بسته آموزشی

روش های نمونه برداری و تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیا و مالاریا

تهیه و تدوین :

احد شهنامی

کارشناس مسئول آزمایشگاه مرکز بهداشت استان

خرداد ۱۳۹۵

بسم الله الرحمن الرحیم

بسته آموزشی

روش های نمونه برداری و تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیا و مالاریا

این مجموعه در راستای آموزشهای تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیا و مالاریا درآزمایشگاه در گروه کارشناسان آزمایشگاه مرکز بهداشت استان آذربایجان شرقی با مشارکت وهمکاری افراد زیر تهیه و تدوین گردیده است :

۱. احد شهنامی (کارشناس آزمایشگاه - پست سازمانی : کارشناس مسئول آزمایشگاه)

۲. مهدی پارسایی (کارشناس آزمایشگاه - پست سازمانی : کارشناس آزمایشگاه)

با قدردانی از همکاری صمیمانه کارشناسان آزمایشگاههای تابعه معاونت بهداشتی استان آذربایجان شرقی

زیر نظر : آقای دکتر علی محمدی

رئیس گروه کارشناسان دارو و آزمایشگاه مرکز بهداشت استان

تاریخ تهیه بسته آموزشی : خرداد ۱۳۹۵

گروه های هدف:

کارشناس آزمایشگاه –کاردان آزمایشگاه - تکنسین آزمایشگاه

اهداف آموزشی:

هدف کلی:

افزایش دانش وآگاهی پرسنل آزمایشگاههای بهداشتی در تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیا و مالاریا

روش و نحوه اجرای آموزش:

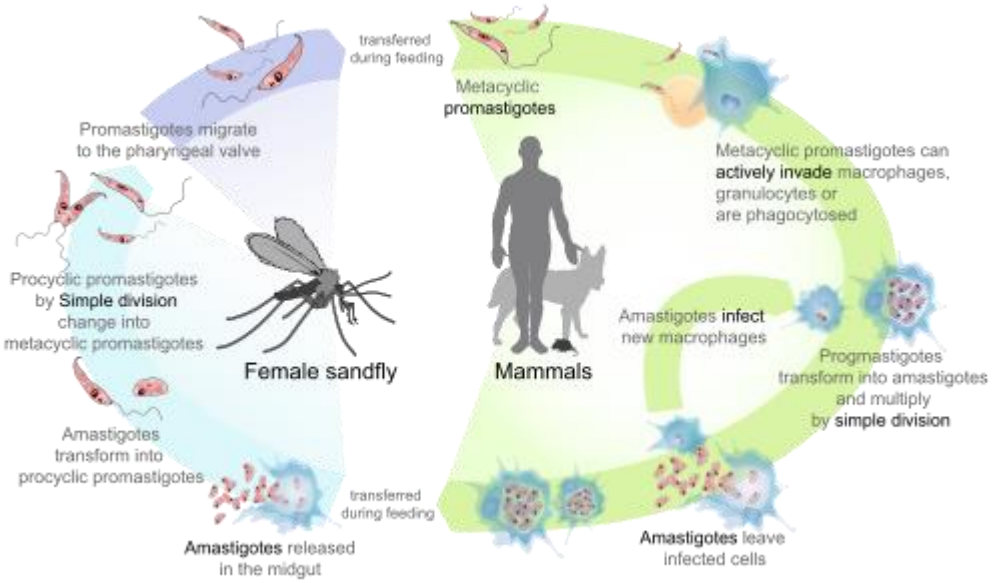
با توجه به اینکه هدف این مجموعه آموزشی افزایش دانش و آگاهی کارکنان در مورد کالیبراسیون دستگاههای دیجیتالی درآزمایشگاه میباشد بنابراین میتواند جهت ارائه بهتر مطالب به روش حضوری درقالب کارگاه آموزشی وعملی ارائه شود و یا جهت پوشش تعداد بیشتری از آموزش گیرندگان بصورت غیرحضوری و در قالب کتابخوانی انجام گیرد.

مدت دوره آموزشی : ۱۵ ساعت

ارزشیابی :

در پایان دوره بمنظور ارزیابی میزان حصول موفقیت ودستیابی به اهداف آموزشی و بررسی آگاهی، نگرش وعملکرد آموزش گیرندگان و بهبود مستمر فرآیند، یک ارزشیابی از شرکت کنندگان بصورت تستهای چهارگزینه ای بعمل خواهدآمد.

تعریف لیشمانیوز

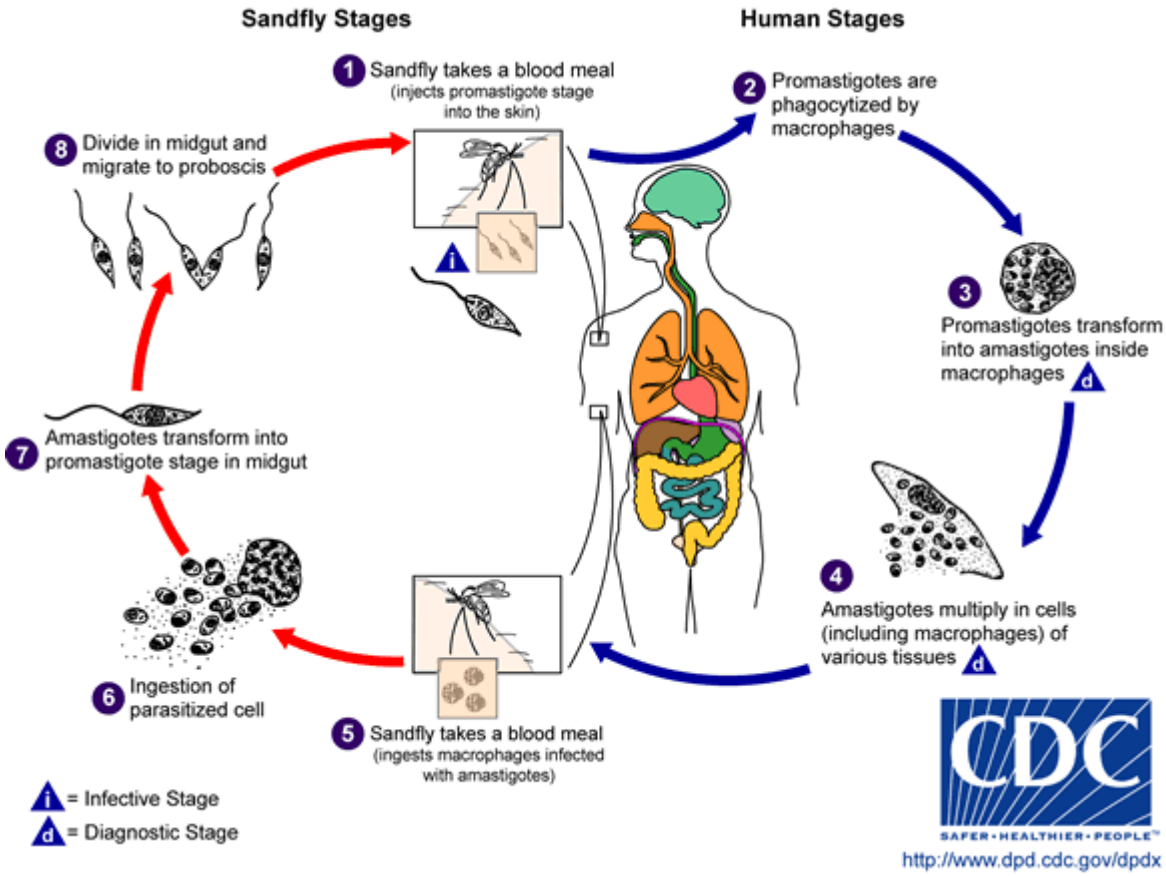


لیشمانیوزها که در شمار بیماری های مشترک انسان و حیوان اند ، در اغلب نقاط جهان وجود دارند و به صورت ضایعات پوستی (سالک) ، احشایی (کالاآزار) و مخاطی – پوستی بروز می کنند .

عامل بیماریزای لیشمانیوز ، نوعی تک یاخته به نام لیشمانیا از راسته کینتوپلاست داران است که برحسب محیط زندگی خود به دوشکل بی تاژک (آماستیگوت یا جسم لیشمان) و تاژک دار (پروماستیگوت) دیده می شوند . این انگل در مهره داران ، در درون سلول های بیگانه خوار تک هسته ای زندگی می کند و تکثیر می یابد . لیشمانیوزها عموما توسط گونه های پشه خاکی (فلوبوتوموس) منتقل می شوند .

بیماری لیشمانیوز در مناطق گرمسیری آمریکا، آفریقا، شبه قاره هند و در نواحی نیمه گرمسیری آسیای جنوب غربی و ناحیه مدیترانه آندمیک می باشد. این اختلال شامل گروهی از بیماریها با تظاهرات بالینی و عواقب بهداشتی بسیار متنوع است (از ضایعات بد شکل خودبخود بهبود یابنده در تعداد اندکی از افراد تا اپیدمی های شدید با میزان مرگ و میر بالا) تعداد افراد آلوده در دنیا دوازده میلیون نفر تخمین زده می شود. و ۳۵۰ میلیون نفر در مناطقی زندگی می کنند که احتمال ابتلاء به بیماری وجود دارد. ۳ میلیون نفر از اشکال مختلف بیماری رنج می برند.

تعداد موارد جدید در هر سال ۱/۵ میلیون نفر می باشد که از این تعداد ، پانصد هزار مورد (۵۰۰/۰۰۰) مبتلا به لیشمانیوز احشایی هستند. این تخمین ها مواردی را که بعلت عدم گزارش بسیاری از موارد جدید بیماری (در مناطق روستایی) یا عدم الزام گزارش این موارد در بسیاری از کشورهای آندمیک در نظر آورده نمی شوند، نیز بحساب می آورند. لیشمانیوز احشایی اپیدمی های وسیع ایجاد می کند و تعداد بیماران در سالیان مختلف بسیار متنوع است. در طول سال ۱۹۹۱ ، اپیدمی های وسیعی در هندوستان بوقوع پیوست. تعداد بیماران در هند به تنهایی حدود ۲۵۰/۰۰۰ نفر بوده است. از آنجا که میزان کشندگی بیماری در موارد تشخیص داده و درمان شده بین ۵ تا ۱۰ درصد (در سودان تا ۱۴٪) و در موارد درمان نشده ۱۰۰٪ می باشد، تخمین می زنند که لیشمانیوز احشایی ۷۵/۰۰۰ نفر را در سال ۱۹۹۱ به هلاکت رسانده باشد. ابتلاء به لیشمانیوز پوستی از شدت کمتری برخوردار می باشد. ولی در مناطق آندمیک ناراحتی فراوانی را ایجاد می نماید. (حداقل به خاطر جنبه روانی و اجتماعی و ظاهر زننده ای که بیماری ایجاد می کند). اهمیت این مسئله نزد مردم در مناطق آندمیک از آنجا مشخص می شود که در این مناطق به روش قدیمی لیشمانیزاسیون روی می آورند . این روش شامل ایجاد عفونت عمومی و مخاطره آمیز بالیشمانیا به منظور القای ایمنی تمام عمر نسبت به آن و به قیمت بروز یک زخم و ضایعه در مناطقی از بدن است که کمتر در معرض برخورد با عامل بیماری قرار دارند.



اهمیت مراقبت در بیماری لیشمانیوزها :

مراقبت این بیماری باتوجه به پیچیدگی اپیدمیولوژیک در حلقه انتقال این بیماری (وجود مخازن و ناقلین گوناگون) از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می باشد چه با تجهیز شبکه مراقبتی کارآمد و آگاهی سریع ازوقوع موارد علی الخصوص در نقاط عاری از بیماری میتوان فرصت کافی جهت آگاهی از وضعیت ناقلین ، مخازن ، طبقه بندی نوع بیماری که از الزامات اولیه تعیین راه صحیح مبارزه با بیماری است و همچنین در مورد نوع احشایی درمان به موقع و پیشگیری از مرگ و میر فراوان بیماری نقش موثری در مهار بیماری ایفاء نمود. اساس مراقبت صحیح در مورد هر بیماری تعیین تعاریف مشخص جهت گزارش بیماری به سطوح مختلف می باشد که در صفحات بعد به آن خواهیم پرداخت .

عامل بیماری

یک انگل تک یاخته ای از جنس لیشمانیا (Leishmania) است که انواع مختلفی دارد. بعضی از آنها در انسان ایجاد بیماریهایی بنام لیشمانیوز می کند. لیشمانیوز جلدی یا سالک بوسیله لیشمانیاتروپیکا (L.Tropica) و لیشمانیا ماژور(L.Major) ایجاد می شود که زخم پوستی خوش خیمی می باشد و در اغلب نقاط ایران دیده می شود. لیشمانیا دونووانی (L.donovani) با لیشمانیااینفانتوم(L.infantum) عامل بیماری کالاآزار و یا لیشمانیوز احشایی است. انگل لیشمانیا جزو تک یاخته های تاژک دار است. در بدن میزبان مهره دار از جمله انسان در داخل سلولهای بیگانه خوار بافتها بشکل گرد یا تخم مرغی با اندازه ۴-۲ میکرون رشد و تکثیر پیدا می کند. در میزبان بی مهره یا پشه خاکی که ناقل بیماری است و هم چنین در محیط کشت بشکل انگلی دراز ، دوکی شکل ، متحرک و دارای یک رشته باریک بنام تاژک می باشد.

