

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مالاریا

دکتر احسان حیدری

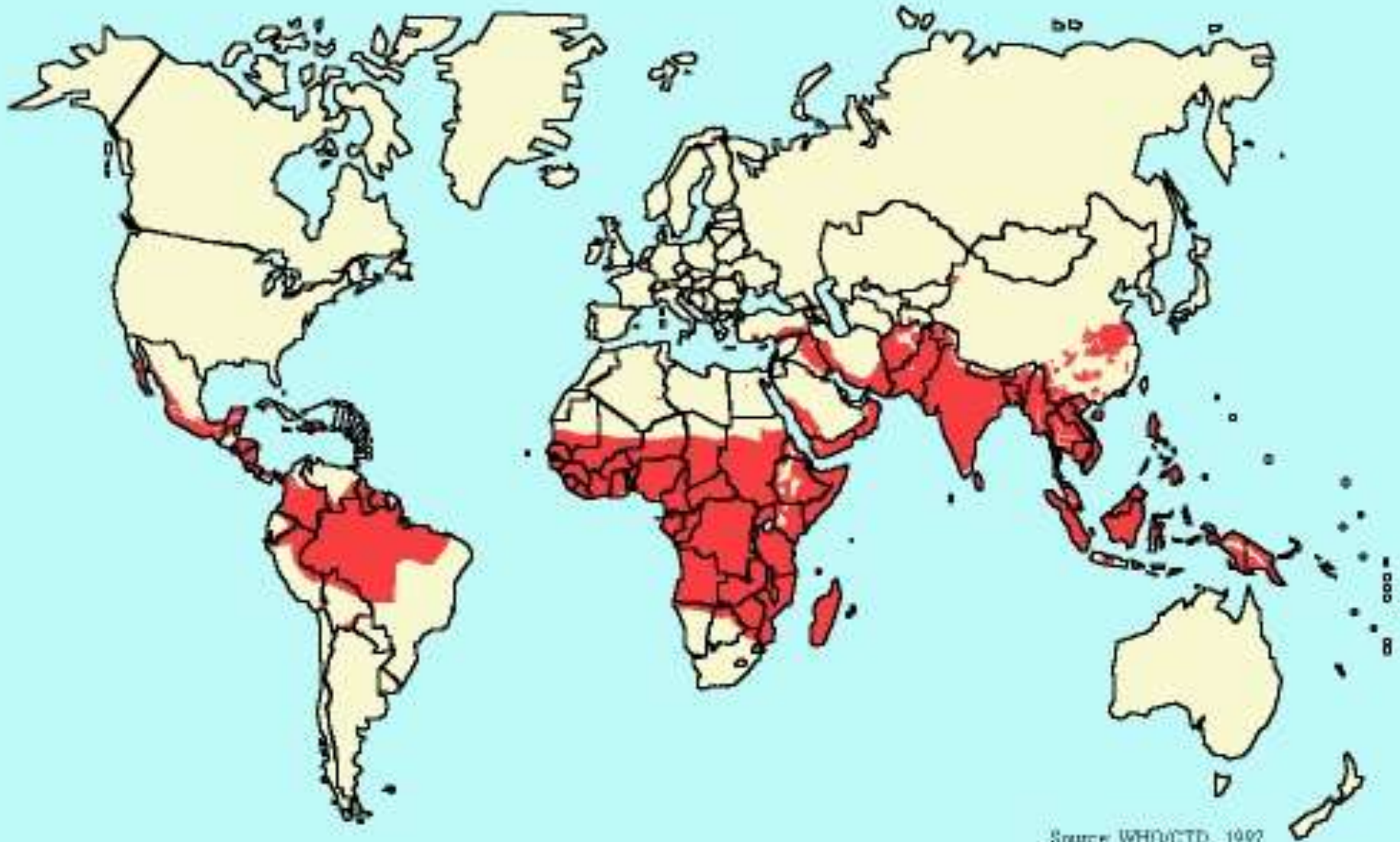
استاد دانشگاه علوم پزشکی البرز



مقدمه و تاریخچه

- مالاریا یا پالودیسیم
- بقراط آن را به تب های سه یک بد خیم ، سه یک خوش خیم و چهار یک تقسیم بندی کرد
- در کتاب اوستا به تب و لرز اشاره شده است.
- ابن سینا
- در اواسط قرن هفدهم از پوست درخت گنه گنه Cinchona برای درمان مالاریا استفاده شد.
- سالانه حدود 214 میلیون نفر به این انگل مبتلا می شود و ۴۳۷ هزار نفر در اثر مالاریا می میرند.
- تا حدود ۱۰۰ سال قبل ۳۰ درصد کل مرگ و میر های ایران مربوط به مالاریا بود.
- بیشترین موارد مالاریا در ایران مربوط به استانهای هرمزگان، سیستان و بلوچستان و کرمان است.

Distribution of Malaria



Source: WHO/CTD, 1997



گونه های مالاریای بیماریزا برای انسان

- Plasmodium vivax (Benign tertian M)•
- Plasmodium falciparum (Malignant tertian M.)•
- Plasmodium malariae•
- Plasmodium ovale•
- Plasmodium knowlesi

میزبانها

مهره دار : انسان به عنوان میزبان مهره دار دارای ۲ ویژگی است

- انسان مخزن انگل است و انگل را در خود نگه می دارد و سبب توسعه و گسترش آن می شود.

- میزبان واسط است و دوره تکثیر غیر جنسی یا شیزوگونی schizogony انگل در آن طی می شود.

بی مهره : گونه های از پشه آنوفل ماده

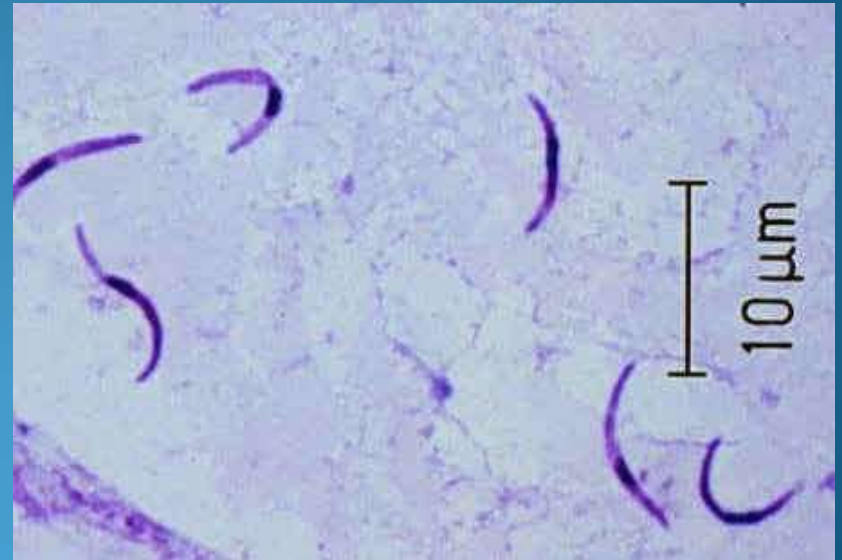
- ناقل انگل

- میزبان نهایی : تکثیر جنسی یا Sporogony

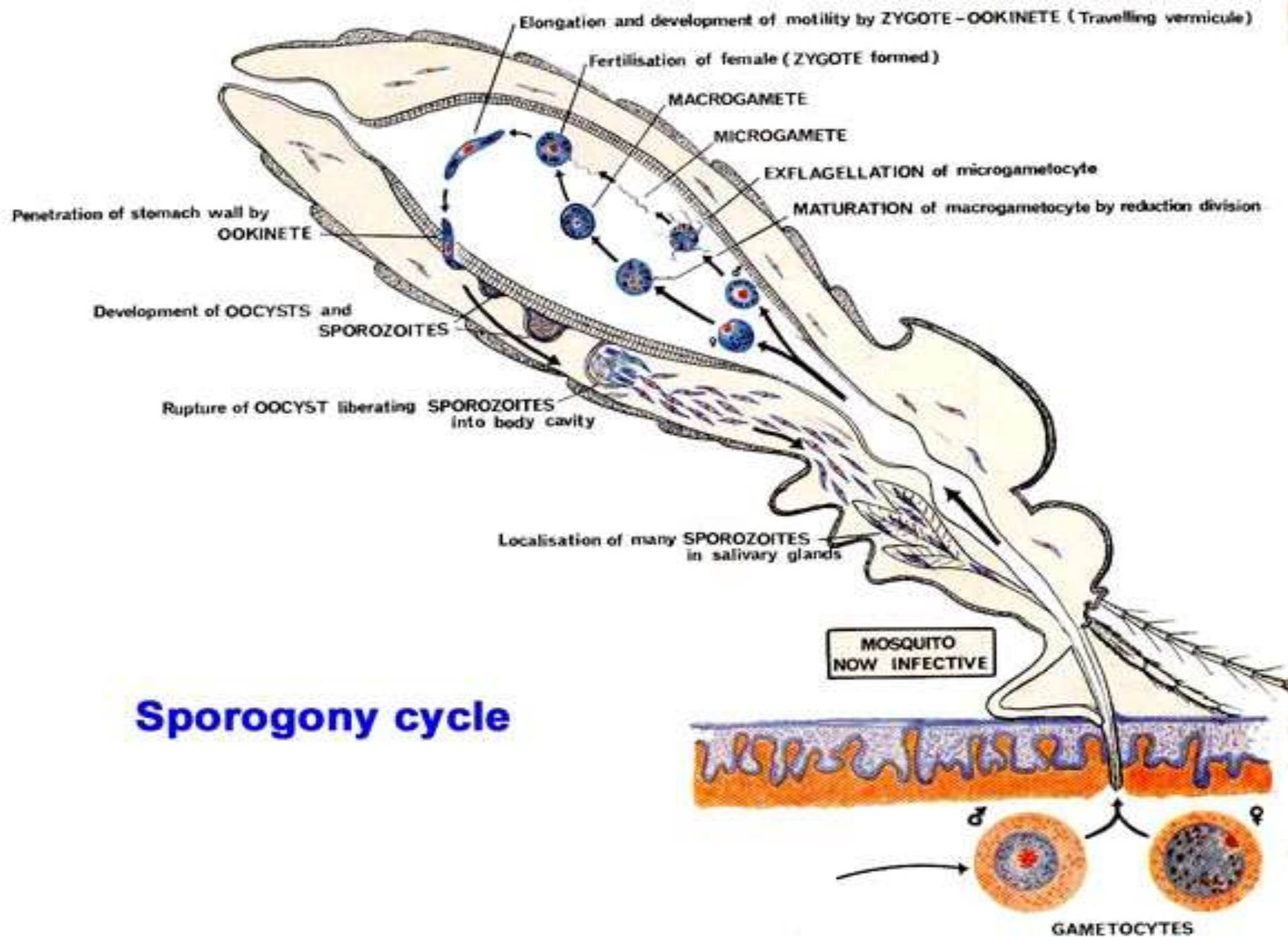
چرخه زندگی



Anophele



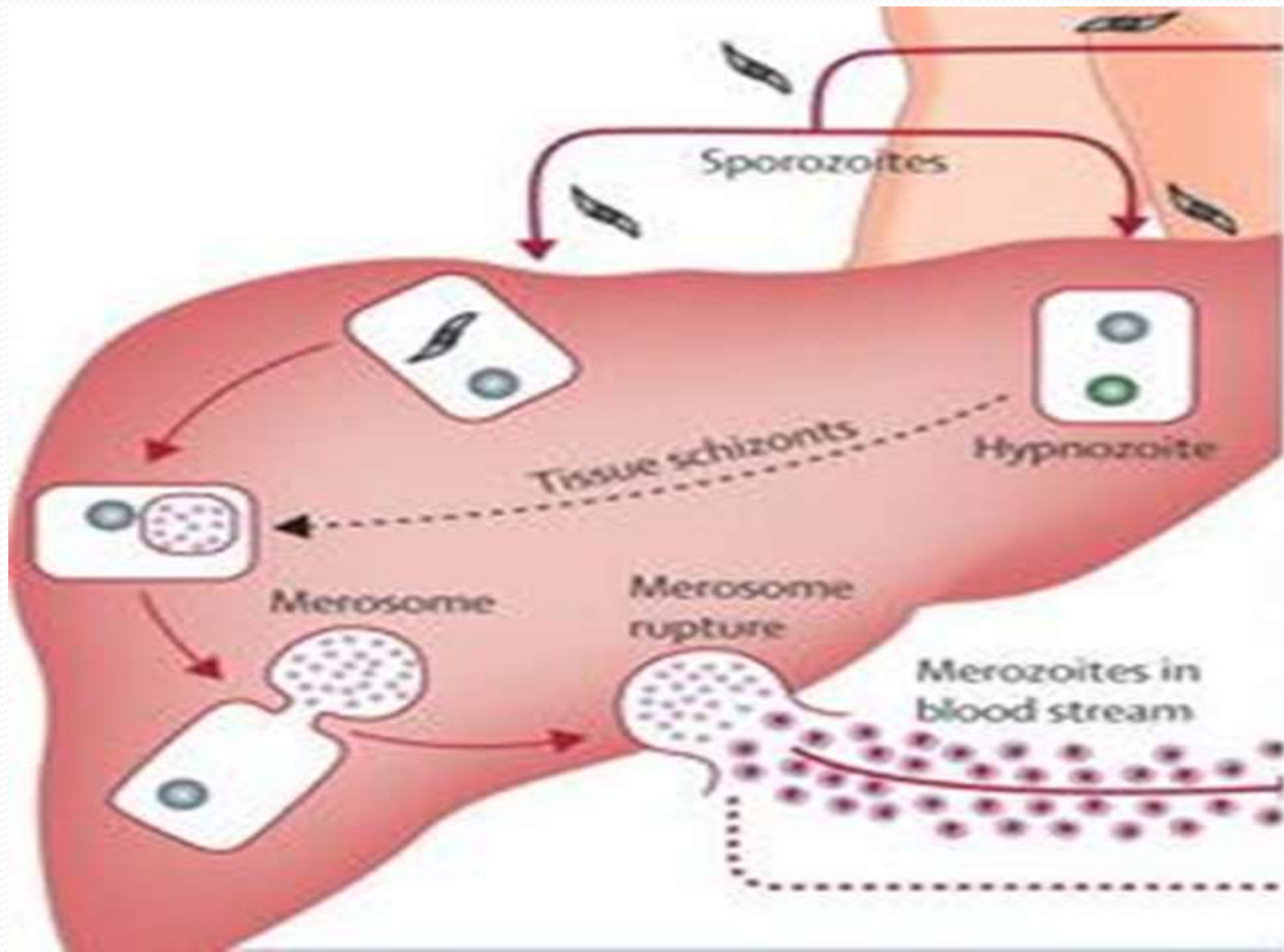
Sporozoite



سیکل زندگی انگل در بدن پشه

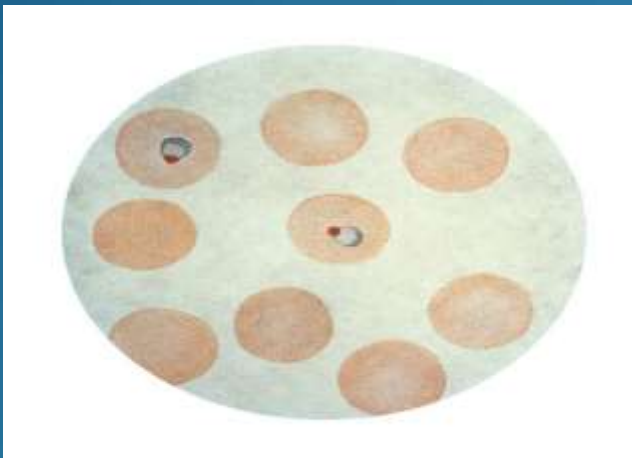
- در معده پشه ماکروگامتوسیت بزرگتر می شود و تبدیل به ماکروگامت می شود اما میکروگامتوسیت تبدیل به ۴-۸ عدد میکروگامت می شود (exflagellation).
- پس از لقاح گامت نر متحرک با گامت ماده سلول تخم یا زیگوت تشکیل می شود.
- سلول تخم تبدیل به سلول نوک تیزی به نام Ookinete می شود و اوکینت در زیر غشای بیرونی معده جایگزین می شود و در آنجا تکثیر شده و مجموعه ای از هزاران انگل را ایجاد می کند که به هر کدام از این انگل ها sporozoite گفته می شود و به مجموعه آنها Oocyst می گویند.
- با پاره شدن اووسیست اسپروزوئیت ها خارج می شوند و در غدد بزاقی پشه قرار می گیرند .
- مرحله sporogony: از زمانی که گامتوسیت ها وارد بدن پشه می شوند تا تولید اسپروزوئیت ها را اسپروگونی یا عمل تولید اسپروزوئیت ها می گویند. (۸-۱۶ روز)

Pre-erythrocytic schizogony

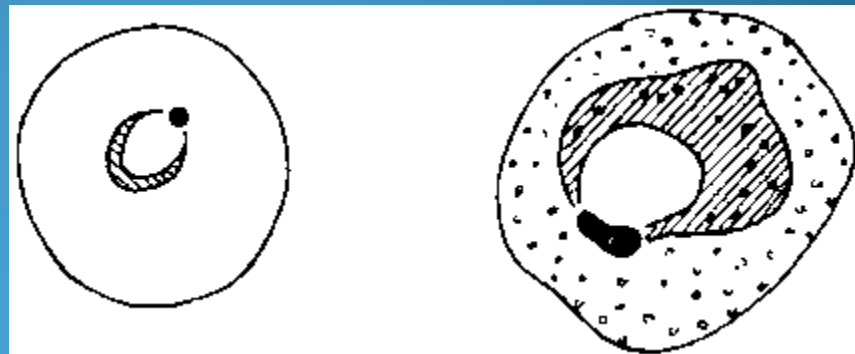
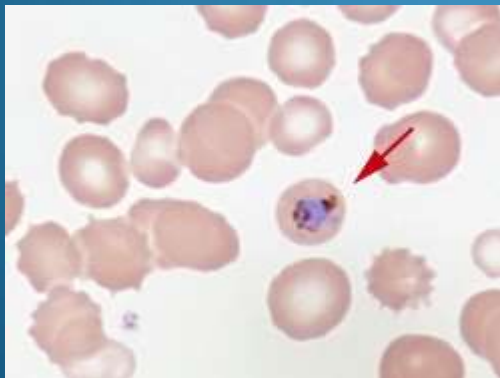


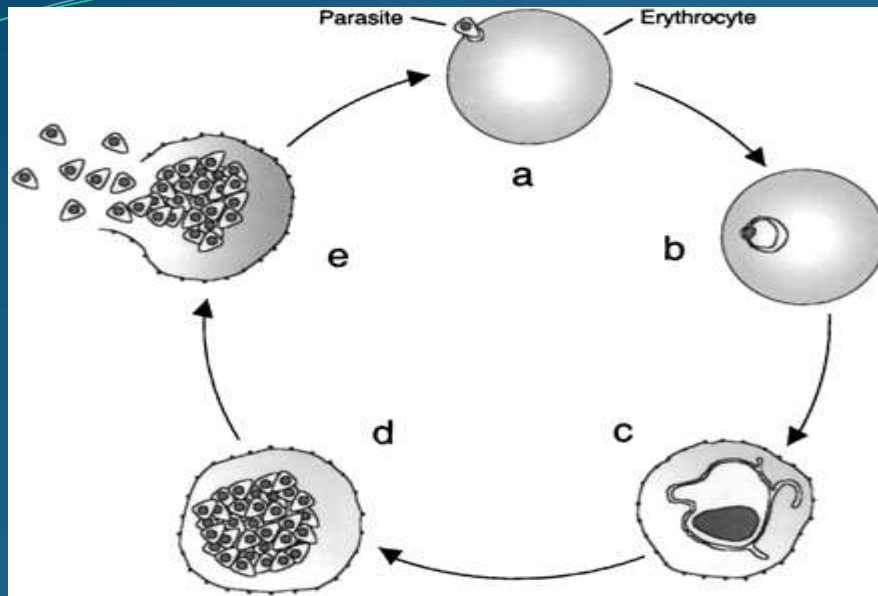
شیزوگونی خونی Erythrocytic schizogony:

- مرحله تروفوزوئیت جوان young trophozoite یا مرحله رینگ ring



- مرحله تروفوزوئیت در حال رشد growing trophozoite





Old trophozoite•

Immature shizont•

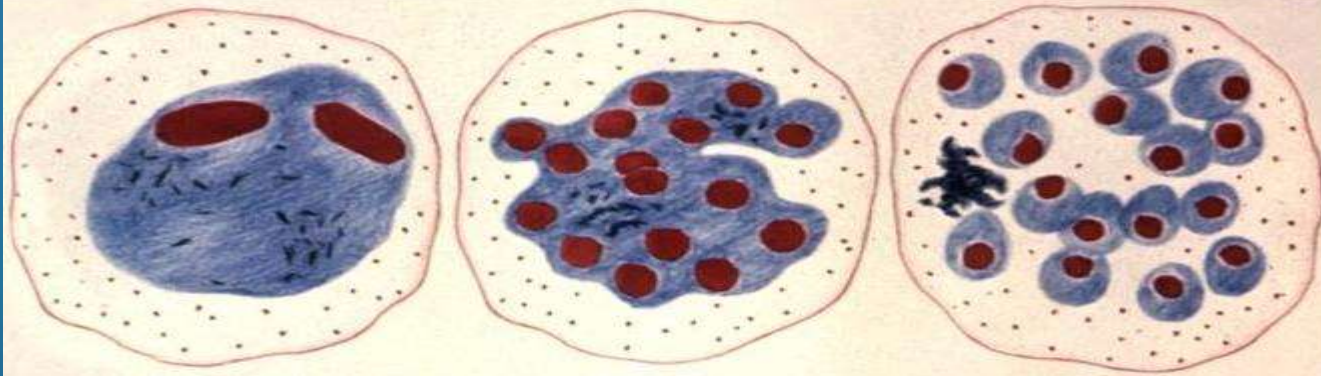
Mature shizont•

Schizonts

Immature
(Presegmenter)

Immature
(Presegmenter)

Mature
(Segmenter)



• یک دوره شیزوگونی خونی در پلاسمودیوم اواله ، پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمویوم فالسیپاروم ۴۸ ساعت طول می کشد. اما در پلاسمودیوم مالاریه ۷۲ ساعت طول می کشد.

