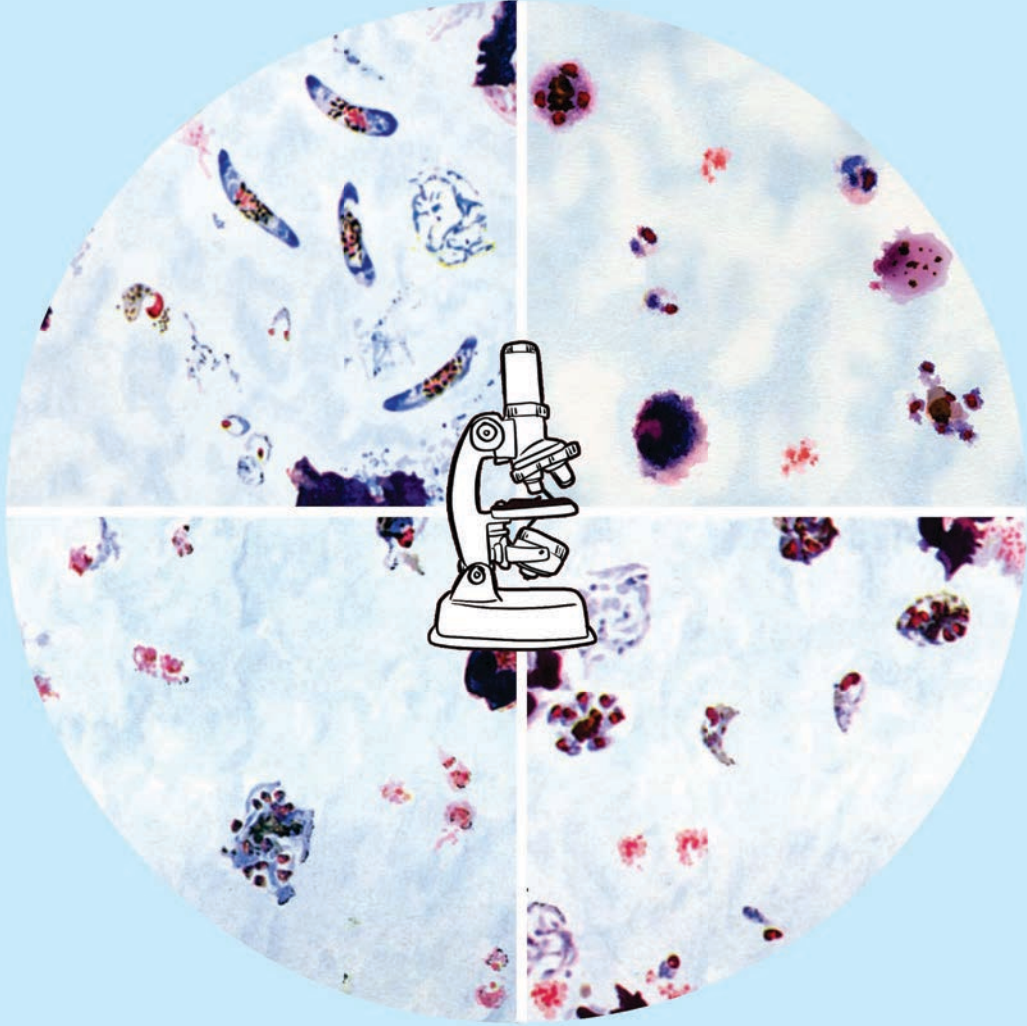


# औलो प्रयोगशाला म्यानुअल २०२१



नेपाल सरकार  
स्वास्थ्य तथा जनसंख्या मन्त्रालय  
स्वास्थ्य सेवा विभाग  
इपिडिमियोलोजी तथा रोग नियन्त्रण महाशाखा  
टेकु, काठमाडौं



पत्र संख्या: २०७८/७९  
च. नं.:

नेपाल सरकार  
स्वास्थ्य तथा जनसंख्या मन्त्रालय  
स्वास्थ्य सेवा विभाग  
इपिडिमियोलोजी तथा नियन्त्रण महाशाखा  
प्राक्कथन

फोन नं. ०१-४२५५७९६  
फ्याक्स: ०१-४२६२२६८  
Email: ewarsedcd@gmail.com  
Website: edcd.gov.np

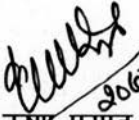
पचली, टेकु  
काठमाण्डौ, नेपाल

औलो प्लाज्मोडियमसँग सम्बन्धित परजीवीले गर्दा हुने रोग हो र यो संक्रमित पोथी एनोफिलिज (Anopheles) जातको लामखुट्टेको टोकाइबाट सर्दछ। औलोको रोकथाम र उपचार गर्न मिल्ने भए तापनि औलोले अझै विश्वभरिका मानिसको स्वास्थ्य र जीवनमा प्रभाव पारिरहेको छ।

नेपालमा औलो अझै पनि जनस्वास्थ्यको प्रमुख मुद्दाको रूपमा रहेको छ। यसले मुख्यतः ग्रामीण क्षेत्रमा बसोबास गर्ने विपन्न समुदायका मानिसहरू, सीमा क्षेत्रमा बसोबास गर्ने समुदाय, वन क्षेत्रको तटीय क्षेत्रका बासिन्दा र आप्रवासी समुदायलाई प्रभाव पार्दछ। त्यसैले समयमै निदान गरि प्रभावकारी उपचार गरि औलोलाई थप सर्न नदिन एकदमै महत्वपूर्ण छ।

त्यसकारण, "औलो प्रयोगशाला म्यानुअल" को प्रकाशन गर्नु पाउँदा हर्षित भएको छु। यस पुस्तकले निदानका विधिहरू, सञ्चालन प्रक्रियाहरू, आवश्यक सामग्रीहरू र मानक प्रोटोकलहरू सम्बन्धी सबै आवश्यक जानकारी प्रदान गर्नुका साथै औलो रोग, परजीवीको जीवविज्ञान, क्लिनिकल र प्याथोफिजियोलोजी, यसको निदान, व्यवस्थापनको साथै र रेकर्डिङ्ग र रिपोर्टिङ्ग सम्बन्धी विस्तृत जानकारी प्रदान गर्दछ।

म यस म्यानुअल तयारीको क्रममा संलग्न सबै प्राविधिक विज्ञहरूलाई आफ्नो अमूल्य सुझाव र टिप्पणीको लागि धन्यवाद दिन चाहन्छु। अन्तमा कीटजन्य रोग नियन्त्रण शाखाको अगुवाईमा म्यानुअल तयारीको क्रममा संलग्न सम्पूर्ण सरकारी तथा गैरसरकारी संस्था र विश्व स्वास्थ्य संगठनलाई हार्दिक धन्यवाद ज्ञापन गर्न चाहन्छु।

  
२०७८/४/२२  
डा. कृष्ण प्रसाद पौडेल  
निर्देशक



नेपाल सरकार  
स्वास्थ्य तथा जनसंख्या मन्त्रालय  
स्वास्थ्य सेवा विभाग

फोन नं. : ५३५२४२९  
फ्याक्स : ९७७-९-४२५२३७५  
इमेल : nphl@nphl.gov.np

## राष्ट्रिय जनस्वास्थ्य प्रयोगशाला


टेकु, काठमाडौं  
स्वास्थ्य तथा जनसंख्या मन्त्रालय  
राष्ट्रिय जनस्वास्थ्य प्रयोगशाला  
टेकु, काठमाडौं  
२०५०

प.सं.: २०७८/०७९  
च.नं.: १२६

### प्राक्कथन

यो महत्वपूर्ण प्रयोगशाला म्यानुअलको प्रकाशनमा केही शब्द लेख्न पाउँदा खुसी लागेकोछ । यो म्यानुअलले माइक्रोस्कोपी प्रशिक्षण तथा गुणस्तरीय औलो निदानमा सहयोग पुऱ्याउने छ । औलो निवारणमा गुणस्तरीय निदानको महत्वपूर्ण भुमिका रहेको हुदा यस म्यानुअलको प्रकाशनले तोकिएको सबै माइक्रोस्कोपिक केन्द्रहरू र प्रशिक्षण केन्द्रहरूलाई मार्गनिर्देशन प्रदान गर्दछ ।

म विश्वस्त छु, यस म्यानुअलले स्वास्थ्यकर्मीहरूले रक्त परीक्षण, त्यसको गुणस्तर सुनिश्चितता र गुणस्तर नियन्त्रणका साथै रेकर्डिङ्ग / रिपोर्टिङ्ग र सूचना प्रणालीमा मद्दत गर्नेछ । यस महत्वपूर्ण म्यानुअलको तयार गर्न टीमलाई नेतृत्व प्रदान गर्नु हुने इपिडिमियोलोजी तथा रोग नियन्त्रण महाशाखा र कीटजन्य रोग अनुसन्धान तथा तालिम केन्द्रका निर्देशकज्युहरूलाई बधाई दिन चाहन्छु ।

  
डा. रुणा भा  
निर्देशक



नेपाल सरकार  
स्वास्थ्य तथा जनसंख्या मन्त्रालय  
कीट जन्य रोग अनुसन्धान तथा तालिम केन्द्र  
विकास समिति  
हेटौंडा, मकवानपुर

पत्र संख्या : २०७८/०७९  
चलानी नं. :

फोन नं : ०५७ - ५२०५७२  
०५७ - ५२३९९६  
फ्याक्स : ०५७ - ५२९८२६  
इमेल : vbdrtc@mohp.gov.np

### प्राक्कथन

औलो प्रयोगशाला म्यानुअल प्रकाशित हुन लागेकोमा म एकदमै हर्षित छु । यो म्यानुअल तोकिएको सबै माइक्रोस्कोपिक केन्द्रहरू, प्रादेशिक जनस्वास्थ्य प्रयोगशालाहरू र राष्ट्रिय जनस्वास्थ्य प्रयोगशालाको लागि उपयोगी हुनुका साथै निर्देशिकाको काम गर्नेछ, जसमा आधारित भएर प्रयोगशालामा कार्यरत कर्मचारीहरूले प्रयोगशाला सम्बन्धित निदान, रेकर्डिङ र रिपोर्टिङ र विरामीको तत्कालै जानकारी गर्नेछन । साथै आधारभूत र पुनर्ताजगी माइक्रोस्कोपिक प्रशिक्षणका लागि यो पुस्तिका अत्यन्त उपयोगी हुनेछ । यो पुस्तिकाले प्रशिक्षणका सबै महत्वपूर्ण पक्षहरूलाई समेटेको छ जसले प्रशिक्षणका क्रममा देखिएको विविधतालाई कम गरी एक रूपता ल्याउने छ । यो पुस्तिकालाई सरकारी मात्र नभई निजी संस्थाहरूले पनि सन्दर्भ पुस्तिकाको रूपमा प्रयोग गर्न सक्नेछन् ।

अन्तमा, यस म्यानुअल तयार गर्न सहयोग पुर्याउनु हुने सम्पूर्ण म धन्यवाद ज्ञापन गर्न चाहन्छु ।

डा. यदु चन्द्र घिमिरे  
निर्देशक





पत्र संख्या: २०७८/७९  
च. नं.:

नेपाल सरकार  
स्वास्थ्य तथा जनसंख्या मन्त्रालय  
स्वास्थ्य सेवा विभाग  
राष्ट्रिय जनस्वास्थ्य प्रयोगशाला  
डेकु, काठमाण्डौ

## इपिडिमियोलोजी तथा रोग नियन्त्रण महाशाखा

फोन नं. ०१-४२५५७९६  
फ्याक्स: ०१-४२६२२६८  
Email: ewarsedcd@gmail.com  
Website: edcd.gov.np

पचली, टेकु  
काठमाण्डौ, नेपाल

### प्राक्कथन

इपिडिमियोलोजी तथा रोग नियन्त्रण महाशाखा, राष्ट्रिय जनस्वास्थ्य प्रयोगशाला, कीटजन्य रोग अनुसन्धान तथा तालिम केन्द्र साथै अन्य शैक्षिक संस्थाहरू, माइक्रोस्कोपिक केन्द्रहरू र प्राविधिक विज्ञहरूको प्रमुख भूमिकामा तयार गरिएको यस औलो प्रयोगशाला म्यानुअल प्रकाशन हुँदै गर्दा अत्यन्तै खुशी लागिरहेको छ। यो म्यानुअल माइक्रोस्कोपिक केन्द्रहरू र औलो माइक्रोस्कोपिक प्रशिक्षणमा भाग लिने वा माइक्रोस्कोपी गर्ने सबै प्रशिक्षकहरू र प्रशिक्षार्थीहरूलाई लक्षित गरिएको छ।

माइक्रोस्कोपी, माइक्रोस्कोपीमा संलग्न चरणहरू, परजीवीको पहिचान, परजीवीका विशेषताहरू र परजीवी गणना बारे सबै आधारभूत जानकारी प्रदान गर्नु यस म्यानुअलको उद्देश्य हो। यस म्यानुअलमा औलो विरामीको रेकर्डिङ्ग र रिपोर्टिङ्गका साथै तत्कालै सुचना प्रदान तथा गुणस्तर सुनिश्चितताको पाटो पनि समावेश गरेको छ। यसले सबै प्रयोगशालाकर्मिहरूलाई विश्व स्वास्थ्य संगठनको मानक प्रोटोकल र निर्देशिका अनुसारको गुणस्तरीय निदान सञ्चालन गर्न विस्तृत मार्गनिर्देशन प्रदान गर्नेछ।

यस म्यानुअल तयारीको लागि प्राविधिक सहयोग प्रदान गर्नु हुने सम्पूर्ण महानुभावहरूलाई धन्यवाद व्यक्त गर्न चाहन्छु।

डा. गोकर्ण देहाल

प्रमुख

एनटिडि तथा भिबिडि शाखा, इडिसिडी

यस औलो प्रयोगशाला म्यानुअल निर्माणमा संलग्न सबैलाई स्वास्थ्य तथा जनसंख्या मन्त्रालय, स्वास्थ्य सेवा विभाग हार्दिक कृतज्ञता व्यक्त गर्दछ । विषेशगरी विश्व स्वास्थ्य संगठन र म्यानुअल निर्माणमा संलग्न प्राविधिक समितिका सबै सदस्य तथा यसको तयारीका क्रममा विभिन्न चरणमा योगदान दिनुहुने सबैलाई हार्दिक आभार प्रकट गर्दछ ।

### योगदानकर्ताको सूची

१. डा. कृष्ण प्रसाद पौडेल, निर्देशक, इडिसिडी
२. डा. बासुदेव पाण्डे, पूर्व निर्देशक, इडिसिडी
३. डा. विवेक कुमार लाल, पूर्व निर्देशक, इडिसिडी
४. डा. रुणा भ्ना, निर्देशक, राष्ट्रिय जनस्वास्थ्य प्रयोगशाला
५. डा. यदु चन्द्र घिमिरे, निर्देशक, कीटजन्य रोग अनुसन्धान तथा तालीम केन्द्र
६. डा. प्रकाश शाह, पूर्व प्रमुख, एनटिडी तथा भिविडी शाखा, इडिसिडी
७. डा. विष्णु बहादुर बस्तेन, पूर्व निर्देशक, कीटजन्य रोग अनुसन्धान तथा तालीम केन्द्र
८. डा. गोकर्ण दहाल, प्रमुख, एनटिडी तथा भिविडी शाखा, इडिसिडी
९. श्री लिला विक्रम थापा, वरिष्ठ जनस्वास्थ्य अधिकृत, एनटिडी तथा भिविडी शाखा, इडिसिडी
१०. श्री उत्तम कोइराला, वरिष्ठ जनस्वास्थ्य अधिकृत, एनटिडी तथा भिविडी कन्ट्रोल सेक्सन, इडिसिडी
११. डा. सुभाष लाखे, एनपिओ-सिडिएस, विश्व स्वास्थ्य संगठन, नेपाल
१२. प्रा.डा. जिवन बहादुर शेरचन, पूर्व प्रमुख, माइक्रोबायोलोजी विभाग, त्रिभुवन विश्वविद्यालय टिचिङ्ग अस्पताल
१३. प्रा.डा. मेघ राज बन्जारा, पूर्व प्रमुख, माइक्रोबायोलोजी विभाग, त्रिभुवन विश्वविद्यालय
१४. प्रा.डा. बसुधा खनाल, बी.पी कोइराला स्वास्थ्य विज्ञान प्रतिष्ठान
१५. सहप्राध्यापक डा. रत्न बराल, माइक्रोबायोलोजी विभाग, बी.पी कोइराला स्वास्थ्य विज्ञान प्रतिष्ठान
१६. डा. राज कुमार महातो, पूर्व निर्देशक, राष्ट्रिय जनस्वास्थ्य प्रयोगशाला
१७. श्री धन प्रसाद पौडेल, मेडिकल टेक्नोलोजिष्ट, इडिसिडी
१८. श्री उत्तमराज प्याकुरेल, भिसिआइ, एनटिडी तथा भिविडी शाखा, इडिसिडी
१९. प्रादेशिक जनस्वास्थ्य प्रयोगशाला
२०. श्री शम्भु नाथ भ्ना, औलो निवारण कार्यक्रम
२१. डा. विजय बज्राचार्य, औलो निवारण कार्यक्रम
२२. डा. संजय आचार्य, औलो निवारण कार्यक्रम
२३. डा. निमा लामा, औलो निवारण कार्यक्रम
२४. श्री दिनेश कोइराला, औलो निवारण कार्यक्रम
२५. श्री रहचन घर्ती मगर, औलो निवारण कार्यक्रम
२६. श्री सुरेश भण्डारी, औलो निवारण कार्यक्रम

खण्ड १: परिचय: औलो रोग.....	१
१.१ पृष्ठभूमि .....	१
१.२ नेपालमा औलोको इतिहास र हालको अवस्था.....	१
१.३ राष्ट्रिय औलो रणनीतिक योजना .....	२
खण्ड २: परजीवी र क्लिनिकल जानकारी .....	३
२.१ औलोको कारक तत्व .....	३
२.२ जीवन चक्र .....	४
२.३ लामखुट्टेमा जीवन चक्र .....	५
२.४ औलोसँग जोडिएको सङ्केत, लक्षणहरू र प्याथोलोजी .....	६
२.५ औलोको उपचार .....	९
खण्ड ३: औलो निदानका विधिहरू (Malaria Diagnostic Tools) .....	११
३.१ औलो निदानको लागि आधारभूत विधिहरू .....	११
३.१.१ माइक्रोस्कोपी (Microscopy) .....	११
३.१.२ द्रुत निदान परीक्षण (Rapid Diagnostic Test) .....	१२
३.१.३ पोलिमरेज चेन रियाक्सन (Polymerase Chain Reaction) परीक्षणहरू .....	१३
खण्ड ४: औलो माइक्रोस्कोपी (Malaria Microscopy) .....	१४
४.१ माइक्रोस्कोपिक परीक्षणहरू .....	१४
४.२ माइक्रोस्कोप स्लाइडहरूको सफाई र भण्डारण.....	१५
४.२.१ स्लाइडहरूको सफाई .....	१५
४.२.२ औलो माइक्रोस्कोपी जाँचको लागि स्लाइडहरू .....	१५
४.२.३ स्लाइडहरू सफा गर्दा चाहिने सामग्रीहरू .....	१५
४.२.४ नयाँ स्लाइडहरू प्रयोग गर्दा सफा गर्ने तरिका.....	१६
४.३ औलो रगतको स्मीयरहरूको लेबलिङ्ग (Labelling malaria blood films) .....	१६
४.४ औलो परजीवि परीक्षणको लागि स्मीयर बनाउने तरिका (Blood Smear Preparation For Malaria Parasite) .....	१७
४.४.१ रगतको पातलो स्मीयर बनाउने तरिका (Preparation of Thin Blood Smear).....	१९
४.४.२ रगतको बाक्लो स्मीयर बनाउने तरिका (Preparation of Thick Blood Smear) .....	२०
४.५ रगतको स्मीयर बनाउँदा बारम्बार दोहोरिन सक्ने समस्याहरू .....	२२
४.५.१ रगतको स्मीयरको गलत अवस्थिति:.....	२२
४.५.२ अधिक मात्रामा रगत: .....	२२
४.५.३ थोरै मात्रामा रगत: .....	२२
४.५.४ गिजी (Greasy) स्लाइडहरू.....	२२
४.५.५ स्पेडर ९५उचभममभच०स्लाइडको किनारा खस्रो (Chipped) भएको .....	२३
४.६ रगतको स्मीयरहरू तयार वा भण्डारण गर्दा आउन सक्ने समस्याहरू .....	२३
४.७ जिम्सा स्टेनसँग रगतको स्मीयर रङ्गाउने तरिका .....	२३
४.७.१ जिम्साको वर्किङ्ग घोल (working solution) को तयारी .....	२३
४.७.२ बफर पानी (Buffered water) .....	२५
४.७.३ २% करेक्टिङ्ग फ्लुइडस (Correcting Fluids)बनाउने तरिका: .....	२७

४.७.४ जिम्सा स्टकको घोल र बफर पानी (buffered water) को गुणस्तर नियन्त्रण.....	28
४.७.५ जिम्सा स्टेनसँग रगतको स्मीयर (Blood Film) रङ्गाउने तरिका .....	३१
<b>खण्ड ५: सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Microscope) .....</b>	<b>३५</b>
५.१ सरल सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Simple microscope) .....	३६
५.२ कम्पाउण्ड सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Compound Microscope).....	३६
५.३ सुक्ष्मदर्शक यन्त्रका भागहरू (Parts of microscope) .....	३६
५.४ सुक्ष्मदर्शक यन्त्रको हेरचाह (Care of Microscope) .....	४०
५.५ सुक्ष्मदर्शक यन्त्र चलाउने तरिका (Handling of Microscope).....	४१
<b>खण्ड ६: रगत स्मीयरको जाच (Examining Blood Smear) .....</b>	<b>४२</b>
६.१ रगतमा पाइने विभिन्न तत्वहरू (Components of Blood) .....	४२
६.२ जिम्सा क्तबप्लप्लन गरिएको रगतको पातलो स्मीयर (Thin Blood Smear) .....	४२
६.३ जिम्सा क्तबप्लप्लन गरिएको रगतको बाक्लो स्मीयर (Thick Blood Smear).....	४६
६.४ रगतको स्मीयरहरूमा देखिने कृत्रिम तत्वहरू .....	४६
<b>खण्ड ७: माइक्रोस्कोपी स्लाइडको परीक्षण .....</b>	<b>४८</b>
७.१ औलो परजीवीहरूको पहिचानको लागि बाक्लो र पातलो रगतका स्मीयरहरूको माइक्रोस्कोपी स्लाइडको परीक्षण .....	४८
<b>खण्ड ८: औलो परजीविको लागि रगतको स्मीयर जाँच .....</b>	<b>५१</b>
८.१ औलो परजीविको चिनारी .....	५१
८.२ औलो परजीविको बनावटमा उज को असर .....	५१
८.३ औलो परजीविका विभिन्न अवस्थाहरू .....	५२
८.४ रगतको पातलो स्मीयरबाट देखिने परजीविका प्रजातीहरू .....	५३
<b>खण्ड ९: औलो परजीवीहरूको लागि रगतका स्मीयरहरूको नियमित परीक्षण .....</b>	<b>५६</b>
९.१ बाक्लो स्मीयर परीक्षण गर्ने .....	५६
९.२ पातलो स्मीयर परीक्षण गर्ने .....	५७
९.३ मिश्रित औला .....	५७
९.३.१ मिश्रित प्लाज्मोडियम संक्रमणका विशेषताहरू .....	५८
९.४ रगतको स्मीयर जाँच गर्दा देखिने Artefact हरू:.....	५९
९.४.१ दुसी (Fungus) .....	५९
९.४.२ हावाबाट सने Pollen / spore हरू: .....	५९
९.४.३ Dirt/Bacteria: .....	६०
९.४.४ प्रदुषित पानी : .....	६०
<b>खण्ड १० औलो परजीविको गणना .....</b>	<b>६१</b>
१०.१ बाक्लो स्मीयरमा गणना .....	६४
१०.१.१ महत्वपूर्ण बुँदाहरू .....	६४
१०.१.२ कसरी गणना गर्ने .....	६४
१०.२. पातलो स्मीयरमा गणना (COUNT ON THIN SMEAR) .....	६५
१०.२.१ महत्वपूर्ण बुँदाहरू .....	६५
१०.२.२ कसरी गणना गर्ने .....	६६
<b>खण्ड ११: नतिजाहरूको व्याख्या, रेकर्डिङ्ग र रिपोर्टिङ्ग .....</b>	<b>६९</b>
११.१ माइक्रोस्कोपी नतिजाहरूको रेकर्डिङ्ग र रिपोर्टिङ्ग .....	६९



११.२ केसको सूचना .....	71
११.२.१ औलो रोग सूचना प्रणाली (Malaria Disease Information System) .....	७१
११.२.२ औलोको रेकर्डिङ्ग, रिपोर्टिङ्ग र खोजपडताल (Surveillance) .....	७२
११.२.३ केसमा आधारित अनुसन्धान (Case based investigation) र फोसाई इन्भेष्टिगेसन (Foci investigation) ....	७२
११.३ जिल्ला स्वास्थ्य सूचना प्रणाली @ (DHIS-2).....	७३
खण्ड १२: औलो माइक्रोस्कोपी प्रयोगशालामा अपनाउनुपर्ने सुरक्षाका प्रक्रियाहरू .....	७५
खण्ड १३: औलो निदानमा गुणस्तर सुनिश्चितता र गुणस्तर नियन्त्रण सुनिश्चितता .....	७८
खण्ड १४: सुपरिवेक्षण र अनुगमन .....	८१
सन्दर्भ सामग्रीहरू (REFERENCES)	१०८

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

- मानवलाई लाग्ने औलो रोगको संक्रामक तत्व (infectious agent) बारे वर्णन गर्न
- औलोको इतिहास र नेपालमा औलोको हालको अवस्था बारे वर्णन गर्न
- राष्ट्रिय औलो रणनीतिक योजना, औलो निवारणको लागि गर्नुपर्ने कार्यहरू र आइपने चुनौतीहरू

## १.१ पृष्ठभूमि

औलो नेपालको प्राथमिकतामा पर्ने एक प्रमुख जनस्वास्थ्य समस्या हो । नेपालमा ४०% भन्दा बढी जनसंख्या अझै पनि औलोको जोखिममा छ । मुख्यतः प्रभावकारी र सफल औलो कार्यक्रमले गर्दा औलोको जोखिममा रहेको जनसंख्या र क्षेत्र विगतका वर्षहरूमा घट्दै गएको छ । सन् २०१९ को कुल औलोका बिरामीहरू मध्ये १३१ (१८%) औलोका बिरामीहरूलाई मात्र स्थानीय (indigenous) औलोको रूपमा वर्गीकरण गरिएको थियो भने ५७९ (८२%) औलोका बिरामीहरूलाई आयातित (imported) औलोको रूपमा वर्गीकरण गरिएको थियो । स्थानीय औलोका बिरामीहरू विगतका वर्षहरूमा कम हुँदै गएका छन् जसले गर्दा स्थानीय स्तरमा औलो सार्ने प्रक्रियालाई अवरोध गर्न सजिलो भएको छ । सन् २०१९ को सूक्ष्मस्तरीकरण (microstratification) अनुसार नेपालमा उच्च जोखिम वडाहरू १५ वटा जिल्लाहरूमा, मध्यम जोखिम वडाहरू १८ वटा जिल्लाहरूमा र कम जोखिम वडाहरू ६७ वटा जिल्लाहरूमा रहेका छन् । २,६८६ वडाहरूमा बसोबास गर्ने १२,४८५,५८४ जनसंख्या औलोको जोखिममा छन् जुन कुल जनसंख्याको ०.६७% (४७ वटा वडाहरू) उच्च जोखिम वडाहरूमा रहेको छ; ३.१९% (१५१ वटा वडाहरू) मध्यम जोखिम वडाहरूमा, ३७.९% (२,४८८ वटा वडाहरू) कम जोखिम वडाहरूमा र जनसंख्याको ५८.२% (४,०५७ वडाहरू) जोखिम रहितमा बसोबास गर्छन् । यी उपलब्धिहरूको साथ देशले अहिलेसम्म पाएको उपलब्धिहरूलाई अझ सशक्त बनाउने, स्थानीय स्तरमा औलो नसार्ने दिनको लागि गरिएको प्रयासहरूलाई तीव्र पार्ने, स्थानीय औलोलाई सन् २०२२ सम्ममा शुन्य केस पुऱ्याई समाप्त गर्ने र सन् २०२५ सम्ममा औलोको निवारण गर्ने लक्ष्य लिएको छ ।

## १.२ नेपालमा औलोको इतिहास र हालको अवस्था

नेपालमा पहिलो पटक औलो नियन्त्रण परियोजनाको सुरुवात सन् १९५४ मा युएसएड (USAID) को सहयोगमा भएको थियो । सो परियोजनाको उद्देश्य मुख्य गरी मध्य नेपालको तराई भेगमा औलोको अध्ययन गर्ने थियो । सन् १९५८ मा राष्ट्रिय औलो उन्मूलन कार्यक्रम सुरु गरियो जसको उद्देश्य निर्धारित समय अवधिमा औलोलाई देशबाट उन्मूलन गर्ने थियो । सन् १९७८ मा विभिन्न कारणहरूले गर्दा सो उन्मूलनको अवधारणालाई नियन्त्रण कार्यक्रम मै फर्काइयो । सन् १९९८ मा औलो नियन्त्रण कार्यक्रमलाई नयाँ रूप दिने विश्व स्वास्थ्य संगठनको आह्वानलाई अनुसरण गर्दै घना वनजङ्गलहरू, तल्लो पहाडी भेग र भित्री तराई र पहाडको उपत्यका क्षेत्रहरू (जहाँ ७०% भन्दा बढी औलोका बिरामीहरू छन्) मा रहेको औलोको दीर्घ समस्यालाई सम्बोधन गर्नको लागि Roll Back Malaria (RBM) को सुरुवात गरियो । औलो सार्ने लामखुट्टेहरूको उपलब्धता, स्वदेश तथा विदेशबाट जनसंख्याको आवतजावत, जोखिमयुक्त समुह, उपयुक्त तापक्रम र सामाजिक-आर्थिक कारकहरूले औलो लाग्ने जोखिम निर्धारण गर्छ ।

पछिल्लो तीन दशकमा औलोका बिरामीहरूको प्रवृत्तिले उतारचढाव देखाउँछ । सन् १९८५ मा औलोका बिरामीहरूको संख्या ४२,३२१ नाघ्दा यो चुलिएको थियो र यसले अहिलेसम्म कै रेकर्ड भएको औलोका बिरामीहरूको उच्च भार (case-load) को प्रतिनिधित्व गर्दछ । यसपछि अहिलेसम्म हरेक वर्ष यो एकदमै धेरै घटिरहेको छ तर बीचमा केही प्रमुख प्रकोपहरू भने भएका छन् । पछिल्लो प्रकोप सन् २००६ मा बाँकेको गाँउहरूमा भएको थियो जसमा ३६ जनाको मृत्यु भएको थियो । एक दशक भित्रमा कुल पुष्टि भएको औलोको बिरामीहरूको संख्या ९०% भन्दा बढीले घटेको छ (सन् २००२ मा १२,७५० बिरामीहरू थिए भने सन् २०१९/२० मा ७१० बिरामीहरू थिए) । त्यस्तै सन् २०११ देखि २०१६ सम्ममा केही मृत्युहरू (प्रायः आयातित औलोका बिरामीहरूको) रिपोर्ट गरिएको छ । सन् २०१६ मा औलोबाट भएका सबै ३ मृत्युहरू अफ्रिका र भारतबाट आयात भएको थियो । सन् २०१९ मा ~९०% औलोका बिरामीहरूमा प्लाज्मोडियम भाइभेक्स (*Plasmodium vivax*) ले गर्दा औलो भएको थियो र ~१०% औलोका बिरामीहरूमा मात्र प्लाज्मोडियम फाल्सिपारम (*Plasmodium falciparum*) ले गर्दा औलो भएको थियो । प्लाज्मोडियम भाइभेक्सका बिरामीहरूको सापेक्ष अनुपात बढिरहेको छ, सन् २०१० मा ~७०% थियो भने सन् २०१९ मा ९१% थियो । प्लाज्मोडियम फाल्सिपारमको अनुपात चाँहि त्यस अनुरूप घटिरहेको छ, सन् २०१० मा ~३०% थियो भने सन् २०१९ मा ९% थियो । आयातित औलोका बिरामीहरूको अनुपात बढ्ने क्रममा छ जसले गर्दा वर्तमान औलो निवारण कार्यक्रमको लागि यो एक प्रमुख चुनौतीको रूपमा रहेको छ (१) ।

### १.३ राष्ट्रिय औलो रणनीतिक योजना

राष्ट्रिय औलो रणनीतिक योजना (२०१४-२०२५) को विकास सन् २०२५ सम्ममा नेपाललाई औलोमुक्त बनाउने परिकल्पनाका साथ गरिएको थियो । सन् २०२० मा अध्यावधिक गरिएको राष्ट्रिय औलो रणनीतिक योजनाको विकास बहुसरोकारवाला र सहभागीतामूलक तरिकाबाट विभिन्न विज्ञहरूको सुझाव सहित गरिएको छ । प्राविधिक कार्यदल (Technical Working Group) र नेपाल सरकारद्वारा यो लागू गरिएको छ र सबै तहमा सम्प्रेषण भइरहेको छ । राष्ट्रिय औलो रणनीतिक योजना २०१४-२०२५ (अध्यावधिक संस्करण २०२०) को लक्ष्य र उद्देश्यहरू यस प्रकार छन् :

#### लक्ष्य :

सन् २०२२ सम्ममा स्थानीय (indigenous) औलोका बिरामीहरूको संख्यालाई शून्यमा पुऱ्याउने र औलोको मृत्युदरलाई शून्य कायम राख्ने ।

#### उद्देश्यहरू :

१. प्रभावकारी निर्णय लिनको लागि औलोको खोजपड्ताल (Surveillance) र रणनीतिक सूचना सुदृढीकरण गर्ने ।
२. औलो जोखिमयुक्त क्षेत्रहरूमा कीटजन्य नियन्त्रणका उपायहरू (interventions) को प्रभावकारीता सुनिश्चित गर्ने ।
३. औलोको गुणस्तरीय निदान तथा प्रभावकारी उपचारमा सबैको पहुँच सुनिश्चितता गर्ने ।
४. औलो निवारणका लागि समुदायस्तरमा नेतृत्व विकास र सहयोगको लागि वकालत गर्ने तथा त्यसलाई निरन्तरता दिने ।
५. औलो निवारण कार्यक्रमका लागि सम्बन्धीत प्राविधिक तथा व्यवस्थापकीय क्षमता सुदृढीकरण गर्ने ।

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

- प्लाज्मोडियम (*Plasmodium*) परजीवीको वर्गीकरण र औलो परजीवीको जीवन चक्र (Life cycle) बुझ्नु
- औलोको सङ्केत, लक्षणहरू र प्याथोलोजी
- उपचार

### २.१ औलोको कारक तत्व

औलो ज्यान जोखिममा पार्ने एक रोग हो जुन सामान्यतया: संक्रमित एनोफिलिज (*Anopheles*) जातको लामखुट्टेको टोकाइबाट सर्दछ। संक्रमित लामखुट्टेले प्लाज्मोडियम परजीवीलाई बोक्ने गर्छ र जब लामखुट्टेले मानिसलाई टोक्दछ, तब यो मानिसको रगतमा प्रवेश गर्छ। मानिसमा हुने औलो मुख्यतः ४ प्रजातीका परजीवीहरूबाट हुने गर्दछ : प्लाज्मोडियम फाल्सिपारम (*Plasmodium falciparum*), प्लाज्मोडियम भाइभेक्स (*Plasmodium vivax*), प्लाज्मोडियम ओभली (*Plasmodium ovale*) र प्लाज्मोडियम मलेरी (*Plasmodium malariae*)। प्लाज्मोडियम प्रजातिको पाँचौँ सदस्य प्लाज्मोडियम नलेसी (*P. knowlesi*) हो जसले बाँदरबाट मानिसमा संक्रमण गराउँदछ।

प्लाज्मोडियम नलेसी सबैभन्दा पहिले बाँदरहरूमा पत्ता लगाइएको थियो। अलि पछि यो परजीवी मानिसहरूमा भेटियो। अधिकांश परजीवीहरू मलेसिया- खासगरी बोर्नियोको टापू (island of Borneo) बाट रिपोर्ट गरिएको छ। यस परजीवीको रूप र आकृति प्लाज्मोडियम फाल्सिपारम र प्लाज्मोडियम मलेरीसँग मिल्छ जसले गर्दा यसको निदान गर्ने उचित तरिका माइक्रोस्कोपी होइन।

### औलो परजीवीहरू

औलो प्लाज्मोडिया (*Plasmodia*) नामक प्रोटोजोअन (protozoan) परजीवीको कारणले हुने गर्दछ। सो परजीवी parasitic phylum *Apicomplexa* अन्तर्गत पर्ने गर्दछ। प्लाज्मोडियमका २०० भन्दा बढी प्रजातिहरू पहिचान गरिएको छ र तिनीहरू सरीसृपहरू (reptiles), चराहरू र स्तनधारी जीवहरू (mammals) का परजीवी हुन्। मानव औलो लगाउनको लागि प्लाज्मोडियमका चार प्रजातिहरू प्लाज्मोडियम फाल्सिपारम (*Plasmodium falciparum*), प्लाज्मोडियम भाइभेक्स (*Plasmodium vivax*), प्लाज्मोडियम ओभली (*Plasmodium ovale*) र प्लाज्मोडियम मलेरी (*Plasmodium malariae*) परिचित छन्। प्लाज्मोडियमको पाँचौँ प्रजाति प्लाज्मोडियम नलेसी (*P. knowlesi*) ले दक्षिण एसियाका धेरै देशहरूमा मानव संक्रमण गराएको कुरा हालसालै अभिलेख गरिएको छ।

### Phylogenetic Trees of Plasmodia

**Phylum:** Protozoa

**Subphylum:** Apicomplexa

**Class:** Sporozoa **Subclass:** Coccidia

**Order:** Coccidiida **Suborder:** Haemosporina

**Family:** Plasmodiidae

**Genus:** Plasmodia

**Subgenera:** Plasmodium, Laverania

**Species:** (affecting man)

**Quartan group:** *P. (Plasmodium) malariae*, *P. (P.) brasilianum*

**Benign tertian group:** *P. (P.) vivax*, *P. (P.) cynomolgi*, *P. (P.) cynomolgi bastianellii*

**Malignant tertian group:** *P. (Laverania) falciparum*

**Ovale group:** *P. (P.) ovale*, *P. (P.) simium*

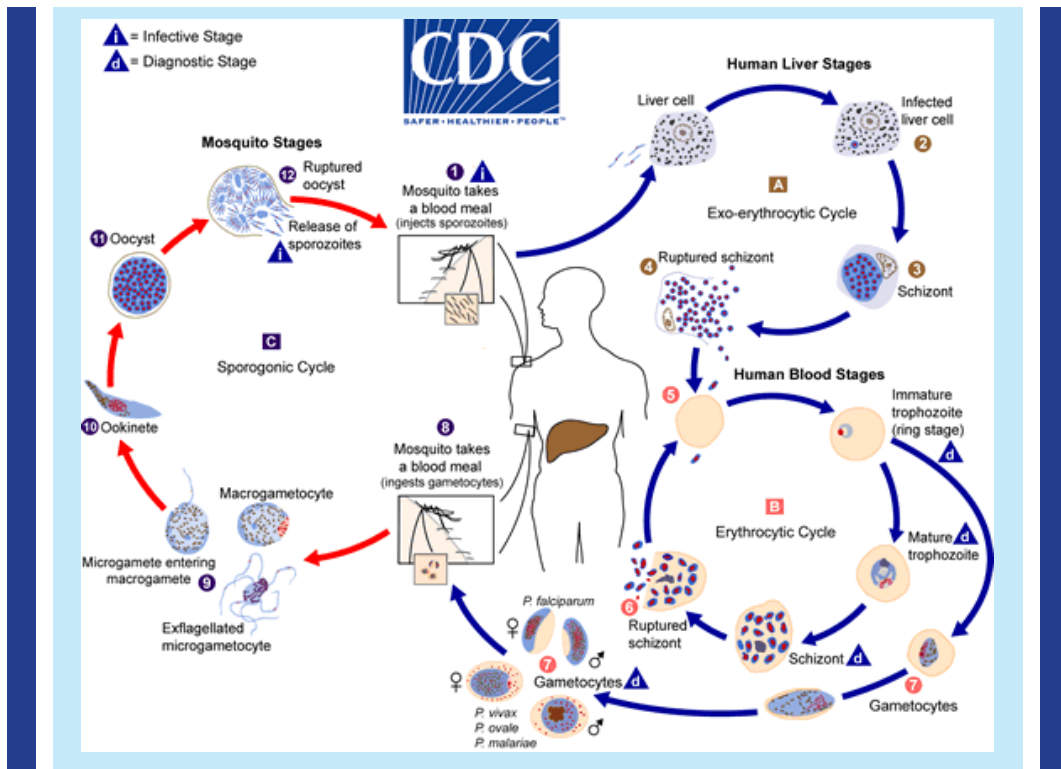
**Knowlesi group:** *P. (P.) knowlesi*

## २.२ जीवन चक्र

औलो परजीवीको जीवन चक्र जटिल हुन्छ जसमा कीटजन्यमा लामखुट्टे र जीव (मानव) विच चक्र रहन्छ । लामखुट्टेले मानिसलाई टोक्ने बेलामा सो परजीवी थुकसँगै मानिसको शरीरमा प्रवेश गर्दछ र पहिले कलेजोमा मेरोगोनी (merogony) को एक चक्र पार गर्छ र त्यसपछि रातो रक्तकोषहरूमा मेरोगोनी (merogony) को थुप्रै चक्र पार गर्छ । मेरुदण्ड भएको जीव (Vertebrate host) को शरीरमा ग्यामेटोगोनी (gametogony) सुरु हुन्छ र लामखुट्टे भित्र सकिन्छ जसमा स्पोरोगोनी (sporogony) हुन्छ ।

क) कलेजोमा हुने चरण (Liver Stage) : लामखुट्टेले मानिसलाई टोक्दा स्पोरोज्वाइटहरू (sporozoites) थुक सँगै मानिसको शरीरमा प्रवेश गर्दछ र त्यसपछि मानवमा संक्रमण सुरु हुन्छ । ती स्पोरोज्वाइटहरू (sporozoites) रक्तसञ्चार प्रणाली भित्र प्रवेश गर्छन् र ३०-६० मिनेट भित्र मै कलेजोको कोषलाई आक्रमण गर्छन् । कलेजोको कोष (Hepatocyte) लाई आक्रमण गरिसकेपछि परजीवीमा असेक्सुअल (asexual) विभाजन हुन्छ जसलाई एकजोइराइथ्रोसाइटिक (exoerythrocytic) अथवा प्रिइराइथ्रोसाइटिक साइजोगोनी (pre-erythrocytic schizogony) भनिन्छ । साइजोगोनी (Schizogony) चरणमा परजीवीको साइटोप्लाजम (cytoplasm) विभाजन नभई पटक पटक न्युक्लियर (nuclear) विभाजन भई मेरोज्वाइट (Merozoites) बन्दछ र सो मेरोज्वाइट कलेजोको कोष (Hepatocyte) फुटिसकेपछि रक्तसञ्चार प्रणालीमा निस्कन्छ ।

प्लाज्मोडियम भाइभेक्स (*Plasmodium vivax*) र प्लाज्मोडियम ओभली (*Plasmodium ovale*) मा केही स्पोरोज्वाइटहरू (sporozoites) तुरुन्त असेक्सुअल (asexual) विभाजन नभई हिप्नोज्वाइट (hypnozoite) भन्ने निष्क्रिय चरणमा प्रवेश गर्छ । यो हिप्नोज्वाइट (hypnozoite) पुनः सक्रिय हुन सक्छ र प्रारम्भिक (primary) संक्रमण भएको धेरै हप्ता, महिना वा वर्ष पछि साइजोगोनी (schizogony) हुनसक्छ, फलस्वरूप फेरि औलो दोहोरिन सक्छ ।



चित्र: मानव र भेक्टरमा हुने प्लाज्मोडियम जातको जीवन चक्र (Life Cycle of *Plasmodium* species in human and vectors)



ख) रगतमा हुने चरण (Blood Stage) : संक्रमित कलेजोको कोषहरूबाट निस्किएको मेरोज्वाइटहरू (merozoites) ले रातो रक्तकोषहरूलाई आक्रमण गर्छ । रातो रक्तकोषहरू भित्र पसेपछि यो बिस्तारै बढ्छ र ट्रोफोज्वाइट (trophozoite) बन्छ । सुरुको ट्रोफोज्वाइट (trophozoite) ring आकारको हुन्छ । ट्रोफोज्वाइट (trophozoite) बन्ने क्रममा परजीवीले जीवको कोषिकाको साइटोप्लाजम (cytoplasm) लाई खान्छ र हेमोग्लोबिनलाई एमिनो एसिड (amino acids) मा टुक्र्याउँछ । हेमोग्लोबिन खाएपछि एक किसिमको पिग्मेन्ट (pigment) निस्कन्छ जसलाई हिमोज्वाइन (hemozoin) भनिन्छ । रगतमा हुने चरणको परजीवीको विशिष्ट विशेषताको रूपमा यी सुनौलो खैरो-कालो दानाहरू लामो समय देखि परिचित छन् ।

न्युक्लियर (Nuclear) विभाजनले ट्रोफोज्वाइट (trophozoite) चरणको अन्त्य र साइजोन्ट (schizont) चरणको सुरुवात जनाउँछ । इराइथ्रोसाइटिक साइजोगोनी (Erythrocytic schizogony) मा ३ देखि ५ चक्र न्युक्लियर (Nuclear) विभाजन हुन्छ र त्यसपछि बडिङ्ग (budding) प्रक्रिया हुन्छ । साइजोन्टहरू (schizonts) को विकासको अन्तिम चरणमा प्रत्येक मेरोज्वाइट (merozoites) छुट्टिन्छ र त्यसलाई सेग्मेन्टर (segmenters) भनिन्छ । जीवको रातो रक्तकोष फुटेर मेरोज्वाइटहरू (merozoites) निस्कन्छ । यी मेरोज्वाइटहरूले नयाँ रातो रक्तकोषहरूलाई आक्रमण गर्छन् र साइजोगोनी (schizogony) को अर्को चक्र सुरु हुन्छ । संक्रमित रातो रक्तकोषहरू फुटेपछि र परजीवीको एन्टिजेन (antigens) र विकार वस्तु (waste products) निस्किसँगै औलो बिरामीमा बिराई बिराई ज्वरो आउँछ । प्लाज्मोडियम फाल्सिपारमको रगतमा हुने चरणको साइजोगोनी (schizogony) अरु मानव औलो परजीवीहरूको भन्दा फरक हुन्छ । यसमा ट्रोफोज्वाइट (trophozoite) र साइजोन्ट (schizonts) द्वारा संक्रमित रातो रक्तकोषहरू क्यापिलरी (capillary) को इन्डोथेलियल (endothelial) कोषहरूसँग टाँसिएर बस्छन् र खुला रूपमा रक्तसञ्चारमा भेटिँदैन । यो अंगमा लुकेर बस्न सक्ने भएकोले यसले मस्तिष्कको औलो लगाउन सक्ने सम्भावना हुन्छ ।

ग) सेक्सुअल (Sexual) चरण : साइजोगोनी (schizogony) को विकल्पको रूपमा केही परजीवीहरूले सेक्सुअल (sexual) चक्र पार गर्छन् र माइक्रो (micro-) वा म्याक्रोग्यामेटोसाइटहरू (macrogametocytes) मा छुट्टिन्छन् । ग्यामेटोसाइटहरूले मानिसमा केही गर्दैन र लामखुट्टेले लगेन भने यो रक्तसञ्चारबाट हराएर जान्छ ।

### २.३ लामखुट्टेमा जीवन चक्र

लामखुट्टेले मानिसको रगत खाने क्रममा ग्यामेटोसाइटहरू लिइसकेपछि ग्यामेटोजेनेसिस (Gametogenesis) अथवा माइक्रो (micro) र म्याक्रोग्यामेटहरू (macrogametes) बन्ने प्रक्रिया सुरु हुन्छ । लामखुट्टेले खाएपछि माइक्रोग्यामेटोसाइटले न्युक्लियर (nuclear) विभाजनको तीन चक्र पार गर्छ र त्यस पश्चात माइक्रोग्यामेटोसाइटबाट निस्किएको फ्लाजेला (flagella) सँग जोडिन्छ । म्याक्रोग्यामेटोसाइट परिपक्व भएर म्याक्रोग्यामेट बन्छ ।

माइक्रोग्यामेटहरू स्थिर रहँदैन । यो एक ठाउँबाट अर्को ठाउँमा तैरिँदै जान सक्छ र सो क्रममा म्याक्रोग्यामेटहरूसँग मिलेर त्यसबाट जाइगोट (zygote) बन्छ । यो प्रक्रिया भएको १२-२४ घण्टा भित्रमा ओकाइनिट (ookinete) को विकास हुन्छ । यो चरण आक्रामक चरण हो । यो ओकाइनिटको चुच्चो भाग हुन्छ जसले लामखुट्टेको पेटको कोष र पेटको इपिथेलियम (epithelium) लाई चिरेर भित्र छिर्छ ।

क) **स्पोरोगोनी (Sporogony)** : लामखुट्टेको पेट भित्र ओकाइनिटहरू ओसिष्ट (oocyst) मा परिवर्तन हुन्छन् । सो ओसिष्टहरूले असेक्सुअल (asexual) विभाजन गरी हजारौं स्पोरोज्वाइटहरू (sporozoites) को उत्पादन गर्छ । प्रजाति र तापक्रमको आधारमा स्पोरोगोनी प्रक्रियाको लागि साधारणतया १० देखि २८ दिन लाग्छ । परिपक्व भएपछि ओसिष्ट फुट्छ र स्पोरोज्वाइटहरू निकाल्छ र यो लामखुट्टेको पेटलाई चिरी ज्याल ग्रन्थी (salivary glands) सम्म पुग्छ । लामखुट्टेले रगतको आहारा लिने क्रममा सो स्पोरोज्वाइटहरू मानव शरीरमा छिर्छ र फेरि आफ्नो जीवन चक्र सुरु गर्छ र संक्रमणको सुरुवात हुन्छ ।

## २.४ औलोसँग जोडिएको सङ्केत, लक्षणहरू र प्याथोलोजी

औलोसँग सम्बन्धित प्याथोलोजी, क्लिनिकल सङ्केत र लक्षणहरू विशेषतः परजीवीहरूको असेक्सुअल इराइथ्रोसाइटिक (asexual erythrocytic) चरणको कारणले गर्दा हुन्छ । टिस्यु साइजोन्टहरू (Tissue schizonts) र ग्यामेटोसाइटहरूले थोरै प्याथोलोजी गराउँछ (यदि भयो भने) । प्लाज्मोडियम संक्रमणमा ४८ वा ७२ घण्टाको फरकमा ज्वरो (periodic fever paroxysms) आउँछ । सो आक्रमणको गम्भिरता प्लाज्मोडियमको प्रजाति साथै संक्रमित व्यक्तिको प्रतिरक्षा प्रणाली, स्वास्थ्य र पोषणको अवस्था आदिमा भर पर्छ । औलो एक दीर्घ रोग हो जुन केही महिना वा वर्षमा फेरि दोहोरिने सम्भावना हुन्छ ।

औलो सर्ने सबैभन्दा प्रमुख तरिका लामखुट्टेको टोकाइबाट हो । रक्तदानबाट वा सिरिन्जहरू एकआपसमा साट्टा पनि औलो संक्रमित व्यक्तिबाट सर्न सक्छ । संक्रमित रगत यसरी सर्दा लक्षण देखिने समय छोटो हुनसक्छ किनकी त्यसमा कलेजोमा हुने चरण हुँदैन । यसरी सरेको प्लाज्मोडियम फाल्सिपारममा मृत्युको जोखिम बढी हुन्छ । प्लाज्मोडियम भाइभेक्स वा प्लाज्मोडियम ओभलीको संक्रमणमा कलेजोमा हुने चरण नहुने हुँदा यी संक्रमणमा औलो फेरि दोहोरिँदैन । जन्मजात औलो सरेको अभिलेख पनि छ तर साल (placenta) को गम्भीर संक्रमण भए तापनि यसलाई अरु भन्दा दुर्लभ नै मानिन्छ ।

संक्रमित लामखुट्टेले टोकेपछि औलोको लक्षणहरू प्रायः १० देखि १५ दिन भित्रमा देखा पर्न थाल्छन् । स्पोरोज्वाइट मानिसको शरीरमा छिरेपछि प्रिपेटेन्ट (prepatent) र इन्क्युबेसन (incubation) को समय प्रजाति अनुसार फरक पर्छ (तलको तालिकामा देखाए अनुसार) । प्रिपेटेन्ट (Prepatent) समय भनेको मानिसको शरीरमा स्पोरोज्वाइट छिरेपछि र रगतमा परजीवीहरू देखा पर्ने बीचको समय हो र यसले कलेजोमा हुने चरणको समय अवधि र उत्पादन भएको मेरोज्वाइटहरू (merozoites) को संख्याको प्रतिनिधित्व गर्छ । इन्क्युबेसन (Incubation) समय अलिक लामो हुन्छ र मानिसको शरीरमा स्पोरोज्वाइट छिरेपछि र लक्षणहरूको सुरुवात बीचको समयलाई जनाउँछ । कहिलेकाँही प्लाज्मोडियम भाइभेक्स (*P. vivax*), प्लाज्मोडियम ओभली (*P. ovale*) र प्लाज्मोडियम मलेरी (*P. malariae*) मा इन्क्युबेसन समय कैयौं महिना सम्मको हुनसक्छ । सबै चार प्रजातिहरूले पहिलो पटक ज्वरो आउनु केही दिन अघि फलु जस्तो लक्षणहरू देखाउन सक्छन् । यस अन्तर्गत टाउको दुख्नु, हल्का ज्वरो आउनु, मांशपेशी दुख्नु, खान मन नलाग्नु (anorexia), बाकवाकी लाग्नु र शरीरमा ऊर्जा नहुनु (lassitude) पर्दछन् । यी लक्षणहरू परजीवीहरूको संख्यामा निर्धारण हुन्छ ।

एकजोइराइथ्रोसाइटिक साइजोगोनी र प्रिपेटेन्ट र इन्क्युबेसन समय				
	पी. फाल्सिपारम	पी. भाइभेक्स	पी. ओभली	पी. मलेरी
प्रिपेटेन्ट समय (दिनमा)	६-९	८-१२	१०-१४	१५-१८

एकजोइराइथ्रोसाइटिक साइजोगोनी र प्रिपेटेन्ट र इन्क्युबेसन समय				
	पी. फाल्सिपारम	पी. भाइभेक्स	पी. ओभली	पी. मलेरी
इन्क्युबेसन समय (दिनमा)	७-१४	१२-१७	१६-१८	१८-४०
मेरोज्वाइट परिपक्व हुने (दिनमा)	५-७	६-८	९	१२-१६
मेरोज्वाइट उत्पादन हुने (दिनमा)	४०,०००	१०,०००	१५,०००	२०००

माथिका यी लक्षणहरू पछि ज्वरोको आक्रमण (febrile attack) आउँछ जसलाई मलेरियल प्यारोक्सिजम (malarial paroxysms) भनिन्छ । यी लक्षणहरू पी. भाइभेक्स, पी. ओभली र पी. फाल्सिपारममा ४८ घण्टाको फरकमा आउँछ र पी. मलेरीमा ७२ घण्टाको फरकमा आउँछ । पी. फाल्सिपारममा यो परजीवीले देखाउने लक्षण निश्चित समयमा नभई लगातारको ज्वरो, दैनिक वा बिराई बिराई लक्षणहरू देखा पर्ने (जस्तै ३६-४८ घण्टाको फरकमा) हुन्छ । बिरामीहरूले औलाको ज्वरोको आक्रमण आउँदा सो अवधिमा स्प्लीनोमेगाली (splenomegaly), हेपाटोमेगाली (hepatomegaly) (हल्का जन्डिस) र रक्तअल्पता देखाउन सक्छन् ।

