# الطفيليات العملي

## المختبر الاول

### المصادر


١- علم الطفيليات الطبية Medical parasitology (٢٠٠٢).
د.والتربيك و د. جونديفيز. ترجمة. د.محمد خير الحلبي. لفصل الرابع عشر ص٣٣١-٣٥٦.

٢- اساسيات علم الطفيليات العملي١٩٨٧. عبد اللطيف مولان. جامعة الموصل.

## التشخيص المختبري للطفيليات الابتدائية والديدان

## Laboratory diagnosis of parasitic protozoa and helminthes

ان التشخيص المختبري يعد جزءاً مهماً لتحديد الطفيلي المسبب للمرض فهو يؤكد التشخيص السريري clinical diagnosis ويوفر دليلاً لايقبل الشك على وجوده. ان مسؤولية التشخيص الدقيق تتطلب تدريباً خاصاً ومهارة ،وقدرة على معرفة الطفيلي وتمييزه من الشوائب 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 عدسات شيئية objective lenses ذات قوة تكبير صغرى low power 10x وكبرى High power40Xوزيتية immersion100X Oil. وعدسات عينية ocular lenses ذات قوة تكبير 5 و10 ويكون مزود بمسرح ميكانيكي mechanical stage ومكثف تحت المسرح substage condenser مع مصدر ضوئي light source ومرشحات ضوء filters .

2. مجهر تشريح Dissecting microscope

3. حاضنة incubator وفرن تجفيف drying oven وجهاز طرد مركزي centrifuge ومعقم بخاري Autoclaveوجهاز تحضير المقاطع النسيجية microtome وادوات تشريح ومصباح كحولي Bunsen burner وعدسات يدوية وانواع مختلفة من ابر الزرق syringes وشاش 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 % محلول اليود $I_2$ محلول كبريتات الزنك $ZnSO_4$ ومحلول السكروز ولجمع النماذج المعدة للفحص فورمالين formalin ومحلول شودن Schaudinn's ومحلو دايكرومات البوتاسيوم واصباغ مختلفة مثل كيمزا Giemsa ورايت wright وليشمان leishman وازرق المثيلين methylene blue وصبغة الايوسن eosin , وصبغة زيل نلسن المحورة Modified Ziehl – nelson وصبغة مالكيت الخضراء malachite greenكما يشترط توفر كميات مناسبة من الكحول الاثيلي ethyl alcohol وزايلين xylene وايثر ether وكليسرول glycerol وماء مقطر disstiled water وبعض الكواشف المستعملة يومياً للتشخيص.

**طرق تشخيص الطفيليات :**

يتم تشخيص الطفيليات بطريقتين اساسيتين هما :

1. التشخيص السريري clinical diagnosis:ويعتمد على الاعراض التي يسببها الطفيلي عند اصابته المضيف.

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

**<u>الطرق المختبرية لتشخيص الطفيليات:</u>**

**(1)فحص الغائط fecal or stool examination**

يستعمل الغائط المطروح حديثاً او التحضيرات المثبتة للبحث عن اكياس والاطوار الخضرية للابتدائيات protozoa ،وبيوض ويرقات الديدان helminthes التي تتطفل وتعيش في القناة الهضمية للمضيف 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 وتفحص لغرض ويستعمل لفحص الاطوار الخضرية الحية للحميات والسوطيات والهدبيات living organismرملاحظة حركتها. أحياناً يستعمل مثبت اليودIodine 1% المائي حيث يقتل جميع الكائنات الحية ويستعمل لغرض تمييز الاكياس cysts,البيوض eggs ومعرفة تراكيبها حيث يصبغ حبيبات الكروماتين والانوية والفجوات الغذائية,حيث تظهربلون الاصفر الداكن والبني.ايضاً تستعمل صبغة ازرق المثيلين buffered methylene blue للكشف وتصبيغ الاطوار الخضرية trophozoites للحميات الاميبات,ولا تصبغ الاكياس cysts,ممكن ايضاً استعمل صبغة الايوسين المائي Eosin 1% حيث ممكن بسهولة الكشف الطفيليات حيث انها لا تصبغ بلون الوردي وتظهر مرئية واضحة.

**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 او اكياس cysts,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 او اكياس الطفيليات ، 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 ($ZnSo_4\ 7H_2o$) 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 الغطاء وتمتلئ البيوض بالمحلول وتترسب للاسفل ولا يتم الكشف عنها.

