

آزمایشگاه بیمارستان / مرکز بهداشت		دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران اداره امور آزمایشگاه‌های بهداشتی	
شماره سند: ۸-۳۹	تعداد صفحات: ۶: ۱	معتبر از تاریخ: ۸۸/۸/۱	زمان بازنگری: ۸۹/۸/۱
محدوده توزیع: انگل شناسی		شرح کلی: روش‌های استاندارد جهت تشخیص انواع انگل‌ها در مدفوع	

موضوع: روش‌های استاندارد جهت تشخیص انواع انگل‌ها در مدفوع:

هدف اصلی از انجام آزمایش مستقیم نمونه مدفوعی که حاوی ماده نگهدارنده نمی‌باشد بررسی حرکت تروفوزوئیت تک یاخته‌ها، گزارش رنگ، قوام، میزان WBC, RBC و 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.

همانطوری که قبلاً ذکر گردید باید به این نکته توجه نمود که نمونه مدفوعی که در ماده نگهدارنده جمع آوری می‌شود جهت انجام آزمایش مستقیم مناسب نیست، اما می‌توان در رابطه با نوع ماده نگهدارنده بر روی این 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 می‌باشد. تعداد ارگانیسم‌ها که ممکن است در آزمایش مستقیم تشخیص داده نشود، بوسیله این روش شناسایی می‌گردد. دو نوع روش تغلیظ وجود دارد.

۱- شناور سازی (Flotation)

۲- رسوب گیری (Sedimentation)

اساس این روش‌ها آن است که کیست‌های تک یاخته‌ها، اووسیست، تخم کرم‌ها و لاروها از مواد اضافی موجود در مدفوع بوسیله عمل سانتریفوژ نمودن و با اساس تفاوت در وزن مخصوص جدا می‌گردند.

۱- روش استاندارد شناورسازی با سولفات روی (Zinc sulfate flotation) در روش شناور سازی، 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 می‌گردند. عناصر انگلی در سطح مایع مشاهده و مواد اضافی در ته لوله باقی می‌ماند. این روش آسان‌تر از روش رسوب گیری است، اما به هر حال بیشتر تخم کرم‌ها مانند تخم‌های دریچه دار و یا تخم‌های خیلی سنگین مانند تخم آسکاریس غیر بارور با این روش تغلیظ نمی‌گردند. باید وزن مخصوص محلول سولفات روی در حد معینی باشد و نیز همه ارگانیسم‌هایی که در سطح مایع و در رسوب تجمع حاصل کرده‌اند، جدا گردیده و تشخیص داده شوند. باید نمونه در مدت ۱۵ تا ۲۰' بعد از مرحله سانتریفوژ نهایی بررسی شود، در غیر این صورت ارگانیسم شکل طبیعی خود را از دست داده و یا تخریب می‌گردد.

نمونه: باید تازه باشد و یا در محلول نگهدارنده مانند فرمالین ۵ یا ۱۰٪ بافره و یا SAF = Sodium Acetate – Acetic Acid – Formalin نگهداری شده باشد.

- برای نمونه‌های خیلی آبکی مرحله سانتریفوژ روش تغلیظ را می‌توان حذف نمود.

مواد:

فرمالین ۵ یا ۱۰٪ بافره یا SAF- سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪، محلول سولفات روی (کحلول آبی ۳۳)، حدود ۳۳۰ گرم سولفات روی را با آب مقطر (به میزان ۶۷۰ میلی لیتر) به حجم لیتر برسانید.

وزن مخصوص محلول فوق باید جهت نمونه‌های نگهداری شده در فرمالین به میزان ۱/۲۰ و برای نمونه‌های تازه ۱/۱۸ باشد. در غیر این صورت باید بوسیله اضافه نمودن سولفات روی و یا آب مقطر تنظیم گردد و در بطری‌های در پیچ دار ذخیره گردد. تاریخ انقضاء را به مدت ۳۶ ماه بعد از تاریخ ساخت بر روی بر چسب شیشه بنویسد و یا در صورتی که وزن مخصوص از ۰/۰۲± واحد تغییر کرده باشد، باید محلول جدیدی ساخته شود.