पी. नलेसीको दैनिक (quotidian) चक्र हुन्छ र जाँच गरेन भने यसले एकदमै छिटो प्राणघातक रूप लिन सक्छ । यो बाँदरबाट सर्ने भएकोले बाँदर र मानिसको बासस्थान सँगै हुँदा एकअर्कालाई सार्न सक्छन् । मलिकुलर प्रविधि (molecular techniques) यो जातको परजीवीको संक्रमण पत्ता लगाउनको लागि, इपिडिमियोलोजी वर्णन गर्नको लागि र मिश्रित संक्रमणलाई पहिचान गर्नको लागि धेरै उपयोगी छ ।

मलेरियल प्यारोक्सिजम (Malarial paroxysm)		
चिसो चरण (cold stage)	तातो चरण (hot stage)	पसिना आउने चरण (sweating stage)
<ul style="list-style-type: none"> <li>अति चिसो महसुस गर्नु</li> <li>लगलग काम्नु (vigorous shivering)</li> <li>१५-६० मिनेट सम्म रहन्छ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>अति तातो</li> <li>सुख्खा जल्ने छाला</li> <li>टाउको दुख्नु (throbbing headache)</li> <li>२-६ घण्टा रहन्छ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>धेरै पसिना आउनु (profuse sweating)</li> <li>तापक्रम कम हुँदै जानु</li> <li>थाक्नु र कमजोर हुनु-- सुत्नु</li> <li>२-४ घण्टा रहन्छ</li> </ul>

मलेरियल प्यारोक्सिजम (Malarial paroxysm) (माथिको तालिका हेर्नुहोस्) प्रायः ४-८ घण्टा रहन्छ र बिरामीलाई अचानक चिसो लाग्न थाल्छ । बिरामीको तापक्रम उच्च हुँदा पनि उसले अति चिसो महसुस गर्छ । यसलाई प्रायः चिसो चरण (cold stage) भनिन्छ र यसमा बिरामी चिसोले लगलग काम्छ । यो चरण पछि तुरुन्तै तातो चरण (hot stage) आउँछ । यसमा बिरामीले अति तातो महसुस गर्छ साथसाथै अति टाउको दुख्ने पनि हुन्छ । तातो चरणमा थकान, चक्कर लाग्नु, खान मन नलाग्नु (anorexia), मांशपेशी दुख्नु (myalgia) र वाकवाकी लाग्न सक्छ । त्यसपछि धेरै पसिना आउन (profuse sweating) सुरु हुन्छ र ज्वरो कम हुन थाल्छ । बिरामी थाकेर कमजोर महसुस गर्छ र प्रायः सुत्ने गर्छ । बिरामी सुतेर उठेपछि उसले प्रायः राम्रो र हलुका महसुस गर्छ तर ऊ थाकेको भने हुन्छ । अर्को प्यारोक्सिजम (paroxysm) सुरु नभए सम्म उसले अरु कुनै लक्षणहरू देखाउँदैन ।

प्रजाति अनुसार यी लक्षणहरूको गम्भीरता र समय अवधि फरक पर्छ (तलको तालिका हेर्नुहोस्) । सामान्यतया रोगको गम्भीरता विभिन्न प्रजातिले देखाउने औसत र अधिकतम परजीवीको संख्या (parasitemia) सँग सम्बन्धित हुन्छ । पी. फाल्सिपारमले गम्भीर र प्राणघातक संक्रमण गर्न सक्छ भने अरु प्रजातिहरू विरलै प्राणघातक हुन्छन् । पी. भाइभेक्सको संक्रमण भएका बिरामीहरू, खासगरी पहिलो पटक भएकाहरू एकदमै बिरामी हुन सक्छन् । तर पी. भाइभेक्सले विरलै जटिलता वा मृत्यु गराउँछ । कहिलेकाँही भने पी. भाइभेक्सको संक्रमणमा गम्भीर औलो पनि देखिएको छ । पी. भाइभेक्समा हिप्नोज्वाइट (hypnozoites) को सक्रियता कैयौं वर्षसम्म हुन सक्ने भएकोले औलो फेरि दोहोरिन सक्छ । पी. ओभली सबैभन्दा मन्द हुन्छ जसमा प्यारोक्सिजम (paroxysm) हल्का र छोटो अवधिको हुन्छ र औलो फेरि दोहोरिने सम्भावना प्रारम्भिक संक्रमण पछि एक वर्ष भन्दा बढी विरलै हुन्छ । पी. मलेरीले प्रायः हल्का रोग लगाउँछ तर सुरुको प्यारोक्सिजम (paroxysm) मध्यम देखि गम्भीर प्रकृतिको हुन सक्छ । यो सबैभन्दा दीर्घ (chronic) हुन्छ र प्रारम्भिक संक्रमणको कैयौं दशक पछि पनि यो फेरी फर्किएको (recrudescence) अभिलेख गरिएको छ । यो दीर्घता (chronicity) कहिलेकाँही मृगौलाको जटिलता (renal complications) सँग जोडिन्छ । जीवले प्रतिरक्षात्मक क्षमता विकास गरेपछि मलेरियल प्यारोक्सिजम (malarial paroxysm) कम गम्भीर र अनियमित हुन थाल्छ । तर यो प्रतिरक्षात्मक क्षमताले जीवनभर औलोबाट सुरक्षा दिँदैन, यसमा लक्षणहरू भन्दा संक्रमण लामो समय सम्म रहन्छ र व्यक्तिमा औलो फेरि दोहोरिन सक्छ । यदि उपचार गरेन भने सबै प्रकारका औलोहरू दीर्घ हुन सक्छन् ।

रोगको गम्भीरता र समयावधि						
	भाइभेक्स	ओभली	मलेरी	फाल्सिपारम		
प्रारम्भिक प्यारोक्सिजम (paroxysm) को गम्भीरता	मध्यम देखि गम्भीर	हल्का	मध्यम देखि गम्भीर	गम्भीर		
औसत परजीवीको संख्या (mm <sup>3</sup> )	२०,०००	९,०००	६,०००	५०,०००-५००,०००		
अधिकतम परजीवीको संख्या (mm <sup>3</sup> )	५०,०००	३०,०००	२०,०००	२,५००,०००		
लक्षणहरूको अवधि (उपचार नगरेको)	३-८+ हप्ता	२-३ हप्ता	३-२४ हप्ता	२-३ हप्ता		
अधिकतम संक्रमणको अवधि (उपचार नगरेको)	५-८ वर्ष	१२-२० महिना	२०-५०+ वर्ष	६-१७ महिना		
रक्तअल्पता	++	+	++	++++		
जटिलता			मृगौला सम्बन्धी (renal)	मस्तिष्क सम्बन्धी (cerebral)		

तल देखाइएको केही थप विशेषताहरूले तिनीहरूले लगाउने रोगको विशेषता देखाउँछ ।

विशेषताहरू	पी. भाइभेक्स	पी. ओभली	पी. मलेरी	पी. फाल्सिपारम
रातो रक्तकोषमा हुने चक्र (घण्टा)	४८ (जति)	४८	७२	४८
मेरोज्वाइटहरूको संख्या प्रत्येक परिपक्व भएको रातो रक्तकोष	२४ सम्म	८-१०	१०-१२	८-३२ रगतमा खुला रूपमा विरलै

विशेषताहरू	पी. भाइभेक्स	पी. ओभली	पी. मलेरी	पी. फाल्सिपारम
साइजोनमा				देखिन्छ
ग्यामेटोसाइटको देखा पर्ने समय (दिन)	०-५	५	५-२३	८-१५
प्रारम्भिक संक्रमण पछि औलो फेरि दोहोरिने समय	८-१० हप्ता वा ३०-४० हप्ता वा ८ वर्ष सम्म	५३ वर्ष सम्म	५३ वर्ष सम्म	औलो फेरि दोहोरिँदैन
मेरोज्वाइटहरू रातो रक्तकोषहरू भित्र छिर्ने	विशेष गरी भर्खरका नयाँ रातो रक्तकोषहरू भित्र छिर्ने	प्रायः नयाँ रातो रक्तकोषहरूलाई संक्रमण गर्ने	प्रायः पुराना रातो रक्तकोषहरूलाई आक्रमण गर्ने	सबै चरणको रातो रक्तकोषहरू भित्र छिर्ने

### औलोका अरु सङ्केत र लक्षणहरू (Other manifestations of Malaria)

खासगरी बालबालिकाहरूमा मस्तिष्क औलो (cerebral malaria) पछि कहिलेकाँही नशासँग सम्बन्धित खराबीहरू (neurologic defects) हुन सक्छ। यसले गर्दा चालमा समस्या, बोल्नमा समस्या, बहिरोपन र अन्धोपन पनि पर्दछ।

- पी. फाल्सिपारमसँगको लगातार संक्रमण (recurrent infections) ले गम्भीर रक्तअल्पता गराउन सक्छ। यो खासगरी ट्रपिकल अफ्रिकाका बालबालिकाहरूमा हुने गर्छ जसलाई बारम्बार संक्रमण भएको हुन्छ र जसको उपचार पर्याप्त भएको हुँदैन।
- गर्भावस्थाको बेला भएको औलो (खासगरी पी. फाल्सिपारम) ले आमामा गम्भीर रोग लगाउन सक्छ र समय अगावै बच्चाको जन्म हुने अथवा कम तौलको बच्चा जन्मन सक्छ।
- पी. मलेरीको दीर्घ वा दोहोरिइरहने संक्रमणले दीर्घ तथा गम्भीर मृगौलाको रोग हुन सक्छ।

### २.५ औलोको उपचार

औलोको उपचारको लागि राष्ट्रिय औलो उपचार पद्धति (National malaria treatment protocol (NMTP) तयार गरिएको छ।

#### क) प्लाज्मोडियम भाइभेक्स: Plasmodium vivax

प्लाज्मोडियम भाइभेक्सको लागि क्लोरोक्वीन (Chloroquine) चक्की चिकित्सकको सल्लाहमा दिइन्छ। यसलाई जम्मा 25 mg/kg को आधारमा ३ दिनको लागि दिने गरिन्छ। क्लोरोक्वीनको डोजलाई पहिलो दिन 10mg/kg, दोश्रो दिन 10mg/kg र तेश्रो दिन 5mg/kg दिइन्छ।

प्लाज्मोडियम भाइभेक्सको पूर्ण रूपमा उपचारको लागि प्राइमाक्वीन (Primaquine) चक्की चिकित्सकको सल्लाहमा दिइन्छ। यसलाई 0.25mg/kg प्रत्येक दिन १४ दिनको लागि दिने गरिन्छ। प्राइमाक्वीन (Primaquine) चक्की सुरु गर्नु अघि G6PD को परीक्षण गर्नुपर्छ। यदि बिरामीमा G6PD को कमी छ भने निगरानीमा 0.25 mg/kg प्राइमाक्वीन (Primaquine) चक्की दिनुपर्छ। बिरामीलाई प्राइमाक्वीनको प्रतिकूल असरहरू बारे परामर्श दिनुपर्छ। प्राइमाक्वीनका प्रतिकूल असरहरू मध्ये सबैभन्दा हुने गम्भीर असर रातो रङ्गको पिसाब (hematuria) देखिनु हो। यदि पिसाब रातो भयो भने प्राइमाक्वीनलाई रोकेर चिकित्सकको तुरुन्त सल्लाह लिनुपर्छ।



माथि उल्लेखित औषधिहरू र खाने तरिका पी. मलेरी र पी. ओभलीबाट हुने औलोको उपचारको लागि पनि प्रयोग हुन्छ ।

ख) प्लाज्मोडियम फाल्सिपारम: **Plasmodium falciparum**

प्लाज्मोडियम फाल्सिपारमलाई दुई वा दुई भन्दा बढी औषधिको प्रयोग (combination therapy) बाट उपचार गरिनुपर्छ । प्लाज्मोडियम फाल्सिपारमको उपचारको लागि Artemisinin-based Combination Therapy (ACT) को प्रयोग गरिन्छ । राष्ट्रिय औलो उपचार पद्धतिमा प्रयोग भएको ACT को निश्चित डोज Artemether 20mg/Lumefantrine 120 mg को संयोजन अनुसार फाल्सिपारमको उपचार गरिन्छ । Artemether र Lumefantrine औलोका औषधिहरूको प्रयोगबाट मानव शरीरका रातो रक्तकोषहरूमा हुने परजीवीहरूको वृद्धि हुन दिँदैन । यसको लागि जम्मा ६ डोजको ३ दिनको औषधि उपचार सिफारिस गरिएको छ ।

थप विवरण औलो उपचार चार्ट अनुसूची १ मा प्रस्तुत गरिएको छ ।

## खण्ड ३: औलो निदानका विधिहरू (Malaria Diagnostic Tools)

औलोको चाँडो निदान र शीघ्र र प्रभावकारी उपचार औलो निवारणको लागि आधारभूत तत्वहरू हुन् साथै औलो लाग्ने दर र औलोबाट हुने मृत्युदर घटाउनको लागि यसको एकदमै महत्वपूर्ण भूमिका छ।

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

- औलो निदानको लागि आधारभूत विधिहरू (standard tools) बारे थाहा पाउन
- निदानका विधिहरूको उपयोगिता र सीमितता (limitations)
- निदानका मलिकुलर विधिहरू (Molecular diagnostic tools)

### ३.१ औलो निदानको लागि आधारभूत विधिहरू

विश्व स्वास्थ्य संगठनका अनुसार औलोको उपचार सुरु गर्नु अगाडि गुणस्तर सुनिश्चित गरिएको निदान सामग्रीद्वारा औलो परजीवीको परिक्षण गरिएको हुनुपर्दछ जुन माइक्रोस्कोपी वा RDT बाट गर्न सकिन्छ। केही विशेष परिस्थितिहरूमा जस्तै: उपचारको असफलता (treatment failure) वा परजीवीको घनत्व निर्धारण गर्नपरेमा माइक्रोस्कोपी विधि नै प्रयोग गरिन्छ।

राष्ट्रिय औलो उपचार पद्धतिले सबै शंकास्पद औलो बिरामीहरूको सुनिश्चितता रक्त परीक्षणद्वारा गर्ने भनिएको भए तापनि शंकास्पद औलो बिरामीहरूको केही संख्या “क्लिनिकल औलो” को रूपमा स्वास्थ्य सूचना व्यवस्थापन प्रणाली (Health Information Management Systems (HMIS)) मा अभै पनि देखिँदै आएको छ। औलोका लक्षणहरू (ज्वरो आउनु, काम्नु, पसिना आउनु, टाउको दुख्नु, मांशपेशी दुख्नु, बाकवाकी लाग्नु र बान्ता गर्नु, थकान) प्रायः औलोमा मात्र देखिने भन्ने हुँदैन र यी लक्षणहरू अरु रोगहरूमा पनि देखिन्छ। क्लिनिकल संकेत र लक्षणहरूका आधारमा मात्र गरिएको निदानले औलोको सही निदान नहुन सक्छ। यदि प्रयोगशाला परीक्षण बिना क्लिनिकल निदान गरियो भने निम्न लिखित कुराहरू हुन सक्छ :

- औषधिको अनावश्यक प्रयोगले गर्दा औलोको औषधिहरूको प्रतिरोध (antimalarial drug resistance) विकास हुने सम्भावना बढाउँछ
  - औषधिहरूको प्रतिकुल असर हुने
  - खर्च बढ्ने
  - औलो बाहेक अन्य कारणबाट हुने ज्वरोको निदान हुन नपाउने
- क्लिनिकल औलोको रिपोर्टिङ्ग स्वास्थ्य सूचना व्यवस्थापन प्रणालीमा गरिन्छ।

#### ३.१.१ माइक्रोस्कोपी (microscopy)

औलो रोगको निदानका लागि माइक्रोस्कोपी सबैभन्दा विश्वसनीय विधि हो। यसले औलोका विभिन्न परजीवीहरू (पी. फाल्सिपारम, पी. भाइभेक्स, पी. मलेरी र पी. ओभली), तिनीहरूको विभिन्न अवस्था (जस्तै: ग्यामेटोसाइट), घनत्व सहितको पहिचान र उपचार परिणामको अनुगमनका लागि मद्दत पुऱ्याउँदछ। त्यसैले यसको छनौट उपचारको असफलता (treatment failure) को अध्ययनका लागि गरिन्छ। औलो माइक्रोस्कोपीको लागि जिम्सा (Giemsa) प्रयोग गर्नु पर्दछ र बाक्लो र पातलो दुवै रक्तनमुना परीक्षण गर्नुपर्दछ। माइक्रोस्कोपी आधारभूत निदान विधि हो जसद्वारा अरु विधिहरूको गुणस्तरीयता तुलना गर्न सकिन्छ।

माइक्रोस्कोपी आधारभूत निदान विधि भएता पनि गुणस्तरीय निदानको लागि प्राविधिकहरूको दक्षतामा निर्भर भएकोले प्राविधिकहरूले आवश्यक तालिम नलिएको अवस्थामा प्रजातिको पहिचान र गणना गलत हुने सम्भावना रहन्छ । त्यसैले यसका लागि केन्द्र देखि स्थानीय स्तरका सबै स्वास्थ्य संस्थाहरूसम्म गुणस्तरीय प्रयोगशाला सामग्री, दक्ष जनशक्ति र गुणस्तर सुनिश्चितता कायम हुनु अत्यावश्यक छ ।

### ३.१.२ द्रुत निदान परीक्षण (Rapid Diagnostic Test)

द्रुत निदान परीक्षण इम्युन क्रोम्याटोग्राफिक (immune-chromatographic) परीक्षण हो जुन औलो परजीवीको एन्टिजेन (antigens) पत्ता लगाउन गरिन्छ । RDTs व्यावसायिक रूपमा विभिन्न स्वरूपहरूमा उपलब्ध छन् जस्तै: डिपस्टिकहरू, क्यासेटहरू वा कार्डहरू । द्रुत निदान परीक्षण गर्न र नतिजा प्राप्त गर्न तुलनात्मक रूपमा सरल छ । तिनीहरूलाई विद्युत वा विशेष उपकरण चाहिँदैन । शंकास्पद बिरामीहरूको परीक्षणको लागि RDTs को प्रयोग गर्दा औंला घोचेर वा हातको नशाबाट निकालिएको रगतको प्रयोग गरी तोकिएको मानक सञ्चालन प्रक्रियाहरू (SOPs) को पालना गर्नुपर्छ ।

RDTs ले औलो परजीवीले उत्पादन गर्ने एन्टिजेन (antigens) (प्रोटिनहरू) पत्ता लगाउँछन् हालै संक्रमित व्यक्तिहरू पत्ता लगाउन मद्दत गर्छ । यी RDTs बाट दुई प्रजाति पी. फाल्सिपारम र पी. भाइभेक्स पत्ता लगाउन सकिन्छ । विभिन्न कारणले माइक्रोस्कोपी उपलब्ध नहुँदा RDT को प्रयोगले मानव औलोको निदान गर्न उपयोगी भूमिका खेल्छ ।

गुणस्तरीय RDT माइक्रोस्कोपीको बहुमूल्य पूरक हो किनभने यसले परजीवीमा आधारित निदान जये र औलोको उपचारको लागि क्लिनिकल निदानको प्रयोग घटाउनलाई सहयोग गर्छ । RDTs खास गरी दुर्गम ठाउँमा प्रकोप/महामारीको अनुसन्धान गर्नको लागि उपयोगी हुन्छ ।



राष्ट्रिय औलो नियन्त्रण कार्यक्रममा प्लाज्मोडियम एन्टिजेन (antigen) पत्ता लगाउने द्रुत निदान परीक्षणको सफलतापूर्वक सुरुवात गरिएको छ । माइक्रोस्कोपी सम्भव नभएका उपस्वास्थ्य चौकीहरू र स्वास्थ्य चौकीहरू सम्म RDTs को उपलब्धताले औलोको छिटो निदानमा पहुँच बढेको सुनिश्चित गर्छ । यद्यपि क्लिनिकल व्यवस्थापकीय निर्णयहरू लक्षण/संकेत र प्रयोगशाला नतिजा

(माइक्रोस्कोपी/RDTs) दुवैमा आधारित हुनुपर्छ ।

राष्ट्रिय औलो उपचार पद्धतिले सन् २००९ तिर नै उच्च जोखिमयुक्त जिल्लाहरूका उपस्वास्थ्य चौकीहरू/स्वास्थ्य चौकीहरूमा पी. फाल्सिपारम र पी. भाइभेक्सको निदानको लागि bi-valent RDTs सुरु गरेको थियो र त्यो अहिले पनि सञ्चालनमा छ । RDTs को कभरेज अहिले देशभर छ । माइक्रोस्कोपिक सुविधा नभएको र दक्ष प्राविधिक नभएको अवस्थामा औलो निदानको लागि RDT प्रभावकारी विधि हो । यद्यपि RDT को औलो परजीवी पत्ता लगाउने क्षमता विभिन्न किट

अनुसार फरक पर्न सकछ । विश्व स्वास्थ्य संगठनको मापदण्ड पूरा गरेका RDTs ले २०० परजीवीहरू/ $\mu\text{l}$  परजीवीसम्म पत्ता लगाउने क्षमता राखदछन् । कुनै RDT ले एउटा मात्र प्रजाति (पी. फाल्सिपारम) पत्ता लगाउन सकछ भने कुनैले परजीवीको अरु प्रजातिहरू पनि पत्ता लगाउन सकछ जस्तै: प्यान (PAN) (पी. भाइभेक्स, पी. मलेरी र पी. ओभली) ।

नेपालमा खास गरी औलो प्रभावित क्षेत्रमा निदानको लागि एन्टिबडी (antibodies) पत्ता लगाउनु उपयोगी छैन किनकी देशका कतिपय भागहरूमा अझै औलोको प्रभाव छ जहाँ एन्टिबडी (antibodies) मानिसहरूको रगतमा उल्लेखनीय तहमा घुमिरहेको हुन सकछ तर परीक्षणको बेला उनीहरूमा सक्रिय संक्रमण नहुन सकछ । त्यसैले एन्टिबडी (antibody) मा आधारित परीक्षणहरू औलोको बिरामीको व्यवस्थापनमा प्रयोग गर्नको लागि उपयुक्त छैन ।

### ३.१.३ पोलिमरेज चेन रियाक्सन (Polymerase Chain Reaction) परीक्षणहरू

निदानका मलिकुलर विधिहरू (Molecular diagnostic tools) जस्तै पोलिमरेज चेन रियाक्सन (Polymerase chain reaction (PCR)) को प्रयोग गरेर परजीवीको वंशाणुगत तत्व (genetic material) पत्ता लगाउन सकिन्छ । पीसीआर (PCR) अति संवेदनशील हुन्छ । यसले १ परजीवी/ $\mu\text{l}$  पत्ता लगाउन सकछ भने ultrasensitive PCR ले न्यूनतम परजीवीहरू/ $१०००\mu\text{l}$  पत्ता लगाउन सकछ । पीसीआरले सबै पाँच वटै प्रजातिहरू छुट्याउन सक्ने क्षमता राखछ ।

पीसीआर पहिलो लाइनको निदान होइन । यो जहिले पनि रगतका स्मीयरहरूको पूर्ण परीक्षण पछि अथवा पातलो र बाक्लो रगतका स्मीयरहरूबाट गरिने माइक्रोस्कोपी निदानसँगै प्रयोग गर्नुपर्छ । औलोको शंका भएकाहरू तर रगतको स्मीयरबाट नेगेटिभ देखिएकाहरूको पुष्टि प्रायः पीसीआरले गर्दछ । मिश्रित संक्रमणको निदान गर्नको लागि पनि यो एकदमै काम लाग्छ साथै यसले परजीवीको कम घनत्व भएको अवस्थामा पनि औलो पत्ता लगाउन सकदछ । तर यसको प्रयोग औलोको नियमित केस व्यवस्थापनका लागि गरिँदैन । यसको प्रयोग अध्ययन अनुसन्धान जस्तै: Therapeutic Drug Efficacy र अन्य इपिडिमियोलोजिकल र इन्टोमोलोजिकल अनुसन्धानमा गरिन्छ । PCR को माइक्रोस्कोपी भन्दा थप फाइदाहरू छन् । यसले न्यून संख्यामा भएका परजीवीलाई पत्ता लगाउन सकछ साथै लक्षण नदेखिएका बिरामीहरू, पुरानो नमुनाहरू वा पोष्ट मार्टम नमुनाहरू पत्ता लगाउने क्षमता राखछ ।

हाल औलोको पीसीआर परीक्षणको लागि इपिडिमियोलोजी तथा रोग नियन्त्रण महाशाखासँगको समन्वयमा राष्ट्रिय जनस्वास्थ्य प्रयोगशाला, शुक्रराज ट्रपिकल तथा सरुवा रोग अस्पताल र कीटजन्य रोग अनुसन्धान तथा तालिम केन्द्र सम्पर्कको केन्द्र भएका छन् ।

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

- औलो माइक्रोस्कोपीका किसिमहरू बारे जान्न
- माइक्रोस्कोप स्लाइडहरूको सफाइ र भण्डारण गर्न
- औलो परजीवीको स्मीयरहरूको लेबलिङ्ग
- औलो परजीवीको लागि रगतको स्मीयरको तयारी
- जिम्सा स्टेनद्वारा रगतको स्मीयर रङ्गाउने तरिका
- जिम्सा स्टेनको घोल र बफर पानीको गुणस्तर नियन्त्रण

#### ४.१ माइक्रोस्कोपिक परीक्षणहरू

माइक्रोस्कोपिक परीक्षणहरूमा परजीवीको स्टेनिङ्ग र माइक्रोस्कोपमा परजीवीको प्रत्यक्ष दृश्यावलोकन गर्न सकिने भएकोले यसलाई आधारभूत विधिको रूपमा प्रयोग गरिन्छ । अधिकांश अवस्थाहरूमा (क्लिनिकल प्रयोगशाला देखि फिल्ड सर्वेक्षण सम्म) औलोको निदानको लागि बाक्लो र/वा पातलो रगतका स्मीयरहरूमा परजीवीको प्रत्यक्ष माइक्रोस्कोपिक दृश्यावलोकन गर्ने विधि प्रयोग गरिँदै आएको छ । औलो निदानको लागि राम्ररी तयार गरिएको र राम्रोसँग स्टेनिङ्ग गरिएको रगतका स्मीयरको जाँच विश्वसनीय विधिको रूपमा रहेको छ । औलो निदानको लागि प्रयोग हुने माइक्रोस्कोपिक विधिहरू निम्न लिखित छन् ।

- माइक्रोस्कोपी
- जिम्साद्वारा रङ्गाइएको बाक्लो र पातलो स्मीयर
- एक्रिडिन अरेन्ज (Acridine orange) द्वारा रङ्गाइएको पातलो स्मीयर
- क्वान्टिटेटिभ बफी कोट एस्से (Quantitative Buffy Coat Assay)

औलो परजीवीहरूको सबैभन्दा सरल र छिटो छरितो परीक्षण पेरिफेरल स्मीयर (peripheral smear) द्वारा गरिन्छ । औलोको निदानका लागि जिम्साले स्टेन गरिएको रगतको स्मीयरमा रातो रक्तकोषहरू भित्र रहेका औलो परजीवीहरूलाई पहिचान गर्न माइक्रोस्कोपी उत्तम विधि मानिन्छ । प्लाज्मोडियम परजीवीहरूको परीक्षणको लागि बाक्लो स्मीयरहरू पातलो स्मीयरहरू भन्दा २०-४० गुणा बढी संवेदनशील हुन्छन् जसको पहिचान गर्ने सीमा माइक्रोस्कोपिष्टहरूको दक्षता अनुसार १०-५० परजीवीहरू/μl हुने गर्दछ । बाक्लो स्मीयरहरूले औलोको परजीवी तथा प्रजातिहरूको पहिचान गर्न साथै मिश्रित संक्रमणको पत्ता लगाउन, परजीवीहरूको संख्यालाई गणना गर्न र परजीवीहरूको विभिन्न चरणको उपस्थिति मूल्याङ्कन गर्न मद्दत गर्छ । पातलो स्मीयरहरू प्रजातिहरूको पहिचान गर्न, संक्रमणको चरण, परजीवीको गणना गर्न (विशेष गरेर बाक्लो स्मीयरमा परजीवीहरू असंख्य रूपमा भएको बेला) उपयोगी हुन्छ ।

र माइक्रोस्कोपीले RDT भन्दा बढी समय लिन्छ । स्मीयरको तयारी पछि परीक्षणको लागि २०-६० मिनेट लाग्छ जुन स्टेनिङ्ग, SoPs र माथि उल्लेखित अन्य कारकहरूमा भर पर्छ । नेगेटिभ नतिजा रिपोर्ट गर्नु अगाडि, बाक्लो र पातलो दुवै स्मीयरमा १०००× को लेन्समा कमसेकम १०० फिल्डको परीक्षण गरिनुपर्छ जसको संवेदनशीलता (sensitivity) ९०% वा सो भन्दा बढी हुन्छ ।

*माइक्रोस्कोपिक स्लाइडको सफाइ, लेबलिङ्ग र रगतको स्मीयरको तयारी (Microscopic slide cleaning, labeling and Blood smear Preparation)*



## ४.२ माइक्रोस्कोप स्लाइडहरूको सफाई र भण्डारण

### ४.२.१ स्लाइडहरूको सफाई

प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने स्लाइडहरू सहि तरिकाले सफाई भएको हुनुपर्दछ । अन्यथा प्रयोगशाला जाँचको नतिजाको गुणस्तरमा ह्रास आउन सक्दछ ।

### ४.२.२ औलो माइक्रोस्कोपी जाँचको लागि स्लाइडहरू

माइक्रोस्कोप स्लाइडहरू साधारणतया एउटा बट्टामा ५० देखि ७२ वटासम्म हुन्छ । स्लाइडको बट्टामा पहिले नै सफा गरिएको वा धोइसकेको (Washed) भनेर लेखिएको हुन सक्छ तर प्रयोग गर्नु पूर्व सबै स्लाइडहरूलाई नियमपूर्वक तरिकाले Standard Protocol अनुसार धुनु, सुकाउनु र बेरेर (Wrap) राख्नु पर्दछ । फोहर र चिल्लो स्लाइडहरूमा Blood Smear बनाउँदा उक्त Smear स्टेनिङ्ग (Staining) गर्दा पखालिन सक्छ । त्यस कारण निम्न प्रकारका स्लाइडहरू प्रयोग गर्नु हुदैन:

- हेर्दा धमिलो (इन्द्रेणिको रङ्ग जस्तो), सेतो र अपारदर्शी भएको
- राम्रो संग सफा नगरिएको
- एकदमै पुरानो, कोरिएको र किनारा फुटेको
- ढुसी परेका स्लाइडहरू (Fungus contaminated slides)

### याद गर्नुहोस्

राम्रोसँग सफा नगरिएका स्लाइडहरूमा बनाइएको Blood smear हरुबाट सहि निदान हुन सक्दैन । यसले विरामीको उपचारमा खतरा उत्पन्न हुन सक्दछ । यस्तो हुनबाट रोक्नका लागि राम्रोसँग सफा गरिएका स्लाइडहरूमा उचित तरिकाले Smear बनाई Staining गर्नु पर्दछ ।

### ४.२.३ स्लाइडहरू सफा गर्दा चाहिने सामग्रीहरू

- एउटा प्लास्टिकको भाँडो ।
- नरम खालको सुतीको कपडा (Sponge)
- राम्रो खालको सरफ (Detergent)
- सफा लिन्ट फ्री (Lint-Free) सुतीको कपडाहरू
- मिथाइल अल्कोहोल (Methyl Alcohol)
- सफा पानी
- राम्रो गुणस्तरको स्लाइडहरू
- नरम टिस्यु पेपर
- स्लाइड बक्स (५०-१००)
- सिलिका जेल (Silica gel)
- लेबलिङ्ग गर्ने मार्कर

#### ४.२.४ नयाँ स्लाइडहरु प्रयोग गर्दा सफा गर्ने तरिका

- नयाँ स्लाइडहरु एक आपसबाट छुट्टाएर सर्फ पानीमा ४ देखि ८ घण्टासम्म डुबाउने ( रात भरी डुबाउंदा राम्रो)
- त्यसरी डुबाइएका स्लाइडहरु, प्रत्येकलाई दुवैपट्टि पुछेर (Rubbing) सफा गर्नु पर्दछ ।
- सफा गर्दा स्लाइडलाई चोर औंला र बुढी औंलाको विचमा राखी सफा स्पन्जले घोट्नु पर्दछ ।
- त्यसपछि प्रत्येक स्लाइडलाई सफा पानीले धुने ।
- धोइसकेपछि स्लाइडहरुलाई राम्रोसँग सुख्खा धुलो रहित काम गर्ने ठाँउमा राख्नुहोस् र अल्कोहल भएको जारमा राख्ने । सो जारलाई सिधा घामबाट जोगाएर राख्नुपर्दछ ।
- त्यसपछि प्रत्येक स्लाइडलाई लिन्ट फ्री कपडाले पुछेर सुकाउने ।
- यसरी सफा स्लाइडहरुलाई छेउबाट समात्ने गर्नु पर्दछ जसले स्लाइडहरु चिल्लो र धमिलो हुनबाट जोगाउँछ । यसरी सफा गरिएका स्लाइडहरु एउटा कार्डबोर्ड बाक्स (Card board Box) मा दश-दश वटाका दरले कागजले बेरेर राख्नु पर्दछ ।
- प्रत्येक प्याक (Pack) लाई टेप वा रबरले बाध्ने ।
- बक्समा सफा गरेको मिति र सफा गर्ने व्यक्तिको नाम लेखेर टाँस्ने ।
- लामो समय सम्मको भण्डारणको लागि सिलिका जेललाई बक्स भित्र राख्नुहोस् ।

#### ध्यान दिनुपर्ने कुराहरु

स्लाइडहरुलाई पुनः प्रयोग नगर्नुहोस् । खस्रो भएको (Chipped) वा कोरिएको स्लाइडहरुलाई फाल्नुहोस् । सफा गरिएका स्लाइडहरु प्रयोग गर्दा सबैभन्दा पहिले सफा गरिएको स्लाइडलाई शुरुमा प्रयोग गर्नुपर्दछ । ओसिलो ठाँउमा राखिएका स्लाइड र माइक्रोस्कोप लेन्सहरुमा ढुसीको संक्रमण हुन सक्छ, त्यसैले यस्ता चिजहरु राख्दा सफा र सुख्खा ठाउँमा राख्नुपर्छ ।

#### ४.३ औलो रगतको स्मीयरहरुको लेबलिङ्ग (Labelling malaria blood films)

दैनिक परीक्षण गर्ने क्रममा स्लाइडहरुलाई विरामीहरु चिनिने गरी विशेष कोडले लेबल गर्नु अत्यन्त महत्वपूर्ण हुन्छ । स्लाइडहरुको लेबलिङ्ग छोटो, भिन्न सङ्केत तथा मिति, कोड इत्यादि प्रष्टसँग पढ्न मिल्ने हुनुपर्छ । औलो रगतको स्मीयरको तयारीमा सही लेबलिङ्गले विरामीको विवरण थाहा पाउन, त्यसको रेकर्ड राख्न र गुणस्तर सुनिश्चित गर्न सहयोग गर्छ । स्लाइडहरुलाई पढेर क्रस जाँच गरिन्छ । उचित लेबलिङ्ग बिना स्लाइडहरुलाई पढ्ने र प्रतिक्रिया दिने प्रणाली गडबड हुन्छ । विभिन्न क्रियाकलापहरु जस्तै सक्रिय केस पहिचान, निष्क्रिय केस पहिचान, ज्वरोको परीक्षण र खोजपडताल (Surveillance) बाट आएका सबै स्लाइडहरुमा लेबलिङ्ग गरिएको हुनुपर्छ । लेबलिङ्गको तरिका देशभर नै समान हुने गरी एकरूपता हुनुपर्छ । यसले विरामीको विवरण र स्लाइड कहाँबाट आउँछ भन्ने बारे प्रष्ट पार्छ ।

आवश्यक सामग्रीहरु:

१. लिड पेन्सिल
२. ७५ मि.मि. X २५ मि.मि., १- १.२ मि.मि. बाक्लो स्लाइड
३. रजिष्टर

विधि:

१. परीक्षण अथवा निदान अनुरोध फारममा विरामीको विवरण चेक गर्नुहोस् र सही तरिकाले लगबुकमा रेकर्ड गर्नुहोस् ।

२. माइक्रोस्कोपिक स्लाइडको किनार वा पुच्छरमा लेबलिङ्ग गर्नुहोस् । कोडिङ्गमा प्रदेश/जिल्ला-स्वास्थ्य चौकी-बिरामीको कोड र नमुना सङ्कलन गरेको मिति हुनुपर्छ ।  
उदाहरण : ०१(प्रदेश)-गा.वि.स./नगरपालिका-स्वास्थ्य चौकीको नाम-०००१  
२०१७/१२/११
३. यदि स्लाइडहरूमा लेबलिङ्ग गर्ने स्थान उपलब्ध छैनन् भने पातलो स्मीयरको बाक्लो छेउ तिर पेन्सिलले लेख्नुहोस् । कहिल्यै पनि टल्किने खालको पेनहरू अथवा रङ्गीचङ्गी मार्करहरूले नलेख्नुहोस् ।

#### ४.४ औलो परजीवि परीक्षणको लागि स्मीयर बनाउने तरिका (Blood Smear Preparation For Malaria Parasite)

- हरेक बिरामीको लागि सधैं नयाँ ल्यान्सेट (lancet) प्रयोग गर्नुपर्छ ।
- रगत सङ्कलन गर्दा ग्लोभ्स लगाएर गर्ने ।
- हातलाई रगत लाग्नबाट जोगाउने ।
- हातमा केहीगरी रगत लागीहालेमा Spirit Swab ले राम्रोसँग पुछ्ने ।
- रगतमा छोइएका वस्तुहरू जस्तै: ल्यान्सेट (Lancet) हरू, cotton swab हरू र भाँचीएका स्लाइडहरू एउटा छुट्टै बाल्टी (Sharp bin) मा राख्ने
- यदी त्यस्तो व्यवस्था नभए Incineration बिधिबाट Dispose गर्न सकिन्छ ।

क) औलो परजीवि जाँचनलाई निम्न प्रकारका Blood Smear तयार गर्नु पर्दछ ।

- १) रगतको पातलो स्मीयर (Thin blood smear)
- २) रगतको बाक्लो स्मीयर (Thick blood smear)

ख) स्मीयर बनाउन चाहिने आवश्यक सामग्रीहरू

- ल्याटेक्स ग्लोब्स (टाल्कम पाउडर रहित)
- सफा स्लाइडहरू
- निर्मलीकृत ल्यान्सेट (Sterile lancet)
- ७०% ईथानोल (Ethanol)
- सुख्खा कपास
- धारीलो बस्तु फाल्ने कन्टेनर (Sharps Disposal Container)
- स्लाइड बक्स वा ट्रे (स्मीयर सुकाउनका लागि)
- सफा लिन्ट (lint) रहित कटनका कपडाहरू (cotton clothes)
- रेकर्ड फर्म वा रजिष्टर
- पेन्सिल (स्मीयरमा लेख्न) र पेन्सिल तिखार्ने शार्पनर वा लेबलिङ्ग गर्ने मार्कर

ग) स्मीयर बनाउने तरिका

- अधिल्लो एकाइमा वर्णन गरे जस्तै एउटा सफा स्लाइड लिनुहोस् ।

- विरामीको कोड लेबल गर्नुहोस् र विरामीको विवरणहरू रजिष्टरमा रेकर्ड गर्नुहोस् ।
  - विरामीको सबै जानकारीहरू रेकर्ड फर्ममा लेखिसकेपछि विरामीको हत्केला वा बीचको औंला माथी फर्काएर बुढीऔलाबाट चौथो औंला (साँडली औला) र बच्चाहरूमा खुट्टाको बुढिऔंला बाट स्मीयरको लागि रगत लिनुपर्छ ।
  - रगत लिने औंला राम्रो सँग अल्कोहलमा डुवाइएका कटन स्वाब (cotton Swab) ले सफा गर्नु पर्दछ । त्यसपछि सुख्खा र सफा कपडाले औला सुख्खा बनाउने । २-४ चोटी औंलालाई बिस्तारै हिकाउने एकतचयपभ० जसले रगतको प्रवाह बढाउँछ । त्यसपछि निर्मलीकृत ल्यानसेट (Lancet) बाट घोचेर (Puncture) रगत निकाल्ने । बाक्लो र पातलो स्मीयर एउटै स्लाइडमा तयार गर्नुपर्छ ।
  - त्यस पछि तल उल्लेख भए अनुसार रगत संकलन गर्नुहोस्:
    - घोंचेको औंलालाई बिस्तारै प्रेसर दिएर रगतको एक थोपा स्लाइडको विच भागमा पर्ने गरि लिने । यो रगतको पातलो स्मीयर बनाउन प्रयोग गरिन्छ ।
    - त्यस पछि अभ्रै बिस्तारै प्रेसर दिएर दुई वा तिन थोपा (पहिलेको भन्दा अलिक ठूलो) रगत स्लाइडमा राख्ने (करिब एक सेन्टिमिटर पातलो स्मीयर भन्दा टाढा) । बाँकी रगत सफा कटनले सफ गर्ने ।
- घ) हातको नशाबाट लिइएको venous रगतको लागि रक्त नमुना सङ्कलन गर्ने विधि
- सङ्कलन गर्न प्रयोग हुने ट्युबहरू र सफा स्लाइडहरूमा विरामीको नाम वा संकेत/कोड, मिति र सङ्कलन गरेको समय सहित लेबल गर्नुहोस् ।
  - रगत सङ्कलन गर्ने ठाँउलाई ७०% अल्कोहलले सफा गरी सुक्न दिनुहोस् ।
  - रगतलाई जम्न नदिन EDTA भएको ट्युबमा सिरिन्जबाट सङ्कलन गर्नुहोस् र राम्ररी मिसाउनुहोस् ।
  - ४) रगतको सङ्कलन गरिसकेपछि जति सक्दो चाँडो कमसेकम दुई वटा रगतको स्मीयरहरू तयार गर्नुहोस् ।
  - EDTA रगत जति सक्दो चाँडो तयार गर्नुपर्छ । यदि त्यसो नगरे त्यसलाई रेफ्रिजेरेटरमा भण्डार गर्नुपर्छ, तर २४ घण्टा भन्दा धेरै समय भण्डार गर्नुहुन्न । लामो समय सम्म भण्डार गर्दा रातो रक्तकोषहरू र परजीवीहरूको आकार र रूप परिवर्तन हुन सक्छ ।

#### याद गर्नुहोस्:


केहि मानिसहरू स्वस्थ देखिए तापनि उनीहरूको रगतमा विभिन्न संक्रमणहरू हुन सक्छन् । जस्तै हेपाटाइटिस (Hepatitis), Hiv/AIDS, मलेरिया, सायफिलिस (syphilis) तथा अरु रोगहरू जस्तै लेप्टोस्पाइरोसिस (Leptospirosis) पनि हुन सक्छ । त्यसैले रगत चलाउँदा सावधानी अपनाउन पर्दछ ।

### ४.४.१ रगतको पातलो स्मीयर बनाउने तरिका (Preparation of Thin Blood Smear)

साधरणतया: रगतको पातलो स्मीयर रक्त कोषहरूको बनौट अध्ययन गर्न प्रयोग गरिन्छ। यसैबाट रगतमा पाइने परजीवि तथा प्रोटोजोवा (Protozoa) पनि जाँच गर्न सकिन्छ। रगतको बाक्लो स्मीयर भन्दा पातलो स्मीयरमा परजीविको बनौट (Morphology) राम्ररी देख्न सकिन्छ, साथै परजीविहरूको विभिन्न अवस्थाहरू राम्रोसँग छुट्याउन सजिलो हुन्छ। त्यसैले विभिन्न औलो परजीवि छुट्याउन रगतको पातलो स्मीयर (Thin blood Smear) बाट सजिलो हुन्छ।

विधि:

- एउटा सफा स्लाइड लिने
- एउटा सफा एप्लिकेटरको सहायताले स्लाइडको एक छेउमा रगतको एक थोपा राख्ने १लगभग 2 $\mu$ l को आकार (size)
- अर्को स्लाइड वा फैलाउने स्लाइड (Spreader) लिएर रगतको थोपा अगाडि राखि पछाडि तानेर रगतलाई छुने र स्प्रेडरको टेम्प्लेट (template) मा देखाए जस्तै जिब्रो आकारको बनाउनुहोस्
- फैलाउने स्लाइड (spreader) लाई ४५ डिग्री को कोण बनाई रगत स्लाइडको अर्को छेउसम्म एकनाश सँग रगत तानेर लाने।

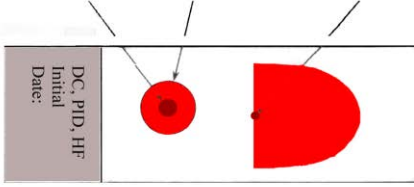


**Vector Borne Disease Research and Training Center**  
Hetauda, Makawanpur

**INSTRUCTION FOR GOOD QUALITY SMEAR PREPARATION**

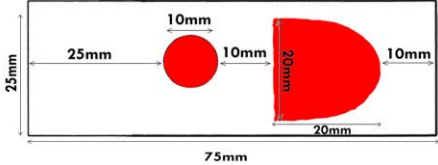
**Amount of Blood Required for Smear Preparation**

Put 6 $\mu$ l of blood here for thick smear.	Size of the thick smear with 6 $\mu$ l of blood - 10mm diameter.	Put 2 $\mu$ l of whole blood here for 2 cm X 2 cm approximate size of thin smear.
--	--	---



DC= District Code, PID= Patient identification Code, HF= Health facility name (in short form)  
Initial= Name of the technician (in short form)

**Approximate Position of the smear on the Glass Slide**



**PROCEDURE FOR MAKING BLOOD SMEARS**

1. Place the labeled slide on the template above.
2. Place 6  $\mu$ l of blood on the spot for the thick smear.
3. Place 2  $\mu$ l of blood on the thin smear spot.
4. Make the thin smear with the edge of a 'spreader'.
5. Spread the drop of blood using corner of the spreader to make an even thick film. Do not excessively stir the blood but spread in circular form with 3 to 6 moves.
6. Dry the slide on a flat surface, away from dust, flies, etc.
7. Wipe the spreader with disinfectant before reuse.

रगतको स्मीयरको लागि टेम्प्लेट (template)

### ४.४.२ रगतको बाक्लो स्मीयर बनाउने तरिका (Preparation of Thick Blood Smear)

रगतको बाक्लो स्मीयर भन्नाले रगतलाई फिजाइ हेमोग्लोबिन निकालिएको (Dehaemoglobinized) बाक्लो स्मीयर हो, जसलाई शुष्कदर्शकयन्त्रमा परिक्षण गर्न सकिने होस् ।

रगतको पातलो स्मीयर (Thin Blood Smear) भन्दा रगतको बाक्लो स्मीयरमा परजीविको संख्या बढि हुन्छ । त्यसैले कम परजीवि भएको बेला अथवा रगतको पातलो स्मीयरमा परजीवि देखिएन भने रगतको बाक्लो स्मीयर तयार पारी परजीवि खोज्नु पर्छ । यो तरिका औलो परजीवि खोज्नलाई ज्यादै उपयोगी हुन्छ । औलो परजीवि बाहेक ट्रेपानोसोमा (Trypanosoma) लिसमानिया (Leishmania) र माइक्रोफिलारिया (Microfilaria) पनि यो तरिकाबाट सजिलै हेर्न सकिन्छ ।

विधि:

- एउटा सफा स्लाइड लिने र यसको बीचमा ६ माइक्रोलिटर (३ सानो रगतको थोपा) रगत राख्ने ।
- अर्को स्लाइडको टुप्पाले वा एप्लिकेटर (Applicator) ले रगतलाई १ से.मिं गोलाई फैलाउने (स्मीयर बनाउने)
- बनाइएको स्मीयरलाई कोठाको तापक्रममा सुक्न दिने ।
- स्मीयरबाट हेमोग्लोबिन हटाउन डिस्टिलड वाटर भएको विकरमा स्मीयर डुबने गरेर स्लाइडलाई ठाडो पारी राख्ने ।
- ५ देखि १० मिनेटमा वा स्मीयर सेतो भएपछि स्लाइडलाई पानीबाट भिक्ने ।
- स्लाइडलाई ठाडो पारेर राख्ने र स्मीयर सुक्न दिने ।

सामान्य विवरण:

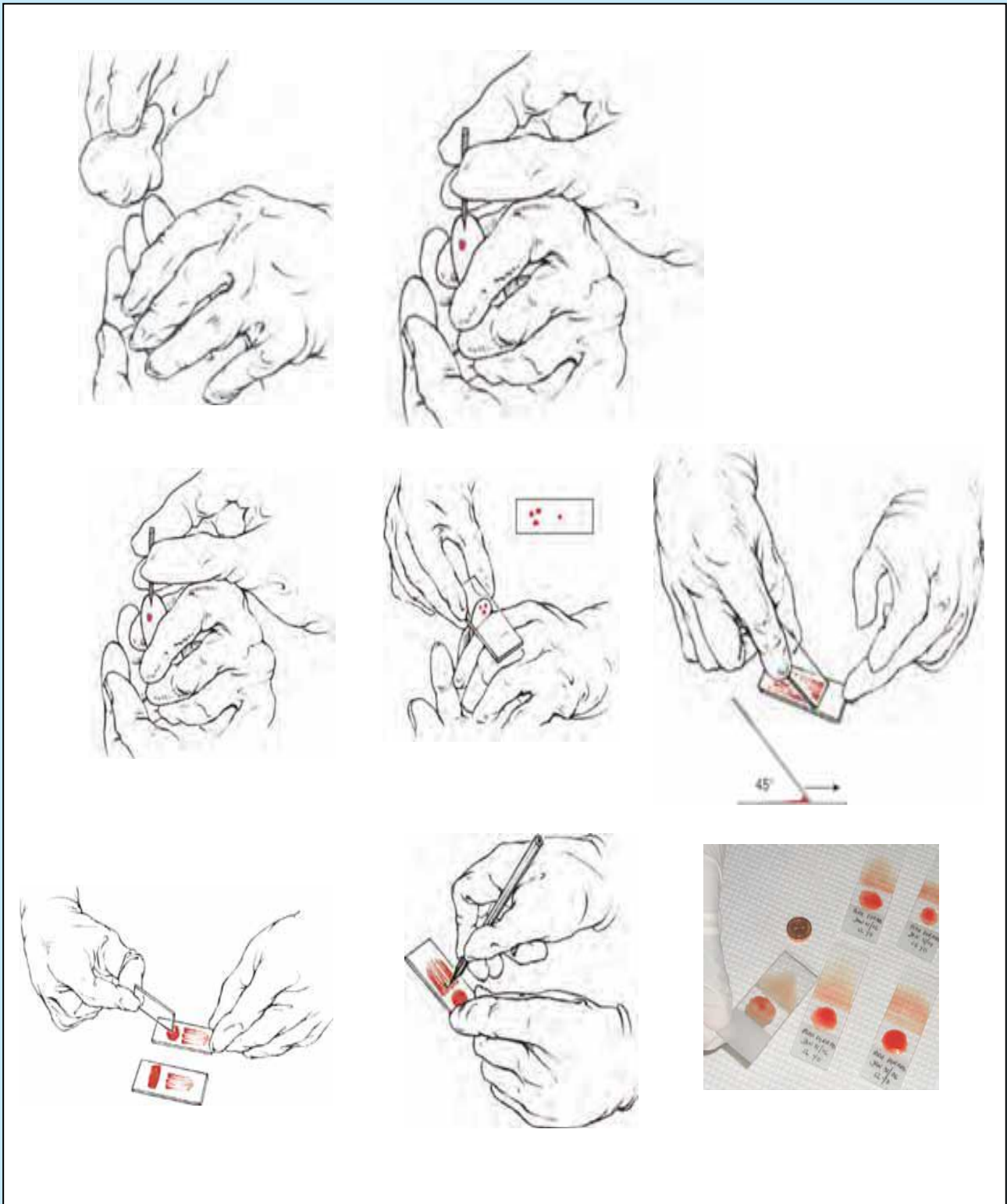
रगत निम्न बमोजिम हुनुपर्छ :

क) औंलाबाट निकालिएको ताजा रगत

ख) EDTA वा ACD (Acid Citrate Dextrose) ट्युबमा सङ्कलन गरिएको रगत । हेपारिन (Heparin) वा फ्लोराइड ट्युबको रगत नगर्नुहोस् किनकी त्यसले स्टेन रातो हुन्छ र खासगरी बाक्लो स्मीयरमा परजीवीहरू रूपष्ट रूपमा देख्न सकिँदैन ।

स्मीयर : स्लाइडको एउटा कुनामा सानो तीन थोपा रगत (२  $\mu$ l प्रति थोपा हुने गरी) राख्नुहोस् । नकोरिएको सफा स्लाइडको किनाराबाट रगतलाई लगभग १.२ से.मि. व्यासको गोलाकारमा फैलाउनुहोस् तर धेरै बाक्लो होइन । अर्को अति सानो थोपा रगत (२  $\mu$ l) लाई बाक्लो स्मीयरको नजिक (१ से.मि. पर) राख्नुहोस् । फैलाउनलाई अर्को स्लाइड वा स्प्रेडर (spreader) को प्रयोग गर्नुहोस् । स्प्रेडर (spreader) लाई लगभग ४५ डिग्रीको कोणमा समात्नुहोस् र स्प्रेड गर्नुहोस् । स्प्रेडर (spreader) लाई बेस्सरी नथिच्नुहोस् अन्यथा रातो रक्तकोषहरू बिग्रन सक्छन् । स्मीयरलाई लामो र पातलो जिब्रो आकारमा हुने गरी फैलाउने प्रयास गर्नुहोस् र स्मीयरलाई सुकाउनुहोस् । बाक्लो स्मीयरलाई सुक्नको लागि स्लाइडलाई छोडिदिनुहोस् । यदि हतार भएचिसो हावाले पहिला र त्यसपछि तातो हावाले सुकाउनको अन्यथा बाक्लो स्मीयरको भिजेको रगत पातलो स्मीयरमा भर्न सक्छ । स्मीयरमा विरामीको कोड, मिति र सङ्कलन गरेको समय र अध्ययनको समय लेखेर लेबल गर्नुहोस् ।





चित्र : औलो माइक्रोस्कोपीको लागि रगतको बाक्लो र पातलो स्मीयर बनाउने तरिका  
 Blood smear preparation (Thick and thin smear preparation for malaria microscopy)

४.५ रगतको स्मीयर बनाउँदा बारम्बार दोहोरिन सक्ने समस्याहरु

४.५.१ रगतको स्मीयरको गलत अवस्थिती:

गलत तरिकाले बनाइएका स्मीयरहरुको परिक्षण गर्न नसकिने हुँदा स्मीयर बनाउँदा सहि तरिकाले बनाउनु अत्यावश्यक हुन्छ । यदि पातलो स्मीयरको आकार धेरै ठुलो भएमा तोकिए अनुसारको फिल्ड नतिजा दिन अत्यन्तै गाह्रो हुन्छ ।



४.५.२ अधिक मात्रामा रगत:

रगतको स्मीयर बनाउँदा धेरै रगत लिएर बनाइएमा एउटै Field मा धेरै रक्त कोषहरु भेटिने हुँदा यीनिहरुले परजीविलाई नै ढाकिदिन्छन् ।



४.५.३ थोरै मात्रामा रगत:

रगतको स्मीयर बनाउँदा अत्यन्त थोरै रगत भएमा सेता रक्त कोषहरुको संख्या चाहिने भन्दा कम भइ सही रूपले परिक्षण गर्न नसकिने हुन्छ ।



४.५.४ ग्रिजी (Greasy) स्लाइडहरु

स्मीयर बनाउँदा प्रयोग गरिने Spreader स्लाइडको किनारा भाँचिएको टुक्रिएको हुनु हुँदैन यसले स्मीयरको गुणस्तर घटाउँछ र स्मीयर राम्रोसँग बन्दैन ।



#### ४.५.५ स्प्रेडर (Spreader) स्लाइडको किनारा खस्रो १ ऋजुजुभम० भएको

जब स्प्रेडर (Spreader) स्लाइडको किनारा खस्रो (Chipped) हुन्छ, पातलो स्मीयरहरू असमान रूपमा फैलन्छन्, राम्रो जिब्रो आकारको बन्न सक्दैन र खस्रो स्प्रेडरले बाक्लो स्मीयर फैलनमा पनि असर गर्न सक्छ ।



#### ४.६ रगतको स्मीयरहरू तयार वा भण्डारण गर्दा आउन सक्ने समस्याहरू

- किरा अथवा कमिलाहरूले रगतको स्मीयर खाइदिन सक्छन्, सो कुराको ख्याल राख्ने ।
- रगतको स्मीयर बनाउन कोरीएका स्लाइडहरू प्रयोग गरिएमा परिक्षण गर्न गाह्रो हुन सक्छ ।
- बाक्लो स्मीयर सुकाउँदा एकरूपता नभएमा स्मीयर गुणस्तरीय हुँदैन ।

#### ४.७ जिम्सा स्टेनसंग रगतको स्मीयर रङ्गाउने तरिका

##### ४.७.१ जिम्साको वर्किङ्ग घोल (working solution) को तयारी

औलो रगतको स्मीयरका लागि सबभन्दा राम्रो स्टेनिङ्ग जिम्साद्वारा गरिन्छ । त्यसको तयारीको लागि स्टकबाट निकालिएको जिम्सालाई pH ७.२ को बफर पानीद्वारा पातलो बनाएको जिम्साको वर्किङ्ग घोलले रङ्गाउनु पर्दछ । १०% को वर्किङ्ग घोल (छिटो रङ्गाउने विधि) वा ३% को वर्किङ्ग घोल (बिस्तारै रङ्गाउने विधि) बाट जिम्सा स्टेनले स्टेनिङ्ग गर्न सकिन्छ । जिम्सा स्टेनको छिटो विधि सामान्यतया बाह्य (outpatient) क्लिनिकहरू र व्यस्त प्रयोगशालाहरूमा प्रयोग गरिन्छ जहाँ बिरामीको लागि छिटो निदान प्रदान गर्न आवश्यक हुन्छ । ढिलो विधि (लामो समय रङ्गाउने विधि) को प्रयोग धेरै संख्या भएका स्लाइडहरूको स्टेनिङ्ग गर्न जस्तै इपिडिमियोलोजिकल सर्वेक्षणहरू, स्लाइड बैकिङ्ग र फिल्ड अनुसन्धानमा गर्नुपर्दछ ।

आवश्यक सामग्रीहरू:

१०% जिम्साको वर्किङ्ग घोल (working solution) बनाउनको लागि :

- २५ वा ५० मि.लि.को बिकर;
- बफर पानी, pH ७.२;
- ५-१० मि.लि. क्षमताको सफा बिकर (beaker) वा ट्युब;
- पिपेट (Pasteur pipette) र
- फिल्टर पेपर (Whatman filter paper, grade #1)

३% जिम्साको वर्किङ्ग घोल (working solution) बनाउनको लागि :

- २५ वा ५० मि.लि.को बिकर;
- बफर पानी, pH ७.२;
- ५-१० मि.लि. क्षमताको सफा मेजरिङ्ग सिलिण्डर (measuring cylinder);
- पिपेट (Pasteur pipette) र
- फिल्टर पेपर (Whatman filter paper, grade #1)

एक-एक बटा स्लाइडहरूलाई स्टेनिङ्ग गर्नको लागि चाहिने जिम्सा स्टकको घोल र बफर पानीको मात्रा हिसाब गर्ने ।

हरेक रगतको स्मीयरलाई ३ मि.लि. को जिम्सा स्टेनको वर्किङ्ग घोल (working solution) चाहिन्छ । प्रत्येक रगतको स्लाइडहरूलाई स्टेनिङ्ग गर्नको लागि चाहिने जिम्सा स्टकको घोलको मात्राको हिसाब तलको फर्मूला अनुसार गर्न सकिन्छ :

प्रत्येक स्लाइडको लागि चाहिने जिम्सा स्टकको घोलको मात्रा = चाहिएको जिम्साको concentration  $x$  ३ मि.लि.