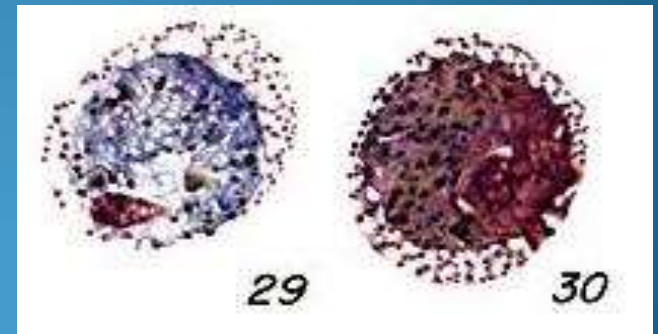
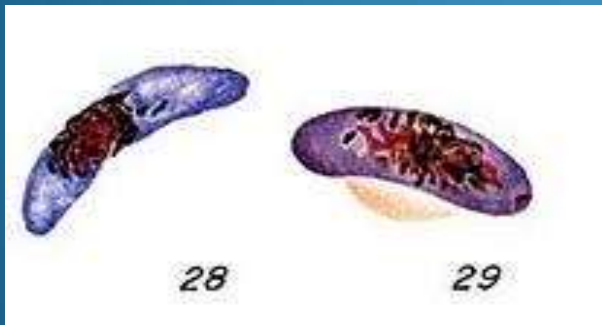
• تعداد مروزوئیت ها یی که در یک شیزوگونی در گلبول قرمز به وجود می آید:

- در پلاسمودیوم مالاریه و پلاسمودیوم اواله ۶-۱۲ عدد
- در پلاسمودیوم ویواکس ۲۲-۱۴ عدد
- در پلاسمویوم فالسیپاروم ۱۲-۲۸ عدد

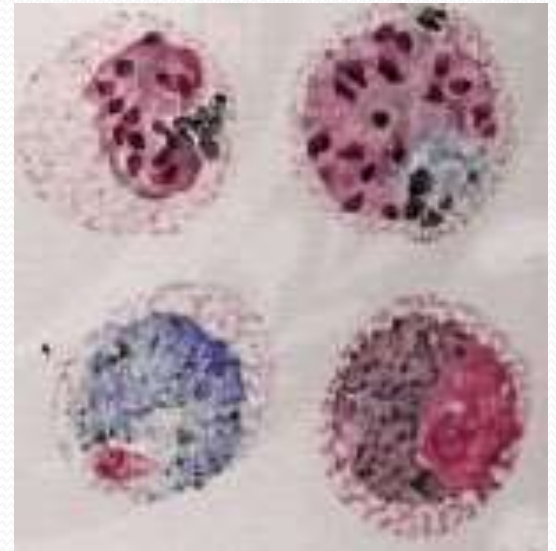
• به وجود آمدن سلولهای جنسی gametocytes

• Macrogametocyte: گامتوسیت ماده است که رنگ سیتوپلاسم آبی نسبتاً پر رنگ و کروماتین هسته متراکم و کناری است.

• Micro gametocyte: گامتوسیت نر است که در آن سیتوپلاسم آبی کم رنگ و کروماتین هسته پخش و مرکزی است.



Plasmodium Falciparum



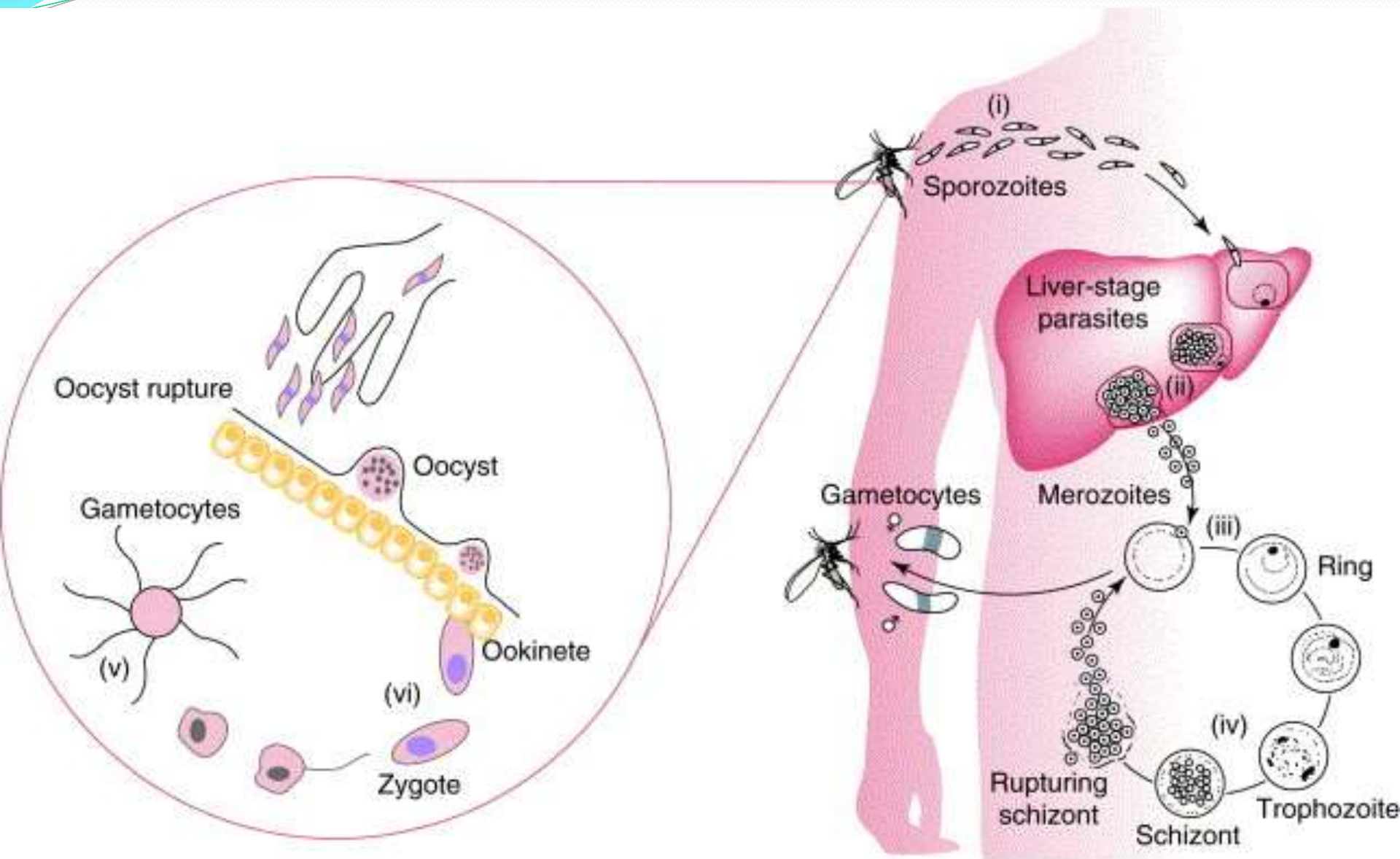
Plasmodium vivax:

Plasmodium malariae

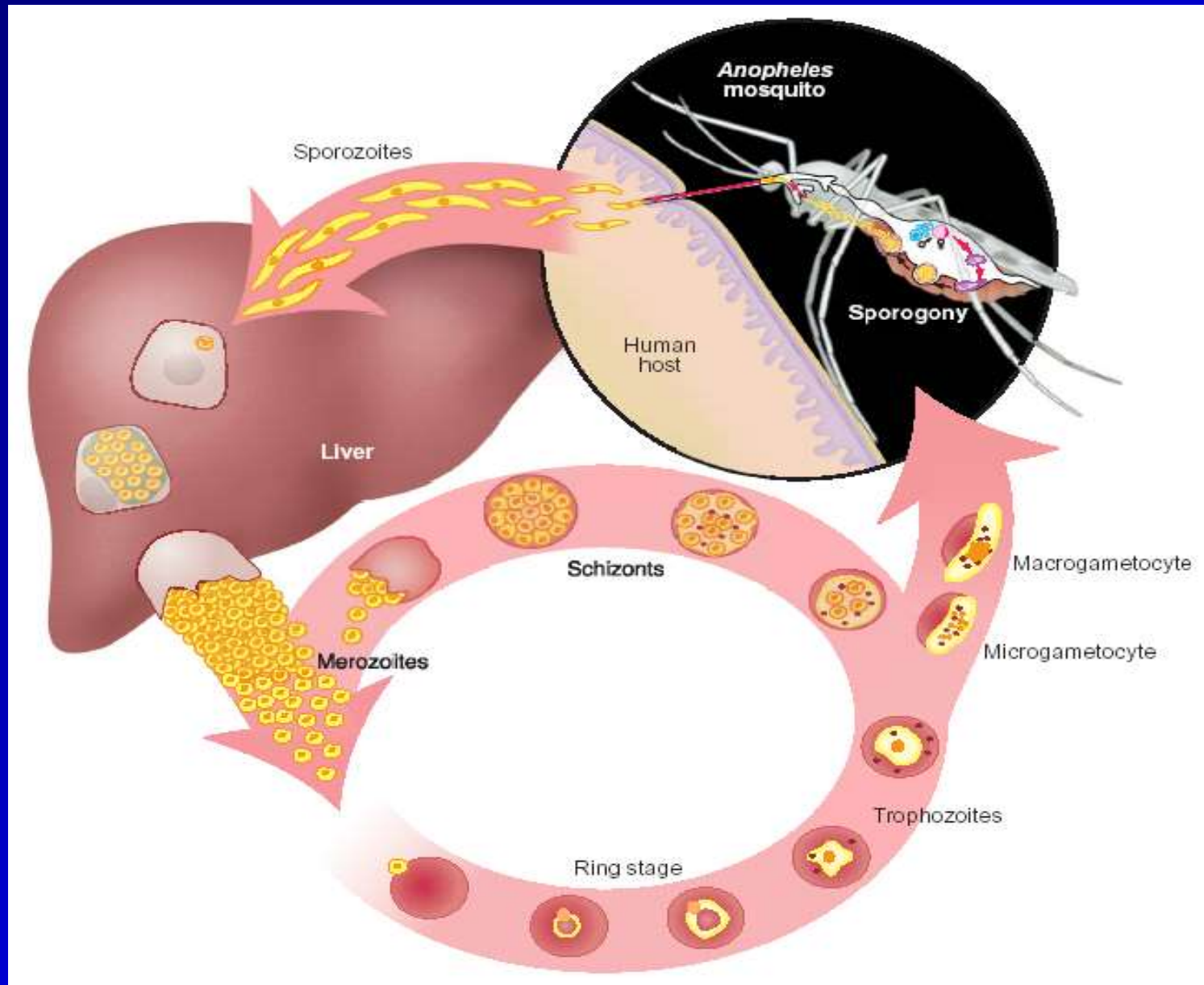


		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
Trophozoites	Young				
	Old				
Schizonts	Immature				
	Mature				
Gametocytes	Male				
	Female				

Life cycle of the malarial parasite



Plasmodium Life Cycle



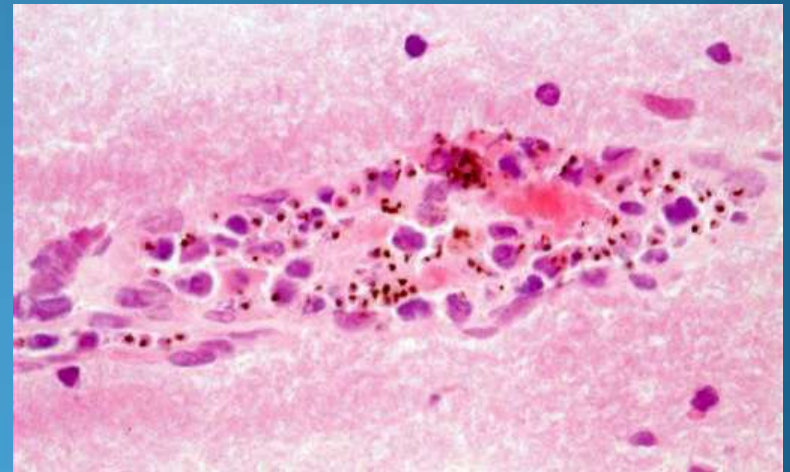
علائم بالینی

- دوره کمون ۹-۴۰ روز، prodormal
- اولین علامت : لرز و سرد شدن بدن (15-60 دقیقه)
- دومین علامت : تب (۲-۶ ساعت)
- سومین علامت : عرق (۲-۴ ساعت)

- مجموعه این سه علامت یک حمله مالاریایی یا paroxysm نام دارد که حدوداً ۵-۱۱ ساعت طول می کشد.
- در مالاریای ویواکس و فالسیپاروم روز سوم (مالاریای سه یک) و در مالاریای مالاریه روز چهارم (مالاریای چهار یک) حمله مالاریا از نو شروع می شود.

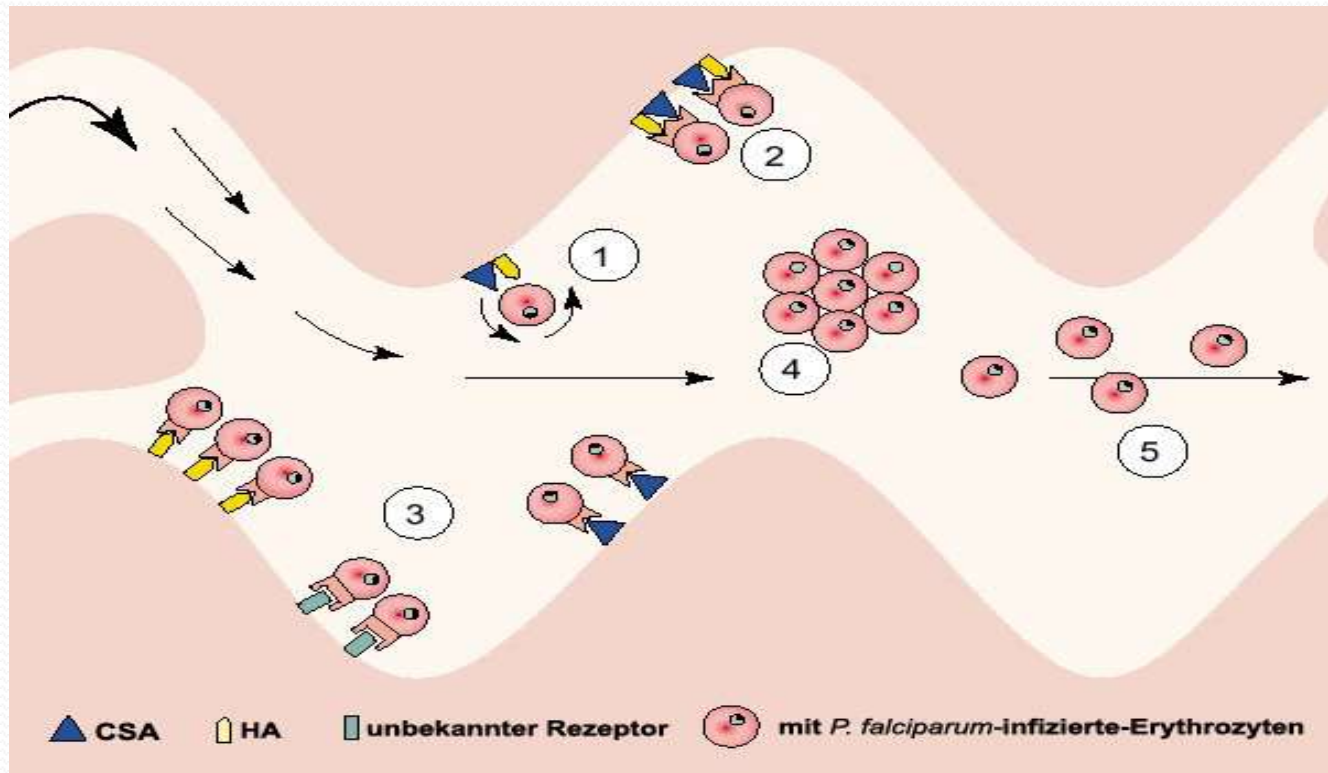
پلاسمودیوم فالسیپاروم

- مالاریای مغزی : مهمترین عارضه عفونت فالسیپاروم است و در اغلب موارد عامل مرگ و میر مالاریا می باشد.
- سر درد شدید ، خواب آلودگی ، اغما
- کمخونی



Sequestration

چسبندگی پلاسمودیوم فالسی پاروم به اندوتلیال عروق



- تب پیشاب سیاه : سیستم ایمنی علیه گلبول های قرمز آلوده آنتی بادی می سازد و تعداد زیادی از RBC ها لیز می شوند که موجب دفع ادرار تیره رنگ می شود. تیره رنگ شدن ادرار، آسیب کلیوی ، افزایش ضربان قلب
- پارازیتی شدید : در پلاسمودیوم فالسیپاروم تعداد گلبولهای قرمز آلوده بیش از سایر پلاسمودیوم ها است (۴-۱۰ درصد).
- بزرگی طحال گرمسیری : بزرگی طحال ، افزایش آنتی بادی IgM
- هایپو گلاسمی: یکی از علل مرگ و میر در مالاریای فالسیپاروم در زنان حامله در سه ماهه سوم حاملگی و کودکان می باشد.

