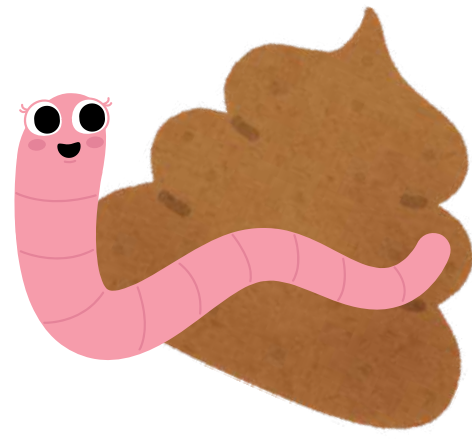


OVA & PARASITE

การตรวจวิเคราะห์



แพทย์หญิงกัญญารักษ์ คูบุรัตต์
ภาควิชา พยาธิวิทยา
สาขา พยาธิวิทยาคลินิก



การตรวจหาไข่และปรสิต (O&P) โดยทั่วไป มักประกอบด้วยขั้นตอนทางห้องปฏิบัติการที่ออกแบบมาเพื่อตรวจหาปรสิตในตัวอย่างทางคลินิก โดยอาศัยการตรวจลักษณะทางจุลทรรศน์ มากกว่าการเพาะเชื้อ การทดสอบทางชีวเคมี หรือการดูคุณสมบัติการเจริญเติบโตของเชื้อ.

การส่งตรวจจะขึ้นอยู่กับปรสิตก่อโรคที่สงสัย แพทย์ผู้ส่งตรวจจำเป็นต้องทราบว่าการตรวจ O&P ครอบคลุมขั้นตอนอะไรบ้าง และควรตระหนักว่า การตรวจนี้อาจไม่ครอบคลุมปรสิตทุกชนิด เช่น การส่ง การย้อมเพิ่มเติม สำหรับ Microsporidia และ Cyclospora / Cystoisospora / Cryptosporidium แยกต่างหาก การตรวจด้วยวิธี immunoassay สำหรับเชื้อบางชนิดอาจไม่ได้รวมอยู่ ในการตรวจ O&P ด้วย

การเตรียมผู้ป่วย

- ควรทำก่อนที่ผู้ป่วยจะได้รับสารแบเรียมสำหรับการตรวจทางรังสีวิทยา
- ตัวอย่างอุจจาระที่มีสารแขวนลอยลักษณะทึบแสง สีขาวคล้ายชอล์ก ไม่สามารถใช้ตรวจได้ และโปรโตซัวในลำไส้อาจถูกบดบังได้นาน 5–10 วันหลังได้รับสารชนิดแบเรียม
- น้ำมันละหุ่งหรือน้ำมันแร่, บิสเมท, ยาปฏิชีวนะรวมถึงยารักษามาลาเรีย และยาต้านท้องเสียชนิดไม่ถูกดูดซึม อาจรบกวนการตรวจ ทำให้ต้องเลื่อนการเก็บตัวอย่างออกไป 5–10 วันหลังได้รับยาเหล่านี้ เพื่อให้สารเหล่านี้ถูกขับออกจากร่างกายก่อน



ช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจตัวอย่างอุจจาระ

- ตัวอย่างอุจจาระสด เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการตรวจพบโปรโตซัวระยะที่มีการเคลื่อนไหวได้ เช่น amoebae, flagellates, ciliates
- **อุจจาระเหลว** ควรตรวจ ภายใน 30 นาทีหลังถ่าย (ไม่ใช่หลังเดินทางถึงห้องแล็บ)
- **อุจจาระกึ่งเหลวหรืออ่อนนุ่ม** ควรตรวจ ภายใน 1 ชั่วโมงหลังถ่าย ซึ่งมักมีทั้งระยะซิสต์และระยะโทรโฟซอยท์
- **อุจจาระเป็นก้อน** ควรตรวจ ภายใน 24 ชั่วโมงหลังถ่าย และมักพบในรูปแบบ cyst เป็นหลัก



สิ่งที่ควรทราบ

“ควรตรวจตัวอย่างอุจจาระหลายครั้งก่อนที่จะสรุปว่าไม่มีการติดเชื้อปรสิต เพราะสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเฉพาะโปรโตซัวในลำไส้ มักไม่ถูกขับออกมาในช่วงเวลาที่คงที่”

แพทย์ควรทราบว่าโอกาสในการตรวจพบปรสิตที่มีความสำคัญทางคลินิกจากตัวอย่างเพียงครั้งเดียว อาจต่ำเพียง 50–60%

แต่หากตรวจ 3 ตัวอย่างด้วยการตรวจ O&P โอกาสในการตรวจพบจะเพิ่มขึ้นเป็น มากกว่า 95%.

ควรทำอย่างไรเมื่อมีการ “ล่าช้า” ในการส่งตรวจตัวอย่างอุจจาระ

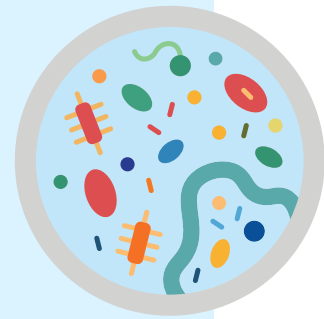
การเก็บอุจจาระไว้ที่อุณหภูมิ 4–8°C สามารถทำให้ปรสิตยังคงอยู่ได้เป็นระยะเวลาต่างกัน ขึ้นอยู่กับระยะของปรสิตนั้น ๆ

- E. histolytica ระยะ trophozoite อยู่รอดได้ประมาณ 1–3 วัน
- E. histolytica ระยะ cyst อยู่รอดได้ประมาณ 4 สัปดาห์
- ไข่พยาธิ (helminth eggs) ที่เก็บไว้ที่ 3–5°C ยังมีชีวิตอยู่ได้ยาวนานถึงประมาณ 1 เดือน

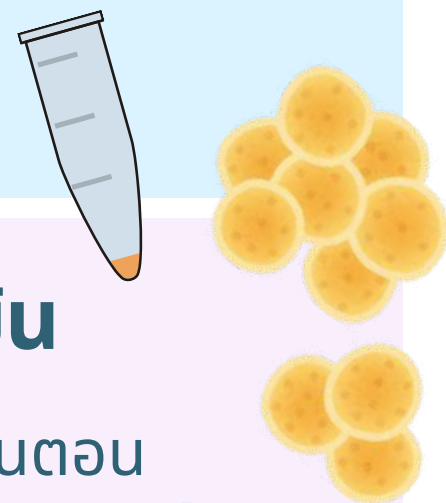


การเตรียม Direct wet-mount

- คือการผสมอุจจาระสดที่ไม่ได้ผ่านการ preserve ร่วมกับน้ำเกลือเพื่อใช้ตรวจหา trophozoite ที่มีการเคลื่อนไหวได้
- วิธีนี้สามารถพบ ไข่พยาธิ (helminth eggs), ระยะซิสต์ของโปรโตซัว (protozoan cysts) และ oocyst ของ Cyclospora, Cystoisospora, และ Cryptosporidium ได้เช่นกัน
- ควรทราบว่า ตัวอย่างที่ผ่านการทำให้คงสภาพ จะไม่สามารถสังเกตการเคลื่อนไหวของโปรโตซัวได้



วิธีการทำความเข้มข้น



การทำความเข้มข้นของอุจจาระเป็นขั้นตอนมาตรฐานในชุดการตรวจ O&P แบบสมบูรณ์ ช่วยให้ตรวจพบปรสิตที่มีจำนวนเล็กน้อยที่อาจตรวจไม่พบในการตรวจสเมียร์แบบเปียกโดยตรง

วิธีการทำความเข้มข้นมี 2 ประเภทหลัก ได้แก่:

- 1.วิธีการตกตะกอน (Sedimentation; FEA method) ใช้การปั่นเหวี่ยงแยกให้ปรสิตตกตะกอน จากนั้นตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยอาจใช้ไอโอดีนหรือไม่ก็ได้
 - 2.วิธีการลอยตัว (Flotation; zinc sulfate method) ใช้สารละลายที่มีความถ่วงจำเพาะสูงทำให้ปรสิตลอยขึ้นด้านบนของสารละลาย เพื่อสะดวกต่อการเก็บและตรวจสอบ
- ทั้งสองวิธีสามารถใช้เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของไข่และตัวอ่อนของพยาธิ, ซิสต์ของโปรโตซัว, oocyst ของ Cyclospora, Cystoisospora และ Cryptosporidium, สปอร์ของ microsporidial

หลักการตรวจวิเคราะห์



การตรวจที่ทำบ่อยที่สุดในห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยาคือการตรวจหาไข่และปรสิต (O&P) แบบสมบูรณ์ ประกอบด้วย