एउटा स्लाइडलाई स्टेनिङ्ग गर्नको लागि चाहिने बफर पानी (pH ७.२) को मात्रा निम्न तरिकाले हिसाब गरेर निकाल्न सकिन्छ :

बफर पानीको मात्रा प्रति स्लाइड = ३ मि.लि. – प्रत्येक स्लाइडको लागि चाहिने जिम्सा स्टकको घोलको मात्रा

३ मि.लि. को जिम्सा स्टेनको वर्किङ्ग घोल (working solution) जिम्सा स्टकको घोलको मात्रा थपेर तयार गरिन्छ ।

उदाहरण १ : १०% जिम्साको घोलले १५ बटा स्लाइडहरूलाई स्टेनिङ्ग गर्ने ।

१५ बटा स्लाइडहरूलाई १०% जिम्साको घोलले स्टेनिङ्ग गर्नको लागि चाहिने जिम्सा स्टकको घोलको मात्राको हिसाब निम्न तरिकाले गर्न सकिन्छ :

$१०\% x ३ \text{ मि.लि.} x १५ \text{ स्लाइडहरू} = \text{चाहिने जिम्सा स्टकको घोलको मात्रा प्रति स्लाइड}$

$(०.१ x ३ \text{ मि.लि.}) x १५ \text{ स्लाइडहरू} = ४.५ \text{ मि.लि.}$

त्यसैगरी, १५ बटा स्लाइडहरूलाई १०% जिम्साको घोलले स्टेनिङ्ग गर्नको लागि चाहिने बफर पानी (pH ७.२) को मात्राको हिसाब निम्न तरिकाले गर्न सकिन्छ :

$[३ \text{ मि.लि.} - (०.१ x ३ \text{ मि.लि.})] x १५ \text{ स्लाइडहरू} = \text{बफर पानीको मात्रा प्रति स्लाइड} [३ \text{ मि.लि.} - (४.५ \text{ मि.लि.})] x १५ \text{ स्लाइडहरू} = ४०.५ \text{ मि.लि.}$

तसर्थ, १५ बटा स्लाइडहरूलाई स्टेनिङ्ग गर्नको लागि चाहिने १०% जिम्साको घोलको मात्रा बनाउनको लागि ४.५ मि.लि. जिम्सा स्टकको घोललाई ४०.५ मि.लि. बफर पानीसँग मिसाउनु पर्छ ।

क्रियाकलापको वर्णन:

क) केही स्लाइडहरूलाई छिटो स्टेनिङ्ग गर्नको लागि स्टकको घोलबाट १०% जिम्साको घोल तयार गर्ने तरिका

रगतको स्मीयर सहितको प्रत्येक स्लाइडलाई लगभग ३ मि.लि.को स्टेन चाहिन्छ ।

१. एउटा सफा बिकर (beaker) वा ट्युबमा पहिले बनाएको बफर पानी (pH ७.२) ९ मि.लि. राख्नुहोस् ।
२. जिम्सा स्टकको घोललाई फिल्टर पेपर मार्फत फिल्टर गर्नुहोस् र २५-५० मि.लि.को भाँडामा खन्याउनुहोस् ।
३. सफा, सुख्खा पिपेट (pipette) को प्रयोग गरेर १ मि.लि जिम्सा स्टकको घोल राख्नुहोस् । त्यसलाई दूषित नगर्नको लागि जिम्सा स्टकको घोल भएको ठूलो भाँडाबाट सिधै

नलिनहोस् । सानो अर्को भाँडामा थोरै खन्याई प्रयोग गर्नुहोस् । यसले जिम्सा स्टकलाई दूषित हुनबाट जोगाउँछ ।

४. रगतको स्मीयरहरूलाई स्टेनिङ्ग गर्नु ठीक अगाडि जिम्साको वर्किङ्ग घोल (working solution) तयार गर्नुहोस् र त्यसलाई जति सक्दो चाँडो प्रयोगमा ल्याउनुहोस् । दुई घण्टा पछिका स्टेनहरूलाई प्रयोगमा नल्याउनुहोस् ।

ख) २०-१०० वटा स्लाइडहरूको ब्याच स्टेनिङ्ग गर्नको लागि स्टकको घोलबाट ३% जिम्साको घोल तयार गर्ने तरिका

१. एउटा सफा मेजरिङ्ग सिलिण्डर (measuring cylinder) मा पहिले बनाएको बफर पानी (pH ७.२) ९७ मि.लि. राख्नुहोस् ।

२. जिम्सा स्टकको घोललाई फिल्टर पेपर मार्फत फिल्टर गर्नुहोस् र २५-५० मि.लि.को भाँडामा सार्नुहोस् ।

३. मेजरिङ्ग सिलिण्डर (Measuring cylinder) वा पिपेट (pipette) को प्रयोग गरेर ३ मि.लि जिम्सा स्टकको घोल राख्नुहोस् । त्यसलाई दूषित नगर्नको लागि जिम्सा स्टकको घोल भएको ठूलो भाँडाबाट सिधै नलिनहोस् । सानो अर्को भाँडामा थोरै खन्याई प्रयोग गर्नुहोस् । यसले जिम्सा स्टकलाई दूषित हुनबाट जोगाउँछ ।

४. रगतको स्मीयरहरूलाई स्टेनिङ्ग गर्नु ठीक अगाडि जिम्साको वर्किङ्ग घोल (working solution) तयार गर्नुहोस् र त्यसलाई जति सक्दो चाँडो प्रयोगमा ल्याउनुहोस् । दुई घण्टा पछिका स्टेनहरूलाई प्रयोगमा नल्याउनुहोस् ।

प्रक्रियाको नोटहरू:

- मेजरिङ्ग सिलिण्डर (Measuring cylinder), पिपेट (pipette), भाँडाहरू र टेस्ट ट्युबहरू प्रयोग गर्नु अगाडि सफा र सुख्खा हुनुपर्छ ।
- दिनभरि वा दिनभर भन्दा बढी प्रयोग वा पुनः प्रयोग गर्नको लागि जिम्सा स्टेनको एक ब्याच नबनाउनुहोस् । जिम्सा स्टेनले छिट्टै पानीको बाफ सोस्छ र यसले आफ्नो स्टेनिङ्ग गर्ने गुणहरू हराउँछ जसले गर्दा ती स्लाइडहरू केही छोटो समय पछि नै नराम्रोसँग स्टेन हुन्छन् र परजीवीको पहिचान गर्न कठिन हुन्छ ।

सुरक्षाका उपायहरू:

- यदि मिथानोल (Methanol) को बाफ श्वासप्रश्वास भित्र छिर्यो वा कारणवश मुखबाट निलियो भने यो विषादी भएकोले नराम्रो असरहरू हुन सक्छ । त्यसैले यसलाई सम्पर्क भन्दा टाढै राख्नुहोस् र यसको प्रयोग नभएको बेला यसलाई दराज भित्र राख्नुपर्छ ।
- व्यक्तिगत सुरक्षात्मक उपकरण जस्तै पन्जा, चश्मा र प्रयोगशाला कोट वा गाउनको प्रयोग सहित आधारभूत सावधानीहरू (Universal precautions) अपनाउनु पर्छ ।

#### ४.७.२ बफर पानी (Buffered water)

राम्रोसँग रङ्गाउनको लागि उचित pH को बफर वाटरको आवश्यक पर्दछ । त्यसैले रगतका स्मीयरहरू staining गर्नु भन्दा अगाडि बफर पानी तयार पार्नुपर्दछ, जसलाई Giemsa Stain Dilution गर्न प्रयोग गरिन्छ ।

कुनै पनि तरल पदार्थको अम्लीय (Acidity) अथवा क्षारीय (Alkalinity) पन नाप्ने एकाईलाई pH भनिन्छ । यो एकाई ० देखि १४ सम्मको अंकमा नापिन्छ । अम्लीय वा क्षारीय दुवै गुण नभएको तरलपदार्थलाई Neutral भनिन्छ । जसको pH ७ हुन्छ ।

pH नाप्न pH Meter वा कलर इन्डिकेटर (Color Indicator) को प्रयोग गरिन्छ । पानीलाई अम्लीय वा क्षारीय गुणको बनाउन बफर साल्ट (Buffered Salt) को प्रयोग गरिन्छ ।

आवश्यक सामग्रीहरू:

- ०.०१ ग्राम सम्म अट्ने/पढ्न सक्ने एउटा Chemical Balance चाहिन्छ ।
- ११ से.मि. व्यास भएको फिल्टर पेपर
- १ लिटर क्षमताको एउटा Conical Flask
- २५० मिलि क्षमताको एउटा बिकर
- काठको स्पाचुलाहरू (Wooden Spatulas)
- डिस्टिल्ड वाटर (Distilled Water)
- पोटासियम डाइहाइड्रोजन फस्फेट ( $KH_2PO_4$ )
- डाइसोडियम हाइड्रोजन फस्फेट ( $Na_2HPO_4$ )

विधि:

स्टेप १: Chemical Balance को Pointer लाई ० मा सेट गर्ने



स्टेप २: प्यान (Pan) मा फिल्टर पेपर राख्ने र ग्राम स्केल आर्म (Gram Scale arm) चलाएर ० मा सेट गर्ने



स्टेप ३ स काठको स्पाचुला द्वारा विस्तारै हाल्दै ०.७ ग्राम सम्म  $KH_2PO_4$  को तौल लिने



स्टेप ४: यसरी तौल लिइसकेको  $KH_2PO_4$  लाई सफा बिकरमा हाल्ने र करिब १५० मि.लि. पानी हालेर राम्रोसँग नुन नघुलिएर सम्म चलाउने



स्टेप ५: फेरि एउटा सफा फिल्टर पेपर Chemical Balance को प्यानमा राख्ने र रिसेट (Reset) गर्ने



स्टेप ६: स्पाचुलाको सहयोगले विस्तारै  $Na_2HPO_4$  को धुलो हाल्दै त्यसबाट १ ग्राम तौल लिने



स्टेप ७: उक्त तौलको  $Na_2HPO_4$  को धुलोलाई स्टेप ४ को बिकरमा हाल्ने र राम्रोसँग चलाएर घोल्ने ।



स्टेप ८: उक्त बिकरको घोल (Solution) राम्ररी घोलिपछि एउटा सफा Conical Flask मा राखेर १ लिटर सम्म पानी हाल्ने



याद गर्नुहोस्:

सहि pH को बफर वाटर प्रयोग गरिएमा **Staining** गुणस्तरीय हुन्छ ।

यसरी तयार पारिएको Buffer Water Giemsa Stain को pH ७.२ बनाउन प्रयोग गरिन्छ ।

४.७.३ २% करेक्टिङ्ग फ्लुइड्स (Correcting Fluids) बनाउने तरिका:

आवश्यक सामग्रीहरू:

- ०.०१ ग्राम सम्म तौलीन सकिने Balance
- ११ से.मि. सम्म व्यास (diameter) भएका फिल्टर पेपरहरू (Filter Papers)
- दुइवटा काँचका बोटलहरू (Glass Bottles) (१०० वा १५० मि.लि. क्षमताका)
- पोट्यासियम डाइहाइड्रोजन फस्फेट (Anhydrous  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- डाइसोडियम हाइड्रोजन फस्फेट (Anhydrous  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- २०० मि.लि. जति डिस्टिल्ड वाटर (Distilled Water)
- काठका स्पाचुलाहरू (Wooden Spatulas)
- २५० मि.लि. क्षमताका दुइवटा विकरहरू
- १०० मि.लि. क्षमताको Measuring Cylinder
- लेबलहरू (Labels)

विधि:

स्टेप १: बफर पानी (Buffered Water) बनाउँदाको स्टेप १ र २ जस्तै गर्ने

स्टेप २: २ ग्राम  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  को तौल लिने र त्यसलाई १०० मि.लि. पानी भएको विकरमा राखेर राम्ररी नघुल्लिए सम्म चलाउने ।

स्टेप ३: उक्त विकरको घोल (Solution) राम्ररी घोलेपछि एउटा सफा द्रवततभि मा खन्याउने र २%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  लेबल गर्न

स्टेप ४: स्टेप २ र ३ दोहोर्न्याएर २%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  बनाउने

स्टेप ५: सूर्यको प्रकाश नपर्ने गरि चिसो ठाउँमा त्यसलाई भण्डारण गर्ने

बफर वाटर को PH जाँच गर्ने र मिलाउने तरिका:

प्रयोग गर्नु भन्दा अघि बफर वाटरको pH जाँच गरिनु पर्दछ । यदि बफरको PH अम्लीय वा क्षारिय छ भने Correcting Fluid प्रयोग गरेर त्यसलाई मिलाउन सकिन्छ । यदि बफरको PH

७.२ भन्दा बढी छ भने २%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  विस्तारै थपेर PH घटाउन सकिन्छ ।

#### ४.७.४ जिम्सा स्टकको घोल र बफर पानी (buffered water) को गुणस्तर नियन्त्रण

औलोको सही निदान गर्नको लागि रगतको स्मीयरहरूलाई राम्रो गुणस्तरको जिम्सा स्टेन र बफर पानी (pH ७.२) ले स्टेन गर्न जरुरी छ । यी घोलहरूको प्रयोग गर्नु अगाडि परीक्षण गर्नुपर्छ र गुणस्तर नियन्त्रण जाँच गर्नुपर्छ :

१. प्रत्येक तयार गरेको नयाँ ब्याच वा लटको स्टकको घोलको लागि;
२. स्टकको घोललाई प्रयोगको लागि प्रयोगशाला पठाउनु अगाडि;
३. राष्ट्रिय जनस्वास्थ्य प्रयोगशालाबाट फिल्डमा स्टकको घोल प्राप्त भएपछि;
४. जिम्सा स्टेनको वर्किङ्ग घोल (working solution) तयार गर्नको लागि स्टकको घोल प्रयोग गर्नु अगाडि र
५. प्रत्येक तयार गरेको नयाँ ब्याचको बफर पानी (pH ७.२) को लागि ।

औलोको लागि पोजिटिभ भनिएको पातलो रगतको स्मीयरमा बफर पानी र स्टेनको गुणस्तर जाँच गर्नुपर्छ । यो गुणस्तर जाँचमा पी. भाइभेक्स परजीवीका Schüffner dots को जाँच गरिन्छ । यदि यी उपलब्ध छैनन् भने पी. फालिसपारम पोजिटिभ रगतको स्मीयरको प्रयोग गर्नुहोस् र Maurer's dots को जाँच गर्नुहोस् । यदि पोजिटिभ रगतको स्मीयर उपलब्ध छैन भने रातो र सेतो रक्तकोषहरूको रङ्ग र स्टेनिङ्गको जाँच गर्नको लागि नेगेटिभ रगतको स्मीयरको प्रयोग गर्नुहोस् ।

ताजा रगत उपलब्ध भएको बेला रगतको स्मीयरहरू प्रशस्त मात्रामा बनाई -२० डिग्री सेन्टीग्रेड वा सो भन्दा चिसोमा भण्डारण गर्नुहोस् अनि आवश्यकता अनुसार यी स्मीयरहरू बफर पानी तथा जिम्साको गुणस्तर मूल्याङ्कन गर्नको लागि प्रयोग गर्न सकिन्छ । कोठाको तापक्रममा लामो समय सम्म (१५-३० डिग्री सेन्टीग्रेड) भण्डार गरिएका, स्टेन नगरिएका स्मीयरहरू समय सँगै बिग्रदै जान्छन् ।

#### राम्रो स्टेन कसरी चिन्ने

- राम्रो नतिजा प्राप्त गर्नको लागि राम्रो स्टेन आवश्यक हुन्छ । नराम्रो स्टेनले गर्दा गलत नतिजा र गलत उपचार हुन सक्छ । त्यसैले तपाईंले आफ्नो स्टेनको गुणस्तर व्यवस्थापन गर्न सक्नुपर्छ ।

#### राम्रो स्टेनको लागि मापदण्ड

- जिम्सा स्टेनिङ्ग पछि रगतका कोषहरू र औलो परजीवीहरूको रङ्ग

#### बाक्लो स्मीयर

- सेतो रक्तकोषको न्युक्लियस (nucleus): गाढा बैजनी
- सेतो रक्तकोषको साइटोप्लाजम (cytoplasm): देखिन्न
- रातो रक्तकोषको साइटोप्लाजम (cytoplasm): देखिन्न (यदि तपाईंले देख्न सक्नुहुन्छ भने मिथानोलले बाक्लो स्मीयर फिक्स (fix) गरेको भन्ने बुझिन्छ)
- प्लेटलेटहरू (Platelets): गुलाबी

- पृष्ठभूमि : फिक्का खैरो (pale grey) (टुक्रिएको रातो रक्तकोषहरूबाट आएको) र धुलोबाट मुक्त । नीलो पृष्ठभूमिको मतलब स्टेन खराब भन्ने बुझिन्छ ।
- औलो परजीवीको न्युक्लियस (nucleus): गाढा रातो
- औलो परजीवीको साइटोप्लाजम (cytoplasm): गाढा नीलो

#### पातलो स्मीयर

- सेतो रक्तकोषको न्युक्लियस (nucleus): गाढा बैजनी
- सेतो रक्तकोषको साइटोप्लाजम (cytoplasm): नीलो वा फिक्का गुलाबी
- रातो रक्तकोषको साइटोप्लाजम (cytoplasm): खैरो-गुलाबी देखि फिक्का बैजनी
- प्लेटलेटहरू ९एबितभभितक०स् गुलाबी
- पृष्ठभूमि : धुलोबाट मुक्त र स्पष्ट
- औलो परजीवीको न्युक्लियस (nucleus): रातो
- औलो परजीवीको साइटोप्लाजम (cytoplasm): नीलो

#### राम्रो स्टेनको लागि सावधानीहरू

- स्मीयरिङ्ग (बाक्लो तथा पातलो स्मीयर बनाउने तरिका) देखि स्टेनिङ्ग सम्मका सबै प्राविधिक चरणहरू धेरै महत्वपूर्ण छन् ।

#### रगतको स्मीयर

- राम्रोसँग सफा गरिएका स्लाइडहरूको प्रयोग गर्नुहोस् ।
- राम्रोसँग बनाएको बाक्लो स्मीयर चाहिन्छ, धेरै रगत भएको बाक्लो स्मीयरलाई राम्रोसँग स्टेनिङ्ग गर्न सकिन्न ।
- पातलो स्मीयरहरू उचित मात्राको रगत र राम्रो स्प्रेडर (खस्रो धार नभएको) को प्रयोग गरेर जिब्रो आकारको बनाउनुपर्छ ।
- बाक्लो स्मीयरलाई राम्रोसँग सुक्न दिनुपर्छ, अन्यथा राम्रोसँग स्टेन हुन्न ।

#### फिक्सिङ्ग (Fixing)

- फिक्सिङ्ग (Fixing) गर्नु अघि रगतको स्मीयरलाई समतल सतहमा पूर्ण रूपमा सुक्न दिनुहोस् ।
- मिथानोल (Methanol) मा छिटो (२-३ सेकेण्ड) डुबाएर पातलो स्मीयरलाई मात्र फिक्स (fix) गर्नुहोस् ।
- स्टेनिङ्ग गर्नु अघि मिथानोल ९:भतजबलय० लाई पूर्ण रूपमा सुक्न दिनुहोस् ।

#### जिम्साको घोल (Dilution of Giemsa) तयार गर्ने

- प्रयोग गर्नु अघि जिम्सालाई फिल्टर गर्नुहोस् । फिल्टर गर्नु अगाडि राम्रोसँग हल्लाउनुहोस् ।
- जिम्साको घोल (Dilution of Giemsa) तयार गर्नलाई सफा र सुख्खा उपकरणहरू (सिलिण्डर, पिपेट आदि) को प्रयोग गर्नुहोस् ।
- सही (accurate) मात्राको जिम्साको घोल (जिम्साको concentration ३% वा १०% को जिम्सा) बनाउनुहोस् ।
- यदि तयार गरेको २ घण्टा भन्दा बढी भएको छ भने यो जिम्साको घोल (Dilution of Giemsa) को प्रयोग नगर्नुहोस् ।
- उपकरणहरूलाई धोइसकेपछि फिल्टर गरिएको पानीले राम्रोसँग पखाल्नुहोस् ।
- रिएजेन्टस (Reagents) वा फिल्टर गरिएको पानीसँग कहिल्यै पनि साबुनलाई नमिसाउनुहोस् ।

## स्टेनिङ्ग

- प्रत्यक्ष सूर्यको किरण नपर्ने गरी स्टेन गर्नुहोस् ।
- ठीक तोकिएको समय सम्म मात्र जिम्साको घोलबाट स्टेन गर्नुहोस् ।
- स्टेन गरिएको स्लाइडहरूलाई सफा पानीले बिस्तारै पखाल्नुहोस् । पानीलाई सिधा बाक्लो स्मीयर तिर नखन्याउनुहोस् (रगत स्लाइडबाट मेटिन सक्छ) ।
- कुनै नयाँ ब्याचको स्टेन वा नयाँ कम्पनीको प्रयोग गर्नु अगावै जिम्साको घोल, त्यसको concentration र स्टेनिङ्गको समयलाई परिक्षण गरी र अनुकूल बनाई प्रयोग गर्नुपर्छ ।

## पानीको गुणस्तर

- राम्रो स्टेन हुनलाई pH ७.२ को न्युट्रल (neutral) पानी चाहिन्छ (न अति अम्लीय (acid) न अति क्षारीय (alkaline)। पानी सफा र फिल्टर गरिएको हुनुपर्छ ।

नोट : घोलको अम्लीयपन (acidity) वा क्षारीयपन (alkalinity) को डिग्रीको चिन्ह pH हो; pH को मान (value) ० देखि ७ भएमा अम्लीयपन (acidity) जनाउँछ र ७ देखि १४ भएमा क्षारीयपन (alkalinity) जनाउँछ । pH indicator paper (litmus paper) को प्रयोग गरेर pH पत्ता लगाउन सकिन्छ ।

## नराम्रो स्टेन भएको खण्डमा निम्न कुराहरूमा ध्यान दिनु पर्दछ:

- पहिले सबै प्राविधिक चरणहरू राम्रोसँग गरिएको छ कि छैन भनेर चेक गर्नुपर्दछ । रगतको स्मीयर, फिक्सिङ (Fixing), जिम्साको घोल तयार गर्ने तरिका, स्टेनिङ्ग उपकरणहरू धुने र भण्डारण गर्ने विधिहरू स्टेनिङ्गको गुणस्तरमा असर पार्न सक्दछ ।
  - यदि यी राम्रोसँग गरिएको भएतापनि गुणस्तरको स्टेनिङ्ग भएको छैन भने पानीको गुणस्तर (pH ७.२) नभएको वा जिम्साको ब्याच खराब भएको हुनसक्छ । त्यसैले बफर पानीको गुणस्तर जाँच गर्नुपर्दछ अथवा फेर्ने प्रयास गर्नुपर्दछ अथवा नयाँ ब्याचको जिम्साको प्रयोग गर्नुपर्दछ ।
  - कहिलेकाँही एक दिनमा केही मात्र नराम्रो स्लाइडहरू हुन्छन् । यस्तो भएमा स्मीयरलाई दोहोराउनुपर्दछ । यदि यो सम्भव छैन भने ती स्लाइडहरूलाई मिथानोल (methanol) मा धोएर फेरी स्टेन गर्न सकिन्छ । पुरानो स्टेनलाई हटाउनुपर्दछ र तिनीहरूलाई पूर्ण रूपमा सुक्न दिनुपर्दछ र होस पुऱ्याएर तिनीहरूलाई फेरी स्टेन गर्नुपर्दछ ।

वैकल्पिक रूपमा यदि व्यवसायिक बफर चक्कीहरू उपलब्ध छन् भने pH ७.२ को बफर पानी (Buffered water) तलका चरणहरू अपनाई तयार गर्नुहोस् ।

- १ लिटर डिस्टिल्ड (distilled) वा डिआयोनाइज्ड (de-ionized) पानी सफा भाँडा वा बिकर (beaker) मा खन्याउनुहोस् ।
- एउटा बफर चक्की भाँडामा राख्नुहोस् ।
- बिस्तारै घुमाएर हल्लाउनुहोस् ।
- बफर पानीको बोटललाई लेबल गर्नुहोस् ।
- जिम्सा वर्किङ्ग घोल (working solution) बनाउनलाई pH ७.२ मा बफर पानीको प्रयोग गर्नुहोस् ।

बनाउने विधिको निर्देशिका पुस्तिका र म्याद समाप्त हुने मिति नोट गर्नुहोस् । कम्पनी अनुसार तयार गर्नको लागि निर्माताको निर्देशन फरक फरक हुन सक्छ ।

औलो परजीवीहरू राम्ररी स्टेन गरिएको स्मीयरहरूमा स्पष्टसँग देखिन्छन् । स्टेनिङ्गको गुणस्तर वर्किङ्ग (working) स्टेनको घोलको pH मा भर पर्छ ।

#### ४.७.५ जिम्सा स्टेनसँग रगतको स्मीयर (Blood Film) रङ्गाउने तरिका

##### जिम्सा स्टेन (Giemsa Stain)

यो रङ्ग अल्कोहलमा आधारित Romanowsky Stain हो । यो तयारी अवस्थामा बजारबाट सिधै खरिद गर्न वा प्रयोगशालामै पनि बनाउन पनि सकिन्छ । Giemsa Stain इओसिन (Eosin) र मिथाइलिन ब्लु (Methylene Blue) को समिश्रण हो । Eosin ले परजीवीको क्रोमाटिन (Chromatin) लाई रातो वा गुलाबी रङ्ग दिन्छ भने Methylene Blue ले परजीवीको Cytoplasm लाई नीलो बनाउँछ । यसले सेतो रक्तकोषलाई नीलो वा लगभग कालो रङ्गको बनाउँदछ ।

##### रगतको स्मीयर Staining गर्ने तरिका

जिम्सा स्टेन (Giesma Stain ) बाट दुई प्रकारले रगतको स्मीयर Staining गर्न सकिन्छ ।

१) छिटो (१०% staining) गर्ने तरिका (Rapid 10% Method)

२) ढिलो (३% staining) गर्ने तरिका (Slow 3% method)

१) छिटो (१०% staining) गर्ने तरिका (Rapid 10% Method)

यो साधारणतया प्रयोग गरिने तरिका हो । १-१५ वटा सम्म स्लाइडहरू रङ्गाउन यो तरिका अपनाउन सकिन्छ । यो तरिकाबाट प्रयोगशाला परिक्षण (Lab Test) छिटो गर्न सकिन्छ ।

##### आवश्यक सामग्रीहरू:

- जिम्सा स्टेन,
- मिथानोल (Methanol)
- एबजरवेन्ट कटन
- ५ मि.लि. क्षमताको टेष्ट ट्यूबहरू (Test tubes)
- डिष्टील्ड बफर वाटर (pH ७.२)
- पाश्चर पापेट (Pasteur Pipette)
- प्लाष्टिक स्टेनिङ्ग ट्रे (Plastic Staining tray or rack)
- स्लाईड-ड्राइङ्ग न्याक (Slide drying rack)
- सानो इलेक्ट्रीक हेयर ड्रायर (Small Electric hair drier)
- Timer
- Gloves

##### तरिका:

- रगतको बाक्लो स्मीयरलाई staining गर्नु भन्दा अघि राम्रोसँग सुकाउनु पर्दछ । त्यसको लागि भन्दा कम तापक्रममा सुकाउनु पर्दछ । स्लाइडहरू धेरै तात्न दिनु हुँदैन जसले Heat Fix गरेर राम्रो रङ्ग बस्दैन ।

- रगतको पातलो लेपलाई मिथानोलमा भिजाइएको कटन प्याड (Cotton Pad) ले विस्तारै पुछेर Dabbing फिक्स गर्नु पर्दछ । पातलो स्मीयरलाई २ सेकेण्डको लागि मिथानोल (methanol) भएको सानो भाँडा वा बिकर (beaker) मा डुबाउनुहोस् ।
- बाक्लो स्मीयरसँगको सम्पर्कबाट टाढा राख्नुहोस् । मिथानोलको बाफले पनि बाक्लो स्मीयरलाई फिक्स (fix) गराउन सक्छ ।
- स्लाइडहरूलाई ट्रे (tray) वा ड्राइड ज्याक (drying rack) मा राख्नुहोस् । मिथानोल (methanol) फिक्सड (fixed) गरिएको पातलो स्मीयरलाई समतल सतहमा २ मिनेटको लागि हावामा सुक्न दिनुहोस् ।
- १० मि.लि. जिम्सा स्टेनको Stock solution ९० मि.लि. बफर वाटरमा मिसाएर १०% जिम्सा स्टेन बनाउन सकिन्छ ।
- एउटा स्लाइड रङ्गाउन ३ मि.लि. जति १०% जिम्सा स्टेन चाहिन्छ ।
- स्लाइडहरूलाई ज्याकमा राखेपछि विस्तारै १०% जिम्सा स्टेन लाई स्लाइडहरू माथि खन्याउने ।
- ८-१० मिनेट सम्म त्यत्तिकै छोड्ने ।
- त्यसपछि सफा पानीले स्लाइडको रङ्ग पखाल्ने ।
- जब पानीले सबै रङ्ग पखालिन्छ तब स्लाइडहरू अर्को ज्याकमा राखेर सुकाउने ।

## २) ढिलो (३% staining) गर्ने तरिका (Slow 3% method)

इपिडिमियोलोजिकल सर्वेक्षणहरू र फिल्ड अनुसन्धानको बेला सङ्कलन गरिएको रगतको स्मीयरहरूलाई स्टेनिङ्ग गर्न गराउन र स्लाइड बैकिङ्ग गर्नको लागि यो उपयुक्त छ ।

यो तरिका साधरणतया धेरै स्लाइडहरू (२० भन्दा धेरै) Staining गर्न प्रयोग गरिन्छ । यो तरिका पहिलाको छिटो गर्ने तरिका) भन्दा सस्तो तरिका हो ।

आवश्यक सामग्रीहरू:

- जिम्सा स्टेन
- मिथानोल
- एबजरवेण्ट कटन
- २० वटा स्लाइडहरू राख्न मिल्ने Staining Troughs
- बफर वाटर (एज ७.२)
- मेजरिङ्ग सिलिण्डर (Measuring Clinder) १०-२५ मि.लि. सम्मको
- फ्लास्क वा बिकर
- घडि (timing Clock)
- स्लाइड ड्राइङ्ग ज्याक (Slide drying rack)



तरिका:

- माथि उल्लेख गरिए अनुसार नै रगतको स्मीयर फिक्स गर्ने
- सबै फिक्स गरिएका स्लाइडहरू एक पछि अर्को गर्दै Staining Trough मा राख्ने
- ३ मि.लि. जिम्सा स्टेन्को Stock Solution ९७ मि.लि.बफर वाटरमा मिसाएर ३% जिम्सा स्टेन बनाउन सकिन्छ ।
- यसरी तयार पारिएको स्टेन विस्तारै स्लाइडहरू राखिएका Staining Trough मा खन्याउने । तर रगतको बाक्लो स्मीयर बनाइएको स्लाइडमा सोभ्रै रङ्ग खन्याउन भने हुदैन ।
- ४५-६० मिनेट सम्म स्लाइडहरू रङ्गमा नै राख्ने
- त्यसपछि विस्तारै सफा पानी त्वयगनज मा हालेर Iridescent 'scum' हटाउने
- विस्तारै सफा पानीले स्लाइडहरू धुने
- सावधानी पूर्वक Staining गरिएका स्लाइडहरू एक-एक गर्दै अर्को न्याकमा राखेर सुकाउने बाक्लो रगतको स्मीयरहरूलाई स्टेनिङ्ग गर्नु अगाडि पूर्ण रुपमा सुकेको हुनुपर्छ । तिनीहरूलाई सानो हेयर ड्रायर (hair-dryer) को तातो हावाले चाँडै सुकाउन सकिन्छ । स्लाइडहरूलाई धेरै तताउन हुन्न किनकी तिनीहरू "heat fix" हुन सक्छन् र नराम्ररी स्टेन हुन्छन् ।
- पखाल्नको लागि प्रयोग गरिने पानीको pH महत्वपूर्ण हुन्छ किनकी अम्लीय (acidic) पानीले स्मीयरहरूको रङ्ग उडाउन सक्छ । त्यही भएर स्लाइडहरूलाई स्टेनिङ्गको लागि प्रयोग गरिएको pH ७.२ बफर पानीले पखाल्नुपर्छ ।

जिम्सा स्टेनले स्टेनिङ्ग (३% वा १०% स्टेन) वर्किङ्ग घोल (working solution) गर्ने बेला टल्किने हरियो फोहर (metallic green scum) ले सतह छोपिन्छ । यसलाई पखाल्ने बेला रगतको स्मीयरहरूमा पर्न दिनुहुन्न किनकी यसले परीक्षणलाई बिगार्न सक्छ ।

तयार गरिसकेपछि रगतको स्मीयरहरूलाई जति सक्दो चाँडो स्टेन गर्नुपर्छ । रगतको स्मीयरहरूलाई केही दिन सम्म स्टेनिङ्ग नगरी भण्डारण गरी राखेमा आफै फिक्सेसन (fixation) भई माइक्रोस्कोपीको लागि स्मीयर काम नलाग्ने हुनसक्छ, त्यसैले गर्दा चाँडो स्टेन गर्नुपर्छ ।

एक-एक वटा स्लाइडहरूलाई स्टेनिङ्ग गर्ने विधि:

१. स्लाइडहरूलाई एक-एक गरी स्टेनिङ्ग गर्ने न्याकमा एक अर्कालाई नछुने गरी वा नटाँसिने गरी राख्नुहोस् ।
२. स्लाइडहरू पूरै छोपिञ्जेल सम्म स्टेनलाई विस्तारै स्लाइडहरूमा खन्याउनुहोस् । हरेक स्लाइडलाई लगभग ३ मि.लि. जति स्टेन चाहिन्छ । स्टेनलाई सिधै बाक्लो स्मीयरमा खन्याउन नदिनुहोस् ।
३. स्टेनलाई स्लाइडहरूमा ३% जिम्साको घोलसँग ४५-६० मिनेट र १०% जिम्साको घोलसँग १०-१५ मिनेट छोड्नुहोस् । उपयुक्त स्टेनिङ्गको समय जिम्साको गुणस्तर अनुसार प्रत्येक प्रयोगशालामा आन्तरिक गुणस्तर नियन्त्रणद्वारा निर्धारण गर्नुपर्छ ।
४. स्टेनको सतहमा रहने जिम्साको बाक्लो टल्किने तह (metallic green scum) लाई बफर पानीले विस्तारै पखाल्नुहोस् । यसरी पानीले पखाल्दा पातलो स्मीयरको छेउबाट पानीले

खन्याउनुपर्छ । अनावश्यक खलबल हुन नदिन र बाक्लो रगतको स्मीयरहरू पानीले धोइएर बगन नदिन ७.२ pH को बफर पानीलाई पातलो स्मीयरको छेउबाट स्लाइडहरूमा खन्याउनुपर्छ ।

५. स्लाइडहरूलाई एक एक गरी निकाल्नुहोस् र सुकाउनको लागि छोड्नुहोस् । यसरी सुकाउँदा बाक्लो स्मीयरलाई तलतिर फर्काएर राख्नुहोस् ।

रङ्गाउन प्रयोग गरिएका भाँडाहरू (Glass Wares) को हेरचाह:

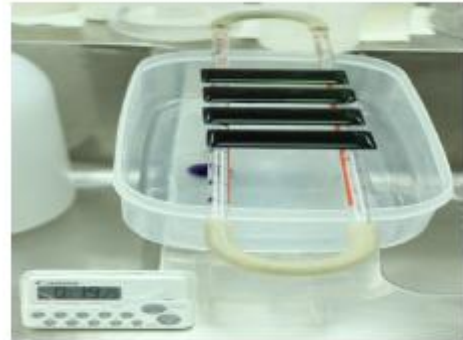
मिजारिङ्ग सिलिण्डर, पाइपेट, स्टेनिङ्ग ट्रे र विकरहरू राम्रोसँग सफा गरी सुकाउनु पर्दछ । फोहोर भाँडाहरू प्रयोग गरेर रङ्गाइएका रगतका लेपहरूबाट गुणस्तरीय परिक्षण हुन सक्तैन ।

जिम्सा स्टेन गर्दा प्रयोग गरिएका सबै Equipment राम्रोसँग तुरुन्तै पखाल्नु पर्छ । त्यसमा Detergent को कुन अंश नरहने गरी पखाल्नुपर्छ । Detergent ले बफर वाटरको PH घटवढ पारिदिन सक्छ ।

जिम्सा स्टेन ३ % वा १० % सँग रगतको स्मीयर Staining गर्दा हरियो लेउ बस्न सक्छ, त्यसैले यस्तो लेउबाट स्लाइडलाई जोगाउनु पर्दछ ।



Stock Giemsa & Buffer



चित्र: जिम्साको प्रयोग गर्दै स्लाइड स्टेनिङ्ग गरिँदै (Slide staining with Giemsa)

## खण्ड ५: सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Microscope)

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

- सहि तरिकाले सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Microscope) प्रयोग गर्न
- मोनोकुलर (Monocular) र बाईनोकुलर (Binocular) सुक्ष्मदर्शक यन्त्रको बारेमा जानकारी राख्न
- सुक्ष्मदर्शक यन्त्रका सबै भागहरूको बारेमा जानकारी लिन
- सुक्ष्मदर्शक यन्त्र उचित तरिकाले भण्डारण र त्यसको सुरक्षा गर्न

सुक्ष्मजीव विज्ञानको विकास सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Microscope) को विकासपछि व्यापक रूपमा भएको पाउँदछौं । त्यसैले सर्वप्रथम सुक्ष्मदर्शक यन्त्रका बारे जानकारी लिनु आवश्यक छ । कुनै पनि स्वास्थ्य प्रयोगशालामा रगत, दिशा, पिसाब, खकार, आदी परीक्षण गर्दा सुक्ष्मदर्शक यन्त्रबिना यो सम्भव छैन । सुक्ष्मदर्शक यन्त्र डच बैज्ञानीक एन्टोनिभान ल्युवेनहक (Antony van Leeuwenhoek) ले पत्ता लगाएका हुन् ।

ग्रीकका दुई शब्द माईक्रो (Micro) र (Scope) बाट सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Microscope) बनेको हो । माईक्रो भन्नाले सुक्ष्म र स्कोप भन्नाले हेर्नु हो । त्यसैले सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Microscope) भनिएको हो । स्वास्थ्य प्रयोगशालामा यसको ठुलो भुमिका रहेको छ । सोभै आँखाले देख्न नसकिने माइक्रोमिटर (Micrometer) जस्ता साना वस्तुको आकृतिलाई यसको सहायताले ठुलो बनाएर हेर्न सकिन्छ । यसबाट रगतमा रहेका सुक्ष्म कोषहरू जस्तो राता रक्तकण (RBC), सेता रक्तकण (WBC), प्लाटलेटस् लगायत विभिन्न रोग ल्याउने हानिकारक सूक्ष्मजीव, जीवाणु (Bacteria), फगस (Fungus), प्रजीवाणु (Protozoa), जुकाका फुल (Ova), परजीवी (Parasite) आदी यसको प्रयोगबाट सजिलैसँग चिन्न सकिन्छ ।

सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (microscope) धेरै प्रकारका छन् । विभिन्न प्रकारका यस्ता यन्त्र आफ्नै विशेष कामका निम्ति प्रयोग गरिन्छन् । यसका प्रकार निम्न बमोजिम छन् ।

- १) सरल सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Simple microscope)
- २) कम्पाउण्ड सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Compound Microscope)
- ३) फ्लुरसेन्स सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Fluorescence Microscope)
- ४) डार्कफिल्ड सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Darkfield Microscope)
- ५) इलेक्ट्रोन सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Electron microscope)

याद गर्नुहोस्:

मलेरिया माइक्रोस्कोपिमा दक्षता हाँसिल गर्न सहि तरिकाले माइक्रोस्कोप प्रयोग गर्न जान्नु पर्छ । तसर्थ यसका सिमाहरु के के हुन् र माइक्रोस्कोपलाई कस्तो अवस्थामा राख्ने भन्ने कुरा थाहा पाउन जरुरी हुन्छ ।

### ५.१ सरल सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Simple microscope)

सरल सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Simple microscope) साधारणतया सानो वस्तुलाई ठुलो बनाउने ग्लास वा लेन्स मात्र हो । हामीले लगाउने चस्मा, हातले समाएर हेर्ने म्याग्निफाइड ग्लास (Magnifying glass) पनि एक किसिमका सरल सुक्ष्मदर्शकिय यन्त्र हुन् । यसमा एउटा मात्र लेन्स (lens) को प्रयोग गरिएको हुन्छ । यो यन्त्रबाट जीवाणुका कोलोनीको बनोट हेर्न सकिन्छ ।

### ५.२ कम्पाउण्ड सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Compound Microscope)

जुनसुकै स्वास्थ्य संस्थामा कम्पाउण्ड सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Compound Microscope) पाईन्छ । यो अति महँगो यन्त्र हो । यस यन्त्रलाई अनि जतनसाथ होसीयारीपुर्वक चलाएनुपर्छ । त्यसैले हामीले यसको व्यापक रूपमा अध्ययन गर्नुपर्दछ । साधारणतया कम्पाउण्ड सुक्ष्मदर्शक यन्त्र दुई प्रकारका हुन्छन ।

क) मोनोकुलर (Monocular): एउटा आँखाले माउ हेर्ने यन्त्रलाई मोनोकुलर सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Monocular Microscope ) भनिन्छ । यसमा एउटा मात्र आई पिस (Eye Piece) हुन्छ ।

ख) बाईनोकुलर (Binocular): एकैपटक दुईवटा आँखाले हेर्ने यन्त्रलाई बाईनोकुलर सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Binocular Microscope) भनिन्छ । यसमा दुईवटा आई पिस (Eye Piece) हुन्छ ।

यी बाहेक एकैपटक दुई जनाले हेर्न हुने, विधार्थी र शिक्षकले संगै हेर्न सकिने सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Teaching Microscope) पनि कम्पाउण्ड माइक्रोस्कोप हो ।

यसमा बाईनोकुलर सुक्ष्मदर्शक यन्त्रमा जस्तै दुई जना दुईतिर बसेर हेर्न मिल्छ, त्यस्तै क्यामेरा मिलाएर फोटो खिचन सक्ने सुक्ष्मदर्शक यन्त्र पनि पाईन्छ ।

### ५.३ सुक्ष्मदर्शक यन्त्रका भागहरु (Parts of microscope)

सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Microscope) मा निम्न विभिन्न भागहरु छन् । प्रत्येक भाग (Part) का आफ्नै विशेष कार्यहरु रहेका छन् ।

१ र २) बडी ट्युब (Body tube) र ड्र ट्युब (Draw tube)

३) रिभोल्विङ नोजपिस (Revolving nosepiece)

४) अब्जेक्टभहरु (Objective)

५) स्टेज (Stage)

६) कन्डेन्सर (Condenser)

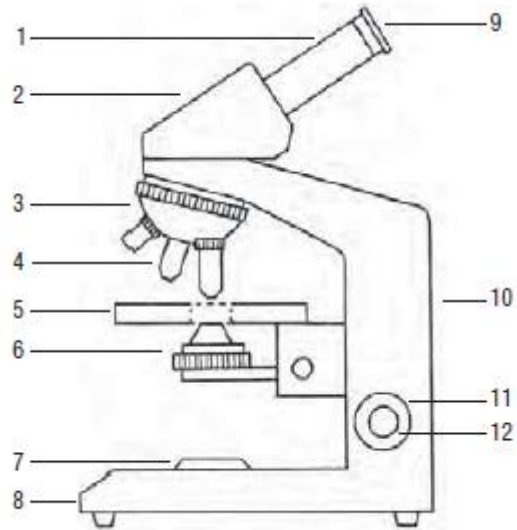
७) इल्युमिनेटर (Illuminator)

८) आधार (Base)

९) आई पिस (Eye Piece)

१०) आर्म (Arm)

११ र १२) मिलाउने पेच (Coarse and fine adjustment knob)



## १ र २) बडी ट्युब (Body tube) र ड्र ट्युब (Draw Tube)

बडी ट्युब (Body tube) र ड्र ट्युब (Draw Tube) को बाहिर आर्मसँग जोडिएको हुन्छ, यसभन्दा माथि ड्र ट्युब हुन्छ जुन आइपिस (Eye piece) सँग जोडिएका हुन्छ र बडी ट्युब भित्र राखिएको हुन्छ।

## ३) रिभोल्विङ नोज पिस (Revolving Nose Piece)

यो भाग सुक्ष्मदर्शक यन्त्रको बडी ट्युब मा जोडीएको हुन्छ, यसलाई सजिलैसँग घुमाउन सकिन्छ। घुमाउँदा अब्जेक्टभ ठीक ठाउँमा पुगेपछि टिङ्ग आवाज आउछ। यसमा विभिन्न शक्तिका अब्जेक्टभहरु जडान गरिएका हुन्छन्। यसमा ३ देखि ५ वटा सम्म अब्जेक्टभ राख्न हुने ठाँउ रहेका हुन्छन्।

## ४) अब्जेक्टभ (Objective)

अब्जेक्टभहरु रिभोल्विङ नोजपिस मा जडान भउर रहेका हुन्छन्। यो साधारणतया चार थरीका हुन्छन्। प्रत्येक अब्जेक्टभमा वस्तुलाई ठुलो पारेर देखाउने फरक फरक शक्तिका (Lenses) हरू जोडिएका हुन्छन्।

क) धेरै कम शक्तिको अब्जेक्टभ (Very low power objective): यसमा 4X लेखिएको हुन्छ। यसले वस्तुलाई ४ गुणाले ठूलो पार्छ।

ख) कम शक्तिको अब्जेक्टभ (low power objective): यसमा 10X लेखिएको हुन्छ, यसले वस्तुलाई १० गुणाले ठूलो पार्छ।

ग) बढि शक्तिको अब्जेक्टभ (High power Objective): यसमा 40x वा 45x लेखिएको हुन्छ। यसले वस्तुलाई देखिएको अनुपातमा ४० वा ४५ गुणाले ठूलो पार्छ। यसबाट हेर्ने फिल्डलाई HPF भनिन्छ।

घ) तेल प्रयोग हुने अब्जेक्टभ (oil immersion objective) : यसमा १००x लेखिएको हुन्छ। यो धेरै शक्तिशाली हुन्छ। यसले वस्तुलाई १०० गुणाले ठूलो पारेर देखाउछ। यो अब्जेक्टभ प्रयोग गर्दा यसका नाम अनुसार नै तेलको प्रयोग गरेर हेर्नुपर्छ। हेर्नु पर्ने नमूना र अब्जेक्टभको लेन्समा तेलले छोएको हुनुपर्छ। त्यसैले यसलाई तेल प्रयोग हुने अब्जेक्टभ (oil immersion objective) भनिएको हो।

शुक्ष्मदर्शक यन्त्रमा प्रयोग हुने केहि तेलहरु (Microscope) oil): तेल धेरै थरीका हुन्छन्। यसमा प्रयोग गर्ने तेलको रिफ्रेक्टभ इन्डेक्स (Refractive index) र शुक्ष्मदर्शकिय यन्त्रमा प्रयोग गर्ने स्लाइडको रिफ्रेक्टभ इन्डेक्स करिब करिब बराबर हुन्छ (१.५)। त्यसैले अब्जेक्टभ (oil immersion) लाई तेल आवश्यक पर्छ। केहि तेलका उदाहरणहरु जस्तै :

- सिडार उड तेल (Cedar wood oil) : यो तेल चाडै सुक्छ, त्यसैले हिजोआज यसको प्रयोग कम हुँदै गएको छ।
- सिन्थेटिक तेल (synthetic oil) : आजभोली प्रयोगशालामा यो तेल धेरै प्रयोग गरिन्छ। यो तेल छिटो सुक्दैन।

- पाराफिन तेल (Paraffin oil) : सजिलैसँग उपलब्ध हुने हुनाले यो तेल पनि प्रयोगशालामा व्यापक रूपले प्रयोग भएको पाउँछौं तर यो त्यती राम्रो तेल भने मानिदैन ।

कहिलेकाहिँ वस्तुलाई microscope बाट हेर्दा लेन्सको कारणले ठुलो देखिए पनि स्पष्ट नदेखिनु (Resolution) रङ्गि चङ्गि देखिनु, नमूना भन्दा बाहिरको वस्तु देखिने हुन्छ । यो एउटा मात्र लेन्स र कमसल लेन्सको कारणले हुन सक्छ । त्यसैले माथि उल्लेखित अब्जेक्टभमा विभिन्न खालका लेन्सहरु जोडिएका हुन्छन् । यिनै बढि लेन्सको कारणले पनि यस्ता खालको सुक्ष्मदर्शक यन्त्रलाई कम्पाउण्ड सुक्ष्मदर्शक यन्त्र (Compound Microscope) भनिएको हो ।

जति राम्रो लेन्स जोडिएको हुन्छ, त्यति नै वस्तु ठुलो, सफा र स्पष्ट (Resolution) देखिन्छ । त्यही अनुरूप नै सुक्ष्मदर्शक यन्त्रको मूल्य पनि बढि पर्दछ ।

## ५) स्टेज (Stage)

यो आर्म (Arms) को तल्लो भागमा रहेको हुन्छ । स्लाइडमा बनाएको स्मीयरलाई परीक्षण गर्नको लागि स्लाइड राख्ने समतल भागलाई स्टेज भनिन्छ । यो गोलो वा चारपाटे आकारको हुन्छ । यसको बीचमा प्वाल परेको हुन्छ ।

स्लाइडमा भएको नमूनालाई त्यही प्वालमाथी पार्नुपर्छ, जसबाट कन्डेन्सरबाट आएको प्रकाश छिरेको हुन्छ । यसमा स्लाईडलाई च्याप्ने क्लिप (Clip) राखिएको हुन्छ । कुनै स्टेजमा स्लाइड यतायउता दायाँ बायाँ लाग हुने गरी व्यवस्था गरिएको हुन्छ । जसलाई मेकानिकल स्टेज (Mechanical stage) पनि भनिन्छ ।

## ६) कन्डेन्सर (Condenser)

सुक्ष्मदर्शक यन्त्रबाट सुक्ष्म जीवाणु तथा अन्य सुक्ष्म वस्तुहरुलाई परीक्षण गर्दा धेरै मात्रामा प्रकाश (Light) को जरुरत पर्दछ । त्यसैले प्रकाशलाई एकै ठाउँमा ल्याउन र प्रशस्त उज्यालो बनाउन कन्डेन्सरको व्यवस्था गरिएको हुन्छ । सुक्ष्मदर्शक यन्त्रको यो भाग स्टेज (Stage) को ठीक मुनि राखिएको हुन्छ । कुनै यन्त्रमा स्टेजसँगै टाँसिएको पनि हुन्छ । कन्डेन्सर (Condenser) मा विभिन्न भागहरु हुन्छन् ।

- लेन्स (Lense)
- आइरिस डायफ्राम (Iris Diaphragm)
- फिल्टर (Filter)
- एडजस्टमेन्ट पेच (Adjustment Knob)

छरिएका प्रकाशका किरणलाई लेन्सले एकै ठाउँमा ल्याउछ । कन्डेन्सरलाई मिलाउने पेच (Condenser adjustment knob) द्वारा तल माथि गरेर प्रकाश बढि चाहिएमा कन्डेन्सर माथि लानुपर्छ ।

यसमा आइरिस डायफ्राम (iris Diaphragm) हुन्छ । यसलाई पुरा आधा खोल्न वा बन्द गर्न मिल्छ र प्रकाशलाई घटबढ गर्न सकिन्छ । धेरै प्रकाश चाहिएमा यो पुरै खोल्नुपर्छ र प्रकाश जाने प्वाल ठुलो पार्नु पर्छ ।



यसमा रहेको अर्को भाग फिल्टर (filter) हो जसलाई आइरिस डायफ्राम माथि राखिएको हुन्छ । यसले प्रकाशलाई छान्छ र जुन रङ्गको फिल्टर हो त्यही रङ्गको प्रकाश पठाउँछ । यिनीहरु तीन किसिमका रङ्ग दिनेमा : क्रिम रङ्ग, नीलो रङ्ग र हरियो रङ्गका ग्लासका गोला टुक्रा हुन् । यस्ता फिल्टरको कारणले आँखालाई प्रकाशबाट हुने हानिमा सुरक्षा गर्न समेत मद्दत मिल्छ ।

### ७) इल्युमिनेटर (Illuminator)

ऐना (Mirror) को कार्य नमूना परीक्षणमा आवश्यक प्रकाश पुऱ्याउनु हो । यसलाई शुक्ष्मदर्शक यन्त्रको आधार वा यसभन्दा अलि माथि राखिएको हुन्छ । यसलाई चारैतिर घुमाउन सकिन्छ र प्रकाशको श्रोततिर फर्काउन पनि मिल्ने हुन्छ । प्रकाशलाई यस ऐनाबाट परावर्तन गरी कन्डेन्सरबाट स्लाइड (Slide) मा भएको नमूना हुँदै अब्जेक्टभ (objective) सम्म पुऱ्याईन्छ । यसका दुई सतह हुन्छन् : समतल (Plane) र नतोदर अर्थात् कन्केभ (Concave) ।

साधारणतया: सम्म परेको ऐना (Plane Mirror) प्रयोग गरिन्छ । समतल ऐनाले जसरी प्रकाश किरण आएका छन् । त्यसै गरी परावर्तन (Reflection) गर्दछ भने नतोदर ऐना (Concave Mirror) ले आएको प्रकाशको किरणलाई परावर्तन (Reflection) गरी एकै ठाउँमा ल्याउँछ र बढि उज्यालो प्रकाश दिन्छ । त्यसैले प्रशस्त प्रकाश चाहिएमा नतोदर ऐना (Concave Mirror) प्रयोग गर्नुपर्छ ।

प्रकाश परावर्तन गर्दा ऐनालाई घुमाएर प्रकाश श्रोत (light source) तिर फर्काउनु पर्छ । सुक्ष्मदर्शक यन्त्रमा प्रकाश दुई प्रकारले पाउन सकिन्छ ।

१) प्राकृतिक प्रकाश (Day/Natural light) र

२) अप्राकृतिक प्रकाश (Artificial Light) जस्तै : इलेक्ट्रिक

अप्राकृतिक प्रकाशमा इलेक्ट्रिक टेबुल बत्ती (Table Lamp) राखिएको हुन्छ । कुनै कुनै सुक्ष्मदर्शक यन्त्रमा ऐनाको सट्टामा इलेक्ट्रिक बत्ती (electric Bulb) यन्त्रको आधारमा राखिएको हुन्छ जसमा प्रकाशलाई घटाउन बढाउन पनि सकिन्छ ।

### द) आधार (Base)

चित्रमा देखाएभैं शुक्ष्मदर्शक यन्त्रलाई ठाडो पारेर अड्याइराख्ने सबभन्दा तल्लो भाग आधार (Base) हो । यसलाई फुट (Foot) पनि भनिन्छ । यो विभिन्न गोलो, चारकुने, यु (U) आकारको हुन्छ । यन्त्रको सबै भर आधारमा पर्दछ । यो भाग सबभन्दा गह्रौँ हुन्छ । जसले गर्दा टेबुलमा यन्त्र स्थिर भएर रहन्छ र साधारणतया: शुक्ष्मदर्शक यन्त्र ढल्दैन ।

### ९) आइ पिस (Eye Piece)

आइ पिसलाई आइ पिस ट्युबभिन्न राखिएको हुन्छ । जसबाट वस्तुलाई हेरिन्छ । त्यसैले यसलाई आइ पिस भनिएको हो । यसमा लेन्स राखिएको हुन्छ । फरक शक्तिका लेन्सले त्यही गुणा अनुसारले ठुलो पार्दछन । अब्जेक्टभबाट ठुलो पारेको सुक्ष्मजीव वा वस्तु अझ ठुलो पार्ने यसको काम हो । आइपिस 5x, 7.5x, 10x, 15 x गुण शक्तिका हुन्छन् । एउटा  $9\mu$  ठुलो RBC लाई 100c को अब्जेक्टभ र 10c को आइपिस मिलाएर हेऱ्यो भने  $10 \times 100 = 100$  गुणा

अर्थात 7mm ठूलो देखिन्छ । यस किसिमको ठूलो बनाउने क्रियालाई म्याग्नीफिकेशन (Magnification) भनिन्छ ।

#### १०) आर्म (Arm)

आर्म प्रायः C आकारको हुन्छ । यन्त्रलाई एक ठाउँबाट अर्को ठाउँमा सार्दा यसैमा समातेर सार्न वा लाग्न सकिन्छ । आर्मको छेउ वा तल एडजस्टमेन्ट पेच (Adjustment knob ) हरू राखिएको हुन्छ ।

#### ११ र १२) मिलाउने पेच (Adjustment knob)

यो आर्मको छेउमा राखिएको हुन्छ । पेचहरू दुई किसिमका हुन्छन्, एकै पटक धेरै मिलाउने/खस्रो पेच (Coarse Adjustment knob) र अलि अलि गरेर मिलाउने/मिहिन पेच (Fine Adjustment knob) । कुनै सुक्ष्मदर्शक यन्त्रमा यस्ता पेच फरक फरक ठाउँमा हुन्छन् भने कुनैमा एकै ठाउँमा दुवै पेच मिलाएर राखिएको हुन्छ । यसको सहायताद्वारा स्टेज र अब्जेक्टभको दूरीलाई घटबढ गरी परिक्षण गरिने नमुनालाई देख्ने गरी मिलाउन सकिन्छ । खस्रो मिलाउने पेच (Coarse Adjustment Knob) को सहायताले दूरीलाई एकै पटक धेरै वा थोरै बनाउन सकिन्छ भने मिहिन मिलाउने पेच (Fine Adjustment Knob) ले कम दूरी घटबढ गर्न सकिन्छ ।

यस्ता पेचहरूले कुनै सुक्ष्मदर्शक यन्त्रमा स्टेजलाई तलमाथि गराउँछन् भने कुनैमा अब्जेक्टभलाई तलमाथि सार्नमा मद्दत गर्दछन् ।

#### ५.४ सुक्ष्मदर्शक यन्त्रको हेरचाह (Care of Microscope)

- काम नभएको बेला धुलोबाट बचाउन सुक्ष्मदर्शक यन्त्रलाई प्लाष्टिकको खोलले छोपेर वा बक्सभित्र राख्नुपर्छ ।
- चिसोले सुक्ष्मदर्शक यन्त्र विग्रने हुनाले रसायन सिलिका जेल (Silica Gel) यन्त्रको नजिक राख्ने वा १५ वाटको बल्बको नजिक तातोमा राखेर सुकाउनु पर्छ ।
- यन्त्रको कुनै भाग खोलेर वा भिक्केर फेरिरहनु हुँदैन । यसो गरेमा धुलो पस्न सक्छ र काममा बाधा दिन्छ ।
- यन्त्रलाई एक ठाउँबाट उठाएर अन्त लगदा सधैं एक हातले तलबाट (Base) मा टेवा दिइ अर्को हातले आर्म (Arm) मा समात्नु पर्छ ।
- यन्त्र प्रयोग गर्दा कडा र समतल ठाउँमा नहल्लने गरी राख्नुपर्छ ।
- लेन्स अब्जेक्टभ लेन्सहरूलाई लेन्स कागज वा टिस्यु पेपर (Lense Tissue Paper) ले पुछ्नुपर्छ । स्पिरिट वा अल्कोहल (Spirit or Alcohol) भने प्रयोग गर्नु हुँदैन ।
- लेन्समा तेल वा अन्य लेपहरू लागेमा (Xylene) ले पुछ्नुपर्छ ।
- लेन्सलाई जे पायो त्यहीले पुछ्नु हुँदैन अर्थात हरतरहबाट लेन्सलाई सफा राखिराख्नुपर्छ ।

## ५.५ सूक्ष्मदर्शक यन्त्र चलाउने तरिका (Handling of Microscope)

- सूक्ष्मदर्शक यन्त्रलाई समतल टेबलमा नहल्लने गरी राख्ने ।
- यन्त्रको ऐनालाई प्रकाशको स्रोततिर फर्काउने ।
- स्मीयर भएको (Specimen भएको) स्लाईडलाई यन्त्रको स्टेजमा राख्ने र क्लिपले च्याप्ने ।
- यन्त्रको कम शक्ति अब्जेक्टिभ (Low Power Objective) लाई मिलाउने ।
- आँखाले आइ पिसबाट हेरेर आवश्यक प्रकाश मिलाउने । ऐना घुमाएर आइरिस डायफ्राम खोल्ने वा बन्द गर्ने । कन्डेन्सरलाई तलमाथि गरेर आवश्यक प्रकाश मिलाउन सकिन्छ ।
- कोर्स एडजस्टमेन्टलाई घुमाएर अब्जेक्टिभलाई स्लाईडको नजिक दुरीमा लाने तर अब्जेक्टिभले स्लाईड छुनु हुँदैन ।
- त्यसपछि फाइन एडजस्टमेन्ट घुमाउँदा सफा वस्तु (image) देख्न सकिन्छ । त्यसलाई फेरी पनि प्रकाशलाई राम्ररी मिलाउने ।
- कम शक्तिको अब्जेक्टिभ ले नचिनिने वस्तुहरूलाई हेर्न बढि शक्तिको अब्जेक्टिभ लाई घुमाएर हेर्न यस बेला बढी प्रकाश चाहिन्छ ।
- जीवाणु रक्तकण हेर्न तेलमा डुबाएर हेर्ने अब्जेक्टिभ प्रयोग गरेर पहिला एक थोपा Oil immersion राखि एडजस्टमेन्ट विस्तारै चलाएर फोकस गरी हेर्नु पर्छ ।
- सूक्ष्मदर्शक यन्त्रमा एउटा अब्जेक्टिभले हेर्न खोज्दा वस्तु देखिने भयो भने बाइफोकल (Bifocal) भनिन्छ । यस्तो अवस्थामा कोर्स एडजस्टमेन्ट नचलाईकन फाइन एडजस्टमेन्ट मात्र चलाउनु पर्छ ।

## खण्ड ६: रगत स्मीयरको जाँच (Examining Blood Smear)

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

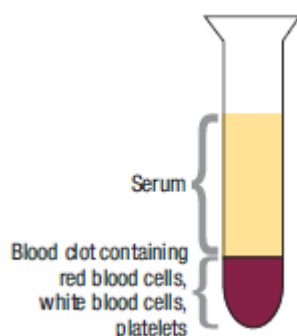
- रगतमा पाइने विभिन्न तत्वहरूको बारेमा जानकारी प्राप्त गर्न ।
- रगतमा बाक्लो र पातलो स्मीयरमा औलोको परजीवीको परिक्षण गर्ने तरिका थाहा पाउन ।
- रगतमा पाइने तत्वहरू चिन्न र वर्गीकरण गर्न ।
- सेतो रक्तकोषको मुख्य भागहरूको बारेमा जानकारी लिन ।
- रगतको स्मीयर बनाउँदा पाइने contaminant हरु चिन्न ।

### ६.१ रगतमा पाइने विभिन्न तत्वहरू (Components of Blood)

जब मानिसको भेन बाट रगत निकालेर टेष्ट ट्युबमा राखिन्छ, यो रातो रङ्गको तरल पदार्थको रूपमा देखिन्छ । ५-२० मिनेट नहल्लाइकन राखेमा यो दुई तहमा छुटीन्छ ।

यसमा माथि पट्टीको फिक्का पहुँलो तरल (Liquid) भागलाई Serum भनिन्छ र पिँधमा रहेको अर्ध ठोस (Semi Solid) गाढा रातो रङ्गमा रहेको भागलाई Clot भनिन्छ । Clot मा धेरै प्रकारका कोषिकाहरू पाइन्छन् जस्तै : राता रक्त कोष (Red Blood Cell), सेता रक्त कोष (White Blood Cell), र प्लेटलेट्स (Platelets) । ती कोषहरू धेरै सूक्ष्म हुन्छन् र यिनिहरूलाई माइक्रोस्कोपको सहायताले मात्र हेर्न सकिन्छ ।

यदि निकालिएको रगतमा Anti Coagulant राखिएको छ भने त्यसबाट Blood Smear बनाउँदा होशियार हुनु पर्दछ, किनभने यस प्रकारको रगत स्लाइडमा राम्रोसँग बस्दैन ।



### ६.२ जिम्सा क्तबप्लप्लन गरिएको रगतको पातलो स्मीयर (Thin Blood Smear)

माइक्रोस्कोपको 100X oil immersion objective र 10X ocular बाट हेर्दा सामान्यतया रगतका पातलो स्मीयरमा राता रक्त कोषहरू (Erythrocytes), सेता रक्त कोषहरू (Leucocytes) र प्लेटलेट्स (Thrombocytes) हरु पाइन्छन् ।

### क) राता रक्तकोषहरू (Red Blood Cells)

यी कोषहरू बाइकन्केभ (Biconcave) आकारको रूपमा रहेका हुन्छन् । लगभग एक माइक्रो लिटरमा ५,०००,००० वटा जती राता रक्त कोषहरू रगतमा पाइन्छन् । जिम्सा स्टेनसँग यी कोषहरू खैरो वा हल्का गुलाबी रंगका देखिन्छन् र यसको व्यास  $7.5\mu\text{m}$  मा पाइन्छन् । यी कोषहरूमा Nucleus हुँदैन ।

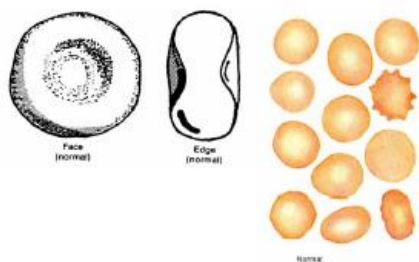
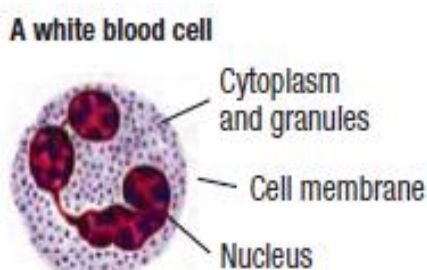


Fig 6. 1: Normal RBC as seen on a thin smear.

### ख) सेता रक्तकोषहरू (White Blood Cells)

यी कोषहरू १ माइक्रो लिटर रगतमा ६,०००-८,००० वटा सम्म पाइन्छन् । यो संख्या अवस्था अनुसार बृद्धि हुन पनि सक्छन् । यी कोषहरूलाई ल्युकोसाइट (Leucocyte) पनि भनिन्छ । यीनिहरू धेरै प्रकारका हुन्छन् । यी कोषहरूले लिने रंगको आधारमा यीनीहरूलाई एक आपसबाट छुट्याइन्छ ।



हरेका Leucocyte सँग एउटा Nucleus हुन्छ जो Cytoplasm ले घेरिएको हुन्छ । केहि Leucocyte हरुमा विभाजीत Nucleus (Multilobed) हुन्छ । Leucocyte हरु दुइ समुहमा विभाजीत गरिएको हुन्छ ।

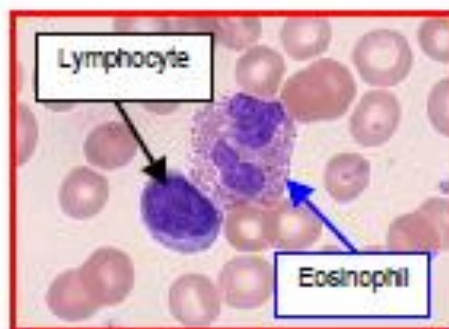
- पोलिमर्फोन्युक्लियर लिम्फोसाइटहरू (Polymorphonuclear Leucocytes)

**न्युट्रोफिल (Neutrophil) :** स्वस्थ मानिसहरूमा सेता रक्तकोषको ६५% भाग यी कोषहरूले ओगटेका हुन्छन् । जिम्सा स्टेनसँग यसका Nucleus हरु गाढा बैजनी/भन्टा (Deep Purple) रंगमा देखिन्छन् । औलो संक्रमित भएमा यी Neutrophil भित्र औलो परजीवीको रंग (Malaria Pigment) पाइन्छ । यो Pigment ले जिम्सा स्टेन लिदैन त्यसैले यो खैरो वा करिव कालो रंगको देखिन्छ ।

यसको साइज १००X अभ्जेक्टिभ (objective) बाट १२-१५ मि.मि. देखिन्छ । न्युक्लियस (Nucleus) थुप्रै (१२-१५) लोब्स (lobes), क्रोम्याटिन (chromatin) को स्ट्र्यान्डस (strands) द्वारा जोडिएको हुन्छ । क्रोम्याटिन (Chromatin) ले गाढा बैजनी रंगको डल्लो (mass) बनाउँछ । ग्रानुल्स (Granules) फिक्का बैजनी (Mauve) /नीलो र धेरै सानो आकारको देखिन्छ ।



**इयोसेनोफिल (Eosinophil) :** यी कोषहरु एउटा स्वस्थ्य मानिसमा १% देखि ४% सम्म पाइन्छ । यी कोषहरुका Cytoplasm का दानाहरु (Granules) गुलाबी रंगमा रंगिने हुँदा सजिलै चिन्न सकिन्छ । यसको साइज १२-१५ मि.मि. र गोलो आकारको देखिन्छ । न्युक्लियस (Nucleus) साधारणतया २ लोब्स (lobes) गाढा बैजनी डल्लो (mass) देखिन्छ । ग्रानुल्स (Granules) ठूलो, गोलो, सुन्तला रंगको हुनुका साथै नजिकै टाँसिएको (closely packed) वा कहिलेकाँही छरिएर रहेको हुन्छ ।



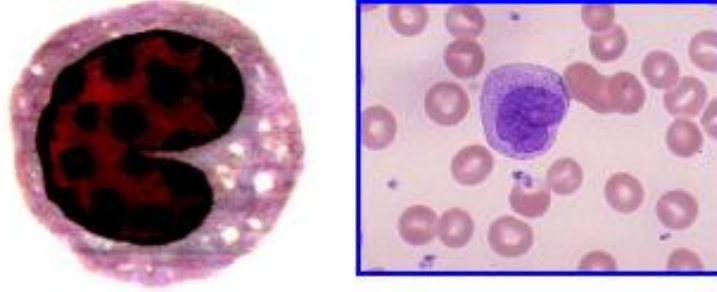
**बेसोफिल (Basophil) :** यी कोषहरु एकदमै कम मात्रामा पाइन्छन् । यसले सेता रक्तकोषहरुको १% भन्दा कम भाग ओगटेका हुन्छन् । यी कोषहरुको Cytoplasm का Granules नीलो रंगमा रंगिन्छन् । यसले मिडिएटर (Mediators) को रुपमा काम गर्छ, खास गरी हाइपरसेन्सिटिभिटी (hypersensitivity) भएको अवस्थामा बेसोफिलहरुको संख्या अत्यधिक रुपमा बढ्छ ।

- मोनोन्युक्लियर लिम्फोसाइटहरु (Mononuclear Leukocytes):

**मोनोसाइट (Monocyte) :** यी सेता रक्तकोषहरु मध्ये सबै भन्दा ठूला कोषहरु हुन् । यी कोषहरु १२-१६ मि.मि. व्यासको हुन्छन् । यी कोषहरुको न्युक्लियस (Nucleus) मृगौला वा सिमिको आकारमा पाइन्छन् । Cytoplasm मा केही मात्रामा दानाहरु हुन्छन् जो जिम्सा स्टेनसँग गुलाबी वा रातो



देखिन्छन् । यी कोषहरू २% देखि १०% सम्म पाइन्छन् । यिनीहरू भित्र पनि Malaria Pigment पाइन्छ । न्युक्लियस (Nucleus) एकनास नभएको, प्रायः मृगौला आकारको हुन्छ । ग्रानुल्स (Granules) मसिनो, धुलो जस्तो, नीलो आकारका हुन्छन् । साइटोप्लाजम (Cytoplasm) नीलो-खैरो रंगको हुन्छ र कहिलेकाँही भित्र भ्याकुल्स (vacuoles) सहित देखिनसक्छ ।



**लिम्फोसाइट (Lymphocyte) :** यी कोषहरू ठूला र साना गरि २ प्रकारका हुन्छन् । सेता रक्तकोषहरू मध्ये यी कोषहरू २०% देखि ४५% सम्म पाइन्छन् । जिम्सा स्टेनमा ठूला लिम्फोसाइटहरूको न्युक्लियस (Nucleus) ठूलो गाढा बैजनि (Deep Purple) रंगको देखिन्छ र यसको Cytoplasm सफा नीलो-पानी रंगको देखिन्छ । त्यसै गरी सानो लिम्फोसाइटहरू राता रक्तकोषहरू भन्दा केही ठूलो रूपमा देखिन्छन् । यिनीहरू सँग थोरै मात्रामा Cytoplasm हुन्छ र जिम्सा स्टेनमा न्युक्लियस (Nucleus) गाढा नीलो-कालो रंगको देखिन्छ । साधारणतया यसको साइज: ७-१० मि.मि. (अरु सेतो रक्तकोषहरू भन्दा सानो) हुन्छन् । यसको आकार गोलो हुन्छ ।

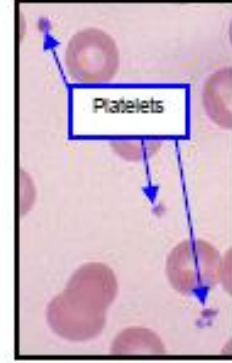


**प्लेटलेट्स (Platelets) :** प्लेटलेट्सहरू कोषहरूको टुक्राहरू हुन्, जसको महत्वपूर्ण काम रगत जमाउने (clotting) हो । यिनीहरू साना, राता रंगका असमान आकारमा हुन्छन् र यिनीहरूमा न्युक्लियस (Nucleus) हुँदैन । प्रति १ मि.लि. रगतमा लगभग १००००० प्लेटलेट्स पाइन्छन् । यी प्लेटलेट्सहरू ५-१० वटाको समूहमा एक भ्रुण्ड बनाएर आपसमा जोडिएर बस्छन् । मलेरिया माइक्रोस्कोपमा अभ्यस्त नभएका प्रयोगशालाकर्मीहरू यी प्लेटलेट्स र औलोको परजीवी छुट्याउनमा भुक्तिकन सक्छन् । यसको साइज १-४µm (१००X बाट) लगभग १-४ मि.मि. देखिन्छ । यो विभिन्न आकारहरूमा (त्रिकोण, तारा आकार, अण्डाकार इत्यादि) हुन्छ ।

Coloring by Giemsa stain: pink



Fig 6. 6 Platelets

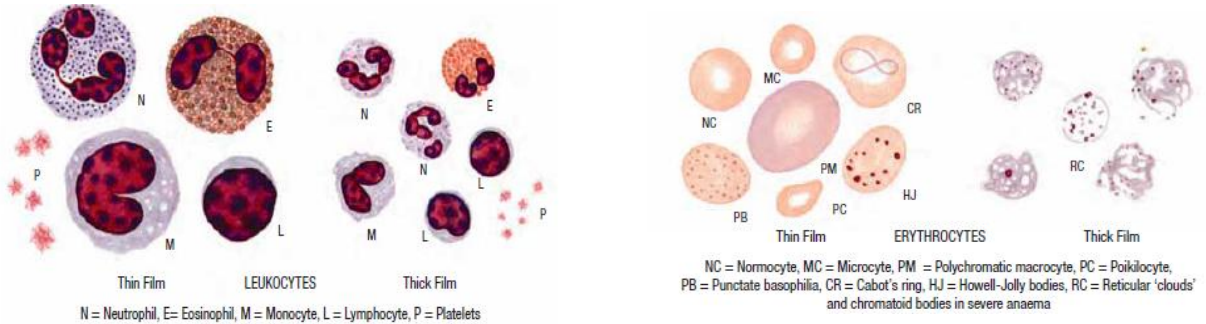


### ६.३ जिम्सा क्तबप्लप्लन गरिएको रगतको बाक्लो स्मीयर (Thick Blood Smear)

यी स्लाइडहरु माइक्रोस्कोपको x100 objective र x10 ocular बाट हेर्दा राता रक्तकोषहरु, सेता रक्तकोषहरु र प्लेट्लेट्सका पूर्ण भागहरु देखिदैनन् । सेता रक्त कोषहरु र प्लेट्लेट्स रगतको पातलो स्मीयरबाट हेर्दा जस्तै देखिन्छन् तर यी तरिकाबाट हेर्दा Nucleus को वरिपरि Cytoplasm देखिदैन ।

हेमोग्लोविन (hemoglobin) नभएका राता रक्तकोषहरु Thick mass को रुपमा यस्ता स्लाइडहरु अध्ययन गर्दा देखिन्छन् । रगतको बाक्लो स्मीयर (Thick Blood Smear) रंगाउदा, रंगमा भएको पानीले हेमोग्लोविन घोलिदिन्छ, यो प्रकृत्यालाई Hemoglobinization भनिन्छ ।

तल दिइएका चित्रहरुबाट तपाईंहरुलाई रगतका विभिन्न कोषहरु चिन्न सजिलो हुनेछ ।



यी अध्ययनबाट तपाईंहरुलाई रगतको स्मीयर बनाउँदा हुन सक्ने आर्टिफेक्टहरु (Artefacts) र Blood Contaminants गराउने चिजहरुको बारेमा पनि जान्न सक्नु हुनेछ ।

### ६.४ रगतको स्मीयरहरूमा देखिने कृत्रिम तत्वहरू

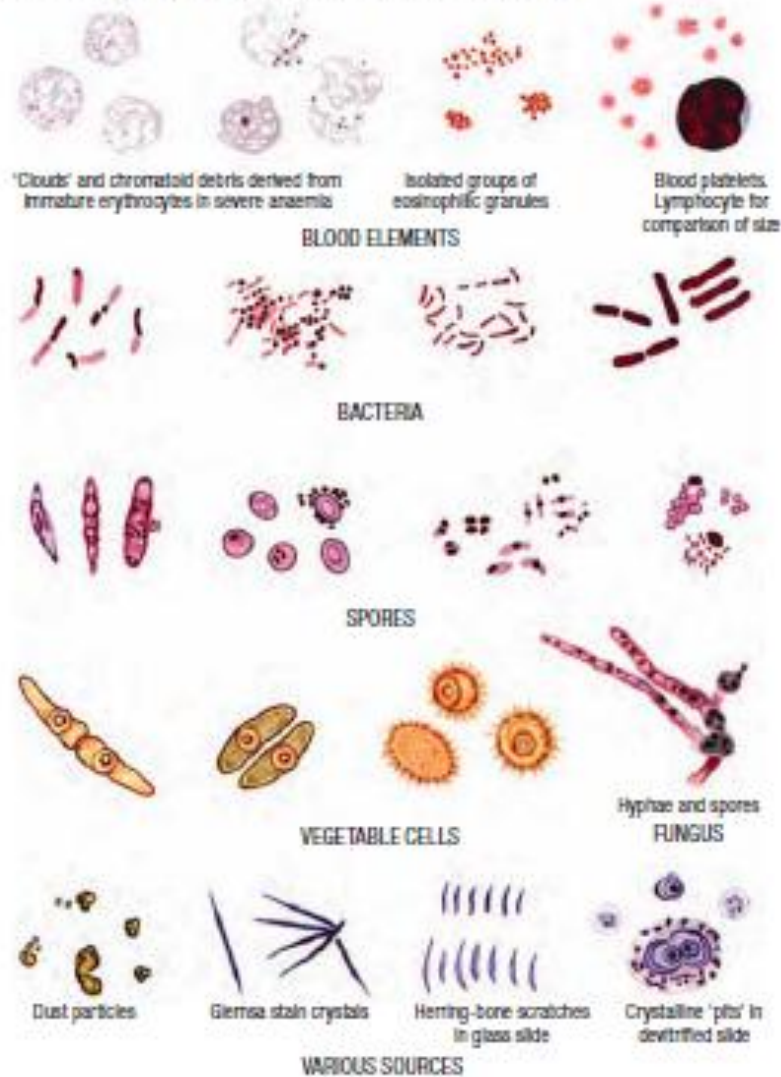
यो धेरै स्रोतहरूबाट उत्पत्ति भएको हुनसक्छ (औंला, स्लाइडहरू, स्टेन, बफर, हावा, इत्यादि)

- औंला-अल्कोहलले सफा गर्नुहोस्, पहिलो थोपालाई पुछ्नुहोस् ।
- स्लाइडहरूलाई सफा गर्नुहोस् र ताजा रिएजेन्ट्स (reagents) को प्रयोग गर्नुहोस् ।
- तयार गरिसकेपछि तयारी स्मीयरहरूलाई छोप्नुहोस् ।
- स्टेनको डिपोजिट (deposit) र ब्याक्टेरियाहरू सामान्यतया परजीवी जस्तो देखिन सक्छ जसलाई आर्टिफ्याक्ट्स (artefacts) भनिन्छ । अन्य आर्टिफ्याक्ट्स (artefacts) मा धुलो, मैला,

दुसी, कपासको रेसा, जिम्साको क्रिस्टलहरू (crystals) र रातो रक्तकोषहरूको स्ट्रोमा (stroma) पर्दछन् ।

**हावेल-जोली बडीज (Howell-Jolly Bodies) :** हावेल-जोली बडीज (Howell-Jolly Bodies) भनेका आर्टिफ्याक्ट्स (artefacts) हैनन् । यी रक्तकोषहरूबाट टुक्रिएका न्युक्लियस (Nucleus) का भागहरू हुन् । अक्सर औलोका बिरामीहरूमा रक्तअल्पता र फियो सुन्नने (splenomegaly) हुन्छ । प्रायः रातो रक्तकोषहरूको किनारमा यी एक एक बटा देखिन सक्छन् भने कहिलेकाँही समूहमा पनि देखिन सक्छन् । क्रोम्याटिन डट (Chromatin dot) सँग मिल्दोजुल्दो देखिन सक्छन् तर यसमा साइटोप्लाजम (cytoplasm) भने देखिन्न ।

### Artefacts and contaminants that can cause confusion



## खण्ड ७: माइक्रोस्कोपी स्लाइडको परीक्षण

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

- माइक्रोस्कोपीद्वारा जिम्सा स्टेन गरिएको रगतका स्मीयरहरूमा औलोको परजीवीहरू सही तरिकाले पत्ता लगाउने र पहिचान गर्ने प्रक्रिया वर्णन गर्न ।

### ७.१ औलो परजीवीहरूको पहिचानको लागि बाक्लो र पातलो रगतका स्मीयरहरूको माइक्रोस्कोपी स्लाइडको परीक्षण

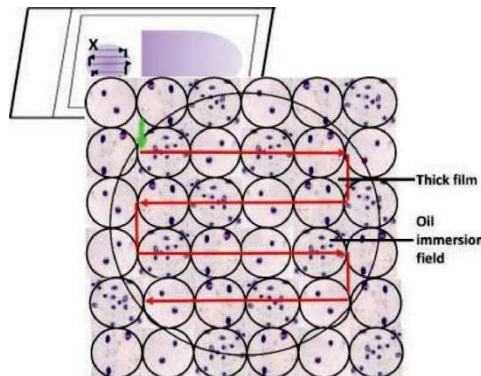
औलोको बिरामीहरूको क्लिनिकल व्यवस्थापन, औषधि प्रभावकारिताको परीक्षण, औलो इपिडिमियोलोजिकल सर्वेक्षण र औलो नियन्त्रण कार्यक्रमका लागि औलो परजीवीको प्रजाति र चरणहरूको पहिचान र तिनीहरूको घनत्वको निर्धारण महत्वपूर्ण छ । त्यसैले, रगतका स्मीयरहरूको परीक्षणमा आधारित औलो निदान सही हुनुपर्छ र त्यसमा परजीवीको गणना पनि सही (accurate) हुनुपर्छ । रगतका स्मीयरहरूको परीक्षणले अनेक रगतका कीटाणु पत्ता लगाउन, रक्तअल्पताको निदान गर्न र अनेक रगतका खराबीहरूको पहिचान गर्न दिन्छ र यसलाई माइक्रोस्कोपिष्टले रिपोर्ट गर्नुपर्छ ।

सामग्रीहरू र उपकरणहरू

- १०x अकुलर (oculars) (आइपिसेस (eyepieces)); १०x, ४०x / १००x अभ्जेक्टिभ्स (objectives); भएको कम्पाउण्ड माइक्रोस्कोप
- जिम्सा स्टेन गरिएको रगतका स्मीयरहरू
- इमर्सन (immersion) तेल, टाइप ए (type A)
- लेन्स पेपर
- कलम र पेन्सिल र
- औलो रजिष्ट्री वा लग बुक

प्रक्रिया

क) बाक्लो स्मीयर परीक्षण गर्ने



१. परीक्षण गर्नुपर्ने जिम्सा स्टेन गरिएको रगतको स्मीयरलाई माइक्रोस्कोप स्टेजमा राख्नुहोस् । लेबललाई देब्रे तिर राख्नुहोस् । बाक्लो स्मीयरलाई १०x अभ्जेक्टिभ (objective) लेन्ससँग मिलाएर राख्नुहोस् ।

२. माइक्रोस्कोपको स्वीच अन गर्नुहोस्, प्रकाशको स्रोतलाई उपयुक्त तरिकाले मिलाउनुहोस् र अकुलर (ocular) र १०x अभ्जेक्टभ (objective) मार्फत हेरेर फोकस (focus) खोज्नुहोस् ।
३. परजीवीहरू र रगतको तत्वहरूको लागि रगतको स्मीयरलाई स्क्यान (scan) गर्नुहोस् । राम्रोसँग स्टेन भएको र सेतो रक्तकोषहरू राम्रो देखिएको भागलाई चयन गर्नुहोस् ।
४. इमर्सन (immersion) तेलको सानो थोपालाई बाक्लो स्मीयरमा राख्नुहोस् । लेन्समा नलाग्ने गरी एप्लिकेटर (applicator) को माध्यमबाट तेललाई राख्नुहोस् । तेलले ४०x अभ्जेक्टभ (objective) लाई छुन नदिनुहोस् ।
५. बाक्लो स्मीयरको छानिएको भाग माथि १००x तेल इमर्सन अभ्जेक्टभ (immersion objective) राख्नुहोस् । इमेजलाई स्पष्टसँग हेर्नको लागि फाइन फोकस (fine focus) को प्रयोग गर्नुहोस् । फाइन एडजसमेन्ट (Fine adjustment) को प्रयोग गरेर कोषका तत्वहरूलाई फोकस (focus) गर्नुहोस्: प्रत्येक बाक्लो स्मीयर फिल्डमा १५-२० सेतो रक्तकोषहरू भए नभएको सुनिश्चित गर्नुहोस् । प्रत्येक फिल्डमा सेतो रक्तकोषहरू कम भएका स्मीयरहरूमा धेरै फिल्ड स्क्यान (scan) गरी परीक्षण गर्नुपर्छ ।
६. रगतको स्मीयरलाई माइक्रोस्कोपमा राम्ररी स्क्यान (scan) गर्नुहोस् । स्मीयरको माथिल्लो बायाँ भागबाट सुरु गर्नुहोस् (चित्र १ मा ठाडो हरियो तीर (arrow) ले चिनो लगाएको) र फिल्डको बाहिरी भागबाट सुरुवात गर्नुहोस्, त्यसपछि एउटा फिल्डबाट अर्को फिल्डमा तेर्सो गरेर दाँया तिर जानुहोस् ।
७. जब स्मीयरको अर्को छेउ तिर पुगिन्छ, स्लाइडलाई अलिकति तल तिर ल्याउनुहोस्, त्यसपछि बायाँ तिर, एउटा फिल्डबाट अर्को फिल्डमा र त्यही अनुसार गर्नुहोस् (तल हेर्नुहोस्) । कुशल परीक्षणको लागि प्रत्येक फिल्डको परीक्षण अवधिभर फाइन नव एडजसमेन्ट (fine knob adjustment) चलाउँदै निरन्तर फोकस र पुनः फोकस गर्नुहोस् ।

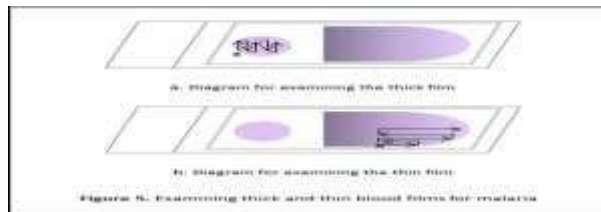
ख) बाक्लो स्मीयरमा औलो परजीवीहरू छन् कि छैनन् भनेर निर्धारण गर्ने र प्रजातिहरू पहिचान गर्ने

१. १००x इमर्सन (immersion) फिल्डमा १०० वटा फिल्डहरूमा औलो परजीवी छ वा छैन भन्ने सुनिश्चित गर्नुहोस् । चित्र १ मा देखाएको ढाँचाको अनुसरण गर्दै प्रत्येक पटक रगतको स्मीयरलाई १००x फिल्डमा हेर्नुहोस् । फोकस गर्नलाई फाइन एडजसमेन्ट (fine adjustment) को प्रयोग गर्नुहोस् ।
२. बाक्लो स्मीयरलाई “कुनै औलो परजीवीहरू नदेखिएको” घोषणा गर्नु अगाडि कमसेकम १०० उच्च पावर फिल्डहरूको परीक्षण गर्नुपर्छ । सम्भव छ भने पूरै बाक्लो स्मीयरलाई स्क्यान (scan) गर्नुपर्छ ।
३. प्रजातिहरूको अन्तिम पहिचान गर्नु अगाडि यदि परजीवीहरू देखिएको शंका लागेमा थप १०० फिल्डहरूमा औलो परजीवी परीक्षण गर्नुहोस् । यसले मिश्रित संक्रमण भएको छ भने अन्य परजीवी पहिचान गर्न मद्दत पुऱ्याउँछ ।
४. परजीवी प्रजातिहरूको निश्चित पहिचान गर्न पातलो स्मीयरलाई जहिल्यै परीक्षण गर्नुपर्छ । बाक्लो स्मीयरको विपरीत, पातलो स्मीयरमा परजीवीको पहिचान रातो रक्तकोषको आकार र रूपबाट गर्न सकिन्छ । तलको प्रक्रियामा वर्णन गरे जस्तै पातलो स्मीयरको किनार वा जिब्रो आकारको छेउमा परीक्षण गर्नुपर्दछ ।
५. औलो माइक्रोस्कोपीमा देखिएका सबै प्रजातिहरू र चरणहरूलाई पहिचान गरी प्रयोगशाला रजिष्टरमा अभिलेख राख्नुहोस् । MM-SOP 6b हेर्नुहोस् : रेकर्डिङ्ग र रिपोर्टिङ्ग माइक्रोस्कोपी नतिजाहरू

नोट : प्रत्येक प्रजातिहरूको पहिचानको लागि विश्व स्वास्थ्य संगठनद्वारा दिएको बेन्च ऐडहरू (bench aids) रिफर गर्नुहोस् ।



ग) प्रजातिहरू र मिश्रित संक्रमणको पुष्टि गर्न पातलो स्मीयरको परीक्षण गर्ने



१. बाक्लो स्मीयरको परीक्षण पछि प्रजातिहरू र मिश्रित संक्रमणको पुष्टि गर्न पातलो स्मीयरको परीक्षण गर्नुहोस् ।
२. इमर्सन (Immersion) तेलको एक थोपा पातलो स्मीयरको जिब्रो आकारको टुप्पोमा राख्नुहोस् ।
३. १०x लेन्सबाट १००x तेल इमर्सन (immersion) लेन्समा परिवर्तन गर्नुहोस् ।
४. पातलो स्मीयरको किनार वा जिब्रो आकारको टुप्पोको छेउको परीक्षण गर्नुहोस् जहाँ रातो कोषहरू फिजिएर रहन्छन् र एकअर्कामा नखप्टिई रहन्छन् । चित्र २ मा देखाए जस्तै परजीवी छ, छैन भनेर परीक्षण गर्नुहोस् । स्मीयरको किनारबाट स्क्यान (scan) गर्दै बायाँबाट दायाँ फिल्ड चलाउनुहोस् ।
५. औलो परजीवीहरूको उपस्थिति र प्रजातिहरूको पुष्टि नभए सम्म पातलो स्मीयरको परीक्षण जारी राख्नुहोस् । औलो माइक्रोस्कोपीमा देखिएका सबै प्रजातिहरू र चरणहरूलाई पहिचान गरी प्रयोगशाला रजिष्टरमा अभिलेख राख्नुहोस् ।

नोट : प्रत्येक प्रजातिहरूको पहिचानको लागि विश्व स्वास्थ्य संगठनद्वारा दिएको बेन्च एडहरू (bench aids) रिफर गर्नुहोस् ।

#### याद गर्नुहोस्:

बाक्लो स्मीयर छैन वा यदि बाक्लो स्मीयर नराम्ररी स्टेन गरिएको वा बिग्रेको छ भने पातलो स्मीयरमा गणना ९अयगलत० गर्न सकिन्छ साथै बाक्लो स्मीयरमा एउटा फिल्डमा १०० परजीवीहरू भन्दा बढी देखिएमा, परजीवीको संख्या ९उबचबकष्तबभष्व० हिसाब गर्नलाई पातलो स्मीयरको प्रयोग गर्नुपर्छ ।

(MM-SOP-09 हेर्नुहोस् : औलो परजीवीहरूको गणना गर्ने)



## खण्ड द: औलो परजीविको लागि रगतको स्मीयर जाँच

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

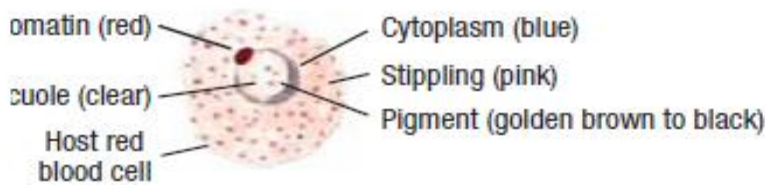
- औलो परजीवीका विभिन्न अवस्थाहरू बारे थाहा पाउन ।
- रगतको बाक्लो र पातलो स्मीयरमा औलो परजीवीहरूको विभिन्न अवस्था जस्तै ट्रौफोजोइट, साइज्वाइन्ट र ग्यामेटोसाइटहरू छुट्याउन ।
- मनिसमा पाइने औलो परजीवीको विभिन्न प्रजातीहरू रगतको बाक्लो र पातलो स्मीयरमा चिन्न ।
- साधारणतया रगतको स्मीयर बनाउँदा देखिने Contaminants र हुने स-साना गलितहरू थाहा पाउन ।
- केही Artefacts बाट रगतको स्मीयरहरू प्रदुषित हुनबाट जोगाउन ।

रगतको स्मीयरहरू जाँच गर्दा एकदमै ठिक तरिकाले जाँच गर्नुपर्छ । औलो परजीवीका सबै प्रजातीहरू राम्रोसँग चिन्न यस्ता प्रकारका धेरै स्लाइडहरू हेरेर अभ्यस्त हुनुपर्दछ । यस खण्डमा औलो परजीवीका विभिन्न अवस्थाहरूको सचित्र राखिएको हुँदा तपाईंहरूलाई औलो परजीवीहरूको बारेमा अझै प्रष्ट रूपमा जानकारी हुनेछ ।

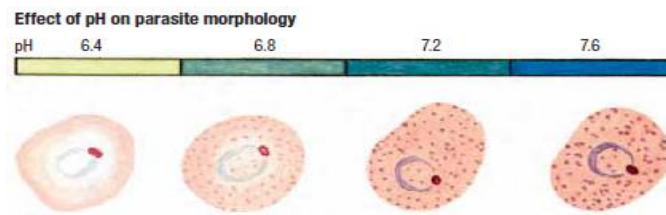
### द.१ औलो परजीवीको चिनारी

जिम्सा स्टेनले औलो परजीवीहरूको प्रत्येक भागहरू विभिन्न रंगमा देखाउछ । त्यसैले गर्दा औलो परजीवीका विभिन्न भागहरू तल चित्रमा उल्लेख गरिए अनुसार चिन्न र छुट्याउन सकिन्छ । औलो परजीवीहरूलाई राम्रोसँग Stain गर्दा स्थिर pH 7.2 सहितको Buffer Water आवश्यक पर्दछ । स्थिर pH बिनाको Staining ले औलो परजीवी प्रष्टसँग देखिदैन र pH अनुसार तल उल्लेख गरिए जसरी विभिन्न स्वरूपमा देखिन्छ ।

Parts of a malaria parasite in a red blood cell



### द.२ औलो परजीवीको बनावटमा pH को असर



औलो परजीवीले विभिन्न चरण पार गरेर आफ्नो जीवन चक्र पूरा गर्दछ । औलो परजीवीको आकार प्रकार विभिन्न अवस्थामा भिन्दा भिन्दै रूपमा देखिन्छन् । जिम्सा स्टेन (Giemsa Stain) सँग Staining गर्दा यसका निश्चित भागहरु जुनसुकै अवस्थामा पनि उस्तै रङ्गमा देखिन्छन् ।

क) क्रोमाटिन (*Chromatin*) : यो परजीवीको Nucleus को रूपमा रहेको हुन्छ । यो गोलो आकारको हुन्छ र गाढा रातो रूपमा देखिन्छ ।

ख) साइटोप्लाजम (*Cytoplasm*) : यो भाग Geisma stain सँग निलो रङ्गमा देखिन्छ ।

ग) पिग्मेन्ट (*Pigment*) : परजीवीको वृद्धि हुदा पैदा भएको दानेदार by product को रूपमा रहेको हुन्छ । साधारणतया यसले क्तबप्ल लिदैँन तर विभिन्न रङ्गहरु सुनौलो खैरो देखी कालो रङ्गमा देखिन्छ ।

घ) स्टिप्लिङ (*Stippling*) : यीनीहरु दाग, थोपाहरु को रूपमा देखिन्छन् । परजीविहरुको विभिन्न प्रजातीहरुमा विभिन्न रूपमा यस्ता Stippling हरु पाइन्छन् ।

जस्तै : भाइभेक्स (*Vivax*) जातको परजीवीमा गुलाबी थोप्ला (Pink dots) हरुको Mass को रूपमा रहेका हुन्छन् । जसलाई Schuffner Stippling भनिन्छ । ओभेली (ovale) जातको परजीवीहरुमा फिक्का बैजनी रङ्गको dots को रूपमा पाइन्छन्, जसलाई James dots पनि भनिन्छ । यसैगरी फाल्सिपारममा (*Plasmodium falciparum*) जातको परजीवीमा कम सजीलो सँग देखिने Maurer's Cleft हरु पाइन्छन् ।

८.३ औलो परजीवीका विभिन्न अवस्थाहरु

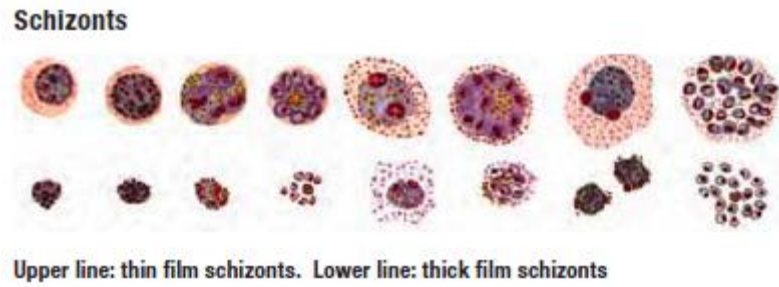
औलो पराजीवीका विभिन्न अवस्थाहरु हुन्छन्, जुन blood smear को परिक्षणबाट देख्न सकिन्छ । तपाईंहरुलाई अझ स्पष्ट रूपमा यी परजीवीहरुको अवस्थाहरु बुझ्नको लागि सचित्र रूपमा वर्णन गरिएको छ ।

क) ट्रॉफोजोइट (*Trophozoite*) अवस्था : यो साधरणतया देखिने अवस्था हो । यो अवस्थामा परजीवी रिङ्ग (Ring) को आकारमा देखिन्छन् साथै यो परजीविहरु वृद्धि हुने अवस्था हो । यो वेलामा byproduct को रूपमा थुप्रै Pigment हरु निस्कन्छन् ।



ख) साइज्वाइन्ट (*Schizont*) अवस्था : यो अवस्थामा परजीवीहरुको प्रजनन (Reproduction) लाई Asexual भनिन्छ । किनकी यो अवस्थामा परजीवीहरु भाले पोथी अवस्थामा छुटिसकेका हुदैँनन् र सामान्य विभाजनको प्रकृया द्वारा प्रजनन हुन्छ । यो अवस्थामा सामान्य कोष विभाजन प्रकृया द्वारा थुप्रै Merozoite हरु बन्दछन् ।

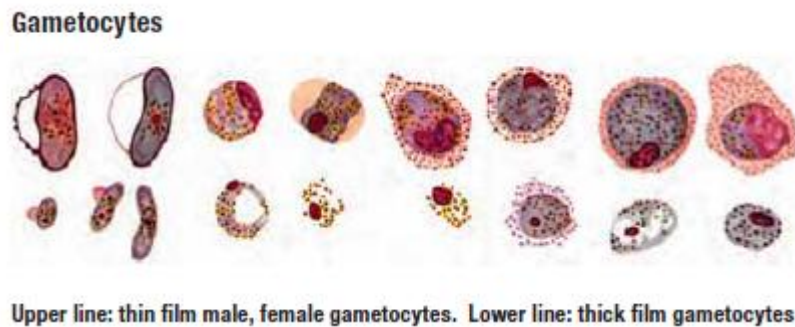
यो अवस्थामा परजीवीहरू विभिन्न रूपमा दुईवटा क्रोमाटिन देखि धेरै क्रोमाटिन थोप्लाहरूमा पाइन्छन् । यो अवस्था तल सचित्र रूपमा उल्लेख गरिएको छ ।



ग) ग्यामेटो साईट (*Gametocyte*) अवस्था:

यो अवस्थामा परजीवीहरू भाले वा पोथी अवस्थामा छुटिन्छन् । यी परजीवीहरू पोथी एनोफिलिज (*Anopheles*) जातको लामखुट्टेमा गई Sexual cycle पुरा गर्दछन् ।

Thin blood smear मा यो अवस्था स्पष्ट सँग देख्न सकिन्छ भने Thick blood smear मा यो अवस्था छुट्याउन गाह्रो हुन्छ ।



III The Gametocyte Stage  
Gametocytes may be either round or banana - shaped, depending on the species  
(see figure 7. 16).

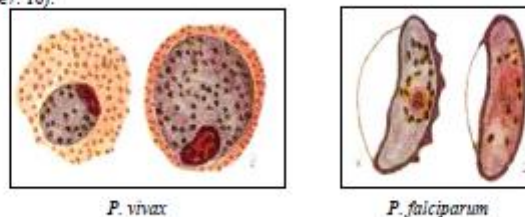


Fig 7. 16: Male and female gametocytes

८.४ रगतको पातलो स्मीयरबाट देखिने परजीवीका प्रजातीहरू

माइक्रोस्कोबाट रगतको स्मीयर (Blood Smear) हरु हेर्दा पहिला राता रक्त कोषहरूको Morphology को बारेमा ध्यान दिनुपर्छ, जसमा कोषको आकारका बारेमा र राता रक्तकोषहरूमा कस्ता प्रकारका थोप्लाहरू (Stippling) छन् भन्ने बारेमा ।

जिम्सा स्टेन (Giemsa Stain) सँग भाइभेक्स (Vivax) र ओभेली (Ovale) जातका परजीवी भएमा कोषमा Schuffner Stippling वा James dots हरु देखिन्छन् । फाल्सिपेरम (Falciparum) जातका औलो परजीवीद्वारा संक्रमित राता रक्तकोषहरूमा Maurer dots हरु दुर्लभ मात्रामा देखिन्छन् ।

यस अध्यायमा समेटिएका रङ्गीन चित्रहरूले तपाईंहरूलाई औलो परजीवीका विभिन्न अवस्थाहरू चिन्न सजिलो हुनेछ ।

**याद गर्नुहोस्:**

गुणस्तरहिन तरिकाले रंगाइएका स्लाइडहरूमा Schuffner stippling (प्लाज्मोडियम भाइभेक्स चिन्ने बलियो आधार) नदेखिन सक्छ । फाल्सिपेरममा पाइने Maurer Cleft हरु राम्रो स्टेन गरिएको स्लाइडबाट पनि देखिन एकदमै गाह्रो हुन्छ ।

बाँया भाग तिर चित्रहरू रगतको पातलो स्मीयर (Thin blood Smear) हेर्दा देखिने परजीवीको विभिन्न अवस्था र दाया भाग तिरका चित्रहरू रगतको बाक्लो स्मीयर (Thick Blood Smear) हेर्दा देखिने विभिन्न अवस्थाहरू राखिएका छन् । यसले तपाईंहरूलाई औलो परजीवीको विभिन्न अवस्थाहरू र यसका प्रजातीहरू माइक्रोस्कोप बाट चिन्न सजिलो हुनेछ भन्ने आशा लिएको छु ।

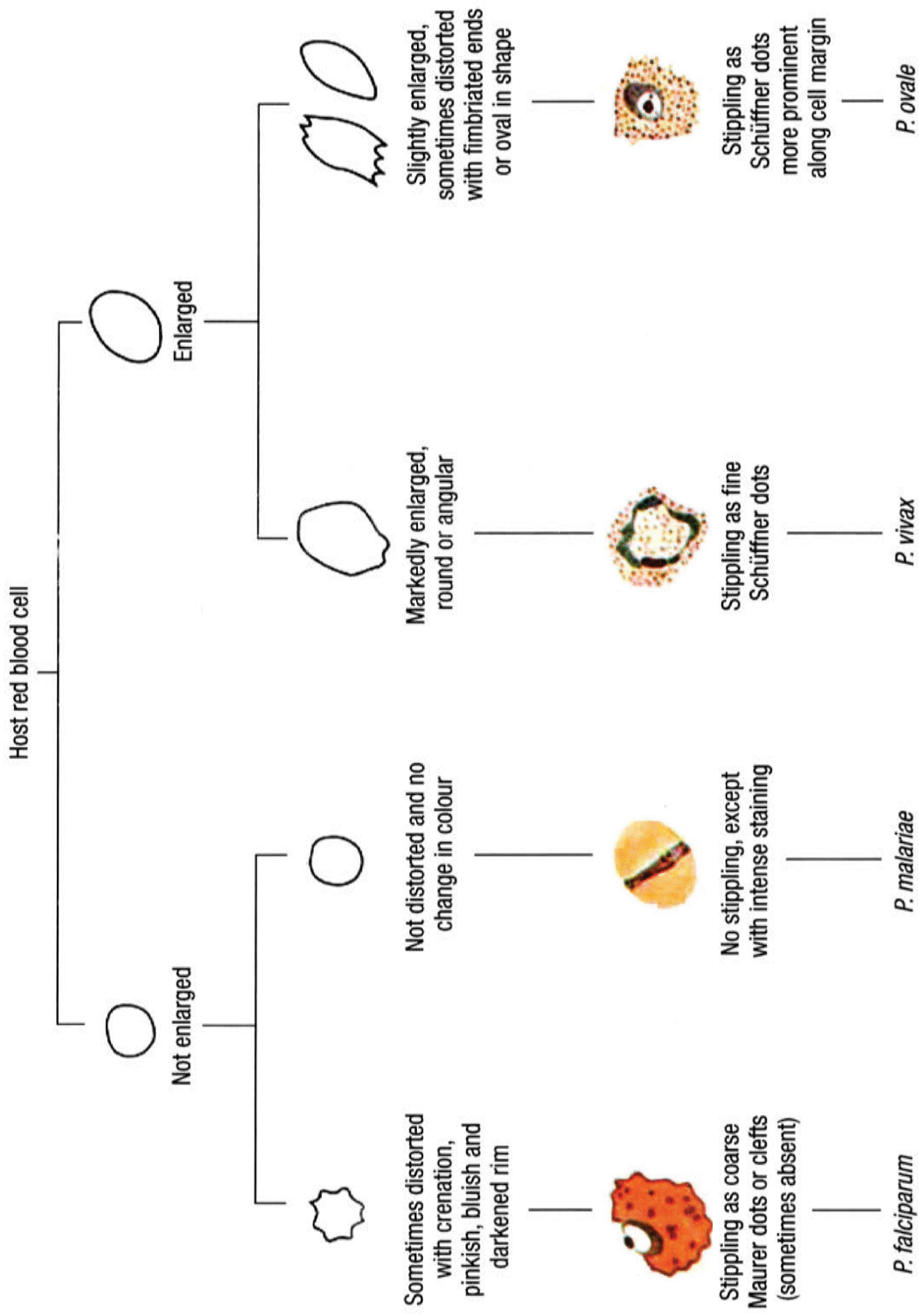
तपाईंहरू रगतको पातलो स्मीयर जाँच गरेर सबै प्रकारका औलो परजीवी चिन्न सक्षम हुनेकुरा प्रशिक्षक द्वारा निश्चित गरिएपछि रगतको बाक्लो स्मीयर जाँचको लागि तयार हुनु हुनेछ । यसबाट माइक्रोस्कोपीटहरूले ८०% सम्म परजीवी चिन्न सक्नु हुनेछ भन्ने लक्ष्य राखिएको छ ।

रगतको बाक्लो र पातलो स्मीयरमा पाइने औलो परजीविका विभिन्न अवस्थाहरू:

<b>Key to identifying malaria parasite stages in thin and thick blood films</b>		
Do you see:	Thin film	Thick film
1. one or more red chromatin dots with attached blue cytoplasm? Yes: Go to 2. No: What you see is not a parasite.		
2. the size and shape right for a parasite? Yes: This is probably a malaria parasite; go to 3. No: What you see is not a parasite.		
3. pigment in the 'cell'? Yes: Go to 7. No: Go to 4.		
4. one chromatin dot attached to a ring of blue cytoplasm containing a vacuole? Yes: This is a trophozoite. No: Go to 5.		
5. one chromatin dot attached to small, solid blue cytoplasm, with no apparent vacuole? Yes: This is a trophozoite. No: Go to 6.		
6. one chromatin dot and irregular or fragmented blue cytoplasm? Yes: This is a trophozoite. No: Go to 8.		
7. a chromatin dot in the parasite with pigment? Yes: Go to 8. No: Go to 9.		
8. a vacuole in the parasite or cytoplasm that is fragmented in some way? Yes: This is a trophozoite. No: Go to 11.		
9. two chromatin dots attached to a ring of cytoplasm and a vacuole? Yes: This is a trophozoite. No: Go to 10.		
10. 2-32 chromatin dots and pigment? Yes: This is a schizont stage.		
11. a rounded or a banana shape? Rounded: Go to 12. Banana-shaped: Go to 14.		
12. clear red chromatin and deep-blue cytoplasm in the rounded body? Yes: This is a female gametocyte. No: Go to 13.		
13. that the rounded body has stained a reddish colour so that the chromatin is not clear? Yes: This is a male gametocyte.		It is difficult to tell the difference between male and female gametocytes in thick films.
14. a banana-shaped parasite with densely stained blue cytoplasm and bright red chromatin? Yes: This is a female gametocyte. No: Go to 15.		
15. a banana-shaped parasite with a reddish overall colour so that the chromatin is indistinct? Yes: This is a male gametocyte.		It is difficult to tell the difference between male and female gametocytes in thick films.