پلاسمودیوم ویواکس

آلودگی به این انگل کشنده نیست مگر در افرادی که:

- کسانی که طحالشان را برداشته اند زیرا طحال مانند یک فیلتر گلبولهای قرمز آلوده را جذب می کند و از بین می برد.
- در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی

پلاسمودیوم مالاریه: سندروم نفروتیک

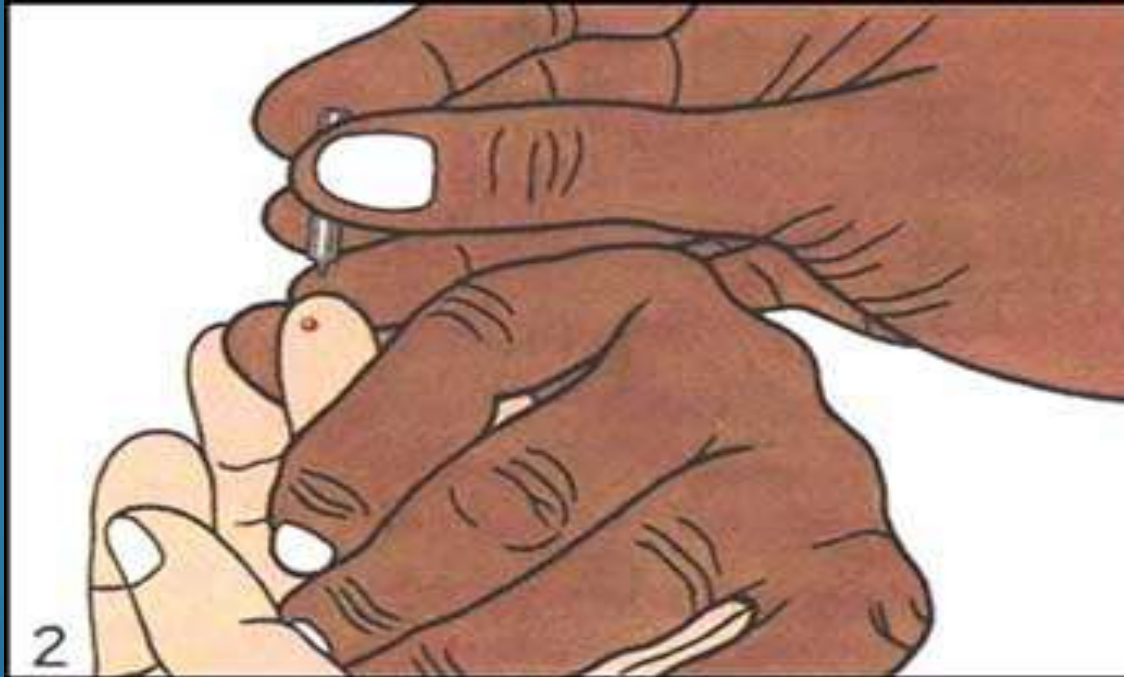
Parasitemia reapperance

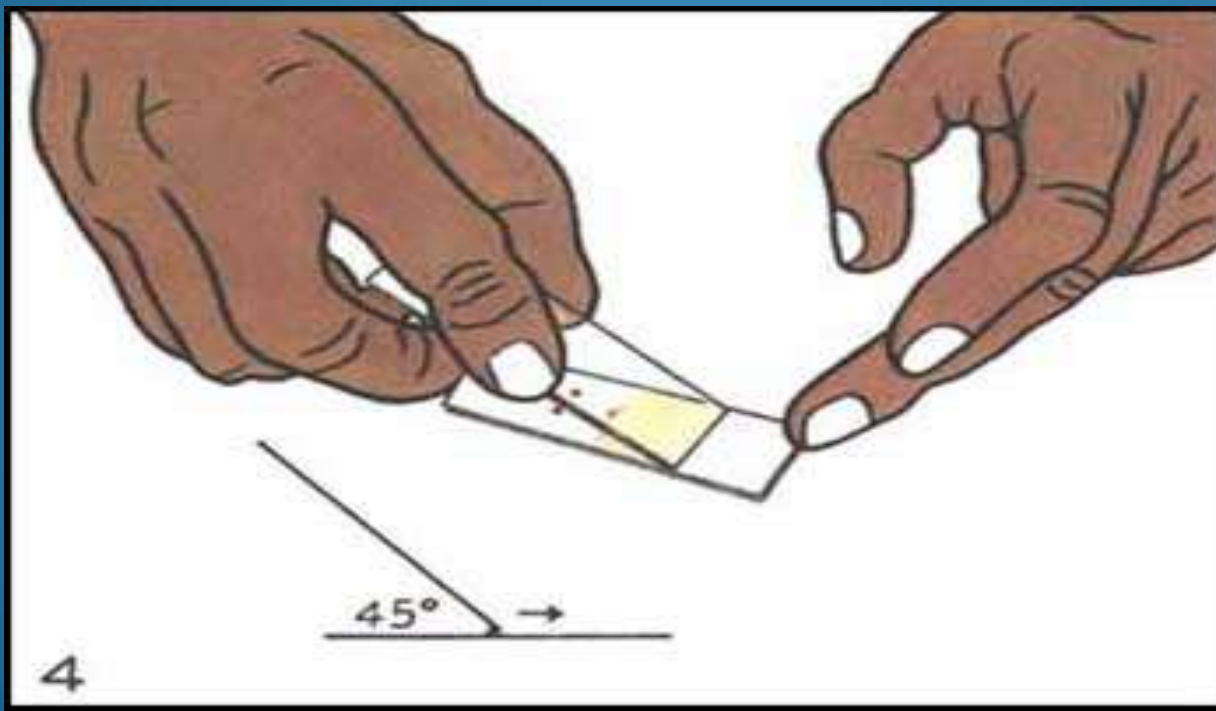
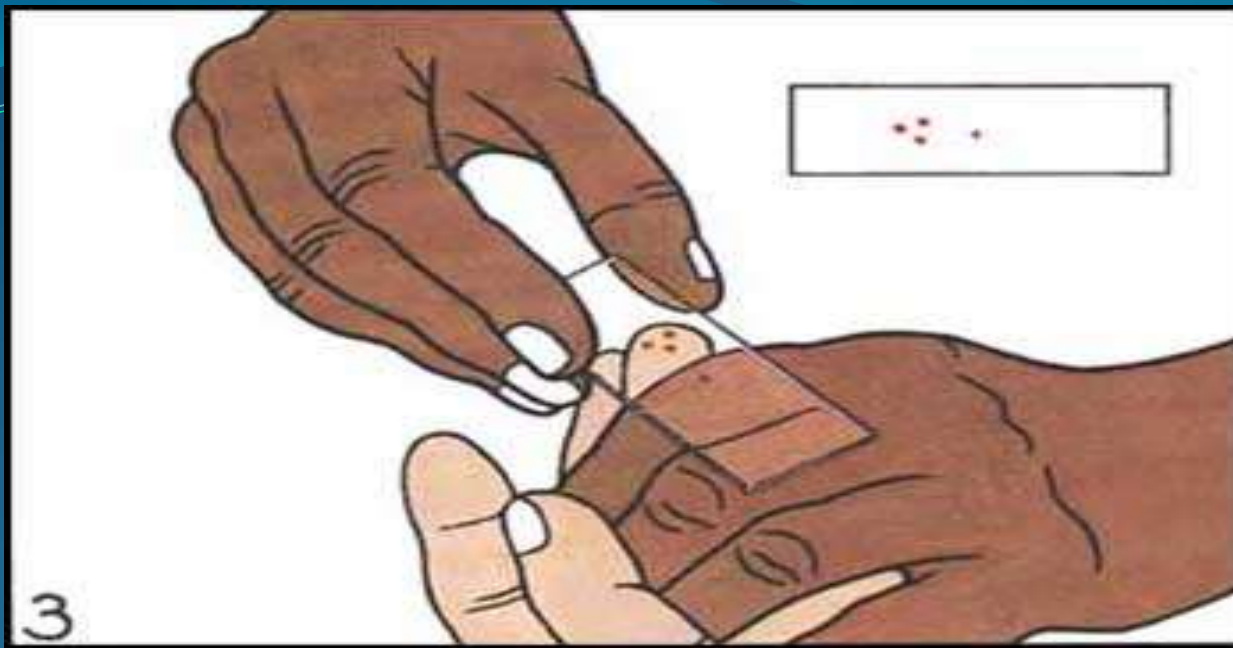
- 1-recrudescence
- 2-reinfection
- 3-relapse

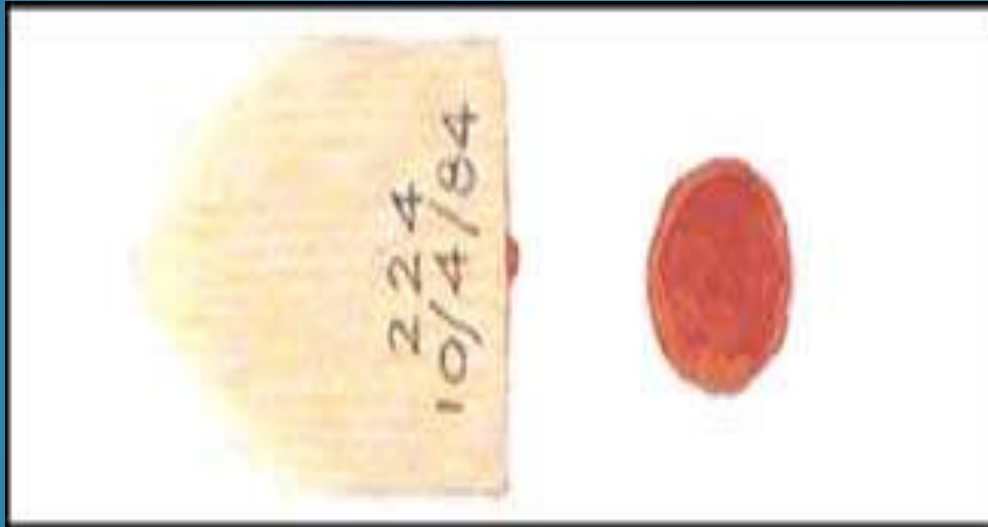
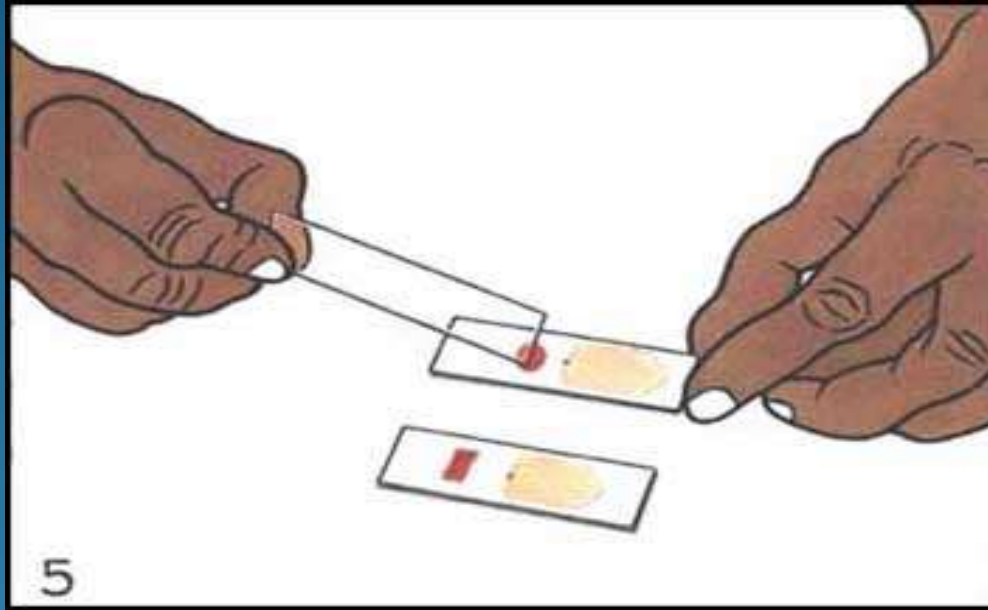


تشخیص

- الف- آزمایش میکروسکوپی نمونه خون از نظر انگل مالاریا
- گسترش نازک : جهت تشخیص گونه پلاسمودیوم
 - گسترش ضخیم : جهت غربالگری بیماری مالاریا

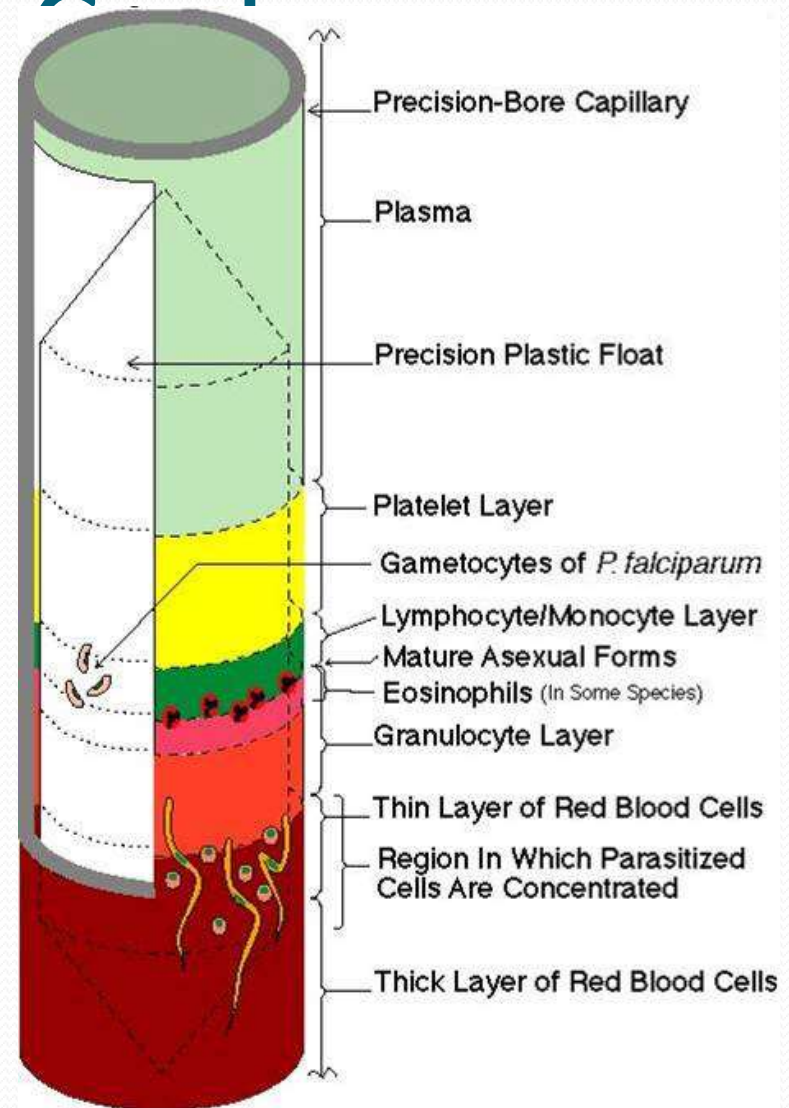
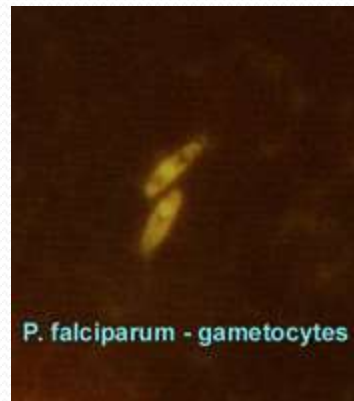






Quantified Buffy

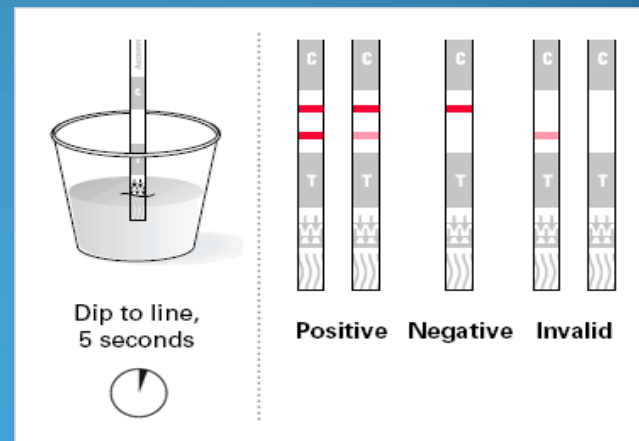
- Acridine orange
- UV Microscope
- Hematocrit tube
- Centrifuge 5 min 12000 RPM



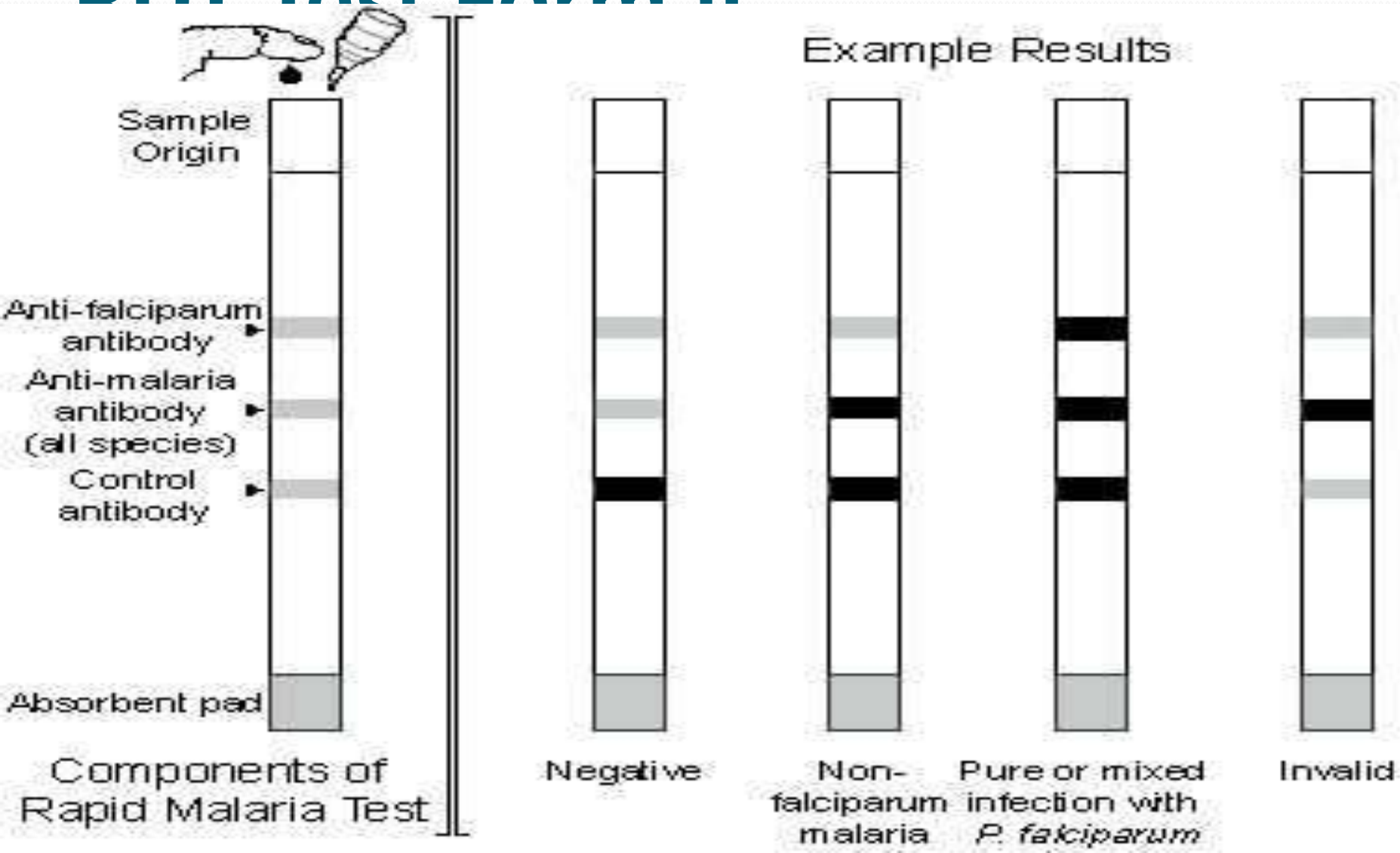
ب- روشهای سرولوژی

- روشهای سرولوژی جهت تشخیص آنتی بادی های مالاریا مانند IFA , ELISA این تست ها بیشتر در مطالعات اپیدمیولوژی کاربرد دارند.

