

## روشهای تشخیص توکسوپلاسموز انسانی



فاطمه میرهادی  
کارشناس ارشد انگل‌شناسی



مریم نیتی  
دانشجوی کارشناسی ارشد انگل‌شناسی

### مرفولوژی تک یاخته.....

توکسوپلاسمای گوندی انگلی با انتشار جهانی است و قادر به تکامل در انواع بی شماری از مهره داران می باشد. میزبانان قطعی این انگل گربه و گربه سانان است. این انگل در سیر تکاملی خود به سه شکل دیده می شود

۱- فرم پرولیفاتیو یا تاکی زوایت که در مرحله حاد بیماری دیده می شود.

۲- برادی زوایت (کیست نسجی) که در مرحله مزمن بیماری دیده می شود.

۳- اوسیست که تولید اسپروزایت را می کند و توسط گربه دفع می شود.

### تاریخچه.....

انگل توکسوپلاسمای گوندی برای اولین بار در سال ۱۹۰۸ توسط تونس در سلولهای تک هسته ای طحال و کبد جوند آفریقای شمالی به نام *Ctenodactylus gundi* مشاهده شد. ابتدا این ارگانیسم را لیشمانیا گوندی نام گذاری کردند ولی یک سال بعد به دلیل عدم وجود کینتوپلاست، این ارگانیسم را توکسوپلاسمای گوندی معرفی کردند. در همان سال (۱۹۰۸) در *Splendor* در برزیل انگل را در خرگوشی که در اثر فلج شدن مرده بود مشاهده کرد.

اولین مورد توکسوپلاسموز انسانی در سال ۱۹۲۳ توسط ژانکو چشم پزشک مقیم پراگ، گزارش شد. او اوکسیت های انگل در شبکیه چشم یک نوزاد ۱۱ ماهه مبتلا به هیلدروسفالی و میکروسفالی مادرزادی مشاهده شد.

## روشهای تشخیصی توکسوپلاسموز.....

### ۱- روشهای پارازیتولوژی

**الف - روشهای بافت شناسی یا هیستولوژیک:** مشاهده تروفوزوئیت در نسج (بیوپسی مغز، اسپیراسیون مغز استخوان، مایعات بدن مانند مایع بطني یا مایع مغزی نخاعی، مایعات کره چشم و خلط) منجر به تشخیص توکسوپلاسموز حاد می‌گردد. اغلب موارد مشاهده اشکال تروفوزوئیت در نسوج یا گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده با روش‌های معمول دشوار است به این دلیل روش فلوروسنت آنتی بادی برای تشخیص دقیق‌تر پیشنهاد شده است. مشاهده اشکال کیستی در بافت نشانه آن است که بیمار توکسوپلاسموز دارد اما گویای عفونت حاد نیست از طرف دیگر کیست ممکن است در ابتدای عفونت در بدن تشکیل گردد و به این جهت مشاهده آنها حاد و فعال بودن بیماری را رد نمی‌کند.

بهترین روش برای رنگ آمیزی کیست روش پاس است زیرا برادی زوئیت‌ها مقادیر زیادی گلیکوژن دارند ولی تاکی زوئیت‌ها با روش‌های متداول رنگ می‌گیرند.

در توکسوپلاسموز مادر زادی، جدا کردن انگل از نوزاد مبتلا دلیل قطعی و غیر قابل انکار عفونت است، اما متأسفانه این روش اغلب نیاز به زمان طولانی دارد و برای تشخیص سریع نمی‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

**ب - تلقیح نسج آلوده (بیوپسی یا نمونه تهیه شده در اتوپسی) به حیوانات آزمایشگاهی حساس:** انگل توکسوپلاسم در محیط کشت مصنوعی رشد نمی‌کند مشکل عمده‌ای که در مورد این انگل وجود دارد عدم تهیه آن به صورت خالص و عاری از نسوج میزبان یا محیط کشت سلولی است.