- Direct examination: การตรวจลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างสามารถให้ข้อมูลเบื้องต้นได้ บางครั้งอาจพบตัวพยาธิในอุจจาระและสามารถเก็บเพื่อนำไปพิสูจน์ชนิดได้
- Microscopic examination: Direct wet-mount preparation, วิธีการทำความเข้มข้น (Conc. procedures), สเมียร์แบบย้อมถาวร
- การย้อมแบบ Modified trichrome stain
- การย้อมแบบ Iron-hematoxylin stain

วิธีการพิเศษ (Special methods) สำหรับ Cyclospora, Cystoisospora, และ Cryptosporidium ได้แก่ การย้อมพิเศษ (Special stains), การย้อมแบบ Modified Acid-Fast staining, วิธีการทำความเข้มข้นสำหรับ Cryptosporidium และ Cyclospora, การย้อมแบบ Safranin staining, การย้อมด้วยสารเรืองแสงชนิดแอนติบอดี (DFA assay) สำหรับ Cryptosporidium, การย้อมแบบ Modified trichrome stain สำหรับ chromotrope 2R



การย้อมสีแบบ

Modified trichrome stain

วิธีการย้อมสีนี้ทำได้ง่าย และช่วยให้สามารถตรวจพบระยะโทรโฟซอยต์ (trophozoites) และซิสต์ (cysts) ของ โปรโตซัวได้ ลักษณะสีที่ได้ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตและสิ่งแปลกปลอม (artifacts) ได้ดีขึ้น

การย้อม Iron-hematoxylin

- วิธีที่ใช้บ่อยที่สุดสองวิธี ได้แก่ Spencer-Monroe และ Tompkins-Miller
- เทคนิคนี้เหมาะสำหรับตรวจหาโปรโตซัวในลำไส้ส่วนใหญ่
- ตัวอย่างที่ย้อมแล้วจะปรากฏเป็น สีเทาอมฟ้า ทำให้เห็นโครงสร้างได้อย่างชัดเจน
- นอกจากนี้ยังสามารถใช้กับตัวอย่างที่ผ่านการเก็บรักษาหรือการทำให้คงสภาพได้

ข้อควรทราบ

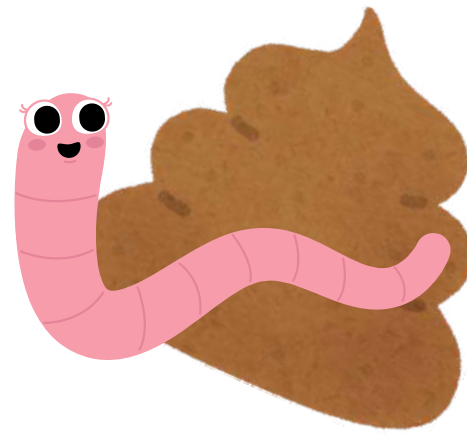
- ไม่ควรส่งตรวจ O&P เพื่อวินิจฉัยโรคพยาธิเส้นด้าย (Enterobiasis).
- การเก็บตัวอย่างด้วยวิธี Pinworm prep: ใช้สำหรับเก็บไข่พยาธิเส้นด้ายจากผิวหนังบริเวณรอบทวารหนัก



อ้างอิง

World Health Organization. Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites. WHO: Geneva, 1994.
Garcia LS, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. Clin Microbiol 2018 Rev 31:10.1128/cmr.00025-17.
Branda JA, et al. A rational approach to the stool ova and parasite examination. Clin Infect Dis. 2006 Apr 1;42(7):972-8.

OVA & PARASITE EXAMINATION



Kanyapak Kooburat
Clinical Pathologist, Pathology dept.



A routine ova and parasite examination (O&P) usually includes laboratory procedures that are designed to detect organism in clinical specimens by using microscopic characteristics rather than culture, biochemical tests, and physical growth characteristics.

The test that is to be requested depends on which infectious agent is suspected. It is very important that the ordering physician be aware of what procedure are performed with the O&P and that this test may not cover all parasites. Additional stains for Microsporida and *Cyclospora*/*Cystoisospora*/*Cryptosporidium* may need to be ordered separately, and immunoassays for selected organisms may also not be included in the O&P.

Patient preparation

- Should be performed **before barium is administered** to a patient for radiology exams.
- Stool specimens **containing the opaque, chalky suspension are unacceptable**, and intestinal protozoa may be masked for 5-10 days after ingestion of barium.
- **Caster oil or mineral oil, bismuth, antibiotic including antimalarial medication, and non-absorbable antidiarrheal preparations, may interfere** examination, and collection should be postponed for 5-10 days after administration to allow clearance of these substances.