- تشخیص آنتی ژنهای مالاریا با استفاده از منوکلونال آنتی بادی مانند تست دیپ استیک جهت تشخیص پلاسمودیوم فالسیپاروم



DNT Test Format

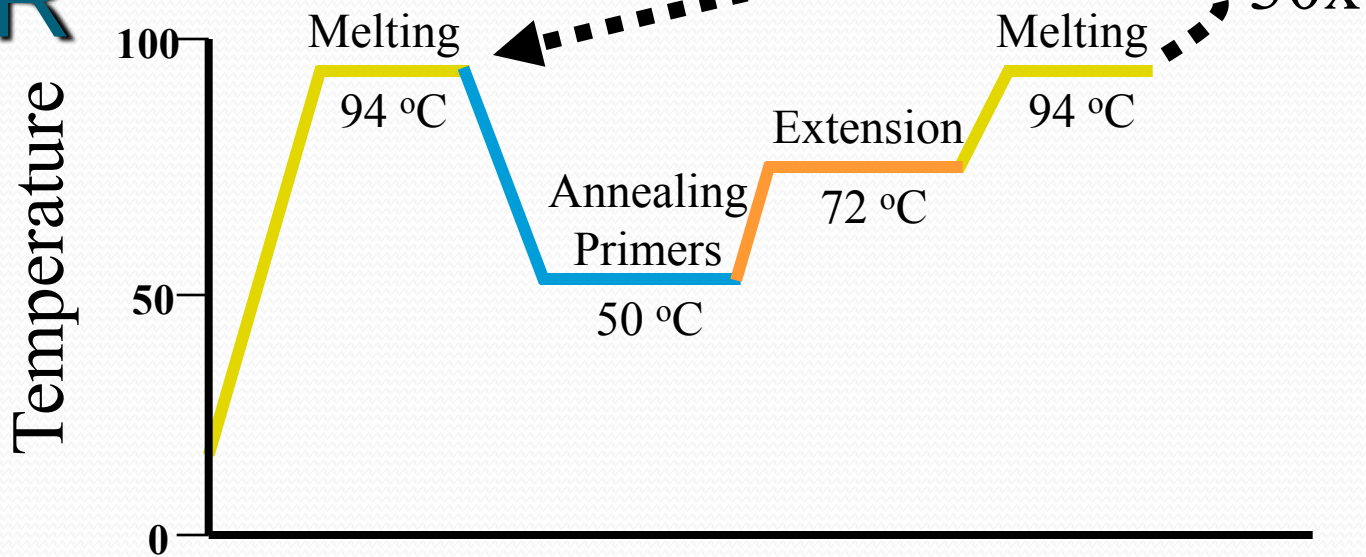


ج- روشهای بیولوژی مولکولی : مانند روش PCR

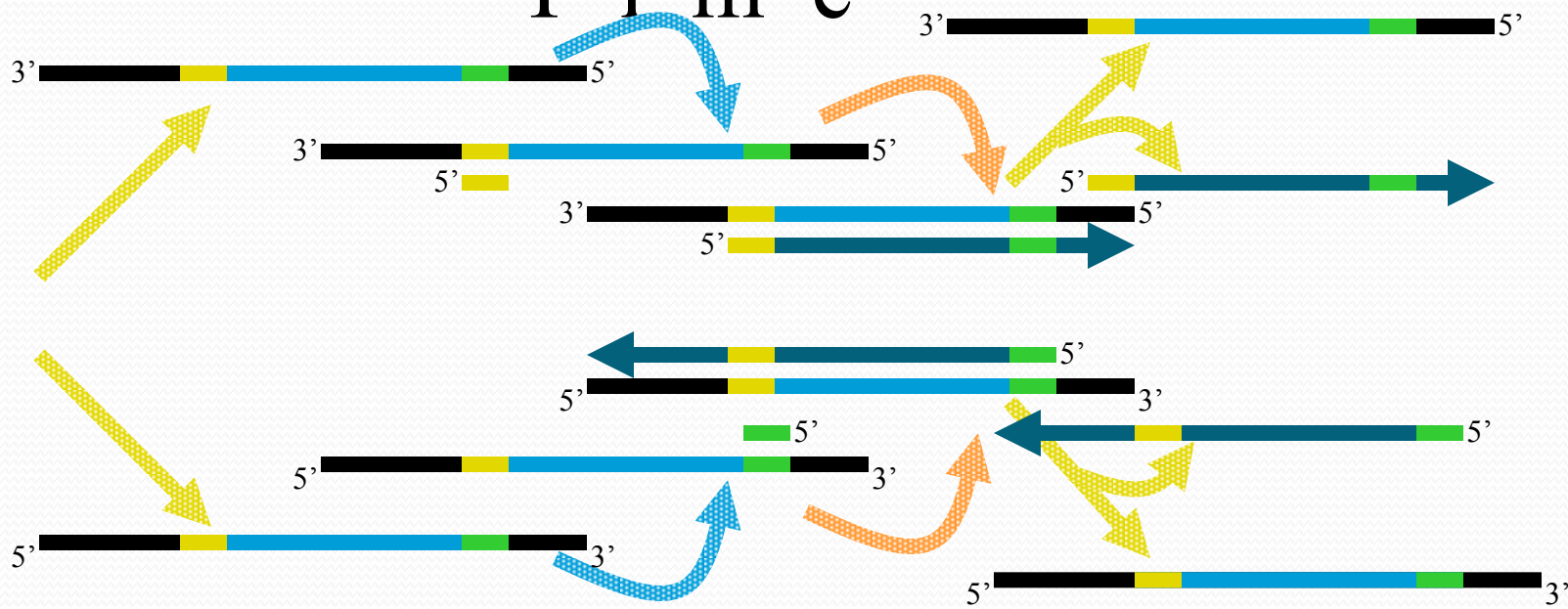


- using ribosomal DNA (18s-rRNA).

PCR



Time

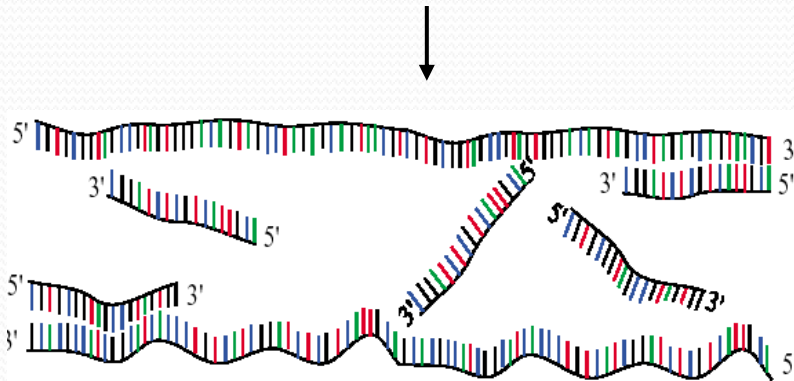


30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C

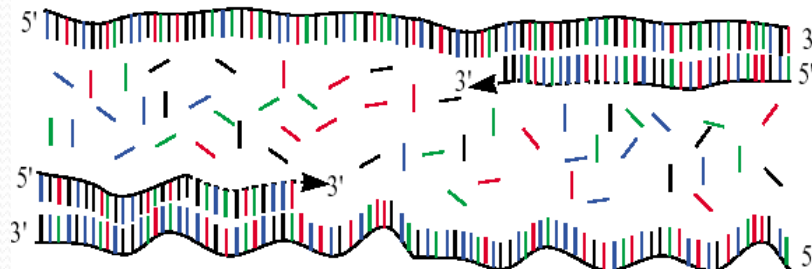


Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse
primers !!!

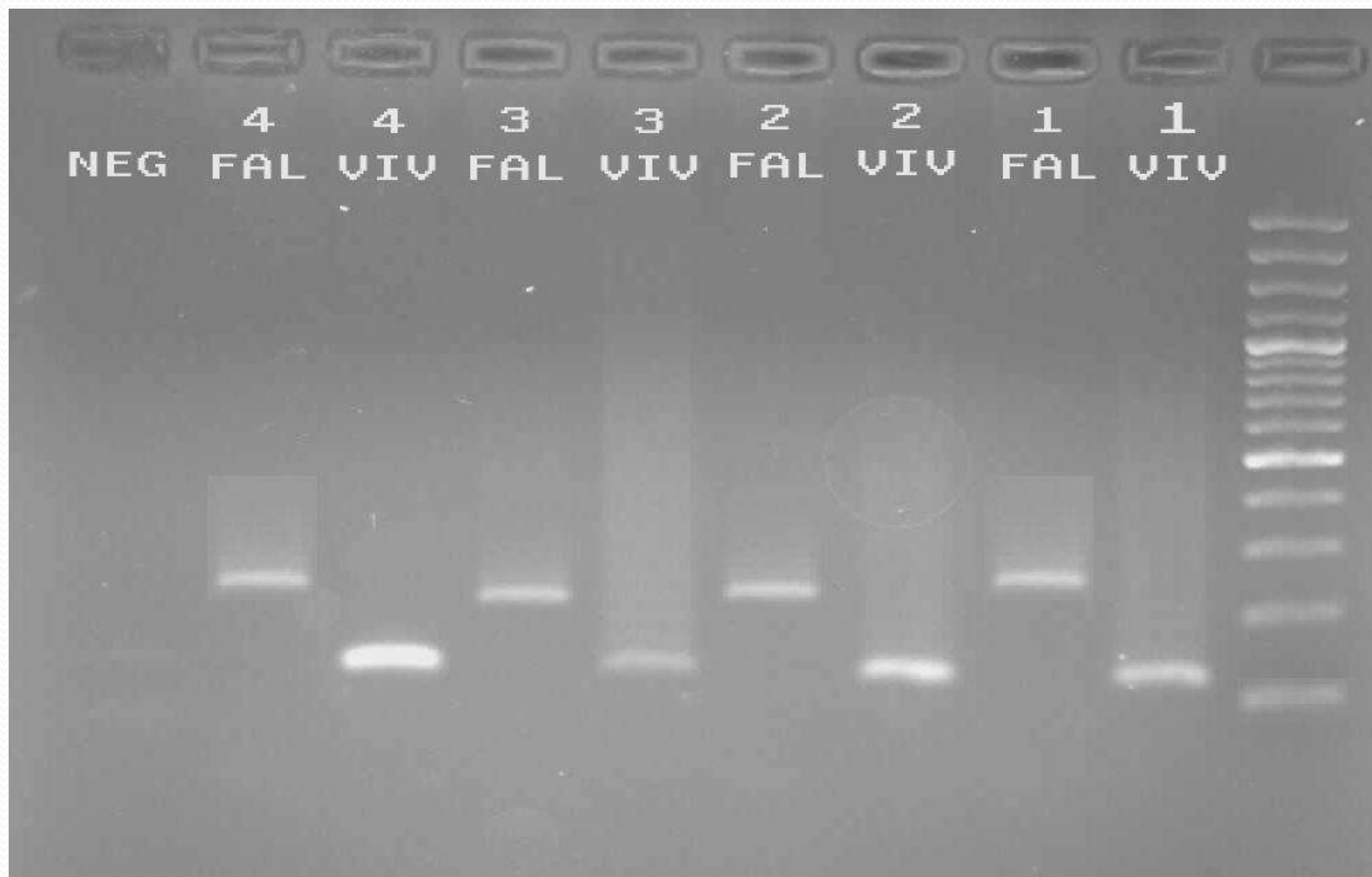
↓
Taq DNA polymerase



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's



راههای انتقال

- الف - از طریق پشه های آنوفل ماده

- Imported malaria

- Autochthonous malaria



- ب - از طریق جفت



- ج - انتقال خون (Induced malaria)

- د - انتقال از طریق سوزن های آلوده

ایمنی در مالاریا

• ایمنی نسبی (Premunition immunity) : در این حالت انگل به میزان کم در بدن وجود دارد و میزان آنتی بادی بالا است و علائم بالینی دیده نمی شود .

افراد مقاوم به پلاسمودیوم فالسیپاروم

• افراد دارای کمبود G6PD

• افراد دارای گلبول قرمز داسی شکل

• افراد مبتلا به تالاسمی

افراد مقاوم به پلاسمودیوم ویواکس

• افراد فاقد آنتی ژن دافی

مناطق مالاریا خیز دنیا از لحاظ انتقال به ۳ دسته تقسیم می شوند.

- High transmissin: مثل آفریقا و تایلند

- Moderate transmissin: مثل برزیل

- Low transmissin: مثل ایران

افرادی در معرض خطر نسبت به بیماری مالاریا

- کودکان زیر ۵ سال

- مادران باردار

- مسافران

درمان

درمان بالینی : از بین بردن انگل در مرحله شیزوگونی خونی
درمان اساسی : از بین بردن هیپنوزوئیت ها و گامتوسیت ها

- Tissue schizontocids: پریماکین
- Blood schizontocids: کلروکین، کنین ، آرتسونیت
- Gametocytocidal drugs: کلروکین، پریماکین
- Prophylactic drugs: پروگوانیل ، پیریمتامین، کلروکین

• درمان مالاریای فالسیپاروم
Chloroquine (کلروکین)

نحوه مصرف دارو:

روز اول: 10 mg/kg کلروکین

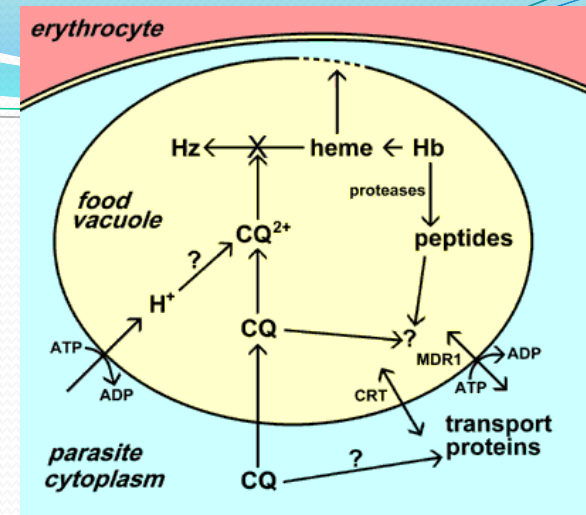
روز دوم: 10 mg/kg کلروکین

روز سوم: 5 mg/kg کلروکین + 45 mg/kg primaquin

پریماکین جهت از بین بردن گامتوسیت ها و جلوگیری از انتقال بیماری
توسط پشه آنوفل

پریماکین به زنان حامله ، بچه های کمتر از یک سال، افراد دارای کمبود
G6PD و بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید نباید تجویز شود .

Chloroquine

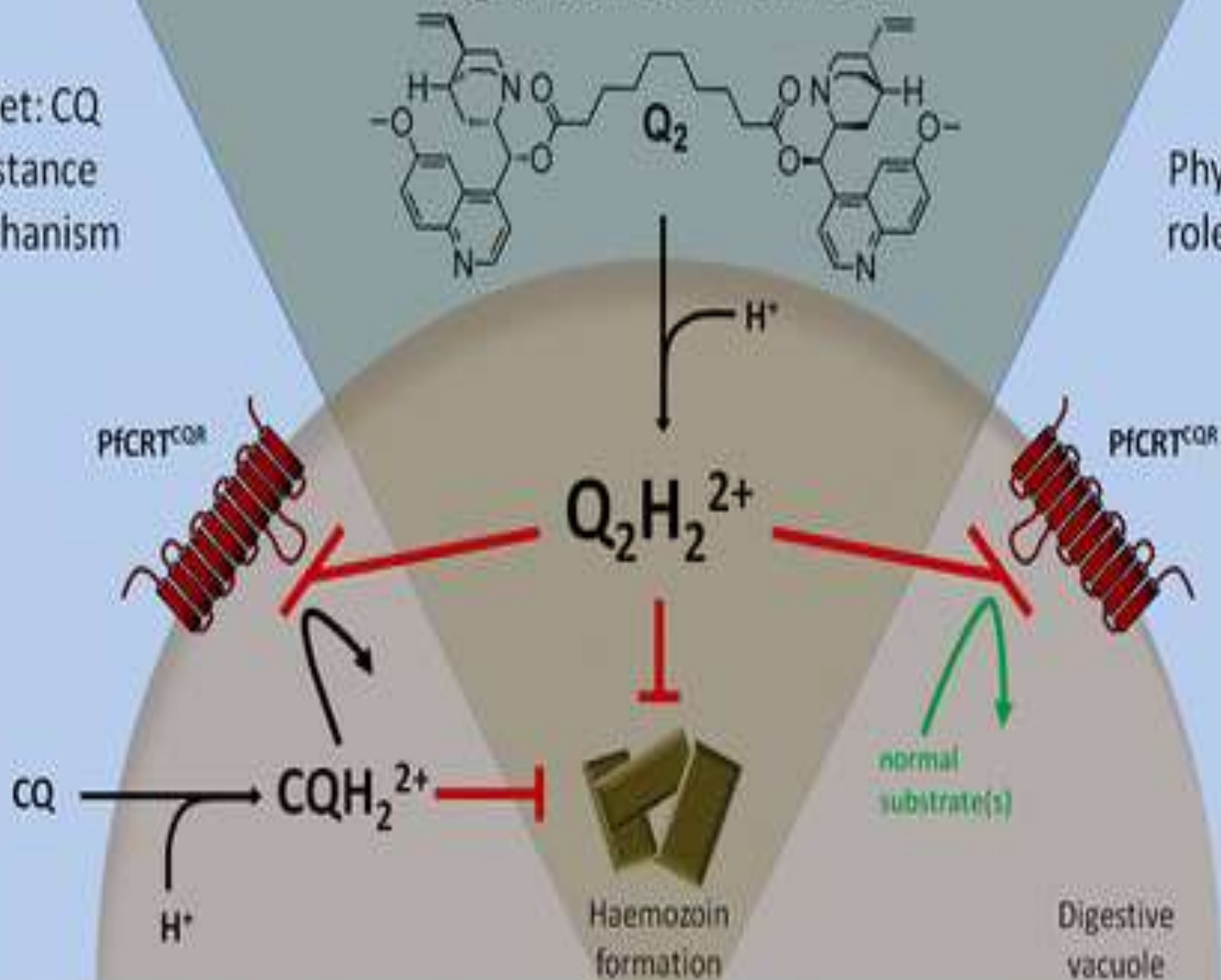


- | 4-amino quinoline
- | acts on asexual intraerythrocytic forms and gametocytes of *P. vivax*
- It has been used as the first line therapy for clinical vivax malaria infections since 1946.
- Side effects
- CQ resistant *P. vivax* has occurred in Oceania (1989), South east Asia, South America and several Africa countries.

Target: CQ
resistance
mechanism

Target: Haemozoin formation

Target:
Physiological
role of PfCRT



Resistance to Chloroquine

- *P. falciparum* resistance transporter (pfcrt) gene on chromosome 7 ,polymorphism 76-Lys to Thr(K 76 T)
- *P. falciparum* multidrug resistance 1(pfmdr1) gene to affect Chloroquine, Mefloquine, halofantrine, quine resistance

درمان مالاریای فالسیپاروم مقاوم به کلروکین

• **Fancidar** (ترکیبی از پیریمتامین و سولفادوکسین) همراه با کنین خوراکی نحوه مصرف دارو:

در افراد بالغ فنسیدار بصورت سه قرص در یک نوبت و کنین نیز به صورت روزانه سه نوبت به فاصله هر 8 ساعت به مدت سه روز تجویز می شود.

فنسیدار به زنان حامله ، کودکان کمتر از سه ماه ، مادرانی که شیر می دهند و افرادی که به ترکیبات سولفامید حساسیت دارند نباید تجویز شود .

• **Artesunate** آرتسونیت

• جهت درمان افراد دچار مالاریای فالسیپاروم شدید مانند درگیری سیستم اعصاب مرکزی ، کم خونی و تب شدید از داروی کنین به صورت وریدی استفاده می شود.

Resistance to Sulfadoxine/

Pyrimethamine

- Dihydrofolate reductase (dhfr) 108 Ser → Asn/Thr
- Resistance to Pyrimethamine Acid amino change at positions 50,51,59,and 164
- Dihydropteroate synthase (dhps). Acid amino change at positions 437,436, 540,581 and 631 confer resistance to Sulfadoxine

درمان پلاسمودیوم ویواکس

نحوه مصرف دارو:

روز اول: 10 mg/kg کلروکین

روز دوم: 10 mg/kg کلروکین

روز سوم: 5 mg/kg کلروکین + 0.45 mg/kg primaquin

در ادامه پریماکین به مدت ۸ هفته و هر هفته یک بار ادامه می یابد

• پریماکین جهت از بین بردن هیپنوزوئیت ها در سلولهای پارانشیم کبد و جلوگیری از عود بیماری

• درمان پلاسمودیوم مالاریه: کلروکین

• درمان پلاسمودیوم اواله: مانند پلاسمودیوم ویواکس

پیشگیری

۱- پیشگیری فردی

- استفاده از پشه بند آغشته به حشره کش



- مالیدن دور کننده پشه ها مانند دی اتیل تولوامید (DEET)



- خوردن داروهای پیشگیری مالاریا مانند کلروکین ، پروگوانیل و پیریمتامین
- مفلوکین



۲- پیشگیری همگانی

- بهسازی محیط : خشکاندن باتلاق ها و آب های راکد و به جریان انداختن آنها



- سم پاشی با سمومی مثل تمفوس ، ابیت جهت از بین بردن لارو پشه

- روشهای بیولوژیک مانند استفاده از ماهی گامبوزیا که لارو پشه ها را می خورد

Bacillus thuringiensis



- بیمار یابی و درمان آنها



Malaria Microscopy Standard Operating Procedures

مجموعه روش های اجرایی
استاندارد میکروسکوپی مالاریا
(MM-SOP)

مترجم و گرد آورنده: علیرضا صادقی
زیر نظر: دکتر احمد رئیسی، دکتر عباس شهبازی
با همکاری: آقایان مسعود یریان، علی حافظی، امیر محمد ابراهیمی و فیروزه گوشه
ناشر: وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت بهداشت

تمیز کردن و ذخیره سازی لام های میکروسکوپی

- لام های شیشه ای مورد استفاده در میکروسکوپی معمولاً در جعبه های ۵۰ یا ۷۲ تایی تهیه می شوند. ممکن است بر روی برچسب آنها
- کلماتی نظیر "شسته شده" یا "تمیز شده" قید شده باشد. برای میکروسکوپی مالاریا، لام های شیشه ای صاف بایستی دارای کیفیت
- "ممتاز"، همراه با لبه های ساب خورده و انتهای مشجر باشد. انتهای مشجر را باید برای اطلاعات نویسی لام استفاده کرد.



لام هاي شيشه اي نو با كيفيت عالي و انتهاي مشجر
دو تشت يا ظرف پلاستيكي با سايز متوسط يك مايع شوينده با كيفيت خوب
پارچه مخصوص شستشو يا اسفنج نرم
نمونه اي از پارچه پنبه اي تميز و فاقد كرك (نمونه اي از آنچه كه براي خشك
كردن ظروف سفال و شيشه ها استفاده مي شود)
مقداري آب تميز 15 cm × 11 cm برگه هاي كاغذ تميز به ابعاد تقريبي
جعبه خالي لام از نوعي كه در آن لام هاي جديد چيده شده نوار چسب تميز
نوار لاستيكي
يك گنجه، كابينت يا دستگاه خشك ساز با ژل سليكاي فعال شده (فاقد كلريد
كبات باشد).

نمودار اجرا

۱. لام هاي جديد را براي مدت ۸ ساعت در يك مايع شوينده غوطه ور كنيد.
۲. لامها را با پارچه يا اسفنج، تميز كنيد.
۳. لامها را دوبار با آب تميز بشوئيد.
۴. با دقت لام ها را خشك كنيد.
۵. لام هارا در كاغذ تميز بپيچيد و در يك جعبه قرار دهيد.
۶. براي ذخيره سازي هاي طولاني مدت، ژل سيليكه در داخل جعبه قرار دهيد.
۷. جعبه را به عنوان تميز شده، برچسب گذاري كنيد و روش را در دفتر عملکرد روزانه كنترل كيفيت بنويسيد.
۸. جعبه را داخل كابينت يا خشك كننده، ذخيره كنيد

آماده سازی محلول ذخیره گیمسا

1. حدود 50 مهره در داخل بطري قرار دهید.
2. مقدار ۳,۸ گرم از پودر گیمسا را وزن کنید و درون بطري بریزید.
3. 100 میلی لیتر متانول را به آرامي درون بطري بریزید.
4. درب بطري را محکم ببندید، و براي مدت ۲ الی ۳ دقیقه به شکل دوراني بچرخانید
5. ۲۵۰ سی سی گلیسرول را به مخلوط اضافه کنید، و برای ۲ الی ۳ دقیقه بچرخانید
6. درب بطري را محکم ببندید
7. ۱۵۰ سی سی متانول باقیمانده را اضافه کنید..
8. عمل چرخاندن براي روز اول ۱ به تعداد 6 بار و هر بار به مدت ۲ الی ۳ دقیقه انجام دهید.
9. به مدت 7 روز هرروز آن را بچرخانید
10. اطلاعات را به طور واضح روي بطري بنویسید، و در دفتر عملکرد کنترل کیفیت ثبت کنید.

تهیه آب بافر با $\text{PH}=7.2$

- ۱. مقدار ۰,۷ گرم از پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) را وزن کنید
- ۲. آن را به بشر شیشه ایی منتقل و ۱۵۰ سی سی آب مقطر اضافه کرده آن را هم بزنید
- ۳. معادل یک گرم دی سدیم هیدروژن فسفات (Na_2HPO_4) وزن کنید
- ۴. آن را به محلول داخل بشر اضافه کنید و هم بزنید
- ۵. محلول را به یک فلاسک شیشه ایی مخروطی منتقل و حجم را با آب مقطر به علامت یک لیتر برسانید
- ۶. آب بافر را در یک ظرف شیشه ایی ریخته و آنرا لیبل بزنید
- ۷. آب بافر را برای هفت روز در جای خشک و خنک و بدور از نور مستقیم خورشید نگهداری کنید

تهیه 2% Na_2HPO_4

- ۱. مقدار ۲ گرم Na_2HPO_4 وزن کنید
- ۲. آن را در یک بشر با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به هم بزنید
- ۳. محلول را به یک ظرف شیشه ای منتقل و به آن لیبل بزنید
- ۴. ظرف را در جای خشک و خنک و دور از نور خورشید نگهداری کنید.



طرز تهیه 2% KH_2PO_4

- مقدار ۲ گرم KH_2PO_4 وزن کنید
- ۲. آن را در یک بشر با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به هم بزنید
- ۳. محلول را به یک ظرف شیشه ایی منتقل و به آن لیبل بزنید
- ۴. ظرف را در جای خشک و خنک و دور از نور خورشید نگهداری کنید.

تهیه آب بافر با $\text{PH}=7.2$ با استفاده از قرصهای بافری

- ۱. مقدار یک لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده برون یک فلاسک یا بشر بریزید
- ۲. یک قرص بافری درون بشر بیاندازید
- ۳. با چرخش آرام مخلوط کنید
- ۴. ظرف را لیبل بزنید
- ۵. از این آب بافر برای تهیه رنگ گیمسای رقیق شده استفاده کنید

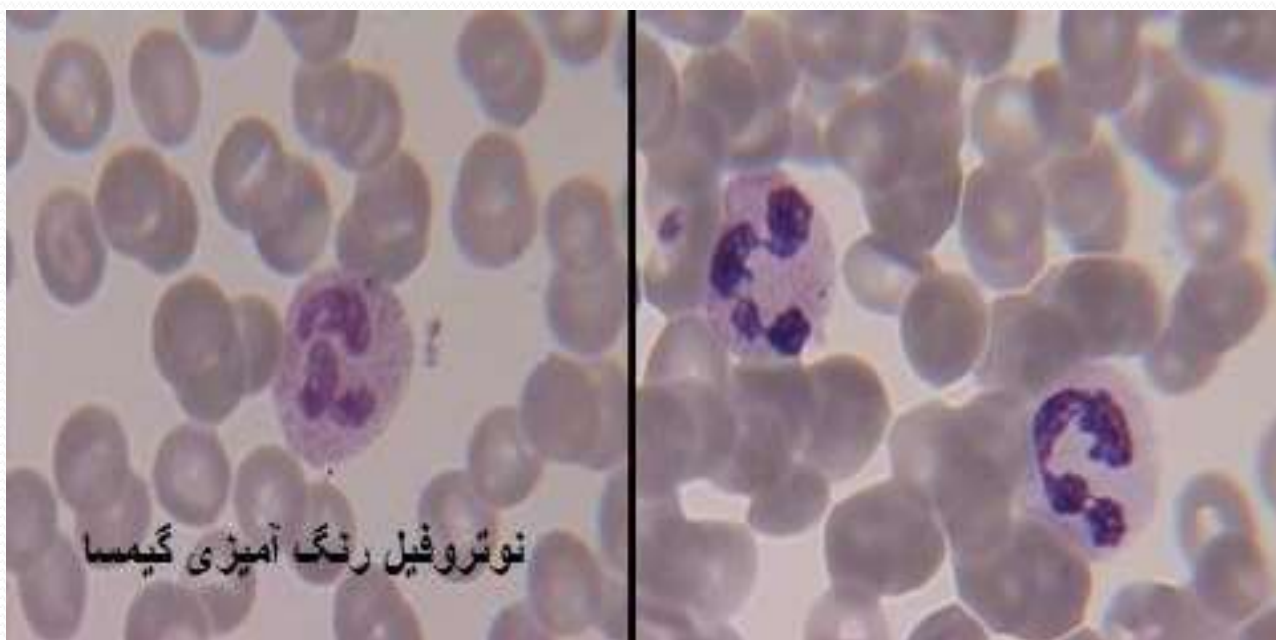
کنترل کیفیت رنگ گیمسای ذخیره

- یک گسترش نازک از خون مالاریا مثبت تهیه کنید
- رنگ گیمسای رقیق شده ۳ درصد و ۱۰ درصد از رنگ ذخیره جدید درست کنید
- لامها را با متانول فیکس کنید و با رنگ گیمسا رنگ کنید
- لامها را از نظر کیفیت رنگ بررسی کنید
- چنانچه لازم باشد زمان رنگ آمیزی را تنظیم کنید

مشخصات سلولها

- در رنگ آمیزی مناسب گلبولهای قرمز به رنگ صورتی متمایل به خاکستری
- پلاکتها به رنگ صورتی پر رنگ
- گلبولهای سفید هسته ارغوانی تیره و سیتوپلاسم آبی
- رنگ های ذکر شده در بالا با هرسری ساخت رنگ و ویژگی های ذاتی خون ممکن است تغییر کند.
- انگل های مالاریا با رنگ آمیزی صحیح باید دارای هسته ای به رنگ قرمز یا صورتی و سیتوپلاسم آبی باشند . چنانچه از پلاسمودیوم ویواکس برای تست رنگ استفاده شود، دانه های شوفر بایستی به شکل دانه های صورتی مفروش در سیتو پلاسم گلبول قرمز دیده شوند. اگر از پلاسمودیوم فالسی پاروم استفاده شود، شکافهای مورر به شکل اجسام درشت و به شکل ناهمگن در سیتوپلاسم گلبول قرمز پراکنده هستند.

نوتروفیل ها دارای گرانول های ظریف صورتی منتشر هستند . سلولهای گرد با قطر ۱۰- ۱۴ میکرومتر هسته ۲ تا ۵ لوبی



اُوزینوفیل ها دارای گرانول های درشت با رنگ قرمز ارغوانی در سیتوپلاسم کمی بزرگتر از نوتروفیل و هسته معمولا دایره دارد قطر ۱۶ میکرون



اُوزینوفیل رنگ آمیزی گیمسا

بازوفیل

- کوچکتر از نوتروفیل دارای هسته بنفش و چند لوبی دارای گرانولهای درشت آبی که روی هسته را نیز می پوشانند



لنفوسیت

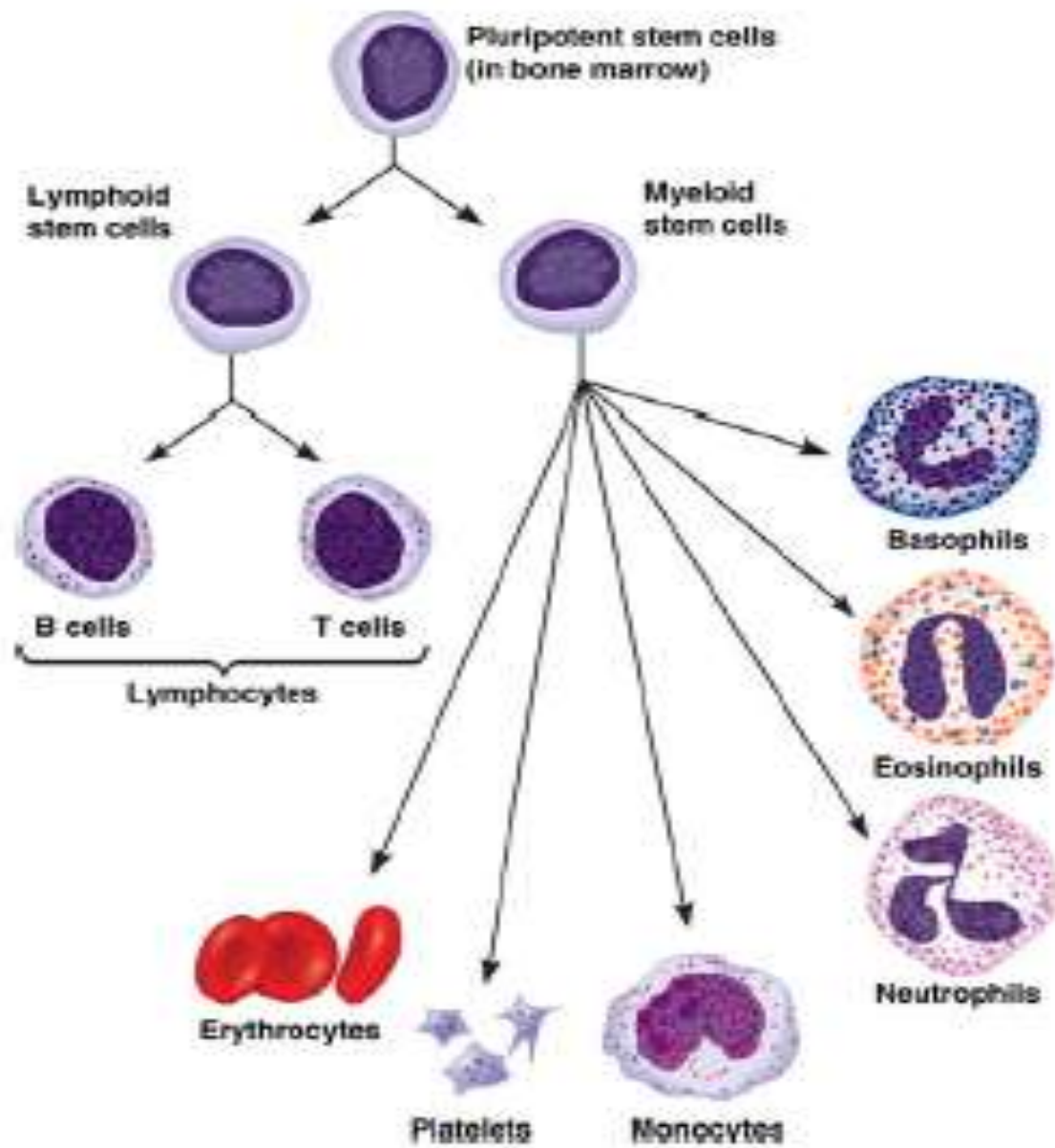
- سلول کوچک با قط ۷-۱۰ میکرومتر با هسته بزرگ و سیتوپلاسم هلالی نازک



منوسیت

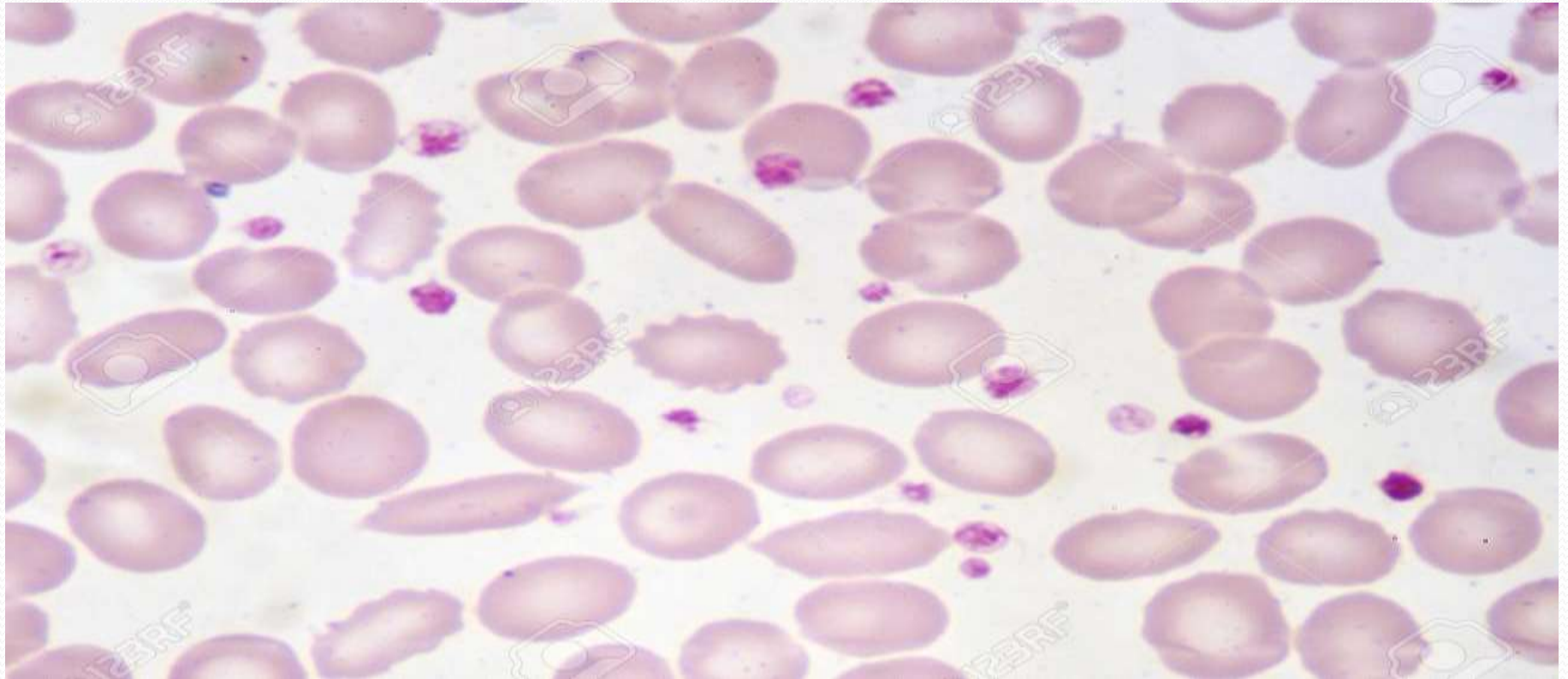
- بزرگترین سلول خونی با قطر ۱۵-۲۲ میکرومتر هسته گرد یا لوبیایی و دارای سیتوپلاسم آبی مایل به خاکستری



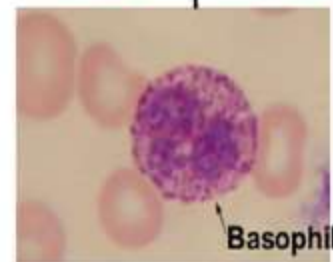
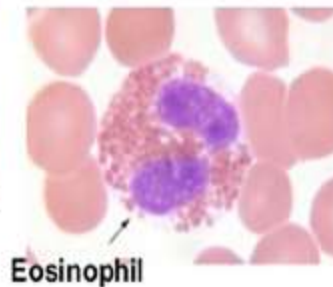
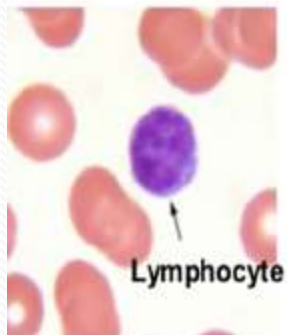
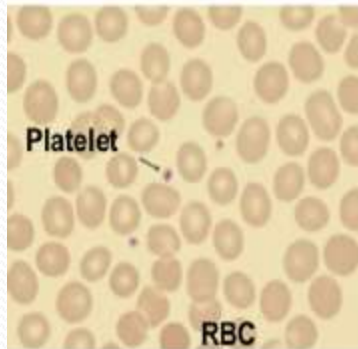


پلاکت

- اجسام کروی به قطر ۲-۴ میکرومتر فاقد هسته



Normal Blood Cell Morphology



پیوست. برگه‌های ثبت نمونه‌های کنترل کیفیت

برگه ثبت کنترل کیفیت برای رنگ گیمسای ذخیره

نام و نام خانوادگی اعضاء کارکنان عضو مجموعه که کنترل کیفیت را انجام دادند.	نام و نام خانوادگی اعضاء کارکنان عضو مجموعه که رنگ گیمسا را آماده کرده‌اند.	فعالیت انجام شده	گونه‌های عالاریا و اظهار نظر در مورد کیفیت رنگ آمیزی	تاریخ تهیه آب بافر و تنظیم PH	تاریخ کنترل کیفیت	حجم هر بطری بر حسب میلی لیتر	تعداد بطری‌های تهیه شده	شماره ساخت	تاریخ انقضاء	تاریخ ساخت گیمسای ذخیره
نام و نام خانوادگی اعضاء	نام و نام خانوادگی اعضاء	نادیده گرفته شده	پلاسمودیم ویواکس ضعیف، خیلی تاریک، رسوب هم دارد.	۱۳۹۳/۰۹/۲۰ ۷/۲PH=	۱۳۹۳/۰۹/۰۲	۵۰	۵	۱۳۹۳/۰۰۱	۱۳۹۵/۰۷/۲۶	۱۳۹۳/۰۷/۲۶
نام و نام خانوادگی اعضاء	نام و نام خانوادگی اعضاء	تنظیم زمان رنگ آمیزی : ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه و ۳٪ به مدت ۵۵ دقیقه	پلاسمودیم ویواکس دانه‌های شوفر قابل رویت رنگ آمیزی کمی کم رنگ	۱۳۹۴/۰۵/۰۶ ۷/۲PH=	۱۳۹۴/۰۵/۰۸	۵۰	۵	۱۳۹۴/۰۰۱	۱۳۹۶/۰۴/۱۱	۱۳۹۴/۰۴/۱۱

برگه ثبت کنترل کیفیت برای آب بافر با PH=7/2

تاریخ تهیه آب بافر	تاریخ انقضاء	تعداد بطری های آماده شده	حجم هر بطری (شیشه) بر حسب میلی لیتر	تاریخ QC	شماره ساخت بطری گیمسای ذخیره	نوع مالاریا وملاحظات درمورد کیفیت رنگ آمیزی	کار انجام شده	نام و نام خانوادگی پرسنل عضو مجموعه که رنگ گیمسا را آماده کرده اند.	نام و نام خانوادگی پرسنل عضو مجموعه که QC را انجام داده اند.
۱۳۹۳/۰۷/۲۶	۱۰۷/۲۶ ۱۳۹۵	۲	۵۰۰	۱۳۹۳/۰۷/۲۶	۱۳۹۳-۰۰۱	دانه های شوفر پلاسمودیوم ویواکس دیده نمی شود.	چک PH و رسانند به ۷/۲	نام خانوادگی امضاء	نام امضاء

ثبت لام‌های مثبت و منفی برای آزمایش‌های QC

تاریخ تهیه	مثبت یا منفی برای انگل مالاریا	گونه‌های مالاریا	مراحل انگل	شماره اسلاید	نام و نام خانوادگی پرسنل عضو مجموعه که لام خونی تهیه کرده اند	نظرات و یادداشت
۱۳۹۴/۰۱/۰۱	مثبت	پلاسمودیوم ویواکس	تروفوزویت بالغ و گامتوسیت	۲۰	نام نام خانوادگی امضاء	
۱۳۹۴/۰۱/۱۵	منفی			۲۵	نام نام خانوادگی امضاء	

رنگ آمیزی گیمسا: برگ کار روزانه

نام پرسنلی که رنگ آمیزی را انجام داده	نتایج کنترل کیفیت لام ها	درصد محلول گیمسای رقیق شده آماده کار	شماره سری ساخت آب یافر و تاریخ	شماره سری رنگ گیمسای ذخیره	شماره سری الکل متانول	شماره بیمار	تاریخ
نام نام خانوادگی	پلاسمودیوم ویواکس: رنگ آمیزی خوب، رنگدانه‌ها قابل رویت	٪۱۰	۱۴/۶۷۸۹ ۱۳۹۴/۰۷/۱۵	۲۰۱۵/۰۱	۱۲۳۴۵/۱۴	۰۱/۱۲۳۴ ۰۱/۱۲۴۴	۱۳۹۴/۰۷/۲۹

۵. روش اجرا

شرح فعالیت	نمودار اجرا
۸. تهیه محلول رنگ رقیق شده ۱۰٪ از رنگ ذخیره برای رنگ آمیزی سریع چند لام. حدود ۳ ml از رنگ برای هر لام گسترش خونی لازم است. ۱. مقدار ۹ ml از آب بافر از پیش تهیه شده، $PH=7.2$ را به درون یک بشر یا لوله تمیز بریزید.	۸. تهیه ۱۰ ml از محلول رنگ رقیق شده گیمسا با غلظت ۱۰٪ ۱. مقدار ۹ ml از آب بافر را به درون یک بشر یا لوله بریزید.
۲. محلول گیمسای ذخیره را با یک کاغذ واتمن شماره ۱ یا ۳ صاف کنید و به درون یک ظرف ۵۰-۲۵ ml منتقل کنید.	۲. محلول گیمسای ذخیره را با یک کاغذ واتمن شماره ۱ یا ۳ صاف کنید و به درون یک ظرف ۵۰-۲۵ ml منتقل کنید.
۳. با استفاده از یک پیپت تمیز و خشک مقدار ۱ ml از رنگ گیمسای ذخیره اضافه کنید. برای جلوگیری از آلودگی ظرف بزرگ حاوی رنگ گیمسای ذخیره، مقدار مورد استفاده را مستقیماً از آن بردارید.	۳. با استفاده از یک پیپت تمیز و خشک مقدار ۱ ml از رنگ گیمسای ذخیره اضافه کنید.
۴. رنگ رقیق شده گیمسا را لحظه‌ای قبل از رنگ آمیزی گسترش‌های خونی آماده کنید. و در طی ۱۵ دقیقه مصرف کنید. مازاد مصرف را دور بریزید.	۴. در طی ۱۵ دقیقه پس از تهیه مصرف کنید. مازاد مصرف را دور بریزید.

B. آماده‌سازی مقدار ۱۰۰ ml از رنگ رقیق شده گیمسا با غلظت ۳% ۱. مقدار ۹۷ ml از آب باقر را درون یک استوانه مدرج بریزید. ۲. رنگ گیمسای ذخیره را با یک کاغذ واتمن شماره ۱ یا ۳ صاف کنید و به درون یک ظرف ۵۰-۲۵ ml منتقل کنید. ۳. مقدار ۲ ml از رنگ گیمسای ذخیره اضافه کنید. ۴. در طی ۱۵ دقیقه پس از تهیه مصرف کنید. مازاد مصرف را دور بریزید.	B. تهیه رنگ رقیق شده گیمسا از رنگ ذخیره جهت رنگ آمیزی تعداد ۱۰۰-۲۰ لام به روش آهسته. ۱. مقدار ۹۷ ml از آب باقر از پیش تهیه شده با $PH=7.2$ را درون یک استوانه مدرج تمیز بریزید. ۲. رنگ گیمسای ذخیره را با یک کاغذ واتمن شماره ۱ یا ۳ صاف کنید و به درون یک ظرف ۵۰-۲۵ ml منتقل کنید. ۳. یا استفاده از یک استوانه مدرج یا یک پیپت، مقدار ۲ ml از رنگ گیمسای ذخیره بکشید. برای جلوگیری از آلودگی ظرف بزرگ حاوی رنگ گیمسای ذخیره، مقدار مورد استفاده را مستقیماً از آن برندارید. ۴. رنگ رقیق شده گیمسا را لحظه‌ای قبل از رنگ آمیزی گسترش‌های خونی آماده کنید و در طی ۱۵ دقیقه مصرف کنید. مازاد مصرف را دور بریزید.
--	--

۶. نکات

- استوانه مدرج، پیپت ها، ظروف و لوله‌ها را پیش از استفاده تمیز و خشک کنید.
- سعی شود برای رنگ آمیزی در طول یک روز یا رنگ آمیزی‌های مکرر، از رنگ یا یک سری ساخت استفاده شود (Batch or lot). زیرا رنگ گیمسا بخار آب موجود در هوا را سریعاً جذب نموده، و لذا زمانی که یا آب دیونیزه یا آب مقطر یا هر نوعی از آب رقیق شود، ویژگی رنگ آمیزی خود را از دست می‌دهد، به همین دلیل لام‌ها پس از مدت کوتاهی به طور ضعیفی رنگ می‌گیرند. لایه متالیک (قوس و قزح) بر روی سطح رنگ گیمسای ساخته شده به سادگی به سطح گسترش خون چسبیده و تشخیص ساختارهای انگلی را دچار مشکل می‌کند. (توضیح اینکه برای هر سری رنگ آمیزی رنگ جدید بسازید و سریعاً استفاده کنید).

۷. محاسبه حجم مورد نیاز از رنگ گیمسای ذخیره و آب بافر برای آمیزی انفرادی لام ها.
هر گسترش خونی نیاز به ۳ ml از رنگ گیمسای رقیق شده دارد. حجم رنگ گیمسای ذخیره مورد نیاز برای رنگ آمیزی گسترش های خونی برای لام های منفرد از طریق فرمول زیر قابل محاسبه است:

حجم محلول گیمسای ذخیره مورد نیاز به ازاء هر لام = غلظت گیمسای خواسته شده (گیمسای مصرفی) $\times 3 \text{ ml}$

مقدار آب بافر (PH=۷/۲) مورد نیاز برای رنگ آمیزی یک لام منفرد را می توان یا فرمول زیر محاسبه کرد:

حجم آب بافر به ازاء هر لام = 3 ml - حجم گیمسای ذخیره مورد نیاز به ازاء هر لام

مقدار ۳ ml رنگ گیمسای رقیق شده، با اضافه کردن حجمی از رنگ ذخیره مورد نیاز، به مقدار مورد نیاز از حجم محاسبه شده آب بافر با PH= ۷/۲ به ازای هر لام تهیه می شود.

مثال ۱: رنگ آمیزی ۱۵ لام با محلول گیمسای ۱۰٪

حجم رنگ گیمسای ذخیره مورد نیاز برای رنگ آمیزی ۱۵ لام منفرد با محلول گیمسای ۱۰٪ را می‌توان به شکل زیر محاسبه کرد:

$$\text{لام } 15 \times 3 \text{ ml} \times \frac{10}{100} = \text{حجم رنگ گیمسای ذخیره مورد نیاز به لام هر لام}$$

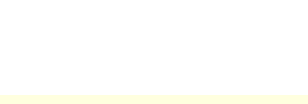
$$4.5 \text{ ml} = 15 \times (0.1 \times 3 \text{ ml})$$

به طور مشابه، حجم آب بافر مورد نیاز برای رنگ آمیزی ۱۵ لام منفرد با محلول گیمسای ۱۰٪ را می‌توان به شکل زیر محاسبه کرد:

$$\text{لام } 15 \times [3 \text{ ml} - (0.1 \times 3 \text{ ml})] = \text{حجم آب بافر به ازای هر لام}$$

$$40.5 \text{ ml} = 15 \times [3 \text{ ml} - (4.5 \text{ ml})]$$

بنابراین مقدار ۴/۵ میلی لیتر از رنگ گیمسای ذخیره را بایستی با ۴۰/۵ میلی لیتر آب بافر مخلوط نمود تا مقدار لازم از رنگ گیمسای رقیق شده آماده مصرف ۱۰٪ برای رنگ آمیزی ۱۵ لام تهیه نمود.

نمودار اجرا	شرح فعالیت	آموزش تصویری
۱. اطلاعات کامل بیمار را بر روی لام بتویسید و در دفتر پذیرش ثبت کنید	۱. برجسب حاوی اطلاعات کامل بیمار را به انتهای مشجر لام شیشه‌ای بچسبانید و این اطلاعات را در فرم مخصوص پذیرش مالاریا ثبت کنید. (SOP 06). برجسب گذاری گسترش‌های مالاریا را ببینید.	
۲-۳. دستکش لاتکس بپوشید، انگشت سوم از شصت را با سوآپ الکلی یا الکل ۷۰٪ تمیز کنید. اجازه دهید الکل در هوا خشک شود.	۲. دستکش لاتکس محافظ بپوشید، از انگشت سوم بزرگسالان یا شصت پای نوزادان استفاده کنید (از پاشنه پای نوزادان یا انگشت شصت دست نوزادان و بزرگسالان استفاده نکنید). ۳. دست بیمار را در حالتی که کف دست به سمت بالا است نگه دارید و سر انگشت انتخاب شده را یا قطعه‌ای از پنبه که با الکل ۷۰٪ کمی خیس خورده یا با یک سوآپ الکلی تمیز کنید، با مالش‌های نسبتاً محکم چربی و روغن روی سطح انگشت را پاک کنید و جریان خون را در محل تحریک کنید. چنانچه لازم باشد انگشت را با ماساژ ملایم گرم کنید، اجازه دهید که الکل سر انگشت خشک شود.	
۴. با یک لاتست جدید و استریل شده سطح انگشت را سوراخ کنید.	۴. با استفاده از یک لاتست جدید و استریل با یک حرکت سریع در قسمت مرکزی نوک انگشت یک سوراخ ایجاد کنید.	
۵-۶. اولین قطره خونی را که شکل گرفت با یک پنبه خشک پاک کنید.	۵. فشار ملایمی را به انگشت وارد کنید (یا شصت یا)، تا قطره اول خون تشکیل شود. ۶. با یک تکه پنبه خشک قطره اول را پاک کنید، مطمئن شوید که هیچ رشته‌ای از پنبه بر روی انگشت باقی نمانده که در خون بماند.	
۷. قطره دیگری را شکل دهید و با تماس لام با قطره خون یک قطره کوچک را جمع کرده و این قطره را برای تهیه گسترش نازک استفاده کنید.	۷. سریع عمل کنید و لام‌ها را با لبه‌های آن در دست بگیرید، با فشار ملایم قطره خون را بر روی انگشت جمع کنید و با تماس لام با خون، قطره کوچکی را در میانه لام جهت گسترش نازک قرار دهید.	
۸. دو یا سه قطره کوچک دیگری را جمع آوری کنید، و از آنها برای تهیه گسترش ضخیم استفاده کنید.	۸. فشار بیشتری را بکار ببرید تا خون بیشتری خارج شود، و حدود دو یا سه قطره در فاصله ۱cm قطره مربوط به گسترش نازک قرار دهید.	
۹. باقی مانده خون را از سطح انگشت پاک کنید.	۹. باقی مانده خون را با پنبه تمیز و خشک پاک کنید.	

۱۰. لام حامل قطرات خون را به حالتی که خون روی سطح لام قرار دارد روی یک سطح صاف قرار دهید.

۱۱-۱۳. با استفاده از یک لام تمیز به عنوان لام پخش کننده، گسترش نازک را درحالی که قطره مربوط به گسترش نازک را رو به جلو حرکت می‌دهید، با یک حرکت ملایم و ممتد تهیه کنید.

۱۴. با کنار هم قرار دادن گسترش دهنده، گسترش ضخیم را به شکلی که با حرکت چرخشی سه قطره خون را با هم ادغام می‌کنید یک دایره شکل دهید.

۱۵. در مجاورت هوا و در حالت افقی گسترش‌ها را خشک کنید. چنانچه خشک کردن سریع لازم باشد از یک خشک‌کننده لام نیز می‌توان استفاده کرد.

۱۰. بین زمان قطره گذاری و پخش قطرات (تهیه گسترش) فاصله نیندازید. گسترش‌های خونی را با یک لام دیگر و با استفاده از حاشیه تخت آن تهیه کنید.

۱۱. برای کشیدن گسترش نازک، لبه یک لام تمیز (گسترش دهنده) را با زاویه ۴۵ درجه، در قسمت جلوی قطره مربوط به گسترش نازک قرار دهید.

۱۲. به آرامی لام گسترش‌دهنده را به عقب برده تا با قطره خون تماس یافته و خون در عرض لام گسترش‌دهنده پخش شود.

۱۳. سریعاً و با یک حرکت آرام و ممتد لام گسترش‌دهنده را به جلو (سمت خارج از مرکز) حرکت داده تا یک انتهای شبیه به پر (شعله شمعی) از خون به جای بگذارد.

۱۴. با کنار هم همان لام گسترش دهنده (که برای گسترش نازک استفاده شده) با حرکت چرخشی سه قطره خون را با هم مخلوط کرده و دایره‌ای به قطر ۱cm برای گسترش ضخیم بسازید. یا سه تا شش حرکت سریع با کنار هم گسترش‌دهنده می‌توان یک گسترش ضخیم دایره‌ای یا چهار گوش ساخت.

۱۵. بعد از تهیه گسترش‌های نازک و ضخیم اجازه دهید تا گسترش در حالت افقی و بر روی جعبه لام خشک شود. چنانچه خشک کردن سریع لازم باشد، گسترش‌ها را با سشوار و حرارت ملایم برای مدت ۵ ثانیه در فاصله ۳۰cm خشک کنید. لام‌ها را هرگز در فاصله خیلی نزدیک به سشوار نگیرید زیرا ممکن است که گسترش‌ها با حرارت فیکس شود.



