آزمایش میکروسکوپی نمونه های مدفوع

معمولاً آزمایش میکروسکوپی نمونه های مدفوع متشکل از سه مرحله جداگانه شامل :
۱- تهیه گسترش مستقیم ۲- روشهای تغلیظ نمونه ۳- روشهای رنگ آمیزی دائمی می باشد

الف- تهیه گسترش مستقیم(مرطوب)

گسترش مستقیم را می توان در کوتاهترین مدت و با حداقل امکانات تهیه نمود.
در صورت مثبت بودن آنها از نظر وجود انگل، می توان یک گزارش اولیه سریع به پزشک ارائه داد و گزارش نهائی را موکول به انجام آزمایش با استفاده از روشهای تغلیظ و رنگ آمیزی دائمی نمود.
در آزمایش مستقیم به علت برداشت حجم بسیار کمی از مدفوع، امکان دستیابی به انگل خیلی کم است. همچنین در صورت یافتن انگل، به علت اینکه بعضی از تک یاخته ها خیلی کوچک می باشند به سختی می توان در گسترش مستقیم نوع آنها را تعیین نمود.

اهداف تهیه گسترش مستقیم شامل:

۱- ارزیابی میزان آلودگی بیمار ۲- تشخیص سریع نمونه هایی که آلودگی شدید دارند۳- بررسی حرکت ارگانیسم می باشد.

این روش آماده سازی باید بر روی نمونه های تازه مدفوع که در یخچال نگهداری نشده و یا با مواد نگهدارنده مخلوط نگردیده است، انجام گیرد. در این روش، مراحل مختلف زندگی اغلب انگلهای روده ای (تروفوزوئیت، کیست، لارو و تخم) ، اووسیست کوکسیدیاها ، اجسام کروماتوئید موجود درکیست و حرکت تروفوزوئیت ها را می توان تشخیص داد.

در مورد نمونه های تازه ای که در ماده نگهدارنده قرار داده نشده اند، محلول ۰/۸۵ ٪ کلرورسدیم در آب و یا محلول ید به عنوان رقیق کننده استفاده می شود. برای نمونه های نگهداری شده در فرمالین و یا مواد نگهدارنده دیگر، مواد نگهدارنده نقش رقیق کننده را نیز ایفا می کنند.

باید توجه نمود که ید و مواد نگهدارنده مانند فرمالین باعث کشته شدن ارگانیسم شده و حرکت آن را نمی توان بررسی نمود.

تهیه گسترش مستقیم با محلول ید باعث می شود که هسته و بیشتر عناصر داخل کیستهای انگل مشخص گردند. معمولاً در این گونه آماده سازی، تروفوزوئیت ها شکل طبیعی خود را از دست می دهند. تخم کرمها و لاروها قابل شناسایی هستند اما بعضاً جزئیات داخلی آنها نامشخص می شود.

برای تشخیص اولیه اووسیست کریپتوسپوریدیوم تهیه نمونه با محلول ید پیشنهاد می گردد، زیرا معمولاً اووسیستها ید را جذب نکرده و شفاف می مانند (برخلاف مخمرها و دیگر عناصر مدفوع که رنگ زرد ید را جذب می نمایند) اما به هر حال باید تشخیص قطعی کریپتوسپوریدیوم با رنگ آمیزهای اختصاصی و یا استفاده از کیت دارای آنتی بادی منوکلونال اختصاصی انجام گیرد.
اووسیست ایزوسپورابلی نیز می تواند در گسترش مستقیم دیده شود. اسپورهای میکروسپوریدیا آنقدر کوچک هستند که ممکن است با ذره های کوچک موجود در محیط اشتباه شوند، بنابراین معمولاًدر گسترش مستقیم تشخیص صحیح داده نمی شوند.

در امتحان میکروسکوپی نمونه مدفوع ممکن است عناصر زیر دیده شوند:

۱- تروفوزوئیت و کیست تک یاخته های روده ای
۲- اووسیست کوکسیدیا و اسپورهای میکروسپوریدیا که تشخیص این اسپورها از ذره های کوچک موجود در محیط مشکل است .
۳- تخم کرمها و لاروها
۴- گلبولهای قرمز که ممکن است دلیل زخم یا عوامل دیگر خونریزی دهنده باشد.
۵- گلبولهای سفید مخصوصاً نوتروفیلها که ممکن است دلیل التهاب باشد.
۶- ائوزینوفیلها که معمولاً دلیل وجود یک پاسخ ایمنی است(که ممکن است در ارتباط با وجود عفونتهای انگلی و یا علل دیگر باشد).
۷- ماکروفاژها که ممکن است به دلیل حضور عفونتهای باکتریایی یا انگلی باشد.
۸- کریستالهای شارکوت لیدن که بقایای ائوزینوفیلهای تخریب شده است (ممکن است به دلیل وجود عفونتهای انگلی و یا علل دیگر باشد).
۹- قارچها (انواع کاندیدا) و مخمرهای دیگر و یا قارچهای شبه مخمر .
۱۰-سلولهای گیاهی، دانه های گرده و اسپورهای قارچها که ممکن است شبیه تخم کرمها، کیست تک یاخته ها و اووسیست کوکسیدیا و یا اسپورهای میکروسپوریدیا باشد.
۱۱-فیبریا ریشه گیاهان و یا موی حیوانات که ممکن است شبیه لارو کرمها باشد.

تهیه محلول سرم فیزیولوژی:

۱- ۸۵٪ گرم کلرورسدیم **(Nacl)** را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به خوبی حل کنید.
۲- به میزان ۱۰ میلی لیتر به داخل ۱۰ لوله در پیچ دار بریزید. لوله ها را در دمای **c** ۱۲۱ بمدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو نمائید و بعد از سرد شدن در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.(در صورت در دسترس نبودن لوله در پیچ دار پس از استریل نمودن می توان، جهت جلوگیری از تبخیر محلول در لوله را با پارافیلم کاملاً ببندید) روی برچسب نام محلول و تاریخ انقضاء آن را به مدت حداکثر یک سال بعد از تاریخ ساخت بنویسید.

تهیه محلول D'Anton's iodine

مواد لازم:

۱- یدور پتاسیم **(Potassium iodide= Kl)** ۱ گرم
۲- کریستال ید پودر شده **(Iodine crystals)** ۱/۵ گرم
۳- آب مقطر تا ۱۰۰ میلی لیتر

یدورپتاسیم و کریستالهای ید را در آب مقطر حل کنید. (مقدار اضافی کریستالهای حل نشده ید در ته ظرف باقی می ماند که به دلیل وجود این کریستالها ، محلول ذخیره در مدت زمان طولانی، دارای کیفیت مطلوب می باشدبنابراین محلول را صاف ننمایید.

محلول فوق رادرشیشه قهوه ای رنگ ریخته ودر محل تاریک، در حرارت اطاق نگهداری نمایید. این محلول جهت استفاده فوری به کار می رود، بنابراین مقداری از آن را به عنوان محلول کاری در دسترس قرار دهید. رنگ محلول کاری باید شبیه چای پر رنگ باشد و چنانچه در مدت ۱۴-۱۰ روز رنگ آن روشن تر گردد، دور ریخته شود.

روی برچسب شیشه محتوی محلول ذخیره، نام محلول و تاریخ انقضای آن را به مدت حداکثر یک سال بعد از تاریخ ساخت بنویسید.

تهیه محلول (Lugol's iodine)

مواد لازم:

۱- یدور پتاسیم ۱۰ گرم
۲- کریستال ید پودر نشده ۵ گرم
۳- آب مقطر تا ۱۰۰ میلی لیتر

(مراحل اشاره شده در مورد تهیه محلول ید و این محلول مشابه است)

جهت ساخت محلول کاری از محلول ذخیره به نسبت ۵ :۱ آن را با آب مقطر رقیق نموده و داخل شیشه قهوه ای رنگ (قطره چکان) نگهداری می نمائیم .

تهیه رنگ متیلن بلوی بافره (گسترش مستقیم)

Nair's Buffered Methylene blue stain (Direct smear)

این روش آماده سازی گسترش مستقیم جهت مشخص نمودن جزئیات هسته تروفوزوئیتها و افتراق آنها از ماکروفاژها بکار می رود، بویژه زمانی که از محلول با P^H پائین استفاده شود که سبب نفوذ هرچه بیشتر رنگ به داخل ارگانیسم می گردد.

بعد از ۵ تا ۱۰ دقیقه سیتوپلاسم به رنگ آبی کمرنگ و هسته به رنگ آبی بسیار پر رنگ دیده می شود. گسترشها باید در مدت ۳۰ دقیقه مورد بررسی قرار گیرند.

روش کار

۱- تهیه محلول ذخیره**A**

۱۱/۵۵ میلی لیتر از اسید استیک **Acetis Acid (CH_3COOH)** را با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

۲- تهیه محلول ذخیره **B**

۱۶/۴ گرم استات سدیم بدون آب **($NaC_2H_3O_2$)** ویا ۲۷/۲ گرم استات سدیم با ۳ مولکول آب **($NaC_2H_3O_2,3H_2O$)** را درآب مقطر حل نموده وحجم نهایی را به ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

طبق جدول زیر محلول **A**و**B** را مخلوط نموده و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم :

محلول ذخیره **B** (میلی لیتر)	محلول ذخیره **A** (میلی لیتر)	**PH**
۳/۷	۴۶/۳	۳/۶
۶	۴۴	۳/۸
۹	۴۱	۴
۱۳/۲	۳۶/۸	۴/۲
۱۹/۵	۳۰/۵	۴/۴
۲۴/۵	۲۵/۵	۴/۶

۰/۰۶ گرم (۶۰ میلی گرم) پودر متیلن بلو را به ۱۰۰ میلی لیتر از محلول بافر اضافه کرده و کاملاً حل مینمائیم. معمولاً استفاده از بافر استات ۳/۶ = **PH** بهترین نتیجه را ایجاد می کند.

روش انجام آزمایش مستقیم

۱- یک قطره سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪ رادر طرف چپ و یک قطره از محلول لوگل را در طرف راست لام قرار می دهیم.

۲- مقدار خیلی کمی از مدفوع (به اندازه ۲ میلی گرم و یا در حدی که نوک یک اپلیکاتور را به داخل نمونه فرو کنیم) را در سرم فیزیولوژی به حالت یکنواخت در می آوریم.اگر بیشتر از این مقدار برداشته شود،گسترش رقیق شده و احتمال مشاهده انگل کم می شود.

عمل فوق را بوسیله اپلیکاتور دیگری با محلول لوگل انجام می دهیم.می توان یک قطره از محلول متیلن بلوی بافره را نیز بر روی لام دیگری قرار داد و به طریقه فوق نمونه مدفوع را در آن به حالت یکنواخت در آورد.