ناقل بیماری :

ناقل بیماری پشه ریزی است بنام پشه خاکی یا فلبوتوموس (phlebotomus) که اندازه آن ۲-۳ میلیمتر و بدن آن پر از مو برنگ زرد مایل به کرم می باشد. پشه خاکی ماده خونخوار است و از خون انسان و بعضی پستانداران تغذیه می کند . پشه خاکی ماده معمولاً هر ۵ روز یکبار خون می خورد در موقع خون خوردن آلوده می شود پس از حدود ۱۰ روز می تواند آلودگی را به میزبان مهره دار دیگر منتقل کند. خونخواری پشه خاکی معمولاً در شب انجام گرفته و روزها را در جای تاریک و مرطوب در زیر زمین و قسمت سایه دار اماکن انسانی یا حیوانی استراحت می کند. طول عمر پشه خاکی بالغ یکماه است که در این مدت یک یا چند بار تخم گذاری انجام می دهد.

تخم ها پس از طی دور ه های مختلف (حدود یکماه و نیم) به پشه بالغ تبدیل می شوند که می تواند پرواز کند. پشه خاکی انواع زیادی دارد که بعضی از انواع آن ناقل کالا آزار و برخی دیگر ناقل لیشمانیوز جلدی نوع شهری و بعضی ناقل لیشمانیوز جلدی نوع روستایی می باشند.

مخزن انگل:

مخزن انگل در بیماری کالاآزار بر حسب نوع آن فرق می کند در کالاآزار نوع هندی مخزن انسان است که با آلوده شدن توسط نیش پشه خاکی به انسان سالم منتقل می گردد. در نوع مدیترانه ای از جمله کالا آزار ایران سگ و سگ سانان وحشی مانند روباه و شغال مخزن اصلی بیماری هستند و در برخی نقاط مانند آفریقا ، جوندگان مخزن این انگل می باشند. در کالاآزار مدیترانه ای انتقال بیماری توسط پشه خاکی از انسان مبتلا به کالا آزار به انسان سالم امکان پذیر است.

مخزن بیماری لیشمانیوز جلدی در ایران

لیشمانیوز جلدی به دو گونه است . نوع شهری یا خشک (Anthroponotic) در این نوع مخزن بیماری انسان بوده ولی سگ هم بطور اتفاقی به بیماری مبتلا می گردد.
در لیشمانیوز جلدی نوع روستایی یا مرطوب (Zoonotic) مخزن بیماری عمدتاً جوندگان بوده که مهمترین آنان در ایران رومبومیس اوپیموس (در اصفهان) از خانواده ژربیل ها می باشد جوندگان دیگری نیز بعنوان مخزن لیشمانیوز جلدی نوع روستایی در ایران مورد بررسی و تائید قرار گرفته اند که از آنجمله مریونس لیبیکوس در شهرستان نطنز استان اصفهان مریونس هوریانه در سیستان و بلوچستان و تاتراایندیکا (Tatera indica) درخوزستان.

راههای سرایت بیماری و سیکل زند گی انگل

زندگی انگل دارای دو مرحله است یک مرحله لیشمانیانی و دیگری مرحله لپتومونائی در مرحله لیشمانیائی که به آن آماستیگوت می گویند انگل بصورت ارگانیسم فاقد تاژک با بدن گرد یا بیضوی و گاهی دوکی شکل است که در داخل سلول های بیگانه خوار (ماکروفاژ) پستانداران وجود دارد و اجسام لیشمن نامیده می شود. در مرحله لپتومونائی که به آن پروماستیگوت نیز می گویند از تغییر شکل حالت لیشمانیائی بوجود می آید، در این شکل انگل تاژکی د رقسمت قدامی خود دارد که این شکل انگل در دستگاه گوارش پشه خاکی و هم چنین در داخل محیط کشت دیده می شود. انگل در فرم آماسیتگوت در بدن میزبان مهره دار مثل انسان و حیوان قرار دارد و اغلب در داخل ماکروفاژها (سلولهای بیگانه خوار) زندگی می کند. پشه خاکی جنس ماده خونخوار است. و با مکیدن خون ، آماستیگوت را می بلعد و در دستگاه گوارش به مرحله پروماستیگوت تبدیل می نماید. این فرم ارگانیسم با تقسیم بندی غیر جنسی دوتایی زیاد می شود و بعد از گذشتن ۵ الی ۲۰ روز تعداد آنها زیاد شده بطوریکه در سالک با نیش زدن پشه خاکی ماده آلوده ، این انگل به انسان سالم منتقل شده و باعث بروز زخم سالک می گردد.

بطور کلی سالک بوسیله انواع پشه خاکی های آلوده به سه طریق زیر بوجود می آید:
۱- انسان به انسان
۲- حیوان به حیوان
۳- حیوان به انسان و بالعکس
و در کالاآزار محل استقرار انگلها در سلولهای بیگانه خوار سیستم رتیکولوآندتلیال ، بافت طحال ، کبد، مغز استخوان ، غدد لنفاوی وسایربافت ها است و ممکن است در منوسیتهای خون نیز دیده شوند. در موقع خون خوردن پشه خاکی از میزبان مهره دار آلوده اشکال لیشمانیایی وارد لوله گوارش پشه شده و در آنجا بشکل لپتومونایی(تاژکدار) در می آید در قسمت میانی معده پشه تکثیر شده و درموقع خونخواری از انسان سالم بهمراه بزاق وارد بدن میزبان مهره دار می شود. در بدن انسان تاژک خود را از دست داده در سلولهای بیگانه خوار بدن انتشار می یابند. راههای دیگر انتقال ممکن است تماس جنسی، انتقال خون، مادرزادی از طریق

جفت و یا آلودگی مخاط چشم و یا زخمهای باز با مواد آلوده مانند ترشح زخم یا مخاط بینی انسان و یا حیوان مبتلا به لیشمانیوز احشایی باشد. حیوانات گوشتخوار ممکن است با خوردن لاشه حیوان آلوده مبتلا شوند.

دوره کمون:

درسالک بسته به نوع بیماری متفاوت است . در لیشمانیوز جلدی نوع مرطوب (روستایی) دوره کمون کوتاهتر (۴-۱) هفته ولی در لیشمانیوز جلدی نوع خشک (شهری) این دوره طولانی تر و بطور معمول (۲ تا ۸ ماه) گاهی ۲-۱ سال می باشد.

در لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) نیز این دوره از چند هفته تا چند ماه و گاهی تا یکسال می باشد.

علائم بیماری در سالک:

ضایعات سالک ممکن است به یکی از اشکال زیر دیده شود:

۱) شکل خشک

۲) شکل مرطوب

۳) اشکال غیر معمول

۴) شکل مزمن

۵) شکل لوپوئید یا عود کننده

۶) ضایعات ناشی از مایه کوبی

که در این نوشته فقط به ذکر انوع خشک و مرطوب آن می پردازیم .

۱- شکل خشک

این شکل بیماری دارای ۴ مرحله پاپول بی درد، مرحله زخم و دلمه ، شروع بهبودی ، بهبودی کامل و به جای ماندن جوشگاه (جای زخم یا اسکار) می باشد.

پس از گذشت دوره کمون در محل گزش پشه پاپول سرخ رنگی ظاهر می شود این پاپول نرم و بی درد است و در اثر فشار محو نمی شود. گاه خارش مختصری دارد. پس از گذشت چند هفته یا چند ماه پاپول فعال شده ، ضایعه بزرگتر شده و اطراف آن را هاله قرمز رنگی فرا میگیرد. و کم کم بر اثر تجمع سلول ها در آن قطعه ضایعه سفت می شود. پس از گذشت ۲ تا ۳ ماه پاپولصورت دانه ای سرخ و برجسته با سطحی صاف و شفاف و قوامی نرم در می آید. در این هنگام گاه در روی آن فرورفتگی به عمق یک میلیمتر که ته آن پوسته پوسته است دیده می شود. به تدریج سطح این دانه نرم می شود و مایع سروزی ترشح می کند و

بالاخره ضایعه بصورت زخمی باز در می آید . زخم حدودی مشخص و حاشیه ای نامنظم و برجسته دارد که روی آن را دلمه ای کثیف و قهوه ای رنگ پوشانده است.
اگر دلمه کنده شود کف زخم فرو رفته است اطراف زخم دارای هاله ای صورتی رنگ که در مقایسه با بافتهای اطراف و زیر آن سفت به نظر می رسد. ضایعه بی درد و گاهی دارای خارش خفیف است. هرچه تعداد ضایعات بیشتر باشد اندازه زخمها کوچکتر و بهبودی آنها سریعتر است . بهبودی زخم بتدریج از مرکز زخم شروع شده و دلمه شروع به خشک شدن می کند . و پس از گذشت ۱۲-۶ ماه و گاه بیشتر ضایعه

کاملا بهبود می یابد و اثر آن به صورت جوشگاهی فرورفته با حدودی کاملا مشخص و حاشیه ای نامنظم باقی می ماند

۲-شکل مرطوب :

این شکل نیز دارای همان چهار مرحله سالک خشک می باشد ولی تظاهرات بالینی آن تفاوتهایی به شرح ذیل دارند:
پس از طی دوره کمون چند هفته تا چند ماه ضایعه بصورت جوش همراه با التهاب حاد ظاهر می شود .پس از دو هفته زخمی شده که بسرعت بزرگ و دور آن پرخون می شود. زیر لبه زخم خالی است و لبه زخم دارای تفاریس و چرک زیاد است . جوش خوردن زخم از وسط و اطراف همزمان اتفاق می افتد و بطور معمول زخم ظرف مدت ۶-۴ ماه پس از شروع آن به کلی خوب می شود و به ندرت در حالتهای عادی بیش از ۸ ماه طول می کشد.

علائم بالینی در کالاآزار :

استقرار بیماری معمولا مخفیانه و بدون علائم مشخصی صورت می گیرد و به کندی پیشرفت می کند .
تظاهرات آن با تب نامنظم و مواج تا ۴۰ درجه سانتیگراد با بیقراری ، درد ناحیه طحال ، سرفه و کم شدن وزن بدن، بزرگی طحال و کبد و در نتیجه بزرگ شدن شکم بیمار ، کم خونی و کم شدن تعداد عناصر سلولهای خونی (گلبولهای قرمز، سفید و پلاکت ها) ورم صورت و دستها و پاها دیده می شود.
در مواردی رنگ پوست بیمار برنزه و تیره می شود که برخی دلیل نامگذاری بیماری را به مرض سیاه (کالاآزار) بهمین دلیل می دانند و برخی نیز به دلیل مرگ و میر زیاد بر اثر این بیماری نام بیماری سیاه به آن داده اند. از بین رفتن سلولهای بیگانه خوار بدن و کاهش قوای دفاعی سبب آمادگی برای پذیرش سایر عفونت ها شده و اگر تشخیص و درمان بموقع انجام نگیرد موجب مرگ بیمار می گردد.
بطور کلی تشخیص بیماری لیشمانیوز جلدی و احشایی براساس آخرین مصوبه کمیته کشوری در انواع مظنون ، محتمل و قطعی بشرح زیر است:

لیشمانیوز جلدی

– تشخیص مظنون (Suspected) :

وجود پاپول یا زخم پوستی بیشتر در نقاط باز بدن در منطقه آندمیک که بیش از ۱۰ روز طول کشیده باشد.

– تشخیص محتمل (Probable):

وجود پاپول یا زخم پوستی که بتدریج افزایش اندازه یافته ، اولسر آن گاه سطحی و برآمده است و گاه بصورت زخم های عمیق و چرکی با کناره های قرمز رنگ می باشد.

– تشخیص قطعی (Definite):

دیدن انگل در گسترش تهیه شده از ضایعه پوستی (اسمیر یا کشت)

لیشمانیوز احشایی (کالاآزار)

– تشخیص مظنون (Suspecred):

بروز علام کلینیکی بصورت بیماری تحت حاد با علائمی نظیر تب ، هپاتومگالی ، اسپلنومگالی ، کاهش وزن ، کم خونی ، تغییر رنگ پوست.

– تشخیص محتمل (Probable):

علائم بالینی همراه با آزمایش IPA DAT مثبت

– تشخیص قطعی : (Definite)

دیدن انگل در گسترش تهیه شده از بافتها (طحال ، مغز استخوان و غدد لنفاوی) و یا بدست آوردن آن در محیط کشت

تشخیص بیماری

تشخیص لیشمانیوز جلدی:

تشخیص بالینی سالک وقتی به اثبات می رسد که میکروارگانیسم در اسمیر رنگ آمیزی شده مایع حاصل از ضایعات جلدی و یا کشت دیده شود و یا در آزمایش بافت شناسی در بافت رنگ آمیزی شده مشاهده گردد.

معیارهای تشخیص آزمایشگاهی :

۱- آزمایشات انگل شناسی مثبت (اسمیر یا کشت از زخم)

۲- آزمایشات سرولوژی مثبت (IFA,ELIZA) فقط برای لیشمانیوز مخاطی (M.C.L)

تشخیص کالا آزار :

باتوجه به اینکه کالا آزار در ایران اغلب در بچه ها دیده می شود و از علائم ظاهری آن تبهای نامنظم ، بزرگی طحال و کبد و در نتیجه بزرگ شدن شکم ، کم خونی و ضعف و لاغری است موارد مشکوک را می توان جهت تشخیص قطعی به پزشک مرکز درمانی و یا متخصص جهت انجام آزمایشات معرفی نمود.

معیارهای تشخیص آزمایشگاهی :

۱- مثبت بودن آزمایشات انگل شناسی (تهیه گسترش از مغز و استخوان – طحال – کبد – غدد لنفاوی – خون) و کشت ازبیوپسی یا مواد آسپیره شده از اعضاء

۲- مثبت آزمایشات سرولوژی (IFA ,DAT,ELIZA) تهیه نمونه خون برای انجام تستهای سرولوژی بسادگی امکان پذیر است.

میتوان نمونه خود را در لوله های باریک هپارتیه از نوک انگشت بیمار پس از ضد عفونی کردن انگشت با الکل و سوراخ کردن آن با تیغه نوک تیز استریل یا لانست یکبار مصرف تهیه کرد. پلاسمای آن را بوسیله سانتریفوژ کردن جدا نمود یا با تماس دادن کاغذ صافی آزمایشگاهی با خون روی انگشت بیمار مقداری از خون را بصورت یک لکه یکنواخت بقطر حدود یک سانتیمتر جذب کاغذ کرده و پس از خشک شدن مورد آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم که انجام آن را در آزمایشگاههای کوچک و دور افتاده با تجهیزات ساده و دور افتاده عملی است قرار داد.

درمان لیشما نیوز

الف – لیشمانیوز احشائی یا کالا آزار

برای درمان شکل های لیشمانیوز بجز نوع منتشر آن Diffuse Cutaneous Leishmaniasis ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی جهت استفاده موضعی و عمومی پیشنهاد می شوند . بمنظور اجتناب از عود بیماری ، تقلیل هزینه درمان ، پیدایش مقاومت داروئی بایستی داروئی مناسب بمقدار لازم ودر فاصله زمانی متناسب تجویز گردد . اگر چه آنتیموان پنج ظرفیتی بعنوان داروی خط اول درمان بیماری پذیرفته شده است ولی تفاوتهای فراوانی در نحوه بکار بردن آن اعمال می شود.

دو داروی آنتیموان پنج ظرفیتی دردسترس می باشند.مگلومین آنتیموانات (گلوکانتیم) وسدیم استیبوگلوکونات (پنتوستام) ، که این دو دارو از نظر شیمیایی مشابه بوده و تصور می شود که مدت اثر بخشی و سمیت آنان در درمان لیشمانیوز احشایی به مقدار آنتیموان موجود در دارو بستگی داشته باشد محلول مگلومین آنتیموانات تقریباً + ۸۵ 8.5% sb5 (mg/ml) آنتیموان داشته در حالیکه میزان آنتیموان (۵+ Sb) موجود درپنتوستام درحدود (mg/ml) 10% Sb ۵۱۰۰+ می باشد

گلوکانتیم درکشورهای فرانسه زبان و آمریکای لاتین و پنتوستام در کشورهای انگلیسی زبان و آمریکا مصرف می شوند . درایران تاکنون گلوکانتیم مصرف شده ودزاژ توصیه شده داروی فوق برپایه میزان آنتیموان پنج

ظرفیتی موجود بوده ودر کالا آزار عبارتست از ۲۰ میلی گرم آنتیموان برای هرکیلو گرم وزن بدن روزانه بمدت بیست روز.

بیمارا نیکه بیماری در آنان باقی مانده و احتیاج به درمان طولانی تری دارند بایستی مدت بیشتری در مان شوند . عدم پاسخ درمانی اولیه که بصورت عدم پاسخ کلینیکی به درمان اولیه با آنتیموان می باشد در بیشتر مناطق بین ۲۰٪ تا ۸٪ است .

بیمارانیکه به درمان با آنتیموان در دوره اول جواب مناسب درمانی نمی دهند ممکنست در دوره دوم یا حتی دوره سوم پاسخ مناسبی بدهند . آنتیموان در این دوره می تواند بدون سمیت تا ۳۰ روز تجویز شود . درمان موفقیت آمیز با دوره طولانی تری (۱۲۰ روزه) درمورد PKDL (لیشمانیوز پوستی بعد از کالا آزار) از هندوستان گزارش گردیده است .

طول دوره درمان در یک منطقه آندمیک با نقاط دیگر متفاوت بوده ولی در تمام موارد درمان باید حداقـــل ۲ هفته پس ازمنفی شدن آزمایش انگلی خون ادامه یابد.

تزریق داخل وریدی پنتوستام باید به آرامی (بیش از ۵ دقیقه) و با استفاده از وزن مناسب صورت گیرد تا از احتمال بروز هرگونه ترومبوز جلوگیری شود . درمان باید تحت نظر کادر پزشکی صورت گیرد.

درمان با ترکیبات آنتیموان معمولاً خوب تحمل می شود ولی اگر عوارض جانبی جدی بروز کند (عوارض کبدی وقلبی) می توان موقتاً درمان را متوقف کرد . اگر عود بیماری اتفاق افتد بیماران باید نخست با ترکیبات آنتیموان تحت درمان قرارگیرند ودر صورت رضایت بخش نبودن پاسخ درمانی انتخاب دوم داروهای آمفوتریسین B وپنتاسیدین خواهند بود.

آمفوتریسین B :

روزانه یا هفته ای سه بار بصورت تزریق داخل وریدی و آنفوزیون داخل دکستروز ۵٪ طی ۴ ساعت تجویز می شود در شروع با دز اولیه ۱۰ – ۵ میلی گرم که بتدریج افزایش یافته ودر هر نوبت بمیزان ۱۰-۵ میلی به آن افزوده می شود تا زمانیکه به دز ۰/۵ تا یک میلی گرم در کیلوگرم از وزن بدن برسد . درمان باید تا زمانیکه دز کامل یعنی ۳-۱ گرم داده شود ادامه یابد . طول دوره درمان بستگی به پاسخ درمانی بیمار دارد . عود بیماری یا فقدان پاسخ درمانی مناسب در ۸٪ – ۲٪ موارد اتفاق می افتد بعلت سمیت دارو برای کلیه وقلب درمان باید همیشه در بیمارستان صورت گیرد.

ب) دستورالعمل درمان لیشمانیوز جلدی (سالک)

درمان بیماری سالک در مواد زیر توصیه می شود.

۱- کسانی که ضایعات زخمی بزرگ تر از ۳ سانتیمتر دارند

۲- کسانی که ضایعات متعدد اولسراتیو دارند

۳- ضایعات مناطق باز بدن (صورت – پشت دست – پشت پا) محل ضایعه درسه سانتیمتری ارگان های

حیاتی مانند چشم– گوش و دهان باشد.
درسایر موارد پیشنهاد می شود که درمان صورت نگرفته و جهت پیشگیری از گزش مجدد و انتقال به دیگران وهم چنین پیشگیری از ایجاد احتمالی عفونت ثانویه ، با گاز استریل پانسمان گردد.

روش درمان

ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی (گلوکانتیم و پنتوستام) : که بدوشکل تزریق موضعی و تزریق سیستمیک قابل استفاده است .
تزریق موضعی در موارد زیر اندیکاسیون دارد.
تعداد ضایعات محدود (۲ –۳) عدد در نزدیکی ارگانهای حیاتی نباشد.

روش تزریق

تزریق معمولاً در چهار نقطه داخل زخم صورت می گیرد تا زمانیکه رنگ محل تزریق ضایعه متمایل به سفید گردد.

مقدار تزریق

بستگی به اندازه ضایعه داشته و فواصل درمان هفته ای یکبار می باشد . درمان یاد شده تا بهبودی کامل ضایعه توصیه می گردد.

تزریق سیستمیک

درموارد زیر توصیه می شود:
– تعداد ضایعات متعدد و السراتیو باشد (از ۳ ضایعه بیشتر)
– همراه با لنفادنوپاتی مجاور ضایعه فرم اسپیروتریکوئید باشد.
– بیمار قادر یا مایل به پذیرش تزریق داخل ضایعه نباشد.
– موارد A.C.L با عامل L.Tropica درایران جهت پیشگیری ازاپیدمی با هر تعداد و فرم ضایعه باید درمان شود.
– در خواست بیمار جهت معالجه بعد از توضیحات علمی توسط پزشک معالج
– توصیه می شود در صورت وجود بیماریهای کبد ، قلبی و کلیوی درمان تحت نظر متخصص پوست انجام شود.
– تزریق در خانم های حامله کاربرد ندارد و توصیه می شود از روش های دیگر درمانی با مراجعه به متخصصین پوست استفاده شود.

مقدار دارو و طول درمان

۲۰ میلی گرم آنتیموان بازاء کیلوگرم وزن بدن (۲۰ mg/kg sb +5) روزانه دریک نوبت تزریق عضلانی که بهتر است بصورت منقسم در دوناحیه (دو باسن ۹ تزریق گردد . بمدت ۱۰ – ۱۴ روز و در صورت نیاز پس از حداقل یکماه مجدداً رژیم درمانی تکرار گردد.

درصورت عدم پاسخ تا دو دوره درمانی ارجاع بیمار به پزشک متخصص پوست توصیه می شود. درصورت عود یا مقاومت انگل به درمان گلوکانتیم تنها باید در دور دوم درمان ، آمپول گلوکانتیم + قرص آلوپورنیول ۲۰۰ میلی گرم پارکیلو) تجویز شود .

درصورت وجود عفونت باکتریائی ثانویه توصیه می شود از مراقبتهای موضعی (پانسمان – نظافت زخم) و آنتی بیوتیک مناسب سیستمیک استفاده نمود.

چنانچه دربیماران سنگین وزن ، بیش از ۲ آمپول گلوکانتیم روزانه لازم باشد در دو دوز منقسم (صبح و شب) تزریقات انجام شود.

توصیه می شود از دستکاری زخم اکیداً خود داری شود.

رژیم های درمانی دیگری هم وجود دارند که در صورت نیاز بایستی توسط متخصصین پوست تجویز گردند.

درصورت بروز هرگونه واکنش در محل تزریق (قرمزی . گرمی ، درد ، تورم) و علائم سیستمیک (شکایتهای قلبی ، یرقان ، مشکلات ادراری) درمان قطع و بیمار به پزشک متخصص ارجاع گردد.

تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز

لیشمانیوز پوستی

به تظاهرات بالینی ناشی از انگل لیشمانیا در پوست ،لیشمانیوز جلدی یا سالک گویندکه در دنیای قدیم از جمله ایران عمدتا به دلیل لیشمانیا ماژور ویالیشمانیا تروپیکا ایجاد می شود.اصولا پیش از استفاده از روش های آزمایشگاهی برای تشخیص انواع لیشمانیوزها،بررسی سابقه بیماری واطلاع از محل سکونت و مسافرت به مناطق بومی این بیماری در کشورونیز توجه به خصوصیات بالینی بیماری،بسیار مهم و کمک کننده خواهد بود.در آزمایشگاه سه نمونه(گسترش)از نقاط مختلف ضایعه تهیه می شود.بهتر است از بیمارانی که دارای چند ضایعه هستند،چند نمونه از ضایعات مختلف گرفته شود.نمونه ها بایستی در اسرع وقت مورد بررسی قرار گیرند،در صورتی که یک نمونه منفی باشد،نمونه دوم و سپس نمونه سوم بررسی می شوند.ولی اگر یک نمونه مثبت باشد ،نیاز به بررسی نمونه های دوم و سوم نیست.

روش نمونه برداری ازضایعات مشکوک به سالک و بررسی میکروسکوپی:

لبه ملتهب ومتورم ضایعه مهمترین قسمتی است که بیشترین تراکم آماستیگوت ها را دارند.هرچه نمونه بیشتری از بافت برداشته شوداحتمال مشاهده انگل در نمونه بیشتر است.از آنجایی که ضایعات پوستی ممکن است دچار عفونت های ثانویه ی باکتریایی و قارچی باشند،لازم است محلی از ضایعه را که قصد برداشت نمونه از آن وجود دارد،کاملا تمیز نموده و اگر لازم باشدچندین مرتبه باپنبه الکل(اتانول ۷۰درصد)ضد عفونی گردد.

