

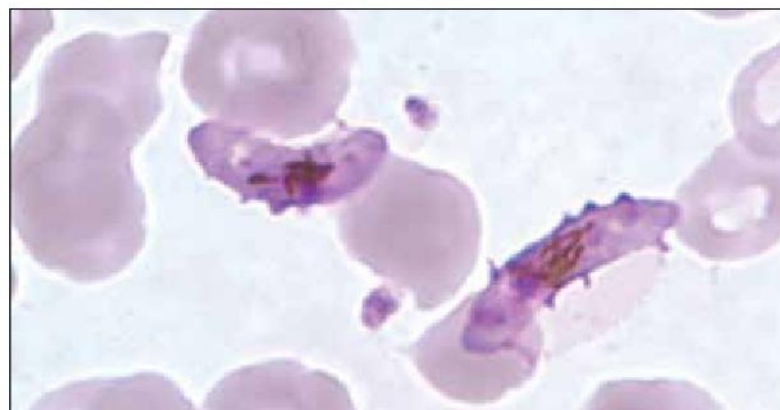


روش‌های تشخیص آزمایشگاهی عفونت مالاریا

● 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 پالودیسیم، 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 ۱۰-۳۰ 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

انتقال بالای انگل بدون علامت زندگی می کنند ممکن است پارازیتی 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 تکنیک های مولکولی جدید را داشته باشد با این حال ارزان و قابل اعتماد می باشد. انتخاب یک تست تشخیصی مناسب برای تشخیص مالاریا باید با سطح بومی بودن گونه های مالاریا، ضرورت تشخیص و در دسترس بودن پرسنل و منابع مالی مشخص در نظر گرفته می شود.

□ روش های تشخیص مرسوم عفونت مالاریا

۱- مشاهده مستقیم میکروسکوپی نمونه خون

ساده ترین 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 می شود. به طور خلاصه، انگشت بیمار با الکل تمیز، بعد خشک می شود و سپس در سمت نوک انگشتان با یک لانس استریل نوک تیز و یا سوزن، دو قطره خون بر روی یک لام شیشه ای قرار داده می شود. برای آماده سازی یک لام خون غلیظ، یک قطره خون در یک حرکت دایره ای با گوشه ای از لام هم زده می شود. 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 می زنیم و سپس لکه خون را با حرکات رفت و برگشت سریع و یکنواخت در امتداد سطح لام تهیه می کنیم. 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 می گیرد بنابراین گسترش ضخیم خیلی حساس تر از گسترش نازک است.

۲- اسمیر داخل جلدی

یکی دیگر از روش های مرسوم تشخیص عفونت با مالاریا اسمیر داخل جلدی است. در این روش به وسیله سر سوزن

اندازه ۲۵ سوراخ های باریکی در روی ساعد دست ایجاد می کنند. نباید از سوراخ خون تراوش کند، فقط خونابه سرمی تحت تأثیر فشار روی یک لام شیشه ای قرار داده شده و اجازه می دهند تا در معرض هوا خشک شده و سپس با متانول فیکس می نمایند. این اسمیر ممکن است لکوسیت های حاوی رنگدانه را نشان داده و نیز اشکال بالغ تری از پلاسمودیوم فالسیپاروم را مشخص می کند.

از روش های رنگ آمیزی برای اسلاید خون شرح داده شده برای تشخیص مالاریا، رنگ آمیزی گیمسا به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه، رنگ آمیزی لیشمن به مدت ۴۵ دقیقه و روش سریع صحرائی به مدت ۱۰ ثانیه طول می کشد. با استفاده از میکروسکوپ های نوری تعداد باندهای خونی، گونه ها و مراحل مورفولوژیکی از انگل گزارش شده است. گاهی اوقات انگل ها در گستره خون محیطی بیماران مبتلا به مالاریا یافت نمی شوند، 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 می گردد. 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 می تواند به لحاظ پیش آگهی بیماری هم اطلاعات مفیدی را ارائه دهد؛ تعداد انگل، تعداد فاگوسیت های حاوی رنگدانه و وجود اواخر مرحله غیرجنسی انگل همگی با پیش آگهی مرگبار عفونت مالاریا رابطه مستقیم دارند.

□ روش های پیشرفته تشخیص عفونت مالاریا

۱- روش های مولکولی

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

- واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) اجازه می دهد تا قسمت خاصی از یک منطقه انتخاب شده از ژنوم مالاریا تکثیر یابد.
- PCR بسیار اختصاصی و حساس است طوری که





۳- روش بافی کوت کمی

(QBC = Quantitative Buffy Coat method)

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

- این روش شامل رنگ آمیزی لایه سلول های قرمز سانتریفوژ شده و فشرده شده با آکریدین نارنجی تحت اثر یک منبع نور ماوراء بنفش می باشد.

- در این روش خون از طریق سوراخ کردن انگشت در یک لوله هماتوکریت حاوی آکریدین نارنجی و ضد انعقاد جمع آوری می گردد و لوله هماتوکریت را ۱۲۰۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفیوژ می کنند.

- با استفاده از میکروسکوپ مجهز به یک منبع نور UV مورد بررسی قرار می دهند.

- هسته انگل به رنگ فلورسانس سبز روشن و سیتوپلاسم آن به رنگ زرد نارنجی مشاهده می شود.

- روش بافی کوت کمی از لحاظ حساسیت شبیه به روش میکروسکوپی اسلاید خون ضخیم معمولی است و باید همراه با گسترش ضخیم خون برای غربالگری استفاده شود. QBC - نیازمند ابزار دقیق تخصصی بوده و دارای هزینه بسیار بالاتری از روش های میکروسکوپی در تعیین گونه و تعداد انگل می باشد.

۴- روش های سرولوژی

- تست های سرولوژیکی برای تشخیص عفونت مالاریا بر اساس شناسایی آنتی بادی های تولید شده علیه مراحل غیرجنسی خونی انگل مالاریا استوار می باشند.

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

- تست های سرولوژی عفونت مالاریای سابق یا سابقه عفونت را تأیید می کنند و یا در بررسی های اپیدمیولوژی و غربالگری نمونه های خون جمع آوری شده برای بانک های خون مفید هستند.

- اولین آزمون سرولوژیکی مورد استفاده برای تشخیص آنتی بادی مالاریا روش ایمونوفلورسانس (IFA) می باشد.

وجود حتی ۱ تا ۵ عدد انگل در یک میلی لیتر خون را نشان می دهد.

- واکنش زنجیره ای پلیمرز قادر به تعیین ژنوتیپ انگل نیز می باشد.

- روش PCR با استفاده از آنالیز پلی مورفیسم نوکلئوتید منفرد SNP= single nucleotide polymorphism تشخیص انگل هایی مقاوم به دارو و نیز عفونت های مخلوط را ممکن می سازد.

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

- تکنیک های مولکولی بهتر است در آزمایشگاه های تحقیقاتی مناسب، گسترش مقاومت به دارو و عود را بررسی نمایند و می توانند برای شناسایی گونه ها در زمانی که تعداد انگل بسیار کم است و یا در برخی از نمونه ها که در معرض از بین رفتن قرار گرفته اند مفید باشند.

۲- روش های سریع

- تشخیص آنتی ژن های انگل مالاریا در نمونه های انسانی مالاریا، نظیر هیسیتیدین غنی از پروتئین ۲ (HRP-II) یا لاکتات دهیدروژناز پلاسمودیوم (pLDH) را می توان با آزمایش سریع point-of-care که بر اساس روش ایمنونوکروماتوگراف می باشد انجام داد.

- بسیاری از آزمایش های سریع به صورت تجاری در دسترس می باشند که از آن جمله OptiMAL و NOW Para Sight F, Paracheck, Binax می باشند.

- تست های تشخیصی سریع، گران قیمت بوده ولی سریع، حساس و راحت می باشند.

- معایب روش های سریع هزینه نسبتاً بالا، ناتوانی در تشخیص بعضی از گونه های مالاریا و تنوع زیاد محصولات آنها می باشد.

- تست های 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.



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 لوکوسیت‌ها 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، CO₂ ۱ درصد اکسیژن و ۹۶ درصد نیتروژن کشت داده می‌شوند.

- 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. تیترا بالاتر از ۱/۲۰ مثبت در نظر گرفته شده و تیتراهای کمتر از ۱/۲۰ مشکوک به عفونت و یا با اهمیت کم طبقه بندی می‌شوند. تیتراهای 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

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.





- 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.