جهت بررسی نمونه های فوق یک لامل (mm) ۲۲*۲۲ بر روی نمونه تهیه شده قرار می دهیم .

ترجیحاً می توان نمونه های تهیه شده در سرم فیزیولوژی و ید را بر روی لامهای جداگانه ای قرار داد که در این صورت امکان جاری شدن مایع بر روی میکروسکوپ کاهش می یابد.

اگر نمونه آبکی یا موکوئیدی باشد، نمونه برداری بوسیله اپلیکاتور مشکل است، لذا از دو اپلیکاتور به کمک هم طوری استفاده کنید که حالت یک قاشقک را ایجاد نماید.

جهت بررسی گسترش ابتدا با عدسی با بزرگنمائی کم (۱۰*) تمام قسمتهای گسترش (لامل) را بررسی می کنیم. اگر مورد مشکوکی مشاهده گردید از عدسی با بزرگنمائی (۴۰*) برای بررسی جزئیات استفاده می نمائیم . حتی در مواردی که مورد مشکوکی مشاده نگردید ، حداقل یک سوم سطح لامل باید با عدسی با بزرگنمائی ۴۰* مورد بررسی مجدد قرار گیرد.

معمولاً تک یاخته ها نور را منعکس می کنند و چون این گونه ارگانیسم ها کمرنگ می باشند، می توانند نور را از خود عبور دهند و مشاهده آنها مشکل گردد، بنابراین باید با نور کم گسترشها را بررسی نمود.

زمانیکه نور زیاد باشد بیشتر ارگانیسمها به خوبی مشاهده نمی شوند(تجربه نویسنده : بخصوص در زمانیکه نمونه محتوی اووسیست ایزوسپورابلی باشد).

بهتر است عمل کاهش نور را به جای پائین آوردن کندانسور با بستن دیافراگرم انجام دهید. میزان نور باید به نحوی تنظیم شود که عناصر سلولی موجود در مدفوع به خصوص کیست تک یاخته ها بتوانند نوررامنعکس کنند.

اگر اطراف لامل کاملاً با پارافین مذاب مسدود شده باشد، می توان با استفاده از عدسی روغنی (بزرگنمایی ۱۰۰*) آن را بررسی نمود. ترجیحاً در این موارد استفاده از لامل ضخیم توصیه می شود.

در صورت استفاده از محلول غلیظ ید عناصر داخل مدفوع به یکدیگر چسبیده و سبب کاهش انکساروعبور نور از ارگانیسم و باعث اشکال در تشخیص می گردد و چنانچه محلول رقیق ید مورد استفاده قرار گیرد، عناصر داخل ارگانیسم به خوبی رنگ نمی گیرند. استفاده از محلول لوگلی که در رنگ آمیزی باکتریها استفاده می شود، به دلیل غلظت آن جهت رنگ آمیزی انگلها توصیه نمی گردد.

چنانچه در بررسی گسترش ، حرکت تروفوزوئیت کم شده باشد، می توان با قرار دادن یک سکه کوچک گرم شده درکنار گسترش ، حرکت آن را تحریک نمود. همچنین با فشار روی لامل نیز می توان باعث حرکت مایع و تحریک تروفوزوئیت جهت حرکت نمودن گردید.

گزارش نتایج :

مثالهایی از گزارش نتیجه مثبت نمونه مدفوع، شامل موارد زیر می باشد:

1- **Giardia lamblia trophozoites present .**
2- **Entamoeba coli cysts present .**
3- **Ascaris lumbricoides eggs present .**
4- **Strongyloides stercoralis larva present.**
5- **Lsospora belli oocysts present.**

همه عناصر و سلولهای موجود در نمونه مدفوع نیز باید تشخیص داده شده و گزارش گردند مانند:

Moderate charcot – leyden crystals present.
Few red blood cells (RBCS) present.

References:

1- **procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract , Approved Guideline (2006).CLSI=NCCLS.(M28-A)**
2- **Topley & Wilson's .(1998) .Microbiology and Microbial infections. Ninth edition . Volume 5 (parasitology)**
Pub: Arnold
3- **Ellenjo Baron and Sydney M.finegold(1996) .Bailey & scott,s . Diagnostic Microbiology.**
4- **Basic Laboratory Methods in Medical parasitology (1991) pub : world Health Organization (WHO)**
5- **John Bernard Henry, M.D.(1996) . Clinical diagnosis and management by laboratory Methods . Nineteenth edition.**
6- **Connie R.Mahon .etal.(1995) .Textbook of diagnostic Microbiology . pub .saunders**
7- **Elmer W. koneman, etal .(1997) .Color Atlas and Diagnostic Microbiology .fifth edition. Pub. Williams & wilkin' s.**

دکتر شهلا فارسی
آزمایشگاه مرجع سلامت
اردیبهشت ۱۳۸۷

همکاران محترم :

طبق آمار سازمان جهانی بهداشت در سال ۱۹۹۳، حدود ۵۱ میلیون نفر فوت کردند که ۳۹ میلیون نفر این افراد در کشورهای در حال توسعه زندگی می کردند. ۴۰٪ (۲۰ میلیون) نفر از آنها در نتیجه بیماریهای مسری فوت نمودند و ۸۰٪ این تعداد (۱۶ میلیون نفر) در اثر عفونت و بیماریهای انگلی جان باختند.
طبق آمار این سازمان، ۶۰۰ میلیون نفر از مردم جهان آلوده به آمیب (با ۱۱۰-۴۰ هزار مرگ و میر در سال) ۲۰۰ میلیون نفر آلوده به ژیاردیا، بیش از ۱/۳بیلیون نفر آلوده به آسکاریس، ۹۰۰ میلیون نفر آلوده به تریکوسفال، ۱/۳بیلیون نفر آلوده به کرمهای قلابدار، ۵۰ میلیون نفر آلوده به استرونژیلوئیدس ، ۴۹۰ -۴۰۰ میلیون نفر مبتلا به مالاریا (با مرگ و میر سالانه ۲/۲تا ۲/۵ میلیون نفر) ، بیشتر از ۱۵۰ میلیون نفر آلوده به شیستوزوما (با ۶۰۰ – ۵۰۰ میلیون نفر در معرض خطر و با میزان مرگ و میر حدود ۵۰۰ تا ۱ میلیون نفر در سال) ، ۷۰ میلیون نفر آلوده به تنیا و ۴۲ میلیون نفر آلوده به کرم سنجاقی، ۱۰ میلیون نفرآلوده به فاسیولا، و۵/۵ میلیون نفرآلوده به تریکواسترونژیلوس می باشند.
بنابراین با توجه به جمعیت جهان (کمی بیش از ۶ میلیارد نفر) و آمار فوق، مشاهده می کنیم که میزان عفونتهای انگلی در دنیا بسیار زیاد بوده و بنابراین علاوه بر میزان مرگ و میر بالا، زیانهای اقتصادی فراوانی نیز به بارمی آورند.

عفونتهای انگلی علائم بسیار متنوعی ایجاد می کنند که عمده ترین و مهمترین علائم عفونتهای انگلی روده ای ، اسهال است که ممکن است خونی یا چرکی باشد، درد شکم در مراحل حمله به مخاط یا دیواره روده دیده می شود. ائوزینوفیلی ۵۰٪-۱۵٪ در خون محیطی مهمترین عامل برای عفونتهای انگلی است اما فقدان آن در خون یا مایعات بدن دلیل رد عفونت انگلی نمی باشد. درگیری **CNS** عموماً در بیماری خواب، مالاریای فالسیپارم و توکسوپلاسموزیس مشاهده می گردد. در ابتلا به انگلهای خونی، تب، لرز، عرق شبانه، درد عضلات ، کاهش وزن وغیره دیده می شود و در مواردی بزرگی کبد، طحال و غدد لنفاوی مشاهده می گردد.
تکرر ادرار، وجود خون در ادرار، درد بالای عانه از دلایل مهم ابتلا به شیستوزوما هماتوبیوم است. پنومونی گذرا ممکن است هنگام مهاجرت اسکاریس یا کرمهای قلابدار دیده شود. آبسه های فضاگیر یا کیست عموماً در سیستی سرکوزیس، عفونت با آنتاموباهیستولیتیکا و اکینوکوکوس گرانولوزوس مشاهده می گردد. درد عضله قلب یکی از مهمترین و جدی ترین علائم در ابتلا به تریپانوزوم کروزئی است. الفانتیازیس یا تورم پا، بیضه وغیره از علائم فیلاریازیس است که به علت انسداد مسیر لنفاوی بوسیله کرمهای بالغ دیده می شود. ضایعات زیرجلدی موضعی پوست ممکن است در انکوسرکیازیس ، لاروهای مهاجر جلدی کرمهای قلابدار سگها و یا حیوانات دیگر مشاهده شود.
نحوه زندگی ، عادات غذایی و زندگی با حیوانات از عوامل مهم آلودگی است که حتی در کشورهای خوب توسعه یافته ای مانند آلمان غربی، بطور مثال توکسوپلاسموز شیوع زیادی داشته و سالانه حدود ۴٪ جمعیت آلمان آلوده می شوند. در مسافرتها، آلودگی بیشتر بوسیله خوردن غذا، آب و حتی یخ آلوده و یا مسواک زدن با آب آلوده، گزش حشره، مصرف گوشت نپخته یا ماهی خام، شنا در آبهای رودخانه ، دریاچه وراههای دیگر ایجاد می گردد.

نکته مهم این است که باید تاریخچه مسافرت به این نواحی و وضعیت زندگی بیمار و دیگر عوامل توسط پزشک مورد سوال قرار گیرد و کارکنان آزمایشگاه نیز جهت تسهیل در شناسائی انگل از این تاریخچه آگاه باشند تا روشهای مناسب نمونه برداری و تشخیص را به کار ببندند.

افرادی که مسافرتهای بین المللی دارند ممکن است به عفونتهای انگلی آندمیک و بومی آن کشورها مبتلا شوند، به طوریکه بیشتر از ۲۰٪ مسلمانان آمریکایی که در مراسم حج تمتع و عمره شرکت می نمایند، در بازگشت به کشورشان به عفونتهای انگلی آلوده می باشند.

محققین در یافته اند که اپیدمی ایدز، تاثیر زیادی روی شیوع نسبی عفونتهای انگلی مانند پنوموسیستیس کارینی، توکسوپلاسما، کریپتوسپوریدیوم پاروم ، کریپتوسپوریدیوم هومینیس، سایکلوسپورا کایتننسیس،میکروسپورا، ایزوسپورا و استرونژیلوئیدس استرکورالیس داشته که از مهمترین عوامل عفونی در این بیماران می باشند. ابتلا به استرونژیلوئیدس در مراحل پیشرفته در بیماران با نقص ایمنی (ایدز ،لنفوم، پیوند کلیه و تحت درمان با کورتیکواستروئیدها) ممکن است به صورت شدید یا کشنده مشاهده گردد. بنابراین امتحان نمونه مدفوع جهت مشاهده لاروهای استرونژیلوئیدس استرکورالیس در مورد تمام این بیماران قبل از دریافت داروهای ایمونوساپرسور، ضروری است. آنتاموباهیستولیتیکا و ژیاردیالامبلیا به میزان زیاد و رو به افزایش در مردان همجنس باز دیده می شود که در اغلب موارد شخص دارای علائم نبوده ویا علائم جزئی دارد.

باتوجه به مطالب گفته شده،توجه به آزمایشگاهها بایدبه انگهایی مانند، **Cryptosporidium, Cyclospora** و **Microsporidia** وغیره جلب شده و درصد راه اندازی روشهای لازم جهت شناسایی این گونه انگلها برآیند.

بعضی از انگلها جهت انتقال به ناقلین واسط بندپا نیاز دارند که برنامه های کنترل انجام شده بصورت غیرمنظم ، غیراصولی و با فواصل زیاد در زمینه کنترل ناقلین باعث مقاومت آنها به حشره کشها گردیده است و بنابراین میزان بروز آنها افزایش یافته است.

بنابراین با توجه به میزان عفونتهای انگلی در جهان و علائم بسیار متنوع و غیر اختصاصی که توسط انگلهای مختلف ایجاد می گردد و باتوجه به طولانی شدن فاصله زمانی بین عفونت و ظهور مراحل تشخیصی، بیشتر بیماریهای انگلی تنها بوسیله معاینه فیزیکی تشخیص داده نمی شوند و آزمایشگاه نقش مهمی را جهت تشخیص عفونت و در نهایت انتخاب یک داروی مناسب جهت درمان ایفا می کند.

در مواردی ممکن است باتجربه ترین افراد نوتروفیلهای موجود در نمونه آماده شده در سرم فیزیولوژی را با کیست آمیب اشتباه کنند که در واقع با این تشخیص، اسهال شخص به غلط به سبب وجود انگل تشخیص داده می شود و از طرفی درمان غیر ضروری با داروهایی که اثرات جانبی فراوان دارند ، انجام می گیرد. بنابراین انجام تستهای آزمایشگاهی به روش صحیح و استاندارد، لزوم استفاده از روشهای رنگ آمیزی و انجام برنامه تضمین کیفیت در آزمایشگاه انگل شناسی بیش از پیش مورد لزوم است تا بتوان به نتایج صحیح دست یافت و در عین حال انجام آزمایش نیز برای بیمار بیهوده نبوده و جهت تشخیص مورد استفاده قرار گیرد.

جمع آوری نمونه مدفوع:

نمونه برداری باید به نحوی انجام پذیرد که امکان تشخیص و جداسازی هر انگلی وجود داشته باشد. تشخیص عفونتهای انگلی به امتحان میکروسکوپی مدفوع، ادرار، خون ، خلط، بافت و در مواردی بررسی ماکروسکوپی نمونه استوار است. نمونه ها باید در یک ظرف دهان گشاد تمیز پلاستیکی یا مومی جمع آوری گردد. در پیچ ظرف باید کاملاً محکم باشد تا رطوبت نمونه حفظ گردد.

نمونه ها نباید با آب یا ادرار مخلوط شود زیرا سبب بی حرکت شدن تروفوزوئیت تک یاخته و یا موجب از بین رفتن آن می گردد. آلودگی اتفاقی نمونه با خاک و یا آب ممکن است باعث گردد که نمونه به ارگانیسم های دارای زندگی آزاد که موجود در آب و یا خاک می باشند آلوده شده که در این مورد به آسانی با تک یاخته های انگلی اشتباه می شوند و جمع آوری نمونه از توالت فرنگی وغیره نیز مناسب نمی باشد.

تداخل مواد: بعضی از مواد مانند روغنهای معدنی، باریم (کریستالها مانع مشاهده انگل به خصوص تک یاخته هامی گردند) بیسموت ، آنتی بیوتیکها (تتراسیکلین) ، داروهای ضدمالاریا و مواد غیر قابل جذب ترکیبات ضد اسهالی در جداسازی انگلهای روده ای تداخل می کنند. بعد از مصرف مواد فوق بوسیله بیمارممکن است برای مدت یک هفته تا چند هفته نتوان انگل را تشخیص داد،معمولاًدو ماده ای که به مقدار زیاد توسط بیماران مصرف می گردد باریم و آنتی بیوتیک است که تتراسیکلین باعث کاهش یا از بین رفتن انگل ها (مخصوصاً تک یاخته ها) می گردد و در چنین مواردی باید نمونه برداری بعد از گذشت ۷ روز انجام شود.

اگر چه بسیاری از آزمایشها مانند روش الایزا،ایمونوفلورسانس وغیره جهت تشخیص آنتی ژن باید با نمونه مدفوعی که در فرمالین ۵٪،۱۰٪ ومحلول سدیم استات فرمالدئید نگهداری شده است استفاده شود،ولی برخی از روشها نیاز به مدفوع تازه یا فریز شده دارد.پس نحوه جمع آوری نمونه برای هر کیت و یا روش تشخیصی در آزمایشگاه باید مد نظر قرار گیرد.

ثبت مشخصات نمونه:

هر نمونه باید دارای مشخصات نام بیمار، نام پزشک ، شماره آزمایشگاه ، تاریخ و زمان جمع آوری نمونه باشد. برگه درخواست پزشک باید ضمیمه شده و در آن اطلاعات اضافی مانند تشخیص احتمالی بیماری با توجه به علائم آن و یا تاریخچه مسافرت به منطقه خاص واطلاعات مورد لزوم دیگر درج گردیده باشد.

باید توجه نمود که چون هرنمونه مدفوع می تواند به عنوان یک منبع مهم باکتری، ویروس و انگل باشد ،لذا باید به عنوان یک منبع آلوده کننده مهم محسوب گردد.

تعداد نمونه

حداقل سه نمونه، به صورت هر روز یا یک روز در میان باید جمع آوری گردد.(به دلیل اینکه معمولاًبعضی از تک یاخته ها و تخم کرمها به صورت تناوبی دفع می گردند).

در مواردی که بیمار اسهال و درد شکم نداشته باشد می توان دو نمونه را به طور معمول ویک نمونه را بعد از استفاده از یک مسهل مانند سولفات منیزیم وغیره جمع آوری نمود.از مسهل های روغنی نبایداستفاده کرد زیرا روغن باعث کندی حرکت

تروفوزوئیت شده و به علت تغییر شکل انگل، تشخیص را مشکل می سازد.در مواردی که پزشک مشکوک به آمیبیاز روده ای باشد جمع آوری ۶ نمونه بسیار کمک کننده است و سبب تشخیص عفونتهای آمیبی به میزان ۹۰٪ می گردد،اما معمولاً کمتر توسط پزشک درخواست می گردد.

در صورت مثبت بودن آزمایش انگل در نوبت اول ، حتماً دو نوبت دیگر نیز باید مورد بررسی قرار گیرد، چون ممکن است بیمار به دو یا چند انگل مختلف آلوده باشد.

زمان جمع آوری :

اگر نمونه های مدفوع به صورت یک روز در میان جمع آوری گردد،۳ نمونه را باید حداکثر در فاصله زمانی ۱۰ روزجمع آوری کرد.اگر منظور جمع آوری ۶ نمونه باشد،باید آنها را حداکثر در فاصله زمانی ۱۴ روز جمع آوری کرد.

***باید توجه نمود که نباید در طی یک روز بیشتر از یک نمونه از بیمار جمع آوری نمود.**

زمان صحیح آزمایش نمونه بعد از جمع آوری:

بستگی به روش جمع آوری نمونه در آزمایشگاه دارد چون بعضی از آزمایشگاهها از مواد نگهدارنده استفاده می کنند.
زمان صحیح به شرح زیر است:

باید در فاصله زمانی ۳۰ دقیقه بعد از جمع آوری نمونه آزمایش شود	مایع(آبکی)	**Liquid(Watery)**
باید در فاصله زمانی ۳۰ دقیقه بعد از جمع آوری نمونه آزمایش شود	نرم	**Soft**
باید در فاصله زمانی ۶۰ دقیقه بعد ازجمع آوری نمونه آزمایش شود		**Semi formed**
همان روز یا روز بعد می تواند آزمایش شود	کاملاً شکل دار	**Formed**

باید توجه نمود که می توان نمونه را در یخچال ۵-۳ درجه سانتیگراد نگهداری نمود که در این حالت، تخمها ، لاروها و کیستهای تک یاخته ها تا چند روز بدون تغییر شکل حفظ می شود اما باید توجه نمود که نمونه ها یخ نزند. چون در اثر نگهداری در دمای زیر صفر، خصوصیات ظاهری انگل تغییر می کند. نمونه نگهداری شده در یخچال برای انجام آزمایش مستقیم به هیچ وجه مناسب نیست چون تروفوزوئیت تک یاخته از بین می رود. همچنین نمونه ها را به هیچ وجه نباید در انکوباتور قرار داد به علت اینکه دمای آن باعث تخریب انگل می گردد.
اگرچه نگهداری نمونه تازه مدفوع در یخچال ممکن است تخریب انگلها رابه تاخیر بیندازد، اما در صورت عدم توانایی در انجام به موقع آزمایش جهت حفظ خصوصیات ظاهری تروفوزوئیت ها، بهتر است نمونه مدفوع را در ماده نگهدارنده قرار داد و آن را در فرصت مناسب آزمایش نمود.

قوام نمونه

قوام نمونه ممکن است از آبکی تا کاملاً شکل دار و حتی سخت (**hard**) متغیر باشد، که می توان در موقع نمونه گیری آنها را بررسی نمود ودر ابتدا نمونه های آبکی وشل را آزمایش نمود.
طبق نظریه سازمان جهانی بهداشت ، بیشتر تقسیمات زیرمد نظر بوده و باید ثبت و گزارش گردد.