حیوان آزمایشگاهی حساس در مورد این انگل موش سوری است. رت نسبت به این بیماری بسیار مقاوم بوده و تنها در مغز آن کیست تشکیل می‌گردد ولی علائم بالینی بروز نمی‌دهد.

نمونه تهیه شده از بیمار مبتلا به توکسوپلاسموز باید هر چه سریع‌تر به حیوان آزمایشگاهی تلقیح شود تا از مرگ انگل جلوگیری به عمل آید. با تلقیح صفاقی سوبه‌های بیماری‌زا

، در هفته دوم بعد از تزریق علائم بیماری بروز می‌کند اما در تلقیح مغزی چند روز زودتر علائم ظاهر می‌شود. بدین ترتیب ۶ تا ۱۰ روز بعد از تزریق در مابعد صفاقی حیوان میتوان تعداد زیادی تاکی زوئیت به همراهماکروفاژ دید. اغلب سوبه‌های جدا شده از انسان برای موش بیماری‌زا نمی‌باشند.

بهترین نمونه برای تشخیص فرم مادرزادی در موارد سقط جنین، جفت و عصاره مواد سقط شده است انگل جدا شده از نوزادان مبتلا به فرم مادرزادی توکسوپلاسم برای موش بالنسبه غیر بیماری‌زا است و معمولاً ۴ تا ۶ هفته زمان لازم است تا بتوان انگل را در بدن حیوان مشاهده کرد.

در انواعی از ارگانایسم که برای موش بیماری‌زا است انگل را می‌توان بعد از ۵ تا ۱۰ روز در مابعد صفاقی موش یافت.

**ج - کشت نسجی:** بر اساس نظر یکی از محققان روش کشت نسجی حساسیتی کمتر از تلقیح به موش را دارد و بیشتر به منظور چگونگی ورود انگل به سلول، تکثیر و خروج آن و بررسی اثرات آنتی بادی، ویتامین، داروها و انترفرون بر روی رشد انگل است.

### ۲- روشهای سرولوژیک و ایمونولوژیک

تشخیص توکسوپلاسموز حاد بر اساس روش‌های سرولوژیک با مشاهده عیارهای بالا رونده آنتی‌بادی تأیید می‌شود.

**۱- ردیابی آنتی ژنهای در گردش (Circulating Ag):** از روش‌های تشخیصی که در سال‌های اخیر برای تشخیص توکسوپلاسموز حاد به کار می‌رود ردیابی آنتی ژنهای در گردش است. ردیابی این آنتی ژن‌ها در سه گروه حائز اهمیت است:

**الف -** افراد دچار اختلالات سیستم ایمنی: زیرا در این افراد آنتی‌بادی دارای تیترا بسیار پائین یا فاقد آنتی‌بادی هستند.

**ب -** در اوایل بیماری حاد و یا حالت مزمن که تیترا آنتی‌بادی پائین است.

**ج -** در افراد مبتلا به گاماپاتی مونوکلونال که تیترا آنتی بادی توکسوپلاسم ممکن است خیلی بالا باشد ولی دلیلی

بر عفونت بالینی نمی باشد .

به این تست چندین روز دیرتر از آنتی بادی های مربوط به تست رنگی ظاهر می شوند و می توانند عیار آن تا حد آزمایش قبل افزایش یابد و مدت طولانی تری نیز بالا باقی بماند .

این تست در اغلب موارد توکسوپلاسموز مادرزادی منفی بوده است و لذا برای تشخیص انواع مادرزادی بیماری توصیه نمی شود .

واکنش های متقاطع بین توکسوپلاسموز و بزوتیا در این روش و روش ثبوت مکمل گزارش شده است .

#### ۴ - تست ثبوت مکمل :

آنتی بادی های ثبوت مکمل به طور عمده در توکسوپلاسموز اکتسابی مطالعه شده است آنتی بادی های مربوط به این تست دیرتر از آنتی بادی های مربوط به تست رنگی ظاهر می شود این تست زمانی مفید واقع می شود که تیتراژ آزمون ایمونوفلورسانس و یا تست رنگی از قبل بالا و ثابت باشد . تشخیص عفونت فعال با مشاهده عیار بالارونده و یا تست منفی که مثبت می شود همراه است . در برخی از موارد این تست برای ۱۰ سال نیز مثبت باقی می ماند .

#### ۵ - تست پرسپیپتین :

این روش با استفاده از سرم بیمار یا مایعات داخل چشم برای تشخیص برخی از موارد توکسوپلاسموز چشمی و یا توکسوپلاسموز حاد منتشر در بیماران مبتلا به اختلالات سیستم ایمنی ارزشمند است .

#### ۶ - آزمون آگلوتیناسیون فولتون :

این تست به آنتی بادی های از نوع IgM بسیار حساس است ولی امکان پیدایش آگلوتیناسیون غیر اختصاصی در افراد سالم نیز وجود دارد .

#### ۷ - آزمون فلوروسنت آنتی بادی

##### غیر مستقیم (AFI) :

تعداد زیادی از محققان برای این آزمون ارزشی معادل تست رنگی از نظر اختصاصی بودن قائل هستند ولی واکنش های مثبت کاذب در برخی از سرم ها که حاوی

#### ۲-سایین-فلدمن (Dye-test)

در این روش تاکی زوئیت های زنده به دست آمده از صفاق موش را برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه و در مجاورت سرم طبیعی (فاقد آنتی بادی) نگه داری می کنند. انگل ها متورم شده و با آبی متیلن قلیایی شدیداً رنگ می گیرند. انگل هایی که سرم حاوی آنتی بادی در شرایط قبل به آنها اضافه گردد چروکیده و کوچک گشته و در اثر عمل آنتی بادی و مکمل لیز می شوند و رنگ آبی متیلن را به خود نمی گیرند. با استفاده از فاز میکروسکوپ این دو ارکانیسم تشخیص داده می شوند. در این روش خطر ابتلای پرسنل وجود دارد و لذا باید دقت کافی به کار رود.

عیار گزارش شده غلظتی از سرم است که در آن نیمی از ارکانیسم ها کشته نشده (رنگ گرفته) و نیمی دیگر نابود شده اند (رنگ ناپذیر). می توان عیار DT را بر حسب واحد بین المللی در میلی لیتر سرم در مقایسه با یک سرم استاندارد شده رفرانس گزارش نمود.

معمولاً یک تا دو هفته پس از عفونت توکسوپلاسمایی عیار این تست به آهستگی افزایش می یابد و اغلب دو ماه یا بیشتر طول می کشد تا به حداکثر میزان خود برسد. عیار بالای آنتی بادی برای ماه ها یا سال ها در خون وجود دارد و در برخی موارد تا ۱۲ سال پس از مرحله حاد عفونت میزان بسیار بالایی در خون دارد.

نتیجه مثبت تست رنگی لزوماً نشانه عفونت فعال نبوده بلکه عمدتاً نشان دهنده تماس قبلی با عامل بیماری بوده و می تواند مبین عفونت فعال نیز باشد .

باید توجه داشت که در عفونت ناشی از سارکو سیستیس آزمون سایین - فلدمن مثبت میشود اما با استفاده از آزمون ثبوت مکمل میتوان عفونت توکسوپلاسمایی را تشخیص داد

#### ۳ - آزمون هماگلوتیناسیون غیر مستقیم :

در این روش گلبول های سرخ حساس شده با آنتی ژن توکسوپلاسموز با اضافه کردن سرم حاوی آنتی بادی های ضد توکسوپلاسموز ، آگلوتینه می شوند آنتی بادی های مربوط

آنتی‌بادی‌های ضد هسته باشند مشاهده می‌گردد. به این دلیل در بیماران مبتلا به اختلالات نسوج همبندی مانند لوپوس منتشر یا آرتریت روما توئید علاوه بر انجام آزمون ایمونوفلورسانس برای تأیید وجود بیماری از تست رنگی یا آزمون هم‌آگلوتیناسیون غیر مستقیم نیز استفاده می‌شود. این آزمون به صورت کیت‌های تجاری شامل ردیابی آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG و IgM در بسیاری از شرکتها قابل دسترسی است.

