راهنمای نمونه گیری و آماده سازی لام مالاریا

۱- اصول انجام آزمایش

از نظر انتشار و میزان ابتلا و مرگ و میر مالاریا مهمترین بیماری انگلی در جهان می باشد درکشور ما با وجود سال ها مبارزه این بیماری هنوز یکی از معضلات مهم بهداشتی به ویژه در جنوب شرقی کشور محسوب می شود در این میان نمونه گیری و تشخیص انگل مالاریاآزمایشگاه یکی از مهمترین مراحل مبارزه با مالاریا می باشد به منظور انجام کارهای میکروسکوپی معمول و رایج در تشخیص مالاریار یک گسترش ضخیم و یک گسترش نازک روی لام تهیه می شود.

۲- نوع نمونه جهت انجام تست مالاریا مطابق زیر:

نمونه ارجح:

- **خون مویرگی حاصل از خونگیری سرانگشتی**

- **نمونه قابل قبول:**

خون وریدی در لوله حاوی EDTA نیز قابل استفاده است

- **نمونه از لولهCBC**

اگر بیمار قبلاً برای **CBC**خونگیری شده باشد، می‌توان از همان **نمونه خون EDTA** برای تهیه گسترش مالاریا استفاده کرد، مشروط بر اینکه:

- نمونه به‌درستی شناسایی شده باشد .
- خون در لوله EDTA مناسب جمع‌آوری شده باشد .
- لخته وجود نداشته باشد .
- حجم و کیفیت نمونه مناسب باشد .
- نمونه تا حد امکان **بلافاصله پس از خونگیری** برای تهیه لام استفاده شود .
- تأخیر طولانی در تهیه لام وجود نداشته باشد، زیرا تأخیر می‌تواند مورفولوژی انگل و ویژگی‌های رنگ‌آمیزی را تغییر دهد CDC .نیز تهیه گسترش از خون وریدی را هرچه سریع‌تر پس از خونگیری توصیه می‌کند .

بنابراین نیازی نیست صرفاً برای بررسی مالاریا دوباره از بیمار خونگیری شود، اگر نمونه EDTA مناسب و تازه CBC در دسترس باشد.

با این حال، اگر شک بالینی به مالاریا زیاد است، **نمونه تازه خون مویرگی و تهیه فوری گسترش ضخیم و نازک** گزینه بسیار مناسبی است.

- **شرایط نمونه برداری :**

نمونه‌گیری باید در اولین فرصت پس از مطرح شدن شک بالینی به مالاریا انجام شود و نباید برای نمونه‌گیری تا زمان بروز تب یا اوج تب منتظر ماند.

- **شرایط نگهداری و پایداری:**

لام فیکس شده و رنگ آمیزی شده تا مدتها قابل بررسی میباشند.

- **شرایط رد یا قبول نمونه :**

۳- نمونه غیرقابل قبول یا نیازمند نمونه‌گیری مجدد در موارد زیر:

- عدم تطابق مشخصات بیمار و نمونه
- نمونه بدون برچسب یا با برچسب ناقص
- وجود لخته واضح در نمونه EDTA
- همولیز شدید یا وضعیت نامناسب نمونه در حدی که تهیه اسمیر را مختل کند
- حجم ناکافی نمونه
- تأخیر طولانی و نامشخص در ارسال نمونه، در صورتی که کیفیت مورفولوژیک را تحت تأثیر قرار داده باشد
- لام شکسته یا آلوده
- گسترش ضخیم بیش از حد ضخیم یا بسیار نازک
- گسترش نازک بدون feathered edge مناسب
- فیکساسیون نامناسب گسترش نازک
- فیکس شدن گسترش ضخیم
- رنگ‌آمیزی نامناسب یا وجود رسوب شدید رنگ که مانع تشخیص شود .