محلی از ضایعه که برای نمونه برداری در نظرگرفته می شود،بایستی توسط دو انگشت شست و سبابه محکم گرفته شده و ثابت گردد.با استفاده از یک اسکالپل استریل نوک باریک،شکافی به عمق یک میلی متر در محل گرفته شده با انگشتان ایجاد گردد.از عمق محل شکافته شده به طرف سطح ومرکز ضایعه چند خراش داده شود.وسیله نمونه گیری را بیرون آورده و ازترشحات حاصله بر روی لام گسترش تهیه شودومشخصات بیمار با قلم الماس روی لام حک گردد.سپس گسترش فیکس گردد با رنگ گیمسا رنگ آمیزی شود.لام با عدسی ۱۰۰وروغن ایمرسیون در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرارمی گیرد.تشخیص مثبت شامل دیدن انگل لیشمانیا به طور واضح می باشد.در هر لام تا زمان مشاهده جسم لیشمن باید حداقل ۳۰شان مناسب که دارای سلول های ماکروفاژ باشدبررسی گرددتا شانس دیدن انگل بیشتر شودو در صورت منفی بودن نمونه لام دوم و سوم مورد بررسی قرار گیرد.درصورت مشاهده گلبول قرمز فراوان و ندیدن جسم لیشمن این نمونه مناسب ارزیابی نبوده ونمونه جدید عاری از خون وحاوی ماکروفاژ بایستی تهیه شود.

از آنجاییکه میزان آنتی بادی ایجاد شده در لیشمانیوز پوستی بسیار ناچیزاست،لذا استفاده ازآزمایشات سرولوژی به علت حساسیت پایین آن بجز در موارد خاص توصیه نمی شود.

لیشمانیوز احشایی

نمونه‌برداری از ضایعات احشایی وانجام آزمایش‌های انگل‌شناسی

برای مشاهده مستقیم اجسام لیشمن می‌توان از سیستم رتیکولوآندوتلیال خصوصا از طحال، مغزاستخوان، کبد و غدد لنفاوی فرد بیمار نمونه‌برداری کرد. براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت میزان حساسیت طحال برای مشاهده انگل لیشمانیا، ۹۰ تا ۹۸ درصد، مغز استخوان ۵۴ تا ۸۶ درصد، کبد حدود ۶۰ درصد و غدد لنفاوی حدود ۶۴ درصد است. علیرغم آنکه احتمال مشاهده آماستیگوت‌ها در نمونه تهیه شده از طحال بیمار بسیار زیاد است ولی به‌علت خطرات و عوارض ناشی از نمونه برداری طحال، در حال حاضر در ایران، از نمونه‌های تهیه شده از مغزاستخوانهای ایلیاک، استرنوم و تیبیا استفاده می‌شود. حساسیت تشخیص انگل درنمونه‌های تهیه شده از مغزاستخوان به نحوه نمونه برداری و تجربه فرد آزمایش کننده بستگی دارد. با توجه به اینکه در برشهای هیستوپاتولوژی اجسام لیشمن تغییر شکل می‌دهند، استفاده از این روش برای

تشخیص قطعی بیماری با محدویتهایی همراه است. گسترشهای تهیه شده را ابتدا با متانول خالص به مدت ۰/۵ تا ۱ دقیقه ثابت نموده و سپس با رنگ گیمسا (۱۰٪) به مدت ۳۰ دقیقه آنها را رنگ‌آمیزی می‌نمایند. پس‌از شستشوی آنها با آب معمولی، با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگترین درشت‌نمایی (X1000) به جستجوی اجسام لیشمن می‌پردازند. اگر پروماستیگوت‌ها در شرایط استاندارد کشت داده شوند، این روش حساسیت زیادی دارد، لذا توصیه می‌شود همراه با آزمایش مستقیم، کشت در محیط های اختصاصی خصوصا محیط NNN نیز انجام شود. جهت کشت، مقداری از نمونه‌های تهیه شده را با رعایت کلیه شرایط آسپتیک به محیط کشت منتقل و در دمای ۲۴ـ ۱۸ درجه سانتیگراد نگهداری می‌کنند. با توجه به گونه لیشمانیا و خصوصیات محیط کشت مورد استفاده، پس از چند روز تا چند هفته شکل پروماستیگوت انگل در محیط رشد می‌کند. برای جلوگیری از تاثیر عوامل بازدارنده بر رشد انگل بهتر است مقدار کمی از نمونه (یک یا دو قطره) به محیط کشت منتقل شود. چنانچه پس از دو هفته پروماستیگوت در محیط کشت مشاهده نشد، توصیه می‌شود مجددا یک پاساژکور انجام شود و چنانچه پس‌از دو هفته دیگر، انگلی در محیط کشت دیده نشد، نتیجه کشت منفی تلقی شود. برای جلوگیری ازآلودگیهای باکتریایی و قارچی استفاده از آنتی‌بیوتیکهای مناسب توصیه می‌شود.

روش‌های سرولوژی

در حال حاضر از روشهای سرولوژی به شکل گسترده جهت تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی استفاده می‌شود.

الف) روشهای سرولوژی اختصاصی:

در روشهای سرولوژی اختصاصی به میزان کمی سرم یا پلاسمای خون (حدود ۱۰ میکرولیتر) نیاز است که آن را می‌توان به وسیله لانست از نوک انگشت و یا پاشنه پای کودکان در لوله‌های میکروهماتوکریت تهیه کرد. روشهای مختلف سرولوژی برای جستجوی پادتن‌های اختصاصی بر علیه لیشمانیا استفاده شده است که از بین آنها با توجه به حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی، کارایی، سهولت انجام آزمایش و صرفه اقتصادی روشهای زیر پیشنهاد می‌شوند. لازم به یادآوری است درآزمایشهای سرولوژی معمولا از پروماستیگوت‌های کمپلکس لیشمانیا دونووانی خصوصا لیشمانیا اینفانتوم، که در محیطهای کشت اختصاصی به تولید انبوه رسیده‌اند، به عنوان آنتی‌ژن استفاده می‌شود.

۱- روش ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم IFA Indirect Fluorescent=(Antibody)

حساسیت و ویژگی این روش حدود۹۰٪ می‌باشد و در شرایط آزمایشگاهی مناسب است. در سرم فرد مبتلا به لیشمانیوز احشایی پادتن اختصاصی ایجاد می‌شود و این پادتن با پادگن لیشمانیا که به صورت دایره‌هایی

به قطر یک سانتیمتر روی لام میکروسکوپی قرارداده شده است، مجموعه پادگن ـ پادتن ایجاد می‌کند. در صورت افزودن پادتن ضد گلوبولین انسانی که با ماده فلوئورسین ایزوتیوسیانات نشاندار شده است (کونژوگه)، مجموعه حاصله در زیر نور میکروسکوپ فلوئورسنت به رنگ سبز درخشان مشاهده می‌شود. تعیین عیار مرزی به نوع آنتی‌ژن تهیه شده، روش انجام آزمایش و حتی فرد قرائت کننده بستگی خواهد داشت و لذا نتایج حاصله در مراکز گوناگون ممکن است با یکدیگر قابل مقایسه نباشند. مطالعات انجام شده دردانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران نشان داده‌اند که عیارهای ۱:۱۲۸ و بالاتر همراه با علایم اختصاصی لیشمانیوز احشایی می‌توانند نمایانگر بیماری لیشمانیوز احشائی باشند. آزمایش IFA ممکن است با انگل‌ها و یا باکتری‌هایی مانند مالاریا، تریپانوزوما، سل و حصبه واکنش متقاطع داشته باشد و وجود عامل روماتوئید در خون و نیز پادتن‌های ضد هسته سلولها (لوپوس اریتماتوس سیستمیک) ممکن است باعث نتایج مثبت کاذب شوند. جهت انجام IFA می‌توان از کیت‌های تهیه شده داخلی و یا خارجی مورد تایید آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت و مطابق دستور العمل‌های مربوطه استفاده نمود.

۲- روش الایزا (ELISA = (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

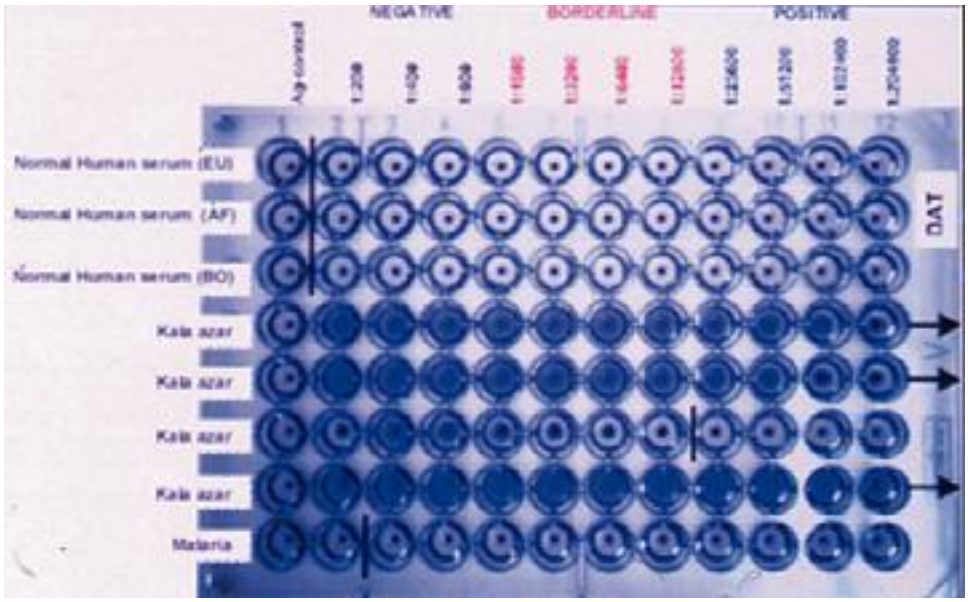
حساسیت این روش بین ۸۰ تا ۱۰۰٪ است ولی ویژگی آزمایش به فاکتورهای زیادی از جمله نوع آنتی‌ژن مورد استفاده بستگی دارد. اصول این روش مشابه ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم است، با این تفاوت که از یک سیستم آنزیمی (آلکالن فسفاتاز و یا پراکسیداز) و سوبستراهای اختصاصی استفاده می‌شود. در این روش از پلیت‌های ته صاف مخصوص الایزا استفاده می‌شود و ۱۰۰ میکرولیتر از پادگن تهیه شده در بافر پوشش دهنده (رقت ۱:۲۰۰) به هر چاهک می‌افزاییم و یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در اتاقک مرطوب نگهداری می‌کنیم و پس از شستشو با بافر شستشو، هر پلیت را جداگانه در کاغذ آلومینیومی می‌پیچیم و پس از بسته‌بندی در کیسه نایلونی در برودت ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان مصرف نگهداری می‌کنیم. پلیت‌های مذکور را معمولا تا مدت ۶ ماه می‌توان مورد استفاده قرار داد. جهت انجام ELISA می‌توان از کیت‌های تهیه شده داخلی و یا خارجی مورد تایید آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت و مطابق دستور العمل‌های مربوطه استفاده نمود. عیارهای مرزی بر اساس دستورالعمل هر کیت و نیز برخی محاسبات آماری خاص در نظر گرفته می‌شود.

۳- آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم (DAT = (Direct Agglutination Test

آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم روشی ساده برای تشخیص لیشمانیوز احشایی می‌باشد و مطالعاتی که در مناطق بومی بیماری درایران و جهان انجام گرفته حساسیت این روش ۱۰۰-۹۵٪ و ویژگی آن ۱۰۰-۸۶٪ تعیین گردیده است. در این روش از فرم تاژکدار انگلهای لیشمانیا اینفانتوم بعنوان آنتی‌ژن استفاده می‌شود. آنتی ژن در مجاورت رقتهای گوناگون سرم یا پلاسمای فرد مشکوک به بیماری قرار داده می‌شوند که در

صورت وجود پادتن اختصاصی پدیده آگلوتیناسیون ایجاد می‌شود. آخرین حفره‌ای که در آن حلقه آبی کامل تشکیل شده باشد، به عنوان عیار نهایی در نظر گرفته می‌شود. طبق مطالعات فراوانی که در واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است، عیارهای ۱:۳۲۰۰ و به بالا همراه با علایم بالینی اختصاصی به عنوان ابتلای فرد به کالا آزار تلقی می‌شود. عیارهای ۱:۸۰۰ و به پایین منفی و عیار ۱:۱۶۰۰ به عنوان عیار مشکوک تلقی می‌شود که برای تایید باید یکبار دیگر به فاصله ۳ـ۲ هفته نمونه برداری انجام شود و چنانچه افزایش قابل توجه عیار پادتن ملاحظه شود و در صورت بروز علایم بالینی اختصاصی، بیماری کالا آزار تأیید می‌شود.

تذکر: از سال ۱۳۷۵ آنتی‌ژن آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) به طور فعال در آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه می‌شود و به کمک مرکز مدیریت بیماریها جهت تشخیص آزمایشگاهی و مطالعات سرو اپیدمیولوژی در مناطق اندمیک لیشمانیوز احشائی مورد استفاده گسترده قرار می‌گیرد.



۴- آزمایش سریع سرولوژی با استفاده از استریپ‌های تهیه شده از آنتی‌ژن نوترکیب rK39

از روش‌های سریع جستجوی آنتی‌بادی جهت تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشائی می‌توان به دیپ استیک‌های حاوی آنتی‌ژن نوترکیب rK39 اشاره نمود. از محاسن این روش‌ها سرعت انجام آزمایش است که معمولاً در مدت حدود ۲ تا ۱۰ دقیقه نتیجه آزمایش مشخص می‌گردد. اخیرا کیت‌های مخصوصی از آنتی‌ژن نوترکیب rK39 توسط شرکت‌های مختلف ساخته شده است که با یک قطره سرم یا خون کامل و یک قطره بافر یا سرم فیزیولوژی آزمایش انجام می‌شوند. مخلوط حاصله با استفاده از خاصیت کروماتوگرافی پس از برخورد با کونژوگه رنگی به سمت بالا حرکت می‌کند و در صورت وجود آنتی‌بادی اختصاصی با آنتی‌ژن rK39 ایجاد کمپلکس رنگی می‌کند که به شکل یک خط بنفش رنگ دیده می‌شود. نمونه مورد نظر علی‌رغم نتیجه مثبت و یا منفی به سیر خود ادامه می‌دهد تا به ناحیه‌ای که بوسیله ضد پروتئین A پوشانیده شده است برخورد نماید و ایجاد خط رنگی دیگری می‌نماید. این خط به عنوان خط شاهد در نظر گرفته می‌شود و وجود آن دلیل بر کافی بودن حجم نمونه و صحت انجام آزمایش است. از محاسن آزمایش Dipstick rK39 سرعت بالا و سادگی آزمایش است و جهت غربالگری لیشمانیوز احشائی علائم دار کاربرد دارد.

ب) روشهای سرولوژی غیراختصاصی

این روشها بر پایه افزایش ایمونوگلوبولین‌های سرم خون استوار است و به هر دلیلی که میزان پادتن در خون افزایش یابد، نتایج حاصل از این روشها مثبت خواهند شد، لذا به‌عنوان روشهای غیراختصاصی تلقی می‌شوند. یکی از مهمترین این روشها عبارتند از:

آزمایش فرمل ـ ژل یا ناپیرآلدئید

در این روش یک میلی‌لیتر از سرم را با یک قطره فرمالین تجارتی (۳۷٪) مخلوط می‌کنند. چنانچه پس از گذشت ۳ تا ۲۰ دقیقه سرم مورد نظر کدر شد و یا به شکل لخته درآمد، نتیجه حاصله مثبت است و در غیر این صورت منفی تلقی می‌شود. این آزمایش غیراختصاصی است و به هر علت که پادتن‌های سرم افزایش یابند (مالاریا، حصبه، تب مالت و غیره) نتیجه این آزمون مثبت می‌شود. در مناطق دور افتاده و بومی بیماری، در صورتی که آزمایشهای اختصاصی انگل‌شناسی و سرم‌شناسی امکانپذیر نباشد، از این آزمایش اختصاصی می‌توان استفاده کرد و در صورت وجود علایم بالینی و شواهد اپیدمیولوژیک، بیمار را می‌توان تحت درمان و مراقبت قرار داد. لوکوپنی همراه با افزایش نسبی مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌های خون محیطی را نیز می‌توان به عنوان یک روش غیراختصاصی برای تشخیص کالا آزار مد نظر قرار داد.

ج) روشهای مولکولی

در حال حاضر از روشهای مولکولی خصوصا PCR برای تعیین گونه انگلهای لیشمانیا استفاده می‌شود. در سالهای اخیر از روشهای PCR-ELISA، PCR و PCR Rapid fluorogenic برای تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوزها استفاده شده است که اکثرا نتایج مطلوبی به همراه داشته‌اند. در حال حاضر روشهای مولکولی برای تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز بیشتر جنبه پژوهشی داشته و برای تایپینگ استفاده می شود.

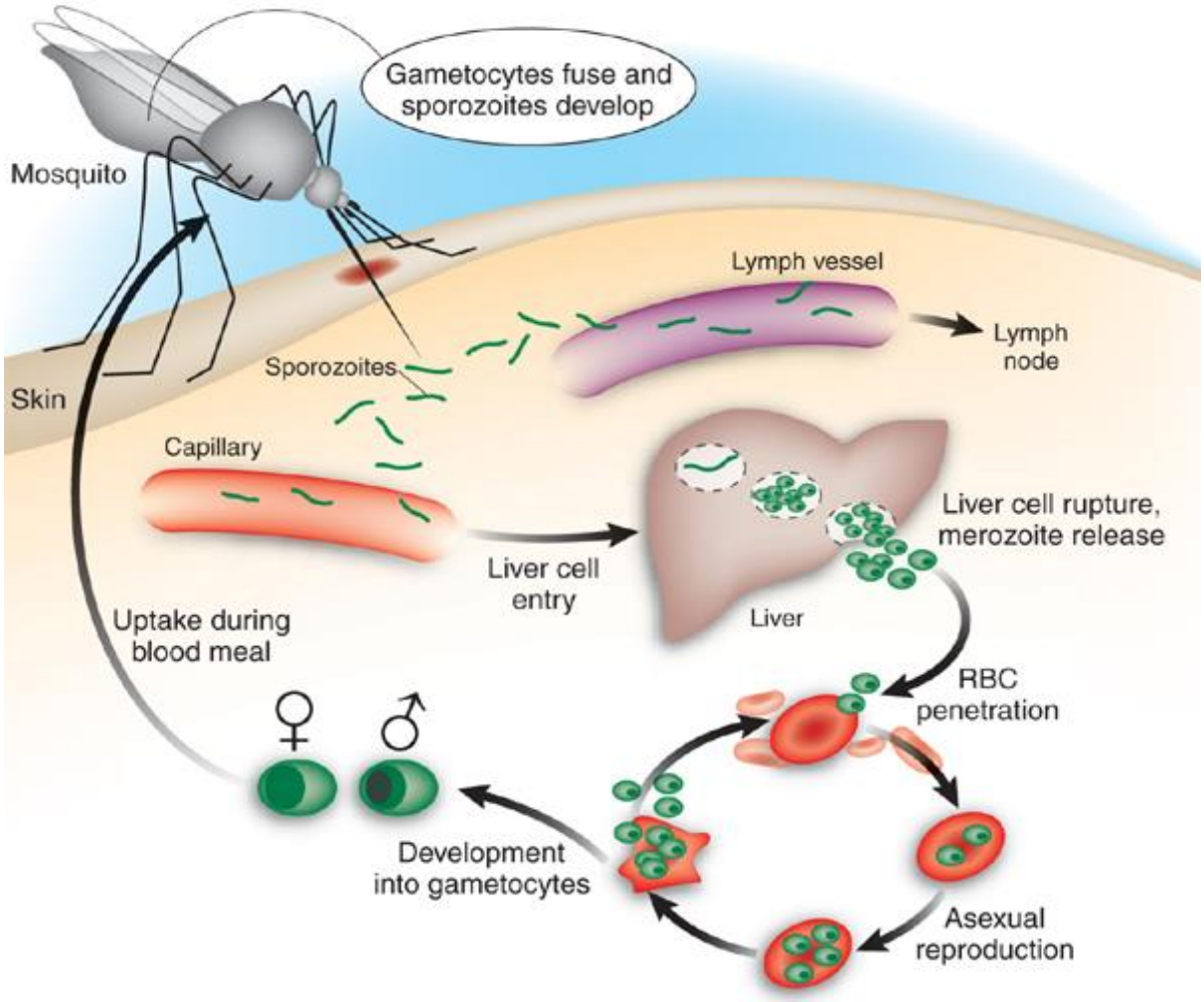
تشخیص لیشمانیوز احشایی در مبتلایان به ایدز

لیشمانیوز احشایی به عنوان یک عفونت فرصت‌طلب مهم در میان افراد آلوده به HIV-1 به‌شمار می‌رود. مطالعات اخیر نشان می‌دهند تعداد سلولهای CD4 در ۹۰٪ مبتلایان کمتر از ۲۰۰ عدد در هر میکرولیتر خون است. پادتن ضد لیشمانیا ممکن است در این بیماران، قابل ردیابی نباشد، به خصوص اگر ابتلا به بیماری ایدز پیش از ابتلای فرد به لیشمانیوز ایجاد شده باشد. روشهای سرولوژی اختصاصی در بیماران با عفونت همزمان لیشمانیوز و ایدز، نسبت به بیماران با سیستم ایمنی سالم حساسیت پایین‌تری دارد (حساسیت این روش‌ها در این بیماران حدود ۵۰٪ می‌باشد در صورتی که حساسیت این روش‌ها در بیمارانی که به عفونت HIV مبتلا نیستند، بیش از ۹۰٪ می باشد). اصولا جستجوی آنتی‌ژن جهت تشخیص لیشمانیوز احشائی خصوصا در مبتلایان به ایدز بسیار اختصاصی‌تر از جستجوی آنتی‌بادی است. یکی از روش‌های سریع جهت جستجوی آنتی‌ژن لیشمانیا روش کاتکس (KAtex) است . آنتی‌ژن هدف در این روش مولکول کربوهیدراتی است (KDa20-5) که جزئی از ساختمان دیواره پروماستیگوت و آماستیگوت انگل است. در حال حاضر کیت تجاری توسط شرکت ,UK Kalon Biological با نام KAtex ساخته شده است. جهت انجام آزمایش، نمونه ادرار فرد مشکوک به لیشمانیوز احشائی را برای حذف موادی که باعث

نتایج مثبت کاذب می‌شوند به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده و پس از سرد شدن یک قطره (۵۰ میکرولیتر) از آن را با یک قطره لاتکس مخلوط نموده که در صورت مثبت بودن نتیجه، واکنش آگلوتیناسیون پس از دو دقیقه ایجاد می‌شود که با چشم غیرمسلح قابل رؤیت است.

تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی در مبتلایان به ایدز از طریق انگل‌شناسی به کمک نمونه‌برداریهای غیرتهاجمی مانند آزمایش خون محیطی بیماران، آسانتر و حساستر است. انگلهای لیشمانیا در این گونه بیماران معمولا در سیتوپلاسم مونوسیت‌های خون یافت می‌شوند. در گسترش خون محیطی رنگ شده با گیمسا حدود ۵۰٪ و در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده و یا کشت‌شده بافی‌کوت حدود ۷۰ تا ۷۵٪ موارد ممکن است انگلهای لیشمانیا مشاهده شوند. روشهای تهاجمی تشخیص انگل از قبیل پونکسیون مغز استخوان در این قبیل افراد از حساسیت بسیار بالایی برخوردار است، زیرا بار انگلی در این بیماران بسیار بالاست.

مالاریا


Gametocytes fuse and sporozoites develop
Mosquito
Lymph vessel
Lymph node
Sporozoites
Skin
Capillary
Liver cell rupture, merozoite release
Liver cell entry
Liver
Uptake during blood meal
RBC penetration
Development into gametocytes
Asexual reproduction

مالاریا مهم‌ترین بیماری انگلی و یکی از مسایل مهم بهداشتی تعدادی از کشورها بخصوص کشورهای 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، کم‌خونی و بزرگی طحال و گاه با ویژگیهای ساده یا کشنده دیگر خودنمایی می‌کند. اهمیت این بیماری به خاطر شیوع زیاد و مرگ‌ومیر قابل توجه‌است. انگل مالاریا توسط یک تیره از پشه به نام آنوفل به انسان منتقل می‌شود که این تیره شامل چندین گونه است.

کلمه مالاریا یک کلمه ایتالیایی و به معنای هوای بد (Mal-Aria) است و منظور از آن تعریف بیماری با ویژگیهای تب متناوب است که ایتالیایی‌ها در گذشته وجود آن را ناشی از هوای بد و مناطق باتلاقی می‌دانستند. همواره با گرم شدن زمین، شیوع این بیماری افزایش می‌یابد.

تاریخچه باستان

علائم بیماری مالاریا در نوشته‌های چین باستان توضیح داده شده‌است. ۲۷۰۰ سال پیش از میلاد چند علامت مشخص مالاریا که بعداً به نام بیماری مالاریا نام گرفت . بیماری مالاریا در یونان تا قرن چهارم قبل از میلاد به خوبی شناخته می‌شد. بقراط علایم اولیه این بیماری را شرح داد.

کینین (پوست درخت گنه گنه)

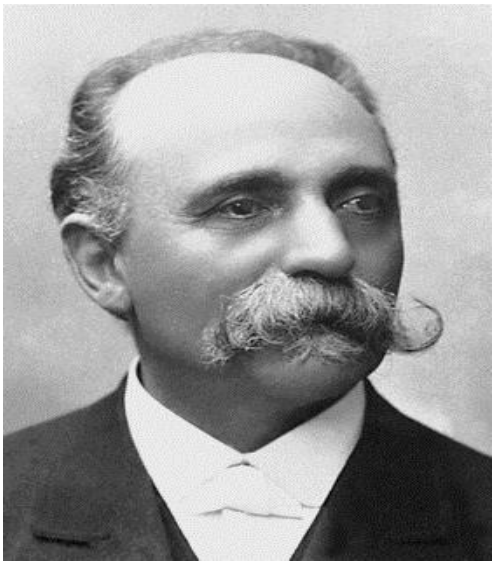
در آمریکای جنوبی، مبلغان مذهبی مذهب انجمن عیسی خاصیت دارویی پوسته درختی را از قبایل بومی هند یادگرفتند. به واسطه همین پوسته درخت زن اشرافی (کنتس) چینکون کشور اسپانیا از تب نجات یافت. بعدها این پوسته درخت به نام پوست درخت پرویی و درخت آن نیز به نام سینکونا ((به انگلیسی: Cinchona))و یا گنه گنه نامیده شد. ماده‌ای که در پوسته این درخت وجود دارد به نام کینین معروف است. کینین یکی از داروهای موثر ضد مالاریا می‌باشد.

کشف انگل مالاریا (۱۸۸۰)

تصویر لاوران

چارلز لوییس آلفونس لاوران((به انگلیسی: Charles Louis Alphonse Laveran)) جراح فرانسوی ارتش بود که در شهر کنستانتین واقع در شمال شرقی الجزایر سکونت داشت. او برای اولین بار وجود انگل مالاریا را در خون افراد مبتلا به مالاریا توضیح داد. به خاطر این کشف او در سال ۱۹۰۷ جایزه نوبل را دریافت کرد.

فرق‌گذاری بین گونه‌های مالاریا (۱۸۸۶)



کامیلوگلژی

کامیلو گلژی فیزیولوژیست اعصاب که اهل ایتالیا بود توضیح داد که بیماری مالاریا حداقل دارای دو شکل متفاوت است. یکی با دوره تب سه‌روزه (تب بعد از ۲ روز) و دیگری دوره چهار روزه (تب بعد از ۳ روز). همچنین او مشاهده کرد که هرکدام از اشکال بیماری شکلهای متفاوتی از مروزوییت را تولید می‌کنند که تب در اثر بلوغ و رهاشدن آنها در خون اتفاق می‌افتد. او در سال ۱۹۰۶ جایزه نوبل فیزیولوژی اعصاب را به خاطر این کشف دریافت کرد.

لازم به ذکر است پزشک شهیر ایرانی ، ابوعلی سینا نیز بیماری مالاریا را شرح داده است .

ایجاد بیماری مالاریا

بیماری مالاریا مهم ترین بیماری انگلی بشر است که حدود ۳ میلیارد نفر از جمعیت جهان را تهدید می کند.

شروع بیماری مالاریا با گزش پشه آنوفل است. پشه آنوفل ماده شب ها خونخواری می کند و حین خونخواری از بزاق خود، انگل های مالاریا (اسپوروزوییت ها) را به داخل خون انسان تزریق می نماید. این انگل ها وارد سلول های کبد می شوند و شروع به تکثیر سریع می کنند، به طوری که از هر یک انگل وارد شده حدود ۱۰ هزار انگل تولید می شود. سپس این انگل ها سلول های کبدی را پاره می کنند و وارد خون

می شوند تا به گلبول های سرخ حمله ور شده و وارد آنها شوند و در آنجا تکثیر کنند. انگل مالاریا پس از ورود به گلبول قرمز از هموگلوبین استفاده و تولید مثل می کند و پس از ۲ تا ۳ روز تمام هموگلوبین مصرف شده و گلبول قرمز پر از انگل می شود. سپس انگل ها گلبول های قرمز را پاره می کنند و به گلبول های دیگر وارد می شوند. به این ترتیب تعداد انگل ها در خون بیشتر و بیشتر می شود.

زمانی که تعداد انگل مالاریا از حد خاصی بالاتر رود، بیمار دچار تب می شود. شروع تب همزمان با پاره شدن گلبول هاست و پس ازآن که انگل ها وارد گلبول های تازه می شوند، تب قطع می شود و این سیکل هر ۲ یا ۳ روز تکرار می شود؛ یعنی بیمار ۲ روز تب ندارد و روز سوم تب می کند. به این ترتیب ۲ مشکل اساسی در بیماری مالاریا وجود دارد؛ یکی ایجاد کم خونی شدید به دلیل استفاده انگل از هموگلوبین خون و دومی تب های دوره ای است که گاهی حرارت بدن تا بالای ۴۰ درجه می رسد و بدن بیمار را عملا از کار می اندازد.

زندگی انگل مالاریا دو مرحله ای است. به این ترتیب که با گزش پشه آنوفل ماده انگل های مالاریا از انسان به روده پشه وارد و آنجا تولید مثل کرده وپس از تکثیر وارد غدد بزاقی پشه می شوند و منتظر می مانند تا در خونخواری های بعدی به افراد سالم منتقل شوند و دوره جدید زندگی را آغاز کنند. دمای محیط، عامل مهمی در انتشار مالاریاست زیرا در هوای گرم انگل هایی که وارد بدن پشه آنوفل می شوند، سریعا تولید مثل کرده و آماده سرایت به افراد سالم می شوند؛اما در هوای خنک مدت زیادی جهت تولید مثل انگل در بدن پشه به طول می انجامد و در این مدت طولانی بسیاری از پشه ها که عمر کوتاهی دارند، از بین می روند و چرخه انتقال مالاریا قطع می شود.

چرخه زندگی انگل

سیر تکاملی انگل در دو میزبان انجام می‌شود. در مورد مالاریای انسان میزبان اصلی انگل پشه آنوفل ماده‌است و دوره جنسی (Sporogony) در این میزبان طی می‌شود و دوره غیرجنسی (Schizogony)در بدن انسان طی می‌شود. علاوه بر این گامت جنسی (Gametocyte) در انسان به وجود می‌آید که اصطلاحاً دوره گامتوگونی (Gametogony) می‌گویند. هنگامی که پشه آنوفل ماده آلوده به انگل مالاریا از انسان خونخواری می‌کند اسپوروزوییت‌های موجود در غدد بزاقی پشه آنوفل به انسان منتقل می‌شود. اسپوروزوییت‌ها به سلول‌های کبد وارد شده و پس از رشد و تکثیر به شیزونت (Schizont) تبدیل می‌شود. شیزونت‌ها پس از بالغ شدن مروزوییت‌ها را آزاد و وارد جریان خون می‌کنند و سپس وارد گلبول‌های قرمز می‌شود و در آنجا پس از مرحله تشکیل حلقه به تروفوزوییت تبدیل می‌شود. تروفوزوییت پس از بلوغ گلبول‌های قرمز را پاره کرده دسته‌ای از این تروفوزوییت‌ها به جریان خون محیطی رفته و تبدیل به سلول‌های جنسی نر (Microgametocyte) و سلول‌های جنسی ماده (Macrogametocyte) تبدیل

می‌شود و دسته دیگر وارد گلبول‌های قرمز سالم می‌شود و در آنجا پس از تکثیر و رشد دوباره به شیزونت تبدیل می‌شود و این شیزونت‌ها مروزوییت‌ها را آزاد می‌کنند و این مروزوییت‌ها وارد گلبول‌های قرمز سالم می‌شود و چرخه دوباره تکرار می‌شود.

چنانچه پشه آنوفل ماده سالم از خون بیمار تغذیه کند سلول‌های جنسی وارد بدن پشه می‌شود و چرخه جنسی انگل آغاز می‌شود. در معده پشه سلول‌های جنسی نر و ماده باهم لقاح پیدا می‌کنند و تبدیل به سلول تخم (زیگوت) می‌شود سپس سلول تخم دراز و متحرک می‌شود که در این حالت به آنها اووکینت (Ookinet) می‌گویند. اووکینت‌ها در دیواره معده پشه رشد کرده به اووسیست (Oocyst) تبدیل می‌شود. اووسیست‌ها رشد کرده و بعد از پاره شدن اسپروزوییت‌ها آزاد می‌شوند و این اسپوروزوییت‌ها وارد غدد بزاقی پشه می‌شوند و چنانچه این پشه فرد سالمی را نیش بزند این اسپوروزوییت‌ها وارد بدن فرد شده و چرخه دوباره تکرار می‌شود.

- لازم است ذکر شود چرخه جنسی در پشه در حدود ۱۰ تا ۲۰ روز طول می‌کشد و پشه حدود ۱ تا ۲ ماه آلوده می‌ماند. چنانچه پشه زودتر ۷ تا ۱۰ روز شخصی را نیش بزند شخص به مالاریا مبتلا نمی‌شود.
- در مدت دوره کمون شخص آلوده هیچگونه علامتی ندارد و اسپوروزوییت‌ها حداقل ۸ روز و حداکثر چند ماه بعد از سلول‌های کبدی خارج می‌شوند.
- علت بروز لرز در بیماران مبتلا به مالاریا پاره شدن گلبول‌های قرمز است که اولین علامت در حمله بیماری است سپس بروز تب و ورود انگل به داخل خون و تعریق که در مرحله آخر و هم‌زمان با ورود انگل به داخل گلبول قرمز اتفاق می‌افتد.
- چنانچه خون شخص مبتلا به مالاریا به بدن شخص سالمی تزریق شود فرد سالم مبتلا به مالاریا می‌شود چون دسته‌ای از سلولهای جنسی می‌توانند مستقیماً به اسپوروزوییت تبدیل شوند.
- مالاریا می‌تواند در موارد نادر از مادر بیمار به جنین منتقل شود.
- در ابتلا به مالاریای فالسیپاروم در هر حمله حدود ۱۰ درصد از گلبول‌های قرمز پاره می‌شود و به همین علت احتمال مرگ زیاد و ادرار به رنگ قهوه‌ای یا سیاه دیده می‌شود.
- انگل‌های پلاسمودیوم اوال و پلاسمودیوم ویواکس مرحله غیرفعال کبدی دارند، بطوریکه می‌توانند ماه‌ها ویا سالها به صورت نهفته باقی بمانند و چنانچه تشخیص داده نشوند ممکن است دوباره فعال شوند و وارد جریان خون بشوند بدون اینکه شخص بیمار علایمی داشته باشد. در علم پزشکی اصطلاحاً این دو انگل را هیپنوزوییت (hypnozoites) و مرحله نهفتگی آنها را فاز کریپتوبیوتیک (cryptobiotic phase) می‌گویند.

دوره کمون

دوره نهفتگی یا کمون مدتی است که بین گزش پشه آلوده تا آشکار شدن نشانه‌های ظاهری بیماری و از همه شایع‌تر تب وجود دارد. مدت دوره کمون بسته به نوع انگل و طبیعت بیماری متفاوت است. این مدت در مالاریای فالسیپاروم به طور متوسط ۱۲ (۹تا۱۴)روز، در مالاریای ویواکس ۱۴ (۸تا۱۷)روز، در مالاریای مالاریه ۲۸ (۱۸تا۴۰)روز و در مالاریای اوال ۱۷ (۱۶تا۱۸)روز است.

منبع عفونت

منبع مهم بیماری افرادی هستند که اصول بهداشتی را رعایت نمی‌کنند و کمتر از دیگران درصدد درمان خود بوده و از پشه بند استفاده نمی کنند ، بیشتر کودکان ۲تا۹ ساله هستند که به علت عدم ایمنی و تعداد زیاد گامتوسیت (سلول جنسی) در خون محیطی، خوابیدن در اوایل شب و نداشتن پوشاک مناسب برای بیماری عوامل مناسبی هستند. مساله مالاریای انسانی با منبع حیوانی با کشف یک مورد پلاسمودیوم ناولزی (Pl.Knowlesi)که به طور طبیعی در کشور مالزیا منتقل شده و یک مورد پلاسمودیوم سیمیوم (Pl.Simium)که به طور طبیعی نزد انسان در برزیل مشاهده شده، دوباره مطرح است. انتقال طبیعی بین مالاریای میمون و انسان و یا برعکس بین انسان و میمون در دیگر مناطق نیز امکان دارد. مطالعه‌های جدید در آمریکا و مالزیا روی پلاسمودیوم سینومولژی (Pl.Cynomolgi) و پلاسمودیوم اینوی (Pl.Inui)و پلاسمودیوم برزیلیانوم (Pl.Brazillianum) نشان داد که این پلاسمودیوم‌ها نه تنها از طریق خون آلوده، بلکه از طریق نیش پشه آلوده به انسان منتقل می‌شوند؛ ولی نکته مهم این است که گمان نمی‌رود جهت ریشه‌کن کردن مالاریای انسانی مالاریای میمونی بتواند مانع این امر شود .

ناقل

پشه آنوفل ناقل و میزبان نهایی انگل مالاریا است. در زیر بعضی از ویژگیهای زیست‌شناسی پشه آنوفل ذکر می‌شود:

انوع آنوفل از بین ۴۸۳ نوع آنوفلی که در دنیا شناسائی شده‌است ۷۰ گونه قادر به انتقال بیماری مالاریا می‌باشند که از این میان ۴۰ گونه در مناطق مختلف جهان به عنوان ناقل اصلی مالاریا شناخته شده‌اند. در ایران ۲۹ گونه آنوفل انتشار دارد که تا کنون ۷ گونه از آنها به عنوان ناقلین قطعی بیماری مالاریا شناخته شده‌اند. نام این ناقلین به شرح زیر است:

- آنوفل سوپرپیکتوس(A.superpictus). در تمام فلات مرکزی ایران همچنین در مناطق کوهستانی شمال و مناطق کوهستانی و تپه ماهورهای جنوب به میزان متغیر وجود دارد. همچنین در دشت‌های ساحلی کناره دریای خزر و خلیج فارس به مقدار کم وجود دارد.
- آنوفل ماکولی‌پنیس (A.maculipennis). در تمام مناطق ساحلی دریای خزر و قسمت بزرگی از دشت و مناطق نیمه کوهستانی قسمت‌های مرکزی و غربی و شرقی ایران فعال است.
- آنوفل ساکاروی (A.acharovi). این آنوفل در منطقه جنوب شرقی ساحل دریای خزر، در آذربایجان کناره رود ارس و دریاچه ارومیه، مناطق مرکزی (تهران، قزوین، همدان و اصفهان)مناطق غربی و جنوب غربی و مناطق جنوبی در استان فارس (شیراز و کازرون)پراکنده‌است.
- آنوفل کولیسیفاسیس (A.culicifacies). این آنوفل در مناطق مختلف استان بلوچستان و قسمت‌های شرقی استان هرمزگان و جنوب شرقی استان کرمان انتشار دارد.
- آنوفل استفنسی (A.stephensi[). در تمام مناطق ساحلی دشت و تپه ماهورهای مناطق جنوبی ایران (از دامنه جنوبی رشته کوه‌های زاگرس به پایین و دره‌های آن در استان‌های خوزستان، فارس، بوشهر، کرمان، هرمزگان و بلوچستان انتشار دارد. بعلاوه، این آنوفل در ایلام و گیلان غرب وجود دارد.
- آنوفل فلوویاتیلیس (A.fluviatilis). در تمام مناطق تپه ماهوری جنوب ایران دامنه جنوبی زاگرس، از منطقه قصرشیرین و گیلان غرب تا شرقی‌ترین منطقه جنوبی ایران در بلوچستان انتشار دارد.
- آنوفل دتالی (A.d'thali). انتشار آن به تقریب مشابه آنوفل فلوویاتیلیس است، به‌اضافه چند کانون محدود و مجزا، مانند یزد، محلات نزدیک همدان و حدود شرقی کویر نمک (منطقه طبس)که در این مناطق نیز فعالیت دارند.

شرایط مربوط به انسان

نژاد

سیاه‌پوستان کمتر از سفیدپوستان به مالاریای ویواکس حساس می‌باشند و این مقاومت به روشنی در رابطه با فقدان عامل خونی دافی (انگلیسی: Duffy) در این افراد است. گلبول‌های قرمز افرادی که گروه خونی دافی منفی در برابر پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم ناولزی مقاوم بوده، در حالیکه گلبول‌های قرمز دافی مثبت به سهولت آلودگی پیدا می‌کنند. در نواحی آفریقای غربی فنوتیپ دافی منفی در افراد بومی نوددرصد می‌باشد.

در یک بررسی که در سال ۱۹۸۰ توسط کاگان انجام شد، نشان داده شد که انگل مالاریا و گروه خونی آ (A)در انسان پادگن‌های (آنتی بادی) مشترک دارند و بنابراین در چنین افرادی عفونت مالاریایی توسط سیستم ایمنی بدن بهتر تحمل می‌شود. در مطالعه دیگری که روی ۴۷۶ بیمار مالاریایی در هند انجام گرفت، معلوم شد که موارد بیماری در کسانی که گروه خونی A دارند از دیگر گروه‌های خونی بیشتر است. با توجه به بررسی فراوانی گروه‌های خونی در ۱۳۰۰ فرد سالم در همان جامعه، کمترین موارد ابتلا در گروه خونی او (O) بود. همچنین مشاهده شده‌است که عده‌ای از افرادی که هموگلوبین غیر طبیعی دارند (هتروزیگوت‌های حامل Sickle cell trait)نسبت به پلاسمودیوم فالسیپاروم به خصوص در ۲ سال اول زندگی مقاومت نسبی دارند. ژن این بیماری در سیاهپوستان آفریقا و ساکنان جنوب شرقی آسیا شیوع دارد. در این افراد مولکول‌های غیرطبیعی هموگلوبین پس از آنکه اکسیژن خود را از دست دادند، بصورت توده‌ای متراکم و کمانی‌شکل در می‌ایند و در نتیجه گلبول‌های قرمز به شکل داس درمی‌ایند. به نظر می‌رسد تروفوزوییت پلاسمودیوم فالسیپاروم در مصرف این هموگلوبین غیر طبیعی دچار اشکال می‌شود، بنابراین رشد آن متوقف می‌شود. گمان می‌رود کمبود ژنیتیکی آنزیم گلوکز شش دی فسفات (G6PD)تا حدی سبب مقاومت در برابر عفونت ناشی از پلاسمودیوم فالسیپاروم می‌شود.

سن

اگرچه در مناطقی که مالاریا شدید و زیاد است، ابتلای کودکان بیشتر از بالغین است، اما وفور انگل در خون در کودکان کمتر از ۶ ماه و بزرگ‌تر است که به دلیل پادتن رسیده از مادر یا به احتمالی در اثر هموگلوبین غیر طبیعی (دنباله هموگلوبین جنینی یا F) یا تغذیه از شیر مادر است.

جنس و شغل

جنس به طور مستقیم و طبیعی در حساسیت یا مقاومت نسبت به مالاریا دخالت ندارد، ولی ممکن است از طریق شغل یا نوع پوشش تأثیر نماید، چراکه در بعضی مناطق دختران بر خلاف پسران مجبور هستند که هنگام شب پوشش کامل داشته باشند یا اینکه مردان، شب در محیط باز (مانند نگهبانی مزارع برنج یا ماهیگیری) مشغول هستند، بنابراین بیشتر در معرض نیش پشه‌ها هستند.

تشخیص آزمایشگاهی مالاریا

- **جمع‌آوری نمونه خون**

اگر چه به محض شک به مالاریا در هر زمان جمع آوری نمونه الزامی است ولی رعایت زمان خونگیری ، شناسایی گونه و مرحله زندگی انگل را امکان پذیرتر می سازد. بهترین زمان خونگیری در فواصل بین حملات لرز و قبل از شروع تب می‌باشد و معمولابدلیل عدم امکان یافتن انگل در یک نوبت خونگیری، جمع‌آوری خون و تهیه گسترش می بایست تا سه روز متوالی هر ۶-۸ ساعت ادامه یابد. بدیهی است که تهیه نمونه قبل از استفاده از هرگونه داروی ضد مالاریا دارای ارزش تشخیصی می باشد.

تهیه نمونه خون از طریق خونگیری مویرگی و وریدی امکانپذیرمی باشد، ولی استفاده از خون مویرگی ارجح است، زیرا مواد ضد انعقاد موجب تغییرات مرفولوژیکی در انگل شده بنا بر این استفاده ازخون وریدی محدود به شرایطی است که تهیه گسترش‌های مناسب با استفاده از خون مویرگی مسیر نباشد.در اینگونه موارد استفاده ازضد انعقادEDTA با رعایت نسبت دقیق با خون توصیه می گردد. در صورت عدم رعایت این نسبت امکان شسته شدن گسترش ضخیم از روی اسلاید هنگام رنگ‌آمیزی و یا عدم رنگ‌پذیری مناسب انگل وجود دارد. در هر حال در موارد خونگیری وریدی بهتر است تهیه گسترش از خون داخل سرنگ و قبل از مخلوط شدن با ماده ضد انعقاد و در صورت عدم امکان حداکثر ۱ ساعت پس از نمونه‌گیری صورت گیرد. با گذشت یک ساعت از زمان نمونه گیری، تغییرات مرفولوژیکی در ساختمان انگل ایجاد شده و حالت منقوط شدن گلبول‌های قرمز نیز از بین می‌رود ولی شکل کلی انگل حداکثر تا دو ساعت قابل تشخیص باقی می‌ماند.

تهیه گسترش های خونی

جهت تشخیص انگل از گسترش های ضخیم و نازک استفاده شده و طبق توصیه CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) در زمان پذیرش بیمار تهیه حداقل ۴ گسترش خونی شامل دو گسترش ضخیم و دو گسترش نازک ضروری می باشد.

گسترش‌های ضخیم امکان تشخیص عفونت‌های خفیف را فراهم ساخته و در واقع حجم زیادی از خون در زمان کمی بررسی می گردد، اگرچه تشخیص گونه پلاسمودیوم در این نوع گسترش ها به مهارت کافی نیاز دارد.

با بررسی گسترش‌های خونی نازک امکان تشخیص مراحل مختلف زندگی انگل و افتراق گونه‌های مختلف فراهم می گردد.

طرز تهیه گسترش های خونی نازک همانند تهیه گسترش‌های خونی معمول بوده که در آزمایشگاهها به منظور بررسی سلولهای خونی انجام می گردد. یک گسترش نازک مناسب می‌بایست در ناحیه مرکزی اسلاید واقع شده ، حاشیه‌های کناری آن آزاد ، در یک انتها ضخیم و در انتهای دیگر نازک و طول قسمت نازک آن حداقل ۲ سانتی‌متر باشد . این گسترش‌ها در دمای اتاق خشک شده و پس از خشک شدن می بایست با متانول خالص ثابت گردند.

تهیه گسترشهای ضخیم به دو صورت امکانپذیر می‌باشد:

در روش اول می‌توان پس از تماس اسلاید با قطره خون حاصل از خونگیری مویرگی با چرخاندن اسلاید (یا با استفاده از انتهای سواپ) خون را پخش کرده تا به قطر و ضخامت مناسب برسد(قطر سکه دو ریالی و ضخامتی که نوشته‌های روزنامه از پشت آن براحتی قابل خواندن نباشد.) در صورت بزرگ نبودن قطره خون و یا لخته شدن آن استفاده از این روش مناسب نمی‌باشد.

در روش دوم چند قطره خون مویرگی یا وریدی بر روی اسلاید قرار داده و با انتهای سواپ مخلوط و پخش شده تا به قطر و ضخامت مناسب برسد. با چرخاندن دورانی اسلاید به مدت ۳۰ ثانیه رشته‌های فیبرین ازبین رفته که این امر خطاهایی مانند جدا شدن گسترش از اسلاید و یا محو شدن انگل‌ها پس از رنگ‌آمیزی بدلیل وجود رشته های فیبرین را به حد اقل می رساند.

گسترش‌های ضخیم می‌بایست در سطح صاف افقی و دمای اتاق خشک شده ولی ثابت نگردند. در مناطق مرطوب می‌توان از انکوباتور ۲۵̊C برای خشک کردن گسترشها استفاده نمود ولی استفاده از دمای ۳۷̊C و یا حرارت بدلیل ثابت شدن گلبول‌های قرمز و عدم لیز کامل آنها توصیه نمی‌گردد. این گسترش‌ها در دمای اتاق در عرض ۱۲-۸ ساعت خشک می‌شوند ولی با استفاده از پنکه می‌توان این زمان را به حدود ۴-۱ ساعت تقلیل داد. در موارد اضطراری جهت تشخیص سریع می‌توان گسترش‌ها ضخیم را اندکی نازکتر از معمول تهیه نمود تا در عرض یکساعت خشک شوند.

در بعضی از آزمایشگاهها خون حاوی EDTA سانتریفوژ شده و پس از برداشتن پلاسما و بافی کوت ، از لایه‌های فوقانی گلبول‌های قرمز و پلاسمای باقیمانده گسترش نازک تهیه می‌گردد. این روش باعث تغلیظ انگل‌ها و همچنین کاهش تعداد پلاکتها در گسترش می شود. کاهش پلاکتها امکان ایجاد خطاهای تشخیصی را کاهش می دهد.گسترش‌های تهیه شده قبل از رنگ‌آمیزی می‌بایست با متانول خالص ثابت شوند.