## Malaria species differentiation in thin films



Malaria species differentiation in thin films using host-cell changes and presence of stippling (Giemsa stain)

## खण्ड ९: औलो परजीवीहरूको लागि रगतका स्मीयरहरूको नियमित परीक्षण

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

- बाक्लो र पातलो स्मीयरमा रातो रक्तकोष बाहेक परजीवीहरूमा देखिने विभिन्न चरणहरूको भिन्नता बारेमा थाहा पाउन ।
- मिश्रित परजीवीहरू पत्ता लगाउने केही विधिहरूको जानकारी प्राप्त गर्न ।

### ९.१ बाक्लो स्मीयर परीक्षण गर्ने

औलो परजीवीहरूको नियमित परीक्षण बाक्लो रगतका स्मीयरहरूमा गरिन्छ । यद्यपि कहिलेकाँही औलो परजीवीहरूको केही चरणहरू वा प्रजातिहरूको फरक छुट्याउन गाह्रो हुन्छ, त्यसैले त्यसलाई पातलो रगतको स्मीयरको परीक्षणले पुष्टि गर्नुपर्छ ।

प्रत्येक रगतको स्मीयरको परीक्षण निम्न लिखित व्यवस्थित तरिकाले गर्नुपर्छ :

१. १००X को प्रयोग गर्नुहोस् ।
२. स्मीयरको बीच भागको छेउबाट हेर्न थाल्नुहोस् ।
३. व्यवस्थित तरिकाले एक एक फिल्ड हेर्दै माथि व्याख्या गरे अनुसार रगतको स्मीयरको परीक्षण गर्नुहोस् ।
४. औलोको लागि रगतको स्मीयर पोजिटिभ छ कि नेगेटिभ भनेर निर्धारण गर्नको लागि १०० राम्रो फिल्डहरू हेर्नुहोस् ।
५. यदि रगतको स्मीयर शंकास्पद छ भने १०० भन्दा बढी फिल्डहरूको जाँच गर्नुहोस् अथवा दोस्रो स्मीयरको लागि अनुरोध गर्नुहोस् ।
६. परीक्षणको अन्त्यमा, नतिजालाई प्रयोगशाला अनुरोध फारम र रेकर्ड बुकमा रेकर्ड गर्नुपर्छ । नतिजामा परजीवीको प्रजाति(हरू), चरण(हरू) र घनत्व उल्लेख गर्नुपर्दछ ।

बाक्लो र पातलो रगतका स्मीयरहरूमा रातो र सेतो रक्तकोषहरूको बनावट फरक देखिने मात्र हैन, औलो परजीवीहरूको बनावटमा पनि भिन्नता हुन्छ । ती यस प्रकार छन् :

- बाक्लो रगतका स्मीयरमा रातो रक्तकोषहरू देखिँदैन तर रातो कोषहरूको स्ट्रोमा (stroma) कहिलेकाँही स्मीयरहरूको पातलो भागहरूमा परजीवीहरूलाई घेरिएर रहेको देखिन सक्छ ।
- सेतो रक्तकोषहरू जस्तै, औलो परजीवीहरू पातलो रगतका स्मीयरहरूमा भन्दा बाक्लो रगतका स्मीयरहरूमा सानो देखिन्छन् ।
- ट्रोफोज्वाइटहरूको साइटोप्लाजम (cytoplasm) मसिनो अथवा अपूरो देखिन सक्छ ।
- बाक्लो रगतका स्मीयरहरूमा कहिलेकाँही Schuffner's dots पनि देखिन सक्छन् ।
- बाक्लो रगतका स्मीयरहरूमा कहिलेकाँही पी. फाल्सिपारमको Maurer's dots पनि देखिन सक्छन् ।

बाक्लो रगतका स्मीयरहरूलाई हेरेर तपाईंले स्लाइड नेगेटिभ छ कि पोजिटिभ छ पत्ता लगाउन सक्नुहुन्छ ।



## ९.२ पातलो स्मीयर परीक्षण गर्ने

बाक्लो स्मीयर परीक्षण गर्न भन्दा पातलो स्मीयर परीक्षण गर्नलाई २० देखि ३० मिनेट बढी समय लाग्छ, त्यसैले निम्न लिखित परिस्थितिहरूमा बाहेक पातलो स्मीयरको नियमित परीक्षण सिफारिस गरिँदैन ।

- जब प्रजातिहरूको पहिचानको पुष्टि गर्न आवश्यक हुन्छ ।
- जब संक्रमित रातो रक्तकोषको प्रतिशत गणना आवश्यक हुन्छ ।
- जब बाक्लो स्मीयरको परीक्षण गर्न सकिन्न अथवा फिक्सड (fixed) भएको हुन्छ अथवा पखाली सकिएको हुन्छ ।

पातलो स्मीयरलाई हेरेर मात्र नेगेटिभ नतिजा कहिल्यै दिनुहुन्न !

पातलो रगतका स्मीयरहरूमा औलो परजीवी र तिनीहरूका चरणहरूलाई कसरी चिन्ने थाहा पाएपछि तपाईंले औलोका प्रजातिहरूलाई छुट्याउनु पर्छ । सबैभन्दा सरल तरिका भनेको परजीवीले संक्रमण गरेका रातो रक्तकोषहरूका रूप, रङ्ग, आकारलाई अध्ययन गर्नु हो । ती यस प्रकार छन् :

रातो रक्तकोषको आकार :

- पी. फाल्सिपारमको संक्रमणमा रातो रक्तकोषको आकारमा कुनै परिवर्तन हुँदैन ।
- पी. मलेरीको संक्रमणमा रातो रक्तकोषको आकारमा कुनै परिवर्तन हुँदैन वा रातो रक्तकोषको आकार सानो हुन्छ ।
- पी. भाइभेक्सको संक्रमणमा रातो रक्तकोषको आकार ठूलो भएको हुन्छ ।
- पी. ओभेली संक्रमित रातो रक्तकोषहरू २० देखि ३०% ठूला हुन्छन् । ती रातो रक्तकोषहरू अण्डाकार देखिने तथा हातका औलाहरू जस्तै (fimbriated) देखिने हुनसक्छ ।

रातो रक्तकोषको रङ्ग :

- पी. फाल्सिपारमको संक्रमणमा रातो रक्तकोषको रङ्गमा कुनै परिवर्तन हुँदैन ।
- पी. मलेरीको संक्रमणमा रातो रक्तकोषको रङ्गमा कुनै परिवर्तन हुँदैन वा रङ्ग गाढा हुन्छ ।
- पी. भाइभेक्स र पी. ओभेलीको संक्रमणमा रातो रक्तकोषको रङ्ग बढी फिक्का हुन्छ ।

क्रोम्याटिन डट्स (Chromatin dots) वा रातो रक्तकोषको साइटोप्लाजम (cytoplasm):

- पी.मलेरीको संक्रमण हुँदा कुनै डट्स (dots) हुँदैन ।
- कहिलेकाँही पी.फाल्सिपारमको संक्रमणमा केही खस्रो र अनियमित बैजनी-रातो डट्स (dots) हुन्छ, जसलाई "Maurer's dots" भनिन्छ ।
- पी.भाइभेक्सको संक्रमणमा रातो रक्तकोषको साइटोप्लाजम (cytoplasm) भरी प्रायः थुप्रै सानो गुलाबी गोलो डट्स (dots) छरिएर रहेको हुन्छ जसलाई "Schuffner's dots" भनिन्छ ।
- पी.ओभेलीको संक्रमणमा प्रायः थुप्रै गाढा डट्स (dark dots) हुन्छ जसलाई "James's dots" भनिन्छ । तिनीहरू "Schuffner's dots" भन्दा चहकिलो र ठूला हुन्छन् ।

## ९.३ मिश्रित औलो

मिश्रित औलो भन्नाले एक वा एक भन्दा बढी औलोका परजीवीहरूबाट संक्रमण हुनु हो । दक्षिण पूर्वी एसियामा अरु ठाउँमा भन्दा मिश्रित औलोको संक्रमण कम हुने गर्दछ । नेपाल जस्तो देशमा

दुवै फालिसपारम र भाइभेक्स औलो रहेको र यहाँ यस्तो संक्रमणको घटनाहरू बेलाबेलामा रिपोर्ट भइरहेकोले मिश्रित संक्रमणहरूलाई बेवास्ता गर्नुहुन्न । यसबाहेक अध्ययनहरूले उपचार भएका एक तिहाइ फालिसपारम बिरामीहरूलाई प्रायः केही समयावधि पछि भाइभेक्स संक्रमण भएको पनि देखाएका छन् । मिश्रित संक्रमणहरू पत्ता लगाउनको लागि एकदमै योग्य माइक्रोस्कोपिष्टको आवश्यकता हुन्छ । PCR विधि मिश्रित संक्रमण पत्ता लगाउनको लागि एक मात्र प्रभावकारी तरिका हो । यी मिश्रित संक्रमणहरूले गम्भीर औलाको जस्तै संकेत र लक्षणहरू देखाउँछन् र यसको उपचार गर्ने पद्धति फालिसपारम र भाइभेक्स संक्रमणको जस्तै हुन्छ ।

तल दिइएको केही जानकारीले माइक्रोस्कोपिष्टहरूलाई मिश्रित संक्रमण चिन्न सहयोग गर्न सक्छ :

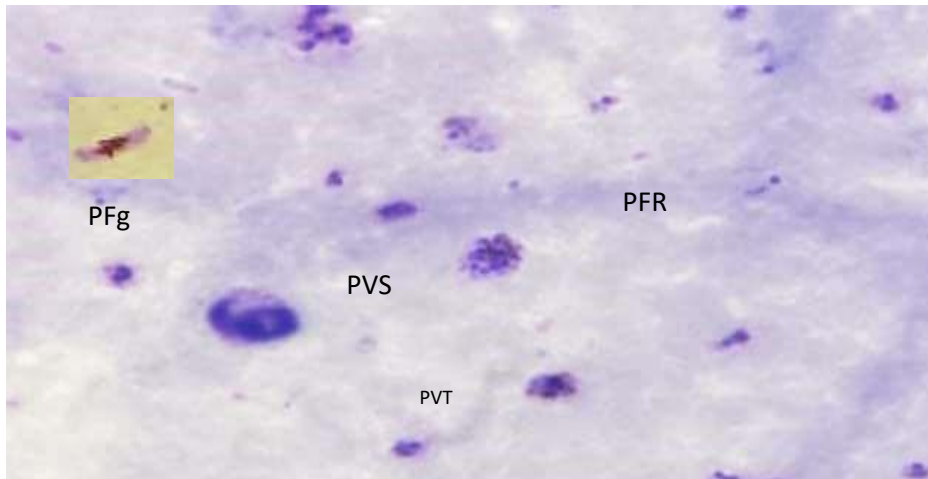
### ९.३.१ मिश्रित प्लाज्मोडियम संक्रमणका विशेषताहरू

औलाको स्मीयरमा भएका निम्न विशेषताहरूले मिश्रित संक्रमण पत्ता लगाउन सहयोग गर्न सक्छ ।

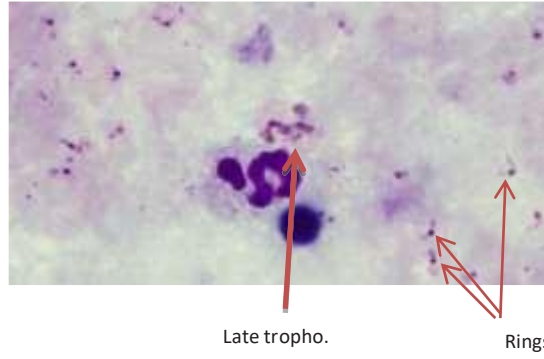
क) प्लाज्मोडियम फालिसपारम (PF) र अन्य प्लाज्मोडियमका प्रजातिहरू:

Pf र Pf भन्दा बाहेककाले मिश्रित संक्रमण गर्ने अवस्थामा Pf का rings वा अरु चरणहरू (Pf का ग्यामेटोसाइटहरू वा दुवै) र प्लाज्मोडियम भाइभेक्स (Pv) ट्रौफोज्वाइटहरू वा Pv को अरु चरणहरू वा अरु प्रजातिहरू भेटिन सक्छन् ।

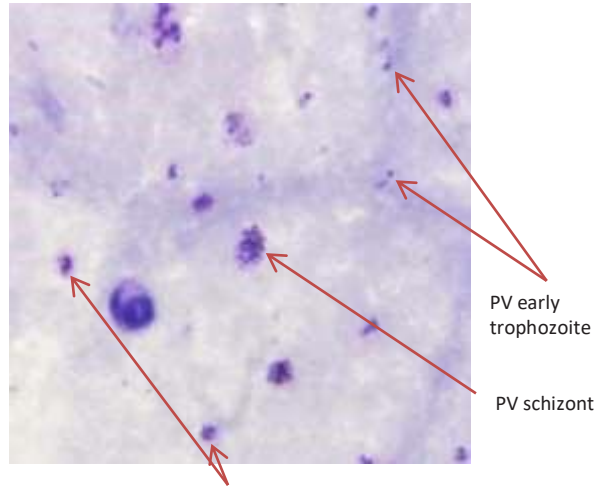
(Pf वा Pf g वा Pf+g) + PVT वा Pv/अरु प्रजातिहरूको अरु चरणहरू)



ख) यदि Pf को ring मात्र छ र PVT वा Pv का अन्य चरणहरू/अरु प्रजातिहरूको विभिन्न चरणहरू देखिएको छ भने, मिश्रित संक्रमण हुनको लागि Pv/अरु प्रजातिहरूको भन्दा Pf को



ग) यदि कम घनत्वमा भएको Pf को ring स्वरूपहरू मात्र देखिएको छ र बाँकी अधिकांशमा दिइएको नमुनामा PVT वा Pv/अरु प्रजातिहरूको अरु चरणहरू समावेश हुन्छ भने यसलाई मिश्रित संक्रमण भनेर पहिचान गर्न गाह्रो पर्छ र थप परीक्षणको आवश्यकता पर्छ ।



रगतको बाक्लो स्मीयर जाँच गर्दा देखिने परजीवीका प्रजातीहरू:

९.४ रगतको स्मीयर जाँच गर्दा देखिने बचतभावअत हरु:

#### ९.४.१ दुसी (Fungus)

स्लाइडहरू राख्दा, सफा गर्दा ध्यान दिनु पर्छ । स्लाइडहरू राख्दा सफा र सुख्खा ठाउँमा राख्नुपर्छ । भ्रतजर्था बभियजर्था मा डुवाएर राखेको स्लाइडमा यस्ता प्रकारको Artefacts देखिदैनन् । ओसिलो ठाउँमा भण्डारण गरिएका स्लाइडहरूमा Fungus grow हुन सक्छ । त्यसैले यस्ता कुराहरूमा सावधानी अपनाउनु पर्दछ ।

#### ९.४.२ हावाबाट सर्ने Pollen र spore हरु:

यस्ता प्रकारका बचतभावअत हरु नयाँ भर्खर बनाइएका स्लाइडहरूमा सजिलैसँग कभततभि हुन सक्छन् । जब रगतको स्मीयरहरू सुकेर क्त्वप्ल गरिन्छ तब यस्ता कउयचभ हरु पनि परजीजी सँगसँगै रङ्गिएर भुक्याउन सक्छन् ।

### १.४.३ *Dirt/Bacteria:*

यस्ता प्रकारका Artefact हरु सजिलैसँग बिरामीको हातबाट रगतको स्मीयर बनाउँदा गर्न सक्छन् । यस्ता चिजहरुबाट जोगीन बिरामीको राम्रो सरसफाईमा ध्यान दिने र स्वास्थ्यकर्मीले Latex glove को प्रयोग गर्नु पर्दछ ।

### १.४.४ *प्रदुषित पानी :*

यदी सोभ्रै कुवा वा नदी वा बर्षाको Buffer Water बनाउन प्रयोग गर्नु भने यसमा भएका इचनबलषअ तत्वहरुले कतबप्लप्लन मा खराबी ल्यायई स्लाइड (स्मीयर) को quality मा न्हास ल्याउँदछ । स्लाइडको रङ्ग पखाल्न प्रयोग गरिने पानी पनि प्रदुषण रहित सफा हुनु पर्दछ ।

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

- बाक्लो र पातलो रगतका स्मीयरहरूमा औलो परजीवीहरू गणना गर्ने प्रक्रिया वर्णन गर्न ।

परजीवीको घनत्वले रोगको चरण, संक्रमणको गम्भीरता र उपचारको प्रभावकारिता बारे जानकारी दिन्छ । पी. फाल्सिपारम (*P. falciparum*), पी. भाइभेक्स (*P. vivax*), पी. मलेरी (*P. malariae*) र पी. ओभली (*P. ovale*) को असेक्सुअल (asexual) चरणहरूको लागि परजीवी गणना (parasite counts) गरिन्छ । प्रोटोकलले अन्यथा नभने सम्म ग्यामेटोसाइटहरूको गणना गरिँदैन तर तिनीहरूको उपस्थिति जहिल्यै पनि रिपोर्ट गरिन्छ । सबै परजीवीका प्रजातिहरू गणना भए सँगै पहिचान गरी रिपोर्ट गरिनुपर्छ ।

औलोको निदानमा परजीवी गणना (parasite counting) निम्न कारणहरूले गर्दा महत्वपूर्ण छ :

- औलो संक्रमणको गम्भीरता निर्धारण गर्न
- औलोमा प्रयोग गरिने औषधिको असर र प्रभावकारिता अध्ययन गर्न
- स्लाइडहरूलाई क्रस जाँच गर्न र माइक्रोस्कोपिष्टहरूको दक्षता मूल्याङ्कन गर्न

सामग्रीहरू र उपकरणहरू

- १०x अकुलर (oculars) (आइपिसेस (eyepieces)); १०x, ४०x/१००x अभ्जेक्टिभ्स (objectives); भएको कम्पाउण्ड माइक्रोस्कोप ;
- ट्याली (Tally) काउन्टर; (एउटा औलो परजीवीहरू गन्न र अर्को सेतो रक्तकोषहरू गन्न);
- जिम्सा स्टेन गरिएको रगतको स्मीयरहरू;
- इमर्सन (immersion) तेल, टाइप ए (type A);
- लेन्स पेपर;
- कलम र पेन्सिल र
- क्यालकुलेटर

परजीवी गणना (Parasite counting) गर्ने विधिहरू

बाक्लो स्मीयरमा

गणना गर्नको लागि २ वटा विधिहरू छन् :

बाक्लो र पातलो स्मीयर

बाक्लो स्मीयर-२ वटा विधिहरू :

- परजीवीहरूको संख्या रगतको प्रति  $\mu\text{L}$  (विश्व स्वास्थ्य संगठनले सिफारिस गरेको विधि)
- प्लस प्रणाली (विश्व स्वास्थ्य संगठनले सिफारिस नगरेको)

बाक्लो स्मीयरमा परजीवी गणना गर्ने र परजीवीको घनत्व हिसाब गर्ने

१. लेबललाई बायाँ तिर राखेर स्लाइडलाई माइक्रोस्कोपमा राख्नुहोस् ।

२. औलो परजीवीहरूको उपस्थिति र तिनीहरूको प्रजाति र चरणहरूलाई निर्धारण गर्नुहोस् र रेकर्ड गर्नुहोस् ।

३. स्मीयरको माथिल्लो बायाँ भागबाट सुरु गरेर परजीवीहरू र सेतो रक्तकोषहरू भएको फिल्ड खोज्नुहोस् । अनि गन्न सुरु गर्नुहोस् ।

४. प्रत्येक परजीवी वा सेतो रक्तकोष देखिएपछि ट्याली (Tally) काउन्टरमा तोकिएको बटन थिच्नुहोस् ।

५. एउटा फिल्डमा भएको सबै परजीवीहरू र सेतो रक्तकोषहरू गनिसकेपछि, अर्कोमा जानुहोस् र गन्ने प्रक्रियालाई जारी राख्नुहोस् र त्यसलाई निरन्तरता दिनुहोस् ।

प्रजातिहरू छुट्टै गनिन्छ ।

परजीवीहरूका चरणहरू (T, S, G) छुट्टै गनिन्छ :

१. बाक्लो अथवा पातलो स्मीयरमा ट्रुफोज्वाइटहरू (T) गनिन्छ ।

२. साइजोन्टहरू (S) र ग्यामेटोसाइटहरू (G) बाक्लो स्मीयरमा गनिन्छ ।

यदि परजीवीहरू वा सेतो रक्तकोषहरूका भागहरू स्पष्ट रूपमा देखिन्छन् र तपाईं तिनीहरू के हो भनेर पक्का हुनुहुन्छ भने मात्र गन्नुहोस् । यदि स्पष्ट छैनन् भने तिनीहरूलाई गणनामा समावेश नगर्नुहोस् । ठीक नतिजा पाउनको लागि यो प्रक्रिया जारी राख्नुहोस् ।

विश्व स्वास्थ्य संगठनद्वारा सिफारिस गरिएको विधि

- NMPS (No Malaria Parasite Seen) घोषणा गर्नु अगाडि १०० उच्च पावर फिल्डमा (१०० x, तेल) परीक्षण गर्नुहोस् ।
- यदि १०० वा सो भन्दा बढी औलो परजीवीहरू ( $\geq ४०००$  परजीवीहरू/ $\mu\text{L}$ ) देखिए भने  $\sim २००$  सेतो रक्तकोषहरू सम्म गन्नुहोस्, त्यसपछि हिसाब गर्नुहोस् ।
- यदि  $\sim २००$  सेतो रक्तकोषहरू गणना गर्दा १०० भन्दा कम औलो परजीवीहरू ( $< ४०००$  परजीवीहरू/ $\mu\text{L}$ ) भेटेमा  $\sim ५००$  सेतो रक्तकोषहरू सम्म निरन्तर गन्ने र त्यसपछि हिसाब गर्नुहोस् ।

नयाँ विश्व स्वास्थ्य संगठन विधिका फाइदाहरू

- यो विधिबाट माइक्रोस्कोपिष्टहरू बिच गरिने परजीवीको गणनामा कम फरक देखिन्छ ।
- अधिकांश अवस्थामा धेरै सेतो रक्तकोषहरू ( $\sim ५००$ ) को गणना गर्ने क्रममा स्मीयरको जाँच गर्दा निम्न फाइदा हुन्छ :
  - प्रजाति पहिचान र परजीवी गणनाको नतिजा राम्रो हुने (accuracy बढ्ने)
  - मिश्रित परजीवी प्रजातिहरू भएमा ठम्याउन सकिने

बाक्लो स्मीयरमा परजीवी गणना

- जति धेरै सेतो रक्तकोष र औलो परजीवी गणना गर्न सक्नुहुन्छ, त्यति गर्नुहोस् अथवा SOPs अनुसार गर्नुहोस् (२००/५०० सेतो रक्तकोषको तुलनामा)

सूत्र :  $\frac{\text{औलो परजीवीको संख्या} \times ८,०००}{\text{सेतो रक्तकोषहरूको संख्या}} = \text{परजीवीहरूको संख्या}/\mu\text{L}$

उदाहरण :  $\frac{९५ \text{ औलो परजीवी} \times ८,०००}{५०२ \text{ सेतो रक्तकोषहरू}} = १,५१४/\mu\text{L}$



तपाईंले २०० सेतो रक्तकोषहरूमा  $\geq 900$  परजीवीहरू गन्नुभयो भने गन्न छोड्नुहोस् र नतिजाहरूलाई परजीवीहरूको संख्या प्रति २०० सेतो रक्तकोषहरू भनेर रेकर्ड गर्नुहोस् ।

- यदि तपाईंले ५०० सेतो रक्तकोषहरूमा  $\leq 99$  परजीवीहरू गन्नुभयो भने गन्न छोड्नुहोस् र नतिजाहरूलाई परजीवीहरूको संख्या प्रति ५०० सेतो रक्तकोषहरू भनेर रेकर्ड गर्नुहोस् ।

सामान्यतया: गणनामा तलका प्रमुख त्रुटिहरू हुन्छन् :

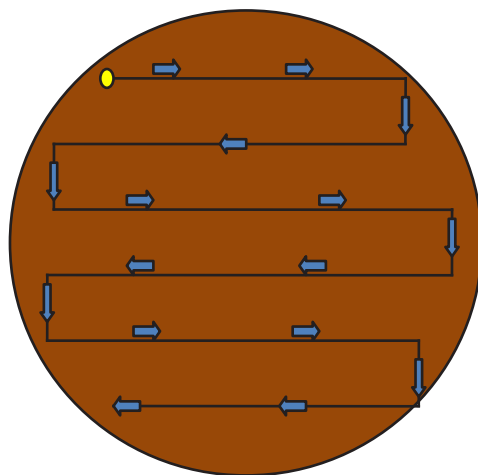
धेरै संख्यामा गणना गर्नु (High counts)- औलो परजीवी धेरै गणना गरिरहनु र सेतो रक्तकोषहरू पर्याप्त गणना नहुनुले हुनसक्छ ।

थोरै संख्यामा गणना गर्नु (Low counts)- सेतो रक्तकोषहरू धेरै गणना गरिरहनु र औलो परजीवी पर्याप्त गणना नहुनुले हुनसक्छ ।

प्रमुख तरिका भनेको परजीवीको गणनालाई बिस्तारै गर्ने र चुस्त दुरुस्त तरिकाले राम्रोसँग गर्नु हो ।

सही गणना (ACCURATE COUNTING) को लागि सुझावहरू

अधिकतम क्षेत्र समेट्नलाई गणनाको ट्राभर्सिङ (traversing) विधि प्रयोग गर्नुहोस् (विश्व स्वास्थ्य संगठनद्वारा सिफारिस गरिएको) ।

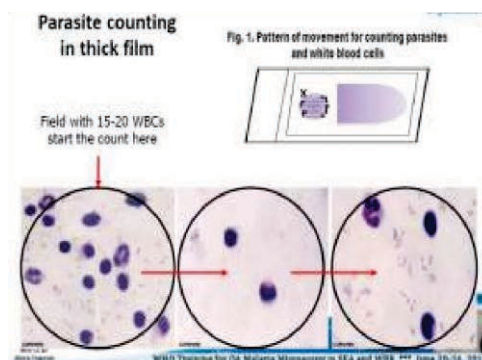


बाक्लो स्मीयरलाई

ट्राभर्सिङ (traversing) गर्ने

- स्मीयरको माथिल्लो बायाँ भागबाट गणना सुरु गर्नुहोस्, क्रस सेक्सनल (cross-sectional) तरिकाले सार्नुहोस् ।
- गणना गर्ने क्रममा प्रत्येक फिल्डमा देखिने सेतो रक्तकोषहरू र औलो परजीवीहरू अथवा यी मध्ये कुनै एक देखिएमा सो मात्र गणना गरी फिल्ड सार्नुहोस् । धेरै फिल्डहरू स्क्यान (scan) गर्नको लागि एक फिल्डबाट ५ अरु फिल्डहरू छोडेर मात्र गणना गर्नुहोस् ।

गन्दा खेरि यदि ५ फिल्डहरू परजीवीहरू पाउँदैन तर वा परजीवीहरू मात्र भेटिन्छ निरन्तरता दिनुहोस् ।



छोड्दा पनि कुनै केवल सेतो रक्तकोषहरू भने पनि गणनालाई

विशेष गरी गणना गर्न सुरु गर्नु अघि पूरै स्मीयरको स्क्यान (scan) गर्नुहोस् ।

- धेरै माइक्रोस्कोपिष्टहरूले प्रत्येक फिल्डको केन्द्रीय क्षेत्र मात्र स्क्यान (scan) गर्छन्, तपाईंले सम्पूर्ण फिल्ड हेर्नुपर्छ ।
- सबै सेतो रक्तकोषहरू र औलो परजीवीहरूलाई हेर्नको लागि फाइन फोकस (fine focus) लाई निरन्तर माथि र तल गर्नुपर्छ ।
- विशेष गरी कम परजीवी भएको अवस्थामा गणना सुरु गर्नु अघि स्क्यान (scan) गर्नुहोस् ।
- एक पटक भन्दा बढी सेतो रक्तकोषहरू वा परजीवीहरू गणना नगर्नलाई फिल्डलाई चार भागमा विभाजन गरेको कल्पना गर्नुहोस् र सोही अनुरूप गणना गर्नुहोस् ।
- स्पष्ट रूपमा पहिचान गर्न सकिने सेतो रक्तकोषहरू वा औलो परजीवीहरूलाई मात्र गणना गर्नुहोस्- पक्का नभएको भागहरूलाई नगणना गर्नुहोस् ।

#### १०.१ बाक्लो स्मीयरमा गणना (COUNT ON THICK SMEAR)

यदि सेतो रक्तकोषहरू भन्दा कम ट्रौफोज्वाइटहरू भएमा (ट्रौफोज्वाइटहरू  $< ५००/५००$  सेतो रक्तकोष) बाक्लो स्मीयरमा गणना गर्नु पर्दछ ।

##### १०.१.१ महत्वपूर्ण बुँदाहरू

- यो राम्रो स्टेन र सफा पृष्ठभूमि भएको राम्रो बाक्लो स्मीयरहरूमा गर्नुपर्छ : नीलो स्टेन भएको र/वा धेरै फोहोर स्मीयरहरूमा परीक्षण नगर्नुहोस् ।
- गणनाको लागि उचित स्थान छनौट गर्नुहोस् : स्मीयरको बीच भागमा लगभग ५ देखि १५ सेतो रक्तकोषहरू/HPF (उच्च पावर फिल्ड) बाट परीक्षण सुरु गर्नुहोस् ।

नोट : यदि राम्रो बाक्लो स्मीयरमा २५ सेतो रक्तकोष/HPF भन्दा बढी भेटियो भने, यसको मतलब सेतो रक्तकोषको गणना एकदमै धेरै देखियो र यसले संक्रमणको संकेत जनाउँछ । चिकित्सकलाई सो अनुसार रिपोर्ट गर्नुहोस् : अनुरोध फारममा अधिक वृद्धि भएको सेतो रक्तकोषको प्रकार (न्युट्रोफिलहरू वा लिम्फोसाइटहरू) र संख्या उल्लेख गर्नुहोस् ।

##### १०.१.२ कसरी गणना गर्ने

- गन्ती एक फिल्डबाट अर्को फिल्डमा गएर गरिन्छ ।

नोट : कहिलेकाँही केही फोहोर वा आर्टिफ्याक्ट्स (artifacts) सँगको फिल्डहरू हुन सक्छन्, त्यतिखेर यस क्षेत्रमा गणना नगर्नुहोस् र उपयुक्त क्षेत्रमा नपुग्दासम्म अगाडि बढ्नुहोस् ।

- सम्पूर्ण फिल्डका सबै सेतो रक्तकोष र सबै परजीवीहरूको गणना गर्नुहोस् : फिल्डको बाहिरी भागमा भएका परजीवीहरूको गणना गर्न नबिर्सनुहोस् ।
- यदि गणनालाई एउटा फिल्डबाट सुरु गरिएको छ भने ५०० सेतो रक्तकोष भन्दा बढी भए तापनि यसलाई सकाउनु पर्छ । वास्तविक परजीवीहरूको संख्या र सेतो रक्तकोषहरू रिपोर्ट गरिनु पर्दछ र हिसाबमा विचार गर्नुपर्छ ।

उदाहरण १ : अन्तिम फिल्डमा ५०४ सेतो रक्तकोषमा पुग्यो र कुल १२ परजीवीहरू गणना गरियो : अनि नतिजा १२/५०४ सेतो रक्तकोष हुनेछ ।

उदाहरण २ : अन्तिम फिल्डमा ४९६ सेतो रक्तकोषमा पुग्यो र कुल १२ परजीवीहरू गणना गरियो : अनि नतिजा १२/४९६ सेतो रक्तकोष हुनेछ ।

## उच्च परजीवी गणना बाक्लो रगतका स्मीयरहरूको गणनाको लागि रणनीतिहरू

- यदि  $> 50,000/\mu\text{L}$  ( $\sim > 900/\text{फिल्ड}$ ) छ भने पातलो स्मीयरको प्रयोग गर्नुपर्दछ-नियमित प्रयोगशालाको कामका लागि गर्नुपर्दछ।
- सेतो रक्तकोष र परजीवीहरूलाई ट्राभर्सिङ्ग (traversing) विधिबाट गणना गर्नुहोस्। परजीवीहरूलाई एक पटक भन्दा बढी गणना नगर्नुहोस्।
- प्रमुख तरिका भनेको परजीवीको गणनालाई बिस्तारै गर्ने र चुस्त दुरुस्त तरिकाले राम्रोसँग गर्नु हो।

### १०.२. पातलो स्मीयरमा गणना (COUNT ON THIN SMEAR)

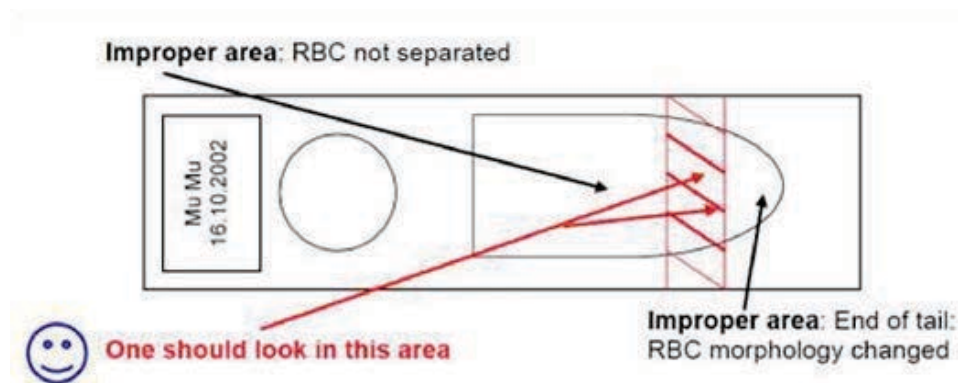
यदि सेतो रक्तकोष भन्दा बढी ट्रौफोज्वाइटहरू भएमा (ट्रौफोज्वाइटहरू  $\geq 500/500$  सेतो रक्तकोष) पातलो स्मीयरमा गणना गर्नु पर्दछ।

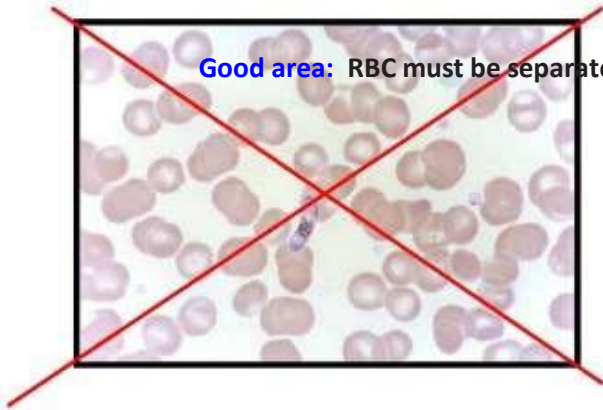
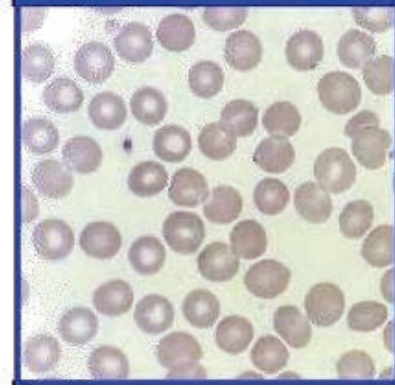
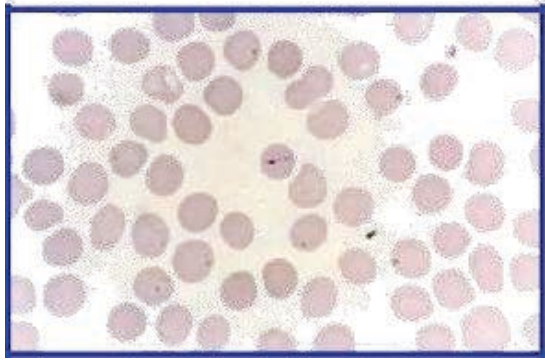
**!! चेतावनी :** परजीवीको संख्या (parasitaemia) उच्च छ र पातलो स्मीयरमा गर्नुपर्ने भए तापनि बाक्लो स्मीयरमा कमसेकम ३० HPF मा साइजोन्टहरू, ग्यामेटोसाइटहरू, औलाको पिग्मेन्ट (pigment) र/वा अरु चरणहरू छ वा छैन भन्ने पुष्टि गर्नुपर्छ।

पातलो स्मीयरमा धेरै समय लाग्ने गर्दछ। बाक्लो स्मीयरको प्रयोगमा भन्दा पातलो स्मीयरमा परजीवीहरूको पहिचान १/१० गुणा मात्र संवेदनशील हुन्छ। जब धेरै परजीवीहरू हुन्छन् र गणना गर्न गाह्रो हुन्छ, सामान्य नियम भनेको पातलो स्मीयरमा जाने र संक्रमित रातो रक्तकोषको गणना गर्ने हो। यद्यपि, दक्षता स्तर मूल्यांकन कोर्स (competency level assessment course) को लागि यो गर्न असम्भव छ। कोर्सको बेला तपाईंले बाक्लो स्मीयरबाट परजीवीको गणना (parasite count) निर्धारण गर्नुहुनेछ।

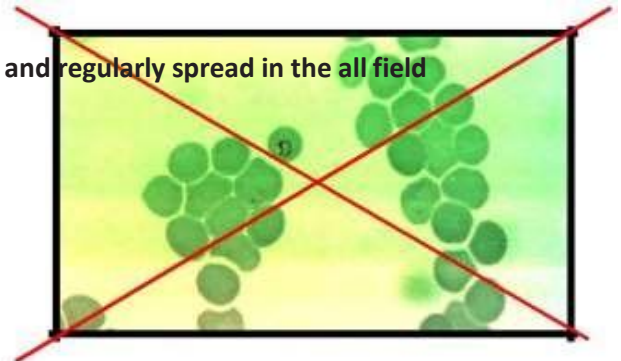
#### १०.२.१ महत्वपूर्ण बुँदाहरू

- राम्रो गुणस्तरको स्मीयर उचित गणनाको लागि आवश्यक छ।
- गणनाका लागि उचित स्थान : पातलो स्मीयरका जिब्रो आकारको पुच्छरको ठीक अघि।





**BAD:** RBC on top of each other

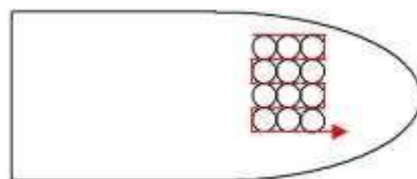


**BAD:** end of the tail

**Good area:** RBC must be separated and regularly spread in the all field

### १०.२.२ कसरी गणना गर्ने

- उचित क्षेत्रको लागि पातलो स्मीयरलाई स्क्यान (scan) गर्नुहोस् जहाँ रातो रक्तकोषहरू समान रूपमा छुट्टाछुट्टै एकअर्कामा नखप्टिने गरी रहेको फिल्डमा परीक्षण गर्नुहोस् । यसको लागि अभ्जेक्टभ (objective) ४०X वा अभ्जेक्टभ (objective) १०X बाट सजिलै स्क्यान (scan) गर्न सकिन्छ ।
- उचित क्षेत्र भेटाएपछि इमर्सन (immersion) तेल राख्नुहोस् र अभ्जेक्टभ (objective) १००X तिर सार्नुहोस् ।
- एक फिल्डबाट अर्को फिल्डमा जाँदै गर्दा गणनालाई निरन्तरता दिनुहोस् ।

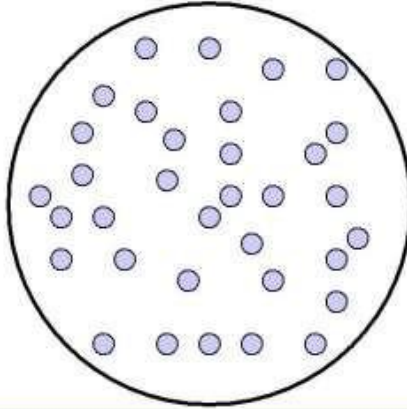


- **सम्पूर्ण फिल्डको सबै ट्रोफोज्वाइटहरूको गणना गर्नुहोस्** : फिल्डको बाहिरी भागमा भएका ट्रोफोज्वाइटहरूको गणना गर्न नबिर्सनुहोस् ।

याद गर्नुहोस्:

सबै केसहरूमा ट्रोफोज्वाइटहरूको मात्र गणना गर्नुहोस् । यदि एउटा रातो रक्तकोष भित्र ३ वटा ट्रोफोज्वाइटहरू छन् भने यसलाई एउटा भनेर गणना गर्नुपर्छ ।

राम्रो पातलो स्मीयर यस्तो देखिन्छ :



There is less than 200 RBCs per H.P.F



**१००० रातो रक्तकोष र संक्रमित रातो रक्तकोषको संख्या गणना गर्नुहोस् ।**

औलो परजीवीको गणनामा देखिने समस्याहरू

- रगतको सानो नमुना मात्र जाँच गरिन्छ-  
~ ५ L → ५  $\mu$ L → १०० फिल्डहरू
- परजीवीहरू लुकेर बसेको अवस्थामा हुन सक्छन् । परजीवीको सही घनत्व पत्ता लगाउन मुस्किल हुनसक्छ ।
- सेतो रक्तकोष र औलो परजीवीहरू समान रूपमा वितरित हुँदैनन् ।
- नराम्ररी तयार गरिएका रगतका स्मीयरहरू
- पर्याप्त एकाग्रता (र अभ्यास) आवश्यक छ
- राम्रो गुणस्तरीय रिएजेन्ट (reagents) र राम्रोसँग राखिएको माइक्रोस्कोपहरूको आवश्यकता छ ।

त्रुटिका स्रोतहरू

- विधिगत (Procedural)
  - गलत विधि अपनाउनु
  - उदाहरण को लागि, पर्याप्त फिल्डहरू वा सेतो रक्तकोषको जाँच नगर्ने
- मेकानिकल

- माइक्रोस्कोपको गुणस्तर राम्रो नहुनु
- ट्याली (Tally) काउन्टर नहुनु
- क्यालकुलेटर नहुनु
- मानव
  - एकाग्रता नहुनु
  - कामको चापले थकान हुनु



## खण्ड ११: नतिजाहरूको व्याख्या, रेकर्डिङ्ग र रिपोर्टिङ्ग

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

- माइक्रोस्कोपी केन्द्रहरूमा औलो रगतको स्मीयर परीक्षणको नतिजाहरूको व्याख्या, रेकर्डिङ्ग र रिपोर्टिङ्गको लागि दिशानिर्देशहरू प्रदान गर्न ।
- औलो निदानको लागि रगतका स्मीयरहरूको माइक्रोस्कोपिक परीक्षणको नतिजाको उचित रेकर्डिङ्ग र रिपोर्टिङ्गको प्रक्रिया वर्णन गर्न

सामग्रीहरू:

- बिरामी रिपोर्टिङ्ग फारम
- प्रयोगशाला रजिष्टर किताब
- कलम

प्रक्रिया :

रगतको स्मीयरको जाँच गरेपछि, नतिजाहरूलाई निम्न रूपमा लगबुकमा रेकर्ड गर्नुहोस् :

प्लाज्मोडियम फालिसपारम:	
असेक्सुअल (Asexual) चरणहरू मात्र (ट्रोफोज्वाइटहरू र साइजोन्टहरू)	F
सेक्सुअल (Sexual) चरणहरू मात्र (ग्यामेटोसाइटहरू मात्र)	Fg
असेक्सुअल (Asexual) र सेक्सुअल (Sexual) चरणहरू	F + g
प्लाज्मोडियम भाइभेक्स:	
केही/सबै चरणहरू देखिएको	V
प्लाज्मोडियम मलेरी	
केही/सबै चरणहरू देखिएको	M
प्लाज्मोडियम ओभली	
केही/सबै चरणहरू देखिएको	O
मिश्रित संक्रमण	P Mix (प्रजाति उल्लेख गर्नुहोस्)
औलो परजीवी नदेखिएको	NMPS

### ११.१ माइक्रोस्कोपी नतिजाहरूको रेकर्डिङ्ग र रिपोर्टिङ्ग

औलोका बिरामीहरूको उपचारको लागि र औलोको खोजपड्ताल (Surveillance) तथ्याङ्कको विश्वसनीयताका लागि रगतका स्मीयरको माइक्रोस्कोपी परीक्षणको नतिजाको उचित रेकर्डिङ्ग र रिपोर्टिङ्ग महत्वपूर्ण छ । रेकर्डिङ्ग र रिपोर्टिङ्गको आधारमा अनुगमन, मूल्यांकन र कार्यक्रमको योजना गरिन्छ ।

सामग्रीहरू र उपकरणहरू

- प्रयोगशाला रजिष्टर (वा औलो माइक्रोस्कोपी रजिष्टर),
- बिरामी नतिजा फारम,
- कलम र पेन्सिल र

- क्यालकुलेटर (परजीवीको घनत्व अनुमान गर्नको लागि)

#### प्रक्रिया

- माइक्रोस्कोपिक परीक्षण गरेपछि नतिजा रेकर्ड र रिपोर्ट गर्नुपर्दछ ।
- रगतको स्मीयरको माइक्रोस्कोपिक परीक्षणको क्रममा अवलोकन गरिएको सबै औलो प्रजातिहरू र चरणहरू रेकर्ड गर्नुहोस् ।
- बाक्लो स्मीयरमा गणना सकिएपछि यदि बिरामीको वास्तविक सेतो रक्तकोषको गणना उपलब्ध छैन भने अनुमानित  $4000/\mu\text{L}$  सेतो रक्तकोषको गणनाबाट परजीवीको घनत्व निम्नानुसार हिसाब गर्नुहोस् :

गणना गरिएको असेक्सुअल (asexual) परजीवीहरूको संख्या  $\times 4000$  सेतो रक्तकोषहरू/ $\mu\text{L}$   
परजीवीहरू/ $\mu\text{L}$  रगत=गणना गरिएको सेतो रक्तकोषहरूको संख्या

#### उदाहरण १ :

गणना गरिएको प्लाज्मोडियम फाल्सिपारम ट्रौफोज्वाइटहरू = १००  
परजीवीहरूको अनुपातमा गणना गरिएको सेतो रक्तकोषहरू = २००  
परजीवीहरूको गणना :

$$100 \times 4000 = 400000 \text{ परजीवीहरू}/\mu\text{L रगत } 200$$

यसरी रिपोर्ट गर्नुहोस्: प्लाज्मोडियम फाल्सिपारम ट्रौफोज्वाइटहरू = ४००० p/ $\mu\text{L}$  रगत

#### उदाहरण २ :

गणना गरिएको प्लाज्मोडियम भाइभेक्स ट्रौफोज्वाइटहरू = ९९  
परजीवीहरूको अनुपातमा गणना गरिएको सेतो रक्तकोषहरू = ५०५  
बिरामीको वास्तविक सेतो रक्तकोष गणना (count) = ६०००

परजीवी गणना (Parasite count) :  $99 \times 6000 = 594000$  परजीवीहरू/ $\mu\text{L}$  रगत ५०५

यसरी रिपोर्ट गर्नुहोस् : प्लाज्मोडियम भाइभेक्स ट्रौफोज्वाइटहरू = ११८८ परजीवीहरू/ $\mu\text{L}$  रगत

मिश्रित संक्रमणमा वा एक भन्दा बढी प्रजातिहरूले गराउने संक्रमणमा सबै प्रजातिहरूलाई सँगै गन्नुहोस् (सेक्सुअल (sexual) र असेक्सुअल (asexual) चरणहरू) र उदाहरण ३ मा जस्तै नतिजालाई देखाउनुहोस् ।

#### उदाहरण ३ :

गणना गरिएको प्लाज्मोडियम फाल्सिपारम ग्यामेटोसाइटहरू + प्लाज्मोडियम भाइभेक्स ट्रौफोज्वाइटहरू = ४२० परजीवीहरू (सबै चरणहरू)

परजीवीहरूको अनुपातमा गणना गरिएको सेतो रक्तकोषहरू = २१०

यसरी रिपोर्ट गर्नुहोस् :

प्लाज्मोडियम फाल्सिपारम ग्यामेटोसाइटहरू + प्लाज्मोडियम भाइभेक्स ट्रौफोज्वाइटहरू = १६००० परजीवीहरू/ $\mu\text{L}$  रगत

साथै यिनको उपस्थिति रिपोर्ट गर्नुहोस् :

- प्लाज्मोडियम फाल्सिपारमको ग्यामेटोसाइटहरू छुट्टै गनिन्छ, तर तिनीहरू नियमित परजीवीको गणनामा पनि समावेश गर्ने गरिन्छ । साइजोन्टहरूको उपस्थितिले रोगको गम्भीरताको सङ्केत गर्दछ ।

- प्रयोगशाला रजिष्टरको माइक्रोस्कोपी भागमा बिरामीको पहिचान नम्बर, परीक्षणको मिति र समय र परजीवीका प्रजातिहरू, चरणहरू र परजीवीको गणनाको रेकर्ड गर्नुपर्छ । रिपोर्टिङमा एकरूपता हुनुपर्दछ । उदाहरणको लागि :
  - प्लाज्मोडियम भाइभेक्स ट्रोफोज्वाइटहरू देखिएको ।
  - प्लाज्मोडियम फाल्सिपारम ट्रोफोज्वाइटहरू देखिएको; गणना,
  - प्लाज्मोडियम फाल्सिपारम ग्यामेटोसाइटहरू देखिएको ।
  - नो मलेरिया प्यारासाइट सिन (No Malaria Parasite Seen: NMPS) । “नेगेटिभ” भन्ने शब्दको प्रयोग नगर्नुहोस् ।

## ११.२ केसको सूचना

शंकास्पद बिरामीको औलो जाँच पछि औलो पुष्टि भएका बिरामीहरूको विवरण मोबाइल एस.एम.एस (SMS) वा मोबाइल APP को प्रयोग गरी औलो रिपोर्टिङ प्रणाली Malaria Disease Information System (MDIS) मा सूचित गर्नुपर्छ । औलो रोग खोजपड्तालमा यसको महत्वपूर्ण भूमिका छ । MDIS मुलधार रिपोर्टिङ प्रणाली DHIS-2 को पूरक (complementary) हो । यद्यपि केस रिपोर्टिङ EWARS मार्फत पनि गर्न सकिन्छ ।

बिरामीको निदान भएको २४ घण्टा भित्र MDIS मा सूचना दिनुपर्दछ । MDIS मा पठाइएको विवरणको आधारमा बिरामीको सुरुवाती पुष्टि गरिन्छ र औलो खोजपड्ताल (Surveillance) निर्देशिका अनुसार “केसमा आधारित अनुसन्धान (Case Based investigation)” र “फोसाई इन्भेष्टिगेसन (Foci investigation)” जस्ता क्रियाकलापहरू गरिन्छ ।

### ११.२.१ औलो रोग सूचना प्रणाली (Malaria Disease Information System)

MDIS वास्तविक समयमा हुने रिपोर्टिङ प्रणाली (Real Time Reporting System) हो । समुदायमा रहेका औलो बिरामीहरूलाई पत्ता लगाई निदान तथा उपचार तत्कालै गर्नुपर्ने भएकोले तुरुन्तै रिपोर्टिङ गर्नु एकदमै आवश्यक हुन्छ । सोही अनुरूप औलो कार्यक्रमले MDIS को माध्यमबाट वास्तविक समयमा छिटो रिपोर्टिङ गर्ने प्रणालीका साथै मासिक रूपमा रिपोर्टिङ गर्ने प्रणाली DHIS-2 (पहिले HMIS) लाई समेटेको छ । MDIS मोबाइलमा आधारित निःशुल्क एस.एम.एस (SMS) रिपोर्टिङ प्रणाली हो जसले पहिचान भएको औलोको बिरामीको जानकारी वास्तविक समयमा कार्यक्रमलाई दिन्छ । MDIS मा उपलब्ध जानकारीको आधारमा प्रमाणिकरण गरी ३ दिन भित्र “केसमा आधारित अनुसन्धान (Case Based investigation)” र ७ दिन भित्र “फोसाई इन्भेष्टिगेसन (Foci investigation)” सञ्चालन गरेर रेकर्डिङ रिपोर्टिङ गर्न आवश्यक हुन्छ ।

३६०४० मा निम्न ढाँचामा लेखेर SMS पठाइन्छ । सो SMS लाई इपिडिमियोलोजी तथा रोग नियन्त्रण महाशाखाको रिपोर्टिङ च्यानलमा पुग्नको लागि पहिलो शब्द ‘Mal’ अनिवार्य हुन्छ ।

Mal<Space>जिल्ला/प्रदेश<Space>नगरपालिका/गाउँपालिका<Space>वार्ड नम्बर<Space>टोलको नाम<Space> बिरामीको नाम <Space>उमेर <Space>लिङ्ग<Space>PV/PF<Space>RDT/Mic <Space>स्थानीय/आयातित<Space> बिरामीको सम्पर्क नम्बर

‘Your SMS has been successfully captured’ भन्ने सन्देश SMS को प्रेषकले प्राप्त गर्नेछ, जसले गर्दा प्रेषकले आफूले पठाएको SMS इपिडिमियोलोजी तथा रोग नियन्त्रण महाशाखामा पुग्यो भन्ने कुराको पुष्टि गर्नेछ । MDIS एप्लिकेसन (application) ‘MDIS Nepal’ स्मार्ट मोबाइलहरूको लागि अब उपलब्ध छ र Android र iOS को लागि डाउनलोड गर्न सकिन्छ ।

MDIS मोबाइल एप (App) प्रयोग गर्ने प्रेषकले ड्रपडाउन (drop-down) विवरणहरू चयन गर्न सक्छ र पठाउनु अघि प्रत्येक विवरण उल्लेख गर्नुपर्छ । विवरणहरू मोबाइल एप (App) मार्फत पठाउनलाई ईन्टरनेट जडानको आवश्यकता पर्दैन किनकि यसले रिपोर्टिङको लागि SMS पोर्टल प्रयोग गरेको छ ।

MDIS स्टीकरको लागि अनुसूची २ मा हेर्नुहोस् ।

### ११.२.२ औलोको रेकर्डिङ, रिपोर्टिङ र खोजपडताल (Surveillance)

औलोको निदान र उपचारका लागि शंकास्पद औलोका विरामीहरू भएका सबै स्वास्थ्य संस्थाहरू (उपस्वास्थ्य चौकी, स्वास्थ्य चौकी, प्राथमिक स्वास्थ्य सेवा केन्द्रहरू, जिल्ला अस्पतालहरू, स्वास्थ्य कार्यालय, अञ्चल अस्पतालहरू र तृतीय श्रेणीका अस्पतालहरू) ले प्रत्येक विरामीको विवरण अनलाइन वा कागजमा आधारित औलो केस रजिष्टर (औलो केस अनुसन्धान फारम र राष्ट्रिय औलो रजिष्टर) मा रेकर्ड गर्नुपर्छ र दैनिक/साप्ताहिक र मासिक रूपमा EWARS/IDSR/MDIS/HMIS को आवश्यकताको आधारमा इपिडिमियोलोजी तथा रोग नियन्त्रण महाशाखामा रहेको राष्ट्रिय औलो कार्यक्रममा रिपोर्ट गर्नुपर्छ । सम्बन्धित जिल्लाका फोकल केन्द्रहरूले मासिक रूपमा रिपोर्ट गरिएका केसहरूको पुष्टि गरी इपिडिमियोलोजी तथा रोग नियन्त्रण महाशाखालाई क्रस रिपोर्टिङ (cross reporting) गर्नुपर्छ ।

इपिडिमियोलोजिकल उद्देश्यका लागि थप विश्लेषण गर्नको लागि प्रत्येक केसलाई केस अनुसन्धान फारम (CIF) मा रेकर्ड गर्नुपर्छ ।

संक्षेपमा, केस अनुसन्धान फारम (CIF) मा विरामीको विवरण, निदान परीक्षणका नतिजाहरू, औषधि उपचारको विवरण, औलो रोगको वर्गीकरण, संक्रमणको स्रोत आदि समावेश गर्नुपर्दछ ।

विस्तृत रूपमा थप जानकारी अनुसूची ३ मा देखाए बमोजिम केस अनुसन्धान फारम (CIF) मा उपलब्ध छन् ।

### ११.२.३ केसमा आधारित अनुसन्धान (Case based investigation) र फोसाई इन्भेष्टिगेसन (Foci investigation)

खोजपडताल (Surveillance) औलो निवारण कार्यक्रमको अभिन्न हिस्सा हो । प्रत्येक निदान भएका औलोको विरामीको सम्बन्धित फोकल व्यक्ति/जिल्ला/प्रदेश/इपिडिमियोलोजी तथा रोग नियन्त्रण महाशाखामा रिपोर्ट गरिनुपर्छ । औलो खोजपडताल (Surveillance) प्रणालीको यो एक महत्वपूर्ण भाग हो । समुदायमा रिपोर्ट गरिएको प्रत्येक औलोको विरामीको अनुसन्धान गर्नुपर्छ । निदान भएपछि केसलाई राष्ट्रिय औलो उपचार पद्धति अनुसार उपचार गरिनुपर्छ र तुरुन्त MDIS मा रिपोर्ट गरिनुपर्छ ।

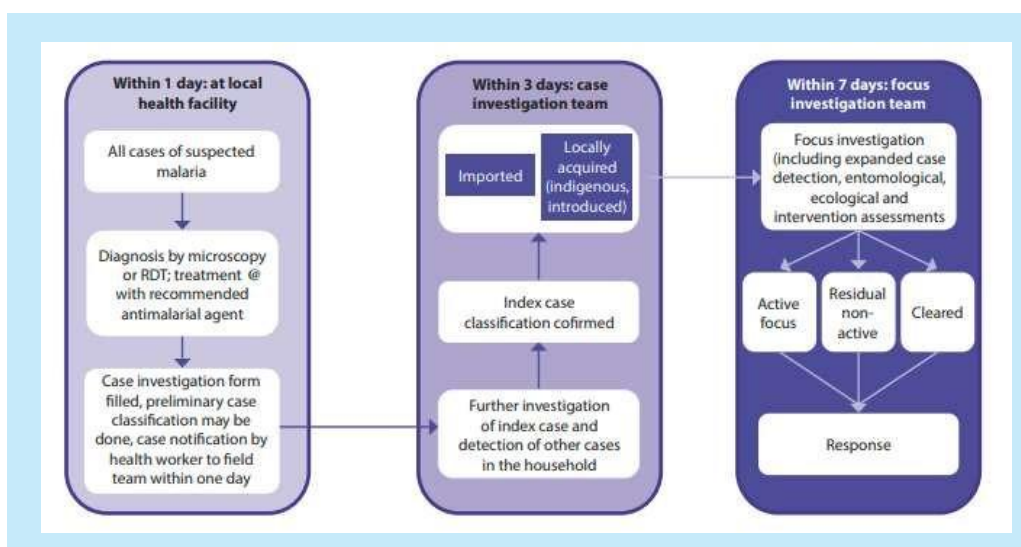
औलो देखिएको समुदायमा औलो विरामी भेटिए लगत्तै केसमा आधारित अनुसन्धान (Case based investigation) गरिन्छ । अनुसन्धान गरिरहेको खोजपडताल (Surveillance) टोलीले औलो सरेको सम्भावित स्थान पत्ता लगाउन विरामीको यात्राको इतिहास लिनुपर्छ । स्थानीय रूपमा सरेको (स्थानीय) रोगलाई तथा सम्भावित स्थानीय रूपमा रोग सर्नबाट रोक्नको लागि नेपाल बाहिरबाट औलो सरेका विरामीहरूलाई पनि प्राथमिकताका साथ अनुसन्धान गरिन्छ । यदि केस अनुसन्धानले केसलाई आयातित भनेर पहिचान गर्‍यो भने mRDT (Malaria RDT) र माइक्रोस्कोपी स्लाइडहरूको प्रयोग गरेर स्वास्थ्यकर्मी र प्रयोगशाला सहयोगीद्वारा महिला स्वास्थ्य स्वयंसेविकाको सहयोगमा सबै परिवारका सदस्यहरू र सहकर्मी/सहयात्रीलाई औलोको लागि जाँच गरिन्छ । यदि

केस अनुसन्धानले स्थानीय भनेर पहिचान गर्‍यो भने थप केसहरू खोज्नको लागि घरका सबै सदस्यहरू सहित २ किलोमिटर परिधि भित्र रहेका अथवा ५० घरधुरीमा बस्ने सबै मानिसहरूको जाँच गरिन्छ ।

यदि केसमा आधारित अनुसन्धान (Case based investigation) मा सक्रिय फोसाई (active foci) देखिन्छ भने केसको सूचना पाएको ७ दिन भित्रमा अनुसन्धान गर्नुपर्छ । खोजपड्ताल (Surveillance) निर्देशिकाले परिभाषित गरे बमोजिम नियमित क्रियाकलाप जस्तै सक्रिय केस पहिचान गर्नुपर्छ । फोसाई (Foci) अनुसन्धान पछि समुदायलाई उपयुक्त उपायहरू (जस्तै कीटनाशक औषधि छर्काउ (IRS) वा भ्रूल (LLIN) वितरण) गरिन्छ । “सक्रिय” फोसाई (Foci) बाहेकका अन्य फोसाई (Foci) हरूको हकमा महिला स्वास्थ्य स्वयंसेविकाको सहयोगबाट समुदायमा देखिएका अथवा शंकास्पद ज्वरो आएका बिरामीहरूलाई नजिकैको स्वास्थ्य संस्थाहरूमा औलो परीक्षणको लागि पठाउनुपर्छ र सतर्कता अपनाउनुपर्छ ।

नेपालमा खोजपड्ताल (Surveillance) प्रणालीबाट केस पत्ता लागेको २४ घण्टा भित्रमा सूचना प्रवाह गर्नुपर्दछ । केसको सूचना प्राप्त भएपछि सूचना पाएको ४८ घण्टा भित्रमा केसको अनुसन्धान गरिन्छ र केस पत्ता लागेको ७ दिन भित्रमा फोसाई इन्भेष्टिगेसन (Foci investigation) भई प्रतिक्रिया आउने अपेक्षा गरिन्छ ।

तलको चित्रले औलो खोजपड्ताल (Surveillance) को १-३-७ दिनको क्रियाकलापहरू देखाउँछ ।



### ११.३ जिल्ला स्वास्थ्य सूचना प्रणाली २ (DHIS-2)

जिल्ला स्वास्थ्य सूचना प्रणाली २ स्वास्थ्य विभाग, नेपाल सरकारको वेबमा आधारित रिपोर्टिङ प्रणाली हो । यसलाई पहिले स्वास्थ्य व्यवस्थापन सूचना प्रणाली (Health Management information system (HMIS)) भनिन्थ्यो । HMIS लाई DHIS2 मा अद्यावधिक (upgrade) गरेको भए पनि रेकर्डिङ र रिपोर्टिङको लागि अझै HMIS कै प्रयोग गरिन्छ । स्थानीय तह देखि जिल्ला सम्मका स्वास्थ्य संस्थाहरूबाट आएका स्वास्थ्यसँग सम्बन्धित तथ्याङ्कहरूको रेकर्डिङ र रिपोर्टिङ गर्न यसको प्रयोग गरिन्छ । कुनै पनि जनस्वास्थ्य कार्यक्रमको मेरुदण्ड भनेको तथ्याङ्क उपलब्ध गराउनु हो र वास्तविक तथ्याङ्क उपलब्ध गराउनको लागि सम्बन्धित फोकल व्यक्ति तोकिएको हुन्छ । तथ्याङ्क प्रविष्टि (data entry) गर्ने बेला प्रत्येक स्तरमा प्रमाणिकरण गरियो भने

तथ्याङ्कमा देखिने त्रुटिमा कमी ल्याउन सकिन्छ । HMIS मा स्पष्ट रेकर्डिङ्ग र रिपोर्टिङ्गका लागि कोडहरू तोकिएको हुन्छ । जस्तै औलोको लागि निम्न बमोजिमका कोडहरू दिइएका छन् :

#### HMIS रेकर्डिङ्ग कोडहरू

- HMIS ५.१: औलो, कालाजार र कुष्ठरोग नमुना सङ्कलन फारम
- HMIS ५.२: औलो, कालाजार र कुष्ठरोग प्रयोगशाला रजिष्टर
- HMIS ५.३: औलो, कालाजार उपचार रजिष्टर
- HMIS ४.२: ORC रजिष्टर
- HMIS २.४: CBIMCI
- HMIS १.३: OPD

#### HMIS रिपोर्टिङ्ग कोडहरू

- HMIS ९.२: ORC रिपोर्ट
- HMIS ९.३: स्वास्थ्य संस्था रिपोर्ट
- HMIS ९.४/९.५: अस्पताल



## खण्ड १२: औलो माइक्रोस्कोपी प्रयोगशालामा अपनाउनुपर्ने सुरक्षाका प्रक्रियाहरू

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

- औलो माइक्रोस्कोपीको लागि रगतको नमुना सङ्कलन र जाँच, स्मीयर तयारी र स्टेनिङ्गको बेला प्रयोगशालामा अपनाउनुपर्ने आधारभूत सुरक्षाका प्रक्रियाहरू वर्णन गर्न

माइक्रोबायोलोजिकल काम गर्ने प्रयोगशालाकर्मिहरूले मानव टिस्यु र तरल नमुनाहरूसँग काम गर्दा आवश्यक सुरक्षाका विधिहरू अपनाउनुपर्छ । मानव शरीरका तरल पदार्थहरू, विशेष गरी रगतको नमुनाहरू दबतब कबचलभ सरुवा रोगहरू जस्तै एचआईभी-१ र -२ (HIV 1 & 2) संक्रमण, हेपेटाइटिस बी र सी (Hepatitis B & C) आदिका सम्भावित स्रोतहरू हुन् । रगत र शरीरको अन्य तरल पदार्थहरूसँगको प्रत्यक्ष सम्पर्कबाट, प्रयोग गरिएका तिखा वा धारिला वस्तुहरू (जस्तै ल्यान्सेट, सिरिन्ज) बाट छाला काटिएर वा भुकिएर घोचिँदा वा अन्य निर्जीव वस्तुहरूसँगको सम्पर्कबाट संक्रमण हुनसक्छ । प्रयोगशाला र फिल्डका सबै कर्मचारीहरूले सबै मानवीय नमुनाहरू संक्रामक हुनसक्छन् भनेर सोच्नुपर्छ र रगतबाट हुने संक्रमणको जोखिमबाट बच्नको लागि सावधानी अपनाउनु पर्छ ।

सामग्रीहरू

३. प्रयोगशालामा लगाउने कोटहरू वा गाउनहरू,
४. चस्माहरू (safety glasses),
५. ७०% अल्कोहल वा सोडियम हाइपोक्लोराइट (ब्लीच) (sodium hypochlorite (bleach)),
६. डिटरजेन्ट,
७. हाइपोक्लोराइट सलुसन (hypochlorite solution) 1 g/L (सामान्य प्रयोगको लागि),
८. हाइपोक्लोराइट सलुसन (hypochlorite solution) 5 g/L (संक्रमित रगत पोखिएको खण्डमा)
९. प्रयोगशालामा प्रयोग गर्ने पञ्जाहरू,
१०. डिस्इन्फेक्टेन्ट (disinfectant) वा एन्टिब्याक्टेरियल साबुन,
११. तिखा धारिला वस्तु फाल्ने भाँडा
१२. फोहोर फाल्ने भाँडा,
१३. हाते तौलियाहरू,
१४. पानी र
१५. अटोक्लेभ (autoclave)

प्रक्रिया

प्रयोगशाला वा काम गर्ने ठाउँ

- कम्तिमा दुई जना प्रयोगशाला प्राविधिकहरू वा कर्मचारीहरू सँगसँगै काम गर्नको लागि सफा, धुलो रहित पर्याप्त ठाउँ प्रदान गर्नुहोस् ।
- कुनै रसायन वा रगत पोखिएको खण्डमा १०% ब्लीच (सोडियम हाइपोक्लोराइट (sodium hypochlorite)), वा ७०% अल्कोहलले तुरुन्त सफा गर्नुहोस् ।
- रिएजेन्ट (reagent) र स्टेनहरू प्रयोगमा ल्याउँदा नाम, तयार गरेको वा खोलिएको मिति र म्याद समाप्त हुने मिति प्रष्ट हुने गरी राम्ररी लेबल गर्नुहोस् ।
- सबै सिसाबाट बनेका सामग्रीहरू र अरु सामग्रीहरूलाई पुनः प्रयोगको लागि डिटरजेन्ट अथवा सफा पानीले पखाल्नुहोस् ।

- सबै सामग्रीहरूलाई बाहिर राम्ररी लेबल गरेर धुलो, फोहोर र कीराहरू रहित ठाउँमा तोकिएको बक्समा राख्नुहोस् ।
- उपयुक्त राष्ट्रिय र/वा अन्तर्राष्ट्रिय नियमहरू अनुसार रगतको नमुनाहरूलाई प्याक गर्नुहोस् र सुनिश्चित तरिकाले लैजानुहोस् ।
- प्रयोग नभएको बेला खतरनाक रसायनहरू जस्तै मिथानोललाई बन्द दराजमा भण्डार गर्नुहोस् ।

### व्यक्तिगत सुरक्षा

- प्रयोगशाला वा फिल्डमा मानिसको रगत चलाउँदा पञ्जाको प्रयोग गर्नुहोस् । रगत वा संक्रामक सामग्रीसँग भुक्किएर वा प्रत्यक्ष सम्पर्क हुने सबै प्रक्रियाहरूको लागि पञ्जा लगाउनुहोस् । फोहोर वा प्वाल भएका पञ्जाहरू फाल्नुहोस् ।
- प्रयोगशाला भित्र काम गर्दा प्रयोगशालामा लगाउने गाउन लगाउनुहोस् र यसलाई निस्कनु अगाडि र प्रयोगशाला बाहिर हुँदा खोल्नुहोस् ।
- सुरक्षा चश्मा लगाउनुहोस् ।
- पञ्जा लगाउनु अगाडि काटेको घाउ, अल्सर, डर्मटाइटिस (dermatitis) छ भने छालामा ड्रेसिङ वा ब्याण्ड ऐड (band aid) ले छोप्नुहोस् ।
- प्रयोगशाला भित्र खानेकुरा निषेधित गर्नुपर्छ ।
- मोबाइल फोनको प्रयोग प्रयोगशालामा गर्न दिनु हुँदैन ।
- प्रयोगशालामा व्यक्तिगत कम्प्युटर वा फोनको प्रयोग गर्दा पञ्जा फुकाल्नुहोस् ।
- काम अधि र पछि र प्रयोगशालाबाट निस्कनु अगाडि साबुन पानीले सही तरिकाले हात धुनुहोस् ।
- प्रत्येक रिएजेन्ट (reagent) प्रयोग गर्नको लागि “सामग्रीको सुरक्षा तथ्याङ्क पाना (material safety data sheet)” पढ्नुहोस् ।

### रगत सङ्कलन र जाँचको बेला सुरक्षा

- ल्यान्सेट, सिरिन्ज हरेक पल्ट प्रयोग गरेपछि पुनः प्रयोग नगर्नुहोस् ।
- माइक्रोपिपेट (Micropipettes) लाई राम्रोसँग प्रयोग गर्नुहोस्, अर्थात् कहिले पनि मुखबाट पिपेट (pipette) नगर्नुहोस्; मेकानिकल पिपेट गर्ने सामग्री (pipetting devices) को प्रयोग गर्नुहोस् ।
- रक्त नमुनाहरू सङ्कलन गर्नु भन्दा अगाडि मात्र सुईलाई खोल्नुहोस् र सावधानीपूर्वक चलाउनुहोस् । प्रयोग पछि तोकिएको फोहोरको भाँडामा फाल्नुहोस् ।
- रगतको नमुनाहरू प्रयोग गर्दा पानीको फोकाहरू (bubbles) र ऐरोसोल (aerosols) उत्पादन हुन नदिनलाई होसियारीपूर्वक काम गर्नुहोस् ।

रसायन पोखिएको अवस्था र सम्भावित संक्रामक रगतको नमुनाहरूसँग भुक्किएर प्रयोगशालाकर्मिहरू सम्पर्कमा आएको खण्डमा निम्न व्यवस्थापन गर्नुपर्छ :

- प्राथमिक उपचारका विधिहरू/व्यवस्थापनको लागि स्पष्ट निर्देशनहरू प्रदान गर्नुपर्छ ।
- तल दिइएको कुनै पनि घाउ र दुर्घटनाहरू भएमा तुरुन्त प्रयोगशालाको तोकिएको संक्रमण नियन्त्रण अधिकृत वा प्रयोगशाला प्रबन्धक, प्राथमिक उपचारको जिम्मा लिएको व्यक्ति वा प्रमुखलाई रिपोर्ट गर्नुहोस् ।
  - सम्भावित संक्रामक नमुनाहरू (जस्तै रगत, सेरम (serum), प्लाज्मा) सँग सम्बन्धित दुर्घटनाहरू;
  - आँखा वा टुक्रिएको छालामा कुनै रगतको छिटा परेको, फुटेको सिसाबाट घाउ भएको वा सुई वा सिरिन्जले घोचेको खण्डमा/अन्य दुर्घटना भएमा

- रगत पोखिएको खण्डमा त्यसलाई सोस्नको लागि तुरुन्त कागजको तौलियाले छोप्नुपर्दछ र त्यसपछि तौलियामा ५ g/L हाइपोक्लोराइट सलुसन (hypochlorite solution) वा ७०% अल्कोहलले छोपी दिनुपर्छ र केही समय त्यतिकै छोड्नुपर्छ । जब केही कारणले छाला काटिन्छ वा सुईले घोच्छ, त्यति बेला तुरुन्तै त्यो ठाउँलाई साबुन र पानीले धुनुहोस् ।
- यदि आँखामा रगतको छिट्टा परेमा तुरुन्त पानीले पखाल्नुहोस् ।
- तुरुन्त सल्लाह/सुझाव चाहिएमा आधारभूत सुरक्षाका प्रक्रियाहरू हेर्नुहोस् ।
- आवश्यक भएमा चिकित्सकको सल्लाह लिनुहोस् ।

## खण्ड १३: औलो निदानमा गुणस्तर सुनिश्चितता र गुणस्तर नियन्त्रण सुनिश्चितता

यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

- गुणस्तर सुनिश्चितता र गुणस्तर नियन्त्रण सुनिश्चितताको लागि आवश्यक विधि, प्रविधि र नियमहरूको बारेमा जानकारी प्राप्त गर्न ।

गुणस्तर सुनिश्चितता (Quality Assurance (QA)) औलो निदान विधिको लागि महत्वपूर्ण छ । यसको उद्देश्य औलो निदानमा प्रयोग गरिने सामग्रीको गुणस्तरता सुनिश्चितता गर्नु हो । साथै यसले दक्ष जनशक्तिबाट प्राप्त गरिने गुणस्तरिय सेवाको निरन्तरता, विश्वसनीयता, दक्षता र उपयोगिताको लागि व्यवस्थापन गर्दछ ।

संक्षेपमा गुणस्तर सुनिश्चितताले प्रयोगशालाका राम्रा अभ्यासहरू (Good Laboratory Practices (GLP)) र निर्माणका राम्रा प्रक्रियाहरू (Good Manufacturing Processes (GMP)) छनौट र कार्यान्वयन गरेर सामग्री वा सेवाको गुणस्तर सुनिश्चित गर्नका लागि गरिएका सबै गतिविधिहरूलाई जनाउँदछ ।

**गुणस्तर नियन्त्रण (Quality Control):** यसमा परीक्षणबाट प्राप्त नतिजाहरू (माइक्रोस्कोपी र/वा RDTs) सही र प्रमाणित छ भनेर सुनिश्चित गर्नका लागि विभिन्न संयन्त्र (components) र प्रक्रियाहरू तयार गरिएको हुन्छ ।

**गुणस्तर सुनिश्चितता (Quality Assurance):** यसमा गुणस्तर नियन्त्रण सहित सबै प्रक्रियाहरू र नतिजाहरू विश्वसनीय भएको सुनिश्चितता गरिएको हुन्छ ।

**गुणस्तर व्यवस्थापन (Quality Management):** यसमा गुणस्तर नियन्त्रण र गुणस्तर सुनिश्चिततासही र पारदर्शी ढंगबाट हुने गरीप्रयोगशालाको व्यवस्थापन गरिएको हुन्छ ।

गुणस्तर सुनिश्चितताको मुख्य उद्देश्य विश्व स्वास्थ्य संगठनबाट मान्यता प्राप्त RDT बाट सही प्रक्रिया अपनाई औलोको निदान गर्नु वा दक्ष जनशक्तिबाट गुणस्तरीय सामग्रीहरूको प्रयोग गरी माइक्रोस्कोपी परीक्षण गर्नु हो । साथै यसमा गुणस्तरीय प्रयोगशाला सामग्रीको आपूर्ति, नियमित सुपरिवेक्षण तथा अनुगमन, दक्षता मूल्याङ्कन, औलो माइक्रोस्कोपी तालिम तथा अन्य उपयुक्त तालिमहरूको सुनिश्चितता गरिएको हुन्छ ।

गुणस्तर सुनिश्चितता प्रणालीको संरचना र काम निम्न लिखित क्रममा (STRUCTURE AND FUNCTION OF QUALITY ASSURANCE SYSTEM IN FOLLOWING ORDER)

१. केन्द्रीय/राष्ट्रिय जनस्वास्थ्य प्रयोगशाला केन्द्र- विशेषज्ञहरूको मूल (core) समूह (विश्व स्वास्थ्य संगठनबाट मूल्याङ्कन गरिएका लेभल १ का माइक्रोस्कोपिष्टहरूको समूह यस केन्द्रमा हुनुपर्दछ)

२. प्रादेशिक जनस्वास्थ्य प्रयोगशाला केन्द्र- तोकिएको माइक्रोस्कोपिक केन्द्रहरू (विश्व स्वास्थ्य संगठनबाट मूल्याङ्कन गरिएका लेभल १ र २ का माइक्रोस्कोपिष्टहरूको समूह यस केन्द्रमा हुनुपर्दछ)

३. जिल्ला अस्पतालहरू/प्राथमिक स्वास्थ्य केन्द्र/तोकिएको स्वास्थ्य संस्थाहरू- सरकारी र गैरसरकारी क्षेत्रहरू

सामान्य नियमहरू : गुणस्तर नियन्त्रण प्रोटोकल

१. अधिल्लो महिनामा प्रयोगशालाद्वारा जाँच गरिएका सबै स्लाइडहरू राख्नुहोस् ।
२. स्लाइडहरूलाई दैनिक भण्डार गर्नुहोस् र पोजिटिभ स्लाइडहरूलाई नेगेटिभ स्लाइडहरूबाट अलग राख्नुहोस् ।
३. यदि तपाईंले स्लाइडहरूको नमुना पठाउनुपर्छ भने जहिले पनि नमुना निष्पक्ष हुने गरी छनौट गर्नुहोस्; स्लाइडहरू आफू खुशी छनौट नगर्नुहोस् ।
४. अधिल्लो महिनाको स्लाइडहरूलाई क्रस जाँचको लागि सकेसम्म चाँडो पठाउनुहोस् ।
५. गुणस्तर नियन्त्रण फारम रेकर्ड गर्दा राम्ररी ध्यान दिनुहोस् । मिति, कोड, नतिजा र ल्याब प्राविधिकको नाम प्रष्टसँग समावेश गर्नुहोस् ।
६. नतिजाले फेला परेको प्रजातिहरू, परजीवीका विभिन्न चरणहरू (T, S र/वा G), र परजीवीको संख्या (parasitaemia) देखाउनुपर्छ ।
७. स्लाइडहरूलाई हुलाकको माध्यमबाट सकेसम्म नपठाउनुहोस् । यदि पठाउनै परे, राम्रो सुरक्षित प्याकिङ्ग गर्नुहोस् ।

विश्लेषण

निम्न सूचकहरूको मूल्याङ्कन हुनुपर्छ :

- ✓ स्मीयरको गुणस्तर : बाक्लो स्मीयर, पातलो स्मीयर र स्टेन ।
- ✓ सेन्सिटिभिटी (Sensitivity), स्पेसिफिसिटी (Specificity), प्रेडिक्टिभ पोजिटिभ भ्यालु (Predictive positive value (PPV)), प्रेडिक्टिभ नेगेटिभ भ्यालु (Predictive negative value (PNV))
- ✓ दुई माइक्रोस्कोपिष्ट बीचको नतिजाहरू समान अथवा फरक छ, छैन भनेर मूल्याङ्कन गर्ने
- ✓ विभिन्न परजीवीका चरणहरू (T, S र G) को सही पहिचानको मूल्याङ्कन गर्ने (detection accuracy) । यो विशेष गरी प्लाज्मोडियम फाल्सिपारमको लागि महत्वपूर्ण छ ।
- ✓ परजीवीको संख्या ठीक छ, छैन भनेर मूल्याङ्कन गर्ने (parasitaemia accuracy)

ECAMM (External competency assessment of malaria microscopists) (औलो माइक्रोस्कोपिष्टको बाह्य दक्षता मूल्याङ्कन) वर्षको एक चोटि वा २ वर्षको अवधिमा गर्नुपर्छ । राष्ट्रिय दक्षता मूल्याङ्कन राष्ट्रिय जनस्वास्थ्य प्रयोगशाला केन्द्रको माध्यमबाट एक वर्षमा एक पटक सञ्चालन गरिनेछ । तोकिएको माइक्रोस्कोपिक केन्द्रहरूमा समयसमयमा राष्ट्रिय जनस्वास्थ्य प्रयोगशालाबाट दक्षता मूल्याङ्कन गरिनेछ । NCA लाई पनि प्राथमिकतामा राखिनेछ ।

औलो माइक्रोस्कोपीको तालिम योग्यता मूल्याङ्कन (Malaria Microscopy Training Competency Assessment):

औलो निदानको लागि राम्ररी तयार गरेको र राम्ररी स्टेन गरेको रगतको स्मीयरको सही जाँच विश्वसनीय विधिको रूपमा रहिआएको छ । माइक्रोस्कोपिष्टको नतिजामा चिकित्सकहरूको विश्वास बढाउनको लागि माइक्रोस्कोपिष्टको सही रूपमा औलो परजीवीको पहिचान र औलो परजीवीहरूको गणना गर्ने क्षमता बारे जान्नु अत्यावश्यक छ । औलो माइक्रोस्कोपिष्टहरू राम्रोसँग प्रशिक्षित हुनुपर्छ र उनीहरूलाई सीप विकास गर्न र त्यसलाई कायम राख्न पर्याप्त अवसर दिइएको हुनुपर्छ । सबै माइक्रोस्कोपिष्टको योग्यताको नियमित रूपमा (कम्तिमा प्रत्येक दुई वा तीन वर्षमा) मूल्याङ्कन गर्नुपर्छ र आधिकारिक रूपमा तिनीहरूको दक्षता स्तर (उदाहरणको लागि

विश्व स्वास्थ्य संगठनबाट) प्रमाणित हुनुपर्छ । यो योग्यता तह औलो परजीवी पत्ता लगाउने, औलो परजीवीको प्रजाति पहिचान र औलो परजीवीको गणनामा आधारित हुनुपर्दछ र यसले पीसीआर (PCR) बाट पुष्टि र मान्यता प्राप्त भएको औलो रगतका स्मीयरको स्लाइड बैंकको उपयोग गर्नुपर्छ ।

विश्व स्वास्थ्य संगठनले चयन गरेका WPRO, SEARO, AFRO र EMRO देशहरूमा पछिल्लो पन्ध्र वर्षमा औलो माइक्रोस्कोपिष्टको बाह्य दक्षता मूल्याङ्कन (ECAMM) को मोडल सफलतापूर्वक विकास गरी प्रयोग गरिएको छ ।

योग्यता मूल्याङ्कन निम्न कुराहरूमा निर्भर हुन्छ :

- औलो परजीवी पत्ता लगाउने र प्रजातिको पहिचान
- परजीवीको गणना (quantification)

दक्षताको लेभल	परजीवी पत्ता लगाउने	प्रजातिको पहिचान (accuracy)	परजीवीको गणना (within 25% of true count)
लेभल १	≥ ९०%	≥ ९०%	≥ ५०%
लेभल २	≥ ८०%	≥ ८०%	≥ ४०%
लेभल ३	≥ ७०%	≥ ७०%	≥ ३०%
लेभल ४	< ७०%	< ७०%	< ३०%



यस खण्ड पूरा भएपछि निम्न कुरामा सक्षम हुन सकिनेछ :

- आउटरिच (Outreach) र स्थलगत सुपरिवेक्षण र मूल्यांकनबारे थाहा पाउन ।

केन्द्र र प्रदेश स्तरबाट प्रभावकारी र नियमित रूपमा सुपरिवेक्षण र अनुगमन गर्नुपर्दछ । सुपरिवेक्षण र अनुगमनको तालिका कहाँ कहिले भन्ने कुराको चयन स्वास्थ्य केन्द्रहरूको गुणस्तर नियन्त्रणको अवस्था र माइक्रोस्कोपिक केन्द्रको क्रस जाँचको नतिजामा भर पर्नेछ । तोकिएको माइक्रोस्कोपिक केन्द्रहरूबाट सुपरिवेक्षण र अनुगमन आवश्यकताको आधारमा नियमित रूपमा गरिनु पर्छ । अनसाइट दक्षता र प्रदर्शनको परीक्षण नियमित रूपमा गर्नुपर्छ । माइक्रोस्कोपीको साइटमा फरक नतिजाहरू भेटिएमा अथवा डिस्क्रिपेन्सी (discrepancy) देखिएमा स्थलगत कोचिङ्ग तुरुन्त गर्नुपर्छ ।

आउटरिच (Outreach) प्रशिक्षण र सुपरिवेक्षण (OTSS):

OTSS भन्नाले क्लिनिकल र प्रयोगशाला सुपरिवेक्षकहरूको टोलीद्वारा गरिने सहयोगी सुपरिवेक्षणको विकेन्द्रित विधि हो जसले माइक्रोस्कोपिष्टहरूको योग्यताको मूल्याङ्कन गर्दछ । तिनीहरू राष्ट्रिय, प्रादेशिक, स्थानीय वा समुदाय स्तरमा पनि काम गर्न सक्छन् । सुपरिवेक्षण भ्रमणहरू र स्थलगत मूल्याङ्कनहरूमा प्रयोगशालाको संगठन, उपकरण, सामग्रीको पर्याप्तता र भण्डारण, रिएजेन्ट (reagent) को गुणस्तर, SOPs को उपलब्धता र प्रयोग, रिपोर्टिङ्ग, सुरक्षा र संक्रमण नियन्त्रणका उपायहरूको विस्तृत मूल्याङ्कन पर्दछ । सुपरिवेक्षण चेकलिस्ट सहितको स्थलगत मूल्याङ्कनले साइटमा औलो माइक्रोस्कोपी निदान सेवाहरूको यथार्थतालाई देखाउँछ । स्लाइडको क्रस जाँचद्वारा पहिचान गरिएको खराब प्रदर्शनलाई सुधार गर्छ, र तत्काल समस्या समाधानको लागि रणनीति र सुधारको लागि अपनाउनुपर्ने कार्यहरू प्रदान गर्छ ।

OTSS ले दिशा निर्देशन प्रदान गर्दछ, जसद्वारा अनुभवी, सक्षम सुपरिवेक्षकले कर्मचारीहरूलाई उनीहरूको माइक्रोस्कोपी सीप सुधार गर्नको लागि निर्देशन दिन्छ । यसका उद्देश्यहरू निम्न छन् :

- सुपरिवेक्षक र कर्मचारी बीच सिक्नको लागि अनुकूल विश्वासिलो, सम्मानजनक सम्बन्ध स्थापना गर्ने,
- निदान र उपचारको प्रभावकारिता बीच तालमेल प्रवर्द्धन गर्ने,
- निरन्तर सुधारको लागि परीक्षण र माइक्रोस्कोपीको स्थितिको वस्तुगत प्रमाण सङ्कलन गर्ने र
- आपसी सहयोग, वकालत, अनुगमन र मूल्याङ्कन प्रवर्द्धन गर्नको लागि संस्थामा प्रयोगशाला र क्लिनिकल कर्मचारीलाई नियमित (त्रैमासिक) सहयोग प्रदान गर्ने ।

स्थलगत मूल्याङ्कन:

स्थलगत मूल्याङ्कनमा समय बढी लिने र खर्चिलो हुन्छ तापनि सबै गुणस्तर सुनिश्चितता कार्यक्रमहरू सञ्चालन गर्नको लागि यो आवश्यक छ किनकी यसले सुपरिवेक्षकलाई निम्न कुरा गर्नको लागि सक्षम बनाउँदछ ।

- नियमित रूपमा लिएको स्लाइडहरूलाई क्रस जाँच गर्ने;
- साइटमा प्रक्रियाहरूमा भएको त्रुटिहरूलाई सच्याउन;

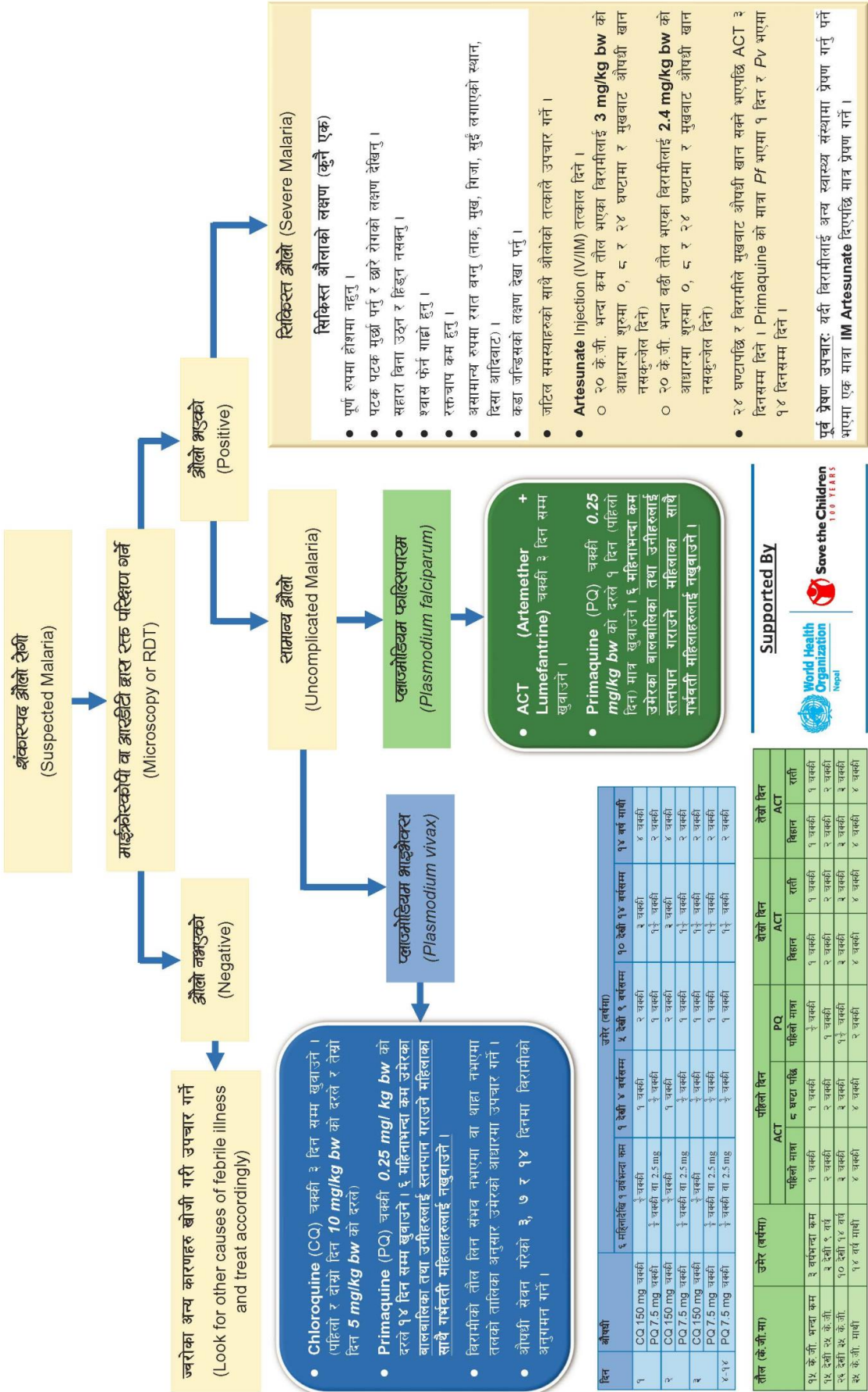
- स्लाइडहरूको क्रस जाँचको माध्यमबाट प्रयोगशालाकर्मिहरूको मूल्याङ्कन र काम गर्ने वातावरण सुनिश्चित गर्न वा मूल्याङ्कन गर्न;
- उपकरण र सामग्री राम्रोसँग कायम राख्नका लागि आन्तरिक गुणस्तर नियन्त्रण र आपूर्तिको प्रक्रियाहरू मूल्याङ्कन गर्न;
- अद्यावधिक गरिएको (updated) SOPs, बेन्च ऐडहरू (bench aids) र अन्य प्रयोगशालाका सामग्रीको उपलब्धता सुनिश्चित गर्न;
- सामग्री वा रिएजेन्टस (reagents) को स्टक आउट (stock-out) पहिचान गर्न;
- माइक्रोस्कोपिष्टहरू र प्रयोगशाला प्रबन्धकहरूले सामना गरेका समस्याहरूको बारेमा छलफल गर्न र समाधानको सुझाव दिन;
- प्रशिक्षण र पुनः प्रशिक्षण (training and retraining) को निर्णय गर्न;
- प्रयोगशालाकर्मिहरू बीच नियमित समन्वय र सञ्चार निर्माण गर्न;

अनुसूचीहरु



## Malaria Diagnosis and Treatment Chart

### औलो निदान तथा उपचार तालिका



दिन	औषधी	उमेर (वर्षमा)			
		१ देखि ४ वर्षसम्म	५ देखि ९ वर्षसम्म	१० देखि १४ वर्षसम्म	१४ वर्ष माथी
१	CQ 150 mg चक्की	१ चक्की	२ चक्की	३ चक्की	४ चक्की
	PQ 7.5 mg चक्की	१/३ चक्की वा 2.5 mg	१ चक्की	१ १/३ चक्की	२ चक्की
२	CQ 150 mg चक्की	१ चक्की	२ चक्की	३ चक्की	४ चक्की
	PQ 7.5 mg चक्की	१/३ चक्की वा 2.5 mg	१ चक्की	१ १/३ चक्की	२ चक्की
३	CQ 150 mg चक्की	१ चक्की	२ चक्की	३ चक्की	४ चक्की
	PQ 7.5 mg चक्की	१/३ चक्की वा 2.5 mg	१ चक्की	१ १/३ चक्की	२ चक्की
४-१४	PQ 7.5 mg चक्की	१ चक्की वा 2.5 mg	१ चक्की	१ १/३ चक्की	२ चक्की

तौल (के.जी.मा)	उमेर (वर्षमा)	पहिलो दिन		दोस्रो दिन		तेस्रो दिन	
		पहिलो मात्रा	८ घण्टा पछि	पहिलो मात्रा	पिक्का	पहिलो मात्रा	पिक्का
१५ के.जी. भन्दा कम	३ वर्षभन्दा कम	१ चक्की	१ चक्की	१ चक्की	१ चक्की	१ चक्की	१ चक्की
१५ देखि २४ के.जी.	३ देखि ९ वर्ष	२ चक्की	२ चक्की	२ चक्की	२ चक्की	२ चक्की	२ चक्की
२५ देखि ४९ के.जी.	१० देखि १४ वर्ष	३ चक्की	३ चक्की	३ चक्की	३ चक्की	३ चक्की	३ चक्की
५० के.जी. माथी	१४ वर्ष माथी	४ चक्की	४ चक्की	४ चक्की	४ चक्की	४ चक्की	४ चक्की

**Supported By**

# औलो (मलेरिया) को बिरामी भेटिएमा MDIS मा तुरुन्त जानकारी गराओ ।



राष्ट्रिय औलो निवारण कार्यक्रमलाई सफल बनाउन सबै औलो बिरामीहरूको जानकारी औलो रोग सूचना प्रणाली (MDIS) मा गराउन हुन अनुरोध गर्दछौं ।

MDIS मा जानकारी गराउनको लागि SMS वा App को निःशुल्क प्रयोग गर्न सकिन्छ ।

SMS गर्दा शुरुमा **mal** टाईप गरी निम्न विवरणहरू **३६०४०** मा पठाउनुहोस् ।

**mal <space> District Name <space> Municipality <space> Ward No.  
<space> Patient Name <space> Patient Contact Number**

App मार्फत जानकारी गराउन आफ्नो मोबाईलको Play Store वा App Store मा गई MDIS Nepal डाउनलोड गर्नुहोस् ।

तलको QR Code Scan गरेर पनि उक्त App डाउनलोड गर्न सकिन्छ ।

android को लागि



नेपाल सरकार  
स्वास्थ्य तथा जनसंख्या मन्त्रालय, स्वास्थ्य सेवा विभाग  
इपिडिमियोलोजी तथा रोग नियन्त्रण महाशाखा  
टेकु, काठमाडौं ।

ios को लागि





Government of Nepal  
Ministry of Health & Population  
Department of Health Services  
**Epidemiology and Disease Control Division**

**Malaria Case Investigation Form (औलो खोजपडताल फारम)**

Malaria Case ID:

Year (B.S.)	Province Number	District Code	Case Number
2 0 7 5	0 1	0 1	0 0 1

Example (उदाहरण)

**Section 1: Case history (बिरामीको विवरण)**

मिति उल्लेख गर्दा नेपाली पात्रो (विक्रम संवत्) अनुसार भर्नुहोस् ।

- 101 Date of onset of first symptoms of current clinical episode (यस पटक पहिलो लक्षण देखिएको मिति):
- 102 Case detection/diagnosed date (रोग पत्ता लागेको मिति):
- 103 SMS notification date (SMS वा जानकारी प्राप्त गरेको मिति):
- 104 SMS approval date (SMS वा जानकारी निक्क्यौल गरेको मिति):
- 105 Date of case investigation (खोजपडताल/सोधपुछ गरेको मिति):

106 Patient name (बिरामीको पुरा नाम):

107 Age (उमेर): वर्ष महिना - पुरा गरेको वर्ष राख्ने ।  
- एक वर्ष भन्दा कमको बालबालिकाको हकमा मात्र महिनामा राख्नुहोस् ।

108 Sex (लिंग):  Male (पुरुष)  Female (महिला)  Third Gender (तेस्रो लिंगी)  
If female; Pregnant (यदि महिला भएमा गर्भवती हो वा होइन एकिकन गर्नुहोस्)  Yes (हो)  No (होइन)

109 Weight (तौल): Kg (के.जी.) 110 Occupation of Patient (बिरामीको पेशा): तल चिन्ह लगाउनुहोस् ।

- Farmer (खेतीपाती गर्ने)  Labor (ज्याला मजदुरी गर्ने)  Migrant/Seasonal Worker (बैदेशिक/मौसमी कामदार)  Office Worker (अफिसमा काम गर्ने)  House Wife (घरमै बस्ने)
- School Children (स्कूल जाने बालबालिका)  Small Children at home (घरमै बस्ने साना बालबालिका)  Security Personal (सुरक्षाकर्मी/प्रहरी/सैनिक)  Other (अन्य भए खुलाउनुहोस्):

111 Place of work (काम गर्ने स्थान वा ठाउँ):

112 Present home address of patient (हाल बसोबास गरेको स्थान): District (जिल्ला):

Rural/Urban municipality (गा.पा./न.पा.): Ward No (वडा नं.):

Village/Tole (गाउँ/टोलको नाम): Contact No. (बिरामीको सर्म्पर्क नं.):

113 Home GPS coordinate (GPS नक्शाङ्कन): Latitude (N) Longitude (E) Altitude  
(26.4831 - 29.84121) (80.33333 - 88.09436)  
(Range for Lat: 26.4831 - 29.84121; Long: 80.33333 - 88.09436) (meter)

114 Permanent address if different from above (स्थायी ठेगाना, यदि हाल बसोबास गरेको स्थान भन्दा फरक भएमा):  
District (जिल्ला): Rural/Urban municipality (गा.पा./न.पा.):  
Ward No (वडा नं.): Village/Tole (गाउँ/टोलको नाम):

115 Information provided by (विवरण दिने व्यक्ति)  Patient (बिरामी आफै)  Family member (परिवारका सदस्य)  Relative (नातेदार)  Neighbors (छिमेकी)  Other (अन्य)

116 Informant (विवरण दिने व्यक्तिको नाम):



**Section 2: Case detection & treatment (रोगको पहिचान र उपचार)**

- 201 Select symptoms (लक्षणहरू एक भन्दा बढि पनि हुन सक्दछ। सोही अनुसार नम्बरमा चिन्ह लगाउनुहोस् ।
- |                                 |   |   |                                    |                            |
|---------------------------------|---|---|------------------------------------|----------------------------|
| 1. Fever (ज्वरो आउनु)           | 2. Severe chills & Rigors (काप छुट्नु, जाडो हुनु) | 3. Body aches (जिउ दुख्नु)              | 4. Sweating (पसिना छुट्नु)         | 5. Headache (टाउको दुख्नु) |
| 6. Nausea (वाकवाकी लाग्नु)      | 7. Vomiting (बान्ता हुनु)                         | 8. Dizziness (चक्कर लाग्नु)             | 9. Blood stool (दिसामा रगत देखिनु) | 10. Fatigue (थकित हुनु)    |
| 11. Abdominal Pain (पेट दुख्नु) | 12. Enlarged Spleen (फियो सुनिनु)                 | 13. Others (अन्य भए खुलाउनुहोस्): _____ |                                    |                            |
- 202 Case Type (विरामीको अवस्था):  Complicated (जटिल)  Uncomplicated (सामान्य)
- 203 Method used for case detection (विरामीको पहिचानका लागि प्रयोग भएको प्रकृया): चिन्ह लगाउनुहोस्  
 Active Case Detection (ACD)  Passive Case Detection (PCD)
- If Active Case Detection (ACD):** 1. House to house Visit 2. Mobile malaria clinic 3. Contact survey  
4. Fever survey 5. Population based survey
- 204 Tool used for diagnosis (निदानको लागि प्रयोग भएको विधि मध्ये कुनै एकमा चिन्ह लगाउनुहोस्)  
 RDT (द्रुत निदानद्वारा गरिएको)  Microscopy (माईक्रोस्कोपीबाट गरिएको)  Both (दुवै विधिबाट गरिएको)
- 
- 205 Rapid Diagnostic Test (RDT) performed at (द्रुत निदान गर्ने स्वास्थ्य संस्था वा ल्याब):
- 206 Rapid Diagnostic Test (RDT) performed by (द्रुत निदानद्वारा जाँच गर्ने व्यक्तिको नाम)
- 207 Date of RDT examination ( द्रुत निदानद्वारा जाँच गरिएको मिति):  /  /   
Year (साल) Month (महिना) Day (गते)
- 208 Manufacturer and brand name of RDT (आर.डि.टी. बनाउने कम्पनी र ब्राण्डको नाम):
- 209 Batch number (ब्याच नम्बर):
- 210 Result (परिणाम):  Positive (पोजिटिभ)  Negative (नेगेटिभ)
- 211 If positive, Plasmodium Species (पोजिटिभ भएमा प्लास्मोडियम स्पेसिस): कुनै एकमा चिन्ह लगाउनुहोस् ।  
 *P. vivax*  *P. falciparum*  *P. ovale*  
 *P. malariae*  *P. knowlesi*  Mixed Infection: \_\_\_\_\_
- 
- 212 Blood sample collected by (रगत नमुना लिने व्यक्तिको नाम):
- 213 Date of sample collection (परिक्षणको लागि रगत लिएको मिति):  /  /   
Year (साल) Month (महिना) Day (गते)
- 214 Microscopic examination performed at (माईक्रोस्कोपी गर्ने स्वास्थ्य संस्था वा ल्याब):
- 215 Microscopic examination performed by (माईक्रोस्कोपीबाट जाँच गर्ने व्यक्तिको नाम)
- 216 Date of examination (माईक्रोस्कोपीबाट परिक्षण गरिएको मिति):  /  /   
Year (साल) Month (महिना) Day (गते)
- 217 Result (परिणाम):  Positive (पोजिटिभ)  Negative (नेगेटिभ)
- 218 If positive, Plasmodium Species (परजीवी देखिएमा प्लास्मोडियम स्पेसिस): कुनै एकमा चिन्ह लगाउनुहोस् ।  
 *P. vivax*  *P. falciparum*  *P. ovale*  
 *P. malariae*  *P. knowlesi*  Mixed Infection: \_\_\_\_\_
- 219 Parasite Density (परजीवीको घनत्व): \_\_\_\_\_/μl
- 220 Gametocytes present (गेमेटोसाइट्स):  Yes (छ)  No (छैन)

221 **Specimen taken for Molecular Testing & Polymerase Chain Reaction (PCR)** (पिसिआर जाँचको लागि नमूना संकलन भए नभएको):  Yes (भएको)  No (नभएको)

222 If yes, (PCR) performed at (यदी भएको भए, पिसिआर जाँच गर्ने संस्था वा ल्याब):

223 PCR performed by (पिसिआर जाँच गर्ने व्यक्तिको नाम):

224 Date of PCR testing (पिसिआर जाँच गरिएको मिति):  Year (साल)  Month (महिना)  Day (गते)

225 Result (परिणाम): Plasmodium DNA (प्लास्मोडियम डिएनए)  Detected (छ)  Not Detected (छैन)

226 **G6PD test performed (G6PD को जाँच भए नभएको):**  Yes (भएको)  No (नभएको)

227 If yes, performed at (यदी G6PD जाँच भएको भए जाँच गर्ने संस्था वा ल्याब):

228 G6PD performed by (G6PD जाँच गर्ने व्यक्तिको नाम):

229 Date of testing (G6PD जाँच गरिएको मिति):  Year (साल)  Month (महिना)  Day (गते)

230 Result (परिणाम):  Deficient (G6PD कमी भएको)  Normal (सामान्य अवस्था)

**Antimalarial treatment provided (औलोको उपचार):**

231 Treatment started date (उपचार शुरू गरिएको मिति):  Year (साल)  Month (महिना)  Day (गते)

232 Medicine used/prescribed (उपचारमा प्रयोग गरिएको औषधी): मात्रा भर्नुहोस् र Tab वा mg मा गोला लगाउनुहोस् ।

Medicine	Total Dose (Tab/mg)	Total Days
Tab Chloroquine	Tab mg	
Tab ACT	Tab mg	
Inj. Quinine	mg	
Inj. Artesunate	mg	

Medicine	Total Dose (Tab/mg)	Total Days
Tab Primaquine	Tab mg	
Tab Quinine	Tab mg	
Inj. Artemether	mg	
Other :		

**Section 3: WHERE, HOW and from WHOM did the transmission possibly take place**

(कहाँ, कसरी र को बाट संक्रमित (सम्भावित) भएको)

301 Length of residence at current/present home address (हालको ठेगानामा बसोवास गरेको अवधि):  Years (वर्ष)  Months (महिना)

302 If residence in current/present address is less than one year kindly provide earlier address including date (यदी हालको ठेगानामा १ वर्ष भन्दा कम बसोवास गरेको छ भने १ वर्ष पहिले बसोवास गरेको ठेगाना र मिति):  
 Date (बसोवास गरेको मिति): \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

303 Recent travel history within the country with dates (i.e. to other malaria-endemic areas) (हालसालै देशभित्र भ्रमण गरेको स्थान र मिति: औलो प्रभावित क्षेत्र भएमा उल्लेख गर्ने):  
 Date travel (भ्रमण मिति): \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ देखि \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ सम्म

304 Recent Travel History outside the Country with dates (i.e. to other malaria-endemic areas) (हालसालै गरिएको बैदेशिक भ्रमण गरेको स्थान र मिति: औलो प्रभावित क्षेत्र भएमा उल्लेख गर्ने):  
 Date travel (भ्रमण मिति): \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ देखि \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ सम्म

305 Type of preventive measures taken during the above-mentioned travel to endemic areas/countries: (औलो प्रभावित क्षेत्रमा भ्रमण गर्दा अपनाइएको रोकथामका उपायहरु के थियो):  
 Not taken (नगरेको)  Normal Net (सामान्य भूल)  LLIN (कीटनाशक भूल)  Chemoprophylaxis taken (औषधी खाएको)  Other (अन्य): \_\_\_\_\_

If chemoprophylaxis taken: Drug Name (औषधीको नाम):   
Dose (मात्रा):  Duration (अवधि): \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ देखि \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ सम्म

306 Recent (within 4 weeks) contact with malaria cases (provide details):

(४ हप्ताभित्रको अवधिमा कुनै औलो बिरामीसँग सम्पर्क भएको भए उल्लेख गर्ने):

--

307 Blood transfusion within past three months (पछिल्लो ३ महिना भित्र रक्तसंचार गरेको छ/छैन):  Yes (छ)  No (छैन)

308 History of confirmed malaria case in Ward/Tole within this transmission season (बसोवास गर्दै आएको वडा/टोलमा यस वर्ष औलो देखा परेको अवस्था)  Yes (छ)  No (छैन)

If Yes (यदी छ भने)  Imported (आयातित)  Indigenous (स्थानिय)

309 Did patient have previous history of malaria (के बिरामीलाई पहिले पनि औलो लागेको थियो): **No (थिएन) भएमा Section 4 मा जानुहोस्।**  Yes (थियो)  No (थिएन)

310 Date (कहिले भएको थियो): Year (साल) / Month (महिना) / Day (गते) 

--	--	--

311 Location (कुन ठाउँमा भएको थियो): 

--

312 Diagnosis performed at (Health Facility/Lab) (निदान गर्ने स्थान, स्वास्थ्य संस्था वा ल्याबको नाम, ठेगाना): 

--

313 Plasmodium Species (प्लास्मोडियम स्पेसिस): कुनै एकमा चिन्ह लगाउनुहोस्  
 *P. vivax*  *P. falciparum*  *P. ovale*  Unknown (जानकार नभएको)  
 *P. malariae*  *P. knowlesi*  Mixed Infection: \_\_\_\_\_

314 Has patient being treated following NMTP (के बिरामीले राष्ट्रिय औलो उपचार विधि अनुसार उपचार पाएको थियो)  Yes (थियो)  No (थिएन)  Unknown (थाहा भएन)

#### Section 4: Conclusion (निष्कर्ष)

401 Malaria infection likely acquired at (औलो लागेको संभावित स्थान): Country (देश): 

--

  
State (प्रदेश): 

--

 District (जिल्ला): 

--

  
Rural/Urban Municipality (गा.पा./न.पा): 

--

 Ward No. (वडा नं): 

--

  
Village/Tole/Street (गाउँ/टोल/मार्गको नाम): 

--

402 Types of Species (औलोको प्रकार छान्नुहोस्):  
 *P. vivax*  *P. falciparum*  *P. ovale*  
 *P. malariae*  *P. knowlesi*  Mixed Infection: \_\_\_\_\_

403 Case classification (रोगको वर्गीकरण छान्नुहोस्):  
 Imported (आयातित)  Indigenous (स्थानिय)  
 Relapse /Recrudescence  Other (अन्य) \_\_\_\_\_ (Specify, उल्लेख गर्नुहोस्)

#### Section 5: Follow-up (अनुगमन भेट)

501 Date of follow-up (फलोअप गरेको मिति): 

	1 <sup>st</sup> (Day-3)	2 <sup>nd</sup> (Day-5)	3 <sup>rd</sup> (Day-10)	4 <sup>th</sup> (Day-15)	5 <sup>th</sup> (Day-28)

502 Treatment outcome after follow-up visits in 4 weeks (४ हप्तापछि फलोअप भ्रमण गर्दा उपचारको नतिजा)  
 Cured  Not Cured  Died  LAMA\*  Unknown

503 Action taken (बिरामीको बासस्थान रहेको ठाउँमा के कस्तो कदम चालियो): सोही अनुसार नम्बरमा चिन्ह लगाउनुहोस्  
1. Foci Investigation 2. Responsive Activities 3. Not Applicable

If Responsive Activities: a. RACD b. Responsive Spraying c. Social Mobilization d. Distribution of LLIN

#### Case investigation undertaken by (खोजपडताल गर्ने व्यक्तिको विवरण)

Name (नाम): \_\_\_\_\_ Designation (पद): \_\_\_\_\_

District (जिल्ला): \_\_\_\_\_ Institution (संस्था): \_\_\_\_\_

Signature (हस्ताक्षर): \_\_\_\_\_ Verified by: 

--	--

Name of SMC or Entomologist

Signature

\*(Treatment) Leaving Against Medical Advice

Note: If additional infections are identified in the case or neighboring households, continue to focus investigation protocols.

# Comparison of the *Plasmodium* Species Which Cause Human Malaria

<i>Plasmodium</i> species	Stages found in blood	Appearance of Erythrocyte (RBC)	Appearance of Parasite
<b><i>P. falciparum</i></b>	Ring	normal; multiple infection of RBC more common than in other species	delicate cytoplasm; 1-2 small chromatin dots; occasional appliqué (accollé) forms
	Trophozoite	normal; rarely, Maurer's clefts (under certain staining conditions)	seldom seen in peripheral blood; compact cytoplasm; dark pigment
	Schizont	normal; rarely, Maurer's clefts (under certain staining conditions)	seldom seen in peripheral blood; mature = 8-24 small merozoites; dark pigment, clumped in one mass
	Gametocyte	distorted by parasite	crescent or sausage shape; chromatin in a single mass (macrogametocyte) or diffuse (microgametocyte); dark pigment mass
<b><i>P. vivax</i></b>	Ring	normal to 1-1/4 X, round; occasionally fine Schüffner's dots; multiple infection of RBC not uncommon	large cytoplasm with occasional pseudopods; large chromatin dot
	Trophozoite	enlarged 1-1/2-2 X; may be distorted; fine Schüffner's dots	large ameboid cytoplasm; large chromatin; fine, yellowish-brown pigment
	Schizont	enlarged 1-1/2-2 X; may be distorted; fine Schüffner's dots	large, may almost fill RBC; mature = 12-24 merozoites; yellowish-brown, coalesced pigment
	Gametocyte	enlarged 1-1/2-2 X; may be distorted; fine Schüffner's dots	round to oval; compact; may almost fill RBC; chromatin compact, eccentric (macrogametocyte) or diffuse (microgametocyte); scattered brown pigment
<b><i>P. ovale</i></b>	Ring	normal to 1-1/4 X, round to oval; occasionally Schüffner's dots; occasionally fimbriated; multiple infection of RBC not uncommon	sturdy cytoplasm; large chromatin
	Trophozoite	normal to 1-1/4 X; round to oval; some fimbriated; Schüffner's dots	compact with large chromatin; dark-brown pigment
	Schizont	normal to 1-1/4 X; round to oval; some fimbriated; Schüffner's dots	mature = 6-14 merozoites with large nuclei, clustered around mass of dark-brown pigment
	Gametocyte	normal to 1-1/4 X; round to oval; some fimbriated; Schüffner's dots	round to oval; compact; may almost fill RBC; chromatin compact, eccentric (macrogametocyte) or more diffuse (microgametocyte); scattered brown pigment
<b><i>P. malariae</i></b>	Ring	normal to 3/4 X	sturdy cytoplasm; large chromatin
	Trophozoite	normal to 3/4 X; rarely, Ziemann's stippling (under certain staining conditions)	compact cytoplasm; large chromatin; occasional band forms; coarse, dark-brown pigment
	Schizont	normal to 3/4 X; rarely, Ziemann's stippling (under certain staining conditions)	mature = 6-12 merozoites with large nuclei, clustered around mass of coarse, dark-brown pigment; occasional rosettes
	Gametocyte	normal to 3/4 X; rarely, Ziemann's stippling (under certain staining conditions)	round to oval; compact; may almost fill RBC; chromatin compact, eccentric (macrogametocyte) or more diffuse (microgametocyte); scattered brown pigment

# Keypoints for *Plasmodium* Species Which Cause Human Malaria

## Infected RBCs

Size	Shape	Schüffner's Dots
<p>&lt;N, N: <b>PM</b></p> <p>N: <b>PF</b></p> <p>&gt;N: <b>PO</b></p> <p>&gt; &gt;N: <b>PV</b></p>	<p>Crescent: <b>PF</b> (gametocytes)</p> <p>Ameboid: <b>PV</b></p> <p>Fimbriation: <b>PO</b></p> <p>Elongated: <b>PO</b></p>	<p><b>PV, PO</b></p>

## Parasites Found In Circulating Blood

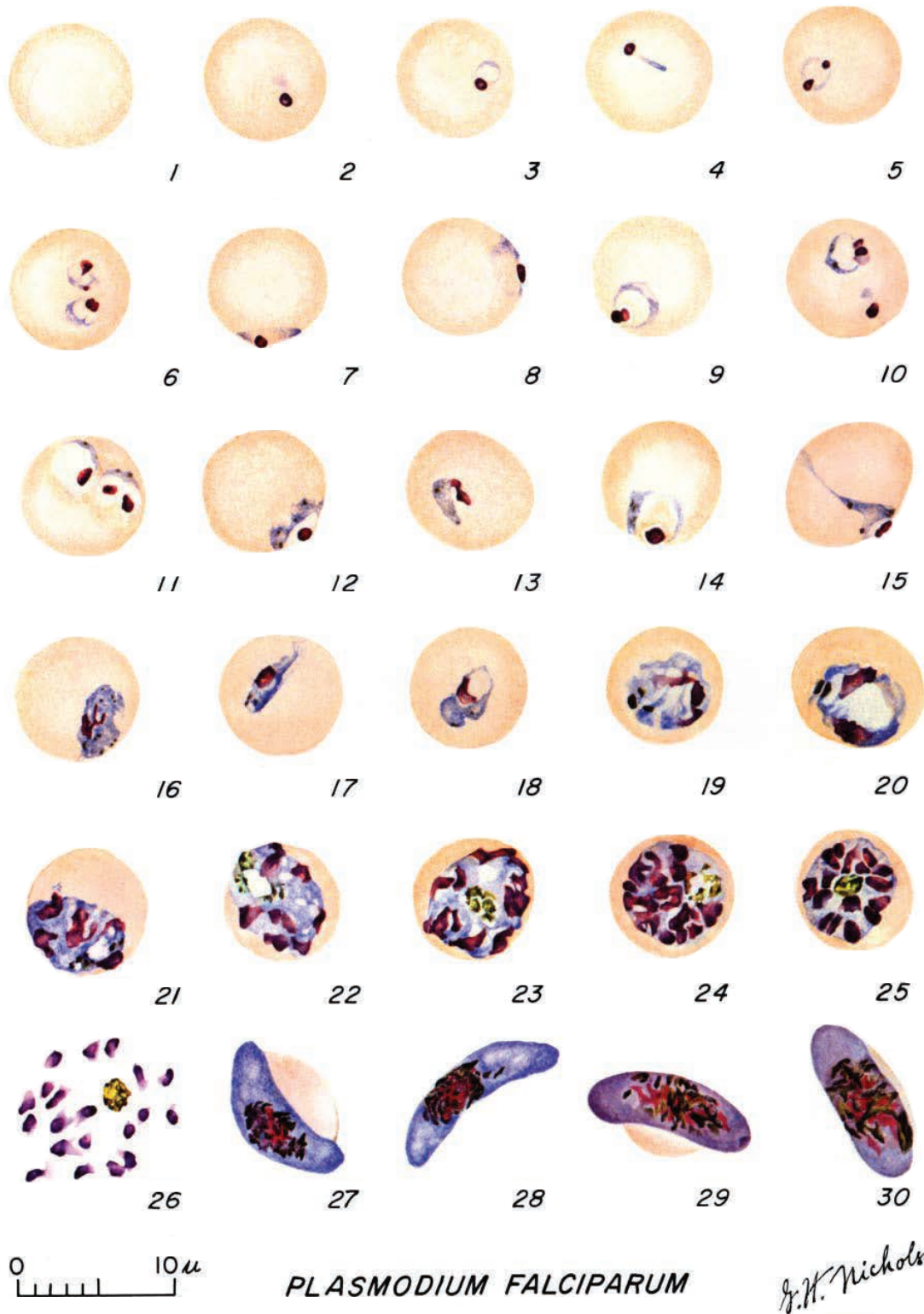
Rings	Trophozoites	Schizonts (mature)	Gametocytes
<p>Rings only (±gametocytes): <b>PF</b></p> <p>Numerous: <b>PF</b></p> <p>Multiply infected RBCs: <b>PF</b></p> <p>Accessory chromatin dots: <b>PF</b></p> <p>Delicate: <b>PF</b></p>	<p>Ameboid: <b>PV</b></p> <p>Compact: <b>PO</b> <b>PM</b> <b>PF</b> (rarely seen)</p> <p>Band form: <b>PM</b></p>	<p>6-12 nuclei: <b>PM</b></p> <p>6-14 nuclei: <b>PO</b></p> <p>12-24: <b>PV</b></p> <p>8-24: <b>PF</b> (rarely seen)</p> <p>Rosettes: <b>PM</b></p>	<p>Crescent: <b>PF</b></p> <p>Round: <b>PV</b> <b>PO</b> <b>PM</b></p>

Certain morphologic key characteristics of the infected erythrocytes and parasites can be used to orient the diagnosis towards one of the four *Plasmodium* species that infect humans, as shown above. These characteristics are by no means absolute, however. The final diagnosis should be based on the combined findings for the various characteristics: what is the most probable species, based on the available findings.

### Legend

**PF:** *P. falciparum*  
**PV:** *P. vivax*  
**PO:** *P. ovale*  
**PM:** *P. malariae*

# *Plasmodium falciparum* Blood Stage Parasites, Thin Blood Smears



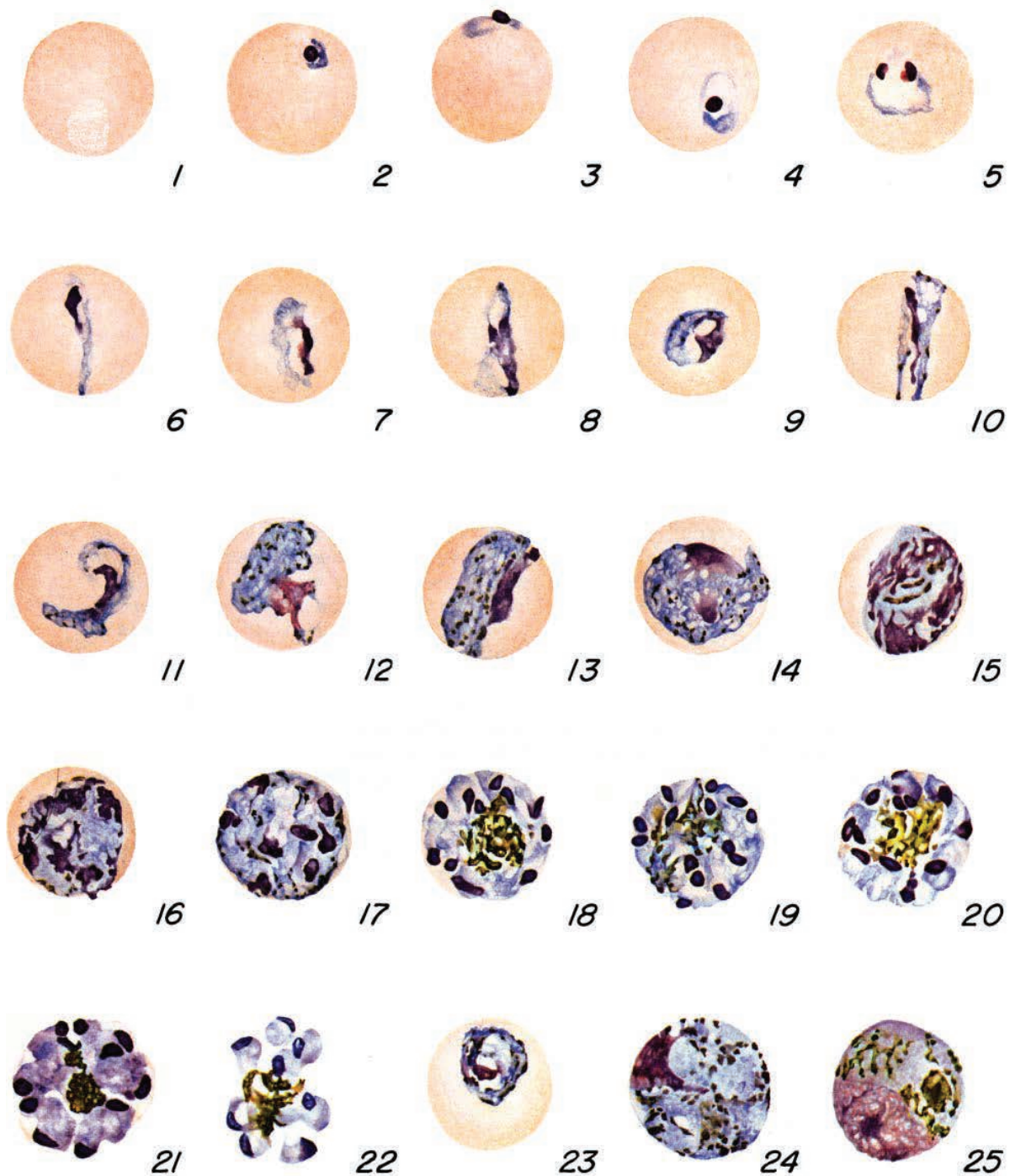
**Fig. 1:** Normal red cell  
**Figs. 2-18:** Trophozoites (among these, **Figs. 2-10** correspond to ring-stage trophozoites)

**Figs. 19-26:** Schizonts (**Fig. 26** is a ruptured schizont)  
**Figs. 27, 28:** Mature macrogametocytes (female)  
**Figs. 29, 30:** Mature microgametocytes (male).

Illustrations from: Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The Primate Malarias. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, 1971.



# *Plasmodium malariae* Blood Stage Parasites, Thin Blood Smears



## *PLASMODIUM MALARIAE*

*H. H. Nicholson*

**Fig. 1:** Normal red cell  
**Figs. 2-5:** Young trophozoites (rings)  
**Figs. 6-13:** Trophozoites  
**Figs. 14-22:** Schizonts

**Fig. 23:** Developing gametocyte  
**Fig. 24:** Macrogametocyte (female)  
**Fig. 25:** Microgametocyte (male)

Illustrations from: Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The Primate Malariae. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, 1971.

# Plasmodium ovale Blood Stage Parasites, Thin Blood Smears

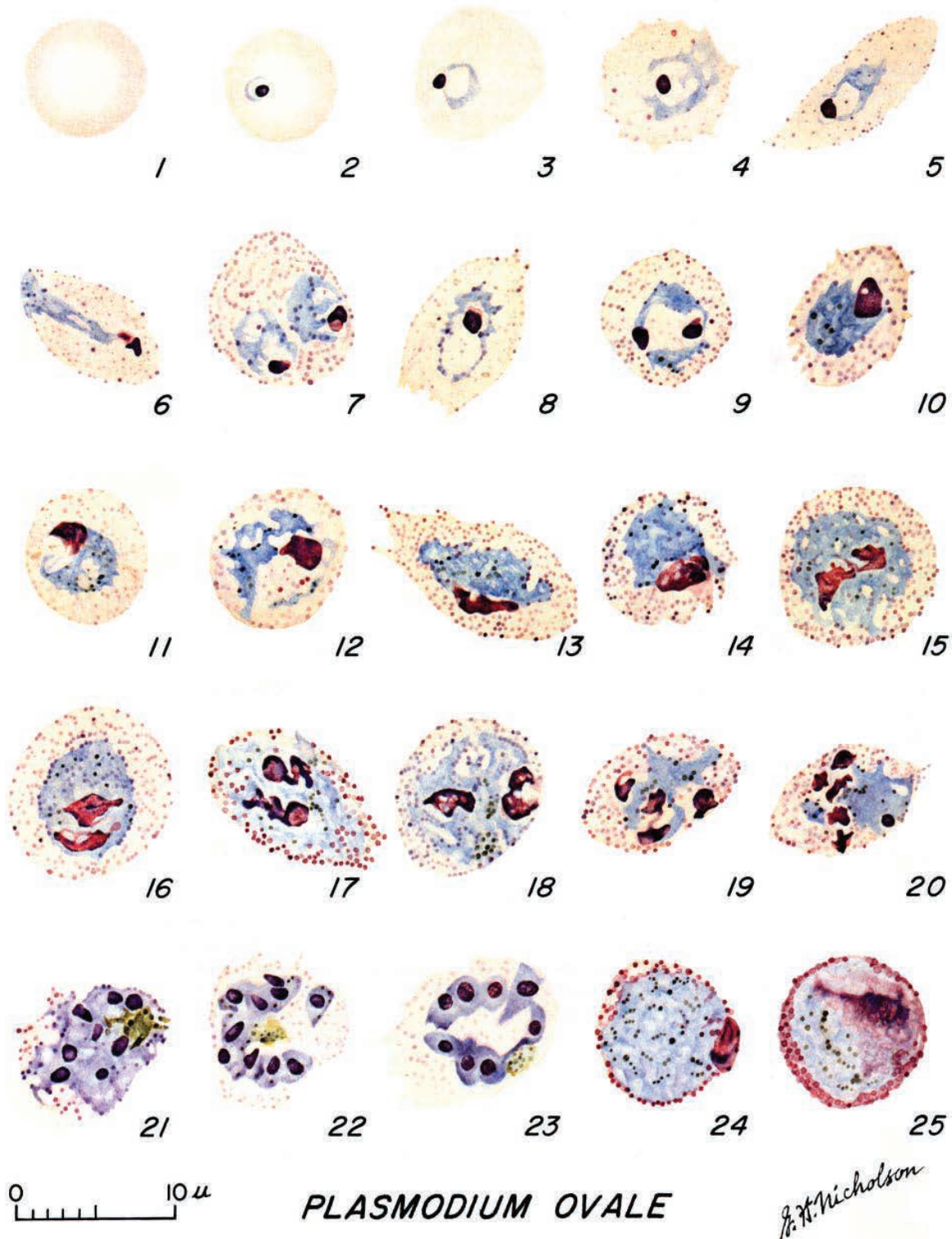


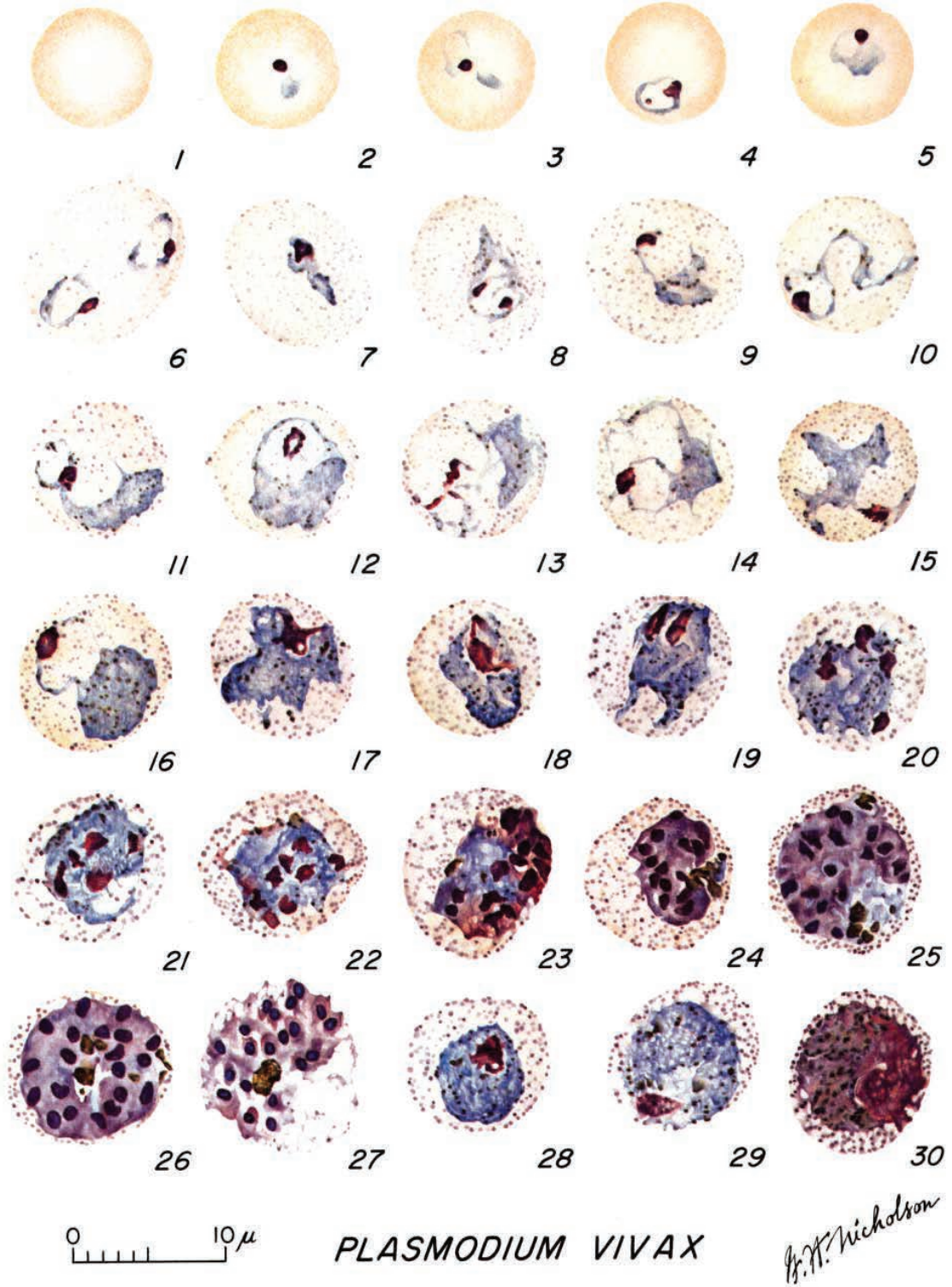
Fig. 1: Normal red cell  
Figs. 2-5: Young trophozoites (Rings)  
Figs. 6-15: Trophozoites

Figs. 16-23: Schizonts  
Fig. 24: Macrogametocytes (female)  
Fig. 25: Microgametocyte (male)

Illustrations from: Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The Primate Malaria. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, 1971.



# *Plasmodium vivax* Blood Stage Parasites, Thin Blood Smears



**Fig. 1:** Normal red cell  
**Figs. 2-6:** Young trophozoites (ring stage parasites)  
**Figs. 7-18:** Trophozoites

**Figs. 19-27:** Schizonts  
**Figs. 28 and 29:** Macrogametocytes (female)  
**Fig. 30:** Microgametocyte (male)

Illustrations from: Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The Primate Malaria. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, 1971.

## ***Plasmodium falciparum*** **Blood Stage Parasites, Thick Blood Smears**

- 1: Small trophozoites.
- 2: Gametocytes — normal.
- 3: Slightly distorted gametocyte.
- 4: "Rounded-up" gametocyte.
- 5: Disintegrated gametocyte.
- 6: Nucleus of leucocyte.
- 7: Blood platelets.
- 8: Cellular remains of young erythrocyte.

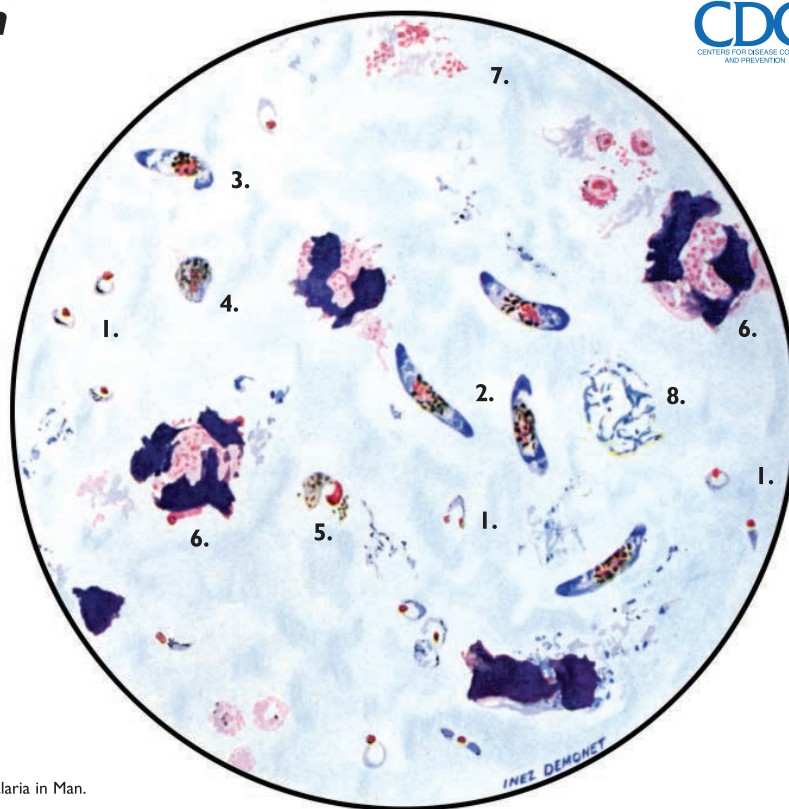


Illustration from: Wilcox A. Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, 1960.

## ***Plasmodium malariae*** **Blood Stage Parasites, Thick Blood Smears**

- 1: Small trophozoites.
- 2: Growing trophozoites.
- 3: Mature trophozoites.
- 4, 5, 6: Immature schizonts with varying numbers of divisions of the chromatin.
- 7: Mature schizonts.
- 8: Nucleus of leucocyte.
- 9: Blood platelets.
- 10: Cellular remains of young erythrocytes.

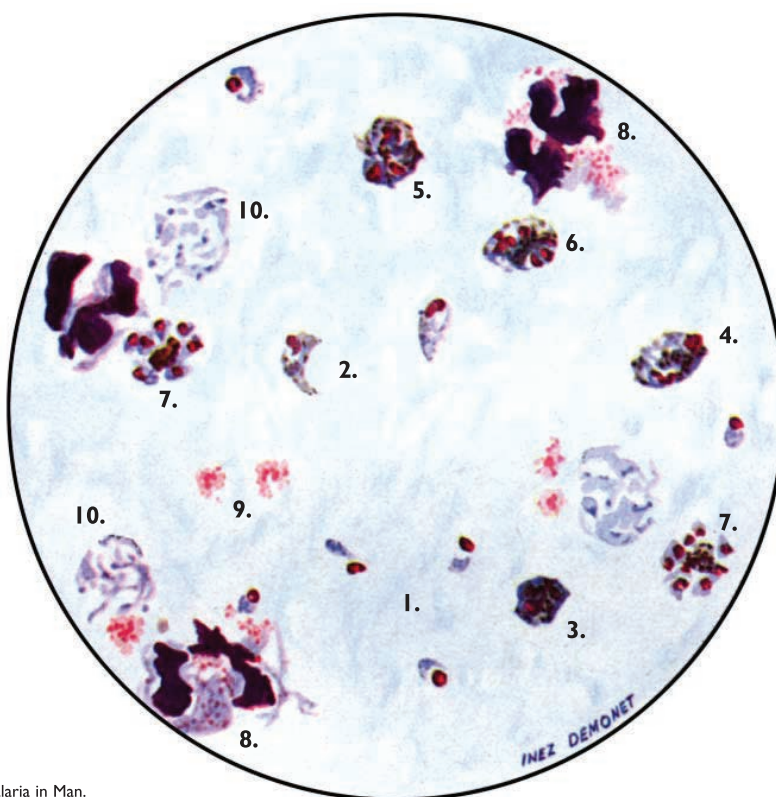
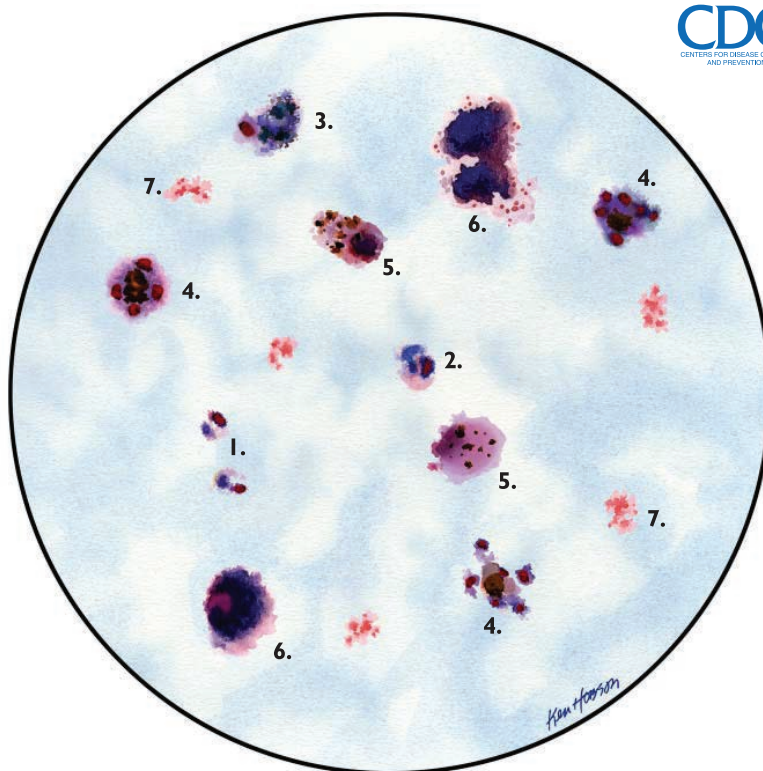


Illustration from: Wilcox A. Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, 1960.



## *Plasmodium ovale* Blood Stage Parasites, Thick Blood Smears

- 1: Small trophozoites.
- 2: Growing trophozoites.
- 3: Mature trophozoites.
- 4: Schizonts.
- 5: Gametocytes.
- 6: Nucleus of leucocyte.
- 7: Blood platelets.



## *Plasmodium vivax* Blood Stage Parasites, Thick Blood Smears

- 1: Ameboid trophozoites.
- 2: Schizont — 2 divisions of chromatin.
- 3: Mature schizont.
- 4: Microgametocyte.
- 5: Blood Platelets.
- 6: Nucleus of neutrophil.
- 7: Eosinophil.
- 8: Blood platelet associated with cellular remains of young erythrocytes.

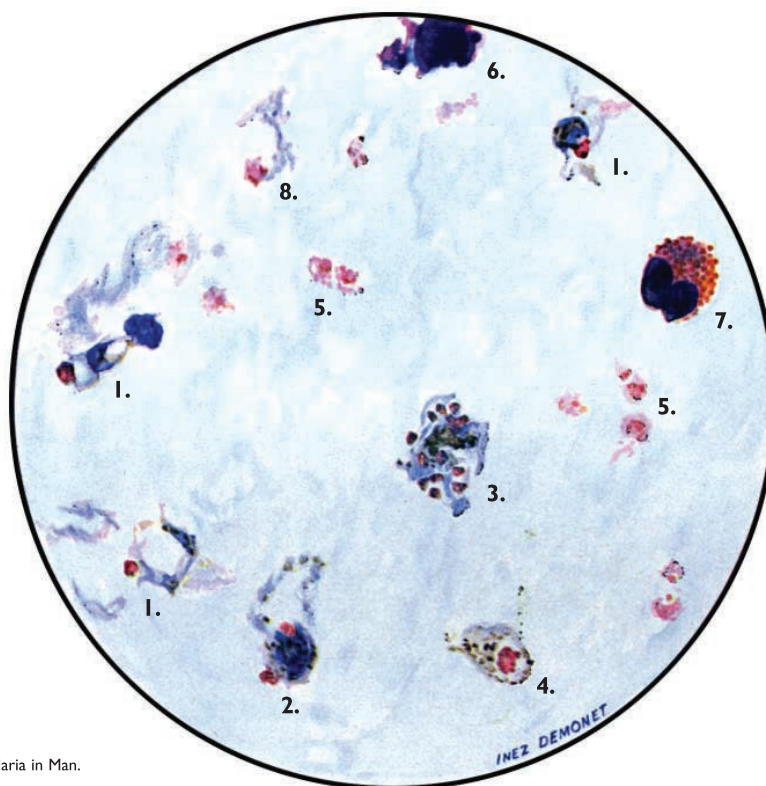
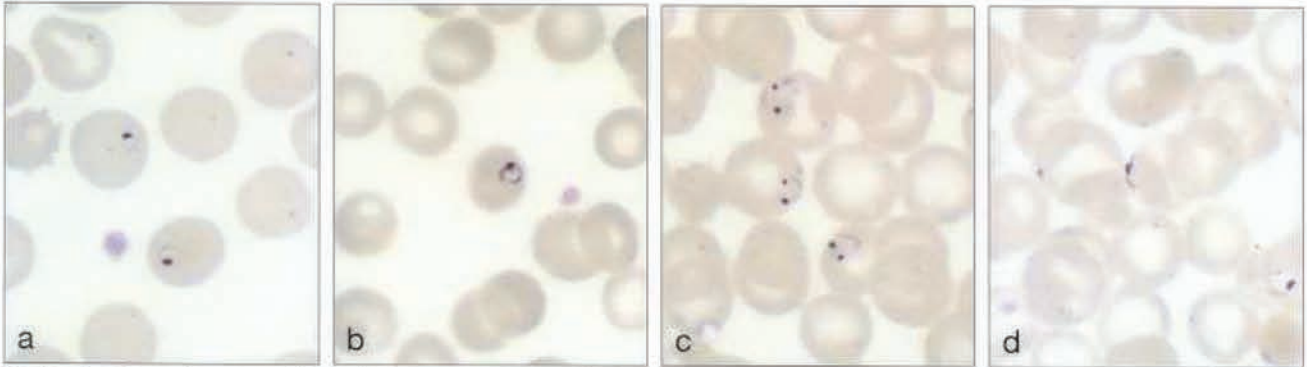


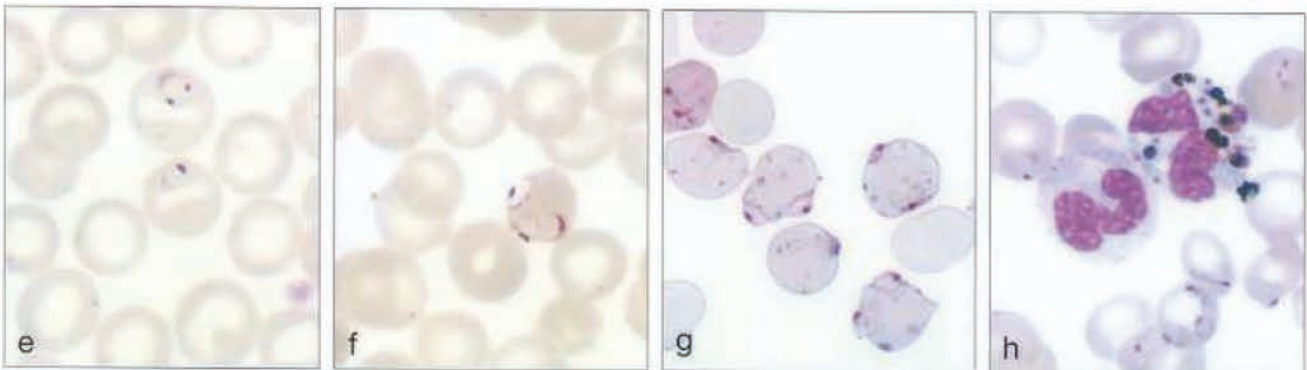
Illustration from: Wilcox A. Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, 1960.

**Plasmodium falciparum thin film**

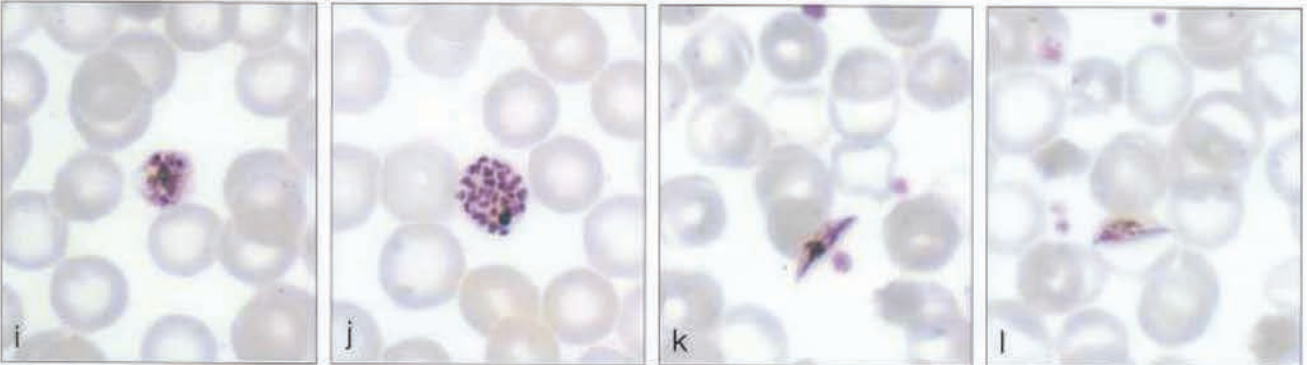
© World Health Organization 2000



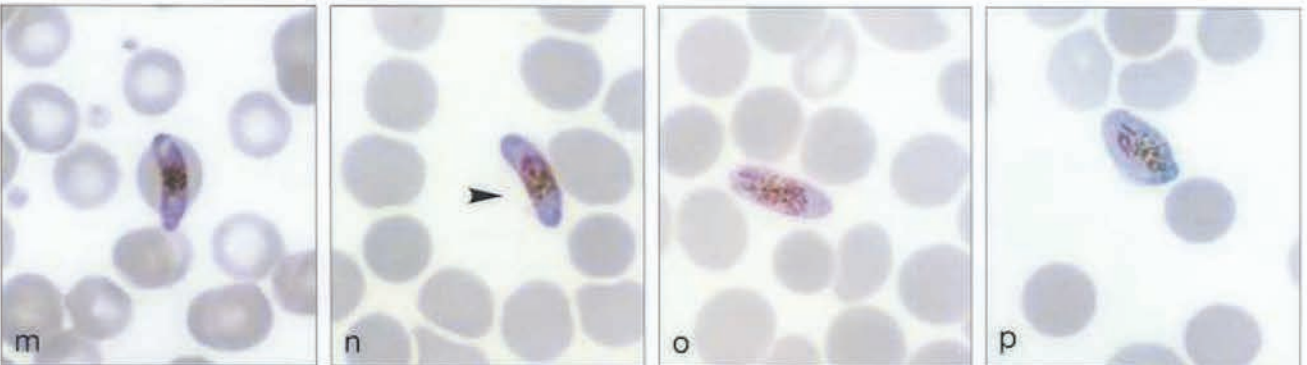
**Trophozoites:** Merozoites invade red blood cells of all ages. Trophozoites of *P. falciparum* are smaller than those of the other human malarías, tending to have a delicate, thin ring of blue cytoplasm, with a vacuole and a prominent red chromatin dot (a–e). Infected red cells with double chromatin dots (c, e) and multiple invasion of erythrocytes (f, h) are frequent features of this infection. The infected red blood cells are not enlarged. Parasites at the margin of red cells are referred to as accolé or appliqué forms (d); recognition



of these is useful in diagnosis. In some instances, these marginal forms are markedly displaced so that much of the parasite extends beyond the cell margin (f, g). Maurer's clefts (f, g) appear later in *P. falciparum* infection than do Schüffner's dots in *P. vivax* infection. Maurer's clefts are seen in red cells containing older trophozoites and stain best when the pH is alkaline (pH 7.2–7.6). Growing and mature trophozoites are not usually seen in peripheral blood films unless infection is severe and parasitaemia is high. Occasionally lumps of pigment can be seen within the cytoplasm of granulocytes.



**Schizonts:** These are rarely seen in peripheral blood films except in heavy infections. Mature schizonts are compact, rounded bodies usually containing between 16 and 24 (range 8–40) merozoites (i, j). Pigment in the schizont is usually fused into a single or double mass and may be anywhere in the infected erythrocyte (i, j).

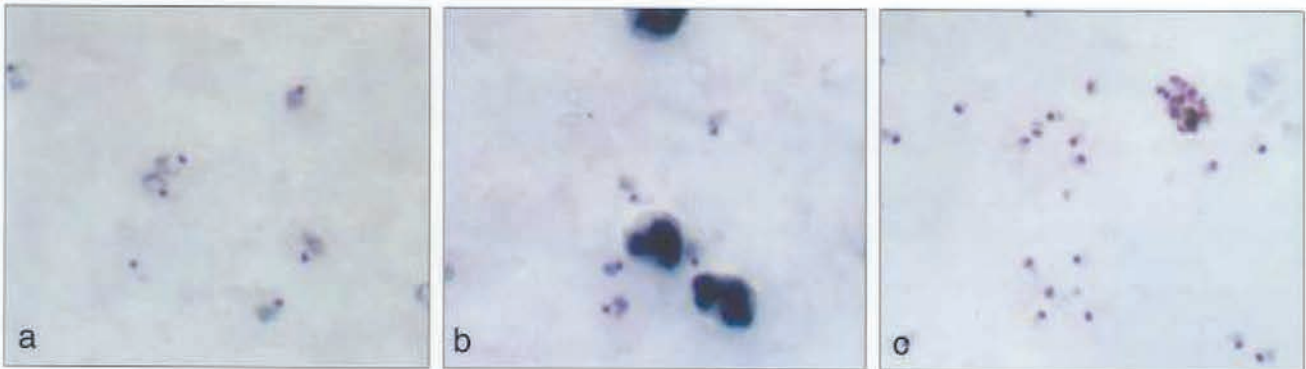


**Gametocytes:** Initially these are rounded bodies lacking pigment and with no vacuole. As they mature, they become spindle-shaped (k, l) and then develop into characteristic banana- or sausage-shaped bodies with rounded ends (m–o). It is frequently possible to see the red-cell membrane during maturation of the gametocyte (n, arrow). In macrogametocytes, the cytoplasm stains blue and the chromatin is concentrated as a purplish mass (m, n); pigment tends to be more concentrated than in microgametocytes and appears as irregular granules or rodlets in the centre of the parasite. The cytoplasm of microgametocytes is often a pinkish purple and the chromatin is more diffuse (o); pigment granules tend to be more scattered than in macrogametocytes. Occasionally, gametocytes may assume bizarre shapes (p).

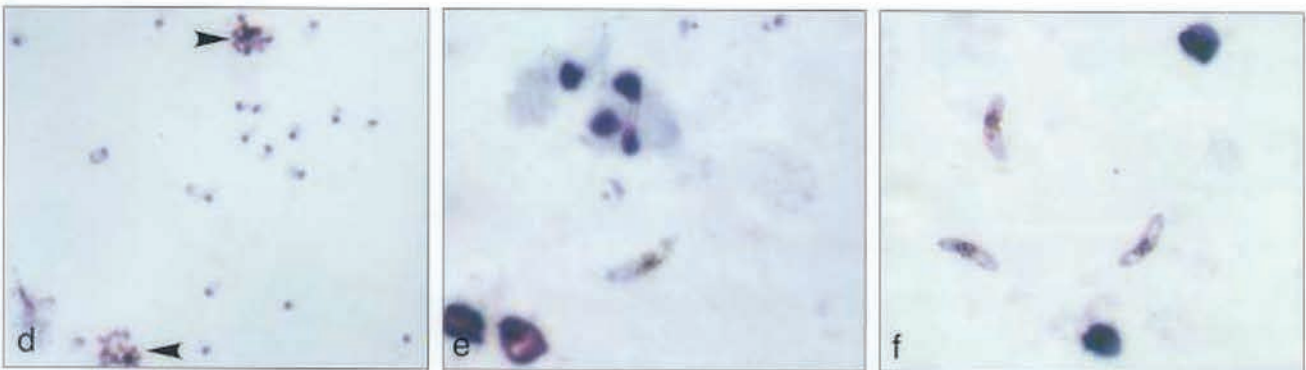


*Plasmodium falciparum* thick film

© World Health Organization 2010



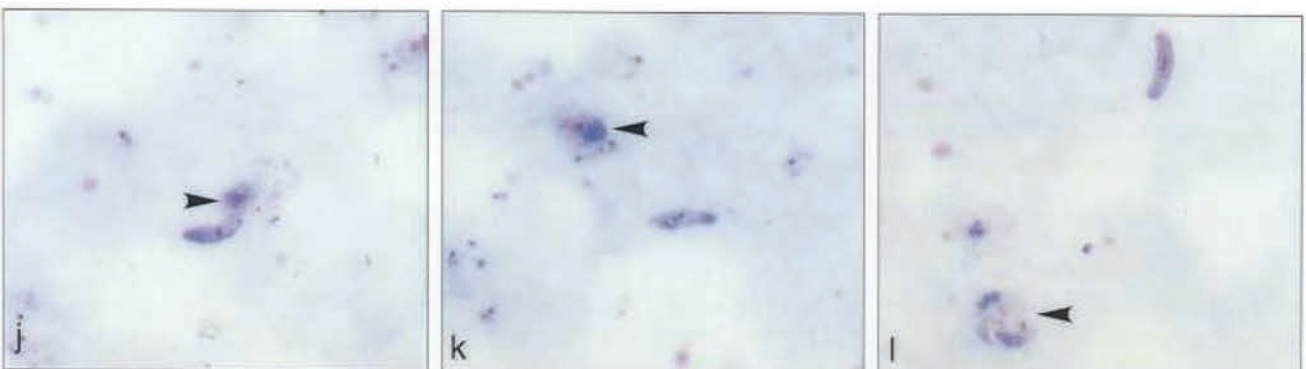
Ring forms (a–c) are usually small, often numerous, with delicate, scanty cytoplasm. Ring and comma forms (distorted ring forms) are common but older ring forms may have more cytoplasm (a). Ring forms with double chromatin dots are common. The presence of large numbers of ring forms in the absence of other morphological stages is generally diagnostic for this species (c).



In heavy infections, small, compact schizonts (d, arrows), usually containing between 16 and 24 (range 8–40) merozoites, may be found clustered around a small, dark mass of pigment (d); large numbers of ring forms are also present. Ring forms may be found with gametocytes (e) and, in some infections, gametocytes may be found in a field in the absence of ring forms (f).

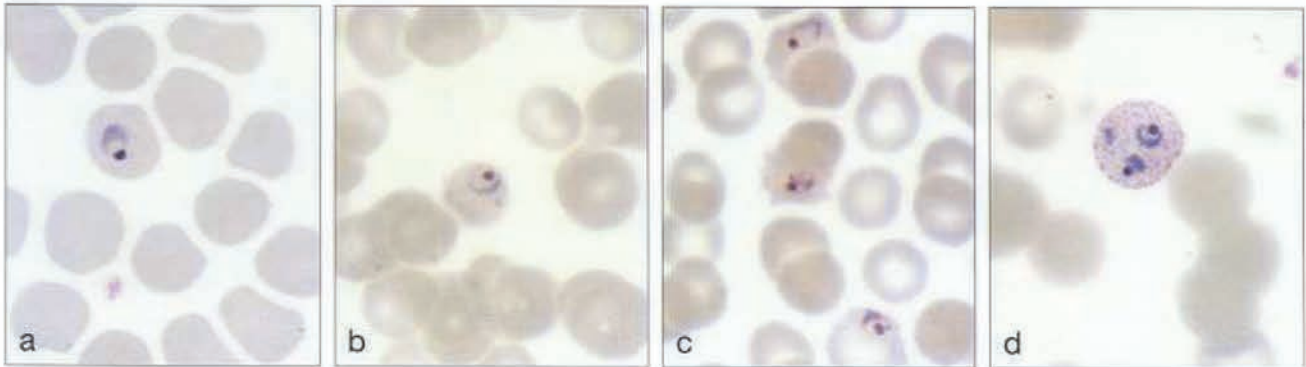


Typical banana- or sausage-shaped gametocytes (g, h), sometimes referred to as crescents, are easy to identify. However, when damaged or altered in the process of making thick films, gametocytes (i, arrows), in the absence of ring forms, may be more difficult to recognize.

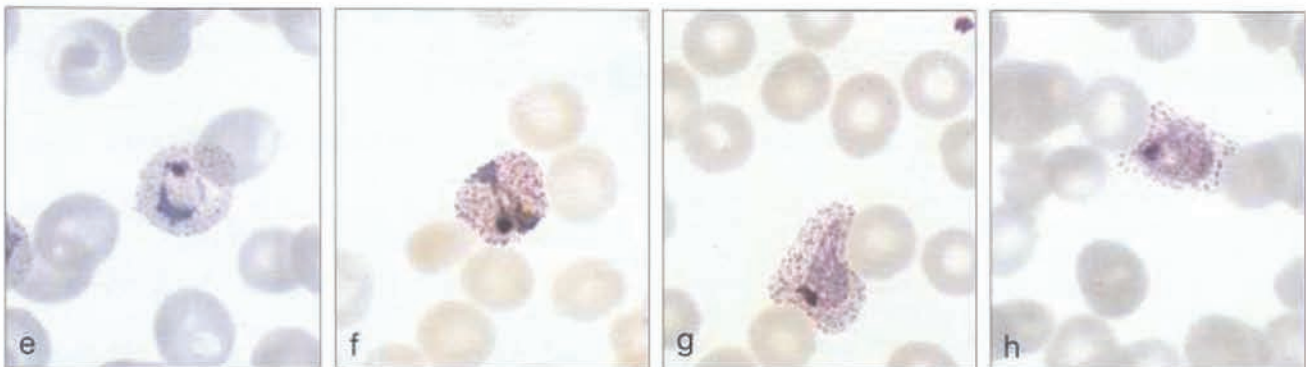


In mixed infections of *P. falciparum* and *P. vivax* (j–l), a typical gametocyte and numerous small ring forms of *P. falciparum* are visible, along with a *P. vivax* trophozoite (j, arrow). In (k) ring forms and a gametocyte are present with a large trophozoite of *P. vivax* (arrow); in (l) a gametocyte is visible along with a prominent trophozoite of *P. vivax* (arrow).

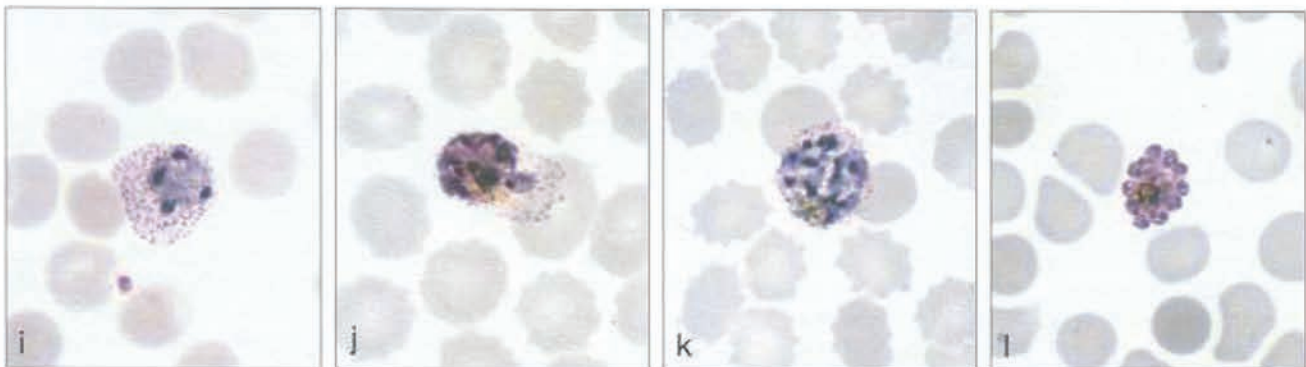
**Plasmodium vivax thin film**



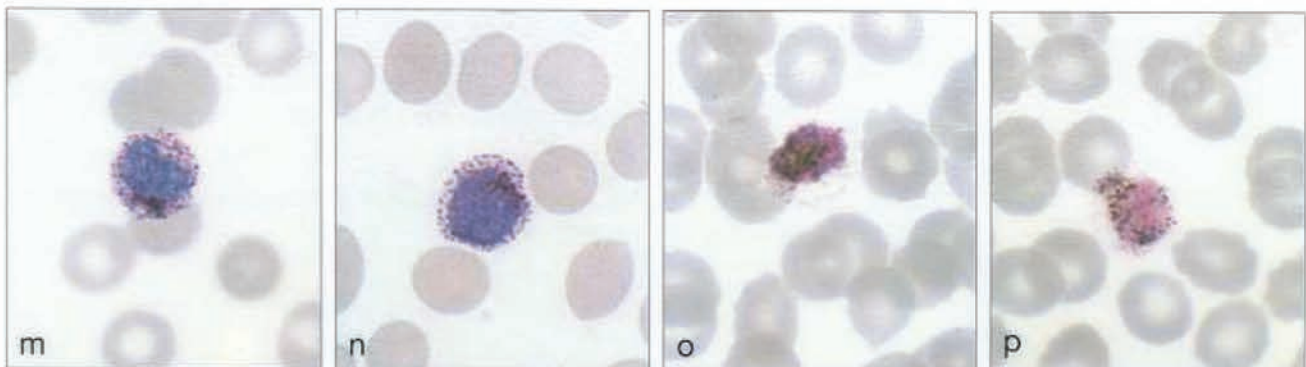
**Trophozoites:** Merozoites typically invade young erythrocytes. The infected red blood cells become enlarged, often by more than about 50% (about the size of a white blood cell), and may vary from round to oval. Very young trophozoites (ring forms) typically measure about one-third the diameter of the red blood cell; they are composed of a prominent red chromatin dot and a fine circle of blue cytoplasm (a–d). Occasionally there may be two chromatin dots. Young growing trophozoites have an increased mass of cytoplasm



and usually an irregular, amoeboid appearance (e). Older trophozoites become very large and markedly amoeboid and can fill the red blood cell (f–h). The chromatin mass is large and compact; grains of pigment are scattered throughout the cytoplasm and a conspicuous vacuole is almost always present (h). Mature trophozoites may be difficult to differentiate from gametocytes (h, m). In properly stained blood films, Schüffner's dots may be seen in red blood cells containing young trophozoites (e–g) and, rarely, earlier (d).



**Schizonts:** Early in its development, the schizont is large and amoeboid. The chromatin divides into small irregular masses, ultimately forming between 14 and 20 (range 12–24) merozoites (i–l). In the mature schizont, one or two clumps of pigment may be centred in the cluster of merozoites (l). Each merozoite is composed of a dot of chromatin surrounded by a small mass of cytoplasm (l). The mature schizont usually fills the enlarged red blood cell (k, l). Schüffner's stippling is usually evident in the infected cell (k).

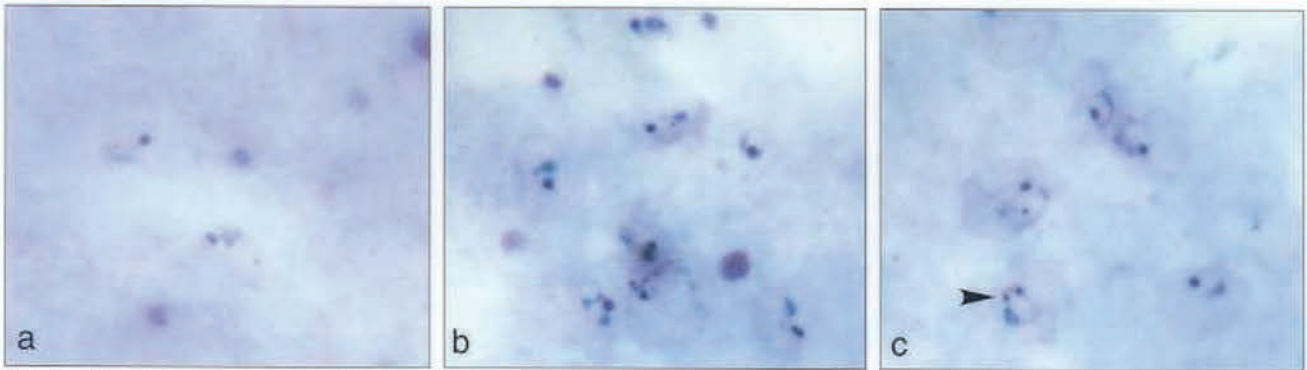


**Gametocytes:** The parasites are usually round to oval and regular in outline (m–p). Macrogametocytes (m, n) are typically large and blue and have a small, eccentric, compact chromatin mass. Brown pigment is scattered throughout the cytoplasm and vacuoles are absent. The mature parasite nearly fills the enlarged red blood cell (m, n); this stage is often difficult to distinguish from a mature trophozoite (h). Microgametocytes (o, p) have a large, diffuse mass of pink-staining chromatin and light blue to pink or lavender cytoplasm containing scattered granules of dark pigment.

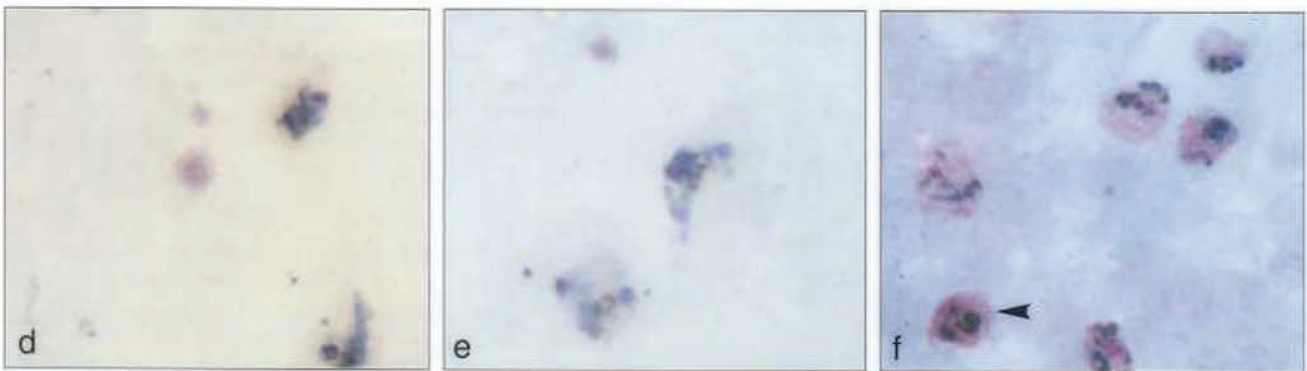


*Plasmodium vivax* thick film

© World Health Organization 2003



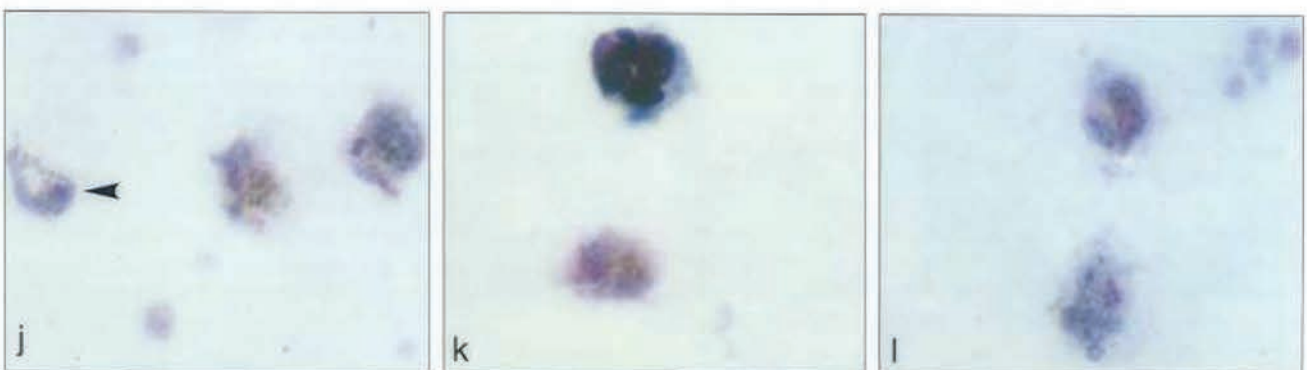
Typical ring forms (a-c), and one with a double chromatin dot (c; arrow), vary somewhat in size and have prominent red chromatin dots with varying amounts of light blue chromatin. The ring forms are typically larger than those of *P. falciparum*, often without a complete circle of blue cytoplasm. Young trophozoites (b, c) are visible in "ghosts" of erythrocytes.



Trophozoites (d-f) of this species may vary in both size and the numbers in which they are present. The cytoplasm is darker and thicker (d, e) than that seen in the "ghosts" of red blood cells containing amoeboid organisms with irregular and fragmented cytoplasm (f). Schüffner's stippling is evident in several of the infected erythrocytes (f). A gametocyte is also visible (f, arrow). Large trophozoites are often dense, compact and darkly staining and contain scattered pigment; they can be confused with macrogametocytes.



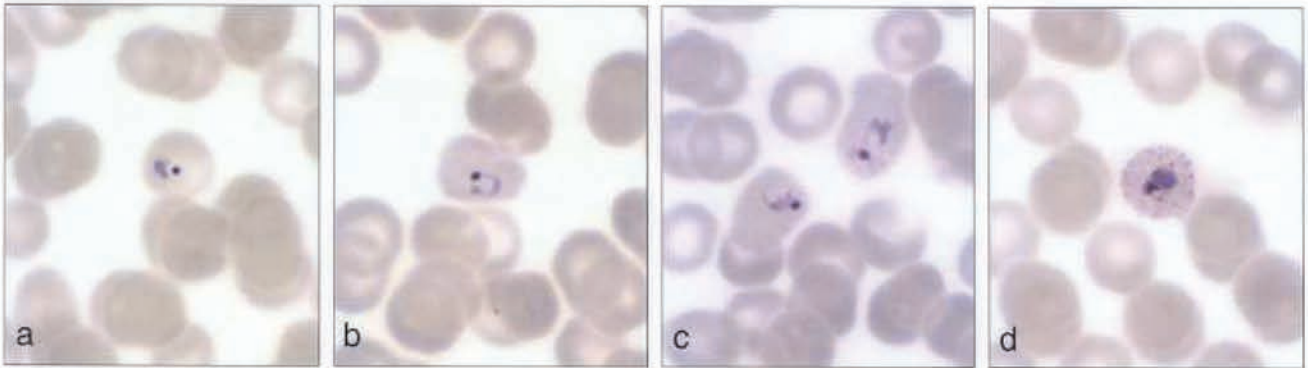
Immature (g, h) and mature (i) schizonts are usually large and present in small to moderate numbers. Mature schizonts usually contain between 16 and 24 merozoites and have a loose mass of pigment. Individual chromatin masses are irregular in shape and often quite large in immature schizonts. Immature schizonts may be confused with those of *P. malariae*.



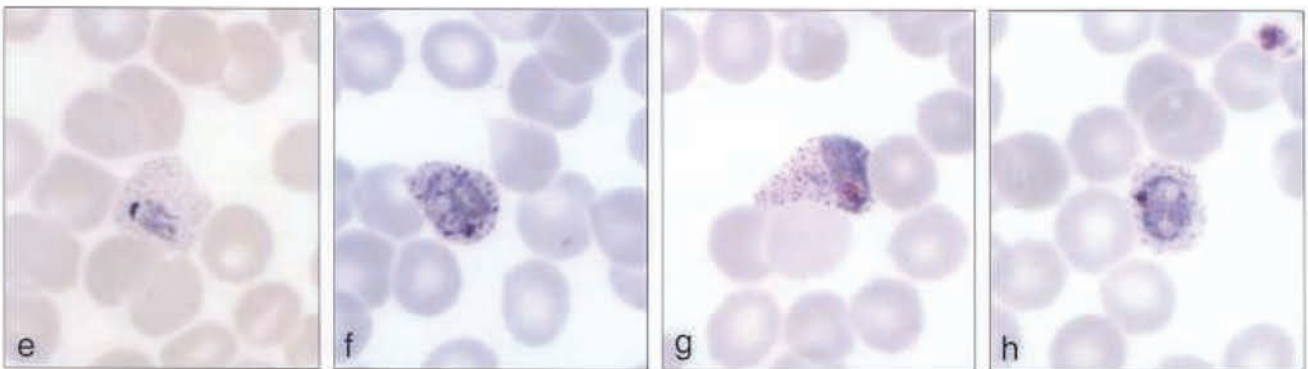
Gametocytes (j-l) of *P. vivax* are usually larger than those of other species. Mature forms are usually large and round; pigment granules are fine and dispersed throughout the non-vacuolated cytoplasm. Chromatin masses are dense and may or may not be well defined. Differentiation of gametocytes, especially immature forms, from mature trophozoites (j, arrow) is often difficult.

**Plasmodium ovale thin film**

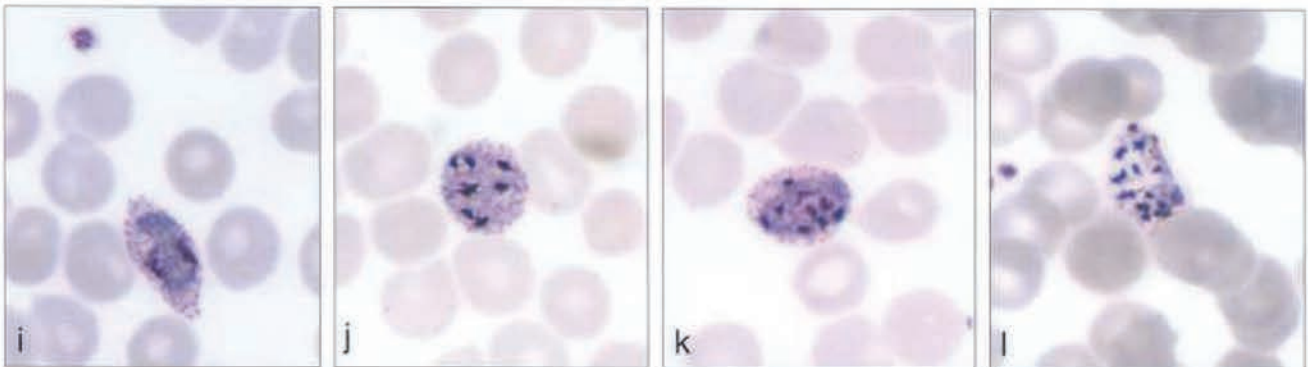
© World Health Organization 2000



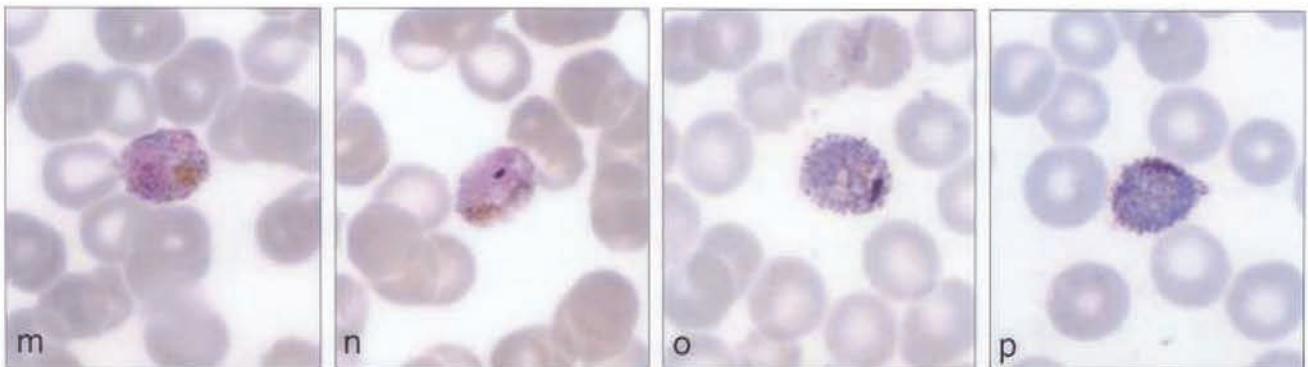
**Trophozoites:** Merozoites, like those of *P. vivax*, invade young erythrocytes; the ring stage resembles that of the other human malaria species (a, b). Infected red blood cells may be round but are often oval in shape and may or may not have an irregular margin (c, d). In young trophozoites, the mass of chromatin may be large and irregular in shape



and may show Schüffner's stippling (c–e). More mature trophozoites are often in slightly enlarged red cells (f), which may be oddly shaped with fringed (fimbriated) margins (g, h). The trophozoites tend to be less amoeboid in appearance than those of *P. vivax*.



**Schizonts:** Developing (i–k) and mature (l) schizonts are frequently found in oval-shaped cells, many with irregular margins (i). Erythrocytes may be only slightly enlarged. Mature schizonts usually have 6–12 merozoites, but occasionally up to 18 (k, l). Clumps of pigment are often found at the centre of the cluster of merozoites. Schüffner's stippling is usually prominent.

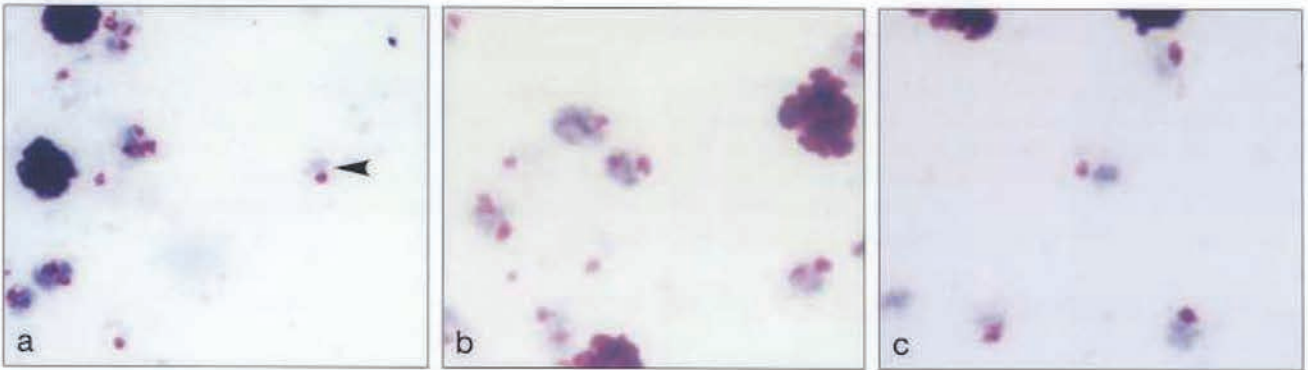


**Gametocytes:** Mature gametocytes typically fill the host red blood cells, which may be round or oval with sometimes irregular margins (m–p). Pigment granules are scattered throughout the cytoplasm or, in microgametocytes (m, n), concentrated towards the periphery of the organisms. The gametocytes of *P. ovale* are often difficult to distinguish from those of *P. vivax*. Microgametocytes (m, n) are usually smaller than macrogametocytes and have diffuse pink chromatin. In macrogametocytes (o, p), chromatin is compact and usually dark red. Schüffner's stippling is prominent in the infected red cells.

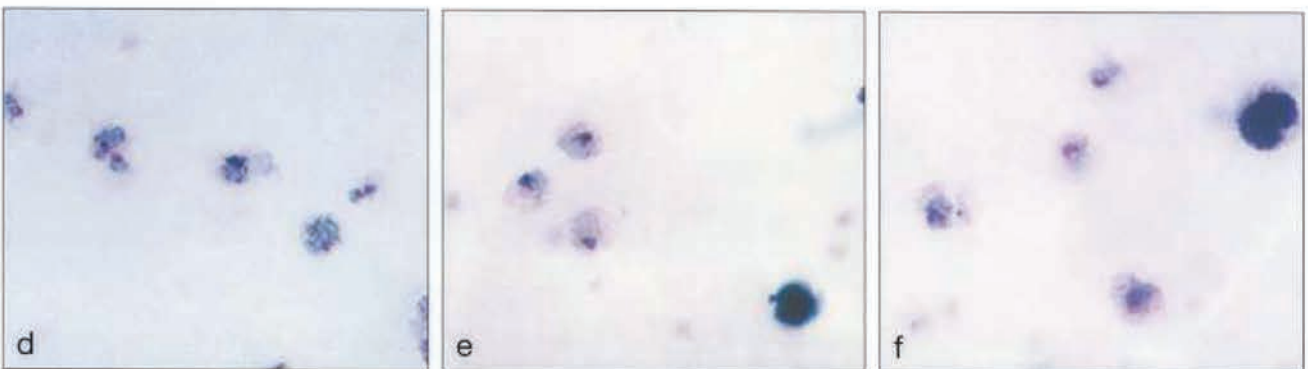


**Plasmodium ovale thick film**

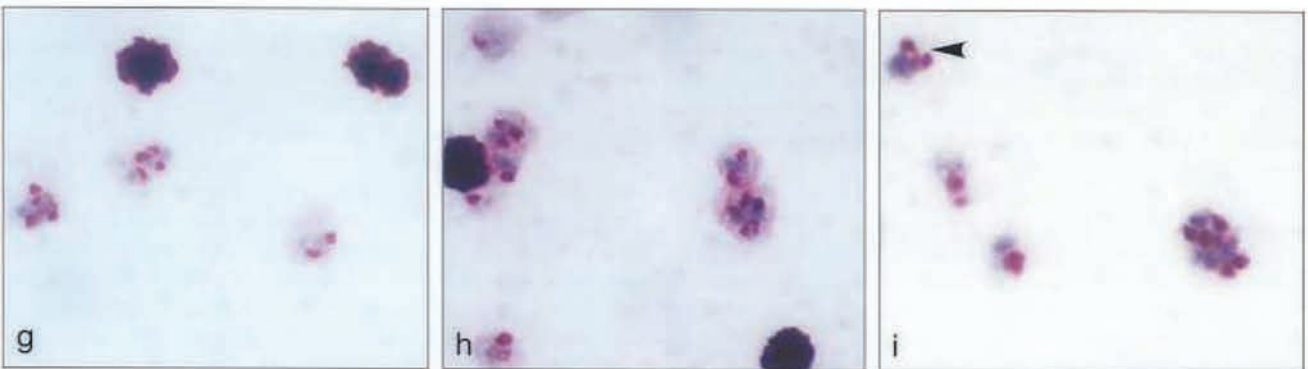
© World Health Organization 2000



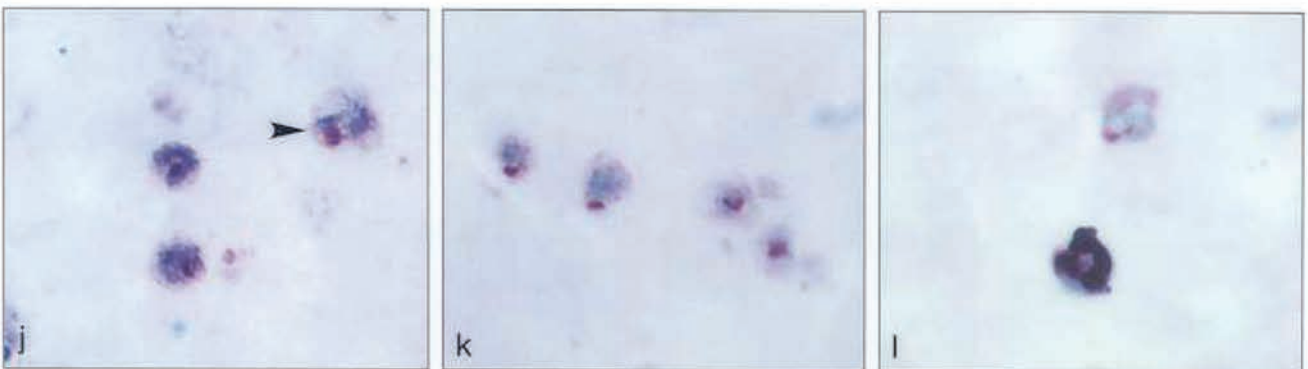
Ring forms and young trophozoites (a–c) of *P. ovale* are similar to those of *P. vivax*. A typical ring form with a prominent chromatin dot and wisp of blue cytoplasm is present (a, arrow), but most of the forms (a–c) are young trophozoites with a prominent mass of blue.



Compact, young trophozoites are present (d), but many of the trophozoites seen (e, f) are mature and have a somewhat amoeboid form. Stippling is frequently pronounced and appears as a pinkish “cloud” around the parasite (d–h).



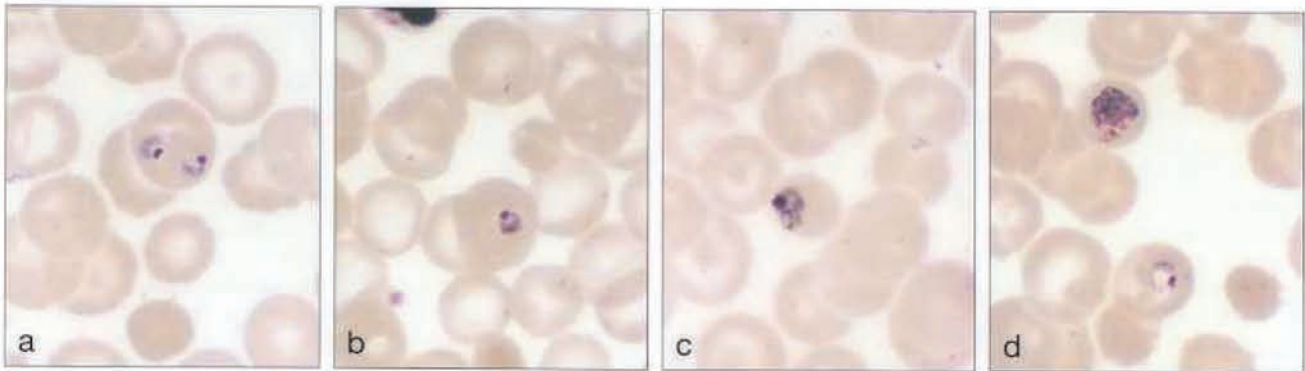
Schizonts of *P. ovale* are usually few in number and similar in size to those of *P. malariae*. Immature schizonts with little pigment are evident (g). Mature schizonts contain 6–12 merozoites and pigment is usually seen as a concentrated mass (h). A mature schizont with a compact mass of pigment can be distinguished, along with two trophozoites and an immature schizont (i, arrow).



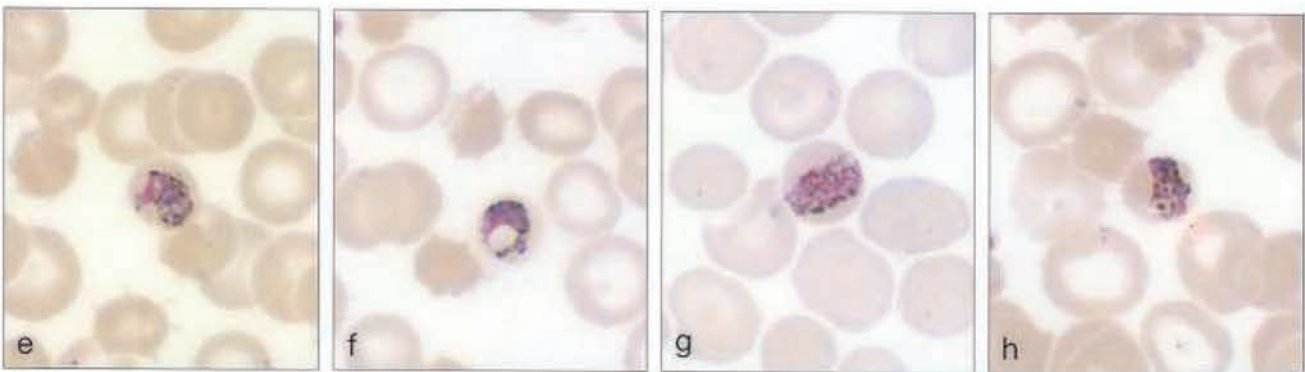
Immature and mature gametocytes of *P. ovale* may be difficult to distinguish from mature trophozoites. In addition, gametocytes of this species are similar in size and morphology to those of *P. vivax*. Two rounded gametocytes with considerable coarse pigment and a trophozoite (j, arrow) illustrate how difficult it is to distinguish between these stages. Two trophozoites (right) and two gametocytes (left) are visible (k), and also a single gametocyte with pigment (l).

**Plasmodium malariae thin film**

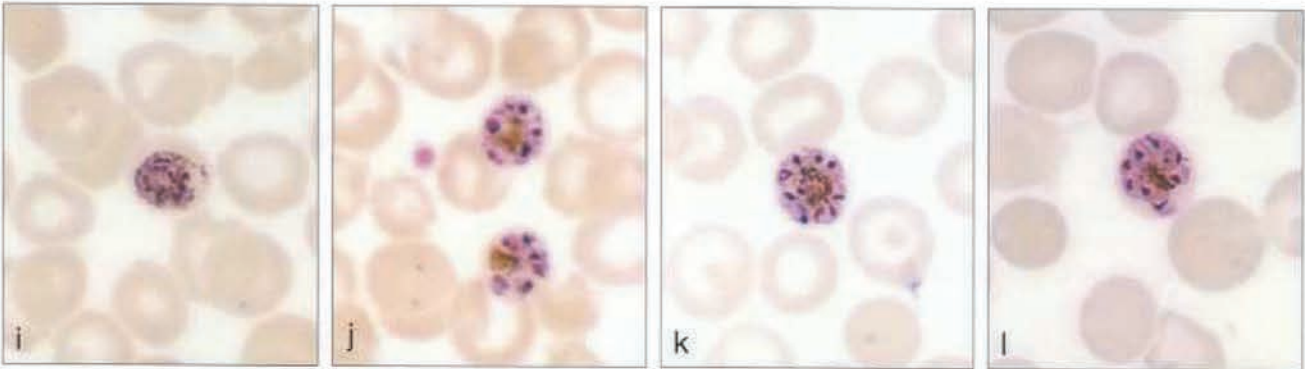
© World Health Organization 2000



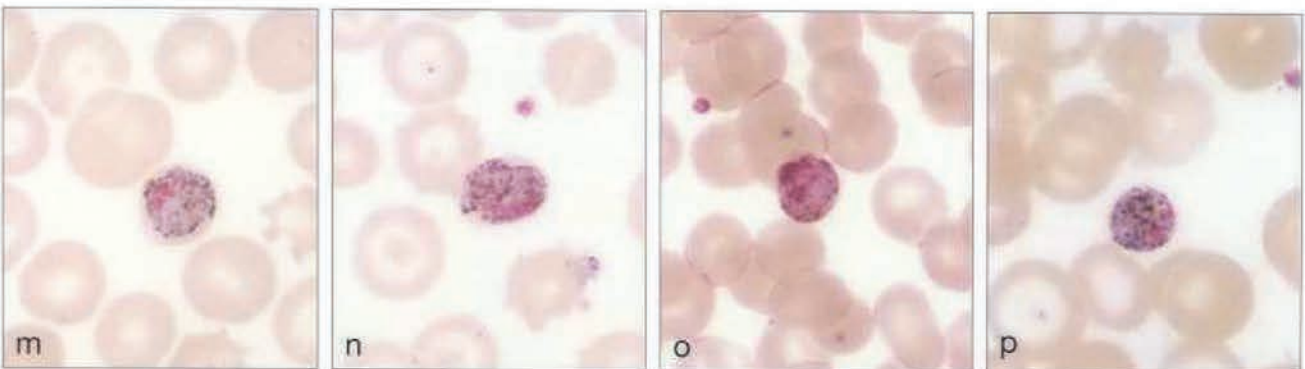
**Trophozoites:** Merozoites invade mature red blood cells. Ring forms are fairly large and the chromatin dot may be peripheral (a–d). Occasionally the chromatin dot may be located in the centre of the vacuole. Double chromatin dots and invasion of red cells by more than one organism (a) are uncommon. Trophozoites grow slowly and often they may stretch



across the equator of the red cell to produce the typical band forms associated with this species (g, h). Other trophozoites may exhibit a large vacuole surrounded by dense cytoplasm and an elongated mass of chromatin, producing a basket-like appearance (f). Mature trophozoites have considerable coarse, brown pigment and almost fill the erythrocyte (d, e).



**Schizonts:** Immature schizonts show fewer divisions of chromatin into irregular sizes and shapes (i). Mature schizonts usually have 8 or 10 merozoites (range 8–12), which are characteristically arranged in a rosette formation surrounding a mass of brown pigment (k). However, many schizonts, which usually fill the red blood cell (j, l), may have the pigment clumped at the periphery of the organism (j, l).

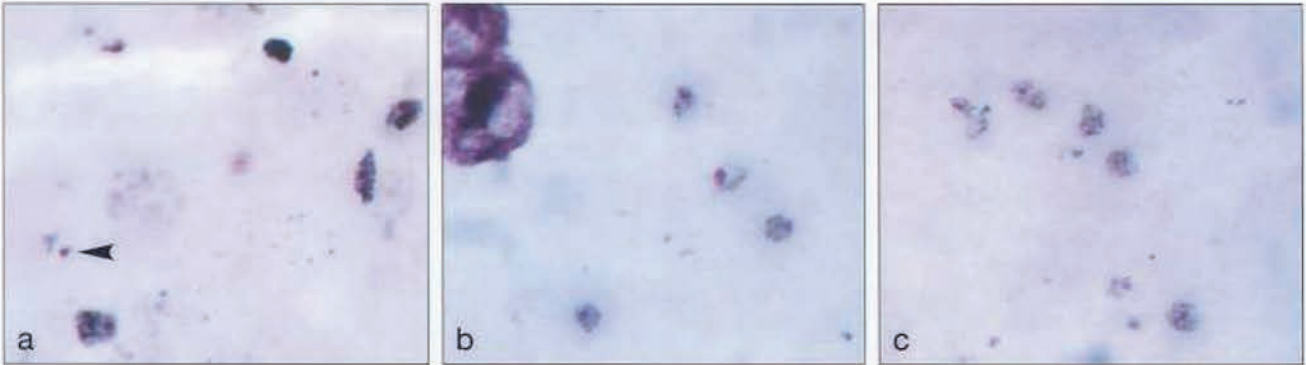


**Gametocytes:** It is difficult to differentiate between gametocytes and mature trophozoites in this species. Macrogametocytes (m, n) have a bluer cytoplasm and the chromatin is smaller, redder and more compact than that seen in microgametocytes. The cytoplasm of the microgametocyte is a light bluish pink (p) and the chromatin is diffuse, pinkish blue (o). Brown pigment is conspicuous with granules scattered throughout the cytoplasm (m–p).

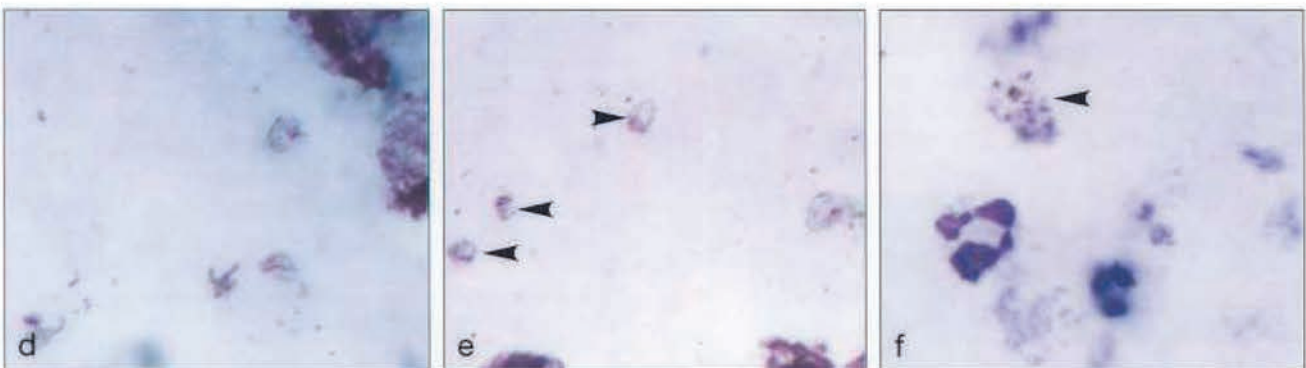


**Plasmodium malariae** thick film

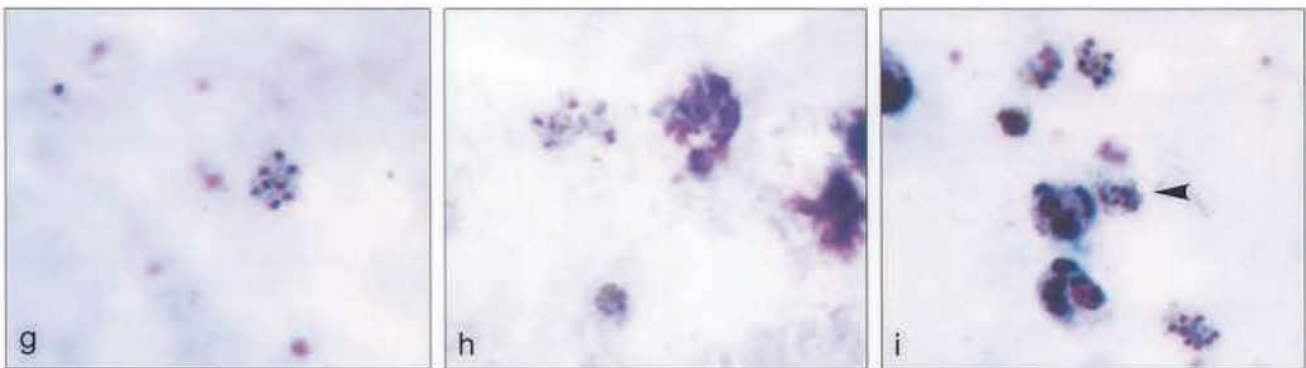
© World Health Organization, 2000



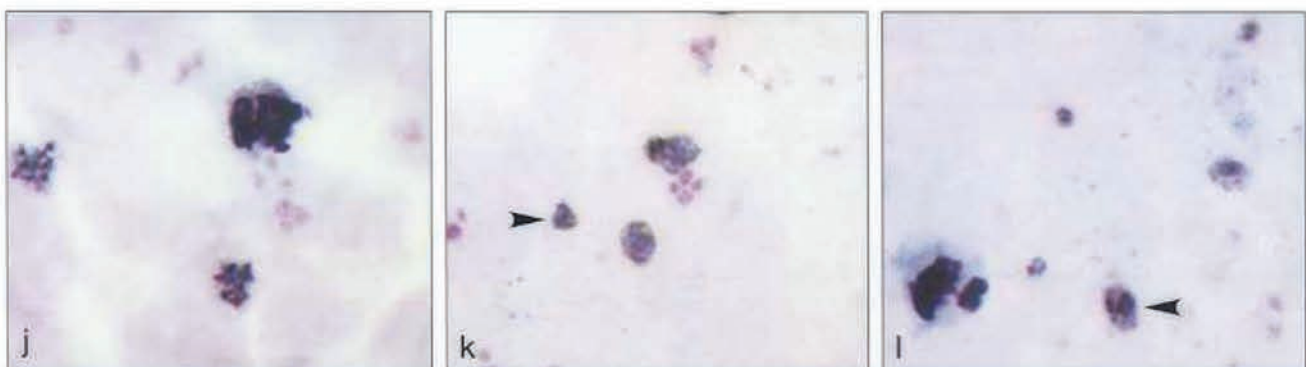
Ring forms tend to be small and few in number and have large chromatin dots and a small amount of cytoplasm, often without a vacuole (a, b). Ring forms may (a) lack a complete circle of cytoplasm, but in a field containing several trophozoites a complete ring form (b) can be seen. Early trophozoites (c) may lack a vacuole. Pigment forms early in this species and is present as dark, coarse grains (b, c).



Growing trophozoites (d, e) vary in shape. Three small, rounded trophozoites are present (e, arrows), along with a growing trophozoite (right). A schizont (f, arrow) containing 8 merozoites and a compact mass of pigment is visible, along with a few rounded trophozoites and two leukocytes.



Mature schizonts, containing 8 merozoites, are visible (g-i); small, dark, concentrated masses of pigment occur in each of the schizonts. In (h), the schizont and a rounded trophozoite are present. An immature schizont (i, arrow) is seen in the same field as three mature schizonts (i).







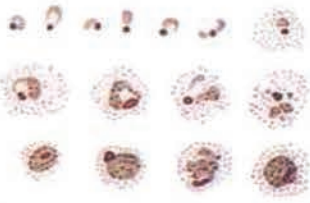
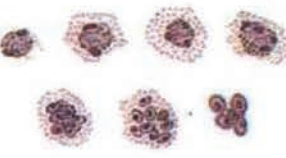
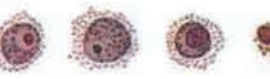





Two mature schizonts and a leukocyte are visible (j). Two gametocytes are larger (k) than the small, rounded trophozoites (k, arrow). A single gametocyte (l, arrow) is seen with small ring forms and growing trophozoites. Gametocytes may be difficult to distinguish from mature trophozoites; coarse pigment grains are often peripherally distributed in gametocytes but not in trophozoites.



Summary table

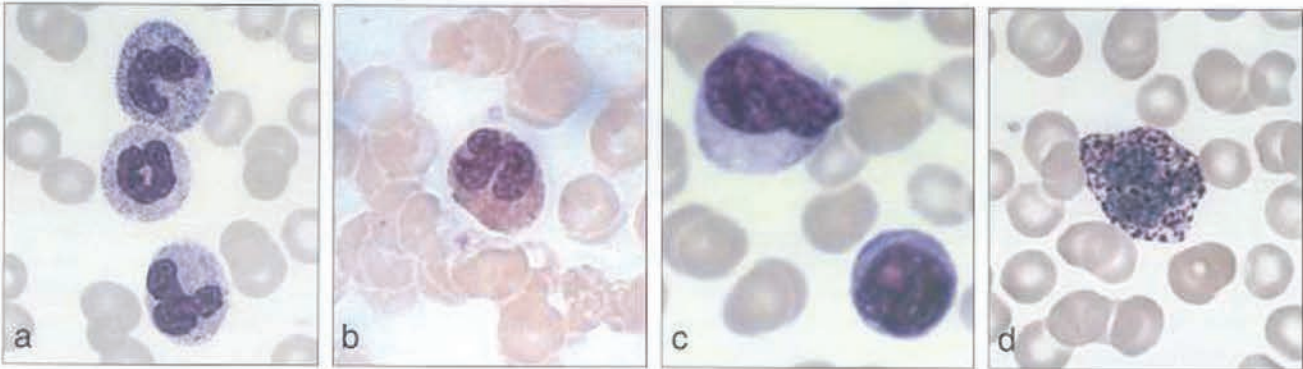
Same figure of old bench aids plate #8

Species		Stage of parasite in peripheral blood		
		Trophozoite	Schizont	Gametocyte
<i>Plasmodium falciparum</i>	Young, growing trophozoites and/or mature gametocytes usually seen.	 <p><i>Size:</i> small to medium; <i>number:</i> often numerous; <i>shape:</i> ring and comma forms common; <i>chromatin:</i> often two dots; <i>cytoplasm:</i> regular, fine to fleshy; <i>mature forms:</i> sometimes present in severe malaria, compact with pigment as few coarse grains or a mass.</p>	 <p>Usually associated with many young ring forms. <i>Size:</i> small, compact; <i>number:</i> few, uncommon, usually in severe malaria; <i>mature forms:</i> 12-30 or more merozoites in compact cluster; <i>pigment:</i> single dark mass.</p>	 <p>Immature pointed-end forms uncommon. <i>Mature forms:</i> banana-shaped or rounded; <i>chromatin:</i> single, well defined; <i>pigment:</i> scattered, coarse, rice-grain like; pink extrusion body sometimes present. Eroded forms with only chromatin and pigment often seen.</p>
		 <p><i>Size:</i> small to large; <i>number:</i> few to moderate; <i>shape:</i> broken ring to irregular forms common; <i>chromatin:</i> single, occasionally two; <i>cytoplasm:</i> irregular or fragmented; <i>mature forms:</i> compact, dense; <i>pigment:</i> scattered, fine.</p>	 <p><i>Size:</i> large; <i>number:</i> few to moderate; <i>mature forms:</i> 12-24 merozoites, usually 16, in irregular cluster; <i>pigment:</i> loose mass.</p>	 <p>Immature forms difficult to distinguish from mature trophozoites. <i>Mature forms:</i> round, large; <i>chromatin:</i> single, well defined; <i>pigment:</i> scattered, fine. Eroded forms with scanty or no cytoplasm and only chromatin and pigment present.</p>
<i>P. ovale</i>	All stages seen; prominent Schüffner's stippling in 'ghost' of host red cells, especially at film edge.	 <p><i>Size:</i> may be smaller than <i>P. vivax</i>; <i>number:</i> usually few; <i>shape:</i> ring to rounded, compact forms; <i>chromatin:</i> single, prominent; <i>cytoplasm:</i> fairly regular, fleshy; <i>pigment:</i> scattered, coarse.</p>	 <p><i>Size:</i> rather like <i>P. malariae</i>; <i>number:</i> few; <i>mature forms:</i> 4-12 merozoites, usually 8, in loose cluster; <i>pigment:</i> concentrated mass.</p>	 <p>Immature forms difficult to distinguish from mature trophozoites. <i>Mature forms:</i> round, may be smaller than <i>P. vivax</i>; <i>chromatin:</i> single, well defined; <i>pigment:</i> scattered, coarse. Eroded forms with only chromatin and pigment present.</p>
		 <p><i>Size:</i> small; <i>number:</i> usually few; <i>shape:</i> ring to rounded, compact forms; <i>chromatin:</i> single, large; <i>cytoplasm:</i> regular, dense; <i>pigment:</i> scattered, abundant, with yellow tinge in older forms.</p>	 <p><i>Size:</i> small, compact; <i>number:</i> usually few; <i>mature forms:</i> 6-12 merozoites, usually 8, in loose cluster; some apparently without cytoplasm; <i>pigment:</i> concentrated.</p>	 <p>Immature and certain mature forms difficult to distinguish from mature trophozoites. <i>Mature forms:</i> round, compact; <i>chromatin:</i> single, well defined; <i>pigment:</i> scattered, coarse, may be peripherally distributed. Eroded forms with only chromatin and pigment present.</p>

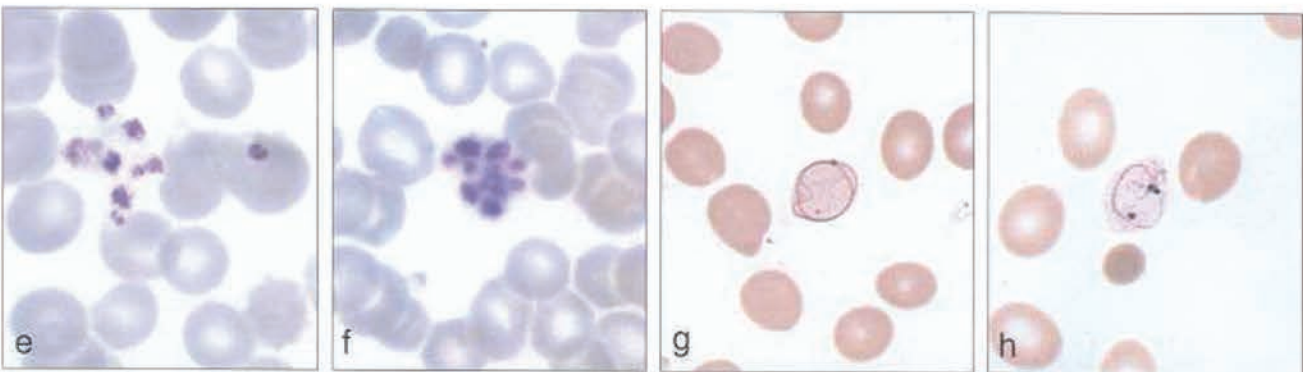


Artifacts and cellular elements in blood films

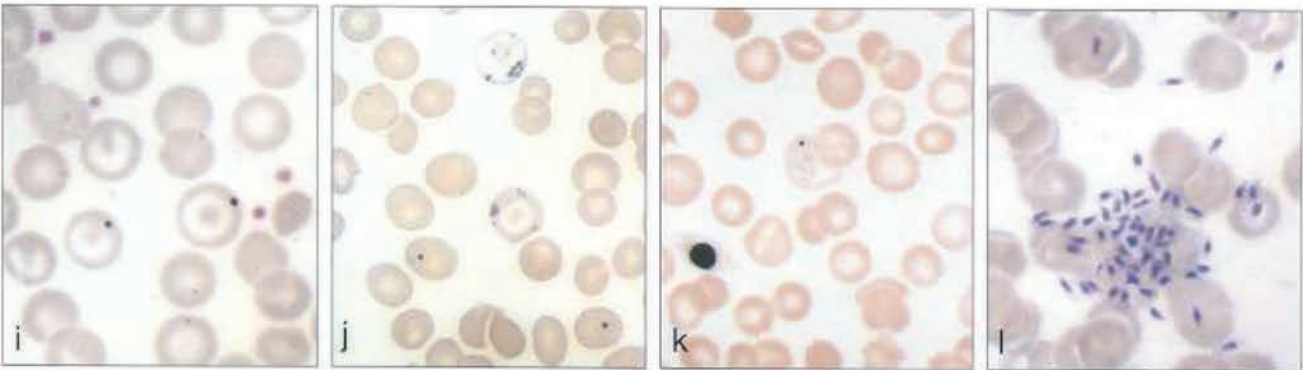
© World Health Organization 2000



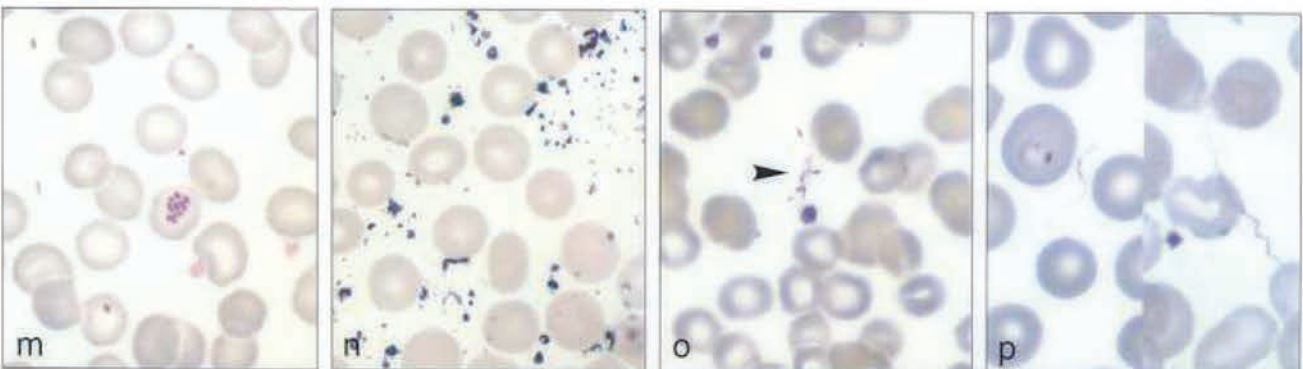
White blood cells (leukocytes) in blood films (a–d): neutrophils (a), an eosinophil (b), a lymphocyte (the smaller cell) and a monocyte (c), and a basophil (d) are commonly found when blood films are examined.



Platelets (e, f) lying free among red blood cells: when individual platelets are superimposed upon erythrocytes (e), or if they form a cluster (f), they superficially resemble schizonts and may be wrongly identified. Cabot's rings (g, h), a type of red cell inclusion that often takes the form of an oval ring, occur in severe anaemias and are thought to be remnants of spindle fibres forming during mitosis.



Howell–Jolly bodies (i, j) are purple-staining granules and represent nuclear (DNA) fragments. They are sometimes confused with the chromatin dots associated with malaria parasites. Pappenheimer bodies are small, irregular, basophilic deposits in erythrocytes; they may occur in association with Howell–Jolly bodies (j) or may be found alone in the erythrocyte (k). Other objects (l) that cannot be readily identified may also be confused with malaria parasites by inexperienced microscopists.



Bacterial organisms may contaminate blood films, and in this case a cluster of bacteria are superimposed on an erythrocyte (m). Blood films that are poorly rinsed following staining may retain the stain (n). In anticoagulated malarious blood kept at room temperature for several hours or more, microgametocytes may undergo exflagellation, releasing microgametes (o, arrow). In the split image (p), a single microgamete (note central nucleus) lies adjacent to a *P. vivax*-infected erythrocyte (left). On the right, a typical spirochaete of *Barrelia* is seen in a case of relapsing fever. Note the similarity to a malaria microgamete; the spirochaete is longer and thicker and has no nucleus.

Alessio Panza, Migrants: HIV Testing and Counseling a manual for IOM counselors, International Organization for Migration (IOM), Bangkok, 1994

Basic Laboratory Methods in Medical Parasitology, World Health Organization Geneva, 1991 Jeffrey & Leach, Atlas of Medical Helminthology & Protozoology

Manual of Basic Techniques for a Health Laboratory, World Health Organization Geneva, England, 1980.

Monica Cheesbrough, Medical Laboratory Manual for Tropical Countries, volume I and II, Tropical Health Technology, Cambridgeshire/ Butterworth-Heinemann, Oxford 1994

Radomyos Prayong, Tangtrongchitr Anchalee, Looareesuwan Sornchai, Chongsuphajaisiddhi Tan, Atlas of Medical Parasitology with 456 colour illustrations, Mahidol University, 1992.

World Health Organization. Malaria microscopy quality assurance manual – Ver. 2. 2016.

World Health Organization. Malaria Microscopy Quality Assurance Manual Version 1. In 2009. p. 1–150. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/207019/9789290614227\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/207019/9789290614227_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific. PREPARATION OF WATER BUFFERED TO pH 7.2 WITH BUFFER TABLETS. Malar Microsc Stand Oper Proced – Mm-Sop-03B 1 [Internet]. 2016;3–5. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274382>.

WHO. Quality control of giemsa stock solution and buffered water. Malar Microsc Stand Oper Proced. 2016;1–12.

WHO. Preparation of giemsa working solution. Malar Microsc Stand Oper Proced - MM-SOP-04 [Internet]. 2016;2. Available from: [http://www.wpro.who.int/mvp/lab\\_quality/2096\\_oms\\_gmp\\_sop\\_02\\_rev.pdf](http://www.wpro.who.int/mvp/lab_quality/2096_oms_gmp_sop_02_rev.pdf)

World Health Organization. Collection of Finger-Prick Blood and Preparation of Thick and Thin Blood Films. Malar Microsc Stand Oper Proced [Internet]. 2016;4. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274382>.

World Health Organization. Collection of blood by venipuncture and preparation of blood films from venous blood collected in tubes containing anticoagulant. Malar Microsc Stand Oper Proced. 2016;Version 1(MM-SOP-05B):1–4.

World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific. Labelling Malaria Blood Films. 2016;1–2. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274382>.

World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific. Recording and Reporting Microscopy Results. 2016;6–8. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274382>.

WHO. Giemsa Staining of Malaria Blood Films. Malar Microsc Stand Oper Proced - MM-SOP-07A [Internet]. 2016;1–6. Available from: [http://www.wpro.who.int/mvp/lab\\_quality/2096\\_oms\\_gmp\\_sop\\_07a\\_rev.pdf](http://www.wpro.who.int/mvp/lab_quality/2096_oms_gmp_sop_07a_rev.pdf).

WHO. Microscopy examination of thick and thin blood films for identification of malaria parasites. Mm-Sop-08 1. 2016;1–6.

World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific. Malaria Parasite Counting. Malar Microsc Stand Oper Proced [Internet]. 2016;1–5. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274382>

World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific. General Safety Procedures in the Malaria Microscopy Laboratory. 2016;1–3. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274382>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Use, Care and Maintenance of Microscopes. 2016;5. Available from: [http://www.wpro.who.int/mvp/lab\\_quality/2096\\_oms\\_gmp\\_sop\\_12.pdf](http://www.wpro.who.int/mvp/lab_quality/2096_oms_gmp_sop_12.pdf)

World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific. Management of Wastes Generated From Malaria Diagnostic Tests. 2016;1–3. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274382>

World Health Organization. PREPARATION OF WATER BUFFERED TO pH 7.2 MALARIA MICROSCOPY STANDARD OPERATING PROCEDURE-MM-SOP-03A [Internet]. 2016. p. 2–7. Available from: <https://iris.wpro.who.int/bitstream/handle/10665.1/14214/MM-SOP-03b-eng.pdf>

WHO. Preparation of Giemsa Stock Solution. World Health Organ. 2016;1–3.

World Health Organization. Cleaning and Storing Microscope Slides. Malar Microsc Stand Oper Proced - MM-SOP-01 [Internet]. 2016;1–3.

Greenwood BM. Bench aids for the diagnosis of malaria infections 2nd edition. Vol. 95, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2001. p. 468.

CDC. Comparison of the Plasmodium Species Which Cause Human Malaria [Internet]. 2013. Available from: <http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>

Coatney GR et al. Plasmodium falciparum Blood Stage Parasites , Thin Blood Smears Plasmodium malariae Blood Stage Parasites , Thin Blood Smears. 1971;4. Available from: [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF\\_Files/Malaria\\_Comparison\\_p3-6.pdf](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF_Files/Malaria_Comparison_p3-6.pdf)

Manual WA, Diagnosis M. Plasmodium falciparum Blood Stage Parasites , Thick Blood Smears Plasmodium malariae Blood Stage Parasites , Thick Blood Smears Plasmodium ovale Blood Stage Parasites , Thick Blood Smears Plasmodium vivax Blood Stage Parasites ,. Education. 1960;3–4.

Ministry of Health and family Welfare. Laboratory Diagnosis of Malaria by Microscopy [Internet]. Book. 2009. 1–101 p. Available from: [https://nvbdcp.gov.in/WriteReadData/l892s/SOP-Quality-Assurance-Microscopy.pdf?fbclid=IwAR0V3Zes5PcwVsRb93tD\\_9bOFcxaphWi0looIr96USdeC77sfqEF-NPBYBk](https://nvbdcp.gov.in/WriteReadData/l892s/SOP-Quality-Assurance-Microscopy.pdf?fbclid=IwAR0V3Zes5PcwVsRb93tD_9bOFcxaphWi0looIr96USdeC77sfqEF-NPBYBk)



