التشخيص المختبري للطفيليات الابتدائية والديدان

Laboratory diagnosis of parasitic protozoa and helminthes

ان التشـخيص المختبري يعد جزءاً مهماً لتحديد الطفيلي المسـبب للمرض فهو يؤكد التشـخيص السـريري clinical diagnosis ويوفر دليلاً لايقبل الشـك على وجوده.ان مسـؤولية التشـخيص الدقيق تتطلب تدريباً خاصـاً ومهارة ،وقدرة على معرفة الطفيلي وتمييزه من الشـــوائب والمواد الغريبة الموجودة ،وكذلك على توفر الاحتياجات من اجهزة ومواد ضرورية.

الاجهزة والمواد الضرورية : Instrument & apparatus

فيما يلي بعض الاجهزة والمواد الضرورية المستعملة في مختبر تشخيص الطفيليات:-

1. المجهر الضوئي المركب light compound microscope

يجب ان يحتوي على عدسـات شـيئية objective lenses ذات قوة تكبير صـغرى low power 10x وكبرى High power40XوزيتيةOil immersion100X. وعدسـات عينية ocular lenses ذات قوة تكبير 5 و10 ويكون مزود بمســـرح ميكانيكي mechanical stage ومكثف تحت المســـرح substage condenser مع مصدر ضوئي light source ومرشحات ضوء filters.

2. مجهر تشريح Dissecting microscope

3. حـاضـــنـة incubator وفرن تجفيف drying oven وجهـاز طرد مركزي centrifuge ومعقم بخـاري Autoclaveوجهاز تحضـير المقاطع النسـيجية microtome وادوات تشـريح ومصـباح كحولي Bunsen burner وعدســات يدوية وانواع مختلفة من ابر الزرق syringes وشــاش gauze وحمام مائي water bath صفيحة حارة hot plate.

4. الكواشف والمواد الكيميائية Reagents and chemicals

للفحوصات الاعتيادية هناك حاجة الى قناني لحفظ الطفيليات محلول الملح الفسيولوجي Nacl 0.9 % ومحلول اليود I_2 او اللوكال ايودين ومحلول كبريتات الزنك $ZnSO_4$ ومحلول الســكروز ولجمع النماذج المعدة للفحص نحتاج فورمالين formalin ومحلول شودن Schaudinn's ومحلو دايكرومات البوتاسيوم واصباغ مختلفة مثل كيمزا Giemsa ورايت wright وليشـــمـان leishman وازرق المثيلين methylene blue وصـــبغة الايوسـن eosin , وصـبغة زيل نلسـن المحورة Modified Ziehl – nelson وصـبغة مالكيت الخضـراء malachite green كما يشـترط توفر كميات مناسـبة من الكحول الاثيلي ethyl alcohol وزايلين xylene وايثر ether وكليسرول glycerol وماء مقطر وبعض الكواشف المستعملة يومياً للتشخيص.

<u>طرق تشخيص الطفيليات :</u>

يتم تشخيص الطفيليات بطريقتين اساسيتين هما :

1. التشـــخيص الســـريري clinical diagnosis: ويعتمد على الاعراض التي يســـببها الطفيلي عند اصـــابته المضيف.على سبيل المثال الاسهال ، والحمى ،والتقيأ والغثيان والضعف العام .

2. التشخيص المختبري laboratory diagnosis: ويعتمد على اكتشاف وجود الطفيلي parasite في المضيف host في واحد او اكثر من ادوار حياته. ان التشـخيص المختبري وكفاءته يعتمد على التحضـير الجيد للمواد المراد فحصها ودرجة خبرة الشخص العامل بالفحص وقدرته على تمييز الانواع المختلفة.