شرح فعالیت	نمودار اجرا
۴-۱- جمع آوری خون به روش خون گیری از سیاهرگ ۱. بروی لوله حاوی قند اتعداد EDTA اطلاعات بیمار شامل نام و نام خانوادگی، تاریخ وساعت نمونه گیری را بنویسد. (MM-SOP-6a) را ببینید: برچسب نویسی گسترش خونی مالاریا).	۴-۱- جمع آوری خون به روش خون گیری از سیاهرگ ۱. یک لوله حاوی قند اتعداد- EDTA را براساس (MM-SOP 6a): برچسب نویسی گسترش های خونی مالاریا، با اطلاعات بیمار برچسب نویسی کنید.
۲. یک تورنیکت (بازوبند) در قسمت بالای بازوی بیمار ببندید تا سیاهرگ بیمار دیده یا قابل لمس شود. از بیمار بخواهید که مشت خود را محکم کند تا رگ بیشتر مشخص شود. ۳. یا انگشت اشاره خود، رگ بیمار را که به قدر کافی بزرگ و با تماس انگشت کمی متحرک است، لمس کنید.	۳-۲. تورنیکت را در قسمت بالای بازوی بیمار ببندید، و برای پیدا کردن یک رگ بزرگ و متحرک در زیر انگشتان، جستجو کنید.
۴. محل خون گیری را با صابون الکلی یا پنبه آغشته به اتانول یا ایزوپروپیل الکل ۷۰٪ قند عفونی کنید. محل تمیز شده را مجدداً لمس نکنید.	۵-۴. محل را با الکل قند عفونی کنید، و اجازه دهید خشک شود.
۶. سرنگ و سر سوزن استریل متصل به آن را در امتداد رگ به شکلی که سطح اریب برش خورده سر سوزن رو به بالا باشد در رگ فرو کنید. به طور یکنواخت مقداری بین ۲ ml تا ۴ ml خون بکشید.	۶. تیدل را فرو کنید (متصل به سرنگ یا لوله خلاء) و به طور یکنواخت خون بکشید.
نکته: (اگر جایی که ماده قند اتعداد ممکن است در چسبیدن خون به سطح لام و همچنین در رنگ آمیزی گیمسا تداخل ایجاد کند، بویژه زمانی که تست خون و قند اتعداد مناسب نباشد. لذا لازم است که حجم خون اضافه شده به یک لوله حاوی EDTA با ظرفیت ۵ ml کمتر از ۲ ml نباشد.	۷. تورنیکت را آزاد کنید، تیدل را خارج کرده و محل خونگیری را با قطعه پنبه خشک محکم فشار دهید.
۷. پس از جمع آوری مقدار مناسب خون، تورنیکت را باز کنید، به بیمار اعلام کنید که مشت خود را باز کند. تیدل را خارج کرده و قطعه ای پنبه خشک را محکم در محل سوراخ شده رگ قرار دهید. به بیمار آموزش دهید در حالی که بازوی خود را به سمت بالا جمع کرده به فشار بروی پنبه ادامه دهد تا زمانی که خونریزی متوقف شود.	۸. خون را به لوله حاوی قند اتعداد EDTA اضافه کنید، و به ملایمت با چند بار سروته کردن مخلوط کنید.
۸. خون را به لوله حاوی قند اتعداد EDTA منتقل کرده و با ملایمت و به تعداد ۶ بار سروته نموده تا مخلوط شود. لوله را به شدت تکان ندهید.	

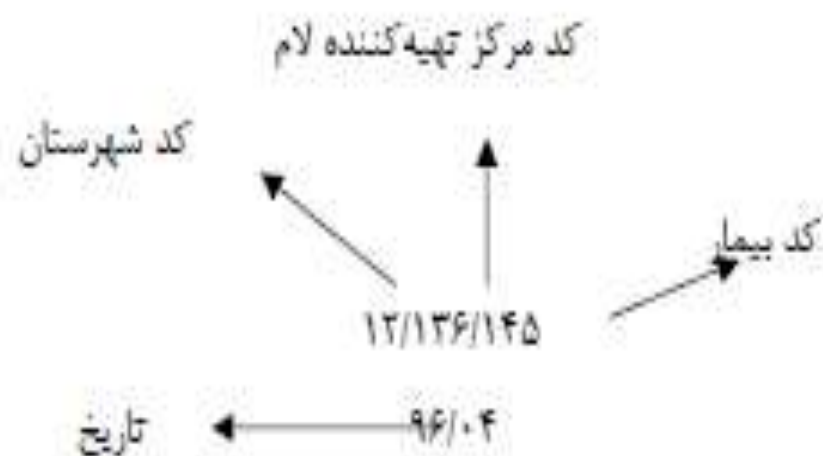
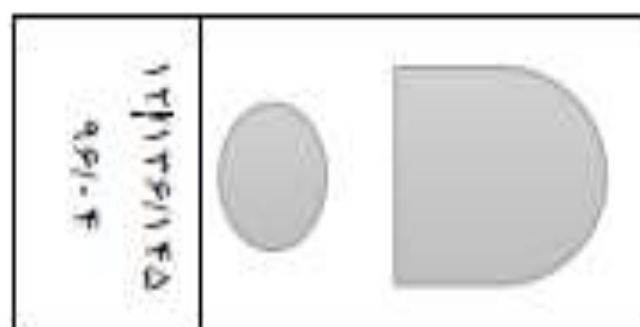
- به علت تاثیر ضد انعقاد بر روی مورفولوژی انگل، خون جمع آوری شده در لوله حاوی ضد انعقاد را نیایستی بیش از ۴ ساعت نگهداریم (در زمانی کمتر از ۴ ساعت گسترش ها تهیه شود).
- چنانچه خون سیاهرگی در جای دیگری غیر از آزمایشگاه که گسترش ها در آنجا تهیه می شوند گرفته شده باشد، لازم است که خون بلافاصله (به طور ایده ال در زمانی کمتر از ۱ ساعت) و بدون سرد کردن یا شرایط یخچالی به آزمایشگاه ارسال شود.
- گسترش ضخیم باید در حالت مسطح خشک شده و از آسیب گرد و غبار و مگس حفظ شود.
- گسترش ضخیم ممکن است چنانچه در معرض حرارت قرار گیرد به صورت خود به خودی فیکس شود، لذا باید بلافاصله رنگ آمیزی شود.
- گسترش ضخیم را می توان به آرامی بوسیله یک سشوار تنظیم شده روی وضعیت گرمای ملایم خشک نمود، اما باید مراقب بود که از فیکساسیون ناشی از حرارت جلوگیری شود که این امر خیلی سریع رخ می دهد. لازم است که صلاحیت تکنیسین استفاده کننده از این متد در استفاده از سشوار اتیات شده باشد.
- برای برچسب نویسی لام از خودکار یا مداد زلما ی استفاده نکنید، چرا که در هنگام فیکس کردن با الکل، جوهر پخش شده و باعث تخریب گسترش می شود.
- مقدار کمی از خون بر روی لام گسترش دهنده یاقی می ماند، چنانچه به شکل صحیحی تمیز شود می توان از این لام برای تهیه گسترش بیمار بعدی استفاده کرد. در غیر این صورت از یک لام تمیز دیگر موجود در بسته لام به عنوان لام پخش کننده جدید استفاده کنید.

شکل ۱. الگوی تهیه لام خون محیطی (محل های قطره گذاری و قطر گسترش ضخیم)



۶. الگوی توصیه شده اطلاعات نویسی

در این سیستم، شهرستان‌های هر استان کد اختصاصی ۲ رقمی دریافت نموده و در هر شهرستان حداکثر ۳ رقم به کد مرکز تهیه‌کننده لام اختصاص می‌یابد، کد بیمار نیز به صورت سریال در هر ماه ثبت شده و تاریخ تهیه به صورت ماه و سال ثبت می‌شود.
برای مثال :



بعد از بررسی میکروسکوپی، نتایج بایستی براساس رویه‌های استاندارد (MM-SOPs-08 09) ثبت

و گزارش شود.

تمام گونه‌ها و مراحل انگلی و شمارش را براساس SOP مربوطه ثبت نمایید.

زمانی که شمارش بر روی گسترش ضخیم کامل شد، چنانچه شمارش واقعی گلبول سفید بیمار در دسترس

نیود، میزان تراکم انگل را براساس یک مقیاسی از ۸۰۰۰ گلبول سفید در میکرولیتر و براساس فرمول زیر محاسبه کنید

$$\frac{\text{تعداد گلبول سفید} \times \text{تعداد انگل غیر جنسی شمارش شده}}{\text{تعداد گلبول سفید شمارش شده}} = \text{تعداد انگل در میکرولیتر خون}$$

مثال ۱:

تمام مراحل شمارش شده انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم - 155

گلبول سفید شمارش شده متناسب با انگل - 208

شمارش انگل:

$$\frac{155 \times 800}{208} = 5962 \text{ انگل/}\mu\text{L خون}$$

نحوه گزارش: 5962 / μ L انگل مالاریای پلاسمودیوم فالسیپاروم

مثال ۲:

تمام مراحل شمارش شده انگل پلاسمودیوم ویواکس - 88

گلبول سفید شمارش شده متناسب با انگل - 505

تعداد واقعی گلبول سفید شمارش شده بیمار - 6500

شمارش انگل:

$$\frac{88 \times 6500}{505} = 1133 \text{ انگل/}\mu\text{L خون}$$

نکات مهم

- از نظر میکروسکوپی گسترش خونی باید ظاهری آبی- خاکستری داشته باشد
- رنگ قرمز صورتی نشانه رنگ پذیری نامطلوب است (خیلی اسیدی)
- PH آب بافر در فواصل زمانی منظم چک شود
- رنگ آمیزی ضعیف
- رنگ رقیق شده را فیلتر نکنید
- برای تنظیم زمان رنگ آمیزی با رنگ ده درصد سه لام با فواصل زمانی ۸، ۹، و ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی می کنیم
- اگر گلبولهای قرمز لیز شده اند دلیل بر عدم فیکس مناسب گسترش نازک است
- سطح لام پوشیده از رسوب است
- Artifact در لام گسترش خونی ناشی از رشد اسپورباکتری و قارچ

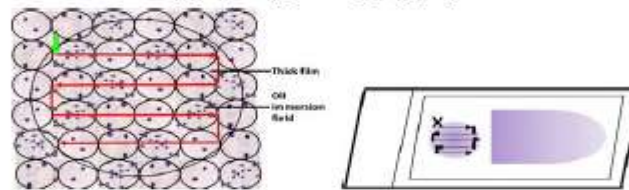
شرح فعالیت	نمودار فعالیت
۱-۵. روش سریع (۱۰٪) ۱. مقدار مورد نیاز از رنگ گیمسای رقیق شده ۱۰٪ برای تعداد لامی که قرار است رنگ آمیزی شود را محاسبه کنید. هر لام تقریباً نیاز به ۳ml از رنگ دارد. رنگ را لحظه‌ای قبل از استفاده و براساس پروتکل MM-SOP-04 تهیه کنید. ۲. برای فیکسه کردن گسترش ترجیحاً از یک پیپت پاستور استفاده کنید یا لام را در ظرف کوچک حاوی متانول برای ۲ ثانیه غوطه ور کنید. مواظب باشید گسترش ضخیم فیکسه نشود زیرا متانول با فیکسه کردن گسترش ضخیم از همولیز جلوگیری می‌کند. ۳. لام‌ها را روی سینی یا رک خشک‌کننده قرار دهید. با قرار دادن لام‌ها روی یک سطح تخت اجازه دهید گسترش فیکس و کاملاً خشک شود (تقریباً ۲ دقیقه). هرگز لام را به شکل عمودی و در حالتی که گسترش نازک پایین است قرار ندهید. ۴. لام‌ها را روی رک رنگ آمیزی رو به بالا قرار دهید. ۵. رنگ را به آرامی از قسمت بالا برروی لام بریزید. ۶. زمان تایمر را روی ۱۰-۸ دقیقه تنظیم کنید (زمان واقعی را قبلاً باید با انجام سری‌های رنگ آمیزی بدست آورده باشید). (MM-SOP 3c را ببینید: کنترل کیفیت گیمسای ذخیره و آب بافر). ۷. در پایان زمان رنگ آمیزی، هرلام را به تنهایی و با ریختن قطرات آب بشویید. رنگ را مستقیماً از روی لام تخلیه نکنید چرا که لایه متالیک تشکیل شده، روی لام می‌ماند و باعث تخریب لام می‌شود. ۸. پس از شستشو لام را به صورت رو به پایین در رک خشک کن قرار دهید یا در حالت عمودی به صورتی که گسترش ضخیم رو به پایین است جهت خشک شدن قرار دهید. مواظب باشید قسمت ضخیم با لبه رک تماس نیابد. ۹. باقیمانده رنگ ۱۰٪ تهیه شده را دوربریزید.	۵-۱- روش سریع (۱۰٪) ۱. تهیه محلول رنگ گیمسای ۱۰٪ MM-SOP-04 ۲. با یک پیپت پاستور و یا دقت فقط گسترش نازک را فیکس کنید. ۳. اجازه دهید که گسترش برروی رک یا سینی خشک کن در معرض هوا خشک شود. ۴. لام‌ها را رو به بالا برروی رک رنگ آمیزی قرار دهید. ۵. رنگ را به آرامی بر روی لام بریزید تا گسترش خونی کاملاً پوشیده شود. ۶. زمان سنج را روی ۱۰-۸ دقیقه تنظیم کنید. ۷. به آرامی با ریختن آب تمیز رنگ را از روی لام بشوئید. ۸. اجازه دهید لام‌ها در هوای عادی خشک شوند. ۹. باقیمانده رنگ ۱۰٪ تهیه شده را دور بریزید.



در حین رنگ آمیزی با رنگ گیمسا (۳% یا ۱۰ %) بر روی سطح لام يك لایه متاليك سبز رنگ شکل می گیرد. مواظب باشید که در حین آب کشی لام این لایه روی گسترش ننشیند چرا که چسبیدن آن به سطح لام باعث اختلال در آزمایش لام می شود. گسترش خونی بایستی تا جایی که امکان دارد بلافاصله بعد از تهیه رنگ آمیزی شود (البته برای تهیه لام آموزشی و اسلاید بانك باید بین زمان تهیه لام و رنگ آمیزی حداقل دو ساعت فاصله باشد). نگهداری لام ها برای چند روز در شرایط گرم و مرطوب پیش از رنگ آمیزی باعث فیکسه شدن خود به خودی گسترش ضخیم شده و آن را برای تشخیص میکروسکوپی نامطلوب می سازد.

شرح فعالیت	نمودار اجرا
۱-۴ بررسی گسترش ضخیم ۱. گسترش رنگ آمیزی شده مورد نظر را روی صفحه میکروسکوپ قرار دهید. در حالی که برچسب اطلاعات در قسمت چپ لام باشد. موقعیت گسترش ضخیم در راستای عدسی شیئی ۱۰X باشد. ۲. میکروسکوپ را روشن کنید. منبع نور را در بهترین حالت تنظیم کنید و وضوح تصویر را با جستجو درون عدسی شیئی ۱۰ X برای چشم خود پیدا کنید. ۳. گسترش خونی را برای یافتن انگل‌ها و عناصر خونی، مورد جستجو قرار دهید. بخشی از گسترش را که خوب رنگ آمیزی شده و توزیع یکسانی از گلبول‌های سفید دارد را انتخاب کنید ۴. قطره کوچکی از روغن ایمرسیون را روی گسترش ضخیم قرار دهید. برای جلوگیری از آلودگی دوطرفه و اتفاقی، هم روغن و هم لام، از تماس نوک قطره چکان روغن با لام اجتناب کنید. اجازه ندهید که عدسی ۴۰X باروغن تماس حاصل کند. ۵. عدسی شیئی ۱۰۰X را به روی بخش انتخاب شده گسترش ضخیم ببرید. با تنظیم دقیق وضوح تصویر آن را به طور شفاف ببینید. برای جلوگیری از آسیب به لام صفحه مکانیکی را به آرامی بالا ببرید. ۶. با تنظیم دقیق، عناصر سلولی را به وضوح ببینید، و کیفیت گسترش را با بررسی وضوح تصویر مورد تایید قرار دهید. حضور ۲۰-۱۵ گلبول سفید در هر میدان گسترش ضخیم بیانگر کیفیت مطلوب گسترش می‌باشد. گسترش‌های با تعداد کمتر گلبول سفید نیازمند بررسی وسیع تری می‌باشند. ۷. لام را به روش قاعده مندی مورد بررسی قرار دهید. از قسمت سمت چپ بالای گسترش شروع کنید (در شکل ۱ با پیکان عمودی سبز رنگ نشان داده شده) واز حاشیه میدان شروع کنید. سپس میدان به میدان و به حالت افقی به سمت راست حرکت کنید. ۸. هنگامی که به انتهای دیگر گسترش رسیدید، به آرامی به سمت پایین لام حرکت کنید. سپس به سمت چپ، میدان به میدان، و همچنان به جلو (تصویر پایین را ببینید). برای یک بررسی دقیق، به طور مداوم و در هر میدان، اقدام به تنظیم دقیق وضوح تصویر بنمایید.	۱-۴ بررسی گسترش ضخیم ۱- گسترش رنگ آمیزی شده را روی صفحه میکروسکوپ به شکلی که برچسب اطلاعات در سمت چپ و گسترش ضخیم در زیر عدسی شیئی ۱۰X باشد قرار دهید. ۲. میکروسکوپ را روشن کنید، و نور را در بهترین حالت تنظیم کنید. ۳. قطره‌ای روغن ایمرسیون را روی گسترش ضخیم قرار دهید. ۴. جستجو کنید و هر قسمتی که به خوبی رنگ گرفته را انتخاب کنید. ۵. عدسی شیئی ۱۰۰X را به سمت گسترش ضخیم بچرخانید، به شکلی که درون روغن قرار گیرد. ۶. با یک تنظیم دقیق، روی گسترش خونی متمرکز شوید. ۷. با اولین میدان بالا و سمت چپ شروع کنید، و سپس روی لام، میدان به میدان به سمت راست حرکت کنید. ۸. زمانی که به انتهای گسترش رسیدید، به سمت پایین حرکت کنید، سپس میدان به میدان به سمت چپ، و همینطور رو به جلو.

شکل ۱. بررسی یک گسترش ضخیم خون



نمودار فعالیت	شرح فعالیت
۲-۴. تشخیص حضور انگل مالاریا در گسترش ضخیم و شناسایی نوع آن ۱. گسترش ضخیم را در زیر عدسی روغنی میدان به میدان و به شکلی افقی و عمودی مورد بررسی قرار دهید. ۲. حداقل ۱۰۰ میدان میکروسکوپی را پیش از گزارش "هیچ گونه‌ای از انگل مالاریا دیده نشد" ببینید. ۳. در صورت یافتن انگل، ۱۰۰ میدان دیگر را برای افزایش شانس تشخیص عقونت مضاعف جستجو کنید. ۴. گسترش نازک را همیشه برای تایید نوع انگل مشاهده شده در گسترش ضخیم ببینید. ۵. تمام گونه‌ها و مراحل دیده شده انگل را تعیین و ثبت کنید.	۲-۴. تشخیص حضور انگل مالاریا در گسترش ضخیم و شناسایی نوع آن ۱. بررسی گسترش را به تعداد ۱۰۰ میدان و با عدسی روغنی ادامه دهید. گسترش را در زیر عدسی روغنی میدان به میدان و (مطابق با شکل ۱) به جلو حرکت دهید و وضوح تصویر را به دقت تنظیم کنید. ۲. قبل از اینکه بخواهیم یک گسترش ضخیم را به شکل " انگل مالاریایی مشاهده نشد" گزارش کنیم باید حداقل ۱۰۰ میدان میکروسکوپی با قدرت بزرگنمایی بالا مورد بررسی قرار دهیم. اگر مقدور باشد، پایستی کل گسترش ضخیم را ببینیم. ۳. در صورت مشاهده انگل، پیش از آنکه بخواهیم نوع انگل را شناسایی و اعلام کنیم، تعداد ۱۰۰ میدان دیگر را باید مورد بررسی قرار دهیم تا از نبودن عقونت مختلط (MIX) مطمئن شویم. ۴. گسترش نازک را با پایستی جهت تایید قطعی گونه انگل مورد بررسی قرار داد. برعکس گسترش ضخیم، گسترش نازک امکان مشاهده شکل کامل انگل و مورفولوژی گلبول قرمز را فراهم می‌کند. یک بررسی را در قسمت پر مانند انتهای (نزدیک به انتهای شعله شمعی) و حاشیه گسترش نازک به شکلی که در روش ۳-۴ توضیح داده شده انجام دهید. ۵. تمام انواع و مراحل مربوط به انگل را شناسایی و در دفتر ثبت گزارشات میکروسکوپی مالاریا ثبت کنید. (b) MM-SOP 6b را ببینید: ثبت و گزارش نتایج میکروسکوپی). نکته: به Bench aid سازمان بهداشت جهانی در زمینه شناسایی و تایید انواع انگل‌های مالاریا مراجعه کنید

نمودار فعالیت	شرح فعالیت
۳-۴. بررسی گسترش نازک برای تایید گونه‌های انگل و عقون‌های مختلط (MIX) ۱. گسترش نازک را یایستی جهت تایید گونه‌های انگلی و عقون مختلط (MIX) مورد بررسی قرار داد. ۲. یک قطره روغن در حاشیه پرماتند گسترش قرار دهید. ۳. میدان را با عدسی 10 X پیدا کنید و با عدسی 100X بررسی را ادامه دهید. وضوح تصویر را برای چشم خود تنظیم کنید. ۴. گسترش نازک یا حاشیه پرماتند گسترش را ببینید، به شکل افقی یا عمودی از یک میدان به میدان بعدی بروید. ۵. گسترش را تا زمانی که همه انواع انگل مورد تایید قرار گیرد جستجو کنید.	۳-۴. بررسی گسترش نازک برای تایید گونه‌های انگل و عقون‌های مختلط (MIX) ۱. برای تایید گونه‌های انگل یا عقون‌های مختلط (MIX) پدنبال بررسی گسترش ضخیم، گسترش نازک را هم بررسی کنید. ۲. یک قطره روغن ایمرسیون در حاشیه پرماتند (تزدیک به انتهای شعله شمعی) گسترش نازک قرار دهید. ۳. میدان را با عدسی 10 X پیدا کنید و با عدسی 100X بررسی را ادامه دهید. ۴. ناحیه زیر شعله شمعی یا حاشیه گسترش نازک، جایی که گلبول‌های قرمز کنار هم قرار گرفته و کمترین روی هم افتادگی وجود دارد را بررسی کنید. از الگوی حرکت نشان داده شده در تصویر ۲ تبعیت کنید. در حاشیه گسترش حرکت کنید، سپس لام را به اندازه یک میدان به سمت خارج، یک میدان به سمت داخل حرکت دهید، به حالت حرکت عرضی برگردید و ادامه دهید. شکل ۲. بررسی گسترش نازک  ۵. تا زمان یافتن همه گونه‌های انگل مالاریا و تایید آن به جستجو ادامه دهید. تمام انواع و مراحل انگلی را پس از تایید در دفتر ثبت گزارشات میکروسکوپی مالاریا ثبت کنید. (MM-SOP 6b) را ببینید: ثبت و گزارش نتایج میکروسکوپی. نکته: به Bench aid سازمان بهداشت جهانی در زمینه شناسایی و تایید انواع انگل‌های مالاریا مراجعه کنید.