Best examination time

Fresh stool specimens are mandatory of motile protozoan trophozoites (amoebae, flagellates, ciliates)

- **Liquid stools** should be examined within 30 min of passage (not after arriving in the lab).
- **Semi-formed or soft stools** should be examined within 1 hr of passage, usually contain both cyst and trophozoites.
- **Formed stools** should be examined within 24 hr after passage and contain mainly cysts.



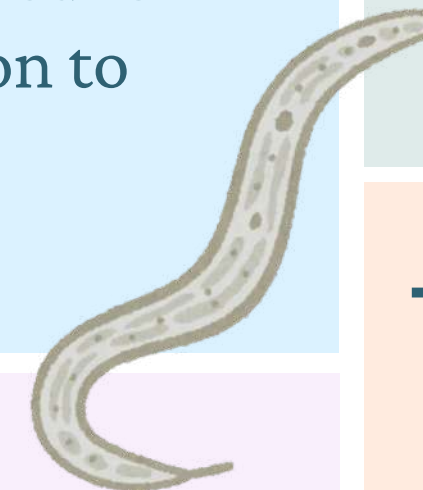
Things must be known

****It is recommended that multiple stool samples be examined prior to ruling out a parasitic infection.**

******* Many organisms, particularly intestinal protozoa, do not appear in the stool in consistent numbers. **Physicians should be aware that the probability of detecting clinically relevant parasites in a single specimen may be low as 50-60% but is >95% if three samples are examined by O&P.**

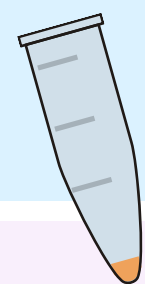
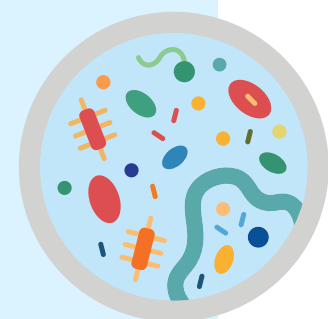
What to do when: Delayed handling specimens

- **Storing stool at 4–8°C** keeps parasites alive for different lengths of time depending on their stage. *E. histolytica* trophozoites survive 1–3 days, cysts about 4 weeks, and helminth eggs stored at 3–5°C can remain viable for up to 1 month.



Direct wet-mount prep

- Prepared by mixing a small amount of fresh, unpreserved stool with saline then suspension under coverslip for motile protozoan trophozoites.
- **Helminth eggs, protozoan cysts, and *Cyclospora/Cystoisospora/Cryptosporidium* oocysts may also be observed on wet film.**
- Motility can not be observed from preserved specimens



Concentration procedure

Fecal conc. is a routine part of a complete O&P. It allows detection of small numbers of organisms that may be missed on a direct wet mount.

Two type of concentration procedure:

1. **Sedimentation (FEA):** by centrifugation parasites and exams with or without iodine
2. **Flotation (zinc sulfate):** used high specific gravity of the solution floats the organisms

Both are **used to concentrate helminth eggs and larvae, protozoan cysts, *Cyclospora/Cystoisospora/Cryptosporidium* oocysts, and microsporidial spores.**

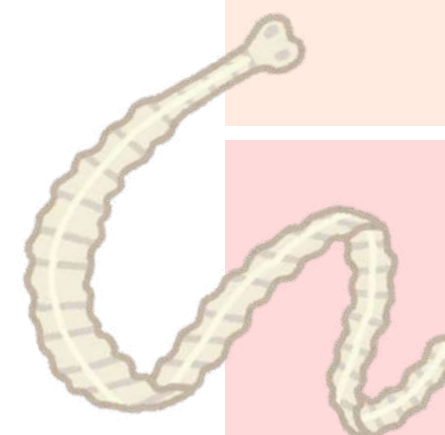
EXAMINATION METHODS



The most commonly performed test in the parasitology laboratory is the complete O&P.

- Direct examination: gross specimen and physical characteristics can provide information. Worms may be seen in the stool specimen and retrieved for identification.
- **Microscopic examination:** Direct wet-mount preparation, Concentration procedures, Routine permanent-stain smears
- Modified trichrome stain
- Iron-hematoxylin

Other special methods for *Cyclospora*, *Cystoisospora*, *Cryptosporidium* such as Special stains, Modified Acid-Fast staining, Concentration of *Cryptosporidium* and *Cyclospora*, Safranin staining or Fluorescent antibody staining (DFA assay) for *Cryptosporidium*, Modified trichrome stains for chromotrope 2R.



Modified trichrome stain

The stain is easy to perform and allows detection of protozoan trophozoites and cysts. The color stain allowing easier differentiation between organisms and artifacts

Iron-hematoxylin

- Two most common used are Spencer-Monroe and Tompkins-Miller procedures
- **Used for most of the intestinal protozoans**
- Specimen stain shades of grayish blue
- Can be used in preservative specimens

Take Notes

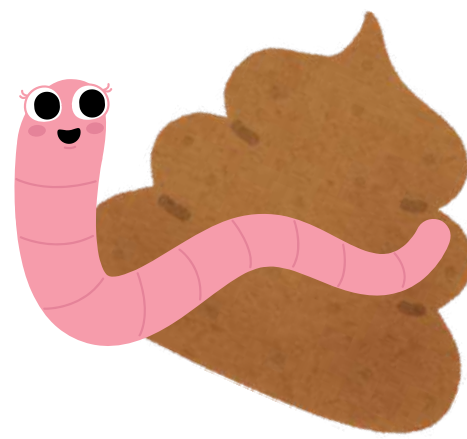
- Do not order an O&P for the diagnosis of Enterobiasis.
- Pin worm prep: use to collect eggs from the perianal skin



References

World Health Organization. Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites. WHO: Geneva, 1994.
Garcia LS, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. Clin Microbiol 2018 Rev 31:10.1128/cmr.00025-17.
Branda JA, et al. A rational approach to the stool ova and parasite examination. Clin Infect Dis. 2006 Apr 1;42(7):972-8.

OVA & PARASITE 检查



Kanyapak Kooburat
Clinical Pathologist, Pathology dept.



常规虫卵及寄生虫检查（O&P）主要通过显微镜观察其形态学特征以鉴定临床标本中的寄生虫，而非采用培养方法、生化试验或依据其生长特性进行检测。

需申请的检验项目取决于所怀疑的感染病原体。下达医嘱的临床医师务必了解 O&P 检查所包含的检验项目及其局限性，因为该检查并不涵盖所有寄生虫。对于微孢子虫 *Microsporidia* 及环孢子虫 / 隐孢子虫属 *Cyclospora* / *Cystoisospora* / *Cryptosporidium* 等病原体，可能需要另外申请特殊染色；此外，某些特定病原体的免疫分析检测亦可能不包含在 O&P 项目中。

患者准备

- 应在接受钡剂用于放射学检查之前完成相关准备。
- 含有不透光、乳白色钡剂悬液的粪便标本不可接受，且在摄入钡剂后的 5–10 天内，肠道原虫可能因其影响而被遮盖，导致无法检出。
- 蓖麻油或矿物油、铋剂、抗生素（包括抗疟药物）以及不可吸收的止泻制剂均可能干扰寄生虫检查。因此，标本采集应在上述药物或物质使用后延迟 5–10 天，以确保其在肠道中被清除，不影响检验结果。



最佳检验时间

对于可运动的原虫滋养体（如阿米巴、鞭毛虫、纤毛虫），必须使用新鲜粪便标本进行检查。

- **稀便**（液状粪便）：应在排出后 30 分钟内完成检查（不是指送达实验室后），以减少滋养体的破坏。
- **半成形或软便**：应在排出后 1 小时内检查，此类标本通常可同时发现包囊与滋养体。
- **成形粪便**：应在排出后 24 小时内完成检查，此类标本主要含有包囊。



延迟处理标本时的注意事项

将粪便标本储存在 4–8°C 条件下，可在一定时间内保持寄生虫的存活性，其持续时间因寄生虫所处的生活阶段而异。

- 溶组织阿米巴（*E. histolytica*）滋养体可存活 1–3 天
- 包囊（cysts）约可存活 4 周
- 蠕虫卵（helminth eggs）在 3–5°C 储存时可保持活性长达 1 个月。

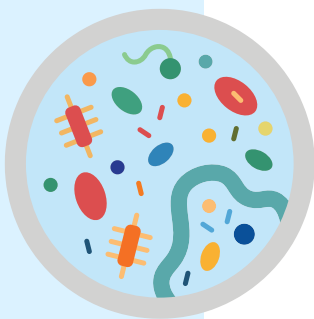
须知事项

建议在排除寄生虫感染之前，应检查多个粪便标本。

许多寄生虫，特别是肠道原虫，在粪便中的数量常呈不稳定分布。临床医师应了解：单一样本中检出具有临床意义寄生虫的概率可能仅 50–60%，但若进行 3 次 O&P 检查，检出率可提高至 >95%。

