عنوان دوره های آموزشی

توکسوپلاسموزیس و روش‌های تشخیص آن

بهار ۱۳۹۶

بسم الله الرحمن الرحيم

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

تاریخچه ۱

مقدمه ٤

تاکسونومی ٥

مورفولوژی ٦

۱- تاکی‌زوئیت (Tachyzoite) ۶

۲- کیست کاذب (Pseudo cyst) ۷

۳- کیست نسجی (Tissue cyct) ۷

۴- اووسیست (oocyct) ۸

چرخه حیات ۹

مرحله ایزوسپوریک (داخل روده‌ای) ۱۰

مرحله توکسوپلاسمیک (خارج روده‌ای) ۱۲

بیماریزایی توکسوپلاسما گوندی ۱۳

عوامل مؤثر در بیماریزایی ١٤

توکسوپلاسموز و افراد در معرض خطر ١٥

آنتی‌ژن‌های سطحی و گرانول متراکم توکسوپلاسما گوندی ١٦

ژنوتایپ‌های توکسوپلاسما گوندی ١٧

علایم بالینی توکسوپلاسموز ١٨

۱- توکسوپلاسموز اکتسابی ۱۸

۲- توکسوپلاسموز مادرزادی ۱۹

۳- توکسوپلاسموز چشمی ۲۱

۴- توکسوپلاسموز در بیماران مبتلا به اختلال سیستم ایمنی ۲۲

عوارض احتمالی اختلالات روانی ۲۲

اهمیت آزمایش ۲۳

تشخیص توکسوپلاسما گوندی ۲۵

تشخیص توکسوپلاسما گوندی در مدفوع گربه ۲۵
تشخیص توکسوپلاسما گوندی در انسان و میزبانان واسط دیگر (موش و ...) ۲۵
الف- تلقیح به حیوان حساس آزمایشگاهی: ۲۵
ب- کشت سلولی: ۲۵
ج- روش‌های ایمونولوژی: ۲۵
د- روش سرولوژی ۲۶
۱- تست رنگی دای تست (Dye-test) یا سابین فیلدمن (Sabin-Feldman) ۲۶
۲- ایمنوفلورسنت غیرمستقیم (IFA: Indirect fluorescent Antibody) ۲۶
۳- هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (IHA) ۲۷
۴- Enzyme-linked Immunosorbent Assaay:ELISA ۲۷
۵- آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) ۳۸
۶- PCR ((Molecular methods (polymerase Chain Reaction) ۳۸
۷- کمی‌لومینسانس (Chemiluminescense) ۳۸

عوامل محیطی مساعدکننده انتقال توکسوپلاسموز به انسان ۴۲

عوامل ریسک آلودگی در انسان ۴۳

اپیدمیولوژی ۴۵

پیشگیری ۴۶

درمان ۴۸

۱- درمان توکسوپلاسموز اکتسابی ۴۸
۲- درمان توکسوپلاسموز مادرزادی ۴۹
۳- درمان توکسوپلاسموز چشمی ۴۹
۴- درمان توکسوپلاسموز در بیماران نقص ایمنی ۴۹

واکسیناسیون ۴۹

پاسخ ایمنی به توکسوپلاسما گوندی ۵۰

گروه‌های هدف

تکنسین، کاردان و کارشناس آزمایشگاه تشخیص طبی

اهداف آموزشی

هدف کلی: افزایش دانش و آگاهی پرسنل در مورد توکسوپلاسموزیس و روش‌های تشخیص آن

روش و نحوه اجرای آموزش

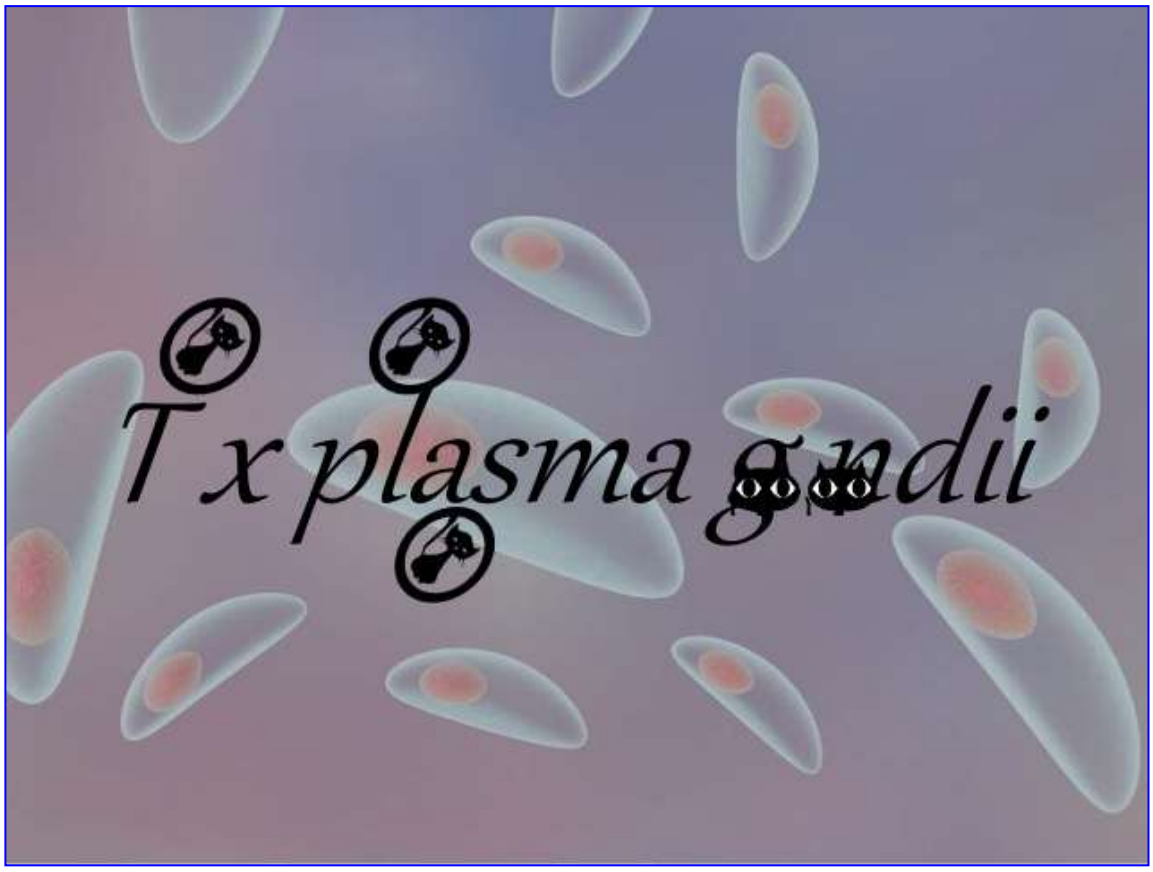
با توجه به اینکه هدف این مجموعه آموزشی افزایش دانش و آگاهی در مورد توکسوپلاسما گوندی و روشهای تشخیص در آزمایشگاه می‌باشد بنابراین می‌تواند جهت ارائه بهتر مطالب به روش حضوری در قالب کارگاه آموزشی و عملی ارائه شود و یا جهت پوشش تعداد بیشتری از آموزش گیرندگان بصورت غیرحضوری و در قالب کتاب‌خوانی انجام گیرد.

مدت دوره آموزشی: ۱۵ساعت

ارزشیابی

در پایان دوره بمنظور ارزیابی میزان حصول موفقیت و دستیابی به اهداف آموزشی و بررسی آگاهی، نگرش و عملکرد آموزش گیرندگان و بهبود مستمر فرایند، یک ارزشیابی از شرکت کنندگان به صورت تست‌های چهار گزینه‌ای بعمل خواهد آمد.

توکسوپلاسما گوندی



تاریخچه

توکسوپلاسما گوندی نخستین بار در سال ۱۹۰۸ توسط نیکول[1] و مانسو[2] در انیستیتو پاستور تونس نزد گونه‌ای از جوندگان شمال آفریقا به نام کتنوداکتیلوس گوندی[3] شناسایی شد. این انگل در سال ۱۹۷۰ توسط Frenkel بطور کامل از نظر سیر تکاملی و چرخه زندگی شناسایی و معرفی گردید.

مطالعات همان سال و سال‌های بعد از آن آلودگی به این تک‌یاخته را در انواعی از حیوانات ثابت کرد، ولی آلودگی انسان چند سال پس از کشف عفونت حیوان شناخته شد.

همزمان با کشف نیکول و مانسو، اسپلندر[4] هم در ساؤپولوی برزیل انگل را در بافت‌های یک خرگوش آزمایشگاهی مشاهده کرد.

اولین مورد انسانی در سال ۱۹۲۳ به وسیله چشم‌پزشکی از اهالی پراگ به نام Janku در مجله پزشکان چک گزارش گردید. یانکو کیست انگل را در مطالعه میکروسکوپی مقاطع بافتی شبکیه چشم کودکی که با عفونت مادرزادی به دنیا آمده و در یازده ماهگی مرده بود، مشاهده و توصیف کرده است.

شکل۱- آسیب‌های چشمی‌بیماری توکسوپلاسموز در انسان

1. Nicolle
2. Manceaux
3. Ctenodactylus gondii
4. Splendore

در سال ۱۹۳۹ ولف (Wolf) و همکاران وی با جدا کردن انگل از ضایعات سیستم اعصاب مرکزی یک نوزاد وجود توکسوپلاسموز مادرزادی را گزارش کردند، اما سیر تکاملی توکسوپلاسما و نحوه انتقال این تک‌یاخته تا مدتی در حدود ۶۰ سال پس از کشف آن ناشناخته ماند.

توکسوپلاسموز اکتسابی نخستین بار توسط پینکرتن[1] و واین[2] من در سال ۱۹۴۰ پس از جدا کردن انگل از ضایعات نکروتیک اندام‌های بیماری از پرو، که از یک عفونت سیستمیک همراه با لنف آدنوپاتی مرده بود، گزارش گردید. اما سیر تکاملی این تک‌یاخته تا مدتی حدود ۶۰ سال پس از شناسایی آن بصورت یک معمای ناشناخته باقی مانده بود و از نظر طبقه‌بندی جای مشخصی نداشت. مطالعاتی که منتهی به روشن شدن چرخه زندگی انگل گردید در سال ۱۹۶۵ بوسیله هچی سن[3] انگل‌شناس انگلیسی روی گربه آغاز و به وسیله محققین زیادی پی‌گیری شد و در سال ۱۹۷۰ مشخص شد.

توکسوپلاسما نوعی کوکسیدیای روده گربه همانند ایزوسپورا می‌باشد.

در سال ۱۹۴۸ آزمون سرولوژیک دای تست توسط سابین و فلدمن جهت تشخیص بیماری ارائه شد و این روش موجب شد تا محققان بسیاری از مسائل اپیدمیولوژیکی و بالینی توکسوپلاسموز را مورد بررسی قرار دهند و طیف بیماری را در انسان مشخص نمایند.

تاریخچه بیماری در ایران

نخستین مورد بیماری از ایران درسال۱۳۲۷ به وسیله انصاری گزارش شده است. در سال ۱۳۳۳ شمسی آزمون سابین- فلدمن در بخش انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران انجام شد و از سال ۱۳۴۵ هجری شمسی با تاسیس مرکز تحقیقات ایمنو فلورسانس ، تحقیق در مورد توکسوپلاسموز ادامه یافت.

1. Pinkerton
2. Weinman
3. Hutchison

مقدمه

توکسوپلاسما (Toxoplasma) از دو کلمه Toxo به معنی کمان یا قوس و Plasma به معنی سلول مشتق شده است. ارگانیسم شکل هلالی یا قوسی دارد.

توکسوپلاسما گوندی (Toxoplasma gondi) یک انگل پروتوزوای درون سلولی اجباری و عامل بیماری «توکسوپلاسموز» است که تقریباً همه حیوانات خونگرم را آلوده می‌کند ولی گربه خانگی تنها میزبان قطعی آن است زیرا انگل در آن تولیدمثل جنسی می‌کند.

توکسوپلاسما گوندی، زئونوز بوده و عامل بیماری به نام توکسوپلاسموزیس (Toxoplasmosis) در انسان می‌باشد.

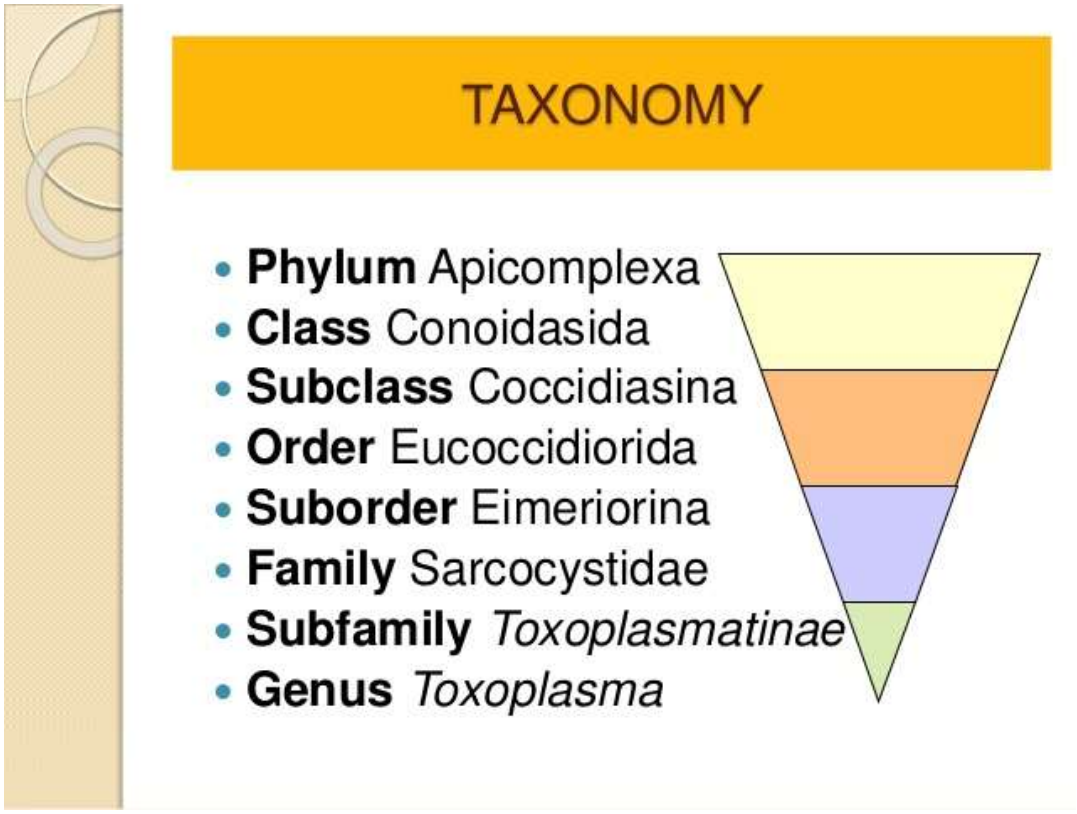
بسیاری از موجودات خونگرم از جمله حیوانات خانگی، دام‌ها، پرندگان و انسان می‌توانند توسط این تک‌یاخته آلوده شوند.

تقریباً ۱۱٪ افراد بین ۴۹-۶ سال در ایالات متحده آمریکا دارای آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما می‌باشند و این بدین معناست که یکبار به این انگل آلوده شده‌اند. اگرچه آلودگی به این انگل معمول می‌باشد ولی بروز بالینی بیماری بسیار نادر است.

علائم بیماری شبیه به یک سرماخوردگی خفیف و شامل تب، درد خفیف و بزرگ شدن گره‌های لنفاوی برای مدت بسیار کوتاه می‌باشد.

این انگل دومیزبانه می‌باشد. میزبان نهایی آن، گربه و گربه‌سانان و میزبان واسط آن تمامی پستانداران و پرندگان می‌باشند از آنجایی که گربه می‌تواند هم میزبان نهایی و هم میزبان واسط باشد به آن دومیزبانه اختیاری می‌گویند.

تک‌یاخته‌ها دارای ۷ شاخه می‌باشند. شاخه مورد نظر ما اپی‌کمپلکسا است و طبقه‌بندی که در زیر ارائه شده بر اساس آخرین طبقه‌بندی انجمن بین‌المللی تک‌یاخته‌شناسان می‌باشد.



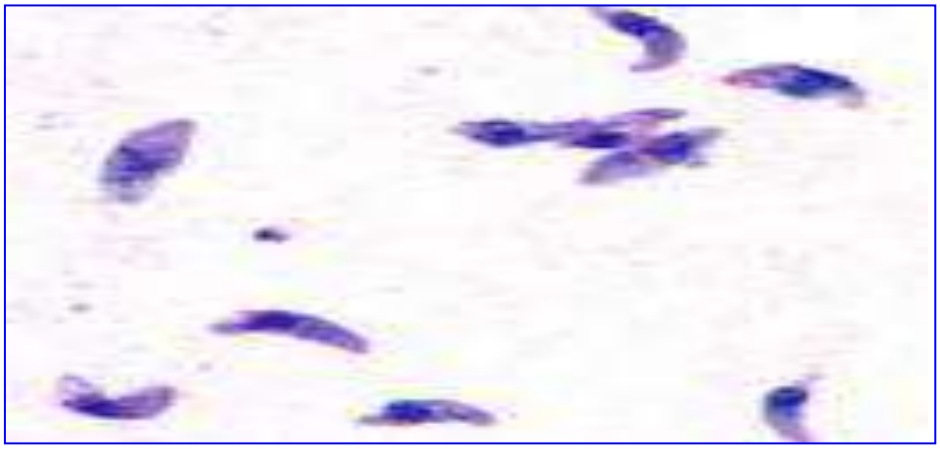
مورفولوژی

۱- تاکی‌زوئیت (Tachyzoite)

شکل آزاد انگل است که شبیه هلال ماه بوده که در یک انتها تیزتر از انتهای دیگر است. طول آن ۷-۴ میکرون و عرض آن ۴-۲ میکرون است. هسته در قسمت خلفی و پهن‌تر انگل می‌باشد. فقد تاژک و مژه می‌باشد.

تاکی‌زوئیت‌ها در مرحله حاد بیماری دیده می‌شوند و به کلیه سلول‌های هسته‌دار بدن پستانداران بویژه منونوکلئرسل‌ها مانند منوسیت و ماکروفاژ حمله نموده و تکثیر می‌یابند. تکثیر انگل به روش اندودیوژنی (جوانه‌زدن داخلی) می‌باشد.

تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما حتی در گلبول‌های قرمز هسته‌دار نیز می‌تواند وارد شده و تکثیر نماید ولی درون اریتروسیت‌ها قدرت تکثیر و بقا ندارد.



شکل۲- تاکی‌زوئیت خارج سلولی انگل توکسوپلاسما گوندی در صفاق موش

۲- کیست کاذب *(Pseudo cyst)*

به سلول هسته‌دار حاوی انگل کیست کاذب گویند. در این حالت انگل‌های درون آن را اندوزوئیت (enozoite) نامند.

علت نامگذاری کیست کاذب ماهیت غشای اطراف آن است که به سلول ماکروفاژ و یا منوسیت تعلق دارد و از انگل ترشح شده است.

تعداد تاکی‌زوئیت‌های درون کیست ۲۰ تا ۴۰ عدد است.

۳- کیست نسجی *(Tissue cyct)*

با فعال شدن سیستم ایمنی میزبان، توکسوپلاسما جهت حفاظت خود از پاسخ ایمنی به اطراف سلول بافتی که در آن قرار داشته و تکثیر یافته است. ماده‌ای ترشح می‌کند و به کیست مقاومی در مقابل پاسخ ایمنی تبدیل می‌شود و ماحصل تکثیر غیرجنسی انگل در میزبان است. اندازه آن ۲۰ الی ۱۲۰ میکرون متغیر بوده و درون کیست حدود ۳۰۰۰ عدد انگل مشاهده شده که به انگل‌های درون کیست bradyzoite یا cystizoite گویند.

کیست نسجی دارای اشکالی از توکسوپلاسماست که به دلیل داشتن حداقل فعالیت متابولیکی برادی‌زوئیت نامیده می‌شود اما به محض پاره شدن کیست نسجی، برادی‌زوئیت دوباره به فرم فعال خود یعنی تاکی‌زوئیت تبدیل شده و به سلولهای میزبان حمله می‌کند.

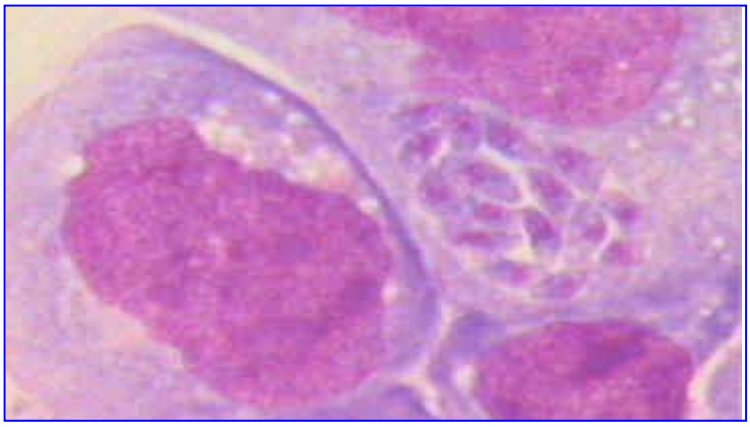
کیست نسجی ممکن است تا آخر عمر میزبان با ایمنی سالم بدون هیچ نشانه‌ای باقی بماند و یا در نهایت نکروزه گردد.

کیست نسجی توکسوپلاسما در بافت‌های مختلف میزبان واسط و نهایی می‌تواند تشکیل شود ولی در درجه اول کیست‌های بافتی توکسوپلاسما در مغز و در مراحل بعدی در عضلات قلبی و اسکلتی تشکیل می‌شوند.

کیست نسجی در فرم مزمن توکسوپلاسموز و در هر دو میزبان نهایی و واسط دیده می‌شود.

توکسوپلاسما انگل داخل سلولی اجباری است و فقط در فرم تاکی‌زوئیت ممکن است به صورت خارج سلولی نیز مشاهده گردد.

یخزدگی و یا حرارت بیش از ۶۰ درجه باعث مرگ انگل‌های درون کیست‌ها می‌شود. انگل‌های درون این کیست‌ها در انتقال بیماری و عفونت نقش مهمی داشته و عامل اصلی ظهور مجدد انگل و انتشار آن در بیماران نقص سیستم ایمنی می‌باشند.



شکل۳- کیست نسجی انگل توکسوپلاسما گوندی حاوی هشت تا بیست انگل

دیواره کیست نسجی argyrophilic بوده و قابل ترکیب و اتصال با املاح نقره است. واکنش PAS ضعیف داشته در حالی که انگلهای درون کیست به شدت PAS مثبت هستند.

۴- اووسیست (oocyct)

شکل دیگری از انگل که تنها در میزبان نهایی یعنی در گربه و گربه‌سانان دیده می‌شود اووسیست است. اووسیت گرد یا بیضی شکل بوده که ۱۱-۹ میکرون عرض و ۱۴-۱۱ میکرون طول دارد و هنگام دفع از روده گربه دارای یک اسپوروبلاست می‌باشد.

یک گربه روزانه تا میلیون‌ها اووسیست دفع می‌کند. اووسیست‌های دفع شده آلوده‌کننده نبوده و بایستی جهت بدست آوردن قدرت آلوده‌کنندگی مدتی را بیرون از بدن میزبان بگذرانند. در طی این مدت اسپوروبلاست به دو اسپوروسیست که هر یک از آنها واجد ۴ اسپوروزوئیت می‌باشند تقسیم می‌شود. اووسیست‌ها در دمای پایین‌تر از ۴ درجه و بالاتر از ۳۷ درجه نمی‌توانند اسپوردار شوند.

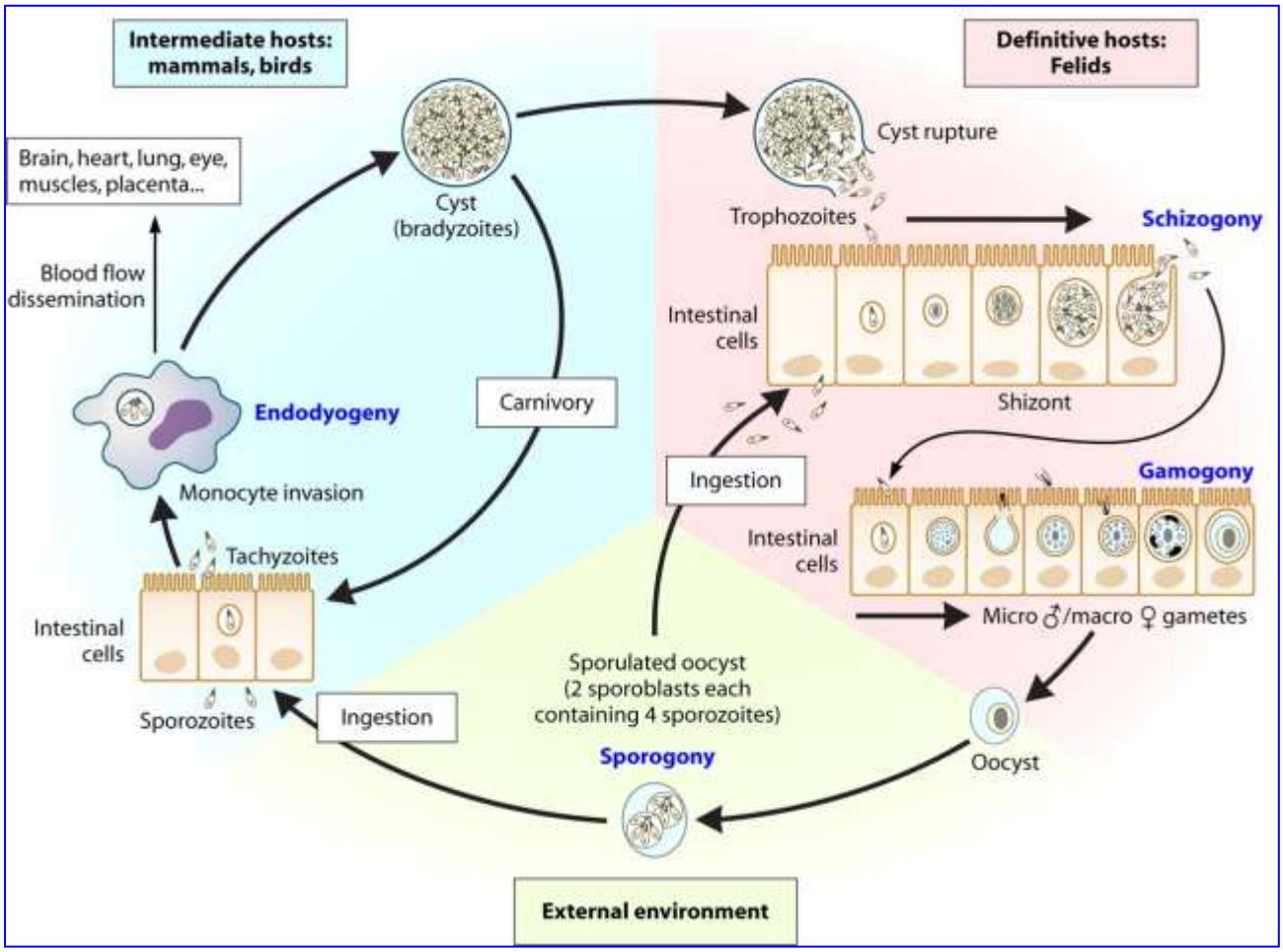
شکل ۴- اووسیست‌های انگل توکسوپلاسما گوندی

چرخه حیات

سیر تکاملی توکسوپلاسما گوندی

توکسوپلاسما به دوصورت تک میزبانه (منوگزنوس)وچندمیزبانه (هتروگزنوس) اختیاری است . گربه وگربه سانان اهلی ووحشی میزبان نهایی یاقطعی و مهره داران خونگرم اغلب میزبان واسط توکسوپلاسماگوندی محسوب میشوند.

توکسوپلاسماگوندی در زندگی خود دو سیکل مجزای خارج روده‌ای و داخل روده‌ای دارد. هر دو سیکل این انگل در گربه‌سانان وجود دارد، در صورتی که در میزبان‌های واسط فقط سیکل خارج روده‌ای دیده می‌شود.



شکل ۵- چرخه زندگی توکسوپلاسما گوندی

مرحله ایزوسپوریک (داخل روده‌ای)[1]

این مرحله در سلول‌های اپیتلیال روده باریک میزبان‌های نهائی (گربه‌سانان) انجام می‌گیرد. انگل به دو روش غیرجنسی یا شیزوگونی[2] و جنسی یا اسپوروگونی[3] تکثیر می‌یابد.

گربه می تواند از طریق خوردن انگل در سه مرحله تاکی زوئیت و برادی زوئیت(از طریق شکار موش یا سایر جوندگان و یا خوردن احشای آلوده پستانداران)و اووسیست حاوی اسپروزوئیت آلوده شود.

1. Intro intestinal
2. Schizogony
3. Esporogony

با خوردن اووسیست دفع شده با مدفوع ،دیواره اووسیست در معده گربه هضم و اسپروزوئیت آزاد می شود.اسپروزوئیت ها وارد روده و سلولهای اپیتلیال روده شده و به تروفوزوئیت تبدیل می شوند. تروفوزوئیت ها درون سلولهای اپیتلیال روده گربه،دو تا سه نسل شیزوگونی (حداکثر ۵ شیزوگونی)را طی می نماید.شیزونت های ایجاد شده هربار پس از رسیده شدن،پاره شده و مروزوئیت های آزاد شده همانطور که ذکر شده تاحداکثر ۵ نسل شیزوگونی را طی می کنند.

برخی از مروزوئیت های رها شده از شیزونت رسیده وارد چرخه جنسی (گامتوگونی)می شوند که عده ای گامتوسیت نر و تعدادی گامتوسیت ماده را تشکیل می دهند.

ماکروگامتوسیت کاهش کروموزومی انجام می دهد بنام ماکروگامت وآماده لقاح می شود.

میکروگامتوسیت نیز با کاهش کروموزومی و تبدیل به تعدادی میکروگامت تاژکدار(پدیده Exflagellation) برای بارور کردن آمادگی لازم را پیدا می کنند،به سمت سلولهای واجد ماکروگامت رفته آنها را می شکافد تاژک خود را از دست داده ،از ناحیه سر وارد ماکروگامت شده ،لقاح حاصل شده و سلول دیپلوئیدی بنام تخم تشکیل می شود.

سلول تخم در سلولهای اپیتلیال روده ، پوشش دار می شود و به شکل اووسیست نارس از سلول خارج شده و همراه مدفوع گربه به محیط بیرون می رسد.

گربه ها معمولا درفاصله۲۱-۷ روز پس ازآلودگی اووسیست دفع میکنند.

اووسیست توکسوپلاسما در محیط خارج بدن گربه و در خاک با رطوبت و دمای محیط مناسب طی 5-3 روز رسیده و اسپرولە شده و به صورت دی اسپوریک تترازوئیک در می آید که در این صورت آلوده کننده است.

درحرارت ۲۵ درجه سانتی گراد ۵ روز،دردمای ۱۵ درجه ۷ روز و دردمای کمتر،۱۵-۱۰ روز طول می کشد. دردمای بالای ۳۰-۲۵ درجه این زمان به ۳ روزتقلیل می یابد.

مجموع مراحل گامتوگونی و اسپوروگونی را سیکل جنسی یا اسپوروگونی می‌گویند.

مرحله توکسوپلاسمیک (خارج روده‌ای)1

این مرحله از سیر تکاملی ، در بدن انسان، میزبان‌های واسط و نیز میزبان نهائی طی می‌شود.

در این مرحله انگل به سه شکل تاکی‌زوئیت، کیست بافتی و کیست کاذب دیده می‌شود. انسان و سایر میزبان‌ها، معمولاً با خوردن گوشت حاوی کیست بافتی بطور خام و نیم‌پز و یا آب و مواد غذایی آلوده به اووسیت‌های انگل آلوده می‌شوند.

با خوردن میزبان واسط حاوی کیست نسجی توسط گربه سانان وقایع زیر رخ می دهند:

دیواره کیست نسجی در روده گربه سانان پاره شده و برادی زوئیت هاآزاد می شوند و به تاکی زوئیت تبدیل می شوند.عده ای از تاکی زوئیت ها به سلولهای اپیتلیال روده گربه سانان حمله کرده و تبدیل به تروفوزوئیت شده ، مراحل شیزوگونی و گامتوگونی را طی می نماید و فاز روده ای رخ می دهد.

برخی از تاکی زوئیت ها وارد سلولهای هسته دار میزبان مانند ماکروفاژ و منوسیت شده که در این حالت انگل درون سلول هسته دار گرد شده و شروع به تقسیمات اندودیوژنی می کند.تا ۴۰ تقسیم ممکن است در درون یک سلول دیده شود که وارد فاز خارج روده ای شده و به بافت ها رفته و کیست نسجی در گربه تشکیل می شود.

اگر گربه بطور مستقیم موش حاوی تاکی زوئیت (فرم فعال توکسوپلاسما)را بخورد،تاکی زوئیتها به دلیل حساس بودن به آنزیم های گوارشی از بین رفته و گربه با خوردن تاکی زوئیت بطور مستقیم آلوده نمی گردد.

گربه با هر دو فرم اووسیست یا کیست نسجی که آلوده شود، هر دو فاز روده ای و خارج روده ای در آنها ایجاد می شود اما دوره کمون متفاوتی دارند ، بطوریکه دوره کمون عفونت با توکسوپلاسما پس از خوردن کیست نسجی کوتاهتر از بلع اووسیست است.

دوره کمون پس از خوردن کیست نسجی 10-3 روز،در حالیکه پس از بلع اووسیست 24-21 روز است.

1. Extra intestinal

چرخه زندگی توکسوپلاسما گوندی در میزبان واسط(انسان،موش ،علفخواران،پرندگان و سایر مهره داران خونگرم) فقط فاز خارج روده ای رخ می دهد.

بیماریزایی توکسوپلاسما گوندی

توکسوپلاسما گوندی انگل اجباری داخل سلولی است و پس از تکثیر درون سلول، آن را پاره کرده و باعث مرگ سلولی می‌شود.

بدنبال مرگ سلول‌های آلوده به توکسوپلاسما لنفوسیت، منوسیت و پلاسماسل‌ها اطراف ناحیه مبتلا را احاطه نموده و کانون‌های نکروزه ایجاد می‌کنند.

ـ عفونت توکسوپلاسموز در بیماران با ایمنی سالم، بدون علامت است زیرا هر دو پاسخ ایمنی هومورال که به انگل‌های خارج سلولی (تاکی‌زوئیت‌های آزاد شده) حمله‌ور می‌شوند و پاسخ ایمنی سلولی بویژه لنفوسیت‌های T که با ترشح اینترفرون گاما به مبارزه با توکسوپلاسما پرداخته و عفونت را مهار می‌کند.

ـ عفونت فعال توکسوپلاسموز در سیستم اعصاب مرکزی مانند مغز و ملتحمه چشم بیشتر از سایر نقاط بدن ادامه می‌یابد و باعث نکروز کوچک اما منتشر می‌گردد که در نهایت کلسیفیه می‌شود.

زمانی که انگل به صورت دهانی بلع می‌شود به صورت فعال به سلول‌های اپیتلیال روده تهاجم کرده و یا توسط همین سلول‌ها فاگوسیت می‌شود. در داخل سلول، توکسوپلاسما گوندی باعث ایجاد واکوئل پارازیتوفوروس شده که حاوی پروتئین‌های مترشحه انگل بوده و پروتئین‌های میزبان را که به صورت نرمال بلوغ فاگوزوم‌ها را مرتفع می‌کند خارج می‌سازند و باعث پیشگیری از ادغام با لیزوزیم می‌شود.

عفونت با توکسوپلاسما گوندی باعث پاسخ قوی Th1 در نتیجه تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مثل $TNF\alpha, IL-12$ و $IFN\gamma$ می‌شود. ترکیب فعالیت این سایتوکاین‌ها و دیگر مکانیسم‌های ایمنولوژیکی میزبان را در مقابل تکثیر سریع تاکی‌زوئیت و تغییرات پاتولوژیکی محافظت می‌کند. بعد از تهاجم به انتروسیت‌ها، سلول‌های APC موجود در لامینا پروپریا را آلوده کرده و باعث پاسخ زودگذر Th1 در آن محل می‌شود.

گرانولوسیت‌ها هم می‌توانند در تولید زودهنگام IL-12 نقش داشته باشند. ماکروفاژهای فعال شده، توکسوپلاسما گوندی داخل سلولی را مهار کرده و از بین می‌برند. در طول ۲ هفته بعد از عفونت آنتی‌بادی‌های lgG و lgM قابل

تشخیص هستند. تولید آنتی‌بادی IgA روی سطح‌های موکوسی منجر به محافظت میزبان در مقابل عفونت مجدد می‌شود.

عوامل مؤثر در بیماریزایی

۱- حساسیت یا مقاومت میزبان به توکسوپلاسما گوندی از فاکتورهای مهم پاسخ در مقابل عفونت توکسوپلاسمایی است. حساسیت افراد و یا حیوانات در مقابل توکسوپلاسما متفاوت است:

الف‌ـ خوک، گوسفند و بز نسبت به عفونت با توکسوپلاسما حساس هستند، بطوریکه توکسوپلاسما علاوه براینکه در مغز و عضلات گوسفند و بز کیسته شده و باعث لاغری می‌شود به دلیل توکسوپلاسموز مادرزادی به سقط جنین در گوسفند نیز رخ خواهد داد.

ب‌ـ گوساله‌های جوان نسبت به گاوها به توکسوپلاسموز حساس‌ترند و علایم در گوساله‌ها بیشتر تظاهر می‌یابد.

ج‌ـ در انسان‌های مبتلا به نقص ایمنی، توکسوپلاسما پس از پنوموسیستیس کارینی در درجه دوم اهمیت قرار دارد و در اروپا ۴۰ درصد موارد مرگ و میر در افراد ایدزی بدلیل توکسوپلاسموز است.

۲- ویرولانس سویه‌های مختلف توکسوپلاسما از عوامل مهم دیگر در پاتوژنیسیته توکسوپلاسما است.

۳- محل استقرار توکسوپلاسما در میزبان نیز از فاکتورهای مهم بیماریزایی توکسوپلاسما می‌باشد.

توکسوپلاسموز و افراد در معرض خطر

انسان در واقع میزبان واسط انگل توکسوپلاسماست و در صورت ورود این انگل به بدن ما، در بدن کیست های بسیار ریز میکروسکوپی تشکیل می دهد که به سرعت توسط سیستم ایمنی افراد سالم مهار شده و اغلب تا پایان عمر فعال نمی شود. این اتفاق تنها یک بار در طول عمر هر فرد رخ می دهد و از آن پس فرد در برابر این انگل ایمن خواهد شد.

در افرادی که به دلایلی مانند ابتلا به ایدز و یا شیمی درمانی شدید سیستم ایمنی بسیار تضعیف شده است ممکن است در برخی مواقع این کیست ها مجددا فعال شوند که در این صورت با دارو درمان می شوند. این افراد همواره از طریق خوردن و تماس با گوشت قرمز و سفید نیز در معرض آلودگی مجدد هستند.

آنچه که اغلب در جامعه ایجاد نگرانی می کند ابتلای زنان باردار به این انگل است که در میان مردم به نازایی ناشی از گربه شهرت یافته است. در این در این خصوص چند نکته وجود دارد:

۱- زنان بارداری که پیش از بارداری یک بار در طول عمر خود به این انگل آلوده شده باشند از آنجایی که نسبت به آن ایمن شده اند حتی با تماس با گوشت و مرغ و یا مدفوع آلوده گربه نیز خود و نوزادشان در معرض خطر نخواهند بود.

.

۲- زنان بارداری که تا پیش از بارداری هرگز به این انگل آلوده نشده باشند در طول دوران بارداری در صورت ابتلا به این انگل می توانند بسته به سن جنین با خطرات سقط و یا بروز بیماری در جنینشان مواجه باشند و به همین دلیل این افراد می بایست از خرد کردن گوشت و مرغ بدون استفاده از دستکش، خوردن استیک یا کباب و همبرگر کم پخته، خوردن سبزیجات ضد عفونی نشده و تماس با مدفوع گربه ای که از نظر سرمی منفی بوده و یا در حال دفع تخم انگل است پرهز نمایند.

به همین دلیل در بسیاری از کشورهای پیشرفته تمامی زنان پیش از بارداری و یا پس از اطلاع از بارداری مورد آزمایش سرمی توکسوپلاسموز قرار می گیرند. افرادی که از نظر سرمی مثبت هستند (یعنی قبلا با انگل آلوده شده

اند) در طول بارداری با خطری مواجه نیستند ولی افرادی که از نظر سرمی منفی هستند (یعنی تا کنون به انگل توکسوپلاسما آلوده نشده اند) تحت آموزش های لازم برای جلوگیری از ابتلا به توکسوپلاسما در طول بارداری قرار می گیرند.

با توجه به تمام توضیحات بالا، احتمال آلودگی به انگل توکسوپلاسما از طریق مواد غذایی بسیار بیشتر از مدفوع گربه است و نیز تماس با گربه و یا مدفوع آن در دوران پیش از بارداری نیز مضر نبوده و حتی در دوران بارداری هم با توجه به مطالب گفته شده تقریبا بی خطر است.

به طور کلی به تمامی بانوان توصیه می شود که پیش از بارداری و یا در اوایل بارداری با آزمایش سرمی توکسوپلاسما از وضعیت سابقه ابتلای خود مطلع شوند تا بتوانند سلامتی فرزندشان را با رعایت اصول بهداشتی ذکر شده تضمین نمایند.

همچنین در مورد افرادی که باردار نیستند و به دلیل ترس از توکسوپلاسموز از نگهداری گربه خود داری می کنند ، با توجه به مطالب گفته شده نگهداری و تماس با گربه نمی تواند در ایشان ناباروری یا بیماری در رابطه با توکسوپلاسموز ایجاد کنند و نمی بایست از این نظر دچار تردید باشند. به ویژه در صورتی که گربه آنها خانگی بوده و از گوشت خام تغذیه نکند جای هیچ گونه نگرانی وجود نخواهد داشت.

آنتی‌ژن‌های سطحی و گرانول متراکم توکسوپلاسما گوندی

سطح تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما گوندی توسط خانواده‌ای شامل ۸ مولکول گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) پوشیده شده است که به آن‌ها آنتی‌ژن‌های سطحی (SAG)[1] گفته می‌شود.

این مولکول‌ها در تهاجم به سلول‌های میزبان و پاسخ دفاعی نقش دارند. همچنین ممکن است این آنتی‌ژن‌ها در بقا انگل در محیط زیست نقش داشته باشند.

با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال، ژن‌های کدکننده این آنتی‌ژن‌ها ..SAG 1,2,3, شناسایی شده‌اند.

1. Surface Antigen

ژن SAG2 کدکننده پروتئین P22 به طور وسیعی در مطالعات اپیدمیولوژی و مولکولی توکسوپلاسما کاربرد دارد. این آنتی‌ژن در تشخیص‌های سرولوژیکی نیز استفاده می‌شود. بررسی ژنتیکی توکسوپلاسما گوندی با استفاده از ژن SAG2 نیاز به مقدار کمی DNA داشته بنابراین می‌توان از ان در بررسی نمونه‌های بالینی استفاده نمود.

آنتی‌ژن‌های گرانول متراکم توکسوپلاسما گوندی، آنتی‌ژن‌های انگلی هستند که به واکوئل پارازیتوفوروس ترشح می‌شوند. آنها مولکول‌های ایمنولوژیک بوده و برای زنده ماندن داخل سلولی انگل لازم هستند.

مارکر ژنتیکی GRA6 به عنوان مارکر خوبی قادر به افتراق سه ژنوتایپ توکسوپلاسما گوندی می‌باشد.

ژنوتایپ‌های توکسوپلاسما گوندی

توکسوپلاسما گوندی، بر اساس میزان و ویرولانس و بیماری‌زایی در موش، در ۳ ژنوتایپ III، II و I طبقه‌بندی شده است اما ژنوتایپ‌های خارج از این ۳ گروه هم در سایر قاره‌ها غالب می‌باشند.

ژنوتایپ I دارای بیماری‌زایی بیشتر در موش بوده و در بیماران با توکسوپلاسموزیس چشمی دیده می‌شود.

ژنوتایپ II در موش غیربیماری‌زا بوده و در بیماران با نقص سیستم ایمنی و مبتلایان به توکسوپلاسموزیس دیده می‌شود.

ژنوتایپ III که در ارتباط با توکسوپلاسموزیس انسان بوده ولی در اروپا و آمریکا شایع نیست.

ویرولانس بالا در موش موجب افزایش غیر کنترل شده سایتوکاین‌های Thl مانند $IFN\gamma$ شده و باعث آسیب بافتی می‌شوددر حالی که تولید کنترل شده این سایتوکاین تأثیر محافظتی بعد از عفونت با ژنوتایپ II دارد.

علایم بالینی توکسوپلاسموز

اغلب عفونت‌های انسانی توکسوپلاسما خوش خیم است و در افراد بالغ با ایمنی سالم و کودکانی که دوران نوزادی را گذرانده‌اند بدون علامت است و هشتاد درصد افراد بدون علایم هستند.

در شرایط خاص ممکن است توکسوپلاسموز با نشانه‌های بالینی بخصوص مشابه منونوکلئوز عفونی همراه باشد و حدود ۲۰ درصد افراد به توکسوپلاسموز با علایم مبتلا می‌شوند. علایم توکسوپلاسموز در انسان به سه فرم زیر دیده می‌شود:

۱- توکسوپلاسموز اکتسابی

یافته‌های سرم‌شناسی نشان می‌دهد که توکسوپلاسموز اکتسابی تقریباً در ۸۰ تا ۹۰ درصد موارد در بالغین سالم بدون علائم است.

آلودگی نهفته که متعاقب عفونت حاد به وجود می‌آید در افرادی که از نظر ایمنی سالم هستند فاقد اهمیت است، مگر در مواردی که کیست‌های انگل در شبکیه شکافته شود و یا اینکه مکانیزم محافظت‌کننده سلول‌های T نقص پیدا کند. شایع‌ترین تظاهرات توکسوپلاسموز اکتسابی در افرادی که دارای پاسخ‌های ایمنی طبیعی هستند لنف آدنوپاتی است.

غدد لنفاوی متورم ممکن است منفرد یا چندتایی، موضعی یا منتشر و همچنین سطحی و یا عمقی باشند. غالباً غدد لنفاوی گردنی، زیر استخوان پشت سری و بالای استخوان چنبرهای بزرگ می‌شود، ولی گاهی بزرگی غدد زیر بغل و کشاله ران نیز به عنوان بخشی از لنف آدنوپاتی منتشره مشاهده می‌شود.

اندازه لنف آدنوها برابر یک نخود یا یک آلبالو، گاهی یک فندق است. در موقع لمس کردن صاف و متحرک و معمولاً بدون درد هستند لنف آدنوپاتی منتشره در ۲۰ تا ۳۰ درصد بیماران با نشانه‌های بالینی از قبیل سردرد، بی‌قراری، خستگی و تب همراه است.

شمار کمتری، از این بیماران بثورات جلدی ماکولوپاپولر، پنومونی درد عضلانی، گلو درد، درد شکم و میوکاردیت دارند و خیلی به ندرت ممکن است با مننگوآنسفالیت و گیجی همراه باشند.

نشانه‌های بیماری حاد به طور معمول طی چند هفته ناپدید می‌شوند، اما بزرگی غدد لنفاوی ممکن است تا چند ماه باقی بماند. لنف آدنیت‌های توکسوپلاسمایی چرکی نمی‌شوند و پوست روی گره لنفی قرمز نمی‌گردد.

علایم بالینی توکسوپلایسموز اکتسابی در انسان به صورت‌های زیر دیده می‌شود:

الف- فرم حاد توکسوپلایوزیس، گذرا است و مرگ‌ومیر بالایی ندارد و شکل فعال آن به علت تکثیر تاکی زوئیت‌ها درون ماکروفاژها می‌باشد.

اولین علامت احتمالی فرم حاد توکسوپلایموزیس، بزرگی غدد لنفاوی یا لنفوآدنوپاتی در گردن و کشاله ران است. تب و دردهای عضلانی نیزاز علایم این مرحله می‌باشند.

ب- فرم تحت حاد یا بینابینی، مرحله است که هنوز تاکی‌زوئیت در بدن وجود دارد و در حال انتشار در بافت‌ها از جمله ریه و عضلات و تشکیل سودوکیست است. در مرحله بینابینی و پس از تکامل پاسخ‌های ایمنی، تشکیل کیست نسجی در مغز، قلب، و شبکیه چشم آغاز می‌گردد.

ج- در فرم مزمن توکسوپلاسموزیس، کیست‌های نسجی تشکیل شده و گاهی تا آخر عمر فرد مبتلا باقی می‌مانند. اگرچه به دلیل پارگی کیست‌های نسجی و آزاد شدن برادی‌زوئیت‌ها پدیده عود یا ریلاپس (relaps) در توکسوپلاسموز مزمن دیده می‌شود. در فرم مزمن بیماری، عفونت به صورت فرصت طلب در می‌آید.

در فرم توکسوپلاسموز اکتسابی، لنفادنیت مزمن توکسوپلاسمایی، بثورات ماکولوپاپولر پوستی یا اگزانتماتیک شبیه تیفوس و گاهی علایم هپاتیت، انسفالومیلیت و میوکاردیت مشاهده می‌شود.

۲- توکسوپلاسموز مادرزادی

علایم و شدت بیماری در جنین و یا نوزاد مبتلا به عوامل زیر بستگی دارد:

الف- قدرت بیماریزایی یا ویرولانس سویه توکسوپلاسما گوندی

ب- تعداد تاکی‌زوئیت‌هایی که از جفت عبور نموده و وارد بدن جنین شده است.

ج- دوران حاملگی که مادر به توکسوپلاسما مبتلا گشته است.

در سه ماهه اول، انگل شانس کمتری برای عبور از جفت داشته ولی اگر تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما عبور نماید علایم شدیدی چون سقط جنین، و در سه ماهه دوم بارداری، ضایعات شدید سیستم اعصاب مرکزی مانند هیدروسفالی، میکروسفالی، رتینوکوروئیدیت و انسفالومیلیت مشاهده می‌گردد.

در سه ماهه سوم قدرت عبور تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما از جفت افزایش یافته اما شدت بیماری کاهش می‌یابد. اغلب کودکانی که در سه ماهه آخر بارداری آلوده شده‌اند، طبیعی و بدون علامت هستند.

برخی از کودکان مبتلا در سه ماهه آخر بارداری، دارای علاماتی چون بثورات جلدی، تب، بزرگی کبد، و طحال و گاهی هیدروسفالی می‌باشند.

گاهی برخی از این کودکان مبتلا، هنگام تولد بدون علامت بوده اما سالها بعد، (گاهی ۴۰ سال بعد) به توکسوپلاسموز مادرزادی علامت‌دار دچار می‌شوند.

عوارض شایع عفونت داخل رحمی توکسوپلاسمایی در کودکان علامت‌دار شامل رتینوکوروئیدیت، انسفالومیلیت، هیدروسفالی، میکروسفالی و عقب‌ماندگی ذهنی است.

انسفالومیلیت توکسوپلاسمایی می‌تواند منجر به کلسیفیکاسیون مغزی منجر گردد که در رادیوگرافی قابل مشاهده است.

تشنج‌های مکرر یکی دیگر از علایم بالینی در نوزادان مبتلا می‌باشد.

معمولاً به دنبال توکسوپلاسموز مادرزادی، فرم چشمی بیماری رخ می‌دهد.

گاهی توکسوپلاسموزیس بصورت منتشر درآمده و به پلی‌میوزیت می‌انجامد.

۳- توکسوپلاسموز چشمی

بیماری چشمی در بیشتر موارد در تعقیب عفونت‌های مادرزادی در دومین یا سومین دهه عمر بروز می‌کند.

این شکل از بیماری به ندرت (کمتر از یک درصد) در مبتلایان به توکسوپلاسموز اکتسابی حاد دیده می‌شود.

ضایعات بیشتر به بخش خلفی چشم محدود می‌شود. اول شبکیه و بعد مشمیه زیر آن دچار ضایعه می‌شود.

در توکسوپلاسموز چشمی تظاهراتی مانند تاری دید، چشم درد، ترس از نور، ایجاد نقطه‌های کور در میدان دید (SCOTOMA) در اثر کوریورتینیت فعال دیده می‌شود.

هرگاه ماکولا آسیب ببیند ممکن باعث از بین رفتن دید مرکزی شود.

درگیری عضلات چشم می‌تواند به ناراحتی مانند لوچی و هم گرایی منتهی شود. با از بین رفتن التهاب چشم بینایی بهبود می‌یابد.

در امتحان چشم ضایعات اول به صورت لکه‌های پنبه‌ای سفید مایل به زرد یا حاشیه برآمده نا مشخص و پرخون دیده می‌شود.

زخم‌های کهنه شبکیه به صورت پلاک‌های خاکستری با حاشیه مشخص و لکه‌های سیاه رنگ در می‌آید. این ضایعات معمولاً در قطب خلفی قرار دارند و ممکن است منفرد و یا چندتایی باشند.

ضایعات ممکن است یک طرفه، دو طرفه و توام با فیبروز پیشرفته باشد.

توکسوپلاسموز چشمی، گاهی منجر به کوری نیز می‌شود.

ـ عفونت چشم با توکسوپلاسما یا رتینوکوروئیدیت به دو علت زیر ممکن است رخ دهد:

۱- حساسیت میزبان به آنتی‌ژن‌های آزاد شده

۲- رتینوکوروئیدیت همچنین ممکن است به علت تکثیر تاکی‌زوئیت‌ها در شبکیه و به صورت گرفتاری پیش‌رونده مزمن رخ دهد و دلیل تکثیر انگل در شبکیه فقیر بودن سیستم ایمنی شبکیه است.

۴- توکسوپلاسموز در بیماران مبتلا به اختلال سیستم ایمنی

توکسوپلاسموزیس در مبتلایان به نقص ایمنی مانند ایدز یا سرطان، به صورت حاد، کشنده، منتشر و سیستمیک مشاهده می‌شود. اغلب می‌تواند ضایعات احشایی در ریه، کبد و کلیه ایجاد نمایید.

توکسوپلاسموزیس مغزی به دلیل کاهش سلولهای TCD4 مثبت در افراد مبتلا به ایدز وفعال شدن کیست‌های مغزی ایجاد می‌شود و شایعترین علایم در این افراد می‌باشد. در ضایعات و کیست‌های نسجی به جای برادی زوئیت، تاکی‌زوئیت دیده می‌شود. در این افراد فرم رتینوکوروئیت، به علت نامشخص نادر می‌باشد.

علایم دیگری مانند عفونت‌های ریوی، میوکاردیت، عفونت روده‌بند و عارضه اورکیت در این افراد گزارش شده است.

عوارض احتمالی اختلالات روانی

مطالعات نشان می‌دهد انگل توکسوپلاسموز ممکن است بر رفتار تأثیر گذارد و ممکن است در حال حاضر به عنوان یک عامل مؤثر در اختلالات مختلف روانی مانند افسردگی، اضطراب و اسکیزوفرنی باشد. در مطالعات علمی، سطح پادتن توکسوپلاسما گوندی در افراد مبتلا به بروز اسکیزوفرنی، به میزان قابل توجهی بالاتر از افراد سالم یافت شد.

بیشتر افراد مبتلا به اسکیزوفرنی، به گزارش سابقه بالینی توکسوپلاسموز در جمعیت عمومی این بیماری هستند.

تحقیق اخیر در دانشگاه لیدز نشان داده است که انگل آنزیمی با فعالیت هیدروکسیلاز تیروزین و فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز تولید می‌کند. این آنزیم ممکن است منجر به تغییرات رفتاری در بیماران مبتلا به توکسوپلاسموز شود. این اتفاق با تغییر تولید دوپامین، انتقال‌دهنده عصبی درگیر در خلق و خوی، معاشرت، توجه، انگیزه و الگوهای خواب مشاهده می‌شود.

در مطالعه سرولوژیکی بزرگی در ایالات متحده شواهدی وجود دارد که آلودگی به توکسوپلاسما در زیر مجموعه‌ای از افراد جوان مبتلا به اختلال دوقطبی نوع اول رشد داشته که با علائم شیدایی و افسردگی بالا همراه بوده است.

اهمیت آزمایش

توکسوپلاسما انگلی با انتشار جهانی بوده که اکثر عفونتهای انسانی با توکسوپلاسما در بزرگسالان خوش خیم میباشند و به خودی خود بهبود می یابند اما کیست های نسجی ایجاد شده تا سالها در بدن شخص باقی می مانند . شدیدترین نوع توکسوپلاسموزیس ، نوع مادرزادی آن است . در صورتیکه مادر پیش تر به عفونت مبتلا نشده باشد و در زمان حاملگی عفونت را کسب کند انگل در فاز حاد می تواند از جفت عبور کرده و عوارض گوناگونی را سبب گردد .

کسب عفونت در سه ماهه اول جنینی ممکن است باعث سقط جنین شود . اما در سه ماهه دوم منجر به تولد نوزاد با نقایصی نظیر کلسیفیکاسیون مغز و به میزان کمتر هیدروسفالی و میکروسفالی می شود . اختلالات حرکتی با منشاء عصبی نیز شایع است . عوارض غیر قابل برگشت بوده و نوزادانی که زنده می مانند با علائم عقب ماندگی دست به گریبانند . کسب عفونت در سه ماهه آخر معمولا"منجر به عوارض چشمی بعدی نظیر کوریورتینیت می شود . از این رو تشخیص عفونت در دوران حاملگی حائز اهمیت می باشد .

امروزه از روشهای ایمونوفلورسانس و الایزا جهت تشخیص آنتی بادی از نوع IgG و IgM ضد توکسوپلاسما استفاده می شود . در نوزادان بدلیل اینکه IgG از جفت عبور می کند ، می تواند چندین ماه در گردش خون نوزاد باقی بماند ، ولی چون آنتی بادیهای IgM نمی توانند از جفت عبور کنند یافتن آن به هنگام تولد یا چند ماهگی امکان توکسوپلاسموزیس مادرزادی را مطرح می کند . برای تشخیص دقیق و درست عفونت با توکسوپلاسما افزایش عیار آنتی بادی IgG در دو نمونه سرمی که حداقل به فاصله ۱۰ روز گرفته شده باشد و یا شناسایی IgM اختصاصی ضد توکسوپلاسما در یک نمونه منفرد لازم است .

در توکسوپلاسموز، آنتی‌بادی IgM، IgG، IgE، IgA تولید می‌شوند و در توکسوپلاسموز مادرزادی دو آنتی‌بادی IgM و IgA حائز اهمیت می‌باشند. بنابراین اندازه‌گیری IgA اختصاصی می‌تواند روش دقیق‌تری در تشخیص توکسوپلاسموز در زنان باردار و بیماران ایدزی باشد.

تیتر بسیار بالای آنتی‌بادی به تنهایی برای تشخیص توکسوپلاسموز فعال کافی نیست اما برای سایر روش‌های تشخیصی راهنمای مفیدی است.

وجود IgM در سرم نوزادان و کودکان چند ماهه، توکسوپلاسموز مادرزادی را مطرح می‌سازد.

در آزمایشات سرمی که فقط قادر به تعیین و تشخیص IgG در سرم نوزادان است به منظور نشان دادن توکسوپلاسموز مادرزادی، لازم است که پایداری IgG و یا افزایش تیتر IgG در ۶ ماه اول زندگی نوزاد وجود داشته باشد.

تشخیص توکسوپلاسموز حاد با روش سرولوژیک نیز با مشاهده تیترهای افزایشی آنتی‌بادی تأیید می‌گردد.

در تفسیر نتایج آزمایشات ایمونولوژی تاریخچه عفونت قبلی می بایست مد نظر قرار گیرد.

اگر IgM منفی باشد ولی تیتر IgG بالا باشد فرد ایمن می باشد.

اگر IgM و IgG هر دو بالا باشد در ابتدا عفونت می باشد. در توکسوپلاسموز حاد تیتر IgM به طور فزاینده افزایش می یابد. تیتر IgM همچنین گاهی اوقات تا یکسال پس از عفونت ممکن است بالا بماند.

هر تیتری IgM که در روش IFA در نوزادان تازه متولد شده بدست می آید، با ارزش است. اندازه گیری آنتی بادی IgM اختصاصی برای تشخیص زودهنگام عفونت حاد ضروری می باشد.

تیتر آنتی بادی IgG مثبت ضعیف تا متوسط (۱:۱۶ - ۱:۲۵۶) احتمالاً دلالت بر عفونت فرد در گذشته به انگل می باشد و تیتر خیلی بالا (>۱:۱۰۲۴) نشاندهنده عفونت فعال توکسوپلاسموز می باشد.

بعضی مواقع به دلایل مختلف ارزیابی صرفا IgM برای مراحل حاد توکسوپلاسما گوندی مفید نیست که از آن جمله می توان به پاسخ های طولانی مدت IgM، تاخیر در تولید این آنتی بادی و یا پاسخ های غیر اختصاصی پلی کلونال (IgM Polyclonal) بر علیه فاکتورهای گوناگون نام برد.

تشخیص توکسوپلاسما گوندی

تشخیص توکسوپلاسما گوندی در مدفوع گربه

۱- تشخیص در گربه با مشاهده اووسیست‌های نارس انگل صورت می‌گیرد که می‌تواند بطور مستقیم و یا در آلودگی‌های اندک با استفاده از روش تغلیظ مانند فلوتاسیون (سولفات دوزنگ، شیتر و ...) انجام می‌گردد.

۲- برای اسپرواله کردن و تشخیص افتراقی از کشت اووسیست‌های نارس کوکسیدیاها از جمله توکسوپلاسما در محیط بی‌کرومات ۵-۲ درصد استفاده می‌شود که طی مدت چند روز، اووسیست‌های دی‌اسپوروس و تترازوئیک به آسانی قابل مشاهده است.

تشخیص توکسوپلاسما گوندی در انسان و میزبانان واسط دیگر (موش و ...)

الف- تلقیح به حیوان حساس آزمایشگاهی:

با تلقیح مایعات و بافت‌های آلوده یا مشکوک به انگل به پریتوان حیوان حساس آزمایشگاهی و مشاهده کیست‌های مغزی پس از ۴ هفته صورت می‌گیرد.

ب- کشت سلولی:

از کشت سلولی (Vero) یا فیبروبلاست‌های MRC-5 نیز می‌توان استفاده کرد که زمان مطالعه فقط چند روز است.

ج- روش‌های ایمونولوژی:

۱- مشاهده توکسوپلاسما گوندی در نسوج بیوپسی شده با روش ایمنوسیتوکمیکال

۲- جستجوی آنتی‌ژن‌های انگل در خون افراد مشکوک

۳- بررسی اینترفرون گاما

۴- تست پوستی توکسوپلاسمین (ازدیاد حساسیت تأخیری)

۵- تست ترانس فورمیشن لنفوسیتی (LTT) با آنتی‌ژن‌های اختصاصی توکسوپلاسما

د- روش سرولوژی

جستجوی آنتی‌بادی در سرم افراد یا سرولوژی معمول‌ترین آزمایش تشخیص توکسوپلاسموزیس است و شامل انواع زیر می‌باشد:

۱- تست رنگی دای تست (Dye-test) یا سابین فیلدمن (Sabin-Feldman)

اساس آن عبارت است بی‌رنگ ماندن تروفوزوئیت توکسوپلاسما در حضور آنتی‌بادی به کمک عوامل رنگی مانند بلودو متیلن قلیایی با pH =۱۱

در این روش سرم بیمار با انگل زنده که از صفاق موش بدست آمده مجاور شده و لزوماً نشان‌دهنده عفونت فعال نیست و مانند تست توبرکولین عمدتاً نشان‌دهنده تماس قبلی با عامل بیماری است و IgG را می‌سنجد. ضمناً هر چه میزان آنتی‌بادی بر علیه انگل در سرم زیاد باشد انگل کمتر رنگ می‌گیرد.

۲- ایمنوفلورسنت غیرمستقیم (IFA: Indirect fluorescent Antibody)

در میان تست‌های سرولوژی، تست IFA به صورت متداول و رایج انجام می‌گیرد. در این روش از تک‌یاخته کشته شده به عنوان آنتی‌ژن استفاده می‌شود.

در این روش ابتدا آنتی ژن فیگوره (تولید انستیتوپاستور ایران) توکسوپلاسما گوندی (تاکی زوئیت) را به فاز ثابت (لام) متصل می کنند . در مرحله بعد، از سرم بیماررقت های (1/200،1/100و1/20) تهیه کرده و به فاز ثابت می افزایند .سپس آن را در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه می کنند .اگرآنتی بادی های ضد توکسوپلاسمائی در سرم وجود داشته باشند، به آنتی ژن فیکس شده بر روی لام متصل می شوند. پس از انجام مراحل شستشو، آنتی هیومن آنتی بادی نشان دارشده با ماده فلورسئین را اضافه می کنند . در ادامه پس ازطی شدن مرحله دوم انکوباسیون در دمای37 درجه سانتی گراد و انجام شستشو، در صورت اتصال آنتی هیومن آنتی بادی نشاندار شده با

فلورسئین به آنتی بادی باند شده به آنتی ژن توکسوپلاسمائی، در زیر میکروسکوپ، رنگ فلورسانس رویت خواهد شد که نشانه مثبت بودن آزمایش می باشد.(کیت IFA ساخت شرکت بهار افشان)

در تست IFA، واکنش متقاطع با آرتریت روماتوئید یا روماتیسم مفصلی و آنتی‌نوکلئر آنتی‌بادی (ANA) وجود دارد و واکنش مثبت کاذب مشاهده می‌شود.

۳- هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (IHA)

آنتی‌ژن به صورت محلول (Suluable) بوده و با گلبول قرمز گوسفند حساس شده با اسید تانیک پوشش داده می‌شوند و چنانچه در مجاورت سرم حاوی آنتی‌بادی قرار بگیرد، منظره آگلوتیناسیون در لوله یا پلیت قابل مشاهده است. دقت آن به اندازه IFA نیست، معمولاً عیار ۱/۲۵۶ دلیل بر مشکوک بودن بیماری است.

۴- ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assaay

تست الایزا به دلیل عدم واکنش متقاطع و میزان حساسیت بالا، همچنین قدرت تعیین نوع آنتی‌بادی بر تست IFA ارجح است.

برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی IgM حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین روش سرولوژی، ساندویچ دولایه الایزا می‌باشد که واکنش متقاطع در آن وجود ندارد.

سنجش آنتی بادی IgM ضد توکسوپلاسما گوندی به روش الایزا

اساس آزمایش:

این کیت به روش Antibody capture طراحی شده است . چاهک های پلیت Anti- human IgM antibody پوشانده شده اند . در هنگام آزمایش ، نمونه های رقیق شده داخل چاهکها ریخته می شوند . تمامی IgM های موجود در نمونه سرم (از جمله IgM های ضد توکسوپلاسما) به آنتی بادیهای کف چاهک متصل می شوند . پس از شستشوی اولیه ، آنتی بادیهای باند نشده جدا شده و در مرحله بعد کونژوگه کیت که شامل آنتی ژن توکسوپلاسما

کونژوگه شده با HRP می باشد اضافه می گردد که آنتی ژن فوق به IgM اختصاصی توکسوپلاسما متصل شده و ایجاد کمپلکس می نماید . پس از شستشو ، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی ، متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها است . افزودن محلول متوقف کننده ، رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت:

۱) پلیت ۴۸ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با Anti-human IgM

۲) محلول آنزیم کونژوگه غلیظ ۲۰ x (Enzyme conjugate20x) :یک ویال حاوی ۵۰۰ میکرولیتر از آنتی ژن توکسوپلاسما نشاندار شده با پراکسیداز در محلول بافری حاوی پروتئین و نگهدارنده

۳) محلول رقیق کننده کونژوگه (Conjugate Diluent) :یک ویال حاوی ۸ میلی لیتر محلول بافری حاوی پروتئین و نگهدارنده

۴) محلول رقیق کننده نمونه(Sample Diluent) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول ، جهت رقیق کردن نمونه ها.

۵) سرم کنترل مثبت (Positive Control) :یک ویال حاوی ۱ میلی لیتر محلول بافری ، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵ ٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده ، حاوی آنتی بادی IgM علیه توکسوپلاسما

۶) سرم کنترل Cut -Off: یک ویال حاوی ۱ میلی لیتر محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵ ٪کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده ، حاوی آنتی بادی IgM علیه توکسوپلاسما.

۷) سرم کنترل منفی (Negative Control): یک ویال حاوی ۱ میلی لیتر محلول دارای بافر فسفات و ۰/۰۵ ٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادی IgM علیه توکسوپلاسما

۸) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen- Substrate): یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف)

۹) محلول شستشو : یک ویال حاوی ۲۵ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵ ٪توئین . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید

۱۰) محلول متوقف کننده (Stop Solution) یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر اسید کلریدریک یک نرمال

۱۱) برچسب مخصوص پلیت.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند:

۱) دستگاه الایزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان رفرانس)

۲) سمپلر های ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق

۳) انکوباتور 37°C

۴) آب مقطر

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان

۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند

۲) این کیت صرفا جهت اندازه Anti- Toxoplasma IgM در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است

۳) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید

۴)کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادیهای ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند ، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.

شرایط نگهداری :

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید

۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید . پایداری پلیت بعد از باز کردن کیسه آن ۴ ماه میباشد

۳) پایداری محتویات کیت (قبل از باز شدن درب کیت) تا پایان مدت انقضاء یاد شده بر روی هر یک از آنها می باشد

۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود ، نمونه میتواند برای مدت دو روز در دمای ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد استفاده کرد (در ضمن باید از Freeze- thaw کردن نمونه پرهیز شود) . از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود.

آماده سازی محلولها

محلول کونژوگه آماده مصرف : برای تهیه مقدار کونژوگه مورد نیاز ، کونژوگه غلیظ را توسط محلول رقیق کننده کونژوگه به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق کنید . بطور مثال برای تهیه ۱ میلی لیتر محلول کونژوگه آماده مصرف ، ۵۰ میکرولیتر از آنزیم کونژوگه غلیظ را با ۱ میلی لیتر محلول رقیق کننده کونژوگه به خوبی مخلوط نمایید

توضیحات عمومی

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند

۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند

۳) باید از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود

۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده ، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد

۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند

۶) در هنگام سمپلینگ تمام محلولها و نمونه ها را وسط و ته چاهکها بریزید

۷) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان انکوباسیون مناسب می باشد . بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب آنها را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق تر می شود.

مراحل انجام آزمایش:

۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب کرده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید

۲) نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱ میلی لیتر محلول رقیق کننده نمونه)

توجه : کنترلهای کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند

۳) ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل ها و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید : سه چاهک اول را برای بلانک ، کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر بگیرید . سرم کنترل Cut -off را بصورت دوپلیکیت در دو چاهک بعدی ریخته و سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید

۴) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت ، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید

۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید . برای شستشو چنانچه دستگاه واشر اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد . در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو ، چاهکها را در حالت وارونه با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند.

۶) ۱۰۰میکرولیتر از آنزیم کونژوگه آماده مصرف را داخل همه چاهکها به استثنای چاهک بلانک بریزید

۷) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت ، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید

۸) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید)همانند بند ۵

۹) ۱۰۰میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen -Substrate) به همه چاهکها از جمله چاهک بلانک اضافه نمایید

۱۰) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید

۱۱) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop -Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید توصیه میشود از فیلتر nm ، برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر 450 nmاستفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید .توصیه میشود از فیلتر 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد.

ارزشیابی آزمایش

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد

*جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای بلانک ، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است

*جذب نوری کمتر از ۰/۱۵ برای کنترل منفی ، در صورت بیشتر بودن این جذب نوری ، احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته است ، آزمایش را دوباره انجام داده و در مراحل شستشو دقت کنید

*میانگین جذب نوری بیشتر از ۰/۱۵ برای سرم کنترل Cut- off

*جذب نوری بیشتر از ۰/۶ برای کنترل مثبت

محاسبه نتایج

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج 450 nm می توان استفاده نمود

۱)جذب نوری کنترلها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج 450 nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس 630nm بخوانید

۲)جذب نوری بلانک را از کنترلها و نمونه ها کم کنید

۳)جهت محاسبه مقدار Cut- off ، میانگین جذب نوری سرم کنترل Cut- off را بدست آورید

Cut - off value = Mean OD of Cut - off control

برای تعیین جوابهای مثبت و منفی ، مقدار ایندکس را از تقسیم جذب نوری نمونه بر مقدار Cut - off بدست آورید

Cut - off Index (COI) = OD of sample/Cut - off value

بر اساس این فرمول مقادیر بالاتر از ۱/۱ مثبت و پایین تر از ۰/۹ منفی قلمداد می شوند . نمونه هایی که مقدار ایندکس آنها بین ۱/۱ - ۰/۹ می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسمای تازه مجددا" آزمایش شوند.

بررسی نتایج

جواب منفی نشان دهنده عدم وجود آنتی بادی IgM علیه توکسوپلاسما می باشد . منفی گزارش گردند .

جوابهای مثبت باید مجدداً تکرار شوند . نمونه های مثبتی که در تکرار مجدد منفی میشوند ، باید منفی گزارش شوند. مثبت شدن آزمایش در مرتبه اول می تواند به دلیل خطای کاری در مراحل شستشو و یا نمونه برداری باشد

شاخصهای اجرایی

۱) حساسیت :

۳۰ عدد سرم مثبت تائید شده با روش کمی لومینسانس و الایزای مرجع با این کیت آزمایش شدند که همگی مثبت بودند . با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی IgM علیه توکسوپلاسما ، ۱۰۰ درصد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد

۲) اختصاصیت :

۱۵۰ عدد سرم منفی به طور همزمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با روش این کیت ۱۴۸ نمونه منفی و ۲ نمونه مثبت بودند و این ۲ نمونه مجددا با کیت تکرار شدند. در تکرار مجدد ، ۱ سرم منفی و یک سرم مثبت گزارش شدند اختصاصیت کیت در حدود ۹۹ درصد می باشد . جهت بررسی تداخلات ۱۴ نمونه (۹ نمونه مثبت ANA و۵ نمونه مثبتRF) که با دو کیت دیگر به روش الایزا منفی بودند با کیت پیشتاز طب نیز مورد بررسی قرار گرفتند که همگی منفی بودند..

دقت آزمایش :

جهت بررسی تکرارپذیری کیت ، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله کنترل منفی و مثبت و یک نمونه سرمی مثبت ضعیف انجام شده است.

الایزا اویدیتی (ELISA Avidity)

یکی از ابزارهای الایزای اویدیتی کشف مراحل حاد یا مزمن بیماری‌های عفونی مانند توکسوپلاسما گوندی است.

بعضی مواقع به دلایل مختلف ارزیابی صرفاً IgM برای مراحل حاد توکسوپلاسما گوندی مفید نیست که از آن جمله می‌توان به پاسخ‌های طولانی‌مدت IgM تأخیر در تولید این آنتی‌بادی و یا پاسخ‌های غیراختصاصی پلی‌کلونال IgM (Polyclonal)بر علیه فاکتورهای گوناگون نام برد.

در سال‌های اخیر کشف روش الایزای اویدیتی در بررسی عفونت‌های اخیر با انگل توکسوپلاسما گوندی راهکاری مناسب برای این موضوع است که فقط به ارزیابی آنتی‌بادی از کلاس IgG می‌پردازد.

در اوایل عفونت مقدار آنتی‌بادی IgG در اتصال به آنتی‌ژن در حالت Low Avidity قرار دارد و با ادامه عفونت تمایل آنتی‌بادی مذکور برای آنتی‌ژن انگل توکسوپلاسما گوندی افزایش می‌یابد و در حالت High Avidity قرار می‌گیرد که نشانه عفونت طولانی‌مدت می‌باشد.

یکی از راه‌های انتقال بیماری توکسوپلاسموزیس مادرزادی از طریق جفت به جنین می‌باشد که تشخیص این بیماری را در این مرحله بسیار حائز اهمیت می‌نماید.

توکسوپلاسموزیس مادرزادی چنانچه در سه ماهه اول بارداری رخ دهد به سقط جنین و اختلالات اعصاب مرکزی و چشمی منجر می‌شود. لذا روش‌های تشخیصی دقیق در بررسی زنان مبتلا به عفونت توکسوپلاسموزیس حائز اهمیت می‌باشد که شامل روش‌های سرولوژی مانند الایز ا والایزا اویدیتی هستند.

در روش الایزای ساده تنها آنتی‌بادی‌های IgG و IgM شناسایی می‌شوند اما در روش جدیدتر که در تشخیص این انگل به کار می‌رود و الایزای اویدیتی نام دارد زمان ابتلای مادر به این انگل بررسی شده و تعیین می‌گردد.

هدف از انجام این بررسی، استفاده از روش جدید الایزا اویدیتی در تعیین زمان ابتلا مادران به انگل توکسوپلاسما گوندی بود.

زمان ابتلاء مادر به انگل توکسوپلاسما گوندی در روش الایزای اویدیتی تا حدود زیادی تعیین می‌گردد.

در حالت‌های اویدیتی پایین ابتلا مادر در زمان‌های خیلی دور است اما در حالت اویدیتی بالا ابتلاء مادر در همین اواخر می‌باشد.

در روش الایزای ساده در تشخیص توکسوپلاسموزیس نتایج مثبت کاذب فراوان است مانند آنتی بادی در بیماران سیستمیک لوپوس (Systemic Lupus) و یا آرتریت روماتوئید (Rheumatoid Arthritis) اما در الایزای اویدیتی این موضوع مرتفع شده است و نتایج مثبت کاذب وجود ندارد.

روش الایزا اویدیتی در تشخیص توکسوپلاسموزیس مادرزادی

انجام آزمایش با کیت الایزا اویدیتی :

مقدار100µl از نمونه های مورد آزمایش را در چاهک های مخصوص مورد آزمایش ریخته و به مدت 30 دقیقه در دمای 18 تا 25 درجه سانتی گراد آزمایشگاه انکوبه می کنیم .سپس سه مرتبه توسط محلول شستشو به میزان 300µl عمل شستشو را انجام می دهیم که این مرحله بسیار در نتیجه نهایی آزمایش تاثیر گذار است ، لذا دقت در این مرحله الزامی است.

در آزمایش نیمه کمی در این مرحله 100µl محلول آنزیم کونژوگه (Conjugate) را در چاهک ها ریخته و مدت زمان انکوباسیون دراین مرحله نیز 30دقیقه در دمای آزمایشگاه می باشد . مجدد ا روش شستشو مانند قبل صورت می گیرد و سپس 100µl محلول سوبسترا (Substrata) درچاهک های مورد نظر توسط سمپلر (Sampler) می ریزیم و پلیت را به مدت 15 دقیقه در دمای محیط انکوبه می کنیم .بعد از گذشت مدت زمان لازم 100µ محلول متوقف کننده واکنش را در چاهک های مورد نظر ریخته و در مدت زمان حداکثر 30 دقیقه پلیت را در طول موج 450لاندا با دستگاه ELISA reader قرائت می کنیم.

در روش کمی این آزمایش قبل از اضافه کردن محلول آنزیم کونژوگه یک مرحله اضافه داریم که شامل افزودن محلول های 200µl بافر اوره به یک سری پلیت ها و افزودن 200µl محلول فسفات بافر به یک سری دیگر از پلیت ها است .

در روش الایزا اویدیتی بافر های اوره و فسفات استفاده می گردند که در الایزای ساده کاربردی ندارند.

محاسبه نتایج حاصل از روش نیمه کمی الایزا ی اویدیتی:

اگر نسبت OD بیماران نسبت به کالیبراتور کمتر از ۰,۸ باشد نتیجه منفی، اگر بین ۰,۸ الی ۱,۱ نتیجه درحد مرز و اگر نتیجه بالاتر۱,۱ باشد نتیجه الایزا اویدیتی مثبت است.

محاسبه نتایج با روش کمی الایزا اویدیتی:

نسبت OD سرم بیماران در پلیت های حاوی بافر اوره به OD سرم بیماران در پلیت های حاوی بافر فسفات را محاسبه کرده و به ۱۰۰ ضرب می کنند که نتیجه نهایی به صورت درصد بیان می شود و تحت عنوان (Relative Index Avidity) RIA بیان می گردد.

اگر RIA کمتر از % 40 باشد نشانه Low Avidity Antibody است و اگر بین ۴۰٪ تا ۶۰٪ نشانه Intermediate Avidity، و اگر بالاتر از ۶۰٪ باشد High Avidity Antibody را بر علیه انگل توکسوپلاسما گوندی نشان می دهد.

۵- آگلوتیناسیون مستقیم (DAT)

آنتی‌ژن به صورت فیگوره می‌باشد و تست مناسبی در غربالگری‌ها می‌باشد.

۶- PCR (Molecular methods (polymerase Chain Reaction))

استفاده از روش PCR به منظور جستجوی توالی یا سکانس اختصاصی بازهای ژن توکسوپلاسما می‌باشد.
از مزایای استفاده این روش‌ها سرعت نسبی زیاد، پتانسیل بالای شناسائی، تشخیص مقادیر بسیار کم پاتوژن و نیز توانائی افتراق دقیق در سطح گونه و زیرگونه می‌باشد.

یافته‌های مثبت PCR نمونه‌های خون، CSF (Cerebral Spinal fluid)، مایع آمنیوتیک، لاواژ برونکوآلوئولار، دلالت بر عفونت فعال توکسوپلاسموزیس داشته و از نظر کلینیکی حائز اهمیت می‌باشد، اما تعیین توکسوپلاسما در بافت‌های سخت مانند قلب، ماهیچه و مغز منوط به تأئید با روش‌های دیگر است زیرا PCR نمی‌تواند فعال بودن یا غیرفعال بودن انگل را تأئید کند.

۷- کمی‌لومینسانس (Chemiluminescense)

در روش کمی‌لومینسانس، ترکیبات آلی نظیر لومینول، ایزولومینول و استرهای آکریدینیوم در حضور یک عامل اکسیدکننده مانند پراکسید هیدروژن و یک کاتالیزور نظیر آنزیم میکروپراکسیداز و یون‌های فلزی، اکسید شده و

نور منتشر از فرآورده تهییج شده به شکل یک جرقه ناگهانی از نور (light of Flash) حاصل می‌آید که توسط لومینومتر قرائت می‌گردد.

در این نمونه‌های سرمی به ذرات Magnet اضافه می‌شوند. در طی اولین انکوباسیون، آنتی‌بادی ضد توکسوپلاسمایی موجود در نمونه‌های سرمی با آنتی‌ژن موجود در فاز جامد باند می‌شود و سپس با استفاده از محلول شستشو، مواد اضافی غیرباند از محیط خارج می‌گردد. در طی دومین انکوباسیون، آنتی‌بادی مونوکلونال متصل به ایزولومینول با آنتی‌بادی ضدتوکسوپلاسمایی باند شده بر روی فاز جامد، واکنش داده و سپس در اثر شستشوی ثانویه، مواد اضافی غیرباند از محیط خارج می‌گردد. در پایان، محلول starter که شامل عامل اکسیدکننده (پراکسید هیدروژن) و همچنین کاتالیزور (آنزیم میکروپراکسیداز و یون‌های فلزی) می‌باشد؛ بر روی باقیمانده مواد اضافه می‌شود. بر اثر فعل و انفعالات شیمیایی که بر روی ایزولومینول صورت می‌گیرد، جرقه ناگهانی از نور (Light of Flash) حاصل می‌شود که توسط لومینومتر ثبت می‌گردد.

چهار روش در سیستم الکتروکمی لومینسانس وجود دارد:

۱) روش رقابتی جهت اندازه‌گیری آنالیت‌های کوچک

۲) روش ساندویچ (یک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای) جهت اندازه‌گیری آنالیت‌های بزرگ

۳) روش پل زدن (Bridging) برای تشخیص آنتی‌بادی‌ها

۴) روش سنجش پروب‌های نوکلوئیک اسید

روش پل زدن (Bridging)

در این روش از دو نوع آنتی‌ژن کنژوگه شده (کنژوگه با بیوتین و کنژوگه با روتنیوم) استفاده می‌شود. این روش شبیه به روش ساندویچ بوده با این تفاوت که در این روش آنتی‌بادی مورد سنجش می‌باشد (مانند IgG، IgM و IgA).

در اولین گام، آنتی‌بادی مورد هدف در سرم به آنتی‌ژن نشان‌دار متصل شده و کمپلکس ایمنی تشکیل می‌دهند.

در مرحله دوم این کمپلکس ایمنی به استرپتوآویدین پوشیده شده در سطح میکروپلیت‌ها متصل می‌شود.

پس از انکوباسیون دوم مخلوط واکنش شامل کمپلکس ایمنی به سلول اندازه‌گیری و به دستگاه ECL منتقل می‌شود. کمپلکس ایمنی بر روی الکترود مغناطیسی متصل شده و نمونه‌ها و معرف‌های اضافی توسط محلول شستشو خارج می‌گردند. سپس واکنش ECL در سطح الکترود که باعث ایجاد نور می‌شود صورت می‌پذیرد.

در این مرحله میزان نور تولید شده با مقدار مولکول موجود در نمونه رابطه مستقیم دارد. در روش ECL ارزیابی و محاسبه غلظت مولکول از طریق منحنی کالیبراسیون انجام شده که آن نیز به واسطه غلظت استانداردها رسم شده است.

تشخیص قبل از تولد توکسوپلاسموزیس مادرزادی به روش‌های زیر قابل انجام است:

۱- جستجوی آنتی‌بادی اختصاصی کلاس IgM در خون جنین

۲- کشت خون جنین یا مایع آمنیوتیک به موش یا کشت سلولی

۳- اولتراسوند و مشاهده بزرگ شدن یطن‌های مغز جنین در تصاویر بدست آمده

در مقایسه روشهای سرولوژی، درروش IFA و ELISA مراحل انجام آزمایش به صورت manual و دستی می باشد، در نتیجه تکرارپذیری آزمایش کمتربوده و احتمال تأثیر فاکتورهای محیطی در آزمایش بر روی نتایج بیش تر می باشد و همچنین اگر سرم بیماردارای عوامل بالقوه پاتوژن باشد، شانس آلودگی پرسنل در حین انجام مراحل آزمایش نسبت به روشهای اتوماتیک بیش تر است . تکرار آزمایشات با تعداد کم نمونه، بسیار هزینه بر بوده و نگهداری نمونه ها برای نوبت بعدی آزمایشات باعث صرف نیروی انسانی می شود . درروش CLIA (Chemiluminescense) مراحل انجام آزمایش به صورت اتوماتیک می باشد، در نتیجه زمان آزمایش کوتاه تر بوده واشتباهات و خطاها فردی و تکنیکی حذف می گردند. در روش CLIA، تکرارپذیری آزمایشات بالا رفته وهزینه پرسنلی پایین می باشد. وجود کالیبراسیون پایدار(حداقل ۲هفته) سبب می شود تا در هر زمانی بتوان نمونه آزمایش را با سرعت و دقت بالا انجام داد که خود باعث از بین رفتن هزینه کالیبراسیون متعدد می شود. بالاتر بودن محدوده سنجش سبب می شود تا دراکثر موارد، آزمایش بر روی نمونه، بدون نیاز به رقیق سازی انجام شود.

در روش CLIA امکان رقیق سازی خودکار توسط خود دستگاه وجود دارد .همچنین بالاترین سرعت انجام آزمایشات مربوط به روش CLIA بر روی دستگاه LAISION می باشد. محدودیت های این روش فقط می توانست بار مالی ناشی از خرید کیت وملزومات باشد.

تشخیص توکسوپلاسموز چشمی

مشاهده علایم بالینی و آزمایش سرولوژی که بر روی نمونه‌های رقیق نشده انجام شود، مفید است. در مواردی از توکسوپلاسموز چشمی که آنتی‌بادی در سرم پیدا نشود می‌توان آنتی‌بادی را در اطاق قدامی چشم بدلیل تولید موضعی آنتی‌بادی، بدست آورد.

عوامل محیطی مساعدکننده انتقال توکسوپلاسموز به انسان

ـ گربه‌های خانگی و ولگرد

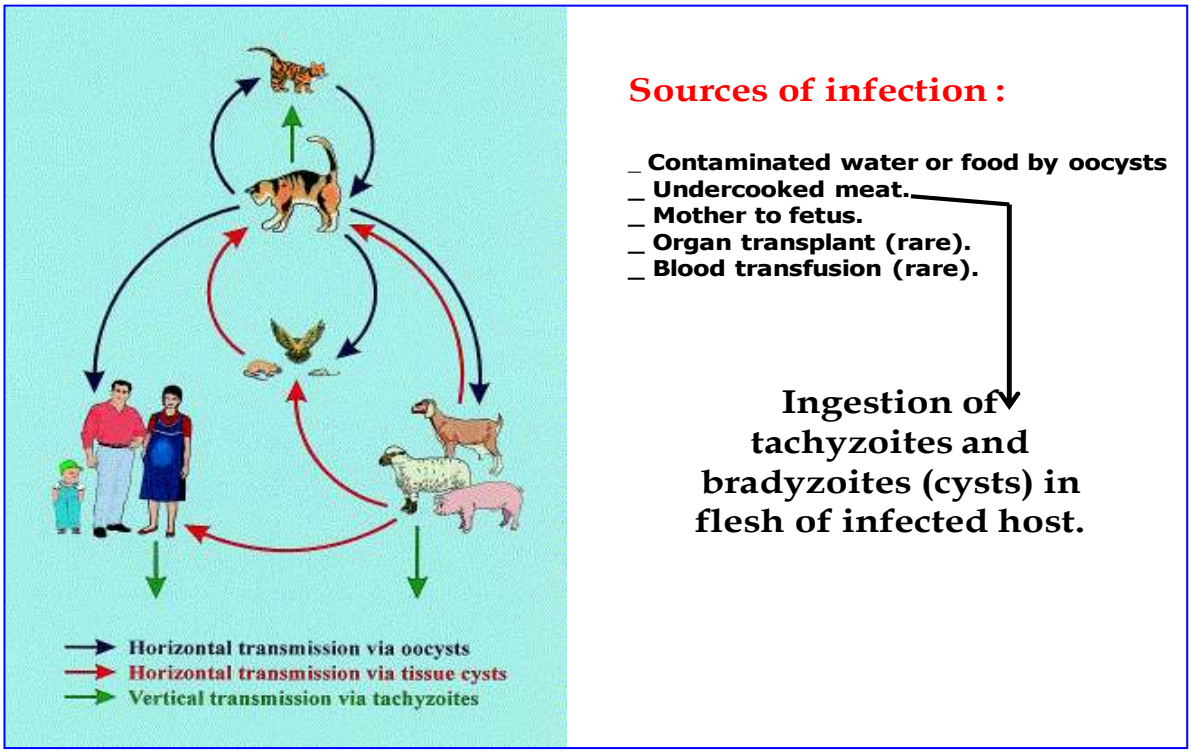
ـ هوای معتدل و مرطوب

ـ تماس نزدیک کودکان با خاک آلوده به مدفوع گربه

ـ مصرف سبزیجات

ـ آب‌های آلوده مخازن

عوامل ریسک آلودگی در انسان



شکل۶- راه‌های انتقال توکسوپلاسماگوندی

مواردی را می‌توان بعنوان عوامل ریسک آلودگی توکسوپلاسموز در انسان مورد توجه قرار داد:

۱- «مصرف گوشت خام حاوی کیست بافتی توکسوپلاسما». در آمریکا این مسئله بخصوص بشکل مصرف گوشت خوک و گوسفند ایجاد می‌شود. گاه آلودگی به انگل از طریق خوردن سایر فراورده‌ها شکل می‌گیرد.

۲- «مصرف آب، خاک، سبزیجات و هر ماده آلوده به اووسیست‌ها» که از طریق مدفوع حیوان مبتلا آلوده شده باشند. مدفوع گربه از این نظر خیلی خطرناک است. تنها مصرف یک کیست توسط یک گربه فوراً تبدیل به هزاران کیست می‌شود. به همین دلیل پزشک‌ها توصیه می‌کنند افراد آبستن و مریض بهیچ وجه به تمیز کردن جعبه استراحت و خواب گربه‌ها دست نزنند. این اووسیست‌ها در برابر شرایط سخت محیطی مقاوم هستند و در خاک آلوده به مدت یک سال دوام می‌آورند.

۳- «از طریق انتقال خون یا انتقال بافت»

۴- «از طریق انتقال جفتی از مادر به جنین» بویژه وقتی انگل در دوره آبستنی به فرد رسیده باشد.

۵- «از طریق مصرف شیر بز پاستوریزه نشده»

۶- «آلودگی از طریق تماس با خاک»

۷- «از طریق خوردن سبزی و میوه نشسته»

۸- تمیز کردن جعبه آشیانه گربه‌ها یک میسر بالقوه آلودگی است.

گرچه مطالعات زیادی نشان داده که زندگی یک گربه در خانه بمعنی عامل خطر جدی برای انتقال عفونت نیست ولی زندگی گربه با چند بچه گربه اثر معنی‌داری در انتقال آلودگی به انسان دارد.

در حیوانات خونگرم مثل موش قهوه‌ای، گوسفند و سگ، این انگل از طریق انتقال جنسی نیز منتقل می‌شود.

فرض است که در انسان بصورت جنسی منتقل شود گرچه تا کنون ثابت نشده است. فاضلاب‌ها بعنوان محیط انتقالی برای این انگل عمل می‌کنند.

تأثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی بر کیست توکسوپلاسما گوندی در گوشت

برای از بین بردن کیست‌های بافتی، گوشت باید حداقل ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ یا به مدت ۲ روز در 12^{0C}- بماند، اما حرارت، مؤثرترین روش می‌باشد.

همچنین تهیه گوشت با استفاده از محلول‌های غنی‌کننده نظیر لاکتات سدیم یا پتاسیم موجب از بین بردن کیست‌های بافتی توکسوپلاسما گوندی می‌گردد که بستگی به اثر متقابل غلظت نمک، دما و مرحله جنسی انگل دارد.

استفاده از فنآوری‌های مدرن پردازش مواد غذایی مانند فشار بالا یا تابش اشعه گاما نیز برای غیرفعال کردن انگل کاربرد دارد.

اپیدمیولوژی

شیوع توکسوپلاسموز به شرایط آب و هوایی، فرهنگ و میزان تماس با گربه بستگی دارد.

آب و هوای معتدل و رطوبت دو عامل مهم تاثیر گذار در میزان شیوع عفونت می باشند.

معمولاً شرایط آب و هوایی گرم و خشک با شیوع اندک عفونت همراه است.

شیوع آن با افزایش سن و تماس بیشترمی‌شود. برای مثال در ایالات متحده ۵ تا ۳۰٪ افراد در سن ۱۰ تا ۱۹ سالگی و ۱۰ تا ۶۷٪ افراد بالای ۵۰ سال سروپوزتیو هستند. بالاترین نرخ عفونت (۹۳٪) در زنان پاریسی که تمایل به مصرف گوشت نیم پز یا خام دارند دیده می‌شود.

دربرخی جزایر اقیانوس آرام که گربه وجود ندارد آنتی بادی توکسوپلاسما نیز وجود ندارد.

در ایران به دلیل مصرف گوشت تازه و غیر یخ زده، احتمالا مصرف گوشت یکی از روش‌های انتقال بشمار آید. شیوع این انگل در شمال کشور بیش از ۵۵٪، در آذربایجان کمتر از ۴۰٪، در سیستان و بلوچستان حدود ۳۰٪، در خوزستان حدود ۴۵٪ و در تهران نزدیک به ۵۰٪ گزارش شده است.

شیوع آلودگی در جهان متفاوت و از ۰,۹۷ تا ۸۴ درصد در جوامع گزارش شده است. شیوع عفونت حاد نیز ۸-۱ در هزار حاملگی گزارش شده است. در آمریکا مرگ افراد مبتلا به ایدز تا ۱۰٪ و در اروپا تا ۳۰ درصد ناشی از

توکسوپلاسموز است .انسیدانس توکسوپلاسموز مادرزادی در اروپا حدود ۶ در هزار تولد و در ایران ۴,۲ در هزار می باشد.

در مطالعه ای که در سال ۱۳۸۵ بر روی ۱۰۰ گربه توسط حداد زاده و همکاران در دانشگاه تهران انجام گرفت، بیانگر ۹۰ ٪ آلودگی به توکسوپلاسما در ۵۰ گربه ولگرد و ۳۶ ٪ آلودگی در ۵۰ گربه خانگی بود که علت بالای آلودگی در گربه های ولگرد به دلیل تغذیه ی آنها از جوندگان عنوان گردیده است.

در بررسی دیگری که توسط هوشیار و همکاران به روی ۵۰ گربه ولگرد در سطح شهر کاشان در سال ۱۳۸۵ صورت گرفت، نشان دهنده ۸۶ ٪ شیوع توکسوپلاسموز در بین گربه های موجود در مطالعه بود که علت درصد بالای آلودگی تغذیه گربه های ولگرد از جوندگان و پرندگان بوده است.

تا کنون گزارشهای متعددی در مورد میزان شیوع آنتی بادی ضد توکسوپلاسما در جوامع انسانی در ایران ارایه شده است. نتایج حاصل از این تحقیقات بیانگر تفاوت میزان شیوع آلودگی در مناطق مختلف جغرافیایی است بطوریکه شیراز با۲۱/۳ درصد آلودگی وشهر ری با ۶۸/۳ درصد دارای کمترین و بیشترین آلودگی در ایران نشان می دهد.

توکسوپلاسموزیس در پستانداران گیاه خوار و گوشتخوار و پرندگان متعددی ایجاد می شود.

در انسان عفونت با این انگل در همه گروههای سنی گزارش شده است.

پیشگیری

۱) خانم‌های باردار و یا خانمهایی که تصمیم به بارداری دارند، حتماً تست توکسوپلاسموز را انجام دهند چرا که در صورت ابتلا، درمان به موقع می‌تواند به طور چشمگیری از احتمال خطرات آن برای جنین جلوگیری کند.

۲) در صورت آلودگی نوزاد، باید درمان شروع شود و نوزاد آلوده تحت درمان دارویی قرار گیرد.

۳) گوشت خام یا گوشتی که کاملاً پخته نشده است را مصرف نکنید. تمام گوشت‌ها باید کاملاً پخته شوند تا دمای آن قبل از مصرف به حداقل ۶۰ درجه سانتی‌گراد برسد.

۴) به مدفوع گربه دست نزنید و اگر خاک گلدان یا باغچه را عوض می‌نمایید، این کار را با دستکش انجام دهید و پس از اتمام کار، حتما دست‌ها را با آب و صابون بشویید.

۵) اگر در منزل گربه دارید، گوشت خام به او ندهید و نگذارید که به هر مکان آلوده‌ای رفت و آمد کند.

۶) تمام میوه و سبزیجات خصوصا آن دسته که به صورت خام مصرف می‌شوند را کاملاً ضدعفونی کرده و با آب بشویید.

۷) ذبح گوسفندان جوان، رعایت زنجیره سرد گوشت قبل از مصرف، پرورش دام‌ها با رعایت اصول بهداشتی در دامداری‌ها و ممانعت از ورود گربه به دامداری‌ها خطر ناشی از انتقال انگل توکسوپلاسما از راه گوشت را کاهش می‌دهد.

۸) کنترل گربه‌های ولگرد، کنترل سوسک و حشرات، تغذیه گربه‌های خانگی با غذای پخته و جلوگیری از خروج گربه‌های خانگی از منزل و شکار پرندگان و جوندگان و شستشو و ضدعفونی ظرف غذای گربه با مواد ضدعفونی معمول از شیوع آلودگی جلوگیری می‌نماید.

قابل ذکر است این انگل برای افرادی نظیر دامداران، دامپزشکان و قصابان، یک خطر شغلی محسوب می‌شود.

در برخی کشورهای اروپایی و همچنین نیوزلند از واکسن زنده حاوی تاکی‌زوئیت انگل جهت ایمن‌سازی گوسفندان استفاده می‌شود و به دلیل ماندگاری کم باید سریع تلقیح شود.

۹) در محیط اووسیست‌ها در مدفوع گربه حداقل یک روز طول می‌کشد که اسپرولە شوند و بعد از ریخته شدن به بیرون از طریق مدفوع آلوده‌سازی کنند بنابراین از برداشت مدفوع گربه‌ها بصورت روزانه شانس حضور اووسیست‌های آلوده در مدفوع را کاهش می‌دهد.

اووسیست‌های آلوده ناشی از مدفوع گربه ماه‌ها در محیط باقی می‌ماند و در زمان باغبانی یا کار با خاک به انسان منتقل می‌شود. انسان باید بعد از دفن فضله گربه به سرعت دست‌هایش را بشوید.

افراد مبتلا به بیماری‌های ایمنی و افراد آبستن در معرض خطر بالاتری جهت انتقال آن‌ها به جنین قرار دارند. به همین دلیل نباید دست به مدفوع گربه و آشیانه آنها بزنند. ایده‌آل آن است که گربه‌ها بیرون خانه نگه داشته شوند و به آن‌ها غذاهای عاری از اووسیست داده شود. غذاهای کنسرو شده گربه یا غذای پخت آشپزخانه مناسب است.

درمان

با علم به این که دارو در شکل کیستی تاثیری بر انگل ندارد،موارد مزمن احتیاج به درمان ندارد.در موارد حاد با علایم بالینی از (prymethamin و Sulfanamide) به طور توام استفاده می شود که اولی بر روی اشکال نسجی و دومی بر روی اشکال خونی موثر می باشد.

۱- درمان توکسوپلاسموز اکتسابی

در بالغین بدون علامت، درمان ضرورتی ندارد. در افراد دارای علامت از پریمتامین (داراپریم) بعلاوه یکی از ترکیبات سولفانامید مانند سولفاپیریمیدین یا سولفامتازین استفاده می‌شود.

مکانیسم اثر سولفانامیدها، تداخل در سنتز اسیدهای نوکلئیک است.

مکانیسم اثر پیریمتامین مهار اثر آنزیم دی‌هیدروفولات ردکتاز می‌باشد.

در زنان باردار مبتلا به توکسوپلاسما به جای پرمتامین که اثر سوء بر جنین دارد از اسپیرامین استفاده می‌شود.

۲- درمان توکسوپلاسموز مادرزادی

کودکان مبتلا بلافاصله باید درمان شوند و درمان کودکان و نوزادان با پیریمتامین و سولفانامید است و در مواردی یک دوره اسپیرامایسین نیز تجویز می‌شود.

۳- درمان توکسوپلاسموز چشمی

در رتینوکوروئیدیت حاد، پریمتامین تجویز می‌گردد، کورتیکواستروئیدها نیز با اثرات ضد التهابی مفید می‌باشند.

۴- درمان توکسوپلاسموز در بیماران نقص ایمنی

برای درمان انسفالیت توکسوپلاسمایی در افراد مبتلا به ایدز از کلیندامایسین داخل وریدی استفاده می‌شود.

واکسیناسیون

واکسن: از آنجا که مصرف گوشت نیم‌پخته، حاوی کیست‌های بافتی، منبع اصلی عفونت انسان می‌باشد، لذا واکسیناسیون دام، استراتژی برای محدود کردن انتقال آن به انسان خواهد بود.

در حال حاضر واکسن دامپزشکی، Toxovax ®، با دوره محافظت ۱۸ ماهه در دسترس می‌باشد که منجر به کاهش سقط جنین در گاوهای باردار شده ولی عملاً برای جلوگیری از انتقال این بیماری به انسان مؤثر نمی‌باشد.

راه مؤثر دیگر برای کاهش انتقال توکسوپلاسما، توسعه واکسن برای گربه‌های خانگی می‌باشد. چنین رویکردی به دلیل هزینه بالای تولید و نگهداری از واکسن انجام نگرفته است.

نوع دیگری از واکسن برای استفاده در انسان طراحی شده بود ولی در حال حاضر، واکسن استاندارد انسانی برای هیچ بیماری انگلی وجود ندارد.

با توجه به اینکه واکسن ضعیف شده توکسوپلاسما، اثرات بالقوه‌ای بر سیستم عصبی مرکزی دارد، بنابراین کمتر احتمال دارد که واکسن انسانی در آینده‌ی نزدیک توسعه یابد.

پاسخ ایمنی به توکسوپلاسما گوندی

مصونیت در توکسوپلاسموز مصونیت نسبی (Premunition) است. پره‌میونیشن بدین معنی است که ایمنی ایجاد شده قادر به از بین بردن انگل نبوده بلکه در مقابل ورود مجدد انگل مصونیت ایجاد می‌شود.

این مصونیت یس از مرحله حاد عفونت وایجاد مرحله مزمن در میزبان پایدار می شود و تا زمانی تداوم دارد که عامل عفونت زا در بدن باقی باشد.

پاسخ های سریع هومورال و بهبودی از عفونت های توکسوپلاسمایی نشان می دهد که توکسوپلاسما گوندی یک ایمنی زای قوی است.

مطالعاتی که با استفاده از پادتن های مونوکلونال وایمنوبلاتینگ انجام گرفته نشان داده است که تعداد زیادی از پادتن های غشایی و سیتوپلاسمی با وزن مولکولی ۱۰۰۰۰ تا ۸۰۰۰۰۰ دالتون وجود دارد.

یکی از یافته های مهم،شناسایی و تعیین خصوصیات یک پروتئین اصلی غشا انگل(P30) با وزن مولکولی ۳۰۰۰۰ دالتون است .

با استفاده از پادتن های منوکلونال متوجه شده اند که دیواره اووسیست ها،اسپروزوئیتهاو تاکی زوئیتهاپادتن های اختصاصی دارند.بعلاوه پادتن های ترشحی ودفعی هم وجود دارد.امید می رود در آینده نزدیک این پادتن های مرحله ای اختصاصی به صورت ژن کلون شده و برای تشخیص مورد استفاده قار گیرند.

در ایجاد مصونیت عوامل سلولی و هومورال هردو نقش دارند ولی ایمنی با واسطه سلولی در محافظت میزبان مهم است.

پادتن قدرت کشتن توکسوپلاسماهای خارج سلولی را دارد،در حالیکه روی ارگانیسم های داخل سلولی اثری ندارد.

ایجاد مصونیت محافظت کننده با انتقال سلولهای لنفوئیدی نشان می دهدکه ایمنی در توکسوپلاسموز با واسطه سلولی است و نه باعیار بالای پادتن،این مشاهدات در موشهایی که نقص سلول T دارند (nude mice) مورد تایید قرار گرفته است.

آلودگی به توکسوپلاسماموجب تولید پادتن های پلی کلونال در کلاس IgM،IgA،IgG می شود. IgM در هفته اول آلودگی ظاهر و بعد از سه هفته به حداکثر می رسد و IgA پس از پنج هفته به حداکثر می رسد. IgG دو هفته بعد از آلودگی ظاهر و طی ۸ تا ۱۰ هفته به حداکثرمی رسد.

پادتن ها تا حدی اثر محافظت کننده دارند ولی برای مهار کامل انگل کفایت نمی کند و به طور کلی دفاع سلولی از دفاع هومورال خیلی موثرتر است.

پاسخ سلولهای T از نوع CD8 و CD4 با خصوصیاتی که دارند، تولید لنفوکین های مختلف و مهمی را تحریک می نمایندکه مجموعه سلولهای T وسلولهای کشنده طبیعی را توسعه می دهند.

مطالعات انجام شده بر موش نشان داد که اینترفرون و اینترلوکین ۲ از عوامل مهم حفاظتی برای میزبان در برابر انگل است.

مصونیت در توکسوپلاسموز در میزبانهایی که ایمنی سالم دارندمادام العمر است. انسان و بسیاری از حیوانات در طبیعت آلوده می شوند و بطور طبیعی واکسینه می گردند. این عمل با پیدایش پادتن های اختصاصی و مقاومت در برابر تلقیح های بعدی انگل بیماریزای زنده در حیوانات نشان داده شده است.

گواه دیگری در این موردتاریخچه زنانی است که یک بار نوزادانی با توکسوپلاسموز مادرزادی به دنیا آورده اند ولی در حاملگی های بعدی هیچ موردی از این نوع در آنهادیده نشده است. این نوع مصونیت در بسیاری از حیوانات به ویژه گوسفند هم دیده می شود.

References

ـ ادریسیان غ، رضائیان م، قربانی م، کشاورز ح ومحبعلی م، تک‌یاخته‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، ۱۳۸۶.

ـ غروی م ج، آزمایش‌های معمولی و اختصاصی، انتشارات تیمورزاده نوین، آزمایشگاه انگل‌شناسی پزشکی دانشگاه تهران، فروردین ۱۳۹۱.

ـ فرانکلین ن، هارولد ب، انگل‌شناسی پزشکی ترجمه دکتر عمید اطهری، انتشارات آییژ، تهران، تجدید چاپ بهار ۱۳۸۹.

ـ غروی م ج، اورمزدی ه، قر هگزلو ب، روئین تن ا، مقایسه حساسیت و ویژگی روش‌های تشخیصی توکسوپلاسموز بر اساس سنجش IgM و IgG، مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران، زمستان ۱۳۸۶، شماره ۵۷.

ـ بهادری ا، صدرائی ج، مرصوصی م، روش الایزا اویدیتی در تشخیص توکسوپلاسموزیس مادرزادی، مجله علوم پزشکی رازی فروردین، ۱۳۹۲، دوره ۲۰، شماره ۱۰۶.

- Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans: CRC press; 2016.

- Frenkel J, Dubey J, Miller N. (1970) Toxoplasma gondii in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science, 167(3919), 893-6.

- LEVINE ND. (1977) Taxonomy of Toxoplasma. The Journal of protozoology, 24(1), 36-41.

Larry S Roberts, John Janovy, Jr, Foundations of Parasitology, 8th edition, 2010 McGraw-Hill Higher Education.

- OIE Terrestrial Manual 2008. CHAPTER 2,9,10. TOXOPLASMOSIS. SUMMARY. Definition and description of disease: Toxoplasmosis is a zoonotic infection.

- Dubey (1998). Toxoplasma gondiioocyst survival under defined temperatures. Journal of parastilogy 84:836-865.

- Obert-Gangneux F, Dardé M-L. (2012) Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clinical microbiology reviews, 25(2), 264-96.

- Hashemi-Fesharki R. (1996) Seroprevalence of Toxoplasma gondii in cattle, sheep and goats in Iran. Veterinary parasitology, 61(1), 1-3.

- Dubey J. (1998) Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii. International journal for parasitology, 28(7), 1019-24.

- Miró G, Montoya A, Jiménez S, Frisuelos C, Mateo M, Fuentes I. (2004) Prevalence of antibodies to Toxoplasma gondii and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. Veterinary parasitology, 126(3), 249-55.

- Sheffield HG, editor Schizogony in Toxoplasma gondii: an electron microscope study. Proc Helm Soc Wash; 1970.

- Dubey J, Lindsay DS, Lappin MR. (2009) Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. Veterinary Clinics of North America: small animal practice, 39(6), 1009-34.

- Wastling J, Harkins D, Buxton D. (1994) Western blot analysis of the IgG response of sheep vaccinated with S48 Toxoplasma gondii (Toxovax). Research in veterinary science, 57(3), 384-6.

- Buxton D, Innes E. (1995) A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. Parasitology, 110(S1), S11-S6.

- Kijlstra A, Jongert E. (2009) Toxoplasma-safe meat: close to reality? Trends in parasitology, 25(1), 18-22.

- Madi JM, Souza RdSd, Araújo BFd, Oliveira Filho PFd, Rombaldi RL, Mitchell C, et al. (2010) Prevalence of toxoplasmosis, HIV, syphilis and rubella in a population of puerperal women using Whatman 903® filter paper. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 14(1), 24-9.

- Kijlstra A, Jongert E. (2009) Toxoplasma-safe meat: close to reality? Trends in parasitology, 25(1), 18-22.