

روشهای استاندارد تغلیظ جهت تشخیص انواع انگلها در مدفوع

- هدف اصلی از انجام آزمایش مستقیم نمونه مدفوعی که حاوی ماده نگهدارنده نمی باشد، بررسی حرکت تروفوزوئیت تک یاخته ها، گزارش رنگ، قوام، میزان WBC، RBC و غیره است. بنابراین روش صحیح این است که گزارش آزمایش مستقیم نمونه به صورت گزارش اولیه به پزشک داده شود و گزارش روش تغلیظ و رنگ آمیزی دائمی بعداً به اطلاع پزشک برسد.

می توان در رابطه با نوع ماده نگهدارنده بر روی نمونه آزمایش تغلیظ و رنگ آمیزی دائمی را انجام داد. استفاده از روش تغلیظ به عنوان قسمتی از روش کامل بررسی نمونه مدفوع جهت جستجوی انواع انگلها می باشد. تعداد کم ارگانیسمها که ممکن است در آزمایش مستقیم تشخیص داده نشود، به وسیله این روش شناسایی می گردد. دو نوع روش تغلیظ وجود دارد.

۱- شناور سازی (Flotation)

۲- رسوب گیری (Sedimentation)

اساس این روشها آن است که کیستهای تک یاخته ها، اووسیست، تخم کرمها و لاروها از مواد اضافی موجود در مدفوع بوسیله عمل سانتیفوژ نمودن و یا بر اساس تفاوت در وزن مخصوص جدا می گردد.

۱- روش استاندارد شناورسازی با سولفات روی (Zinc sulfate)

(flotation

در روش شناورسازی، کیستهای تک یاخته و بعضی از تخم کرمها از مواد اضافی موجود در مدفوع، بر اساس استفاده از یک مایع با وزن مخصوص بالا، جدا می گردند. عناصر انگلی در سطح مایع مشاهده و مواد اضافی در ته لوله باقی می ماند. این روش آسان تر از روش رسوب گیری است، اما به هر حال بیشتر تخم کرمها مانند تخمهای دریچه دار و یا تخمهای خیلی سنگین مانند تخم آسکاریس غیربارور با این روش تغلیظ نمی گردند.

باید وزن مخصوص محلول سولفات روی در حد معینی باشد و نیز همه ارگانسیم هایی که در سطح مایع و در رسوب تجمع حاصل کرده اند ، جدا گردیده و تشخیص داده شوند. باید نمونه در مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه بعد از مرحله سانتیفوژ نهایی بررسی شود ، در غیر این صورت ارگانسیم شکل طبیعی خود را از دست داده و یا تخریب می گردد.

نمونه : باید تازه باشد و یا در محلول نگهدارنده مانند فرمالین ۵ یا ۱۰ درصد بافره و یا

نگهداری SAF=sodium Acetate-Acetic Acid-formalin

شود .

- برای نمونه های خیلی آبکی مرحله سانتیفوژ روش تغلیظ را می توان حذف نمود.

مواد:

فرمالین ۵ یا ۱۰ درصد بافره یا SAF سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ گرم درصد ، محلول سولفات روی (محلول آبی ۳۳%)

حدود ۳۳۰ گرم سولفات روی را با آب مقطر (به میزان ۶۷۰ میلی لیتر) به حجم یک لیتر برسانید.

وزن مخصوص محلول فوق باید جهت نمونه های نگهداری شده در فرمالین به میزان ۱/۲۰ و برای نمونه های تازه ۱/۱۸ باشد. در غیر این صورت باید بوسیله اضافه نمودن سولفات روی و یا آب مقطر تنظیم گردد و در بطریهای درپنج دار ذخیره گردد. تاریخ انقضاء را بمدت ۳۶ ماه بعد از تاریخ ساخت بر روی برچسب شیشه بنویسید .

روش کار:

۱- حدود ۴گرم مدفوع تازه را داخل ۱۰ میلی لیتر فرمالین ۱۰% (درون یک ظرف مناسب از نظر حجم نهائی) بریزید. مدفوع و فرمالین را کاملاً مخلوط کنید. مخلوط را به مدت حداقل ۳۰ دقیقه جهت ثابت شدن نگه دارید. اگر نمونه در محلول نگهدارنده فرمالین و یا SAF نگهداری شده است ، مخلوط ماده نگهدارنده و مدفوع را به خوبی مخلوط کنید.