直接湿片检查

- 将少量新鲜、未固定的粪便与生理盐水混合后，置于载玻片并加盖玻片制备湿片，以用于观察可运动的原虫滋养体。
- 在湿片中亦可观察到蠕虫卵、原虫包囊以及环孢子虫 (Cyclospora), 隐孢子虫属 (Cystoisospora), 隐孢子虫 (Cryptosporidium) 的卵囊。
- 需要注意的是：使用固定或保存过的标本无法观察到原虫的运动性。

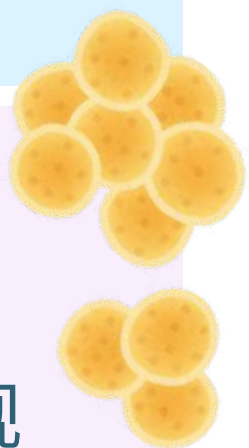
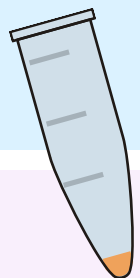


浓缩法

粪便浓缩是完整 O&P 检查中的常规步骤，可帮助检出在直接湿片中可能被遗漏的少量寄生虫。
浓缩方法分为两大类：

1. 沉淀法 (Sedimentation; FEA)
通过离心使寄生虫沉降，可在有或无碘染液情况下进行镜检。
2. 漂浮法 (Flotation; 硫酸锌法)
利用高比重溶液使寄生虫漂浮于表面以便收集和观察。

两种方法均可用于浓缩：蠕虫卵与幼虫, 原虫包囊, 环孢子虫 / 隐孢子虫属 / 隐孢子虫的卵囊, 微孢子虫孢子 (microsporidial spores)



检验方法

寄生虫学实验室中最常进行的检测为完整的虫卵及寄生虫检查 (O&P)。

- 直接检查：通过观察标本外观和物理特征可获得初步信息。部分蠕虫可直接在粪便标本中看到，并可取出以供进一步鉴定。
- 显微镜检查：直接湿片 (Direct Wet-Mount Preparation), 浓缩法 (Concentration Procedures), 常规永久染色涂片, (Routine Permanent-Stain Smears)
- 改良三色染色 (Modified Trichrome Stain)
- 铁苏木素染色 (Iron-Hematoxylin)

其他特殊方法适用于环孢子虫

(Cyclospora)、隐孢子虫属 (Cystoisospora)、隐孢子虫 (Cryptosporidium), 包括：特殊染色 (Special Stains), 改良抗酸染色 (Modified Acid-Fast Staining), 隐孢子虫与环孢子虫的浓缩法 (Concentration Techniques), 番红染色 (Safranin Staining), 隐孢子虫荧光抗体染色 (DFA Assay), Chromotrope 2R 改良三色染色。



改良三色染色

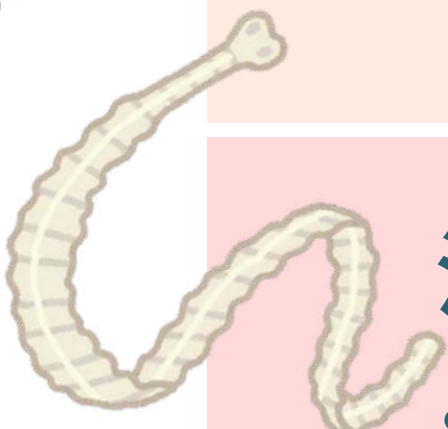
此染色方法操作简便，可用于检测原虫的滋养体与包囊。其染色后呈现的色彩对比鲜明，有助于更容易区分寄生虫结构与伪影。

铁苏木素染色

- 最常使用的两种方法为 Spencer-Monroe 法与 Tompkins-Miller 法。
- 该染色法适用于大多数肠道原虫的检出。
- 染色后的标本呈灰蓝色调，结构对比良好。
- 此外，铁苏木素染色可用于已保存 (固定) 之标本。

注意事项

- 不得使用 O&P 检查来诊断蛲虫病 (Enterobiasis)。
- 蛲虫采样 (Pinworm prep)：用于从肛周皮肤采集蛲虫卵。



References
World Health Organization. Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites. WHO: Geneva, 1994.
Garcia LS, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. Clin Microbiol 2018 Rev 31:10.1128/cmr.00025-17.
Branda JA, et al. A rational approach to the stool ova and parasite examination. Clin Infect Dis. 2006 Apr 1;42(7):972-8.