رنگ‌آمیزی گسترش‌ها ی خونی

گیمسا مناسب‌ترین رنگ جهت رنگ‌آمیزی انگل‌های خونی می‌باشد و امکان تشخیص دانه‌های شافنر،که در پلاسمودیوم ویواکس دیده می‌شود، را میسر می‌سازد. این دانه ها در رنگ‌آمیزی‌های رایت یا رایت گیمسا بخوبی قابل تشخیص نمی‌باشند. نکته مهم در تهیه رنگ، تنظیم PH بافر رقیق‌کننده(بافر فسفات) بوده که جهت تشخیص افتراقی انواع انگل‌های خونی می‌بایست در حد ۷/۲-۷ حفظ شود. از رنگ گیمسا با غلظت‌های مختلف می‌توان جهت رنگ آمیزی گسترش ها متناسب با شرایط بیمار و به منظور تشخیص سریع استفاده نمود بطور مثال در موارد اضطراری استفاده از رنگ با غلظت ۷/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و در سایر موارد به منظور رنگ‌آمیزی بهتر ساختمان‌های داخلی انگل استفاده از غلظت‌های ۲/۵ درصد به مدت ۴۵ دقیقه و یا ۲٪ به مدت ۶۰ دقیقه توصیه می گردد. در پایان رنگ آمیزی ، شستشوی اسلایدها با بافر دارای PH ۷/۲-۷ کیفیت نهایی رنگ را بهتر می‌نماید.

کنترل کیفی رنگ و بررسی کیفیت رنگ پذیری انگل‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی گسترش‌های خونی معمولی امکانپذیر می باشد که در صورت مناسب بودن رنگ پذیری گلبول‌های قرمز، سفید و پلاکت‌ها، می توان از رنگ‌آمیزی مناسب انگل‌ها نیز مطمئن گردید.

برای آگاهی از طرز تهیه رنگ و بافر رقیق کننده می توان از کتب مرجع یا دستورالعمل استاندارد CLSI(M15-A) و یا کتاب تضمین کیفیت در تشخیص مالاریا تالیف آقای دکتر شهبازی استفاده نمود.

بررسی گسترش‌های خونی تهیه شده

بطور کلی در بررسی گسترش‌های خونی جهت شناسایی و تشخیص انگل‌ها ابتدا از درشت نمایی کم و متوسط (×۱۰و ×۴۰) میکروسکوپ جهت یافتن اجزا درشت‌تر نظیر شیزونت و گامتوسیت و نهایتاً از درشت نمایی زیاد (×۱۰۰)جهت بررسی کامل گسترش استفاده می‌گردد. برای بررسی کامل گسترش می بایست حداقل ۳۰۰ میدان با درشت نمایی زیاد (×۱۰۰)مشاهده گردد.

تشخیص انگل‌های خونی، خصوصاً چهارگونه پلاسمودیوم که در انسان ایجاد عفونت نموده و همچنین افتراق صحیح آنها از هم جهت انتخاب درمان مناسب ضروری است. افتراق این گونه‌ها با استفاده از مشخصاتی نظیر اندازه و شکل گلبول‌های قرمز آلوده، وجود یا عدم وجود دانه‌های شافنر،مورر و یا زیمن ، شکل و تعداد تروفوزوئیتها در داخل گلبول قرمز و شکل گامتوسیت‌ها امکانپذیر بوده که معمولاً تشخیص قطعی با استفاده از کنار هم قرار دادن چند یافته فوق امکانپذیر می گردد.

نکته مهم در امر تشخیص، افتراق انگل از مواردی مانند پلاکت ، رسوب رنگ، قارچ و یا باکتریهایی است که بر روی گلبول قرمز قرار گرفته‌اند. افتراق پلاسمودیوم فالسی پاروم از بابز یا نیز جهت انتخاب درمان مناسب، دارای اهمیت بوده که اگرچه این امر گاهاً در بررسی میکروسکوپی به سختی صورت گرفته، بدلیل عدم دسترسی تمامی آزمایشگاه‌ها به آزمایشهای اختصاصی نظیر تلقیح نمونه مشکوک به حیوانات آزمایشگاهی، آزمایشات سرولوژی و یا PCR کماکان تشخیص افتراقی میکروسکوپی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

تعیین میزان پارازیتمی

تعیین میزان پارازیتمی قبل از شروع درمان و جهت پیگیری اثر دارو بر روی عفونت و تعیین سوشهای مقاوم به داروی پلاسمودیوم فالسی پاروم ضروری می‌باشد که بطور معمول قبل از درمان و ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از درمان انجام می‌گیرد. در صورت موفقیت درمان میزان پارازیتمی در عرض ۲۴ ساعت اول درمان بطور مشخص کاهش می‌یابد. (تا ۵۰٪ یا بیشتر)

تعیین میزان پارازیتمی به دو روش امکانپذیر می باشد.در روش اول که فقط در گسترش‌های نازک قابل انجام بوده با حداقل مشاهده ۱۰ میدان میکروسکوپی درصد گلبول‌های قرمز آلوده به ازای شمارش ۱۰۰ گلبول قرمز گزارش می‌گردد. (مثلاً ۰/۰۵٪ یا ۱٪) در مواردی که تعداد انگل‌ها در خون کم است می توان از روش دیگری استفاده نمود که بر روی هر دو گسترش ضخیم و نازک قابل انجام است .در این روش تعداد انگل برحسب شمارش ۱۰۰ گلبول سفید اعلام می‌گردد .همچنین می‌توان مقدار انگل را در یک میکرولیتر خون نیز محاسبه نمود که برای اینکار تعداد انگل شمرده شده بر حسب ۱۰۰ گلبول سفید در تعداد کل گلبول‌های سفید خون ضرب شده و نتیجه بر عدد ۱۰۰ تقسیم می‌گردد. قابل ذکر است که در صورت کم بودن تعداد انگلها می‌توان تعداد آنها را به ازای ۲۰۰ گلبول سفید شمارش نمود.

کیت های تشخیص سریع – RTD

کیت های تشخیص سریع امکان تشخیص مبتنی بر انگل بدون محدودیت های تشخیص میکروسکوپی را فراهم آورده ، فوائد چشمگیری را در مدیریت بیماری های تبدار در مناطق دوردست به همراه داشته اند . حساسیت و ویژگی کیت های تشخیص مالاریا که در کشور استفاده می گردد در حد قابل قبولی است . حساسیت برای تشخیص عفونت های ویواکس و فالسیپاروم با عفونت های شدید و متوسط در حد ۱۰۰٪ بوده و برای تشخیص عفونت های کم انگل با کمتر از ۲۰۰ انگل در میکرولیتر حدود ۹۶٪ ارزیابی می گردد .

به نظر می رسد RDT ها یک ابزار تشخیصی بسیاز با ارزش و سریع برای تشخیص مالاریا باشند که در مناطق مالاریا خیز روستایی ، موارد اورژانس و عدم وجود میکروسکوپیست ماهر کارایی بالایی داشته باشند اما به هر حال تشخیص میکروسگوپی گلد استاندارد بوده و به هیچ وجه RDT جایگزین روش میکروسکوپی نمی باشد حتی موارد مثبت با تست سریع توسط روش میکروسکوپی باید تایید گردد مگر در مناطق اندمیک مالاریا که باید درمان ضد مالاریایی آغاز گردد و منتظر تایید میکروسکوپی نخواهند بود .

این تست ها بر اساس شناسایی آنتی ژن های انگل های مالاریا در خون لیز شده با استفاده از روش های ایمنوکروماتوگرافی انجام می شوند . این کیت از یک dipstick یا استریپ پوشیده از مونوکلونال آنتی بادی فعال شده بر علیه آنتی ژن های هدف تشکیل شده اند و انجام آنها در مدت ۳۰ دقیقه ممکن است.

در کیت موجود در کشور از آنتی ژن های زیر استفاده می کنند :

۱- آنتی ژن های رایج شامل Histidine – Rich Protein 2 قابل حل شدن در آب و تولید شده بوسیله تروفوزوئیت و گامتوسیت جوان پلاسمودیوم فالسیپاروم
۲- پلاسمودیوم لاکتات دهیدروژناز یا (pLDH) تولید شده توسط مراحل غیر جنسی و گامتوسیت های کلیه انگل های مالاریا

فواید تست های تشخیص سریع

۱- ساده
۲- سریع
۳- تفسیر ساده
۴- یادگیری ساده
۵- عدم تفسیر متفاوت توسط افراد مختلف
۶- عدم نیاز به تجهیزات مثل میکروسکوپ ، فضا ، برق و ...
۷- قابل نگهداری در شرایط معمولی
۸- مفید برای تشخیص موارد Sequestered پلاسمودیوم فالسیپاروم

معایب تست های تشخیص سریع

۱- در مورد پلاسمودیوم فلسیپاروم تا ۱۴ روز مثبت است که با مقاومت دارویی اشتباه می شود .
۲- در صورت وجود فاکتور روماتوئید کیت تشخیص سریع مثبت کاذب می شود .
۳- کیفی است . کمیت (شمارش انگلی) را نشان نمی دهد.
۴- قادر به تمایز عفونت میکس و افتراق بین ویواکس ، مالاریه و اووال نیست .
۵- در شناسایی اشکال مختلف انگل در خون (شیزونت ، رینگ ، آمیبوییید و ...) ناتوان است

تلاشهایی برای حذف مالاریا در دنیا- موفقیت و شکست (۱۹۷۸-۱۹۵۵)

تصویر تمبرهای مالاریا

با موفقیت ددت، تولید داروهایی با سمیت کمتر، تولید داروهای ضد مالاریایی موثرتر و وجود پول موجب شد تا سازمان بهداشت جهانی (WHO)در سال ۱۹۵۵ تأسیس انجمن بهداشت جهانی را با هدف حذف مالاریا در دنیا، پیشنهاد کرد. تلاشهای حذف مالاریا با تمرکز و استفاده از حشره‌کشهای ابقایی برای سمپاشی خانه‌ها، درمان بیماران با داروهای ضدمالاریا و مراقبت انجام شد. این تلاشها در ۴ مرحله انجام شد:

۱- آماده‌سازی
۲- حمله
۳- استحکام
۴- نگه‌داری

این موفقیت‌ها شامل حذف مالاریا در مناطقی که دارای آب‌وهوای گرم بودند می باشد. بعضی از کشورها مانند هند و سری‌لانکا و همچنین کشور جمهوری اسلامی ایران ، کاهش چشمگیری در موارد ابتلا به مالاریا داشتند. بعضی دیگر از کشورها مانند اندونزی، افغانستان، هایتی و نیکاراگوئه پیشرفت ناچیزی در کاهش مالاریا داشتند. اکثر بخش‌های جنوب صحرادر آفریقا اصولاً در این زمینه توفیقی نداشتند. بروز مقاومت انگل نسبت به دارو، گسترش مقاومت آنوفل‌ها به حشره‌کشها، جابجایی گسترده جمعیت، مشکل جلب حمایت مالی کشورها، کمبودو یا عدم مشارکت همه احاد اجتماع سبب طولانی شدن تلاشها برای حذف مالاریا گردید. سرانجام به علت مشکلات بالا عملیات حذف و ریشه کنی مالاریا در کشورهای مورد اشاره به کنترل مالاریا تغییر یافت اما در دیگر کشورها مانند کشور جمهوری اسلامی ایران برنامه حذف مالاریا در افق ۱۴۰۴ در برنامه های بهداشتی در حال اجرا و پیگیری می باشد لذا در این مرحله به روز بودن میکروسکوپیستها و تشخیص ، درمان و در کل پاسخ سریع بهداشتی به موراد وارده از اهمیت بالایی برخوردار بوده و مانع از برقراری مجدد چرخه انتقال مالاریا در کشور می شود .

منابع

۱- انگل شناسی جامع پزشکی تالیف دکتر عادل اسپوتین ، دکتر عباس شهبازی ، دکتر اسماعیل فلاح – انتشارات پزشکی شروین به سفارش دانشگاه علوم پزشکی تبریز سال ۱۳۹۲

۲- انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها هیئت مولفان ، دکتر ابوالحسن ندیم ، دکتر عزت الدین جوادیان ، دکتر مهدی محبعلی ، دکتر علی ضامن مومنی – مرکز نشر دانشگاهی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران سال ۱۳۸۷

۳- استانداردهای آزمایشگاه مالاریا و نکات اجرایی نظام تضمین کیفیت ، دکتر عباس شهبازی ، دکتر منصور رنجبر ؛ سال انتشار آبان ۱۳۹۴ ، مرکز مدیریت بیماری های واگیر

۴- تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز تدوین مهدی پارسایی ، صدیقه سرافراز زیر نظر دکتر مهدی محبعلی سال ۱۳۹۵ جزوه آموزشی معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز