التشخيص المختبري للطفيليات الاولية 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 المختبري تتطلب تدريباً خاصاً ومهارة مركزة 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 power40X(جافة)Oil immersion100X. 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 التشريح Dissecting microscope

3. حاضنة incubator وفرن تجفيف drying oven وجهاز طرد مركزي centrifuge ومعقم بخاري Autoclave وجهاز 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

للتحويصلات الاعتيادية هناك حاجة الى قائمة لحفظ الطفيليات محلول الملح الفسيولوجي Nacl 0.9 % محلول اليود و محلول كبريتات الزنك $ZnSO_4$ ومحلول السكروز والجمع المعدة للفحص فورمالين formalin ومحلول شودن Schaudinn's ومحلول فيكروسك اليوديد البوتاسيوم واصباغ مختلفة مثل كيمزا Giemsa وزانيت wright وليشمان leishman والزرق المثيلين methylene blue وصبغة الايوسين eosin , وصبغة زيل النيلسن المعورة Modified Ziehl – nelson وصبغة مالكيت الخضراء malachite green كما يشترط توفر كميات مناسبة من الكحول الاثيلي ethyl alcohol وزايلين xylene وايثر ether وكليسرول glycerol وماء مقطر distilled water وبعض الكواشف المستعملة يومياً للتشخيص.

طرق تشخيص الطفيليات :

يتم تشخيص الطفيليات بطريقتين اساسيتين هما :

1. التشخيص السريري clinical diagnosis ويعتمد على الاعراض التي يصيبها الطفيلي عند اصابته المضيف.
2. التشخيص المختبري laboratory diagnosis: ويعتمد على الكشف 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 المحلل بالفحص وقدرته على تمييز الانواع المختلفة.

الطرق المختبرية لتشخيص الطفيليات:

(1)فحص البقط fecal or stool examination

يستعمل الفاحص المطروح حديثاً او المحضورات المثبتة للبحث عن البيض والاطوار الضخرية للابتدائيات protozoa ويوجد ويرقات الديدان helminthes التي تتطفل وتعيش في القناة الهضمية للمضيف وافضل استخدام الفاحص الطازج للتشخيص ويفحص بأحد الطرق التالية :

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

تؤخذ كمية صغيرة من الفاحص بواسطة عود خشبي wooden stick وتوضع على شريحة زجاجية وتمزج مع قطرة من المحلول الملحي الفسلجي 0.9% (saline) وتغطى بغطاء الشريحة وتفحص للعرض ويستعمل لفحص الاطوار الضخرية الحية للديدان والبروتوزوا والبيوض living organism ملاحظة حركتها. احياناً يستعمل ملون اليود Iodine 1% الملائم حيث يقتل ويمنع التكشف الحية ويستعمل لعرض تمييز الاكياس cysts البيوض eggs ومعرفة تراكيبها حيث يصبغ جيداً الترومفات والاذنية والديدان الخلوية حيث تظهر باللون الاصفر الفاتح والبني ايضاً تستعمل صبغة أزرق الميثلين buffered methylene blue للكشف وتصبغ الاطوار الضخرية trophozoites الحية الاميبات وكيسات cysts ممكن ايضاً استعمال صبغة الايوسين المائي Eosin 1% حيث ممكن بسهولة الكشف الطفيليات حيث انها لا تصبغ باللون الوردي وتظهر مرئية واضحة.

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

تستعمل هذه الطرق لاكتشاف عدد الطفيليات في العينة قليل ، وكذلك لمعرفة مدى نجاح علاج الشخص المصاب بالطفيلي عن طريق اجراء عد للطفيلي وتعرض الطور والكشف عن بيوض بعض الديدان اذا كانت قليلة مثل بيوض 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 وترسب في قعر الانبوبة بواسطة عملية الطرد المركزي centrifuging لاخذ جزء صغير من الفاحص تقريباً 0.5 - 1 غم من الفاحص و يخلط مع محلول ملحي saline في انبوبة طرد مركزي ذات نهاية مخروطية بشكل جيداً بالقرع ثم يصفى خلال شاش لأجل التخلص من العرقيات والمواد الكبيرة ويقلبها للعلم ، يضاف الترشيح محلول ملحي ثم تقوم بعملية الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 2 دقيقة ثم تسكب مباشرة من الراسب والفحص بالمسحة المباشرة الرطبة بهذه الطريقة يمكن الكشف عن بيوض الديدان والاكياس الابتدائيات افضل طرق الترسيب هي طريقة ether sedimentation Formaline-saline. يستعمل في هذه الطريقة محاليل ذات كثافة نوعية وقطنة.

2. التطويف flotation method:

يعتمد على الفرق في الكثافة النوعية للمحاليل وبيوض ويرقات او اكياس الطفيليات ، حيث تطوف اطوار الطفيلي وترسب الفاحص في القعر استخدم كبريتات الزنك ZS في هذه الطريقة تعتمد الفكرة أن أي وزن خفيف للعرطة الطفيلية سوف تطفو على قمة المحلول ذو الكثافة النوعية العالية محلول كبريتات الزنك (ZS)؛ يحضر بإذابة 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 ملائمة لبيوض الديدان ذات الغشاء trematoda حيث خلال العملية يتفتح الغشاء وتتلاشى البيوض بالمحلول والترسب للاسفل ولا يتم الكشف عليها.

ج. التحضيرات المثبتة الدائمية permanent preparation :

يتم عمل التحضيرات الدائمية وذلك بعمل مسحة من عينات الفاحص الطازج fresh او الفاحص المحفوظ بعد طرق التركيز او الفاحص المحفوظ مع احد محاليل الحفظ والتثبيت. عمل مسحة خفيفة thin smear على شريحة زجاجية نظيفة ثم بعد ذلك تترك لتجف بالهواء والغرض تثبيت المسحة على شريحة تنشف انها تحول ميثانول مطلق methanol absolute وبعد ان يجف التحول تكون المسحات جاهز: للتصوير ع احد الصبغات الدائمية المتوافرة مثل Trichrome stain لصبغ اطوار الابتدائيات وصبغة Modified zeihl –neelson لصبغ طور cocysts لطفيلي Cryptosporidium ، صبغة Aceto carmine تستعمل لصبغ الديدان ، وصبغة Gio... لصبغ الابتدائيات. ان الغرض من التحضيرات الدائمية هي لأغراض بحثية تعليمية او تدريبية حيث يتم حفظ الشرائح جاهزة الدائمية دون تلف الطفيلي لفترات طويلة.