**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 نترك 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 التحضرات 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 0.9% normal saline

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 الثبيت مهمة ليس فقط لأغراض التشخيص فقط وانما هو وسيلة لحفظ النماذج الطفيلية للاستعمالات المستقبلية 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 500 ادورة/ 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 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 او رايت Field , whright يفحص الدم لغرض الكشف عن طفيليات : plasmodium ؛ ديدان microfilaria ؛ Trypanosoma ؛ Leishmania.احياناً نعما مسحة مباشرة رطبة Direct wet mount من الدم الكلي حالاً بعد الحصول عليه او بعد الطرد المركزي عادتاً يستعمل لكشف طفيلي Trypanosoma و microfilarai.

**(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 الفم mouth examination:**

يفحص الفم واللثة واسفل الاسنان واللوزتين بواسطة اخذ مسحة بواسطة Swab وعمل مسحة مباشرة رطبة للتأكد من وجود الابتدائيات على سبيل المثال Entamoeba gingivalis.

**(6) فحص السائل المهبلي :**

تفحص افرازات المهبل المرضية للمرأة عن طريق عمل مسحة بواسطة swab ونعمل مسحة مباشرة رطبة وتفحص او نعمل مسحة وتثبت وتصبغ مع صبغة كيمزا لكشف وتشخيص الاصابة مع Trichomonas vaginalis.

**(7) الفحص النسيجي وسوائل الجسم :**

لفحص الطفيليات التي تصيب الاعضاء والانسجة ، وتؤخذ المادة المراد فحصها biopsy بالقشط او السحب من مواقع الاصابة مثل سطح الجسم بالشمانيا الجلدية او نخاع العظم او الطحال ..... الخ ثم تعمل منها مسحة مباشرة او تزرع ثم تفحص مثل الـ Leishmania , Trypanosoma.

**(8) فحص سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal fluid:**

يسحب سائل النخاع الشوكي CSF من قبل الطبيب او الممرض المختص بواسطة ابرة طبية معقمة 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 ، ممكن ان نكشف عن طفيلي plasmodium الملاريا.

**(8)الشريط اللاصق Tape technique**

لقلة مشاهدة بيوض الديدان الدبوسية في براز 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) زراعة الطفيليات Culture:**

يتم زرع عينات الغائط او الدم او بعض السوائل الجسمية او قشط الجلد في اوساط زرعية مناسبة مختلفة حسب نوع الطفيلي في حالة كون الطفيلي قليل في العينة او مشكوك فيه لغرض زيادة اعداد الطفيلي وكذلك الحصول على اطوار اخرى للطفيلي وكذلك لغرض اجراء الدراسات البحثية ومعرفة تاثير بعض المواد والعقاقير على الطفيلي.

**Laboratory animals:** C:\Users\hareth\Desktop\receive

حيث يمكن الحفاظ على بعض انواع الطفيليات في الحيوانات المختبرية كالفأر والجرذ وخنزير غينيا . وذلك اما بحقن العينة الحاوية على الطفيلي في جسم الحيوان او تركه يتغذى عليها ثم يفحص الحيوان المختبري للتأكد من وجود الطفيلي. هنالك فحص xenodiagnosis لتشخيص مرض الشاكس T.cruzi حيث يسمح للبق بالتغذي على المريض ثم يفحص البق بعد ذلك للتأكد من وجود اطوار الطفيلي فيه.

**(11) التشخيصات المصلية او المناعية Immunological or 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 المضيف host 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.

انواع طرق التشخيص المناعي تشمل :

1.تثبيت المتمم complement fixation test

2.التلازن الدموي indirect haemagglutination test

3.كشف الـ Ab المشعة indirect fluorescent test

4.تلازن اللاتكس latex agglutination test

5. اختبار الجلد intradermal test

6 .الترسيب precipitation test

## (12) التقنيات الجزيئية molecular techniques

مثل PCR ان اساس هذا الكشف يعتمد على استخلاص الحمض النووي DNA للطفيلي ثم بعد ذلك مضاعفة جزء منه والكشف عنه. تستخدم هذا التقنية لغرض كشف وتمييز انواع وسلالات الطفيلي المتشابه مظهرياً ومختلفة وراثياً وجينياً.