الطرق المختبرية لتشيخص الطفيليات:

(1)فحص الغائط fecal or stool examination (G.S.F)

يستعمل الغائط المطروح حديثاً اوالتحضيرات المثبتة والمصبوغة للبحث عن بيوض ويرقات الديدان helminthes التي تتطفل وتعيش في القناة الهضمية للمضيف مثل دودة الاسكارس ويفضل استخدام الغائط الطري للتشخيص ويفحص بأحد الطرق التالية :

أ.طريقة المسحة المباشرة الرطبة اوالتحضيرات المؤقتة direct wet smear or temporary method:

تؤخذ كمية صغيرة من الغائط بواسطة عود خشبي wooden stick وتوضع على شريحة زجاجية وتمزج مع قطرة من المحلول الملحي الفسلجي 0.9%(saline)وتغطى بغطاء الشريحة ويستعمل لفحص بيوض ويرقات الديدان أحياناً يستعمل اللوكل ايودين لتمييز وصبغ البيوض eggs ومعرفة تراكيبها.حيث تظهربلون الاصفر الداكن والبني.

ب.الطرق غير المباشرة طرق تركيز الغائط stool concentration methods :

تستعمل هذه الطرق اذا كان عدد الطفيليات في العينة قليل ، وكذلك لمعرفة مدى نجاح علاج الشخص المصاب بالطفيلي عن طريق اجراء عد للطفيلي, ولغرض العثور والكشف عن بيوض بعض الديدان اذ كانت قليلة مثل بيوض Taenia او S.mansoni او اية بيوض ova اخرى وتقسم هذه الطرق الى:

1.طريقة الترسيب Sedimentation method:

في هذه الطريقة الطفيليات لا تطوف بل تنزل الى الاسفل وتترسب في قعر الانبوبة بواسطة عملية الطرد المركزي centrifuging.نأخذ جزء صغير من الغائط تقريباً 0.5- 1 غم من الغائط و يخلط مع محلول ملحي saline في انبوبة طرد مركزي ذات نهاية مخروطية يخلط جيداً بالرج ثم يصفى خلال شاش لأجل التخلص من الجزيئات والمواد الكبيرة وبقايا الطعام ، يضاف للمترشح محلول ملحي ثم نقوم بعملية الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 2 دقيقة ثم نسكب الطافي ونعيد نفس الخطوة حتى نحصل على محلول طافي صافي , بعد ذلك نترك المحلول لمدة 2 دقيقة ونفحص وناخذ قطرة صغيرة من الراسب وتفحص بالمسحة المباشرة الرطبة.بهذه الطريقة يمكن الكشف عن بيوض الديدان, واكياس الابتدائيات.افضل طرق الترسيب هي طريقة Formaline-saline ether sedimentation. يستعمل في هذه الطريقة محاليل ذات كثافة نوعية واطئة.

2. التطويف floatation method:

يعتمد على الفرق في الكثافة النوعية للمحاليل وبيوض ويرقات الديدان، حيث تطوف أطوار الطفيلي ويترسب الغائط في القعر. تستخدم كبريتات الزنك 33٪ في هذه التقنية تعتمد الفكرة أن أي وزن خفيف للمرحلة الطفيلية سوف تطفو على قمة المحلول ذو الكثافة النوعية العالية.محلول كبريتات الزنك (33٪)؛ يحضر باذابة 330غم من كبريتات الزنك المائية (ZnSo4 7H2o) في لتر واحد من الماء المقطر.طريقة عمل التطويف نفس طريقة الترسيب لكن يفحص الطافي وليس الراسب.ان طريقة التطويف غير مناسبة لبيوض المخرمات ذات الغطاء trematoda حيث خلال العملية ينفتح العطاء وتمتلئ البيوض بالمحلول وتترسب للاسفل ولا يتم الكشق عنها.وكذلك لا تستعمل للكشف عن بيوض Ascaris غير المخصبة unfertilized حيث تكون جدا ثقيلة فلا تطوف.

