بسم الله الرحمن الرحيم

Lab.diagnostic methods of leishmaniases

Presented By

Dr. Ramtin Hadighi

Associated Professor of Medical Parasitology

Iran University of Medical Sciences

- **مقدمه :**
- ليشمانيوز ها مجموعه اي ازبيماري هاي انگلي ناشي ازگونه هايی از جنس ليشمانيا مي باشند كه درمناطق گرمسيري امريكا، آفريقا و شبه قاره هند و درنواحي نيمه گرمسيري آسياي جنوب غربي وناحيه مديترانه به شكل آندميك وجود دارند. ليشمانيوزها به اشكال باليني پوستي (سالک)، مخاطي _پوستي (اسپونديا) و احشائي (كالاآزار)مشاهده مي شوند

Clinical forms of human leishmaniasis

- **Old World**
- *L.major*
- *L.tropica*
- *L.aethiopica*
- *L.donovani*
- *L.infantum/chagasi*
- **New World**
- *L.mexicana complex*
- *L.braziliensis complex*

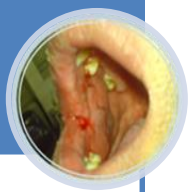
Cutaneous leishmaniasis

- **Old World**
- *L.donovani*
- *L.infantum*
- *L.archibaldii*
- *L.tropica*
- **New World**
- *L.chagasi*

Visceral leishmaniasis

- **New World**
- *L.braziliensis*
- *L.panamensis*
- *L.guyanensis*
- ***Rarely***
- *L.infantum/chagasi/donovani*