٤- روش انجام آزمایش:

روش نمونه‌گیری از خون مویرگی

١. دست بیمار به‌صورت مناسب قرار داده شود .
٢. معمولاً قسمت جانبی نوک انگشت مناسب انتخاب شود .
٣. محل با الکل ضدعفونی و اجازه داده شود کاملاً خشک شود .
٤. با لانست استریل سوراخ شود .
٥. اولین قطره خون پاک شود .
٦. با فشار ملایم، خون بعدی برای تهیه گسترش استفاده شود .

از فشار شدید و مکرر روی انگشت باید اجتناب شود، زیرا می‌تواند باعث مخلوط شدن خون با مایع بافتی شود.

تهیه گسترش نازک:

یک قطره کوچک خون روی لام تمیز قرار داده شود.

لام پخش‌کننده با زاویه مناسب در مقابل قطره قرار گرفته و با حرکت یکنواخت به سمت جلو کشیده شود تا یک **گسترش نازک با انتهای feathered edge** ایجاد شود.

گسترش نباید بیش از حد ضخیم باشد.

سپس لام در وضعیت افقی قرار گرفته و اجازه داده شود در هوا خشک شود.

فیکساسیون:

فقط گسترش نازک با متانول فیکس می‌شود.

گسترش ضخیم نباید قبل از رنگ‌آمیزی با متانول فیکس شود، زیرا در گسترش ضخیم باید گلبول‌های قرمز طی فرآیند رنگ‌آمیزی لیز شوند.

تهیه گسترش ضخیم

پس از تهیه گسترش نازک، چند قطره خون روی لام قرار داده شود.

قطرات با گوشه لام یا اپلیکاتور مناسب با حرکات دورانی به یک گسترش تقریباً دایره‌ای تبدیل شوند.

گسترش ضخیم نباید آن‌قدر ضخیم باشد که رنگ‌آمیزی نامناسب ایجاد کند و نباید آن‌قدر نازک باشد که مزیت گسترش ضخیم از بین برود.

WHOدر کنترل کیفیت، ضخامت مناسب گسترش ضخیم را به‌گونه‌ای توصیف می‌کند که پس از آماده‌سازی، کیفیت آن برای لیز شدن کاملRBC ها و مشاهده مناسب انگل مناسب باشد .

پس از تهیه:

گسترش ضخیم باید کاملاً در هوا خشک شود و فیکس نشود.

تهیه گسترش مالاریا از نمونهCBC / EDTA

١. نمونه خون وریدی بیمار در لوله **EDTA**دریافت شود .
٢. مشخصات بیمار و زمان نمونه‌گیری کنترل شود .
٣. نمونه به‌آرامی مخلوط شود تا خون کاملاً همگن شود؛ از تکان شدید نمونه اجتناب شود .
٤. در صورت امکان، **قبل از تأخیر قابل توجه**، یک قطره از خون EDTA روی لام تمیز قرار داده شود .

۵. از همان نمونه :
   - یک گسترش نازک
   - و یک گسترش ضخیم

   تهیه شود .
٦. گسترش نازک پس از خشک شدن با متانول فیکس شود .
۷. گسترش ضخیم بدون فیکساسیون باقی بماند .
۸. لام‌ها با Giemsa رنگ‌آمیزی شوند .

نکته مهم درباره نمونهCBC

نمونه EDTA قابل استفاده است، اما هرچه فاصله بین خون‌گیری و تهیه اسمیر بیشتر شود، کیفیت مورفولوژیک نمونه ممکن است کاهش پیدا کند. بهتر است در کمتر از ٢٤ ساعت ارسال و انجام گردد.

۵- رنگ آمیزی:

برای تشخیص میکروسکوپی مالاریا، **Giemsa stain** رنگ اصلی توصیه‌شده است WHO .نیز Giemsa را رنگ توصیه‌شده برای میکروسکوپی مالاریا معرفی می‌کند .

گسترش نازک:

- فیکساسیون با متانول
- سپس رنگ‌آمیزی با Giemsa

گسترش ضخیم:

- بدون فیکساسیون
- رنگ‌آمیزی با Giemsa
- طی فرآیند رنگ‌آمیزی، RBCها لیز می‌شوند .