ج. التحضيرات المثبتة الدائمية permanent preparation :

يتم عمل التحضيرات الدائمية وذلك بعمل مسحة من عينات الغائط الطري fresh او الغائط المعامل بأحد طرق التركيز او الغائط المحفوظ مع احد محاليل الحفظ والتثبيت ونعمل مسحة خفيفة thin smear على شريحة زجاجية نظيفة ثم بعد ذلك تترك لتجف بالهواء ولغرض تثبيت المسحة على الشريحة نضيف لها كحول ميثانول مطلق methanol absolute وبعد ان يجف الكحول تكون المسحات جاهزة للتصبيغ مع احد الصبغات الدائمية المتوفرة مثلTrichrome stain لصبغ اطوار الابتدائيات وصبغة Modified zeihl –neelson لصبغ طور oocysts لطفيلي Cryptosporidium ، صبغة

Aceto carmine تستعمل لصبغ الديدان ، وصبغة Gemisa لصبغ الابتدائيات. ان الغرض من التحضيرات الدائمية هي لأغراض بحثية تعليمية او تدريبية حيث يتم حفظ الشرائح الزجاجية المثبتة دون تلف الطفيلي لفترات طويلة.

محاليل حفظ الطفيليات في الغائط :1.فورمالين 2%1 .محلول دايكرومات البوتاسيوم 3.محلول شودن Schaudinn's 4.محلول PVA(polyvinyl alcohol)5.محلول ملحي فسلجي normal saline0.9%

احياناً لايتمكن الشخص من فحص الغائط مباشرتاً ولذا تضاف بعض المواد المثبتة والحافظة لكي لايتلف الغائط ومن أكثر تلك المواد المثبتة شيوعاً هي الفورمالين 10 % الذي يستخدم لحفظ أكياس وبيوض ويرقات الطفيليات ويفضل أن يسخن الى درجة 60 م^0 لان بيوض بعض الطفيليات تبقى حية ومعدية لفترات طويلة ويحضر هذا المثبت من فورمالين 10 مل ومحلول فسلجي 90 مل . ان عملية التثبيت مهمة ليس فقط لأغراض التشخيص فقط وانما هو وسيلة لحفظ النماذج الطفيلية للاستعمالات المستقبيلة والتدريب الشخصي للتعرف عليها وتمييزها.

تدرس الطفيليات احياناً بعد عمل مسحات ملونة دائمية . حيث تحضر المسحات من الغائط الطري او المحفوظ حيث تثبت العينة لمدة 4 ساعات بنسبة 3 مل من المثبت مع 1 غم من الغائط ولغرض التصبيغ يمكن استخدام صبغتي leishman stain أو Giemsa أحياناً تتطلب عمليات التشخيص القيام بزرع الطفيليات في أوساط زرعية محددة , وعموماً زرع الابتدائيات اسهل من استخدام الديدان.

(2) الفحص المباشر للإدرار Urine examination :

يكون الادرار ذو قيمة محدودة في الاصابة بالابتدائيات ويمكن الحصول على الطور الخضري trophozoites لطفيلي Trichmonas vaginalis عن طريق ترسيب الادرار للمصابين من كلا الجنسين بعد وضعه في جهاز طرد مركزي 1500دورة/ دقيقة لمدة 2 دقيقة . ويعد الادرار مصدر مهم لتشخيص الاصابة مع البلهارزيا الدموية Schistosoma heamatobium حيث يوصى الشخص بعمل مجهود رياضي قبل اخذ عينة الادرار لغرض الكشف عن البيوض البلهارزيا ، كذلك يكشف عن بيوض Dioctophyma renale في كلا الحالتين يتم جمع وترسيب الادرار.

(3) فحص الدم blood examination:

يمكن الحصول على الدم بوخز الاصبع او فص الاذن وفي حالة الحاجة الى كمية كبيرة منه يتم اخذ دم وريدي بواسطة سرنجة طبية من الذراع ، نعمل مسحات طرية أو جافة من الدم وصبغها بالصبغة المناسبة حيث تستعمل المسحة الرقيقة الجافة thin في الغالب لكن عندما تكون شدة الاصابة واطئة (عدد الطفيليات في الدم قليل) يعمل مسحة دم جافة سميكةthick كما في حالة الاصابة المزمنة وتصبغ بصبغة Leishman او Giemsa اوwhright, يفحص الدم لغرض الكشف عن يرقات ديدان microfilaria بعد اخذ مسحة من الدم الوريدي .