توجه به این نکته مهم است که در هر دو روش تست رنگی و فلورسنت آنتی‌بادی غیرمستقیم بسته به آزمایشگاه انجام دهنده آزمون پاسخ‌هایی متفاوت دارد.

عیار آنتی‌بادی به هیچ عنوان ارتباطی با شدت بیماری ندارد و در کسانی که نشانه‌های بالینی ندارند ممکن است عیار آنتی‌بادی به بیش از ۱/۲۵۶۰۰ نیز برسد.

آزمایش IgM فلوروسنس آنتی‌بادی روش حساسی برای تأیید تشخیص توکسوپلاسموز اکتسابی حاد یا مادرزادی است و به دنبال عفونت اکتسابی عیار این آنتی‌بادی به سرعت بالا رفته و به ۱/۶۱۰ یا بیشتر نیز میرسد.

وجود فاکتور روما توئید باعث نتیجه مثبت کاذب می‌شود. در برخی از بیماران با توکسوپلاسموز اکتسابی حاد میزان بالای آنتی‌بادی IgG ضد توکسوپلاسم با IgM - IFA تداخل کرده و سبب ایجاد نتیجه منفی کاذب در این آزمون می‌گردد.

در بررسی عفونت‌های مادرزادی و مقایسه رقت‌های سرم‌های زنان باردار آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم حائز اهمیت می‌باشد (جهت ازدواج).

اگرچه ایمونوفلورسانس غیرمستقیم به‌طور وسیعی قابل دسترس می‌باشد ولی تست رنگی از نظر کمی قابلیت اطمینان بیشتری دارد.

#### ۸- روش الیزا:

حساس‌ترین روش تشخیص آنتی‌بادی IgM بوده و نسبت به روش ایمونوفلورسانس حساس‌تر و اختصاصی‌تر است از مزایای این روش عدم تداخل آنتی‌بادی‌های ضد هسته و فاکتور روما توئید است.

به‌طور کلی در افراد بالغ، آنتی‌بادی IgM ضد توکسوپلاسمایی در سطح ۶ تا ۱۰ در این آزمون نشانه آن است که عفونت توکسوپلاسمایی در طی کمتر از ۵ ماه اخیر به وجود آمده است.

سطوح ۲ یا ۳ نشانه آلودگی به این انگل در چندین ماه گذشته است و سطوح صفر یا یک در این آزمایش منفی محسوب می‌شود.

این روش در تشخیص عفونت‌های توکسوپلاسمایی مادرزادی نیز ارزش بیشتری از آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم دارد و حدود ۷۵٪ از نوزادان مبتلا را مشخص می‌کند در حالی‌که روش ایمونوفلورسانس تنها قادر به تشخیص ۲۵٪ از نوزادان مبتلا به عفونت مادرزادی اثبات شده است.

#### ۹- آزمون جلدی توکسوپلاسمین:

این آزمون جهت سنجش واکنش ایمنی سلولی در توکسوپلاسموز بکار می‌رود. این تست تا چند ماه پس از ابتلا به عفونت منفی است و لذا برای تشخیص عفونت‌های مزمن توکسوپلاسمایی مفید خواهد بود.

موارد مثبت کاذب این آزمون کمتر از نیم درصد و بسیار غیر معمول است این تست بیشتر در بررسی‌های اپیدمیولوژیک و از نظر آگاهی از میزان شیوع عفونت در افراد یک جامعه است.