۲- نسبت به اندازه و قوام نمونه ، تعداد کافی گاز مرطوب را

روي هم قرار داده و آن را داخل يك قيف بگذاريد. قيف را داخل يك لوله ته مخروطي گذاشته و حدود ۸ ميلي ليتر از مخلوط فوق را صاف نمائيد تا رسوبي به اندازه ۰/۵ تا اميلي ليتر ايجاد كند. اگر نمونه در ماده نگهدارنده فرمالين و يا SAF قرار داده شده باشد ، حدود ۴ - ۳ ميلي ليتر كافي است مگر اينكه نمونه مدفوع در ابتدا كم باشد.

۳- محلول سرم فيزيولوژي ۰/۸۵% را تا سر لوله اضافه كنيد و بمدت ۱۰ دقيقه در دور ۵۰۰ سانترفوژ نمائيد. مقدار رسوب بدست آمده بايد حدود ۰/۵ تا ۱ ميلي ليتر باشد. رسوب خيلي غليظ و يا خيلي رقيق نشاندهنده روش نادرست تخليظ است .

(روش صحيح محاسبه تعداد دور در دقيقه بر اساس شعاع ، كه در سانترفوژهاي مختلف ، متفاوت است در كتب مرجع موجود ميباشد.)

۴- مایع رويي را دور ريخته و رسوب را در ۱ تا ۲ ميلي ليتر سولفات روي به حالت سوسپانسيون درآوريد و سپس تا ۳-۲ ميلي ليتر لبه لوله را با محلول سولفات روي پر كنيد.

۵- بمدت يك دقيقه در دور ۵۰۰ سانترفوژ كنيد . اجازه بدهيد كه بدون هيچ دخالتي سانترفوژ كاملاً متوقف شود. دو لايه تشكيل مي گردد . مقدار كمی رسوب در ته لوله ويك لايه سولفات روي در بالاي لوله مشاهده مي شود.

کیست تک یاخته ها و بعضی از تخم کرمها در سطح و بعضی از تخمهای سنگین و یا دریچه دار در رسوب قرار می گیرند.

۸- بدون اینکه لوله را از سانتریفوژ خارج کنید ، یک یا دو قطره از سطح مایع را با کمک یک پی پت پاستور و یا یک لوپ سیمی حرارت داده و سرد شده بردارید و روی یک لام بگذارید.

هرگز لوپ را به طور عمقی وام د مایع نکنید. بلکه فقط با سطح مایع آن را به طریقی تماس دهید که لوپ موازی با سطح مایع قرار گیرد (نه اینکه با آن زاویه 90° بسازد). مطمئن باشید که نوک پی پت یا لوپ زیر سطح مایع وارد نشود.

۷. یک لامل 22×22 و یا 22×24 میلیمتری روی آن قرار دهید. جهت آماده سازی نمونه از محلول لوگل میتوان استفاده نمود.

۸- با عدسی با بزرگنمایی ($10 \times$) تمام سطح لامل را بررسی کنید.

۹- اگر مورد مشکوک مشاهده گردید ، با بزرگنمایی ($40 \times$) برای مطالعه جزئیات بیشتر استفاده نمائید. باید حداقل $1/3$ سطح لامل را حتی اگر مورد مشکوک مشاهده نگردید، بررسی کنید .

۱۰- قبل از آزمایش و یا بعد از آن می توان لام مرطوب را جهت

آموزش به دیگران در يك پلیت محتوي كاغذ مرطوب در روي يك اپلیکاتور و یا پایه مخصوص لام قرار دهید. هوای محفظه باید کاملاً مرطوب باشد اما خیس نباشد .

گزارش نتایج : مثال هایی از گزارش مثبت شامل

Giardia lamblia cysts present.

Trichuris Trichura eggs present

Few macrophages present

Moderate WBCs present

می باشد.

نکات قابل توجه در روش :

- استفاده از آب لوله کشی می تواند جایگزین استفاده از سرم فیزیولوژی گردد . بعضی از کارکنان ترجیح می دهند که در تمام مراحل روش به جای آب از محلول فرمالین ۵% یا ۱۰% استفاده کنند.