(4) الفحص المباشر للقشع Sputum examination

تجمع عينة القشع في الصباح الباكر وتفحص بواسطة عمل مسحة مباشرة رطبة مع المحلول الملحي الفسلجي 0.9% Nacl لغرض البحث عن بيوض او يرقات الديدان المخرم الرئوي Paragonimus westerman نادراً جداً نعثر على بيوض Schistosoma.

(5) فحص سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal fluid:

يسحب سائل النخاع الشوكي C.S.F من قبل الطبيب او الممرض المختص بواسطة ابرة طبية خاصة بين الفقرة القطنية الرابعة والخامسة وبعمق 4-5 سم ، بكمية 6-7مل في انبوبتين ونعمل له عملية تركيز بالطرد المركزي ويعمل مسحات رطبة من الراسب لغرض كشف طفيلي Trypanosoma ،طفيليات اخرى ممكن ان تكشف مثل Naegleria ويرقة الدودة الخيطية مثل Angiostrongylus.

(8)الشريط اللاصق Tape technique :لقلة مشاهدة بيوض الديدان الدبوسيةEnterobius vermicularis في غائط المصاب لكنها توجد في المنطقة المحيطة بفتحة الشرج , لذلك يفضل استخدام الشريط اللاصق عند الصباح الباكر ثم يوضع الشريط على شريحة زجاجية ويزال الصمغ من الشريحة بالزايلين ثم تفحص الشريحة.

(9) Segmoidoscope المنظار :

يمكن اخذ نماذج نسيجية من الاعضاء المصابة أو من الغشاء المخاطي للامعاء بواسطة ناظور حيث تفحص مباشرة او تزرع بأوساط زرعية مناسبة كما في بيوض Schistosoma sp.

(10) الاشعة السينية X-Ray :

تستخدم الاشعة السينية لتشخيص الطفيليات التالية : Ascaris lumbricoide، Echinocuccus granulosus ، Taenia solium (cyst)

(11) التشخيصات المصلية او المناعية serodiagnosis :-

يم تشخيص اغلب الاصابات الطفيلية سواء كانت ابتدائيات protozoa اوديدان helminthes عن طريق فحص مصل الدم serum او عينات الغائط او عينات اخرى لغرض الكشف عن مستضدات الطفيلي (مواد ايضية ينتجها الطفيلي او اجزاء من جدار جسم الطفيلي) او الكشف عن احد انواع الاضداد النوعية(IgG-IgM-IgA-IgE) التي تنتج في جسم المضيفhost نتيجة الاصابة بالطفيلي.يستعمل حالياً لكشف النساء المصابات بداء القطط Toxoplasmosis لكن من سلبيات التشخيص المناعي لا يمكن التمييز بين الاصابة الحادة والمزمنة acute and chronic infection. ممكن تستعمل لتشخيص: Paragoniums westermani ، Clonorchis sinensis، Ascaris Lumbricoides ، Ascaris duodenale ، Filaria.

انواع طرق التشخيص المناعي تشمل :

1.تثبيت المتمم complement fixation test

2.التلازن الدموي haemagglutination test

3.كشف الـ Ab المشعة indirect fluorescent test

4.تلازن اللاتكسlatex agglutination test

5. اختبار داخل الجلد intradermal test

6 .الترسيب precipitation test

(12) التقنيات الجزيئية molecular techniques

ان اساس هذا الكشف يعتمد على استخلاص الحمض النوويDNA للطفيلي ثم بعد ذلك مضاعفة جزء منه بأستعمال تقنية PCR والكشف عنه. تستخدم هذا التقنية لغرض كشف وتمييز انواع وسلالات الطفيلي المتشابه مظهرياً والمختلف وراثياً وجينياً مثل سلالات دودة الاكياس المائية Echinococcus granulosus.