Watery, Loose, Soft. Formed

معمولاً قوام مدفوع تاحدودی مشخص می کند که چه شکلی از انگل را می توان در آن یافت.
تروفوزوئیت آمیبها و تاژکداران بیشتر در نمونه های آبکی یا شل دیده می شود و سریعاً در درجه حرارت اتاق از بین می روند. همچنین ممکن است در نمونه نرم **(soft)** نیز تروفوزوئیت تک یاخته ها مشاهده گردد. معمولاً خصوصیات ظاهری کیستهای موجود در نمونه شکل دار، در درجه حرارت اطاق و در فاصله زمانی یک روز تغییر نمی کند. تخمها و لاروها در هر نمونه ای با هرگونه قوام ممکن است مشاهده گردند اما در نمونه های آبکی به علت رقیق بودن نمونه ، شانس یافتن آنها کم می شود، اما در درجه حرارت اطاق به نسبت تروفوزوئیتها و کیستها خصوصیات خود را از دست نمی دهند. فقط اگر بعضی ازتخمهای کرمهای قلابدار بیشتر از یک روز در درجه حرارت اطاق بماند تبدیل به، لارو شده و یا در این شرایط ممکن است لاروهای فیلاریفرم استرونژیلوئیدس استرکورالیس مشاهده گردد.
بعضی مواقع کرم آسکاریس،کرم سنجاقی و یا بندهای کرمهای نواری ممکن است در سطح یا زیر مدفوع مشاهده شود. بندرت ممکن است کرم تریکوسفال ، کرم قلابدار و هیمنولپیس نانا در مدفوع مشاهده شود و معمولاً دفع این کرمها بعد از درمان یا مصرف مسهل مشاهده می گردد. جهت جدا نمودن این انگلها، می توان مقداری از نمونه را با سرم فیزیولوژی مخلوط کرده و سپس آن را از چند لایه گاز مرطوب صاف نمود. در مورد عفونتهای انگلی ناشی از کرمها، باید ۱ تا ۲ هفته بعد از درمان، آزمایش مدفوع را تکرار نمود. در مورد عفونتهای انگلی ناشی از تک یاخته، این کنترل باید ۳ تا ۴ هفته بعد از درمان انجام گرفته و در مورد افراد مداوا شده برای عفونت ناشی از کرم تنیا، ۶-۵ هفته بعد از درمان، انجام آزمایش مجدد توصیه می گردد.

نگهداری نمونه ها:

اغلب یک فاصله زمانی بین جمع آوری نمونه تا رسیدن آن به آزمایشگاه و یا زمان انجام آزمایش نمونه وجود دارد. اگر این مدت زمان بیشتر از فاصله زمانی ذکر شده باشد باید فوراً نمونه را بعد از جمع آوری و یا بعد از دریافت بوسیله آزمایشگاه در ماده نگهدارنده قرار داد.
اگر تعداد نمونه های مدفوع آزمایشگاه زیاد است ، باید نمونه ها را مورد بررسی قرار داد و درابتدا سریعاًنمونه های شل، آبکی و یا دارای خون و موکوس را آزمایش نمود و یا بعداز ثبت خصوصیات ظاهری آنها در ماده نگهدارنده قرار داد .
مواد نگهدارنده متنوعی وجود دارد که پر مصرف ترین آنها، فرمالین ۵٪ یا ۱۰٪ است که می توان در روی این نمونه عمل تغلیظ را نیز انجام داد.
مواد نگهدارنده دیگر شامل
سدیم استات- استیک اسید- فرمالین **Sodium Aceteate- Acetic Acid Formalin = (SAF)**
می توان روی نمونه نگهداشته شده در این ماده عمل تغلیظ و رنگ آمیزی ر ا انجام داد ومانند فیکساتیوشاودین و پلی

وینیل الکل حاوی کلرورمرکوریک نمی باشد. فیکساتیو سدیم استات- استیک اسید- فرمالین مایع بوده و برای تهیه رنگ آمیزی دائمی استفاده می شود. گسترش هاباید باآلبومین مخلوط با رسوب مدفوع تهیه شده تا از چسبندگی آن اطمینان حاصل شود.

مورفولوژی ارگانیسم درگسترش های تهیه شده درمحلول سدیم استات- استیک اسید- فرمالین که با رنگ آهن- هماتوکسیلین رنگ آمیزی شده اند، نسبت به نمونه های رنگ شده با تریکروم از کیفیت مطلوب تری برخوردار می باشند.

Merthiolate – lodin –formalin= (MIF) مرتیولات -آیدین-فرمالین

از نمونه نگهداری شده در این ماده می توان جهت تهیه گسترش مستقیم و انجام روشهای تغلیظ استفاده نمود. اما تهیه گسترش رنگ آمیزی با کیفیت مطلوب از آن آسان نمی باشد. بخصوص در مورد نمونه های حاوی تروفوزوئیت تک یاخته، که در رنگ آمیزی خصوصیات آن مشخص نمی شود.

Schaudinn' s fixative

این ماده ثابت کننده جهت نمونه های مدفوع تازه و یا هر نمونه تهیه شده از مخاط روده (نمونه های حاصل از سیگموئیدوسکوپی) مناسب می باشد

Polyvinyl Alcohol = (PVA) پلی وینیل الکل

اگرچه هر دو روش تغلیظ و رنگ آمیزی را می توان در مورد نمونه های نگهداری شده در این ماده بکار برد، اما طبق توصیه **clinical and laboratory standards Institute = CLSI = NCCLS** بهتر است عمل تغلیظ را روی نمونه های نگهداری شده در فرمالین و عمل رنگ آمیزی را روی نمونه نگهداری شده در **PVA** انجام داد.

باید توجه نمود که نسبت بین مدفوع و ماده نگهدارنده باید به نسبت یک قسمت از مدفوع و سه قسمت ماده نگهداری بوده و کاملاً با هم مخلوط شوند. به طور کلی مدت زمان مجاورت مدفوع و ماده نگهدارنده نباید کمتر از ۳۰ دقیقه باشد. نمونه های مدفوع موجود در ماده نگهدارنده می تواند در درجه حرارت اطاق نگهداری شوند.