- اگر نمونه ها در SAF نگهداری شده اند ، آزمایش از مرحله ۲ شروع می شود.

- اگر در مورد نمونه های تازه از آب لوله کشی استفاده شود ، ممکن است انگل بلاستوسیستیس هومینیس از بین برود .

- اگر ترجیح می دهید که جهت نمونه برداری لوله ها را از

سانتریفوژ خارج نمائید ، دقت کنید که قبل از نمونه برداری
سطح مایع تکان نخورد .

- بعضی از کارکنان ترجیح می دهند که مقدار کمی سولفات روی
را به سطح لوله اضافه کرده ، به نحویکه سطح مایع یک
برآمدگی کوچک محدب شکل را تشکیل دهد و سپس یک لامل بر روی
سطح آن قرار دهند.

باید ه دقیقه صبر نموده و در این مدت لوله را تکان ندهید .
سپس لامل را با دقت از روی لوله برداشته و جهت بررسی روی
یک لام قرار دهید.

محدودیت‌های روش : تک یاخته های مشاهده شده در نمونه باید
بوسیله روش رنگ آمیزی دائمی تائید شوند. بعضی از
تک یاخته ها کوچک بوده و تشخیص آنها با این روش مشکل میباشد
.

باید حداکثر در فاصله زمانی ه دقیقه بعد از توقف کامل
سانتریفوژ ، سطح مایع جهت بررسی ، برداشت گردد. چون هر چه
تماس ارگانیسمها با محلول سولفات روی بیشتر شود ، امکان اینکه
شکل طبیعی خود را از دست دهند ، بیشتر می باشد،

به طوریکه اگر کیست پروتوزوئرها و تخم کرم های دارای
دیواره ضخیم بیشتر از چند دقیقه در تماس با محلول سولفات
روی با وزن مخصوص بالا قرار بگیرد ، ممکن است متلاشی شده و یا

شکل طبیعی خود را از دست بدهد.

اگر از روش شناورسازی، به عنوان تنها روش تشخیصی استفاده می کنید ، باید سطح مایع و هم رسوب آن را بررسی کنید تا مطمئن شوید که همه ارگانیسرها را جدا نموده و تشخیص می دهید. بهر حال روش تغلیظ فرمالین - اتیل استات (اتر) به عنوان بهترین روش جهت جداسازی و تشخیص تخم کرمها، کیست ، تک یاخته ها و غیره می باشد.

روش استاندارد رسوب سازی (Sedimentation)

Standard Methods

روش استاندارد فرمالین - اتیل استات (اتر) جهت جداسازی همه انواع تک یاخته ها ، اووسیست ها ، تخم کرم ما و لاروها مناسب می باشد. در این روش ارگانیسهای سنگین تر در مقایسه با عناصر سبک تر محلول زودتر ته نشین میشوند و علاوه بر مراحل سانتیفوژ ، مراحل صاف کردن و از بین بردن چربی را شامل می گردد. در مرحله صاف کردن قطعات بزرگ و مواد اضافی مدفوع بوسیله صاف کردن از طریق چند لایه گاز مرطوب گرفته می شوند.

ترکیبات از بین برنده چربی شامل اتر ، اتیل استات ، Hemo-De و یا ترکیبات گزیل (xylene) می باشد که چربی های مدفوع را حل کرده و مواد اضافی را شناور می سازد ، اما به

تخم کرمها ، لاروها و یا کیست پروتوزوئرها آسیبی نمی رساند .
معمولاً در این روش تروفوزوئیت تک یاخته ها خراب شده و یا از
بین می رود .

مناسب ترین روش تغلیظ استفاده از اتیل استات و ترکیبات
دیگر مانند Hemo-De به جای اتر است که علت آن حفظ
سلامتی افراد می باشد . این ترکیبات دقیقاً همان عمل اتر را
انجام می دهند .

روش های تغلیظ را می توان روی نمونه های نگهداری شده در
Polyvinyl Alcohol=PVA انجام داد ، اما ممکن
است در مرحله از بین بردن چربی ، بعضی از ارگانیسرها مخصوص
پروتوزوئرها خراب شوند. بنابراین همانطور که در جزوه
قبلی ذکر گردید بهتر است که عمل تغلیظ را روی نمونه های
نگهداری شده در فرمالین و عمل رنگ آمیزی را روی نمونه های
نگهداری شده در PVA انجام داد .