شمارش انگل در گسترش ضخیم

شرح فعالیت	تعداد مراحل انجام
۶. برای اینکه بدانید چگونه شمارش را تمام کنید از قانون زیر می‌توانید استفاده کنید. • اگر مساوی یا بیش از ۱۰۰ انگل (≥ 100) در ۲۰۰ گلیول سفید شمردید، شمارش را متوقف کنید و نتایج را به شکل تعداد انگل به ازای ۲۰۰ گلیول سفید ثبت کنید. • اگر مساوی یا کمتر از ۹۹ انگل (≤ 99) در ۲۰۰ گلیول سفید شمردید شمارش را تا ۵۰۰ گلیول سفید ادامه دهید و نتیجه را به شکل تعداد انگل به ازای ۵۰۰ گلیول سفید ثبت کنید.	۶. بسته به تعداد انگل مشاهده شده، شمارش را بعد از ۲۰۰ یا ۵۰۰ گلیول سفید متوقف کنید. • اگر مساوی یا بیش از ۱۰۰ انگل (≥ 100) در ۲۰۰ گلیول سفید شمردید، شمارش را متوقف کنید و نتایج را به شکل تعداد انگل به ازای ۲۰۰ گلیول سفید ثبت کنید. • اگر مساوی یا کمتر از ۹۹ انگل (≤ 99) در ۲۰۰ گلیول سفید شمردید شمارش را تا ۵۰۰ گلیول سفید ادامه دهید و نتیجه را به شکل تعداد انگل به ازای ۵۰۰ گلیول سفید ثبت کنید.
۷. تمام انگل‌ها و گلیول سفید میدان آخر را بشمارید.	۷. تمام انگل‌ها و گلیول سفید میدان آخر را بشمارید، حتی اگر شمارش گلیول سفید از مرز ۲۰۰ یا ۵۰۰ نیز بگذرد.
۸. تعداد واقعی انگل‌ها و گلیول‌های سفید را ثبت کنید.	۸. تعداد واقعی انگل‌ها و گلیول‌های سفید را بر روی یک برگ کار مناسب بنویسید.
۹. شدت تراکم انگل را یا فرمول زیر محاسبه کنید $8000 \times \frac{\text{تعداد انگل شمرده شده}}{\text{تعداد گلیول سفید شمرده شده}} = \text{تعداد انگل در میکرولیتر}$	۹. زمانی که شمارش کامل شد، تراکم انگل را براساس تعداد واقعی گلیول سفید بیمار محاسبه کنید. اگر شمارش واقعی گلیول سفید را نداشتید، یک حد متوسطی از گلیول سفید معادل ۸۰۰۰ در میکرو لیتر را برای محاسبه در نظر بگیرید از فرمول زیر برای محاسبه تعداد انگل استفاده کنید. $8000 \times \frac{\text{تعداد انگل شمرده شده}}{\text{تعداد گلیول سفید شمرده شده}} = \text{تعداد انگل در میکرولیتر}$

شمارش انگل در گسترش نازک

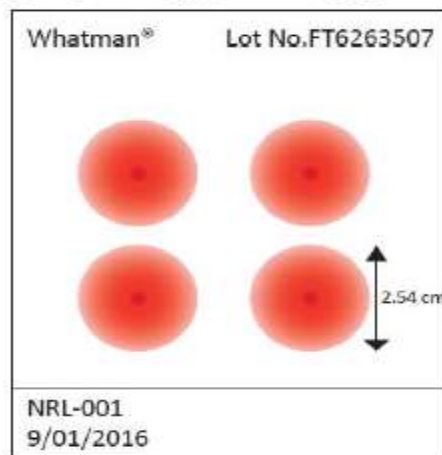
شرح فعالیت	نمودار مراحل اجرا
۳-۴ نکته: در صورت فقدان گسترش ضخیم شمارش انگل روی گسترش نازک انجام می‌دهیم. ۱. تمام گلیول‌های قرمز آلوده را بشمارید. همه قرم‌های انگل از جمله کامتوسیت‌ها را نیز بشمارید. در عقون می‌کنس. تمام گلیول‌های قرمز آلوده با هم شمارش می‌شوند. وجود گونه‌های متعدد (حالت می‌کنس) گزارش می‌شود.	۳-۴. شمارش انگل روی گسترش نازک و محاسبه تراکم انگل ۱. اگر گلیول‌های قرمز آلوده شده موجود باشند، تمام گلیول‌های قرمز آلوده را بشمارید و ثبت کنید.
۲. در قسمت بالایی گسترش نازک، یک میدان با حدود ۲۵۰ گلیول قرمز را پیدا کنید. همه تعداد گلیول‌های قرمز آن میدان و تعداد انگل موجود را بشمارید. یک میدان نمونه (یا بزرگنمایی ۱۰۰) بایستی دارای ۲۵۰ گلیول قرمز باشد.	۲. از قسمت بالایی گسترش نازک شروع کنید. پدنبال یک میدان تیپیک یا گلیول‌های قرمز آلوده و دیگر گلیول‌های قرمز بگردید.
۳. از شمارشگر چند انگشتی استفاده کنید. گلیول‌های قرمز آلوده و غیر آلوده را با فشردن دکمه در نظر گرفته شده بشمارید. اگر شمارشگر دو انگشتی بود یکی را برای گلیول قرمز آلوده و دیگری را برای غیر آلوده در نظر بگیرید.	۳. دکمه‌های در نظر گرفته شده را برای هر کدام از گلیول‌های آلوده و غیر آلوده فشار دهید.
۴. بعد از شمردن تمام انگل‌ها و گلیول‌های قرمز به میدان بعدی حرکت کنید. از الگوی نشان داده شده در شکل ۱ تبعیت کنید و روش شمارش را تکرار کنید. مراقب باشید که میدان‌ها روی هم نیافتند. در عرض گسترش به مقداری که لازم باشد حرکت کنید. تمام گلیول‌های آلوده و غیر آلوده را بشمارید حتی اگر تعداد گلیول‌های قرمز از ۲۵۰ عدد تجاوز کند.	۴. بعد از شمردن تمام گلیول‌های قرمز آلوده و غیر آلوده در یک میدان، نتایج را ثبت کنید، به میدان بعدی حرکت کنید، و همان روش شمارش را ادامه دهید.
۵. شمارش را زمانی که حدود ۲۰ میدان هر یک با حدود ۲۵۰ گلیول قرمز (حدود ۵۰۰۰ گلیول قرمز) شمردید، متوقف کنید. تعداد واقعی گلیول‌های آلوده و غیر آلوده را بر روی یک برگ کار مناسب یادداشت کنید. از این الگوها برای محاسبه شمارش کلی انگل در هر میکرولیتر خون استفاده کنید.	۵. بعد از دیدن ۲۰ میدان گسترش نازک، شمارش را متوقف کنید، و نتیجه شمارش تمام گلیول‌های آلوده و غیر آلوده را ثبت کنید.
۶. زمانی که شمارش کامل شد، میزان تراکم انگل را از روی مقدار واقعی گلیول‌های قرمز بیمار حساب کنید. اگر مقدور نبود، از یک میانگینی معادل ۵۰۰۰۰۰ در میکرولیتر و قرم‌ول زیر استفاده کنید. $\text{تعداد گلیول قرمز در هر میدان} \times \frac{500000}{\text{تعداد گلیول قرمز آلوده}} = \text{انگل در میکرولیتر خون}$	۶. بعد از ثبت تعداد کل آلوده‌ها و غیر آلوده در ۲۰ میدان یا استفاده از قرم‌ول زیر شدت تراکم انگل را محاسبه کنید. $\text{تعداد گلیول قرمز در هر میدان} \times \frac{500000}{\text{تعداد گلیول قرمز آلوده}} = \text{انگل در میکرولیتر خون}$

نمونه گیری بر روی کاغذ و اتمن

۴. روش اجرا

شرح فعالیت	نمودار اجرا
۱- کد آزمایشگاه، مشخصات بیمار یا کد و تاریخ نمونه گیری را روی کاغذ فیلتر بنویسید (مراجعه کنید به MM-SOP-06a). برچسب نویسی گسترش‌های خونی مالاریا) به طور اختیاری شما ممکن است حروف اول نام و نام خانوادگی تکنیسین نمونه گیر را نیز بنویسید شکل ۱ را ببینید.	۱- کاغذ فیلتر را برچسب نویسی کنید. (MM-SOP-06a) را ببینید: برچسب نویسی گسترش‌های خونی مالاریا).
۲. اگر از کارت‌های FTA و اتمن استفاده می‌کنید، مقدار ۱۲۵ میکرولیتر از خون ((برای دایره ۲/۵۴ cm) جمع آوری شده در لوله را با پیپت بکشید و با حرکت دایره‌ای از مرکز به سمت بیرون و متعادل‌المرکز در مرکز ناحیه مشخص شده بر روی کارت پخش کنید، برای هر بیمار حداقل دو دایره در نظر بگیرید. از لخته شدن خون بر روی کاغذ اجتناب کنید، چرا که باعث تراکم ترکیبات شیمیایی بر روی کارت می‌شود. همچنین خون را روی کارت تمالید یا به شکل گسترش (اسمیر) در نیاورید.	۲. چنانچه از کاغذ و اتمن FTA استفاده می‌کنید، مقدار ۱۲۵ μ l خون را بکشید و در قسمت مرکز دایره مورد نظر پخش کنید.
۳- اگر از کاغذ و اتمن ۳.۲ یا ۹.۳ استفاده می‌کنید، مقدار ۴۰-۵۰ میکرولیتر از خون بکشید و بر روی ناحیه تعیین شده برای لکه‌ها پخش کنید. برای هر بیمار دو یا سه لکه تهیه کنید. شکل‌های ۲ و ۳ را ببینید.	۳. اگر از کاغذ و اتمن ۳.۲ یا ۹.۳ استفاده می‌کنید، دو یانه قطره ۵۰ - ۴۰ ml را با پیپت روی ناحیه طراحی شده (دایره) منتقل کنید.
۴- نمونه‌های قرار داده شده بر روی کاغذ فیلتر برای نگهداری در دمای اتاق آماده است.	۴. نمونه به کار برده شده برای ساختن لکه‌ها اکنون آماده نگهداری در دمای اتاق است.
۵- چنانچه قرار است نمونه مدت کوتاهی بعد از لکه گذاری مورد آزمایش قرار گیرند اجازه دهید پیش از قرار دادن آن در کیسه پلاستیکی زیپ دار حداقل به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق خشک شود. از حرارت برای کوتاه کردن زمان خشک شدن استفاده نکنید. لکه‌های خون خشک شده نسبت به لکه‌های تازه گذاشته شده ظاهر تیره تری دارند.	۵. پیش از اینکه کاغذ فیلتر را در کیسه زیپ دار بگذارید اجازه دهید نمونه به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق خشک شوند.
۶- درون هر کیسه زیپ دار حاوی نمونه‌های کاغذ فیلتر، یک رطوبت گیر بگذارید.	۶. داخل هر کیسه زیپ دار حاوی نمونه‌های کاغذ فیلتر، یک رطوبت گیر بگذارید.
۷- تمام شرایط نگهداری عاری از رطوبت را تحت نظر بگیرید (رطوبت گیر را به طور منظم برای هر تغییر رنگی که نشانگر تماس با رطوبت می‌باشد چک کنید و در صورت نیاز عوض کنید).	۷. مطمئن شوید که فضای نگهداری کاملاً خشک است. رطوبت گیر را به طور منظم چک کنید، و در صورت لزوم آن را عوض کنید.
۸- چنانچه نمونه‌ها در مدت زمانی معادل ۴ هفته مورد آزمایش قرار گیرد آنها را در یخچال ۴ درجه نگهداری کنید. برای نگهداری طولانی تر، آنها را در دمای ۲۰- یا ۸۰- درجه نگهداری کنید.	۸. چنانچه در طی چهار هفته نمونه آزمایش شود در یخچال ۴ درجه و برای نگهداری طولانی تر در ۲۰- یا ۸۰- نگهداری.

شکل ۱. لکه‌های خون خشک شده بر روی کاغذ فیلتر FTA واتمن



شکل ۲. لکه‌های خون خشک شده ۲ یا ۳ تایی بر روی کاغذ صافی واتمن که به شکل قطعه ای، با ابعاد $6/35 \times 2/54$ سانتی متری برش خورده و یک نوار کاغذی سفت دیگری به عنوان یک پوشش و محل برچسب نویسی روی آن الصاق می‌شود

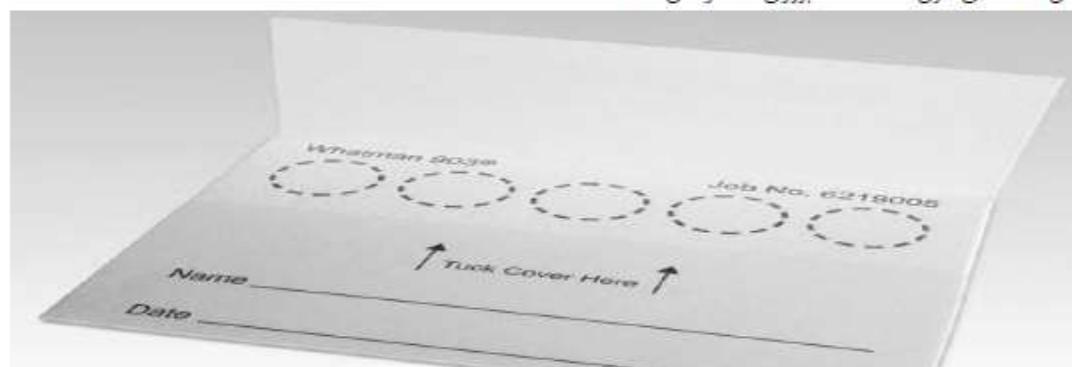


کاغذ صافی با ۲ یا ۳ لکه خون (نمای داخلی)



کاغذ سفت (نمای روبرو، به عنوان یک پوشش و همچنین محل برچسب نویسی برای کاغذ صافی حاوی خون عمل می‌کند)

شکل ۳. لکه‌های خون خشک شده بر روی کاغذ واتمن ۹۰۳

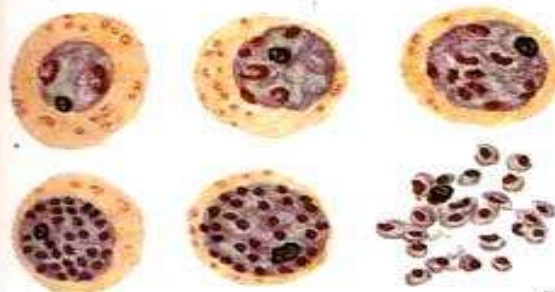


۴-۲- جداسازی و دفع پسماندهای عفونی تولید شده از تست‌های تشخیصی مالاریا

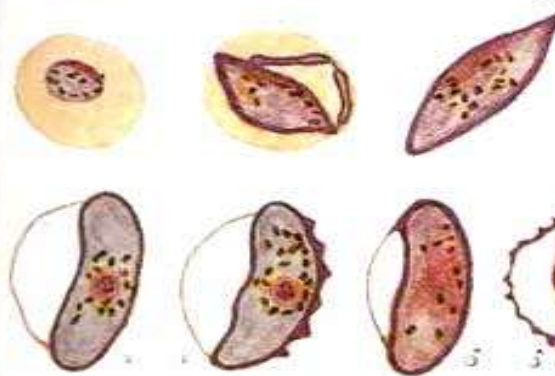
نوع پسماند	علامت‌ها و رنگ بندی	نوع ظرف	نوع دفع و عفونت زدایی
برنده ها؛ لاتست آلوده به خون، نیدل‌های زیرپوستی، اسلاید و شیشه شکسته، پیت و جاقوی جراحی	کد رنگ مخصوص (رنگ از پیش تعیین شده و قراردادی)، مشخص شده با متن "برنده" همراه با علامت خطر جانی	ظرف ساخته شده از جنس پلاستیک سخت مقاوم به پارگی و نفوذ آب	قد عفونی به روش شیمیایی یا اتوکلاو کردن و در ادامه سوزاندن، خرد کردن یا بازیافت
پسماندهای عفونی نظیر: وسایل جمع آوری خون، ظروف و لوله‌های استفاده شده خونی، سواب، بانداز، دستکش ها، کاست‌های تست سریع، گسترش‌های خونی رنگ نشده	کد رنگ (رنگ از پیش تعیین شده یا قراردادی)، مشخص شده با عبارت "عفونی" همراه با علامت خطر جانی	ظرف یا کیسه پلاستیکی محکم و غیر قابل نشنی که بتوان اتوکلاو کرد	اتوکلاو کردن در محل تولید، و در ادامه به روش سوزاندن یا دفن عمیق
پسماندهای شیمیایی نظیر: اتکل ها، متانول، گزیلول، حلال ها، سدیم هیپوکلریت، یاطری ها	دارای کد رنگ، مشخص شده با عبارت "شیمیایی" همراه با علامت خطر اختصاصی (خورنده، سمی، قابل اشتعال و غیره)	ظرف محکم غیر قابل نشت برای جمع آوری و دفع ایمن	پسماندهای شیمیایی مایع را هرگز با مخلوط کردن یا ریختن در قاضلاب دفع نکنید بلکه آنها را در ظروف یا کیسه محکم و غیر قابل نشت نگهداری کنید.
بی خطر ها مثل: کاغذ، مقول پلاستیک، مواد بسته بندی	عدم نیاز به رنگ بندی و علامت خطر زیستی	کیسه پلاستیکی	آنها را مانند پسماندهای خانگی و جامدات معمولی دفع کنید.



TROPHOZOITES



SCHIZONTS



GAMETOCYTES



Thin film

Thick film

		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
Trophozoites	Young				
	Old				
Schizonts	Immature				
	Mature				
Gametocytes	Male				
	Female				

