

PARASITOLOGI: MANUAL AMALI & ATLAS

Anuar Md. Zain

Hakcipta/Copyright
Fakulti Perubatan dan Sains Kesihatan
Universiti Sultan Zainal Abidin – UniSZA
(dahulunya dikenali sebagai Universiti Darul Iman Malaysia – UDM)

Cetakan Pertama: 2009
Cetakan Kedua: 2011

Fakulti Perubatan dan Sains Kesihatan
Universiti Sultan Zainal Abidin (UniSZA)
Kampus Kota
Jalan Sultan Mahmud
20400 Kuala Terengganu
Terengganu Darul Iman
Tel: 09-6275668
Fax: 09-6275583
E-mel: fpsk@unisza.edu.my
Laman Web: www.fpsk.unisza.edu.my

KANDUNGAN

1.	Prakata	3
2.	Pengenalan	4
3.	Keselamatan Makmal	5
4.	Penyelenggaraan Mikroskop	10
5.	Pengumpulan & Pemprosesan Spesimen Parasit	17
6.	MANUAL AMALI PARASITOLOGI	
6.1	Pengenalan Makmal Parasitologi	21
6.2	Amali Protozoa I (Ameba)	36
6.3	Amali Protozoa II (Flagelat)	37
6.4	Amali Protozoa III (Apikompleksa)	38
6.5	Amali Malaria	39
6.6	Amali Sestoda (Cacing Pita)	58
6.7	Amali Trematoda (Fluk)	61
6.8	Amali Nematoda (Cacing Bulat)	63
6.9	Amali Entomologi Nyamuk	65
7.	Rujukan	67

1. PRAKATA

Tujuan utama buku panduan (manual) amali dan atlas parasitologi ini dihasilkan adalah untuk memberi panduan kepada para pelajar jurusan Diploma Teknologi Makmal Perubatan, Universiti Sultan Zainal Abidin (UniSZA) yang mempelajari bidang Parasitologi dan bakal menjadi Juruteknologi Makmal Perubatan yang akan bertugas di mana-mana makmal di hospital seluruh Malaysia. Buku dan atlas ini juga boleh digunakan oleh pelajar lain di Fakulti Perubatan dan Sains Kesihatan yang mengambil subjek Parasitologi.

Buku panduan ini terbahagi kepada dua bahagian utama iaitu Panduan (Manual) Amali Parasitologi dan juga Atlas Parasitologi.

Panduan (Manual) Amali yang disediakan merangkumi dari aspek keselamatan dan prosedur makmal di mana penyediaan spesimen parasit dari pelbagai sediaan dititikberatkan.

Manakala Atlas parasitologi mengandungi lebih 100 fotomikrograf dan gambar-gambar mengenai parasit yang penting kepada kesihatan manusia dimana setiap satu telah dijelaskan sumbernya.

Diharapkan para pelajar mendapat manfaat yang berguna dari buku Panduan (Manual) Amali dan Atlas ini di dalam pemahaman dan persiapan dalam kerja amali dan kerjaya kelak.

ANUAR MD. ZAIN

Pensyarah Parasitologi

Program Diploma Teknologi Makmal Perubatan

2. PENGENALAN

Terdapat lebih 70 spesies parasit yang berlainan, yang terdiri daripada dua kumpulan utama iaitu Protozoa dan Helminth, yang boleh dijumpai di mana – mana bahagian tubuh manusia.

Parasitosis berpunca daripada dedahan kepada satu atau lebih parasit yang mana sumbernya berpunca daripada: 1) air atau tanah yang terkontaminasi; 2) makanan yang mengandungi peringkat infektif parasit; 3) daripada serangga penghisap darah manusia; 4) daripada haiwan-haiwan domestic (belaan) atau liar; 5) jangkitan parasit yang berpindah dari satu manusia ke manusia yang lain, samada melalui sentuhan, batuk, selsema, berkongsi katil dan persekitaran yang terkontaminasi.

Amalan kerja makmal parasitologi yang kompeten dan efektif bergantung kepada: 1) penghantaran spesimen; 2) kemudahan makmal yang berkualiti dan selamat termasuklah kemahiran penggunaan mikroskop; 3) latihan berterusan kepada Juruteknologi Makmal atau kakitangan yang terlibat dengan analisa spesimen Parasit didalam mengenalpasti spesimen parasit makmal; 4) kakitangan makmal yang terlatih terhadap keselamatan dan perlindungan diri daripada spesimen tinja, cecair badan dan apa-apa bahan patogenik.

Spesimen yang paling kerap diterima di makmal parasitologi untuk pemeriksaan dan identifikasi ialah daripada spesimen tinja ('stool') dan darah, walaupun spesimen lain turut terlibat seperti swab anus, urin, aspirat, abses atau spesimen peparu, spesimen pembedahan dan biopsy turut dihantar untuk identifikasi parasit.

Ketepatan diagnosis dan identifikasi parasit amat penting di dalam menjamin kesihatan dan keselamatan pesakit yang terlibat.

3. KESELAMATAN & PERATURAN MAKMAL

3.1 BAHAN KIMIA

Terdapat berbagai-bagai jenis bahan kimia berbahaya yang sering digunakan dalam makmal pada masa ini. Antaranya, ada yang mudah terbakar, mengkakis, beracun mudah meletup dan kesan-kesan lain yang mempunyai gabungan bahaya tersebut di atas. Pelajar-pelajar hendaklah membasuh tangan selepas menjalankan eksperimen yang melibatkan bahan kimia.

Jika pipet digunakan untuk mengukur isipadu larutan bahan kimia, pengisi pipet hendaklah digunakan untuk menyedut keluar larutan. Jangan sedut dengan mulut.

Mesti berhati-hati serta cermat bila menggunakan bahan-bahan berikut:

3.1.1 Pepejal Mudah Terbakar

Logam natrium dan kalium hendaklah disimpan terendam sepenuhnya dalam minyak (Kerosin atau minyak tanah) dan terletak jauh daripada larutan berair. Fosforus kuning mestilah disimpan terendam sepenuhnya dalam air dan jangan dibiarkan menjadi kering. Penyimpanan ketiga-tiga bahan ini hendaklah diperiksa selalu untuk menentukan bahawa ia terendam sepenuhnya dalam cecair. (Penggunaan fosforus kuning tidak digalakkan di sekolah).

Bahan pengoksida yang kuat (misalnya klorat, perklorat, nitrat, mengganat, peroksida, asid nitrik) mestilah disimpan berjauhan daripada bahan-bahan yang mudah teroksida.

Jadual 1 menunjukkan beberapa pepejal mudah terbakar disertai dengan kesan bahaya dan kaedah penyimpanan masing-masing.

3.1.2 Cecair Mudah Terbakar

Cecair mudah terbakar yang banyak seperti yang terdapat dalam botol “Winchester” hendaklah disimpan pada aras terbawah dalam almari. Almari ini harus mempunyai tubir untuk mencegah cecair mengalir keluar daripada botol yang pecah. Cecair ini haruslah disimpan dalam bekas dan hendaklah terhindar daripada bara api dan sumber elektrik kerana wap daripadanya boleh menyebabkan letupan.

Cecair tersebut mesti dipanaskan dengan menggunakan kukus air. Jauhkan cecair mudah terbakar daripada sebarang sumber nyalaan.

3.1.3 Bahan Kimia Mengkakis

Contoh bahan-bahan kimia bersifat mengkakis adalah asid-asid pekat seperti asid nitrik, asid hidroklorik, asid sulfurik, asid etanoik, asid metanoik, ammonia pekat, hidrogen peroksida pekat, metanol, fenol, cecair bromin, kalium manganat (VII) dan argentum nitrat.

Elakkan anggota badan daripada tersentuh bahan-bahan tersebut. Pengendalian bahan kimia ini hendaklah dilakukan dalam kebuk wasap dengan memakai cermin mata keselamatan serta sarung tangan keselamatan.

Sekiranya sebahagian badan terkena bahan kimia mengkakis, bahagian tersebut hendaklah segera dibilas dengan air yang berlebihan.

Selalunya, jika amali melibatkan bahan kimia mengkakis dengan bahan organik, kuantiti yang kecil sahaja digunakan.

3.1.4 Bahan Kimia Beracun

Eksperimen dengan gas beracun mesti dilakukan dalam kebuk wasap. Gunakan pipet untuk menyedut keluar cecair yang beracun.

Seseorang yang menggunakan bahan kimia beracun mesti memakai cermin mata keselamatan dan sarung tangan keselamatan getah. Selepas eksperimen, tangan hendaklah dibasuh.

Jika mata atau kulit terkena bahan kimia beracun, cuci segera dengan air yang banyak. Sebagai langkah susulan rawatan Pegawai perubatan hendaklah didapati.

(A) Langkah Keselamatan

Bahan-bahan kimia yang berikut mempunyai kesan yang boleh memudaratkan. Oleh itu langkah keselamatan mesti diberi perhatian.

- (i) ANILINA mudah menyerap ke dalam kulit.
- (ii) BENZENA jika dihidu sedikit-sedikit selama tempoh masa yang agak lama, boleh menjadi racun. Ia juga boleh menyerap ke dalam kulit. Jika boleh ia mestilah digantikan dengan bahan yang kurang beraacun misalnya toluena atau xilena.
- (iii) WAP BROMIN adalah merbahaya kepada mata, hidung dan paru-paru. Ia juga membahaya bila bersentuhan dengan kulit.
- (iv) KARBON DISULFIDA boleh menyerap ke dalam kulit dan wapnya sangat beracun. Ia sangat mudah terbakar dan mempunyai takat suhu nyalaan yang rendah.
- (v) WAP KARBON TETRAKLOARIDA (tetraklorometana) adalah beracun dan boleh menyerap ke dalam kulit.
- (vi) KLOOROFORM (Triklometana) adalah beracun dan boleh menyerap ke dalam kulit.
- (vii) HIDROGEN SULFIDA sama beracun seperti hidrogen sianida, tetapi ia bukanlah racun yang menokok. Ia mesti digunakan hanya dalam kebuk wasap sahaja.
- (viii) MERKURI mesti dipanaskan hanya di dalam kebuk wasap tetapi lebih baik lagi jika tidak dipanaskan langsung. Wapnya ADALAH SANGAT merbahaya.
- (ix) SULFUR DIOKSIDA adalah beracun.

(B) Peraturan Penyimpanan

Penyimpanan bahan kimia hendaklah mengikut peraturan-peraturan berikut:

- (i) Semua botol reagen bahan kimia mestilah dilebel dengan jelas dan lebel itu hendaklah diperiksa dari semasa ke semasa.

Bagi-bahan kimia yang beracun dan berbahaya simbol-simbol tertentu digunakan.

- (ii) Bahan kimia tidak sepatutnya disimpan dalam makmal tetapi mestilah disimpan dalam stor bahan kimia yang mempunyai peredaran udara yang baik. Rak menyimpan bahan ini mestilah bertubir untuk mengelakkan botol daripada jatuh.

- (iii) Cecair meruap dan lain-lain cecair yang berbahaya hendaklah disimpan dalam tempat khas yang kalis api.

(iv) Bahan kimia yang beracun hendaklah disimpan dalam almari yang berkunci di dalam stor. Penggunaannya mestilah direkodkan.

(iv) Di dalam makmal tidak digalakkan menyimpan cecair yang lebih daripada 500cm³. Bahan kimia lama yang tidak boleh digunakan lagi merupakan sumber yang akan mendatangkan bahaya (misalnya letupan). Ia mestilah dirawat mengikut cara yang betul.

3.1.5 Amalan Keselamatan Bagi tumpahan bahan Kimia

Sebarang tumpahan bahan kimia adalah berbahaya, kerana ia menyebabkan kebakaran, kemalangan dan mengeluarkan wasap toksik.

(i) Bahan pepejal kering : Bahan ini disapu, dikumpul dan dimasukkan dalam bekas sisa buangan yang sesuai.

(ii) Larutan (Asid) : Tumpahan larutan asid hendaklah dengan air berlebihan.

Pepejal Natrium Hidrogen Karbonat atau laarutannya boleh digunakan untuk meneutralkan saki baki tumpahan asid dan kemudiannya dicuci dengan air.

Peringatan : Apabila air disiram ke atas tumpahan asid sulfik pekat, dengan tujuan untuk membersihkannya, haba terhasil dan asid akan terpercik. Siram dengan air yang banyak untuk mencairkan asid dan ini akan mengurangkan hasilan haba serta percikan asid itu.

i) larutan Alkali : Tumpahan larutan alkali hendaklah disiram dengan air berlebihan terus ke dalam longkang.

Peringatan: Larutan alkali akan menyebabkan lantai menjadi licin. Tabur pasir ke atas tumpahan tersebut dan bersihkan.

i) **Bahan berminyak**

Tumpahan minyak hendaklah dilap dengan kain dan terus dibuang. Mop kawasan tumpahan dengan sabun dan air dan lap hingga kering.

ii) **Pelarut mudah Meruap** : Tumpahan pelarut mudah meruap akan meruap dengan cepat. Tumpahan ini mungkin menyebabkan kebakaran, letupan, atau sesak nafas. Kaedah pembersihan adalah seperti berikut:

(a) Jika tumpahan itu sedikit, lapkan dengan kain dan buangkan kain tersebut

ke dalam bekas sisa buangan yang sesuai.

Dan

b) Tumpahan yang banyak dimop sehingga kering (Lakukan seperti kaedah di atas (i).

iii) **Merkuri:**

Tumpahahn merkuri merupakan punca biasa wap merkuri dalam udara makmal . Jika merkuri tertumpah pastikan tingkap, pintu dibuka supaya terdapat peredaran udara yang cukup. Jika tumpahan yang berlaku adalah sedikit, litup merkuri dengan serbuk sulfur. Penguntip merkuri boleh digunakan untuk mengutip merkuri yang banyak.

* Peringatan: Pakai sarung tangan getah keselamat semasa membersihkan sabarang tumpahan.

3.1.6 Pelupusan

Satu senarai bahan kimia yang beracun dan kaedah rawatan atau pelupusan yang sepadan baginya hendaklah diadakan dalam makmal. Pelupusan bahan-bahan kimia toksik hendaklah terlebih dahuludirujuk kepada jabatan kimia, Kementerian Sains, Teknologi dan Alam Sekitar unatuk mendapatkan khimat nasihat.

3.2 Peraturan Makmal

- No food or drink allowed in the lab.
- Students are responsible for leaving their workstations clean and orderly for the next lab section. Students should keep in accordance of observation of lab safety and cleanliness. Please leave the lab, as it was when you entered. Points are accumulated per individual, but a whole group can be penalized for their group member's misconduct.
- A student may leave the lab after completing all work and checking out with his/her lab instructor.
- All cell phones must be turned off during class.
- You will participate in class activities and discussions, but not dominate any discussion or activity, nor will you negatively impact your colleague's participation. Negative participation will be dealt with immediately and in private.
- You will be prepared to participate in class by having read the assigned readings, and completed any assigned tasks before the class meeting.
- Quizzes and exams must be taken when scheduled.

4. PENYELENGGARAAN MIKROSKOP

4.1 Proper Use of the Microscope

4.1.1 Illumination

1. Condenser should always be racked up as high as it will go.
2. BRIGHTNESS is controlled by (not all microscopes have all features):
 - a. varying voltage to lamp by adjusting rheostat
 - b. neutral-density filter over illuminator
 - c. adjusting illuminator iris diaphragm
3. CONTRAST is controlled by adjusting condenser iris diaphragm
4. Centering condenser.
 - a. For microscope with iris diaphragm on illuminator:
 - i. focus on a specimen with 10X objective
 - ii. close diaphragm almost completely
 - iii. focus spot of light by slightly lowering condenser
 - iv. if necessary, adjust centering screws (two knurled rods), which protrude from condenser assembly, until the spot of light is centered in the field of view
 - v. open the illuminator diaphragm until the light just in the field
 - b. For microscopes with no iris diaphragm on illuminator:
 - i. focus on a specimen with 10X objective
 - ii. remove an eyepiece (pull straight out)
 - iii. look down tube and close condenser iris diaphragm until a small spot of light is seen surrounded by black
 - iv. center bright spot as above

4.1.2 Focusing

1. Use coarse adjustment first, then fine adjustment (the fine adjustment may have a limited range of travel in some instruments).
2. Oil immersion objective:
 - a. If objectives are parfocal, focus at lower power, put drop of oil on slide, swing oil immersion objective into position, and adjust focus carefully with fine adjustment.
 - b. If objectives are not parfocal:
 - i. view objective from the side

- ii. place drop of oil on specimen
 - iii. lower oil imm. objective with coarse adjustment until its tip just touches the slide. Note the direction the focusing knob was turning!
 - iv. looking into the microscope, turn the coarse focusing knob in the opposite direction slowly until the specimen comes into focus. Adjust, if necessary, with the fine-focus knob.
- 3. To make objective parfocal:
 - a. adjust screw on each objective (expensive models)
 - b. if no adjusting screws on your instrument, use shims between each objective and turret (available from microscope supplier & usually cheap)
- 4. If you find it impossible to focus on a specimen:
 - a. coverslip may be too thick (usually only a problem with oil immersion)
 - b. slide may be upside down
 - c. oculars not matched (binocular microscopes)

4.1.3 Tips for eyeglass wearers

- 1. install rubber guards over eyepieces to prevent scratching
- 2. trade in your eyepieces for "high eyepoint" ones ("exit pupil" further away from end of eyepiece)

4.1.4 Cleaning

- 1. Locating dust specks (assuming that slide is clean):
 - a. if specks disappear when condenser is moved, then dust is on illuminator bulb or filter
 - b. if specks disappear while focusing, then dust is on condenser
 - c. if neither of the above manipulations works, then:
 - i. rotate eyepiece(s) - specks will rotate as well if dust is on them
 - ii. rotate objective - ditto above
- 2. Removing dirt and film from lens surfaces:
 - a. try using a special brush or air jet first (blower/brushes available at photo stores)
 - b. wipe, using lens paper, after breathing on surface
 - c. if necessary, use some alcohol - xylene is the last resort! (solvents may attack lens mounting cements)
 - d. immersion oil should always be removed from objective soon after use by wiping with lens tissue - no solvents should be necessary

4.1.5 Measuring objects under the microscope

The purchase of an ocular micrometer is highly recommended for parasitology work. It is relatively cheap and easy to install. It must be calibrated before it can be used; this procedure is simple and is described below:

4.1.6 Calibration of the ocular scale

Calibrating a ocular scale in a microscope is simply a matter of converting an arbitrary measure (ocular micrometer units) to a standard unit of measure (microns).

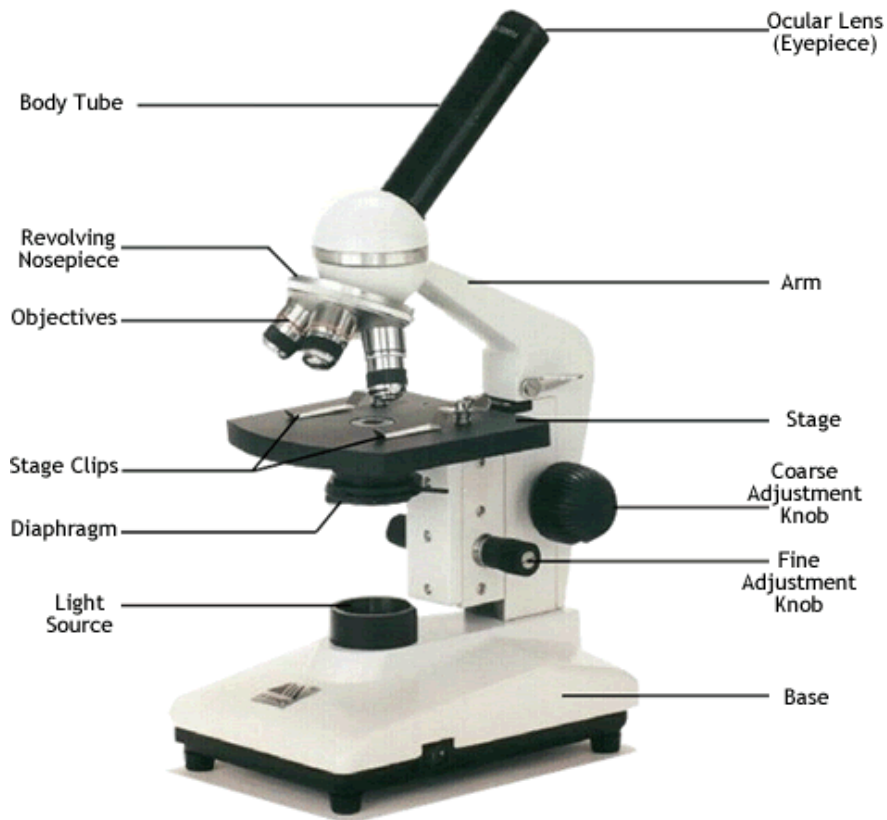
Place a stage micrometer on the microscope stage and focus on the scale using reduced illumination. Notice that the scale has large divisions which are 0.1 mm or 100 microns in length. At one end of the scale, two of the 0.1 mm divisions are each divided into 10 smaller divisions each measuring 0.01 mm (10 microns).

1. Superimpose the ocular scale over the micrometer scale so that the zero point of each scale will coincide.
2. Count the total number of divisions from the 0 of the ocular to one of the numbers near the end of the ocular where it exactly coincides with one of the lines on the stage. Record both numbers.
3. Divide the stage measurements in microns by the ocular units to obtain the number of microns/ocular unit.
4. Repeat the measurement twice to ensure that you have made no errors.
5. Carry out the same procedure for each of the objectives on your microscope. It is not necessary to use oil with the oil immersion objective in this instance.
6. Prepare a chart converting ocular units (at the left) to microns (at the right) for each of the microscope objectives.

4.2 Langkah-Langkah Memelihara Mikroskop

- 4.2.1 Untuk tujuan pindah memindah, mikroskop haruslah diangkat atau dibawa dengan memegang lengan mikroskop dengan satu tangan dan meletakan satu tangan lagi di bawah mikroskop.
- 4.2.2 Hanya tisu kanta sahaja digunakan bagi tujuan pembersihan kanta-kanta mikroskop. Bahan-bahan lain seperti tisu dan kain, jika digunakan mungkin akan mencalarakan kanta dan juga meninggalkan serabut dan serbuk halus di atas kanta.
- 4.2.3 Tapak jari dilarang digunakan untuk mengelap sebarang kekotoran atau debu dari permukaan kanta. Perbuatan ini mungkin akan menyebabkan minyak atau gris (yang terdapat di atas jari kita) melekat di atas permukaan kanta tersebut dan seterusnya dan mengurangkan kualiti imej.

- 4.2.4 Setiap kali mikroskop digunakan, fokuskan spesimen dengan kanta objektif bermagnifikasi rendah (4x dan 10x) dahulu sebelum menggunakan kanta objektif bermagnifikasi tinggi (40x dan 100x). Jika kanta objektif 40x dan 100x digunakan, jangan menggunakan pemutar fokus kasar untuk tujuan pemfokusan. Perbuatan ini mungkin dengan tidak sengaja mengakibatkan kanta objektif (40x dan 100x) menyentuk atau memecahkan sisip kaca slid. Selain dari kerosakkan pada spesimen, kerosakan pada kanta objektif juga boleh berlaku.
- 4.2.5 Jangan menggunakan sebarang minyak rendaman terlekat pada permukaan kanta objektif. Ini akan menghasilkan imej yang kabur. Jika minyak itu menjadi kering di atas kanta objektif, ia sangat susah untuk di hilangkan melainkan dengan menggunakan xylene.
- 4.2.6 Pastikan pentas mikroskop sentiasa dalam keadaan bersih. Jika terdapat sebarang tumpahan di atas pentas, perlulah di bersihkan dengan segera. Tumpahan-tumpahan seperti Canada Balsam, dan minyak rendaman perlulah dibersihkan dengan segera supaya tidak menjadi kering di atas pentas. Xylene boleh digunakan untuk tujuan pembersihan bahan- bahan ini.
- 4.2.7 Jangan biarkan lubang kanta objektif atau tiub kanta mata dalam keadaan terbuka. Langkah ini adalah untuk tujuan mengelakkan dari debu dan lain-lain kekotoran masuk ke dalam mikroskop. Jika keadaan tertutup sentiasa di jaga, bahagian kanta di sebelah dalam mikroskop tidak perlu pembersihan. Sekiranya lubang pemasangan objektif itu lebih dari bilangan objektif yang ada, lubang -2 yang terdedah itu perlu ditutup dengan penutup plastik yang selalunya dibekalkan bersama-sama dengan mikroskop.
- 4.2.8 Selepas digunakan mikroskop haruslah di simpan di dalam peti atau almari yang di buat khas untuk mikroskop. Langkah ini ialah untuk memastikan kanta-kanta dan cermin-cermin tidak di selaputi debu dan kekotoran. Jika tidak ada tempat tertutup, sekurang-kurangnya mikroskop itu ditutup dengan penutup plastik dengan kemas.



4.3 Pembersihan Kanta-Kanta

Bahan yang di perlukan:

- a) Kertas tisu kanta
- b) Alat peniup (seperti yang digunakan untuk kamera)
- c) Berus lukisan yang lembut dan bersih.
- d) Pelarut:
 - i) Xylene
 - ii) 7:3 (eter : alkohol) atau
 - iii) 1-3% Alc dalam air/ (dan diikuti dengan pembersihan menggunakan alkohol mutlak (*absolute alcohol*) sebanyak 3 kali.
 - iv) Kayu nipis yang lembut (berbentuk lidi) (sila lihat gambarajah)

- * Gunakan berus lukisan dan alat peniup untuk menanggalkan debu pada permukaan kanta.
- * Sediakan tisu kanta dengan membalutkan kertas tisu itu pada kayu nipis yang lembut tadi.
- * Bernafaslah ke dalam kanta supaya terdapat wap air diatas permukaan kanta.
- * Kemudian lapkan kantan dengan tisu kanta yang disediakan tadi. Mulakan gerakan mengelap dari pusat (tengah) kanta dan semakin keluar (seperti bulatan yang semakin membesar).
- * Tiupkan (dengan alat peniup) ke atas permukaan kanta beberapa kali untuk menanggalkan sebarang serabut tisu di atas permukaan kanta.

NOTA:

Dalam banyak keadaan langkah-langkah 1-5 adalah mencukupi, tetapi langkah-langkah 6-8 harus dilakukan jika pembersihan tambahan diperlukan.

- * Sediakan satu lagi kertas tisu kanta (langkah 2) sentuh hujungnya dengan sedikit pelarut (Xylene, eter/alkohol), kemudian lakukan pembersihan.
- * Gunakan tisu yang baru (atau bahagian tisu yang baru) setiap kali pengelapan dilakukan. Pelarut perlulah digunakan dengan berhati-hati, semasa pengelapan dilakukan, pastikan kayu tidak terlonjak keluar dari tisu dan menyentuh kanta. Jika Alkohol digunakan untuk pembersihan, selepas itu perlu dibilas dengan alkohol mutlak sebanyak 3 kali.
- * Tiupkan (dengan alat peniup) atas permukaan kanta beberapa kali.
- * Kanta harus dipasang balik dan diperiksa. Jika kekotoran masih ada, lakukan pembersihan sekali lagi.

PERINGATAN:

1. Untuk pembersihan biasa, gunakan hanya wap nafas, iaitu dengan bernafas ke dalam kanta, diikuti dengan pengelapan tisu kanta. Pelarut-pelarut hanya digunakan jika kekotoran tidak dapat ditanggalkan dengan cara wap nafas tadi.
2. Dalam kebanyakan kanta objektif dan kantamata, kanta-kantanya dipasang atau dilekatkan dengan sejenis simen dan balsam. Jadi semasa pembersihan dengan pelarut-pelarut seperti alkohol, eter dan xylene, ianya perlu dilakukan dengan berhati-hati supaya pelarut-pelarut ini tidak terkena simen atau balsam terlalu lama dan melonggarkan kedudukan kanta-kanta (satu kanta objektif biasa jenis akromat mungkin mempunyai sehingga 15 kanta yang mana mempunyai kedudukan yang

tertentu). Jika tisu yang mengandungi pelarut terkena sempadam kanta(kawasan simen), tisu itu mungkin (atau bahagian tisu) tidak seharusnya digunakan lagi. Satu amalan yang baik untuk mengelakkan pebggunaan tisu lebih dari sekali.

3. Semasa pembersihan kantamata(yang biasanya mengandungi 2 set kanta), kanta-kanta mestilah dipastikan supaya tidak tersalah pasang. Amalan yang baik ialah unutk mengeluarkan dan memasang balik kanta-kanta itu satu demi satu.

5. PENGUMPULAN & PEMROSESAN SPESIMEN PARASIT

5.1 Pewarna & Reagen

5.1.1 Larutan Saline

- Sediakan reagen saline dengan menggunakan air suling, air ternyahion atau air terdidih bertapis.
- Masukkan larutan saline ke dalam botol bertutup (bagi elakkan kontaminasi).
- Lakukan pemeriksaan rutin untuk memastikan larutan saline adalah bebas daripada kontaminasi. Titiskan satu titik larutan saline ke atas slaid dan perhatikan di bawah mikroskop (10x dan 40x). Larutan saline yang bebas kontaminasi akan memberikan warna cerah tanpa eksudat.

5.1.2 Dobell's Iodine

Prinsip: Digunakan bagi mengenalpasti sista daripada spesimen tinja.

- Simpan reagen/larutan iodine Dobell didalam botol amber; sekiranya perlu balutkan botol amber tersebut dengan aluminium bagi elakkan degradasi iodine.
- Periksa larutan iodine dengan menggunakan spesimen sista *Iodamoeba buetschlii*.

5.1.3 Reagen Penimbal (Buffered Reagents)

Prinsip: Larutan penimbal adalah penting bagi teknik penyediaan spesimen parasit.

- Sediakan larutan penimbal dengan berhati-hati. Timbang bahan kimia dengan tepat dan pastikan nilai pH yang dikehendaki dipatuhi.
- Simpankan larutan penimbal pada suhu 2 - 8°C dan bertutup. Apabila hendak digunakan, elakkan daripada terdedah kepada cahaya matahari (boleh menggalakkan penumbuhan alga hijau di dalam botol penimbal). Periksa sekiranya terkontaminasi.

5.1.4 Pewarnaan Giemsa

Prinsip: Digunakan terutamanya untuk pewarnaan identifikasi malaria, trypanosome, leishmania dan microfilaria sahaja.

- Gunakan hanya larutan pewarna Giemsa yang telah mengikut piawai pewarnaan bagi malaria, leishmania, trypanosome, dan microfilaria sahaja.
- Simpan larutan stok didalam botol gelap/amber dan elakkan pelembapan berlaku. Untuk kegunaan rutin, guna hanya amaun yang dikehendaki sahaja.
- Bagi penyediaan kawalan (control), filem darah nipis dan tebal hendaklah disediakan dari darah pesakit yang baru, keringkan, lipatkan kedalam kertas, dan simpan di dalam penyejuk pada suhu -20°C.

5.1.5 Pewarnaan Field (Field's stain) – sila rujuk 6.5 Manual Malaria

5.1.6 Metanol

Prinsip: Metanol digunakan sebagai larutan fiksatif bagi penyediaan filem darah nipis (untuk pewarnaan Giemsa) dan juga bagi pewarnaan Romanosky.

- Pastikan larutan methanol yang digunakan adalah larutan baru (jangan gunakan 70% kerana kandungan air di dalam methanol boleh merosakkan sediaan filem darah).
- Elakkan pelembapan berlaku di dalam botol berisi methanol.

- Pastikan botol methanol ditutup kemas. Gunakan hanya amaun yang dikehendaki sahaja setiap kali sesi amali.

5.2 Pengawetan & Penyediaan Pelekap Slaid

5.2.1 Prinsip

Pengawetan spesimen parasit dan penyediaan pelekapan kekal ('permanent mounts') adalah diperlukan untuk:

- * Bagi tujuan ujian kawalan dan untuk latihan/pembelajaran
- * Penghantaran spesimen ke makmal lain untuk pemeriksaan/identifikasi lanjut
- * ketika spesimen dikumpulkan di lapangan

NOTA: Terdapat 2 kaedah pengawetan/penyediaan pelekapan kekal iaitu bagi spesimen kering (Dry Specimens) dan juga spesimen basah (Wet Specimens).

5.2.2 Pelekapan Kekal

5.2.2.1 Spesimen Kering ('Dry Specimens')

Pelekap slaid yang sesuai bagi spesimen malaria, trypanosoma, microfilaria dan leishmania ialah seperti pelekap DPX, HystoMount atau Permount.

- Titiskan bahan pelekap ke atas filem bebas minyak atau lakukan sebaran ('smear') terus ke atas slaid spesimen.
- Biarkan slaid mongering.
- Tanggalkan bahan pelekap yang berlebihan daripada slaid yang telah kering.
- Pelekapan slaid yang baik boleh mengekalkan spesimen sehingga 7 – 10 tahun.

6

MANUAL AMALI PARASITOLOGI

6.1 PENGENALAN MAKMAL PARASITOLOGI

6.1.1 PENGENALAN

Makmal ini merupakan tempat untuk para pelajar diperkenalkan teknik – teknik yang digunakan oleh Teknologis Makmal Perubatan untuk mengenalpasti telur, sista dan larva parasit di dalam tinja manusia atau haiwan. Kebolehpayaan pelajar untuk menggunakan mikroskop adalah sangat penting dan ini membantu di dalam pengenalpastian parasit di dalam makmal parasitologi.

OBJEKTIF AMALI

- Mempelajari dan memahami teknik 'passive fecal floatation'.
- Mempelajari dan memahami teknik 'centrifugational fecal floatation'.
- Mempelajari dan memahami kaedah penyediaan slaid 'wet mount'.
- Mempelajari dan memahami kaedah pemeriksaan slaid daripada penyediaan – penyediaan di atas.
- Menjelaskan pelbagai teknik pemeriksaan tinja (feses) yang sesuai dan tepat bergantung kepada permasalahan.
- Menjelaskan bagaimana spesimen dikumpul dan diproses untuk ujian parasitologi dan juga masa (jangkamasa) ulang ujian bagi pemeriksaan tinja ('fecal repeat exams').
- Mengenalpasti dan menjelaskan ciri – ciri umum parasit berdasarkan subkingdom, filum dan genera dan lain – lain perbandingannya.

6.1.2 Collection and Processing of Samples for Parasitology

Feces

Collection

- Ideally, feces should be processed as soon after passage from the animal as possible.
- Feces should be collected in airtight containers to prevent desiccation.
- If the processing of a fecal specimen must be delayed, it may be:
 - refrigerated (but not frozen) for several days (not recommended for samples with live larvae that you intend to examine using the Baermann technique).
 - fixed, e.g., 10% formalin (5% formalin-saline is better for protozoal cysts). Add fixative to feces at a ratio 3:1 (v:v) and mix well. (Not for Baermann technique.)
- If an animal has been treated with anti-diarrhea preparations containing bismuth or kaolin, mineral oil, oral contrast material (barium) for radiology (all of these materials float) or antibiotics, then parasites may be difficult or impossible to find. Therefore, repeat the fecal exam 5-10 days after treatment withdrawal.

Processing

- First, examine the feces for blood and other clinical signs, then examine the inside of container for tapeworm segments (which are motile and may move away from the fecal mass).
- Many techniques have been devised to increase the likelihood that parasites will be detected in a particular sample of feces. The merits and limitations of representative fecal processing techniques are summarized in the table on the next page. Step-by-step directions for performing the various methods are on the following pages.

Repeat Fecal Exams are suggested in the following situations:

1. Clinical signs suggest parasitism, but initial fecal exam was negative. Repeat in 2 or 3 days. Repeat for a total of 3 times within 7 to 10 days, if no parasites are seen it is likely the animal is not infected.
2. Following specific therapy of a parasitic infection, have owner submit a fecal specimen 2 weeks following the last administration of drug. (This is late enough that all eggs and cysts will have been cleared from the gut, but , for most parasites, too early for re-infection to be showing up.)

6.1.3 Saturated Salt Floatation

Method

- A small amount of feces (a pea to grape size, about 1 gram) is mixed with about 10 ml of floatation medium and poured into a tube so that the liquid comes just over the top of the tube. The mixture is allowed to sit for about 15 min while the eggs float to the top and the rest of the fecal matter sinks to the bottom. A cover slip can be placed on the top of the tube before the incubation period starts or can be applied at the end. The cover slip is then transferred to a microscope slide.
- Commercial devices have a sieve incorporated into the tube to keep large particles from floating up and sticking to the coverslip. See image below of some commonly available commercial fecal devices.



USES: This method will recover most nematode eggs and protozoan cysts, however many trematode and cestode eggs, as well as Giardia cysts will not be recovered.

Specific Gravity of Some Helminth Eggs as Determined Using Sucrose Density Gradient Centrifugation*

Species	Mean Specific Gravity	Range
<i>Ancylostoma caninum</i>	1.0559	1.0549 - 1.0573
<i>Toxocara canis</i>	1.0900	1.0791 - 1.0910
<i>Toxocara cati</i>	1.1005	1.1004 - 1.1006
<i>Taenia</i> sp.	1.2251	1.2244 - 1.2257
<i>Physaloptera</i> sp.	1.2376	1.2372 - 1.2380
ZnSO ₄ Solution	1.18	
Saturated salt or sugar	1.20	

*from David and Lindquist, 1982. J. Parasitology 68:916-919.

6.1.4 Zinc Sulfate Centrifugal Flotation

Methods:

- Fill a 15 ml centrifuge tube with ZnSO₄ solution (1.18 specific gravity) and pour into a glass dish.
- Using a tongue depressor, push the feces (2 to 3 grams, a piece the size of a grape) through the strainer into the ZnSO₄ solution in the dish.
- Using a funnel, pour the ZnSO₄-fecal mixture back into the centrifuge tube.
- Centrifuge for 2 min at high speed (1500 - 2000 rpm).
- Using a headed-rod or loop, remove a sample from the surface of the solution and place on a microscope slide.*
- Add a drop of iodine solution (to stain the cysts and ova) and a coverslip.
- Examine at 10X. .



*Note You may have to take several samples with the rod or loop to get enough material to examine, you want the equivalent of a large drop on the slide.)

6.1.5 Ethyl Acetate Sedimentation Method

1. Pass a grape-sized piece of feces through a sieve into about 9 ml of water and pour into a 15 ml centrifuge tube.

2. Add about 3 ml of ethyl acetate, plug the tube with a rubber stopper and shake the tube vigorously.

CAUTION: Test materials before placing Ethyl Acetate into them. This solvent will dissolve many types of plastic!! The white plastic centrifuge tubes (polypropylene) used in the lab are OK, but clear hard plastic tubes and the disposable polystyrene cups will dissolve.

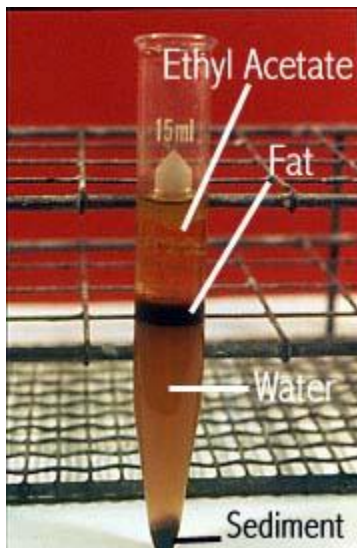
3. Remove the rubber stopper and centrifuge the tube (1500-2500 rpm) for 1 to 2 minutes.

4. Using a stick, "ring" the plug of fat at the water - ethyl acetate interface (the plug adheres to the side of the tube and must be detached before the liquid contents of the tube can be poured off).

5. Pour off the supernatant, being careful to leave the pellet at the bottom of the tube intact. (Flush the ethyl acetate down the sink with plenty of water.)

6. Transfer some of the sediment from the bottom of the tube to a slide and examine. The sediment can be transferred in several ways: 1) If some liquid remains, the pellet can be resuspended and a drop transferred with a pipette. 2) Add a drop of iodine to the pellet to resuspend it and then transfer with a pipette. 3) Use a stick to remove some of the pellet and smear it on a slide as you would when making a direct smear.

Note: For this technique to be as sensitive as a flotation method, you must examine the entire pellet!



NOTE: When removed from centrifuge, your tube will have clearly defined layers:

1. **ethyl acetate** layer on top
2. plug of dissolved **fat** in the middle
3. layer of **water** below fat
4. pellet of **sediment** on bottom

USES: Used when the feces contain a large amount of fat (which make use of a flotation method difficult) or when you are specifically looking for trematode or cestode eggs.

Helpful tips

1. The sieve must be in the liquid in order for the feces to be passed through.
2. The more feces you use, the more likely you will be able to find eggs which are present in low numbers.
3. To increase the sensitivity: After removing the tube from the centrifuge, fill the tube with ZnSO_4 to just over the top of the tube, place a coverslip over the top of the tube and wait 5 to 10 min. Place a drop of iodine on a slide and place the coverslip onto the drop of iodine and examine at 10X. This modification also allows you to skip using the loop or headed rod to obtain your sample, and thus may be easier to do at a veterinary practice.
4. If the sample contains a large amount of fat or other material that floats in water, you may want to wash the sample before doing the flotation. To do this, start at step 1 but use water instead of ZnSO_4 . When you centrifuge the water-fecal mixture the eggs, being heavier than water, will sink but the fat and other material will float. After centrifugation pour off the supernatant, add the ZnSO_4 solution and mix well. Centrifuge as in step 4 and examine as in step 5.

Preparation of ZnSO_4

Add 386 grams of ZnSO_4 to 1 liter of water. The mixture should be checked with a hydrometer and adjusted to 1.18 sp. Gr. The ZnSO_4 solution should be stored tightly capped to prevent evaporation (and the resulting change in the specific gravity of the solution).

Preparation of Iodine Solution

Add 10 gms Potassium Iodide (KI) to 1 liter of distilled H_2O . Shake to dissolve. Add 10 gms of Iodine (I_2) to the above solution. Allow to stand overnight with stirring, at this time you may still have Iodine crystals at the bottom, this is OK, just leave them there. This solution will stain (and kill) most parasite eggs and cysts (coccidial oocysts are an exception, they do not take in the iodine).

Because formalin fixed eggs and cysts may not float (they may now have a specific gravity of greater than 1.2) this technique is preferred for formalin fixed samples.

TIP: If you did this technique just to remove fat, you can resuspend the pellet in flotation solution, centrifuge, and remove the material from the top of the float to examine for eggs.

6.1.6 Direct Smear Fecal Exam

1. Place a small amount of feces on a microscope slide.
2. Add a drop of liquid to the feces and mix thoroughly. The type of liquid added depends on what you hope to accomplish with the technique. If you are examining a liquid fecal sample for the presence of protozoan trophozoites (live active protozoa) then use saline (if any extra liquid is needed). If you are looking for helminth eggs and protozoan cysts in a small sample (bird droppings, rectal smear, etc) then either water or iodine may be used.
3. Cover with a cover slip. Move the cover slip around until it lays flat. You should be able to read through the smear (light from the microscope must be able to pass through the sample in order for you to examine it).
4. Examine the slide using the 10X objective, and then go over it with the 40X objective.

NOTE: Because this technique examines only a very small amount of feces, it should only be used in the following circumstances:

- Liquid feces where protozoan trophozoites may be present.*
- Fecal samples where the amount of feces obtained is too small to handle with any other technique.*
- As an adjunct to a flotation technique where you are looking for eggs that do not float. (In this case you probably would be better off running an ethyl acetate sedimentation and examining the resultant pellet using the direct smear method.)

*These circumstances occur frequently when dealing with small fish, birds, amphibians and reptiles and, thus, the direct smear has some utility in dealing with fecal samples from these animals.

6.1.7 Baermannization

In 1917, while working in Java, the Dutch physician Dr. Baermann developed a simple method for isolating nematodes from soil. Today veterinarians use his method for the extraction of live larval stages of nematode parasites from the feces.

1. Place a sieve in a custard dish or other similar container.
2. Spread about 10 grams of fresh feces on a piece of tissue paper and place it into the sieve.

Note: Since you are looking for live larvae, anything which is done to the feces that might kill the larvae should be avoided (i.e. don't let it dry out, don't put it into formalin, don't freeze it, and even keeping it in a refrigerator overnight may impair the larvae's motility).

3. Place warm water* in the custard dish until it just covers the feces, taking care not to disrupt the feces.
4. Allow to sit for about one hour**.
5. Lift off sieve and pour liquid into a 50 ml centrifuge tube.
6. Let sit for 20 minutes.
7. Using a Pasteur pipet, remove a drop of the sediment at the bottom of the tube and place it on a microscope slide for examination. (Be careful not to resuspend the sediment before you take a sample from it.)



Traditional Baermann set-up



Clinical Baermann set-up

USES: This technique is used to recover larval nematodes for identification. Larval nematodes are normally not numerous in feces and therefore not seen on a direct smear or sedimentation. They are also damaged by flotation solutions, making identification difficult to detect them. This technique makes use of two characteristics of parasitic larval nematode behavior:

1. *The warmer it is the more active the larva (up to a point: 37 to 40°C is as warm as you want to get. You don't want to cook them!). Also, some nematode larvae are thermotaxic and will move toward the warmer water in the funnel (the surface cools quicker than the middle of the funnel).
2. Most parasitic larval nematodes are poor swimmers.

Therefore, the following events take place when the sieve is placed in the water: The larvae will be moving around in a random fashion and within any given time interval some of them will migrate through the tissue and fall into the water. Because they can't swim, they sink to the bottom and over time a number accumulate there. The more active (or themotaxic) the larvae are (i.e. the warmer the water) the greater the number of larvae that will accumulate at the bottom in a given time interval.

**The longer you wait the more larvae will fall to the bottom of the dish, but with time the fecal sample also breaks down, leading to an accumulation of sediment along with the larvae.

6.1.8 Stoll Egg Counting Technique

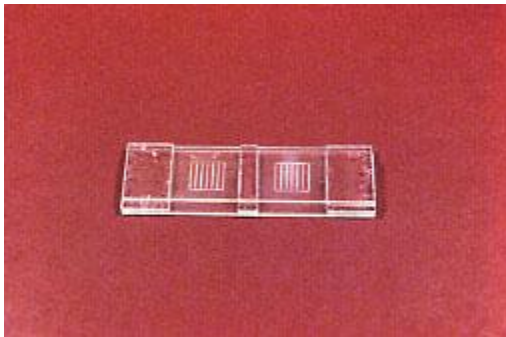
A method for determining the number of nematode eggs per gram of feces in order to estimate the worm burden in an animal. The advantage of this technique is that it requires no specialized equipment, the disadvantage is the counting takes a long time because of the amount of extra (non-egg) material on the slides.

1. Weigh out 3 grams of feces.
2. Measure out 42 ml of water and place it into a dish. Using a tongue depressor, push the 3 grams of feces through a sieve into the water. Lift the sieve and hold over the dish. Push out any remaining water from the feces.
3. While stirring the water-feces mixture, take 0.15 ml of the suspension and spread over 2 slides. Cover each slide with a long coverslip (or 2 regular size coverslips).
4. Examine both slides for worm eggs, the total number of eggs counted X 100 represents the number of eggs per gram of feces.
5. Since 0.15 ml is $\frac{1}{300}$ of 45 ml (42 ml water and 3 gm feces) then the number of eggs in 0.15 ml X 100 is equal to $\frac{1}{3}$ of the total number of eggs in the original 3 grams and thus equal to eggs per gram (**EPG**).

6.1.9 McMaster Egg Counting Technique

Another method for determining the number of nematode eggs per gram of feces in order to estimate the worm burden in an animal. The advantage of this method is it is quick as the eggs are floated free of debris before counting, the disadvantage is you must use a special counting chamber.

1. Weigh out 2 grams of feces.
2. Pass the feces through a sieve into a dish containing 60 ml of ZnSO_4 or saturated salt solution. Lift the sieve and hold over the dish. Push out any remaining solution from the feces.
3. While mixing vigorously (you may want to put the solution into a flask to prevent spillage) take a sample of the mixture with a pipette and transfer it to one of the chambers of the McMaster slide. Repeat the procedure and fill the other chamber.



Counts done before and after anthelmintic treatment allow you to monitor for drug-resistance. Counts done between scheduled treatments allow you to monitor the worm load and thus allow you to change the treatment schedule if necessary.

4. Wait 30 sec then count the total number of eggs under both of the etched areas on the slide. Focus first on the etched lines of the grid, then go down a tiny bit, the eggs will be floating just below the top of the chamber. Multiply the total number of eggs in the 2 chambers by 100, this is the eggs per gram (EPG).
5. The volume under the etched area of each chamber is 0.15 ml (the etched area is 1 cm X 1 cm and the chamber is 0.15 cm deep) so the volume examined is 0.3 ml. This is 1/200 of 60 ml. Since you started with 2 gms of feces and then multiplied by 100, the final result is **eggs per gram** of feces.

NOTE: Since McMaster slides are often difficult to find, these listings are being given as a service to those looking for a source for them. This should not be taken as an endorsement by the University of Pennsylvania.

If you want to have one of these slides made for you, here are the particulars: They are usually made of Glass or Plexiglass: 2 pieces (2.5 cm by 7.5 cm) with 2 etched boxes (1 cm by 1 cm) on the under side of the top piece. Some people make

the bottom piece a little wider than the top piece to make it easier to load. The etched boxes usually have 5 additional etched lines (subdividing the box into 6 sections) to make counting easier. The etched lines should be as thin as possible so eggs are not hidden under them. The 2 pieces are separated by pieces (0.15 cm thick) placed at both edges and in the center between the etched boxes. (see photo above).

6.1.10 Modified Wisconsin Sugar Flotation Method

This method of determining the EPG is probably the most commonly used method. First used by the University of Wisconsin's Parasitology Laboratory, it is a modification of the Stoll technique. It is the most accurate as it counts all the eggs in 3 grams of feces and, because it is a flotation method, it has little debris to interfere with the count. However, if the EPG is high, there may be too many eggs to count.

1. Fill a 15 ml test tube with 10 ml of Sheather's solution.
2. Weigh 3 grams of feces and place into a cup.
3. Pour the Sheather's solution from the test tube into the cup and mix well.
4. Place a funnel into the test tube, place a strainer into the funnel and pour the fecal-sugar solution mixture through the strainer into the test tube. Using a tongue depressor, squeeze the liquid out of the feces that is left in the strainer.
5. Centrifuge the tube for 2 to 4 minutes.
6. Fill the tube to just over the top with Sheather's solution and place a cover slip onto the meniscus.
7. Let sit for about 5 minutes, then remove the cover slip and place on a slide.
8. Examine the entire cover slip and count the number of eggs that you find.
9. The number of eggs counted is the number per 3 grams of feces, so divide by 3 to find the EPG.

Sheather's Solution Preparation: Add 454 gm (1 lb) of table sugar to 355 ml of very hot water. Stir until dissolved and allow to cool. This solution will grow mold if left out, so keep refrigerated and use quickly.

6.1.11 Blood Parasite Examination (can refer to 6.5 Manual Malaria)

Blood is collected for two basic parasitological procedures:

1. Smears - to detect protozoal and rickettsial infections (e.g., *Trypanosoma*, *Babesia*, *Anaplasma*). Smears must be fixed and stained to reveal organisms.
2. Concentration - to detect microfilaria (i.e., *Dirofilaria* and *Dipetalonema*).

NOTE: If blood is not to be processed immediately upon removal from the patient, an anticoagulant must be added to the sample. Among those commonly used include Heparin (effect lasts only for a matter of hours) and EDTA (effect lasts several days).

1. Blood Smear Procedure (thin films):

1. Clean slide by wiping with alcohol. Handle slides by edges only. (Any grease on the slide will cause the dried blood to flake off during staining).
2. Place a very small drop of blood near the end of a slide.
3. Place the end of another slide (the "spreader") on the sample slide so that the edge of the spreader is just ahead of the drop of blood.
4. Holding the spreader at an angle of about 30 degrees (relative to the sample slide), draw it back until its edge just touches the drop of blood. The blood will then run along the entire edge of the spreader slide.
5. Push the spreader briskly in one fluid motion completely across the sample slide. Note that the blood is being dragged behind the spreader, not pushed in front of it.
6. If the correct amount of blood was applied, the smear should end before the end of the slide, and the smear should end in a "feathered edge" a region where the blood cells are well separated.
7. Air dry slide.
8. Fixation and staining - various methods can be used. Normally a commercial staining kit is utilized following the manufacturer's instructions.

2. Procedures for concentration of blood:

A. Modified Knott Method

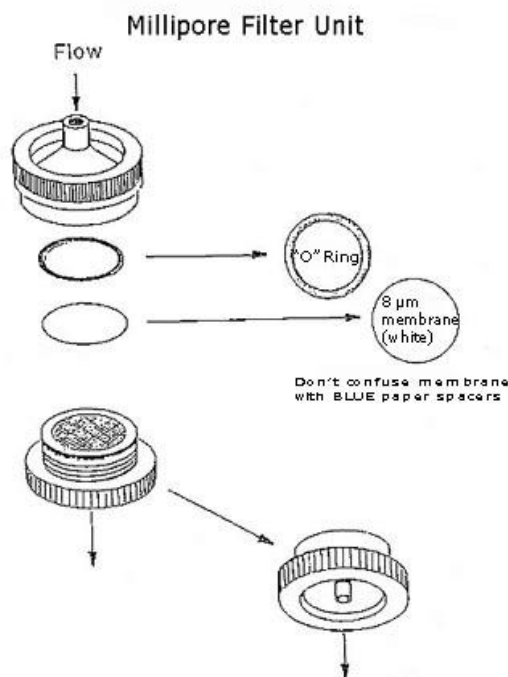
1. Add 1 ml freshly-drawn blood to 9 ml 2% formalin (aqueous) in a centrifuge tube.
2. Mix well to lyse red blood cells.
3. Centrifuge for 5 minutes at 1500 rpm.
4. Pour off supernatant fluid. Note: Invert the tube completely when decanting the supernatant. Remember, the blood sample you are using is dilute so you won't see a large pellet.

5. Add a drop of 0.1% aqueous methylene blue. (Adjust the amount to suit yourself; it stains the microfilariae blue and makes them much easier to see.) Then stir or mix up the sediment in the bottom of the tube.
6. Mix again and place a drop of the stained mixture on a microscope slide and add a cover slip.
7. Examine slide under a microscope.

NOTE: As a further modification, a microfilaria count can be made if a measured amount of the stained mixture is counted. Although it is only a generality, *D. immitis* microfilaraemias are often characterized by having high concentrations of microfilariae, whereas *D. reconditum* microfilariae are often found in low concentrations.

B. Filtration Method

1. Collect a 1 ml blood sample into EDTA or heparin and add to 10 ml lysing solution within a syringe. Mix thoroughly. (Lysing solution consists of 5.0 ml Triton X-100, 8.0 grams NaCO₃, 1 liter water.)
2. Attach syringe to a filter unit (see diagram). The lysed blood solution is pushed through an 8 m pore filter membrane.
3. Remove the filter from the filter holder, place it on a microscope slide and add one drop of 1:10,000 Methylene Blue Stain. Cover filter with a cover glass and examine under microscope.



6.1.12 Miscellaneous

It is frequently difficult to distinguish microfilariae of *D. immitis* from microfilariae of *D. reconditum* using the morphologic characteristics outlined above. More definitive techniques for differentiation are available, but they are not usually practical for routine use in the practitioner's laboratory.

The first technique employs a histochemical (acid phosphatase) stain of microfilariae. *D. immitis* stain positive in certain zones only and *D. reconditum* stain over the entire microfilariae. See J. Am. Vet. Med. Assoc. 158:601-605, 1971 or consult a parasitologist.

The second technique exploits the fact that *D. reconditum* microfilariae have a cephalic hook and *D. immitis* microfilariae do not. Again, since this technique requires good microscopic capability, it may not be suited for routine use. See Proceedings Helminthol. Society of Washington 32(1):15-20, 1965, or Georgi's Parasitology for Veterinarians or consult a parasitologist.

Microfilariae of:	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Dipetalonema reconditum</i>
Numbers	May exceed $2 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$	Usually $< 10^3 \text{ ml}^{-1}$
Length	> 300 microns	< 300 microns
Width	6.7 - 6.9 microns	4.7 - 5.8 microns
Anterior End	slightly tapered (cone on a cylinder)	blunt (hemisphere on a cylinder)
Posterior End	straight (usually; may vary)	hooked (usually; may vary)

6.2 AMALI PROTOZOA I (AMEBA)

6.2.1 PENGENALAN

Ameba merupakan salah satu pengkelasan terbesar yang tergolong di dalam filum Protozoa (Kelas Sarcomastigophora). Ameba merupakan penyumbang utama kepada penyakit infeksi parasit yang juga dikenali sebagai 'Amoebiasis'. Setiap tahun, kira – kira hampir 100,000 manusia mati akibat jangkitan invasif amoebiasis. Namun begitu, di negara tropika termasuk Malaysia hanya sebilangan sahaja yang menjadi penyebab jangkitan patogenik.

6.2.2 OBJEKTIF AMALI:

Para pelajar perlu:

- Mengenalpasti peringkat sista, trofozoit dan kitaran hidup *Entamoeba spp.*
- Membanding sista dan trofozoit bagi *Entamoeba spp.*
- Melukis dan melabel sista dan trofozoit *Entamoeba spp.*
- Mengenalpasti sista dan trofozoit *Iodamoeba buetschlii* melalui kehadiran vakoul iodine (termasuk kitaran hidup).
- Mengenalpasti parasit dan kitaran hidup *Balantidium coli*.
- Mengenalpasti parasit dan kitaran hidup *Naegleria fowleri*.
- Mengenalpasti parasit dan kitaran hidup *Acanthamoeba spp.*

6.2.3 SUMBER:

- Nota Kuliah & Atlas Parasitologi

6.2.4 PENILAIAN:

Sila jawab semua soalan – soalan amali di dalam ruang jawapan yang disediakan.

6.3 AMALI PROTOZOA II (FLAGELAT)

6.3.1 PENGENALAN

Flagelat merupakan salah satu pengkelasan kedua terbesar yang tergolong di dalam filum Protozoa (Kelas Sarcomastigophora). Kumpulan flagelat ini dikenali kerana mempunyai struktur flagella yang bertindak untuk pergerakan (motility) dan juga mengukuhkan strukturnya semasa berada di dalam badan hos (perumah). Antara parasit flagelat yang ditemui ialah *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma spp.* dan *Leishmania spp.*

6.3.2 OBJEKTIF AMALI:

Para pelajar perlu:

- Mengenalpasti peringkat kitaran hidup dan struktur *Giardia lamblia*.
- Mengenalpasti peringkat kitaran hidup dan struktur *Trichomonas vaginalis*.
- Mengenalpasti peringkat kitaran hidup dan struktur bagi pelbagai jenis *Trypanosoma spp.*
- Mengenalpasti peringkat kitaran hidup dan struktur bagi pelbagai jenis *Leishmania spp.*

6.3.3 SUMBER:

- Nota Kuliah & Atlas Parasitologi

6.3.4 PENILAIAN:

Sila jawab semua soalan – soalan amali di dalam ruang jawapan yang disediakan.

6.4 AMALI PROTOZOA III (APIKOMPLEKSA)

6.4.1 PENGENALAN

Apikompleksa merupakan salah satu pengkelasan ketiga terbesar yang tergolong di dalam filum Protozoa (Kelas Sarcomastigophora). Terdapat tiga order bagi kelas apikompleksa iaitu Coccidia, Piroplasma dan Hemosporidia. Antara parasit yang tergolong di dalam kelas Apikompleksa ialah *Cryptosporidium spp.* dan *Toxoplasma gondii*.

6.4.2 OBJEKTIF AMALI:

Para pelajar perlu:

- Mengenalpasti peringkat kitaran hidup dan struktur *Cryptosporidium spp.*
- Mengenalpasti peringkat kitaran hidup dan struktur *Toxoplasma gondii*.

6.4.3 SUMBER:

- Nota Kuliah & Atlas Parasitologi

6.4.4 PENILAIAN:

Sila jawab semua soalan – soalan amali di dalam ruang jawapan yang disediakan.

6.5 AMALI MALARIA

6.5.1 PENGENALAN

Malaria adalah berasal daripada perkataan *mal aria = bad air*. Parasit malaria tergolong dalam genus *Plasmodium*. Ia memerlukan dua perumah iaitu perumah perantara (manusia) dan perumah definitive (nyamuk *Anopheles* betina). Peringkat perkembangan tanpa seks (skizogoni) berlaku di dalam perumah perantara sementara peringkat perkembangan seks (gametogoni) berlaku di dalam perumah definitf.

Spesies yang menjangkiti manusia terdiri 4 jenis utama dan boleh dibezakan mengikut ciri-ciri berikut:

Plasmodium vivax

- Kitaran tanpa seks = 48 jam
- Kitaran seks = 7 – 16 hari
- Jangkamasa pre patent = 8hari
- Menyerang sel darah merah yang muda.
- Ciri: SDM membesar
- Kehadiran bintil-bintil Schuffber selepas 8-10jam infeksi
- Bentuk cincin (semasa 'ring stages') yang kecil.
- Trofozoit yang sangat ameboid
- Skizon matang mengandungi 14 – 22 merozoit.
- Menyebabkan relapse.

Plasmodium malariae

- Kitaran tanpa seks = 72 jam
- Kitaran sek = 15-30hari
- Jangkamasa pre patent = 11hari
- Menyerang sel darah merah yang tua
- SDM bersaiz normal
- Tiada bintil-bintil
- Bentuk cincin tebal, kromatin bersaiz lebih besar
- Pembentukan 'bands' atau jalur yang merentasi SDM

- Skizon matang mengandung 6-12 merozoit, biasanya tersusun dalam bentuk 'rosette'.
- Boleh menyebabkan 'recrudescence'.

Plasmodium ovale

- Kitaran tanpa seks = 48jam
- Kitaran seks = 9-20hari
- Jangkamasa pre patent = 9hari
- Menyerang SDM yang muda
- SDM membesar dan bahagian permukaannya tidak sekata (terdapat bentuk-bentuk oval).
- Bintil-bintil Schuffner akan kelihatan pada awal jangkitan.
- Bentuk cincin lebih kecil dari *Plasmodium vivax*.
- Peringkat trofozoit kurang ameboid jika dibandingkan dengan *Plasmodium vivax*.
- Purata bilangan bagi merozoit di dalam skizon ialah 8.
- Menyebabkan relapse.

Plasmodium falciparum

- Kitaran tanpa seks = 36-48jam
- Kitaran seks = 15-30hari
- Jangkamasa pre patent = 5 ½ hari
- Menyerang SEMUA peringkat sel darah merah; dengan ini ia boleh menyebabkan jangkitan darah yang serius.
- SDM bersaiz normal
- Tiada bintil Schuffner (Bintil Maurer – lebih besar dan terpisah antara satu sama lain; berwarna kebiruan apabila diwarnakan dengan Giemsa).
- Adalah menjadi kebiasaan penemuan peringkat cincin melebihi daripada 1 dalam SDM yang dijangkiti. (Hanya peringkat cincin dan gametosit sahaja yang biasanya ditemui pada sampel darah periferi).
- Bentuk cincin kecil; kebiasaannya ditemui 2 kromatin pada 1 cincin (terdapat bentuk yang dipanggil 'accolé').
- Gametosit berbentuk 'bulan sabit'.
- Menyebabkan recurrence.

6.5.2 PANDUAN PENDIAGNOSAN MALARIA

Penyediaan Filem Darah Tebal dan Nipis (Slaid yang sama)

Untuk pemeriksaan parasit malaria pada pesakit secara rutin harian, filem darah nipis dan tebal dibuat diatas slaid yang sama. Filem darah nipis digunakan untuk melabel dan juga untuk pengenalan sepsis. Pemeriksaan menyeluruh mestilah dilakukan pada filem darah tebal.

Keperluan-keperluan bagi membuat Filem Darah (Malaria):

- Slaid kaca yang bersih
- Lanset steril (bukan jarum hipodermik atau lanset yang hanya direndam di dalam alcohol).
- 70% alcohol
- Kapas penyerap
- Tuala bersih
- Kotak slaid untuk kegunaan pengawalan semasa proses pengeringan filem darah
- Pensil atau pen
- Boring pendaftaran atau rekod.

Selepas data-data lengkap daripada pesakit direkodkan, filem darah dibuat mengikut kaedah berikut:

1. Pilih jari ketiga (iaitu jari hantu) daripada tangan pesakit. Hujung jari dipicit secara menghala ke atas (bagi bayi, ibu jari kaki boleh digunakan. Jangan sesekali menggunakan ibu jari tangan orang dewasa atau kanak – kanak).

Bersihkan hujung jari daripada kotoran dan minyak dengan kapas yang telah dibasahkan dengan sedikit 70% alcohol.

Keringkan dengan tuala bersih atau kapas. Tekan hujung jari bagi merangsangkan pengaliran darah.

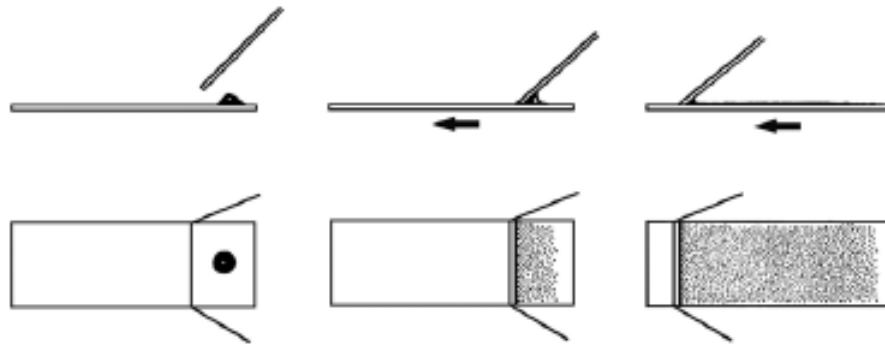
2. Cucuk dibahagian hujung jari dengan lanset steril.

Picit dengan cermat di bahagian hujung jari. Dengan menggunakan kapas yang kering, sapukan darah yang mula-mula keluar. Pastikan tiada benang kapas yang terlekat pada hujung jari tersebut. Ini penting bagi mengelakkannya bercampur dengan darah.

3. Kerja-kerja mestilah dilakukan dengan cermat, cekap dan pantas. Slaid hendaklah dipegang pada kedua-dua sisinya. Ambil sampel sepertimana dijelaskan berikut:

Picit hujung jari dengan cermat, tompok darah yang keluar diambil dengan cara menyentuhkan bahagian tengah permukaan slaid pada tompok darah tersebut. Saiz tompokan adalah seperti yang ditunjukkan di rajah dibawah. Gunakan ia sebagai filem darah nipis.

Mechanics of a thin blood smear



Seterusnya bagi membentuk filem darah tebal, 2 atau 3 tompokan darah yang bersaiz lebih besar sedikit dilekatkan lebih kurang 1cm dari bahagian atas tompokan bagi filem darah nipis.

Bersihkan lebihan darah pada jari pesakit dengan menggunakan kapas yang bersih.

4. Filem Darah Nipis

Pastikan slaid mengandungi tompokan darah yang berada pada keadaan mendatar atau pada permukaan yang sekata. Dengan menggunakan slaid bersih yang lain sebagai 'spreader', sentuhkan garisan hujungnya pada tompok darah dan biarkan ia mengalir. 'Spreader' disendengkan pada kedudukan 45° dan ditolak ke hadapan dengan sekata bagi menghasilkan filem darah nipis.

5. Filem Darah Tebal

Pegang slaid pada kedua-dua bahagian sisi atau pada hujungnya. Ikuti langkah berikut bagi membentuk filem darah tebal.

Dengan menggunakan hujung tepi 'spreader', satukan ketiga-tiga tompok bagi membentuk filem darah tebal yang sekata. Tompokan darah tidak boleh dikacau secara berlebihan (boleh merosakkan SDM) tetapi hanya boleh dilakukan sebanyak 3 hingga 6 kali sahaja. Filem darah tebal biasanya disediakan secara bulatan atau empat persegi bujur.

6. Dengan menggunakan pensil, labelkan filem darah nipis dan tebal dengan nama/rekod pesakit dan tarikh. Bahagian atas iaitu lapisan paling tebal pada filem darah nipis dipilih sebagai kawasan melabel. Jangan sesekali menggunakan pen. Keringkan filem darah nipis dalam keadaan mendatar dan bebas daripada serangga, habuk dan juga haba yang tinggi.
7. Simpan dan lindungi slaidn filem darah didalam kotak slaid dan segera dihantar ke makmal untuk pemeriksaan diagnostic selanjutnya.
8. Slaid yang telah digunakan sebagai spreader boleh digunakan semula dengan membasuh dan merendamkan di dalam larutan 70% alcohol dan keringkan.

6.5.3 MENCUCI DAN MENYIMPAN SLAID MALARIA

1. Mencuci

Bagi penyediaan sampel darah untuk tujuan pemeriksaan mikroskopik, tahap kebersihan slaid yang berkualiti hendaklah dititikberatkan. Kesemua slaid hendaklah dibersihkan dengan teliti dan bebas daripada kesan minyak imersi dan apa-apa kelembapan. Ini akan mengelakkan daripada bendasing yang boleh merosakkan dan mengelirukan dalam proses pengenalan parasit malaria. Jangan menggunakan slaid-slaid yang mempunyai ciri-ciri berikut:

a) Mempunyai kesan kabur dan wap air

b) Slaid yang tidak dibersihkan dengan sempurna samada slaid itu lama atau baharu.

c) Slaid yang mempunyai kesan calar, retak dan tidak rata yang boleh mencederakan pegawai yang akan mendiagnos slaid tersebut.

1.1 Slaid baharu

Adalah penting membersihkan setiap slaid (termasuklah slaid yang kelihatan bersih dan baru dibeli) secara merendamkannya di dalam air yang mengandungi bahan pencuci yang sesuai (penggunaan asid bikromat sebagai bahan pencuci tidak sesuai kerana boleh menjejaskan kualiti filem darah) dan kemudiannya diletakkan pada aliran air paip bersih atau dibilas pada pertukaran air bersih sebelum dikeringkan dengan kain bersih. Setiap slaid hendaklah dilap kering dan digilap dengan kain bersih yang bebas daripada bebenang. Pelajar hendaklah memegang slaid pada bahagian tepi bagi mengelakkan kesan cap jari dan minyak (hati-hati ketika memegang slaid kaca).

1.2 Slaid yang telah digunakan

Adalah disarankan slaid-slaid yang telah digunakan, direndam di dalam larutan pembersih/pencuci. Setelah tempoh rendaman mencukupi, slaid-slaid tadi hendaklah dibersihkan satu persatu dengan menggunakan kain kasa atau kapas sehinggalah tiada kesan-kesan filem darah dan minyak. Pindahkan slaid ke dalam larutan pembersih yang baru, seterusnya pada air yang mengalir atau dibilas pada beberapa pertukaran air bersih sebelum dikeringkan dengan kain bersih. Slaid yang mempunyai sedikit kesan calar dianggap tidak sesuai untuk kegunaan filem darah. Slaid-slaid ini mungkin sesuai untuk kegunaan harian di makmal parasitologi.

2. Penyimpanan Slaid

Slaid-slaid kaca tidak disimpan pada keadaan persekitaran cuaca tropika melebihi beberapa minggu. Jika keadaan ini berlaku, ia boleh menyebabkan slaid melekat antara satu sama lain dan akan mengurangkan kadar ketelusan cahaya akibat daripada pemerangkapan wap air. Sebaiknya slaid-slaid yang telah dibersihkan hendaklah disimpan di tempat yang kering atau di dalam cabinet berhawa panas.

Adalah disarankan slaid yang telah dibersihkan perlu disimpan dengan kertas nipis di dalam bentuk 10 keping bagi setiap bungkusan dan ditampal pelekat atau diikat dengan getah pengikat. Dengan cara ini, ia sudah sedia untuk digunakan. Bagi urusan penghantaran dan pengangkutan ke sesuatu tempat, bungkusan slaid boleh diletakkan dalam kotak kertasnya yang asal atau kotak lain yang sesuai dan dialas dengan kadbod, polysterene atau kapas.

6.5.4 PENYEDIAAN LARUTAN STOK PEWARNA GIEMSA

1. Pengenalan

Didalam pendiagnosan malaria, larutan pewarna Giemsa adalah pewarna piawai yang sesuai digunakan bagi pewarnaan filem darah. Bagaimanapun kualiti pewarna ini samada dalam bentuk larutan yang sedia digunakan atau dalam bentuk serbuk adalah bergantung pada pengeluarannya. Oleh itu anda mestilah menilai tahap kualiti bagi setiap keluarannya dengan menjalankan seberapa banyak ujian pewarnaan ke atas filem darah.

1.1 Formula Pewarna

Serbuk Giemsa	3.8 gm
Methanol	250ml
Glycerol	250ml

1.2 Penyediaan

Botol gelap adalah disyorkan, bagaimanapun jika sekiranya tiada dalam simpanan, botol cerah yang kering dan bersih daripada bahan kimia dan juga botol plastic bersaiz sesuai juga boleh digunakan. Anda juga memerlukan lebih kurang 50 bijian kaca bersaiz 50mm.

- Masukkan bijian kaca ke dalam botol, kemudian tuangkan 250ml Methanol dan diikuti dengan serbuk pewarna (3.8gm).
- Botol hendaklah ditutup rapat. Biarkan serbuk pewarna mendak perlahan-lahan melalui Methanol. Goncangkan perlahan-lahan dalam bentuk pusingan selama 2-3 minit.
- Tambahkan glycerol (250ml) dan ulang proses goncangan. Goncangkan selama 2-3minit bagi setiap 30minit dan lakukannya sehingga 6 kali.
- Biarkan sehingga 2-3hari, goncang 3-4kali setiap hari sehingga lah pewarna ini sebatu. Asingkan sedikit ke dalam botol yang lain untuk kegunaan semasa bagi mengelakkan sebarang kontaminasi ke atas stok pewarna.

Setiap larutan pewarna yang baru disediakan mestilah dilabel dengan baik termasuklah tarikh penyediaannya, diuji pada cairan dan masa pewarnaan optima. Botol mestilah ditutup rapat setiap masa dan disimpan di tempat sejuk dan bebas daripada cahaya matahari. Jika bekas botol yang digunakan adalah dari jenis cerah, ia mestilah dibungkus dengan kertas pembungkus bagi mengelakkan terkena pancaran cahaya.

6.5.5 PENYEDIAAN LARUTAN PENIMBAL BAGI PEWARNAAN MALARIA

Larutan penimbal fosfat pada pembetulan pH 7.2 adalah perlu dalam pewarnaan parasit malaria.

1. Penyediaan larutan untuk kerja-kerja harian
 - 1.1 Larutkan 1.0gm Disodium hydrogen fosfat (Na_2HPO_4) kontang dan 0.7gm potassium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) dalam 1 L air suling.
 - 1.2 Dapatkan nilai pH (ini boleh dilakukan samada dengan menggunakan meter pH atau kertas warna pengukur pH seperti Komparator Lovibond).
 - 1.3 Betulkan pH kepada 7.2. Tambahkan sedikit 2% Na_2HPO_4 bagi meningkatkan bacaan ataupun sedikit 2% KH_2PO_4 bagi menurunkan bacaan kepada 7.2.
 - 1.4 Setelah mendapat keseimbangan bacaan pada pH 7.2 simpan larutan tadi di dalam botol yang ditutup rapat. Botol gelap (amber) adalah disyorkan dan diletakkan di tempat sejuk serta bebas daripada cahaya matahari. Larutan ini boleh bertahan selama beberapa minggu tetapi mestilah diperiksa selalu bagi mengelakkan sebarang pertumbuhan kulat. Ini mungkin boleh dilakukan dengan cara menggoncangnya selalu. Larutan ini tidak sesuai digunakan jika ianya telah keruh atau bertukar warna dan sifat larutan.
2. Penyediaan larutan stok berkepekatan tinggi – sesuai untuk kerja lapangan atau di tempat yang jauh.
 - 2.1 Larutkan 3.0gm Na_2HPO_4 di dalam 25ml air suling atau air ternyahion.
 - 2.2 Dapatkan nilai pH 7.2 seperti yang telah diterangkan pada 1.3 diatas.
 - 2.3 Simpan didalam botol gelap (amber) di tempat yang bebas daripada cahaya matahari. Larutan ini boleh berthana selama beberapa minggu.
 - 2.4 Bagi membentuk larutan kerja, cairkan 1ml larutan stok dengan 20ml air suling atau air ternyahion.
3. Penyediaan dalam bentuk bungkusan yang telah ditimbang

Kedua-dua garam fosfat tersebut (Na_2HPO_4 dan KH_2PO_4) boleh ditimbang dan disimpan bersama di dalam tiub yang mempunyai penutup yang sesuai, botol atau beg plastic yang dibungkus elok dan diletakkan ke dalam jar yang mempunyai penutup skru. Bila kandungan tersebut dilarutkan ke dalam 1 L air, dapatkan nilai pH 7.2, ikutilah langkah biasa dalam tatacara penyediaannya.

6.5.6 TEKNIK PEWARNAAN GIEMSA: KAEDAH BIASA

Filem darah nipis dan tebal pada slaid yang sama.

Untuk pewarnaan yang optima, filem darah nipis dan tebal dibuat pada slaid yang berasingan dengan kadar kepekatan pewarna dan kadar masa yang berbeza. Bagaimanapun lazimnya filem darah nipis dan tebal dibuat pada slaid yang sama. Dengan ini tahap kualiti pewarnaan bagi filem darah tebal tidaklah terlalu dititikberatkan. Pewarnaan yang elok biasanya diperolehi apabila filem darah yang dibuat dikeringkan selama semalaman.

Kaedah bagi 20 keping slaid (atau lebih)

1. Filem darah nipis boleh diawet dengan cara meletakkan ketulan kapas yang telah dilembapkan dengan Methanol atau mencelupkan filem darah itu beberapa saat ke dalam bekas yang mengandungi Methanol. Jangan biarkan slaid terendam terlalu lama di dalam Methanol, boleh menyebabkan kesukaran dalam penelitian bintil-bintil Schuffner dan Maurer. Bagi memastikan atau menentukan proses dehemoglobinisasi berlaku dengan sempurna, filem darah tebal tidak boleh diawet sama sekali. Oleh itu, jangan biarkan methanol atau wapnya terkena pada filem darah tebal tersebut.
2. Susunkan slaid secara berpasangan dengan bahagian belakangnya melekat antara satu sama lain kemudiannya diletakkan di dalam bekas pewarnaan.
3. Sediakan larutan 3% Giemsa di dalam larutan penimbal daripada air suling atau air ternyahion. Larutan ini hendaklah disebatikan dengan sempurna.
4. Tuangkan pewarna sehingga kesemua slaid tenggelam.
5. Biarkan selama 30-45minit di tempat yang bebas daripada cahaya matahari.
6. Dengan perlahan-lahan, tuangkan air bersih ke dalam bekas pewarnaan supaya kekotoran daripada pewarna dapat mengalir keluar tanpa melekat pada slaid. Cara yang lebih mudah ialah dengan merendamkan keseluruhan bekas pewarna ke dalam bekas yang lebih besar yang mengandungi banyak air.
7. Dengan berhati-hati, tuangkan kesemua sekali pewarna yang masih tinggal dan siramkan dengan air bersih. Tuangkan air yang berlebihan.
8. Ceraikan slaid satu persatu dan susunkan pada rak slaid dalam keadaan menegak untuk proses pengeringan. Pastikan filem darah tidak tersentuh dengan rak tersebut.

NOTA: Menguji kesempurnaan pewarnaan pada filem darah tebal

- a) Latarbelakang mestilah bersih, bebas daripada sebarang debris.
- b) Nukleus sel darah putih (WBC) berwarna ungu terang.
- c) Kromatin daripada parasit malaria kelihatan berwarna merah terang sementara sitoplasmanya berwarna biru muda. Di dalam jangkitan *P.vivax* dan *P.ovale*, kehadiran bintil-bintil Schuffner dapat diperhatikan pada permukaan sel darah merah yang terinfeksi.

6.5.7 TEKNIK PEWARNAAN GIEMSA: KAEDAH CEPAT

Ia sesuai bagi keperluan diagnosis cepat ataupun di makmal yang sangat sibuk. Bagaimanapun kaedah ini memerlukan kuantiti pewarna yang lebih banyak.

Kaedah bagi setiap satu slaid

1. Biarkan filem darah tebal mongering dengan sempurna; jika memerlukan keputusan yang lebih cepat, filem darah tebal boleh dikeringkan dengan pengering rambut, kipas angin atau memanaskannya pada lampu mikroskop. Langkah berjaga-jaga mestilah diambil bagi mengelakkan filem darah tebal mengalami awetan-haba. Ini boleh berlaku apabila filem darah itu dibiarkan terlalu panas.
2. Awetkan filem darah nipis dengan methanol untuk beberapa saat.
3. Sediakan larutan 10% Giemsa pada pH 7.2 dalam larutan penimbal daripada air suling; jika kuantiti yang sedikit diperlukan, 3 titik pewarna Giemsa bagi setiap 1ml larutan penimbal akan memberikan kepekatan yang tepat. Setiap satu slaid memerlukan 3ml larutan kerja ('working solution').
4. Pipetkan larutan kerja ke atas slaid. Cara lain ialah dengan menelangkupkan slaid ke atas permukaan larutan kerja, bekas yang digunakan mestilah dapat menakung larutan kerja tersebut.
5. Warnakan selama 5-10 minit.
6. Pewarna dibuang secara menitisikan air bersih ke atas slaid tersebut. Jangan sesekali menuangkan pewarna terlebih dahulu sebelum membasuhnya kerana ini boleh menyebabkan kekotoran *scum* daripada pewarna akan melekat pada filem darah tersebut.
7. Letakkan slaid di atas rak secara menegak untuk membiarkan proses pengeringan. Pastikan filem darah tidak bersentuh dengan dinding rak tersebut.

NOTA: Menilai kesempurnaan pewarnaan filem darah nipis.

- a) Latarbelakang mestilah bersih dan bebas daripada 'debris'; sel darah merah akan diwarnakan dengan warna 'pale greyish pink'.
- b) Nukleus daripada sel darah putih neutrofil berwarna ungu dan granul-granulnya akan kelihatan terang.
- c) Kromatin daripada parasit malaria akan kelihatan merah keunguan terang sementara sitoplasmanya biru keunguan.
- d) Bintil-bintil Schuffner di dalam sel darah merah pada jangkitan *P.vivax* dan *P.ovale* mestilah boleh ditemui, begitu juga dengan bintil-bintil Maurer pada jangkitan *P.falciparum* di peringkat cincin.

6.5.8 KAEDAH PEMBILANGAN PARASIT MALARIA DALAM FILEM DARH TEBAL

Parasit per μl

Berikut adalah kaedah praktikal yang hampir tepat. Ia berdasarkan kepada jumlah parasit per μl di dalam filem darah tebal dan dihubungkan dengan jumlah pembilangan leukosit. Dalam 1 μl darah, terdapat lebih kurang 8000 leukosit dan angka ini digunakan sebagai piawai. Oleh kerana bilangan leukosit di dalam 1 μl darah adalah berbeza di antara satu sama lain dan juga di antara orang yang sihat dengan orang sakit, maka keputusannya masih dipertikaikan.

Sebelum melakukan proses pembilangan 0.5 μl darah (lebih kurang 100 lapangan, dengan menggunakan pembesaran 7x kanta mata dan 100x objektif) hendaklah diperiksa terlebih dahulu bagi memastikan sepsis dan peringkat sepsis parasit yang ada. Bila telah siap, proses pembilangan ke atas slaid yang positif bolehlah dilakukan seperti berikut:

1. Parasit malaria dan leukosit perlu dibilang secara berasingan. Dengan ini dua pembilang diperlukan.
2.
 - a) Apabila jumlah leukosit mencapai angka 200, jumlah parasit ialah 10 atau lebih. Catat ia di dalam boring rekod iaitu jumlah parasit per 200 leukosit.
 - b) Apabila jumlah leukosit mencapai angka 200, jumlah parasit ialah 9 atau kurang, pembilangan parasit hendaklah diteruskan sehinggalah jumlah leukosit mencapai angka 500. Kemudian rekodkan jumlah parasit per 500 leukosit.

3. Pada setiap kes di atas, jumlah parasit per μl darah boleh dikira dengan menggunakan formula pengiraan yang mudah dengan berdasarkan jumlah leukosit yang diperolehi:

$$\frac{\text{Bil parasit}}{\text{WBC}} \times 8000 = \text{parasit per } \mu\text{l}$$

Ini bermakna, jika 200 leukosit yang dikira, maka jumlah parasit akan didarabkan dengan 40 dan jika 500 leukosit yang dikira, maka jumlah parasit akan didarabkan dengan 16.

4. Pada praktis yang biasa digunakan, pengiraan mestilah meliputi setiap sepsis yang ditemui serta peringkat-peringkat seksual dan aseksual. Kadang-kadang peringkat gametosit dibilang secara berasingan. Bagaimanapun jumlahnya mestilah dicampurkan bersama bagi mendapatkan nilai sebenar dalam proses pengiraan parasit. Adalah sukar untuk membezakan peringkat gametosit dalam peringkat aseksual sama ada dari sepsis *P.vivax* ataupun *P.ovale*. Oleh itu, nilai perbandingan gametosit bagi sepsis-spesis ini mungkin kurang tepat.

Sistem Campur

Kaedah yang lebih mudah dalam menggambarkan jumlah parasit di dalam filem darah tebal ialah dengan menggunakan sistem campur. Bilangan parasit dikaitkan dengan jumlah 'campur' iaitu bermula dari satu hingga empat sepertimana yang ditunjukkan di bawah:

+	=	1-10 parasit dalam 100 lapangan
++	=	11 – 100 parasit dalam 100 lapangan
+++	=	1 – 10 parasit dalam 1 lapangan
++++	=	Lebih dari 10 parasit dalam 1 lapangan

NOTA: Sistem di atas adalah berdasarkan pada pemeriksaan filem darah tebal sahaja.

Sistem campur hanya digunakan apabila kaedah pengiraan parasit per μl darah tidak dapat dilakukan.

6.5.9 TEKNIK PEWARNAAN WRIGHT

Stok Pewarna

Serbuk Pewarna Wright	2.7 gm
Methanol	900ml

Larutan Penimbal Fosfat (pH 6.8)

- a) Disodium hydrogen fosfat (Na_2HPO_4) 9.5gm/L
- b) Potassium dihidrogen Orthofosfat (KH_2PO_4) 9.1 gm/L

Untuk menghasilkan larutan penimbal fosfat pH 6.8:

Larutan A (49.2ml) + Larutan B (50.8ml)

6.5.10 TEKNIK PEWARNAAN

Filem Darah Nipis

- a) Banjirkan smear darah nipis dengan pewarna Wright (1bahagian) selama 4 minit.
- b) Tambah larutan penimbal fosfat (1 bahagian) dan sebatikan selama 12 minit.
- c) Bersihkan dengan aliran air pada penjuru slaid bagi mengelakkan scum melekat pada slaid.
- d) Keringkan dan mount dengan DPX.

Filem Darah Tebal

- a) Filem darah hendaklah dinyah-hemoglobin ('dehemoglobinization) terlebih dahulu.
- b) Ikuti langkah-langkah pewarnaan sepertimana pada filem darah nipis di atas.

6.5. 11 TEKNIK PEWARNAAN FIELD

Pewarna A

Methalin Biru	0.8 gm
Azure B	0.5 gm
Disodium fosfat	5.0 gm
Potassium fosfat	6.25 gm
Air Suling	500 ml

Pewarna B

Eosin	1.0 gm
Disodium fosfat	5.0 gm
Potassium fosfat	6.25 gm
Air Suling	500 ml

Kaedah:

Larutkan garam fosfat sebelum serbuk pewarna dimasukkan. Azure B dilarutkan secara 'grinding' dengan sedikit larutan fosfat. Pewarna dibiarkan selama 24 jam sebelum ia sesuai digunakan. Selepas beberapa minggu, pewarna ini tidak sesuai lagi untuk digunakan.

Teknik Pewarnaan Menggunakan Field

Filem Darah Tebal

- a) Pastikan filem darah telah kering, jika tidak ia akan terkeluar semasa proses pewarnaan. Jangan awet dengan Methanol.
- b) Rendamkan slaid dalam pewarna A selama 3 saat.
- c) Bilas dengan air paip selama 3 saat.

- d) Rendamkan slaid ke dalam pewarna B selama 3 saat.
- e) Dengan cermat, bilas dengan air paip hingga tiada lagi lebih pewarna yang tinggal.
- f) Keringkan slaid secara menegak.
- g) Periksa slaid dengan menggunakan minyak imersi ('immersion oil'). Slaid mestilah diperiksa sekurang-kurangnya 100 lapangan sebelum ia dilaporkan NEGATIF.

Kegunaan:

- pada filem darah tebal, jumlah darah yang digunakan adalah lebih banyak. Dengan ini pengesanan parasit malaria pada tahap jangkitan rendah lebih mudah dikesan.
- pemeriksaan parasit malaria hendaklah dijalankan pada filem darah tebal terlebih dahulu. Jika ia didapati negative, adalah amat sukar atau tidak mungkin anda dapat mengesan parasit malaria pada filem darah nipis.
- kawasan yang paling sesuai untuk pemeriksaan ialah pada bahagian pinggiran filem, bagaimanapun sebahagian besar daripada filem tersebut hendaklah diperiksa terlebih dahulu sebelum ianya disahkan negative.
- oleh kerana filem darah tebal tidak diawetkan maka sel darah merah akan mengalami lisis apabila dicelup ke dalam air. Dengan ini, pengenalan sepsis parasit tidak dapat dikenalpasti berdasarkan kepada saiz dan bentuk sel darah merah. Sungguhpun parasit dapat dikesan pada filem darah tebal, pewarnaan filem darah nipis hendaklah dilakukan untuk pengenalan sepsis malaria yang selanjutnya.
- sel darah putih, platelet dan pigmen malaria dapat dilihat pada filem darah tebal.
- jika filem diwarnakan dengan baik, kromatin parasit malaria akan berwarna merah terang dan sitoplasmanya akan berwarna biru muda. Nucleus sel darah putih berwarna ungu dan latarbelakang filem berwarna biru muda.
- filem darah tebal boleh disimpan pada suhu -20°C iaitu dengan cara membungkusnya dengan kertas tisu dan disimpan secara kering serta tidak diawet.

Filem Darah Nipis (Kaedah yang diubahsuai)

- a) Keringkan filem darah nipis pada suhu bilik.
- b) Awetkan di dalam methanol.
- c) banjirkan dengan 1 ml pewarna Field B selama 1 minit (Catatan: Pewarna Field B dicairkan 1:4 dengan larutan penimbal pH 7.2 terlebih dahulu sebelum digunakan).
- d) Tambah 1 ml pewarna Field A dan sebatikan selama 1 minit.
- e) Bilas dengan air paip dan keringkan pada suhu bilik.

Kegunaan: Kaedah ini sangat berguna jika pengenalan sepsis parasit diperlukan dengan SEGERA. Semua peringkat parasit dan juga bintil-bintilnya diwarnakan sekadar untuk pengenalan spesiesnya, bagaimanapun kaedah pewarnaan Giemsa adalah yang terbaik untuk pembezaan sepsis malaria.

6.5.12 KAEDAH PENGKULTURAN MALARIA

Pengenalan:

Pengkulturan parasit malaria secara *in vitro* mula diperkenalkan oleh Trager dan Jensen pada tahun 1976. Sehingga kini, pengkulturan *P.falciparum* adalah yang paling Berjaya walaupun terdapatnya laporan-laporan tentang pengkulturan terhadap spesies lain yang menjangkiti manusia. Geiman dan Meagher (1967) pernah melaporkan mereka melakukan pengkulturan *P.falciparum* secara *in vitro* iaitu dengan menggunakan monyet *Aotus trivirgatus* sebagai perumah kajian parasit malaria.

Dalam proses pengkulturan, sel darah merah digunakan sebagai perumah. Parasit menukarkan hemoglobin kepada globulin dan hematin. Globulin kemudiannya akan dihadamkan oleh enzim proteolitik. Komponen ferum disimpan dalam bentuk hematin dan dikenali sebagai pigmen malaria.

Kejayaan dengan menjalankan kaedah pengkulturan telah banyak membantu dalam informasi dan penemuan biologi terhadap parasit ini.

Keperluan:

a) Flask Kultur

Berukuran 25cm². Sebanyak 3ml media kultur ditambah ke dalam flask dan ini akan memberi bacaan kedalaman sehingga 0.2 – 0.4cm.

b) Media

RPMI 1640. Diubahsuai dengan menambahkan serbuk penimbal Hepes, Sodium bikarbonat dan 10% atau 20% Human Serum.

c) Gas

Campuran gas 5% CO₂, 5% O₂ yang diimbangi dengan gas N₂.

d) Sel Darah Merah

Sebaiknya digunakan SDM yang masih segar dan dari kumpulan O (Rh+ve).

e) Serum

Samada daripada yang dibekukan atau serum penderma dari kumpulan AB.

f) pH

Sesuai pada pH 7.3 hingga 7.5

g) Suhu

Hendaklah selalu dipastikan pada 37.5°C.