برای نمونه های آبی باید استفاده از یک مرحله سانتیفوژ (۱۰دقیقه در دور ۵۰۰ g) جایگزین روش تغلیظ معمولی گردد.
(روش صحیح محاسبه تعداد دور در دقیقه بر اساس شعاع که در
سانتریفوژهای مختلف ، متفاوت است ، در کتب مرجع موجود می
باشد.)

مواد و معرفهای لازم :

۱- مواد از بین برنده چربی مانند اتیل استات و غیره

۲- فرمالین ۵ یا ۱۰ درصد بافر شده و یا Sodium

Acetate-Acetic Acid-formalin=SAF

۳- ۸۵% NaCl / ۰% -۶- محلول لوگل

روش کار :

۱- حدود ۴ گرم از مدفوع تازه را در داخل ۱۰ میلی لیتر فرمالین ۱۰% (در یک ظرف مناسب از نظر حجم نهایی) مخلوط کرده و اجازه دهید که جهت ثابت شدن عناصر انگلی موجود در مخلوط، بمدت حداقل ۳۰ دقیقه بماند. اگر نمونه در محلول نگهدارنده مانند فرمالین ۵ یا ۱۰ درصد و یا SAF تهیه گردیده است، آن را کاملاً مخلوط کنید.

۲- در رابطه با قوام و مقدار مدفوع، تعداد کافی گاز مرطوب را روی هم قرار داده و سپس آن را داخل قیف بگذارید. قیف را داخل یک لوله ته مخروطی ۱۰ میلی لیتری و یا لوله های مخصوص سانتریفوژ قرار دهید. شکل ته لوله باید به نحوی باشد که مقدار کافی رسوب (۱ ml یا ۰/۵ ml) ایجاد کند. معمولاً ۸ میلی لیتر از مخلوط فرمالین و مدفوع آماده شده، صاف می گردد. اگر نمونه در ماده نگهدارنده فرمالین یا SAF نگهداری شود، حدود ۳ میلی لیتر از آن کافی است مگر اینکه نمونه حاوی مقدار خیلی کمی مدفوع باشد.

۳- محلول سرم فیزیولوژی را تا نوک لوله اضافه کنید و بمدت ۱۰ دقیقه در دور g ۵۰۰ سانتیفوژ نمائید.

۴- روی محلول را خالی کنید ، رسوب بدست آمده باید حدود ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر باشد . دوباره رسوب را در سرم فیزیولوژی به حالت سوسپانسیون درآورده و تا نوک لوله را پر نمائید و مجدداً بمدت ۱۰ دقیقه در دور g ۵۰۰ سانتیفوژ نمائید.

در صورتی که بعد از مرحله اول شستشو ، تفاوت رنگ کمی بین رسوب و مایع رویی مشاهده گردید می توان مرحله دوم شستشو را حذف نمود و اگر محلول رویی تیره بوده و یا کدورت زیادی داشت مایع رویی را خالی نموده و دوباره عمل سانتیفوژ را با محلول سرم فیزیولوژی تکرار کنید.

۵- مایع رویی را خالی نموده و آنقدر فرمالین ۱۰% به رسوب ته لوله اضافه نمائید که ۲/۳ لوله را پر نماید سپس اجازه دهید که قبل از اضافه کردن مواد از بین برنده چربی ، بمدت حداقل ۱۰ دقیقه بماند.

اگر مقدار رسوب ته لوله خیلی کم ، و یا نمونه اصلی محتوی مقدار زیادی موکوس باشد ، مواد از بین برنده چربی را (مرحله ۶) اضافه ننمائید و به عوض آن مقداری فرمالین اضافه و آن را سانتیفوژ نموده و سپس مایع رویی را خالی کرده و رسوب باقی مانده را بررسی نمائید.

۶- ۴ تا ۵ میلی لیتر اتیل استات و یا دیگر مواد از بین برنده چربی را اضافه کنید. در لوله را با چوب پنبه ببندید و آن را

حداقل بمدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان دهید . لوله را طوری نگه دارید که چوب پنبه دور از صورت شما و یا همکارتان باشد.

۷- ۵ تا ۱۰ ثانیه صبر کنید و سپس با دقت چوب پنبه را بردارید.

۸- آن را بمدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰ g سانتریفوژ کنید . بعد از سانتریفوژ ۴ لایه تشکیل می شود . اولین لایه مقدار کمی

رسوب (حاوی انگل) است که در ته لوله تشکیل می شود. لایه بعد فرمالین می باشد و سپس آشغالهای مدفوع روی سطح لایه فرمالین قرار گرفته و بقیه مواد از بین برنده چربی در نوک لوله قرار می گیرد.

۹- بوسیله اپلیکاتور تمام آشغالهای مدفوع را خارج کرده و سپس همه محلول رویی را خالی نمائید و در حالیکه لوله را سرازیر نگه داشته اید ، بوسیله اپلیکاتوری که در سر آن پنبه پیچیده شده است و یا بوسیله سواب همه آشغالهای چسبیده به دیوار را خارج نمائید. سپس لوله را به حالت اولیه برگردانید.

وقتی که از لوله های شیشه ای استفاده می کنید مایع خیلی

راحت تر به ته لوله بر می گردد. اگر نمونه حاوی مقدار زیادی موکوس باشد مقدار سدیمان به حداقل می رسد در این حالت جهت خارج نمودن مایع رویی ، لوله را وارونه نکنید. زیرا ممکن است همراه این عمل رسوب را از دست بدهید. در این صورت مایع رویی را بوسیله پی پت پاستور و غیره خارج نمائید.

۱۰- هنگامی که رسوب به ته لوله چسبیده و سفت است یک یا دو قطره سرم فیزیولوژی و یا فرمالین به آن اضافه نموده و مخلوط نمائید. سپس مقدار کمی از آن را روی لام گذاشته و یک لامل با اندازه 22×22 روی آن قرار دهید. ممکن است از لامل با اندازه 22×40 هم استفاده نمود. اما معمولاً بیشتر از لامل 22×22 استفاده می شود.

۱۱- معمولاً ابتدا با بزرگنمایی ($10 \times$) تمام محدوده لامل را بررسی نمائید.

۱۲- اگر مورد مشکوکی مشاهده گردید از عدسی با بزرگنمایی ($40 \times$) برای بررسی بیشتر جزئیات استفاده کنید. حداقل $1/3$ محدوده لامل را باید با عدسی با بزرگنمایی ($40 \times$) بررسی کنید ، حتی اگر مورد مشکوکی مشاهده نگردید .

- اگرچه بعضی از افراد اطراف لامل را بوسیله پارافین و غیره مسدود کرده و با عدسی با بزرگنمایی ($100 \times$) آن را بررسی می کنند . اما معمولاً این کار انجام نمی شود و تشخیص صحیح تک

یاخته ها بوسیله تهیه لام رنگ آمیزی انجام می پذیرد.

۱۳- می توان لام تهیه شده را جهت بررسی بیشتر و یا آموزش به افراد در یک پلیت محتوی کاغذ یا پنبه مرطوب روی یک اپلیکاتور یا وسیله نگهدارنده لام قرار داد. فضای محفظه باید کاملاً مرطوب بوده ، اما خیس نباشد.

- ممکن است کیست تک یاخته ها ، اووسیست، تخم کرمها و لارو ها درآماده سازی با روش تغلیظ با تعداد بیشتری در مقایسه با روش مستقیم مشاهده کردند.

روش صحیح گزارش نتایج به همان ترتیبی خواهد بود که در جزوه قبلی اشاره گردید.

نکات قابل توجه

- در تمام مراحل روش کار استفاده از آب لوله کشی می تواند جایگزین استفاده از سرم فیزیولوژی گردد اما بعضی از کارکنان ترجیح می دهند که در تمام مراحل از فرمالین ۱۰% استفاده کنند.

بهرحال اگر در مورد نمونه های تازه و یا نگهداری شده در فرمل از آب لوله کشی استفاده کنید بارها مشاهده گردیده است که انگل *Blastocystis hominis* از بین رفته است و یا ارگانیسمهای آلوده کننده ای که زندگی آزاد دارند در نمونه مشاهده گردیده اند.