روش کار:

	نام و امضاء تصویب کننده:	نام و امضاء تایید کننده:

آزمایشگاه بیمارستان / مرکز بهداشت		دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران اداره امور آزمایشگاه‌های بهداشتی	
شماره سند: ۸-۳۹	تعداد صفحات: ۶: ۲	معتبر از تاریخ: ۸۸/۸/۱	زمان بازنگری: ۸۹/۸/۱
محدوده توزیع: انگل شناسی		شرح کلی: روش‌های استاندارد جهت تشخیص انواع انگل‌ها در مدفوع	

- ۱- حدود ۴g مدفوع تازه را داخل ۱۰ میلی لیتر فرمالین ۱۰٪ (درون یک ظرف مناسب از نظر حجم نهایی) 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 روی هم قرار داده و آن را داخل یک قیف بگذارید. قیف را داخل یک لوله ته مخروطی گذاشته و حدود ۸ میلی لیتر از مخلوط فوق را صاف نمائید تا رسوبی به اندازه ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر ایجاد کند. اگر نمونه در ماده نگهدارنده فرمالین و یا SAF قرار داده شده باشد، حدود ۴-۳ میلی لیتر کافی است مگر اینکه نمونه مدفوع در ابتدا کم باشد.
- ۳- محلول سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪ را تا سر لوله اضافه کنید و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰g سانتریفوژ نمائید. مقدار رسوب به دست آمده باید حدود ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر باشد. رسوب خیلی غلیظ و با خیلی رقیق نشان دهنده روش نادرست تغلیظ است. (روش صحیح محاسبه تعداد دور در دقیقه بر اساس شعاع، که در سانتریفوژهای مختلف، متفاوت است در کتب مرجع موجود می‌باشد).
- ۴- مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در ۱ تا ۲ میلی لیتر سولفات روی به حالت سوسپانسیون در آورید و سپس تا ۳-۲ میلی لیتری لبه لوله را با محلول سولفات روی پر کنید.
- ۵- به مدت یک دقیقه در دور ۵۰۰g سانتریفوژ کنید. اجازه بدهید که بدون هیچ دخالتی سانتریفوژ کاملاً متوقف شود. دو لایه تشکیل می‌گردد و مقدار کمی رسوب در ته لوله و یک لایه سولفات روی در بالای لوله مشاهده می‌شود.
- کیست تک یاخته‌ها و بعضی از تخم کرم‌ها در سطح و بعضی از تخم‌های سنگین و یا دریچه دار در رسوب قرار می‌گیرند.
- ۶- بدون اینکه لوله را از سانتریفوژ خارج کنید، یک یا دو قطره از سطح مایع را با کمک یک پی‌پت پاستور و یا یک لوپ سیمی حرارت داده و سرد شده بردارید و روی یک لام بگذارید.
- هرگز لوپ را به طور عمقی وارد مایع نکنید و بلکه فقط با سطح آن را به طریقی تماس دهید که لوپ موازی با سطح مایع قرار گیرد (نه اینکه با آن سطح با آن زاویه ۹۰° بسازد). مطوئن باشید که نوک پی‌پت یا لوپ زیر سطح مایع وارد نشود.
- ۷- یک لام ۲۲×۲۲ و یا ۲۲×۲۴ میلی متر روی آن قرار دهید. جهت آماده سازی نمونه از محلول لوگل می‌توان استفاده نمود.
- ۸- با عدسی با بزرگ نمایی (×۱۰) تمام سطح لام را بررسی کنید.
- ۹- اگر مورد مشکوکی مشاهده گردید، با بزرگ نمایی (×۴۰) برای مطالعه جزئیات بیشتر استفاده نمائید. باید حداقل ۱/۳ سطح لام را بررسی کنید، حتی اگر مورد مشکوکی مشاهده نگردید.
- ۱۰- قبل از آزمایش و یا بعد از آن می‌توان لام مرطوب را جهت آموزش به دیگران در یک پلیت محتوی کاغذ مرطوب در روی یک اپلیکاتور و یا پایه مخصوص لام قرار دهید. هوای محفظه باید کاملاً مرطوب باشد اما خیس نباشد.

گزارش نتایج: مثال‌هایی از گزارش مثبت شامل:

Giardia lamblia cysts present.
Trichuris Trichiura eggs present.
Few macrophages present.
Moderate WBCs present.

می‌باشد.

نکات قابل توجه در روش:

- استفاده از آب لوله کشی می‌تواند جایگزین استفاده از سرم فیزیولوژی گردد. بعضی از کارکنان ترجیح می‌دهند که در تمام مراحل روش به جای آب، محلول فرمالین ۵٪ یا ۱۰٪ استفاده کنند.

نام و امضاء تایید کننده:	نام و امضاء تصویب کننده:

آزمایشگاه بیمارستان / مرکز بهداشت		دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران اداره امور آزمایشگاه‌های بهداشتی	
شماره سند: ۸-۳۹	تعداد صفحات: ۶: ۳	معتبر از تاریخ: ۸۸/۸/۱	زمان بازنگری: ۸۹/۸/۱
محدوده توزیع: انگل شناسی		شرح کلی: روش‌های استاندارد جهت تشخیص انواع انگل‌ها در مدفوع	

- اگر نمونه‌ها در SAF نگهداری شده اند، آزمایش از مرحله ۲ شروع می‌شود.

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

- اگر ترجیح می‌دهید که جهت نمونه برداری لوله‌ها را از سانتریفوژ خارج ننمایید، دقت کنید که قبل از نمونه برداری مایع تکان نخورد.

- بعضی از کارکنان ترجیح می‌دهند که مقدار کمی سولفات روی را به سطح لوله اضافه کرده، به نحوی که سطح مایع یک برآمدگی کوچک محدب شکل را تشکیل دهد و سپس یک لامل بر روی سطح آن قرار دهند. باید ۵' 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 یاخته‌های مشاهده شده در نمونه باید بوسیله روش رنگ آمیزی دائمی تأیید شوند. بعضی از تک یاخته‌ها کوچک بوده و تشخیص آنها با این مشکل می‌باشد.

باید حداکثر در فاصله زمانی ۵ 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 می‌باشد، به طوری که اگر کیست پروتوزوئرها و تخم کرم‌های 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 شناور سازی، به عنوان تنها روش تشخیصی استفاده می‌کنید، باید سطح مایع و هم رسوب آن را بررسی کنید تا مطمئن شوید که همه ارگانیسم‌ها را جدا نموده و تشخیص می‌دهید. به هر حال روش تغلیظ فرمالین- اتیل استات (اتر) لازم به بهترین روش جهت جداسازی و تشخیص تخم کرم‌ها، کیست، تک یاخته‌ها و می‌باشد.

روش استاندارد رسوب سازی (Sedimentation Standard Methods)

روش استاندارد فرمالین- اتیل استات (اتر)

جهت جدا سازی همه انواع تک یاخته‌ها، اووسیست‌ها، تخم کرم‌ها لاروها مناسب می‌باشد. در این روش ارگانیسم‌های سنگین‌تر در مقایسه با عناصر سبک‌تر محلول زوردرتر ته نشین می‌شود و علاوه بر مراحل سانتریفوژ، مراحل صاف کردن از بین بردن چربی را شامل می‌گردد. در مرحله صاف کردن قطعات بزرگ و مواد اضافی مدفوع به وسیله صاف کردن از طریق چند لایه گار مرطوب گرفته می‌شوند.

ترکیبات از بین برنده شامل اتر، اتیل استات، Hemo - De و یا ترکیبات گزین (Xylene) می‌باشد که چربی‌های مدفوع را حل کرده و مواد اضافی را شناور می‌سازد، اما به تخم کرم‌ها، لاروها و یا کیست پروتوزوئرها آسیبی نمی‌رساند. معمولاً در این روش تروفوزوئیت تک یاخته‌ها خراب شده و یا از بین می‌رود.

مناسب‌ترین روش تغلیظ استفاده از اتیل استات و ترکیبات دیگر مانند Hemo - De به جای اتر است که علت آن حفظ سلامتی افراد می‌باشد. این ترکیبات دقیقاً همان عمل اتر را انجام می‌دهند.

روش‌های تغلیظ را می‌توان روی نمونه‌های نگهداری شده در Polyvinyl Alcohol = PVA انجام داد، اما ممکن است در مرحله از بین بردن چربی، بعضی از ارگانیسم‌ها به خصوص پروتوزوئرها خراب شوند. بنابراین همان طور که در جزوه قبلی ذکر گردید بهتر است که عمل تغلیظ را روی نمونه‌های نگهداری شده در فرمالین و عمل رنگ آمیزی را روی نمونه‌های نگهداری شده در PVA انجام داد.

برای نمونه‌های آبکی باید استفاده از یک مرحله سانتریفوژ (۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰g) 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 می‌باشد).

مواد و معرف‌های لازم:

۱- مواد از بین برنده چربی مانند اتیل استات و

۲- فرمالین ۵ یا ۱۰ درصد بافر شده و یا Sodium Acetate - Acetic Acid - Formalin = SAF

نام و امضاء تایید کننده:	نام و امضاء تصویب کننده:

آزمایشگاه بیمارستان / مرکز بهداشت		دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران اداره امور آزمایشگاه‌های بهداشتی	
شماره سند: ۸-۳۹	تعداد صفحات: ۶: ۴	معتبر از تاریخ: ۸۸/۸/۱	زمان بازنگری: ۸۹/۸/۱
محدوده توزیع: انگل شناسی		شرح کلی: روش‌های استاندارد جهت تشخیص انواع انگل‌ها در مدفوع	

۳- NaCl ۰/۸۵٪

۴- محلول لوگل

روش کار:

۱- حدود ۴ گرم از مدفوع تازه را 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، به مدت ۳۰ دقیقه بماند اگر نمونه در محلول نگذارنده مانند فرمالین ۵ یا ۱۰ درصد و یا SAF گردیده است، آن را کاملاً مخلوط کنید.

۲- در رابطه با مقدار و قوام 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 لوله‌های مخصوص ساترifiوژ قرار دهید. شکل ته لوله باید به نحوی باشد که مقدار کافی رسوب (۱ml - ۰.۵ml) ایجاد کند. معمولاً ۸ میلی لیتر فرمالین و مدفوع آماده شده صاف می‌گردد. اگر نمونه در ماده نگهدارنده فرمالین یا SAF نگهداری شده است، 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 به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰g سانتریفوژ نمایید.

۴- روی محلول را خالی کنید، رسوب به دست آمده باید حدود ۰.۵ml تا ۱ml باشد. دوباره رسوب را در سرم فیزیولوژی به حالت سوسپانسیون درآورده و تا نوک لوله را پر نمائید و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰g سانتریفوژ نمایید.

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

۵- مایع روئی را خالی نموده و آن قدر 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، به مدت حداقل ۱۰ دقیقه بماند.

اگر مقدار رسوب ته لوله خیلی کم و یا نمونه اصلی مقدار زیادی موکوس باشد، مواد از بین برنده چربی را (مرحله ۶) اضافه ننمائید و به عوض آن مقداری فرمالین اضافه و آن را سانتریفوژ نموده و سپس مایع روئی 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 به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان دهید. لوله را طوری نگه دارید که چوب پنبه دور از صورت شما و یا همکاران باشد.

۷- ۱۵ تا ۳۰ ثانیه صبر کنید و سپس با دقت چوب پنبه را بردارید.

۸- آن را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰g سانتریفوژ کنید. بعد از سانتریفوژ ۴ لایه تشکیل می‌شود. اولین لایه کمی رسوب (حاوی انگل) است که در ته لوله تشکیل می‌شود. لایه بعد فرمالین می‌باشد و سپس آشغال‌های مدفوع روی لایه فرمالین قرار گرفته و بقیه مواد از بین برنده چربی در نوک لوله قرار می‌گیرد.

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

وقتی که از لوله‌های شیشه‌ای استفاده می‌کنید مایع خیلی راحت‌تر به ته لوله بر می‌گردد. اگر نمونه حاوی مقدار زیادی موکوس باشد مقدار سدیمان به حداقل می‌رسد در این حالت جهت خارج نمودن مایع روئی، لوله را وارونه نکنید. زیرا ممکن است همراه آن عمل رسوب را از دست بدهید. در این صورت مایع روئی را به وسیله پی‌پت پاستور و خارج نمائید.

	نام و امضاء تایید کننده:	نام و امضاء تصویب کننده:

آزمایشگاه بیمارستان / مرکز بهداشت		دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران اداره امور آزمایشگاه‌های بهداشتی	
شماره سند: ۸-۳۹	تعداد صفحات: ۶: ۵	معتبر از تاریخ: ۸۸/۸/۱	زمان بازنگری: ۸۹/۸/۱
محدوده توزیع: انگل شناسی		شرح کلی: روش‌های استاندارد جهت تشخیص انواع انگل‌ها در مدفوع	

۱۰- هنگامی که رسوب به ته لوله چسبیده و سفت است یک یا دو قطره سرم فیزیولوژی و یا فرمالین به آن اضافه نمائید. سپس مقدار کمی از آن را روی لام گذاشته و یک لامل با اندازه ۲۲×۲۲ روی آن قرار دهید. ممکن است از لامل با اندازه ۲۲×۴۰ هم استفاده نمود. اما معمولاً بیشتر از لامل ۲۲×۲۲ استفاده می‌شود.

۱۱- معمولاً ابتدا با بزرگ نمایی (×۱۰) تمام محدوده لامل را بررسی نمائید.

۱۲- اگر مورد مشکوکی مشاهده گردید از عدسی با بزرگ نمایی (×۴۰) برای بررسی بیشتر جزئیات استفاده کنید. حداقل ۱/۳ محدوده لامل را باید با عدسی با بزرگ نمایی (×۴۰) بررسی کنید، حتی اگر مورد مشکوکی مشاهده نگردید.

- اگرچه بعضی از افراد اطراف را به وسیله پارافین و مسدود کرده با عدسی با بزرگ نمایی (×۱۰۰) آن را بررسی می‌کنند. اما معمولاً این کار انجام نمی‌شود و تشخیص صحیح تک یاخته‌ها به وسیله تهیه لام رنگ آمیزی انجام می‌پذیرد.

۱۳- می‌توان 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 یاخته‌ها، اووسیست، تخم کرم‌ها و لاروها در آماده سازی با روش تغلیظ با تعداد بیشتری در مقایسه با روش مستقیم مشاهده گردند.

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

نکات قابل توجه:

- در تمامی مراحل روش کار استفاده از آب لوله کشی می‌تواند جایگزین استفاده از سرم فیزیولوژی گردد اما بعضی از کارکنان ترجیح می‌دهند که در تمام مراحل از فرمالین ۱۰٪ استفاده کنند.

به هر حال در مورد نمونه‌های 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 ارگانسیم‌های آلوده کننده‌ای که زندگی آزاد دارند در نمونه مشاهده گردیده اند.

- توصیه می‌شود که استفاده از اتیل استات جایگزین استفاده از اتر گردد. هم چنین استفاده از حلال‌های دیگر مانند Hemo – De که بی خطرتر از انواع دیگر بوده، توصیه می‌گردد.

- بعد از اینکه در مرحله آخر روش تغلیظ، مایع را خارج نمودید، در حالی که هنوز لوله وارونه است. کناره‌های 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 لوله‌های پلاستیکی استفاده می‌شود، مهم است. چون اگر این مواد وارد رسوب موجود در لوله گردد در زیر میکروسکوپ حباب‌هایی را ایجاد می‌کند که باعث می‌شود که مواد و عناصر مورد نظر پوشانده شوند و یا به سختی مشاهده گردند و هم چنین 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 نمونه‌ها در ماده نگهدارنده (SAF) نگهداری شوند، روش انجام آزمایش تغلیظ از مرحله ۲ شروع خواهد شد.

- اگر نمونه‌ها در (PVA) نگهداری شود مراحل ۱ و ۲ روش انجام آزمایش تغلیظ باید به شرح زیر اصلاح گردد. مدفوع و PVA را به وسیله 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 کیف گذاشته اید، به داخل لوله سانتریفوژ 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 می‌تواند بیان گر روش تغلیظ غیر صحیح باشد.

محدودیت‌های روش:

نام و امضاء تایید کننده:	نام و امضاء تصویب کننده:

آزمایشگاه بیمارستان / مرکز بهداشت		دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران اداره امور آزمایشگاه‌های بهداشتی	
شماره سند : ۸-۳۹	تعداد صفحات : ۶ : ۶	معتبر از تاریخ : ۸۸/۸/۱	زمان بازنگری : ۸۹/۸/۱
محدوده توزیع : انگل شناسی		شرح کلی : روش‌های استاندارد جهت تشخیص انواع انگل‌ها در مدفوع	

- تک یاخته‌های مشاهده شده در آزمایش مستقیم نمونه باید به وسیله روش رنگ آمیزی دائمی تایید شوند. بعضی از تک یاخته‌ها کوچک بوده و تشخیص آنها در آزمایش مستقیم نمونه مشکل می‌باشد و حتی اگر نوع انگل در آزمایش مستقیم تشخیص داده شود، جداسازی آن انگل با روش رنگ آمیزی دائمی، تشخیص را تایید می‌کند.

- مخصوصاً تایید تشخیص در مواردی که انگل انتاموباهیستولیتیکا جدا می‌گردد. بسیار مهم است که این امر در مورد انگل انتاموباکلی صدق نمی‌کند.

بعضی از ارگانیسیم‌ها مانند ژباردیا لامبلیا، تخم‌های کرم قلاب دار و بعضی مواقع تخم‌های کرم تریکوسفال ممکن است در روش تغلیظ انجام شده با مدفوعی که در PVA نگهداری شده به خوبی مدفوعی که در فرمالین نگهداری شده، حفظ نگردند، به هر حال در مواردی که آلودگی به انگل‌های فوق به میزان متوسط تا شدید باشد، این مشکل مشاهده می‌گردد. هم چنین شکل لاروهای استرونژیلوئیدس استرکورالیس و کیست‌های انتاموباکلی در نمونه تغلیظ شده مدفوعی که در OVA نگهداری شده به خوبی نمونه‌های نگهداری شده در فرمالین مشخص نمی‌باشند.

به طور معمول اووسیست ایزوسپورا بلی (*Isospora belli*) در رسوب نمونه تغلیظ شده مدفوعی که در PVA نگهداری نگردیده و تخریب می‌گردد.

	نام و امضاء تایید کننده:	نام و امضاء تصویب کننده: