به روش میکروســـکوپی اســـلاید خون ضخیم معمولی است و باید همراه با گسترش ضخیم خون برای غربالگری استفاده شود.

- QBC نیازمند ابزار دقیق تخصصی بوده و دارای هزینه بســـیار بالاتری از روش‌های میکروسکوپی در تعیین گونه و تعداد انگل می‌باشد.

۴- روش‌های سرولوژی

- تســـت‌های سرولوژیکی برای تشـــخیص عفونت مالاریا بر اســـاس شناسایی آنتی بادی‌های تولید شده علیه مراحل غیرجنسی خونی انگل مالاریا استوار می‌باشند.

- روش ســـرولوژی بهترین روشی است که به عنوان یک ابزار اپیدمیولوژیک استفاده می‌شود و مناسب برای تشخیص مالاریای حاد نیست.

- تســـت‌های ســـرولوژی عفونت مالاریای سابق یا سابقه عفونت را تأیید می‌کنند و یا در بررســـی‌های اپیدمیولوژی و غربالگری نمونه‌های خون جمع آوری‌شده برای بانک‌های خون مفید هستند.

- اولین آزمون ســـرولوژیکی مورد استفاده برای تشخیص آنتی بادی مالاریا روش ایمونوفلورسانس (IFA) می‌باشد.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

- در روش ایمونوفلورسانس از آنتی ژن ویژه و یا آنتی ژن خام آماده چسبانده شده در روی یک اسلاید که در ۳۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه داشته شده است استفاده می‌شود و به روش کمی هر دو آنتی بادی IgG و IgM در نمونه‌های سرم بیمار را بررسی می‌کنند. تیتر بالاتر از ۱/۲۰ مثبت در نظر گرفته شده و تیترهای کمتر از ۱/۲۰ مشکوک به عفونت و یا با اهمیت کم طبقه بندی می‌شوند. تیترهای بالاتر از ۱/۲۰۰ دلیل محکمی بر عفونت اخیر می‌باشند.

- ابزارهای لازم برای روش‌های سرولوژیکی جهت تشخیص عفونت حاد مالاریا محدود بوده و با توجه به تأخیر در تولید آنتی بادی‌ها، عدم تأیید گونه و نیاز به میکروسکوپ فلورسنس (UV) انجام آن‌ها مشکل می‌باشد.

۵ - کشت انگل مالاریا

از روش‌های دیگر تشخیصی بیماری مالاریا می‌توان به کشت انگل مالاریا به صورت زنده و تشخیص پس از مرگ از طریق تشخیص انگل‌های مالاریا و یا مشاهده رنگدانه در لوکوسیت ها در کالبد شکافی از طریق بیوپسی بافت‌ها از نمونه مغز، طحال و اسمیر نازک استخوان اشاره کرد. در روش کشت گلبول‌های قرمز انگل دار در محیط کشت حاوی RPMI1640 و در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد زیر لایه ای از گاز ۳ درصد، CO_2 ۱درصد اکسیژن و ۹۶ درصد نیتروژن کشت داده می‌شوند.

References

1- Chotivanich Kesinee, Silamut Kamolrat, Day Nicholas: Laboratory diagnosis of malaria infection- A short review of methods. N Z J Med Lab, 61 (1):4-7, 2007.

2- Gilles HM, Warrell DA. Diagnostic methods in malaria. In: BruceChwatt's Essential Malariology, 3rd ed., 1993. Edward Arnold; 78-95.

3- 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.

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.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

12- Imwong M, Pukrittayakamee S, Rénia L, Letourneur F, Charlieu 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.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]