- توصیه می شود که استفاده از اتیل استات جایگزین استفاده از اتر گردد . همچنین استفاده از حلالهای دیگر مانند Hemo-De که بی خطرتر از انواع دیگر بوده ، توصیه می گردد.

- بعد از اینکه در مرحله آخر روش تغلیظ ، مایع رویی را خارج نمودید ، در حالیکه هنوز لوله وارونه است ، کناره های آن را با یک سواب پنبه ای تمیز کنید که اضافی ماده از بین برنده چربی خارج گردد. این عمل مخصوصاً در مواردی که از لوله های پلاستیکی استفاده می شود ، مهم است . چون اگر این مواد وارد رسوب موجود در لوله گردد در زیر میکروسکوپ حبابهایی را ایجاد می کند که باعث می شود که مواد و عناصر مورد نظر پوشانده شوند و یا به سختی مشاهده گردند و همچنین در هنگام تهیه گسترش سوسپانسیون تمایل دارد که در وسط لام تجمع حاصل کند و تهیه یک گسترش خوب به سختی امکان پذیر است .

- اگر نمونه ها در ماده نگهدارنده (SAF) نگهداری شوند ، روش انجام آزمایش تغلیظ از مرحله ۲) شروع خواهد شد.

- اگر نمونه ها در (PVA) نگهداری شوند مراحل ۱ و ۲ روش انجام آزمایش تغلیظ باید به شرح زیر اصلاح گردد. مدفوع و PVA را بوسیله یک اپلیکاتور مخلوط نمائید. سپس حدود نیمی از آن را به داخل یک لوله مناسب ریخته و با سرم فیزیولوژی تا سر لوله را پر کنید. حدود ۳ میلی لیتر از مخلوط سرم فیزیولوژی ، PVA و

مدفوع را از طریق گاز مرطوب که داخل قیف گذاشته اید ، به داخل لوله سانتزیفوژ ۱۵ میلی لیتری صاف کنید و سپس بقیه مراحل را از مرحله ۳ ادامه دهید .

- علیرغم نوع ماده نگهدارنده استفاده شده ، رسوب خیلی غلیظ و یا خیلی رقیق می تواند بیانگر روش تغلیظ غیر صحیح باشد.

حدودیتهاي روش:

- تک یاخته های مشاهده شده در آزمایش مستقیم باید بوسیله روش رنگ آمیزی دائمی تأیید شوند. بعضی از تک یاخته ها کوچک بوده و تشخیص آنها در آزمایش مستقیم نمونه مشکل می باشد. حتی اگر نوع انگل در آزمایش مستقیم تشخیص داده شود، جداسازی آن انگل با روش رنگ آمیزی دائمی، تشخیص را تأیید می کند.

- مخصوصاً تأیید تشخیص در مواردی که انگل آنتاموباهیستولیتیکا جدا میگردد ، بسیار مهم است که این امر در مورد انگل آنتاموباکلی صدق نمی کند.

بعضی از ارگانیسمها مانند ژیا ردیا لامبلیا ، تخم های کرم قلابدار و بعضی مواقع تخمهای کرم تریکوسفال ممکن است در روش تغلیظ انجام شده با مدفوعی که در PVA نگهداری شده مجربی مدفوعی که در فرمالین نگهداری شده ، حفظ نگردند.

بهر حال در مواردی که آلودگی به انگلهای فوق به میزان متوسط تا شدید باشد ، این مشکل کمتر مشاهده می گردد. همچنین شکل لار

و های استرونیلوئیدس استزکورالیس و کیستهای انتاموباکلی در
نمونه تخلیظ شده مدفوعی که در PVA نگهداری شده بخوبی نمونه
های نگهداری شده در فرمالین مشخص نمی باشند.

به طور معمول اووسیست ایزوسپورابلی (*Isospora belli*)
در رسوب نمونه تخلیظ شده مدفوعی که در PVA نگهداری شده ،
حفظ نگردیده و تخریب می گردد.

دکتر شهلا فارسی

آزمایشگاه مرجع
سلامت

اردیبهشت ۸۷

Reference :

1- Procedures for the recovery and identification of
parasites from the
intestinal tract. Approved Guideline (2006). NCCLS (
National committee for clinical laboratory Standards) .

M28-A