Penyediaan Media

a) Media Stok

RPMI 1640	10.4 gm
Hepes	6.0 gm
Air Suling	1 L
Gentamycin	40.0 gm/ml

b) Media Basuhan (washing medium)

Media Stok (Stock Media) 48.4 ml

Sodium bikarbonat 1.6 ml

c) Media Kultur

Media Stok 43.4 ml

Sodium bikarbonat 1.6 ml

Serum / Plasma 5.0 ml

NOTA: Semua media hendaklah ditapis pada penapis yang mempunyai ketelusan 0.22 cm terlebih dahulu sebelum digunakan atau disimpan pada 4°C.

Tatacara:

A. Isolat Segar ('Fresh Isolate')

a) Isolat dicampur dan diempar pada 1500rpm selama 10 minit.

b) Plasma atau supernatant dan juga buffy coat dibuang. Tambahkan media basuhan ('washing media') bagi menguraikan mendakan.

c) Ulangi langkah (b) sebanyak 3 kali.

d) Tambahkan media kultur mengikut isipadu mendakan untuk membentuk 50% suspense.

e) Suspensi di atas perlu dicairkan lagi dengan nisbah 1:5 bagi membentuk 5% suspense.

f) Sedutkan 5 ml daripada 5% suspense di atas dan masukkan ke dalam 25cm² flask media kultur.

g) Dengan kadar tiupan gas yang perlahan, alirkan gas ke dalam flask kultur selama 10 saat dan tutupkan flask dengan cepat.

h) Eramkan flask kultur pada suhu 37.5°C.

i) Selepas 48jam pengeraman, media kultur ditukar dan digantikan dengan media yang segar. Campurkan perlahan-lahan dan seterusnya ulangi langkah (g) dan (h).

B. Isolat yang dibekukan ('Frozen Isolate')

- a) Cairkan isolate dan dengan segera masukkan ke dalam tiub yang mengandungi media basuhan.
- b) Campurkan dan emparkan pada 1500rpm selama 10 minit.
- c) Buang supernatan dan tambahkan media basuhan ('washing media').
- d) Ulang langkah (c) sebanyak 3 kali.
- e) Pada basuhan terakhir, buang semua supernatant, kemudian tambahkan 5 ml 5% suspense sel darah merah normal.
- f) Masukkan 5 ml suspensi di atas ke dalam flask kultur.
- g) Seterusnya ulang langkah (g-i) seperti yang dilakukan pada pengkulturan isolate segar.

Catatan:

Selepas daripada pertukaran media kultur yang pertama, pertukaran media kultur yang seterusnya hendaklah dilakukan selepas 24jam pengeraman. Sedikit bahan kultur diambil dalam jumlah yang mencukupi untuk membuat filem darah dan diwarnakan dengan Giemsa; tujuannya ialah untuk memeriksa tahap pertumbuhan kultur. Apabila tahap parasitemia melebihi 2-3%, sub-kultur hendaklah dilakukan bagi mengelakkan kematian parasit.

6.6 AMALI SESTODA (CACING PITA)

6.6.1 PENGENALAN

Kumpulan helminth atau cacing pita daripada kumpulan platyhelminth ini juga dikenali sebagai sestoda. Ini merupakan parasit cacing yang terpanjang yang menginfeksi sepanjang trek gastrousus manusia. Kebanyakannya infeksi parasit sestoda manusia adalah kerana manusia merupakan perumah definitive bagi parasit ini. Segmen seakan pita atau dikenali 'proglottids' adalah identifikasi utama bagi prosedur pengenalpastian parasit ini. Antara jenis cacing pita yang paling utama ialah *Taenia spp.*, *Echinococcus spp.*, *Hymenolepis spp.* dan *Diphyllobothrium spp.*

6.6.2 OBJEKTIF AMALI

- Lakukan ujian identifikasi parasit bagi perbandingan antara dua jenis cacing *Taenia* yang utama iaitu *Taenia saginata* dan *Taenia solium*.
- Perhatikan struktur sista, kehadiran rostellum, bentuk dan panjang proglotid, juga kedudukan dan bilangan uterus lateral bagi tiap-tiap cacing jenis *Taenia spp.*
 - Lukiskan bentuk sista/cacing dewasa (beserta struktur rostellum, cangkuk dan sebagainya).
 - Catatkan panjang dan lebar sista/cacing dewasa
 - Lukiskan kedudukan dan struktur uterus lateral
 - Lukiskan struktur proglotid

- Lakukan ujian identifikasi bagi sista, bahagian-bahagian dan panjang cacing pita jenis *Echinococcus spp.* Bandingkan bentuk struktur antara cacing *Echinococcus* dan *Taenia*.
 - Lukiskan bentuk sista/cacing dewasa (beserta struktur rostellum, cangkuk dan sebagainya).
 - Catatkan panjang dan lebar sista/cacing dewasa
 - Lukiskan kedudukan dan struktur uterus lateral
 - Lukiskan struktur proglotid

- Lakukan ujian identifikasi bagi sista, bahagian-bahagian dan panjang cacing pita jenis *Hymenolepis spp.* Bandingkan bentuk struktur antara cacing *Hymenolepis* dengan cacing jenis *Taenia* dan *Echinococcus*.
 - Lukiskan bentuk sista/cacing dewasa (beserta struktur rostellum, cangkuk dan sebagainya).
 - Catatkan panjang dan lebar sista/cacing dewasa
 - Lukiskan kedudukan dan struktur uterus lateral
 - Lukiskan struktur proglotid

- Lakukan ujian mikroskopi identifikasi bagi sista, bahagian-bahagian dan panjang cacing jenis *Diphyllobothrium spp.* Bandingkan bentuk struktur antara cacing *Diphyllobothrium* dengan cacing jenis *Taenia spp.*, *Echinococcus spp.* dan *Hymenolepis spp.*
 - Lukiskan bentuk sista/cacing dewasa (beserta struktur rostellum, cangkuk dan sebagainya).
 - Catatkan panjang dan lebar sista/cacing dewasa
 - Lukiskan kedudukan dan struktur uterus lateral
 - Lukiskan struktur proglotid

6.6.3 SUMBER

- Nota Kuliah Sestoda & Atlas Parasitologi

6.6.4 PENILAIAN

Sila jawab semua soalan – soalan amali di dalam ruang jawapan yang disediakan.

6.7 AMALI TREMATODA (FLUK)

6.7.1 PENGENALAN

Kumpulan cacing Trematoda juga dikenali sebagai 'flukes' atau cacing pipih atau cacing daun kerana mempunyai struktur cacing ini kecil, pendek, pipih dan berbentuk seakan struktur daun. Trematoda (berasal daripada Kumpulan Platyhelminth) mempunyai kumpulan cacing yang paling banyak di dalam subkumpulannya.

Terdapat 4 pengelasan utama cacing pipih atau Trematoda ini iaitu Fluk Hati, Fluk Peparu, Fluk Usus dan Fluk Darah.

6.7.2 OBJEKTIF AMALI

- Kelaskan jenis-jenis fluk mengikut Fluk Hati, Fluk Peparu, Fluk Usus dan Fluk Darah. Kenalpasti peringkat-peringkat kitaran hidup cacing pipih iaitu miracidia, sporosista, rediae dan cercariae.
- Bagi kategori Fluk Hati, kenalpasti bentuk/struktur cacing pipih peringkat sista dan dewasa bagi cacing *Fasciola spp.*, *Fasciolopsis spp.* dan *Clonorchis sinensis*.
 - Lukiskan bentuk sista/cacing dewasa
 - Catatkan panjang dan lebar sista/cacing dewasa
- Bagi kategori Fluk Usus, kenalpasti bentuk/struktur cacing pipih peringkat sista dan dewasa bagi cacing *Heterophyes heterophyes* dan *Metagonimus yokogawai*.
 - Lukiskan bentuk sista/cacing dewasa
 - Catatkan panjang dan lebar sista/cacing dewasa

- Bagi kategori Fluk Peparu, kenalpasti bentuk/struktur cacing pipih peringkat sista dan dewasa bagi cacing *Paragonimus westermani*.
 - Lukiskan bentuk sista/cacing dewasa
 - Catatkan panjang dan lebar sista/cacing dewasa

- Bagi kategori Fluk Darah, kenalpasti bentuk/struktur cacing pipih peringkat sista dan dewasa bagi cacing *Schistosoma spp.*
 - Lukiskan bentuk sista/cacing dewasa
 - Catatkan panjang dan lebar sista/cacing dewasa

- Banding sista dan dewasa bagi kesemua jenis fluk yang dibincangkan di atas.

6.7.3 SUMBER

- Nota Kuliah Trematoda dan Atlas Parasitologi

6.7.4 PENILAIAN

Sila jawab semua soalan – soalan amali di dalam ruang jawapan yang disediakan.

6.8 AMALI NEMATODA (CACING BULAT)

6.8.1 PENGENALAN

Cacing Nematoda atau dikenali sebagai kategori cacing bulat/cangkuk merupakan pengkelasan parasit cacing yang terbesar bagi kelas Nematelminth. Saiz terkecil bermula dari sekecil 0.017mm sehingga saiz terbesar kira-kira 80cm. Bentuknya yang unik seakan bulat atau bercangkuk di bahagian hujung dorsalnya merupakan ciri utama bagi cacing ini.

Terbahagi kepada tiga subkategori utama iaitu cacing bulat (*Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichuria* dan *Strongyloides stercoralis*), cacing cangkuk (*Necator americanus* dan *Ancylostoma duodenale*) dan microfilaria (*Wucherichia spp.*, *Brugia spp.*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus*, *Dracunculus medinensis* dan *Trichinella spp.*).

6.8.2 OBJEKTIF AMALI

- Kenalpastikan kategori utama subkelas cacing nematode dan peringkat kitaran hidupnya (rhabditoid larva dan filariform larva).
- Bagi subkelas cacing bulat (*Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichuria* dan *Strongyloides stercoralis*), bandingkan:
 - Lukiskan bentuk sista/cacing dewasa jantan dan betina
 - Catatkan panjang dan lebar sista/cacing dewasa jantan dan betina
 - Catatkan/senaraikan ciri-ciri utama seperti cangkuk, ketebalan badan cacing dewasa, bilangan cangkuk (jika berkaitan).
- Bagi subkelas cacing cangkuk (*Necator americanus* dan *Ancylostoma duodenale*), bandingkan:
 - Lukiskan bentuk sista/cacing dewasa jantan dan betina
 - Catatkan panjang dan lebar sista/cacing dewasa jantan dan betina

- Catat/senaraikan ciri-ciri utama seperti cangkuk, ketebalan badan cacing dewasa, bilangan cangkuk (jika berkaitan).
- Bagi subkelas microfilaria (*Wucherichia spp.*, *Brugia spp.*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus*, *Dracunculus medinensis* dan *Trichinella spp.*), bandingkan:
 - Lukiskan bentuk sista/cacing dewasa jantan dan betina
 - Catat panjang dan lebar sista/cacing dewasa jantan dan betina
 - Catat/senaraikan ciri-ciri utama seperti cangkuk, ketebalan badan cacing dewasa, bilangan cangkuk (jika berkaitan).

6.8.3 SUMBER

- Nota Kuliah Trematoda dan Atlas Parasitologi

6.8.4 PENILAIAN

Sila jawab semua soalan – soalan amali di dalam ruang jawapan yang disediakan.

6.9 AMALI ENTOMOLOGI NYAMUK

6.9.1 PENGENALAN

Entomologi merupakan ilmu mengenai serangga termasuk artropod yang berperanan sebagai penular penyakit atau penyebab penyakit. Tajuk ini diperkenalkan di dalam topic terakhir bagi silibus Parasitologi adalah untuk member pendedahan kepada para pelajar Teknolgi Makmal Perubatan akan kepentingan vector penyebab penyakit berkaitan sebaran nyamuk seperti jangkitan Malaria dan Denggi.

Vektor nyamuk tersebar hampir ke seluruh pelusuk dunia kecuali di Artik dan Antartika. Terdapat hampir 3000 jenis nyamuk di seluruh dunia dan di Malaysia sahaja, terdapat kira-kira 381 spesis dan 20 genera nyamuk.

6.9.2 OBJEKTIF AMALI

- Dalami dan fahami struktur asas nyamuk (kepala, toraks dan abdomen), pengkelasan utama nyamuk dan kitaran hidupnya.
- Bagi pengkelasan *Anopheles*, *Culicinae*, *Aedes*, *Mansonia* dan *Toxorhynchites*, lukis dan bandingkan peringkat:
 - * Telur
 - * Larva
 - * Pupa
 - * Dewasa (pilih satu)

6.9.3 SUMBER

- Nota Kuliah Trematoda dan Atlas Parasitologi

6.9.4 PENILAIAN

Sila jawab semua soalan – soalan amali di dalam ruang jawapan yang disediakan.

7

RUJUKAN

Noor Hayati M.I. (2000) Atlas Berwarna: Parasitologi Perubatan. Nhmikbm Ent. Kuala Lumpur, 1st edi.

Monica C. (2005) Laboratory Practice in Tropical Countries (Part 1 & 2). Cambridge Uni. Press, 2nd ed.