فرمالین: بیشترین ماده ثابت کننده ای است که جهت تخم کرمها، لاروها، کیست تک یاخته ها و اووسیت استفاده می شوند. معمولاً فرمالین خریداری شده، یک محلول آبی ۳۷٪ از گاز فرمالدئید می باشد و در موقع ساخت محلولهای ثابت کننده انگل شناسی باید به عنوان یک محلول ۱۰۰٪ در نظر گرفته شود. دو غلظت مورد استفاده از فرمالین ۵٪ و۱۰٪ می باشد . اگرچه تهیه محلول ۵٪ آن برای تمام اهداف توصیه می شود اما تمام کارخانه های سازنده کیتهای حاوی ماده نگهدارنده فرمالین، از محلول ۱۰٪ آن استفاده می نمایند چون توانائی بیشتری را جهت کشتن تخم کرمها دارد .

می توان بر روی نمونه های نگهداری شده در فرمالین، عمل تغلیظ را انجام داد. اما نمی توان بر روی این نمونه روشهای رنگ آمیزی را بکار برد.

روش تهیه فرمالین ۱۰٪ : فرمالدئید**(usp)**، ۱۰۰ میلی لیتر- محلول سرم فیزیولوی ۰/۸۵٪ ، ۹۰۰ میلی لیتر

روش تهیه فرمالین ۵٪ = فرمالدئید **(usp)**، ۵۰ میلی لیتر – محلول سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪ ، ۹۵۰ میلی لیتر

طرز تهیه = ۱۰۰ میلی لیتر (یا جهت تهیه محلول ۵٪ ، ۵۰ میلی لیتر) از فرمالدئید را با ۹۰۰ میلی لیتر (یا ۹۵۰ میلی لیتر جهت تهیه محلول ۵٪) از محلول سرم فیزیولوژی **g/L** ۸/۵ رقیق می کنیم.

(باید توجه نمود که از آب مقطر نیزمی توان به جای سرم فیزیولوژی استفاده نمود)

استفاده از فرمالین گرم (۶۰ درجه سانتیگراد) جهت جلوگیری از آلودگی تخمهای کرم توصیه می شود.

بررسی خصوصیات ظاهری نمونه:

اصولاً بررسی ظاهر مدفوع و گزارش کامل آن به پزشک اهمیت بسیار زیادی جهت تشخیص بیماری دارد. این بررسی کمک بسیار زیادی به تشخیص عفونتهای انگلی ، یرقانها، خونریزیهای دستگاه گوارش، اسهال، سوء جذب وغیره می نماید بنابراین باید شکل وقوام، رنگ،وجود موکوس، خون، موادغذایی هضم نشده وسایر موارد بررسی وبه پزشک گزارش گردد.
بررسی خصوصیات ظاهری نمونه مدفوع باید روی نمونه های تازه انجام شود و نمی توان این بررسی را درنمونه های موجود درماده نگهدارنده انجام داد. از طرفی تروفوزوئیت انگلها نیز در این مواد بیحرکت می شود. بنابراین گرفتن یک نمونه تازه جهت تشخیص پروتوزوئرهای متحرک و نیز بررسی خصوصیات ظاهری ، ضروری می باشد.

مدت زمان نگهداری نمونه:

تازگی نمونه یک عامل مهم در تشخیص عفونتهای انگلی است چون مرحله تروفوزوئیت تک یاخته ها خیلی زود، بعد از خروج از بدن ، از بین می رود. ثبت تاریخ و زمان جمع آوری نمونه نیز ضروری بوده و باید انجام شود.
وجود خون و موکوس میتواند به دلیل عفونت آمیبی ، باکتریائی ، التهاب ، کولیت ، بدخیمی وغیره باشد که جهت یافتن تروفوزوئیت آمیبها حتماً باید از این قسمتها نمونه برداری را انجام داد.
وجود خون تیره در مدفوع می تواند دلالت بر خونریزی زیاد در مجاری معده- روده ای داشته و بر عکس وجود خون روشن دلالت بر خونریزی قسمتهای تحتانی دارد.
رنگ مدفوع می تواند برحسب نوع تغذیه، مصرف دارو، بیماری وغیره تغییر کند.
مصرف سبزیجات زیاد باعث رنگ سبز ، مصرف گوشت، رنگ آن را تیره و مصرف لبنیات رنگ آن را روشن می سازد.
آهن رنگ مدفوع را سیاه و باریم رنگ آن را قهوه ای روشن یا سفید می کند که این رنگ می تواند نشان دهنده عدم وجود صفرا در مدفوع نیزباشد.
مدفوع با قوام نرم یا شل و بارنگ خاکستری می تواند به دلیل اسهال چرب باشد.

آزمایشگاه مرجع سلامت
دکتر شهلا فارسی
اردیبهشت ۸۷

References:

1-procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract , Approved Guideline (2006).CLSI=NCCLS.(M28-A)
2-Topley & Wilson's .(1998) .Microbiology and Microbial infections. Ninth edition . Volume 5 (parasitology)
Pub: Arnold
3-Ellenjo Baron and Sydney M.finegold(1996) .Bailey & scott,s . Diagnostic Microbiology.
4- Basic Laboratory Methods in Medical parasitology (1991) pub : world Health Organization (WHO)
5- John Bernard Henry, M.D.(1996) . Clinical diagnosis and management by laboratory Methods . Nineteenth edition.
6-Connie R.Mahon .etal.(1995) .Textbook of diagnostic Microbiology . pub: saunders
7-Elmer W. koneman, etal .(1997) .Color Atlas and Diagnostic Microbiology. fifth edition. Pub. Williams & wilkin' s.