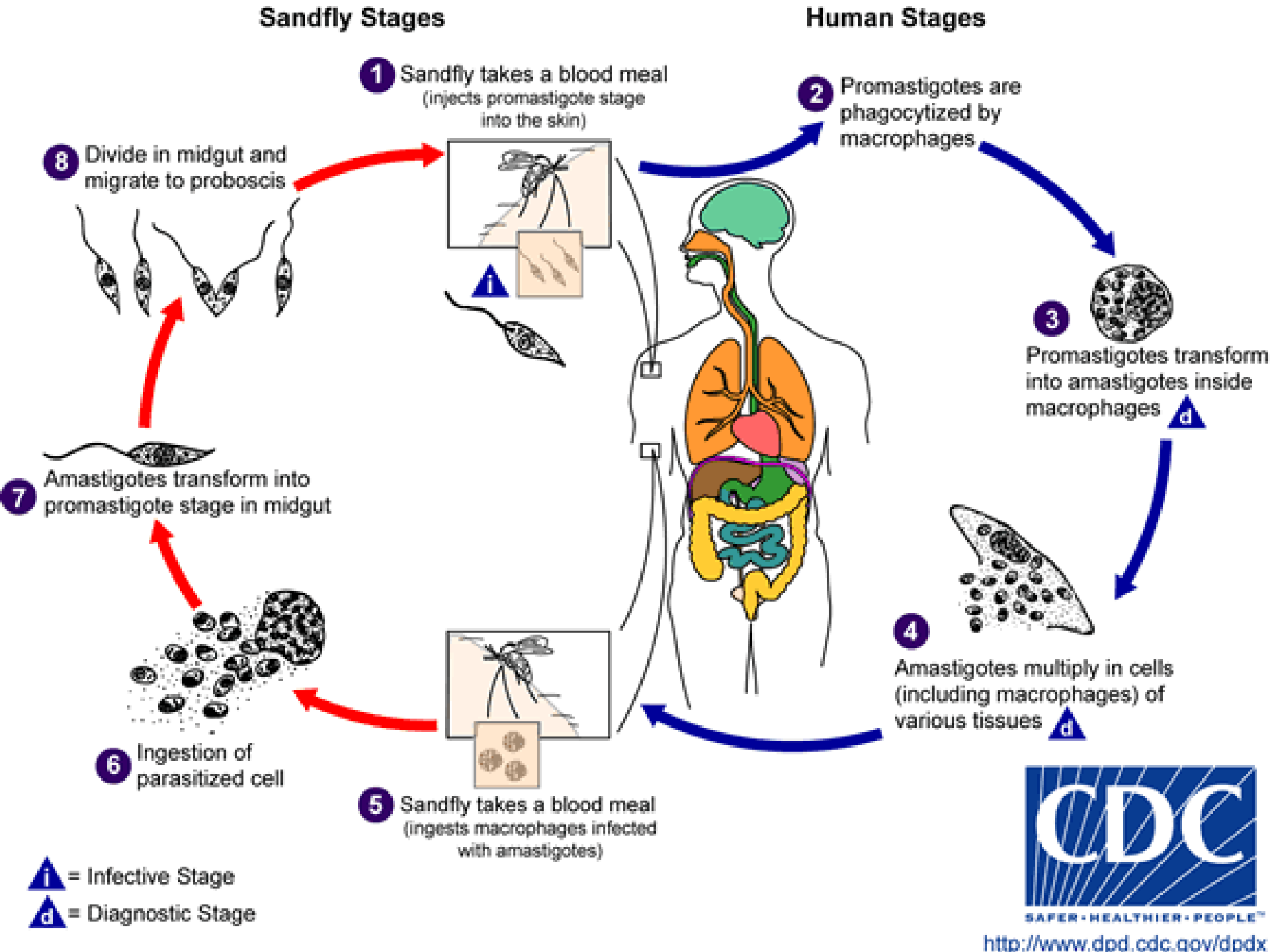
Mucosal leishmaniasis

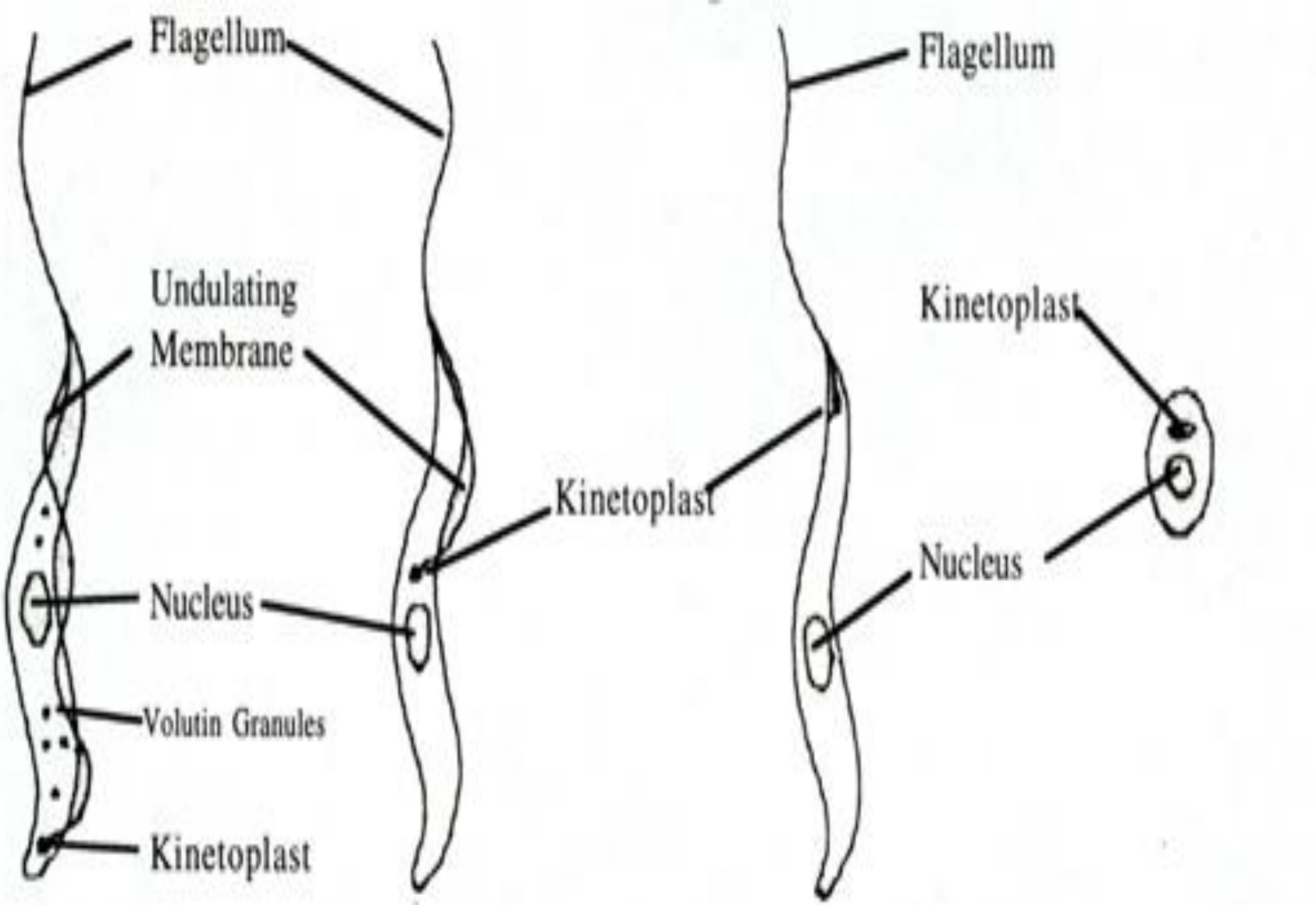


- ليشمانيوزاحشائي با مرگ وميربالا همراه بوده، اما معمولاً مرگ وميردر بيماري سالك مشاهده نمي شود ولي بدليل ميزان ابتلاء زياد، ايجاد ضايعات بد شكل پوستي نموده كه دربرخي موارد تا بيش ازيكسال باقي مي مانند و معمولا باعث ايجاد جوشگاه (اسكار) شده كه حتي با استفاده ازدرمان تا آخرعمر بر روی بدن باقی می ماند.
- از طرف ديگر عفونت هاي باكتريائي و قارچي ثانويه شامل عفونت هاي نسوج سطحي وعمقي، آبسه، سپتي سمي، وحتي كزاز ازعواض زخم سالك مي باشد كه ممكن است گاهی موجب ناتواني وحتي مرگ بيمار گردد.

- اگرچه ميزان بروزاين عوارض ناچيز است ولي با توجه به گستردگي بيماري ساللك، تعداد بيماراني كه دچار اين عوارض مي گردند، قابل توجه خواهند بود.
- تخمين زده ميشود كه بيش از12 ميليون نفردردنيا مبتلا به ساللك باشند و 350 ميليون نفردر مناطقي زندگي مي كنند كه احتمال ابتلاء آنها وجوددارد و سالانه 5/1 تا 2 ميليون نفر به مبتلايان اين بيماري اضافه مي شوند كه متاسفانه بسياري از آنها ثبت و گزارش نمي شوند. اين بيماري دربرخي موارد ضايعات متعدد (تا بيش از300 عدد) ايجاد مي كند.

- گرچه سالانه حدود 20 هزار مورد بيماري ليشمانيوز جلدي درايران گزارش مي شود ولي موارد حقيقي بيماري حدود 4 تا 5 برابر اين تعداد است.
- سالک درايران به شكل روستائي (مرطوب) و شهري (خشک) مشاهده ميشود. نوع روستائي دراكثرمناطق روستائي نيمی از استان های كشورشايع است و نوع شهري در بسياري از نقاط شهري كشور به صورت اندميک وجود دارد.
- ميزان بروز ليشمانيوزاحشائي در كشورحدود 200تا 300 مورد در سال است و اين بيماري از تمامي استان هاي كشورگزارش شده است


Sandfly Stages
Human Stages
1 Sandfly takes a blood meal
(injects promastigote stage
into the skin)
2 Promastigotes are
phagocytized by
macrophages
3 Promastigotes transform
into amastigotes inside
macrophages d
4 Amastigotes multiply in cells
(including macrophages) of
various tissues d
5 Sandfly takes a blood meal
(ingests macrophages infected
with amastigotes)
6 Ingestion of
parasitized cell
7 Amastigotes transform into
promastigote stage in midgut
8 Divide in midgut and
migrate to proboscis
i = Infective Stage
d = Diagnostic Stage
CDC
SAFER·HEALTHIER·PEOPLE™
http://www.dpd.cdc.gov/dpdx



These forms are based on the position of the kinetoplast and flagellum

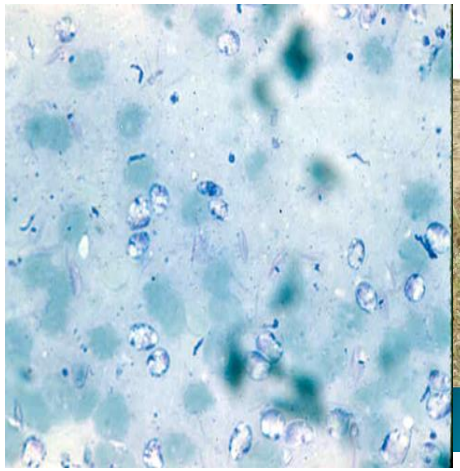
فرم لپتومونایی

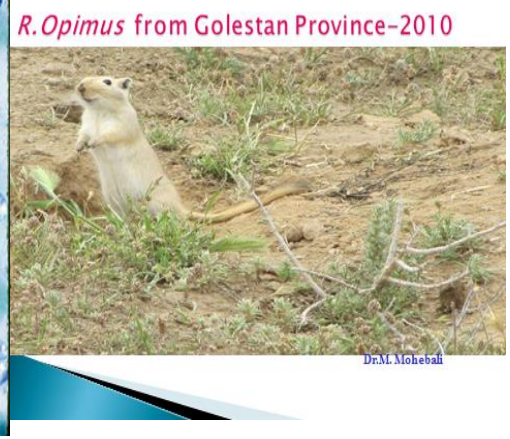
فرم لیشمانیایی

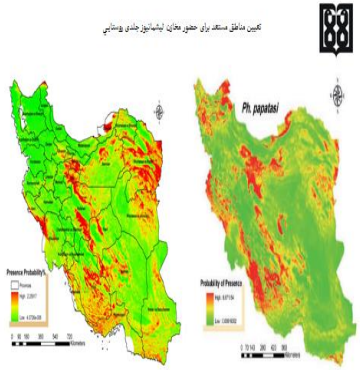
الف/ سالک

- **روش هاي انتقال :** عمده ترين روش انتقال سالک، گزش پشه خاکي است ولي راه هاي فرعي ديگري نيز گزارش شده که شامل خاراندن زخم و انتقال مکانيکي توسط ساير بندپايان مي باشد که فاقد اهميت اپيدميولوژيک می باشند.
- **اشکال باليني:**با توجه به عامل بيماري و علائم باليني عفونت در انسان، ليشمانيوز پوستي به اشکال باليني خشک (شهري)، مرطوب (روستائي)، عودکننده (لوپوئيد Recidivans)، منتشر واشکال غيرمعمول (اسپوروتريکوئيد، زردزخمي، توموري، زگيلي، بادسرخي، محو شونده و ...) مشاهده مي شود. همچنين ليشمانيوز پوستي ممکن است به اشکال حاد و يا مزمن ديده شود.

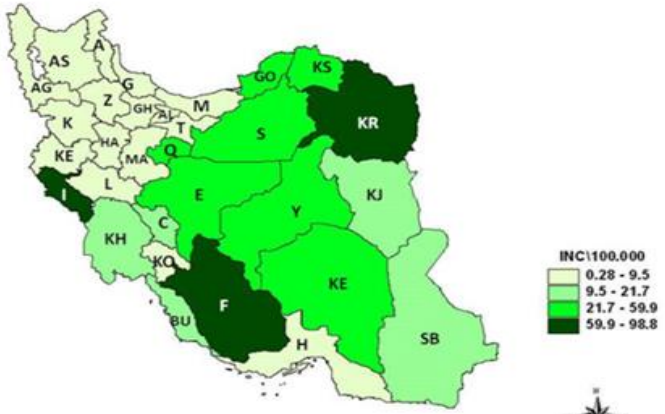
ZCL in Iran







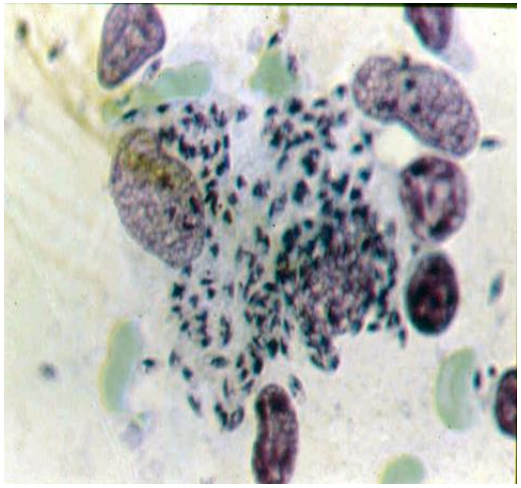
Cutaneous leishmaniasis from Golestan Province-2010



نقشه پراکندگی لیشمانیوز پوستی شهری و روستایی در ایران (شیرزادی و همکاران ،2015)

Cutaneous Leishmaniasis
Severe conjectivitis

ACL in Iran



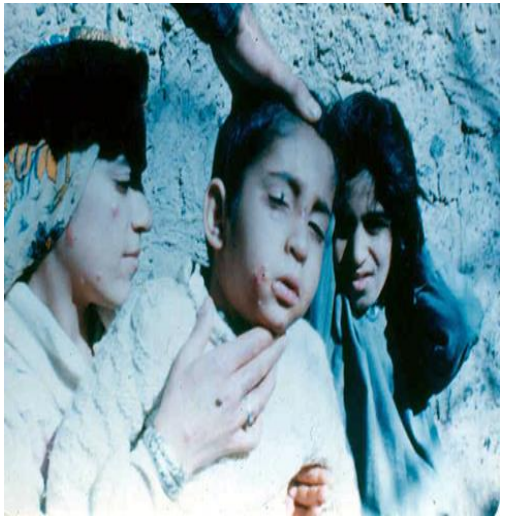
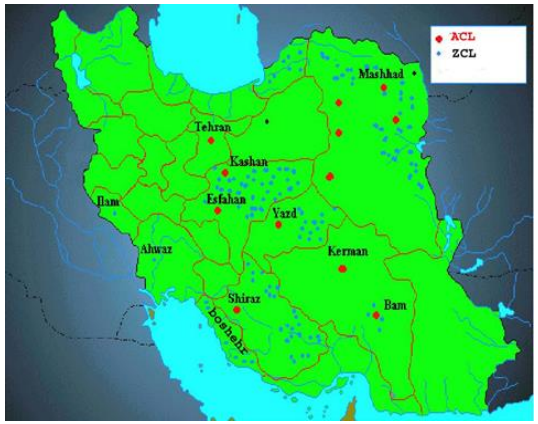


Photo by Dr.M. Mohebali

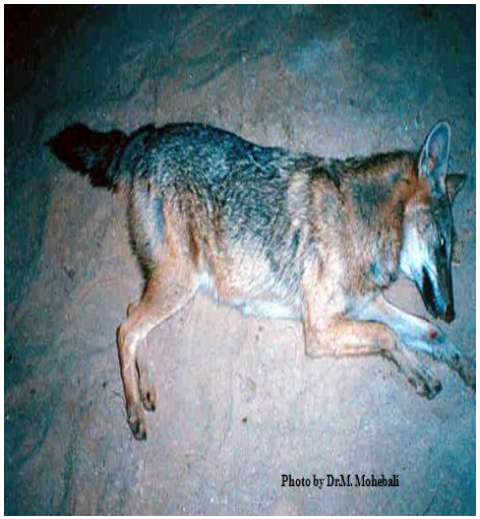

ACL
ZCL
Mashhad
Tehran
Kashan
Esfahan
Ilam
Yazd
Ahwaz
Kerman
Shiraz
Bam
Bushehr

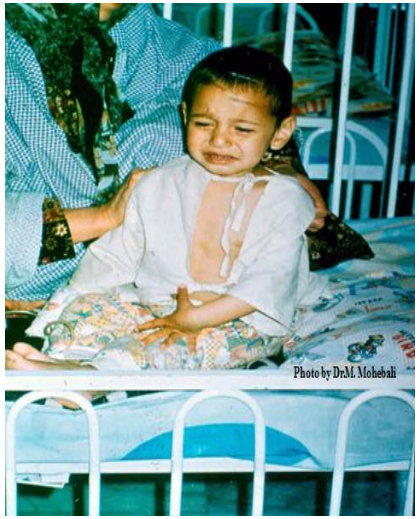
Kala Azar in Iran

Agents:

Leishmania infantum LON49

Leishmania tropica





- **تشخيص آزمايشگاهي :**
- اصولاً پيش‌ازاستفاده ازروشهاي آزمايشگاهي براي تشخيص انواع ليشمانيوزها، بررسي سابقة بيماري و اطلاع ازمحل سكونت و مسافرت به مناطق بومي اين بيماري درکشور و نيزتوجه به خصوصيات باليني بيماری، بسيارمهم و كمك كننده خواهد بود.
- در آزمايشگاه سه نمونه (گسترش) ازنقاط مختلف ضايعه (ها) جلدي تهيه مي شود. بهتراست از بيماراني كه داراي چند ضايعه هستند، چند نمونه ازضايعات مختلف گرفته شود.
- نمونه ها بايستي دراسرع وقت مورد بررسي قرارگيرند، درصورتي كه يك نمونه منفي باشد، نمونه دوم و سپس نمونه سوم بررسي مي شود ولي اگر يك نمونه مثبت باشد نياز به بررسي نمونه های دوم و سوم نمي باشد.

- **روش نمونه برداري از ضايعات مشكوک به سالک و بررسي ميكروسكپي :**
- لبه هاي ملتهب ومتورم ضايعه مهم ترين قسمتي است كه بيشترين تراكم آماستيگوت ها را دارند.
- نكته مهم آنكه هر چه نمونه بيشتري از بافت برداشت شود احتمال مشاهده انگل درنمونه بيشتر است.
- ازآنجايي كه ضايعات پوستي ممكن است دچارعفونت هاي ثانويه باكتريايي و يا قارچي شده باشند، لازم است محلي از ضايعه را كه قصد برداشت نمونه از آن وجود دارد، كاملاً تميز نموده و اگر لازم باشد چندين مرتبه با پنبه الكل (اتانل 70 درصد) ضد عفوني گردد

نحوه تهیه نمونه از ضایعات پوستی مشکوک به لیشمانیوز

- **روش صحيح نمونه برداري و رنگ آميزي:**
- رعايت اصول ايمني در هنگام نمونه گيري ونيز استفاده از وسايل حفاظتي مانند دستكش وغيره
- حذف كبره هاي روي ضايعه و هر گونه چرك روي آن
- انتخاب محل مناسب براي نمونه برداري شامل لبه خارجي قسمت متورم و ملتهب ضايعه پوستی و اجتناب از نمونه برداري از محل هاي باز و زخمي ضايعه.
- استفاده ازاتانول 70 درصد براي استريل كردن وشستشوي ضايعه (قبل ازنمونه برداري بايد صبر كرد كه الكل خشك شود)
- توجه به عدم استفاده از موادي مانند مركوركوروم (تركيبات جيوه) در محل ضايعه(زيرا ممكن است باعث تغيير شكل آنها شود). درصورت استفاده ازتركيبات يد دار براي ضدعفوني ضايعه، قبل ازنمونه برداري محل ضايعه بايستي به كمك پنبه آغشته به الكل ، ازاين ماده پاك شود.

- محلي از ضايعه كه براي نمونه برداري در نظر گرفته مي شود بايستي توسط دو انگشت شست و سبابه محكم گرفته شده و ثابت گردد.
- با استفاده از واكسينواستيل استريل (يا لانستي كه اطراف آن بريده و باريک شده باشد) و يا يك اسكالپل استريل نوك باريك (كند شده)، شكافي به عمق يك ميلي متر درمنطقه گرفته شده با انگشتان ايجاد گردد.
- توسط وسايل فوق ازعمق محل شكافته شده به طرف سطح ومركزضايعه چند خراش (براي برداشت مقدارمناسب بافت و خونابه) داده شود.
- وسيله نمونه گيري را بيرون آورده واز ترشحات حاصله برروي لام گسترش تهيه شود و مشخصات بيمار با قلم الماس روي لام حك گردد. (درصورت نياز به كشت، در كنار شعله ابتدا نمونه به محيط كشت منتقل شود)

- **روش رنگ آميزي :**

- 1- بايد گسترش تهيه شده بدون استفاده از شعله و در هواي اتاق خشك شود.
- 2- متانول، به مدت 30 تا 60 ثانيه قبل از رنگ آميزی روي گسترش ريخته شود .
- 3- گسترش در مجاورت هوا خشک شود.
- 4- با توجه به نوع گيمسا آنرا به نسبت 1 به 10با آب با pH تنظيم شده 7.2 رقيق شود (اگر رنگ رسوب كندبايد با كاغذ صافي صاف شود)
- 5- لام را روي پل رنگ آميزي قرار داده و به مدت 30 دقيقه برروي آن محلول گيمسا ي رقيق شده ريخته مي شود ويا لام را در ظرف محتوي رنگ با همين مدت زمان قرار مي دهيم (بايد توجه داشت كه در ارتباط با رقت محلول رنگ آميزي و نوع آن، مدت 20 تا 30 دقيقه براي رنگ آميزي لازم است و هر آزمايشگاه بايستي در حين اجراي برنامه كنترل كيفيت مدت زمان مطلوب را نيزجهت رنگ مورد استفاده، ازقبل بدست آورد)
- 6- لام براي مدت كوتاهي در آب با pH تنظيم شده 7.2 فرو برده شده به سرعت خارج شود و در هوا خشک گردد.

- **گزارش نتايج :**
- لام (با استفاده ازعدسي چشمي 10 و عدسي شيئي 100 و روغن ايمرسيون و بدون استفاده از لامل) درزير ميكروسكوپ نوری مورد مطالعه قرار می گيرد، تشخيص مثبت، شامل ديدن انگل ليشمانيا بطورواضح مي باشد.
- درهرلام تا زمان مشاهده جسم ليشمن بايد حداقل 30 شان مناسب كه داراي سلول هاي ماكروفاژ باشد، بررسي گردد تا شانس مشاهده انگل بيشترشود ودرصورت منفي بودن نمونه، لام دوم و يا سوم مورد بررسي قرارگيرد.
- شايان ذكراست كه درصورت مشاهده گلبول قرمز فراوان و نديدن جسم ليشمن، اين نمونه مناسب ارزيابي نبوده و نمونه جديد عاري از خون و حاوی ماكروفاژ بايستي تهيه شود.

ب/ ليشمانيوز احشائی(کالاآزار):

- **روش انتقال:**
- مهمترين راه انتقال اين بيماري از طريق گزش پشه خاكي هاي آلوده مي باشد ولي مواردي از انتقال بيماري از طريق جفت از مادر به جنين، تماس جنسي، وسائل تزريقي آلوده و به طور نادر از طريق خون آلوده گزارش شده است.
- **علائم باليني:**
- ليشمانيوز احشائي ممكن است به اشكال بدون علامت، تحت باليني، علامت دار، سندرم پوستي پس از كالاآزار، اشكال احشائي تروپيكال و نيز اشكال باليني آتيپيک در مبتلايان به بيماري ايدز مشاهده شود.

- **تشخيص آزمايشگاهي:**
- در حال حاضر معتبرترين روش تشخيصي انواع ليشمانيوزها، استفاده از روشهاي انگل‌شناسي است و ارجح آن است كه همة موارد ليشمانيوز توسط مشاهدة انگل تأييد گردند. از روشهاي انگل‌شناسي به‌عنوان «استاندارد طلايي» براي ارزيابي ديگر روشهاي تشخيصي نيز استفاده مي‌شود. متأسفانه تهاجمي‌بودن روش نمونه‌برداري براي مطالعات انگل‌شناسي در مورد اين بيماری ، استفاده از اين روشها را تا حدود زيادی با محدوديت روبه‌رو ساخته است.

- **1- *نمونه‌برداري از ضايعات احشايي*وانجام آزمايش هاي انگل شناسي:**
- براي مشاهدة مستقيم اجسام ليشمن مي‌توان از سيستم رتيكولوآندوتليال خصوصاً از طحال، مغزاستخوان، كبد و غدد لنفاوي فرد بيمار نمونه‌برداري كرد. براساس گزارش سازمان جهاني بهداشت ميزان حساسيت طحال براي مشاهدة انگل ليشمانيا،90 تا 98%، مغز استخوان 54 تا 86%، كبد حدود 60% و غدد لنفاوي حدود 64 % است. عليرغم آنكه احتمال مشاهدة آماستيگوت‌ها در نمونة تهيه‌شده از طحال بيمار بسيار زياد است ولي به‌علت خطرات و عوارض ناشي‌از نمونه‌برداري طحال، در حال حاضر در ايران، از نمونه‌هاي تهيه‌شده از مغزاستخوانهاي ايلياك، استرنوم و تيبيا استفاده مي‌شود. حساسيت تشخيص انگل درنمونه‌هاي تهيه‌شده از مغزاستخوان به نحوة نمونه‌برداري و تجربة فرد آزمايش كننده بستگي دارد.

- با توجه به اينكه در برشهاي هيستوپاتولوژي اجسام ليشمن تغيير شكل مي دهند، استفاده از اين روش براي تشخيص قطعي بيماري با محدوديتهايي همراه است. گسترشهاي تهيه‌شده راابتدا با متانول خالص به‌مدت 5/0 تا 1 دقيقه ثابت نموده و سپس با رنگ گيمسا (10%) به‌مدت 30 دقيقه آنها را رنگ‌آميزي مي نمايند.
- پس‌از شستشوي آنها با آب معمولي، با استفاده از ميكروسكوپ نوري و با بزرگترين درشتنمايي (1000X) به جستجوي اجسام ليشمن مي‌پردازند. اگر پروماستيگوت‌ها در شرايط استانداردكشت داده شوند، اين روش حساسيت زيادی دارد، لذا توصيه مي شود همراه با آزمايش مستقيم، كشت در محيط هاي اختصاصي خصوصا محيط NNN نيز انجام شود.

- **روشهاي سرولوژي اختصاصي**
- در روشهاي سرولوژي اختصاصي به ميزان كمي سرم يا پلاسماي خون (حدود 10 ميكروليتر) نياز است كه آن را مي‌توان به‌وسيله لانست از نوك انگشت و يا پاشنة پاي كودكان در لوله‌هاي ميكروهماتوكريت تهيه كرد. روشهاي مختلف سرولوژي براي جستجوي پادتن‌هاي اختصاصي بر عليه ليشمانيا استفاده شده است كه از بين آنها با توجه به حساسيت، ويژگي، ارزش اخباري مثبت و منفي، كارايي، سهولت انجام آزمايش و صرفة اقتصادي روشهاي زير پيشنهاد مي شوند.

- روش ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم (Indirect Fluorescent Antibody)=IFA
- حساسیت و ویژگي اين روش حدود90% مي باشد و در شرادط آزمایشگاهی مناسب است.
- تفسير آزمايش
- تعيين عيار مرزي به نوع آنتي ژن تهيه‌شده، روش انجام آزمايش و حتي فرد قرائت‌کننده بستگي خواهد داشت و لذا نتايج حاصله در مراكز گوناگون ممكن است با يكديگر قابل مقايسه نباشند. مطالعات انجام‌شده نشان داده‌اند كه عيارهاي 1:128 و بالاتر همراه با علايم اختصاصي ليشمانيوز احشايي مي‌توانند نمايانگر بيماري ليشمانيوز احشائي باشند.
- آزمايش IFA ممكن است با انگل ها ويا باكتري هايي مانند مالاريا، تريپانوزوما، سل و حصبه واكنش متقاطع داشته باشد و وجود عامل روماتوئيد در خون و نيز پادتن‌هاي ضد هسته سلولها (لوپوس اريتماتوس سيستميک) ممكن است باعث نتايج مثبت كاذب شوند.

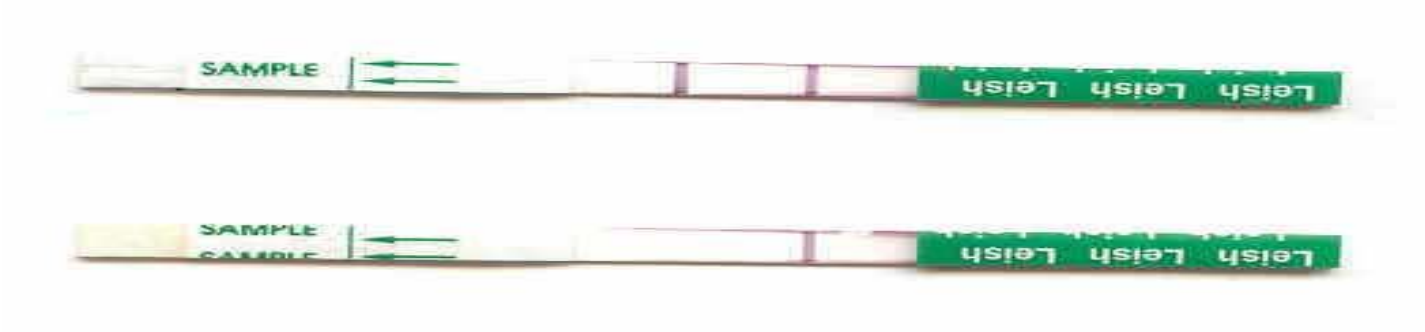
- **روش الايزا ELISA**
- حساسيت اين روش بين 80 تا 100% است ولي ويژگي آزمايش به فاكتور های زيادی از جمله نوع آنتي ژن مورد استفاده بستگي دارد.

- **آزمايش آگلوتيناسيون مستقيم DAT**
- آزمايش آگلوتيناسيون مستقيم روشي ساده براي تشخيص ليشمانيوز احشايي مي باشد و مطالعاتي كه در مناطق بومي بيماري درايران و جهان انجام گرفته حساسيت اين روش 100- 95 % و ويژگي آن 100- 86% تعيين گرديده است.

- آخرين حفره‌اي كه در آن حلقة آبي كامل تشكيل شده باشد، به‌عنوان عيار نهايي در نظر گرفته مي‌شود.
- عيارهاي 1:3200 و به بالا همراه با علايم باليني اختصاصي به‌عنوان ابتلاي فرد به كالاآزار تلقي مي‌شود.
- عيارهاي 1:800 و به پايين منفي و عيار 1:1600 به‌عنوان عيار مشكوك تلقي مي‌شود كه براي تأييد بايد يك‌بار ديگر به فاصله2-3 هفته نمونه‌برداري انجام شود و چنانچه افزايش قابل توجه عيار پادتن ملاحظه شود و در صورت بروز علايم باليني اختصاصي، بيماري كالاآزار تأييد مي‌شود.

- **آزمايش سريع سرولوژی با استفاده از استريپ های تهيه شده از آنتي‌ژن نوتركيب rK39**
- از روش‌هاي سريع جستجوي آنتي‌بادي جهت تشخيص آزمايشگاهي ليشمانيوز احشائي مي‌توان به ديپ‌استيك‌هاي حاوي آنتي‌ژن نوتركيب rK39 اشاره نمود. از محاسن اين روش‌ها سرعت انجام آزمايش است كه معمولاً در مدت حدود 2 تا 10 دقيقه نتيجه آزمايش مشخص مي‌گردد.
- اخيراً كيت های مخصوصي از آنتي‌ژن نوتركيب rK39توسط شركت های مختلف ساخته شده است كه با يك قطره سرم يا خون كامل و يك قطره بافر يا سرم فيزيولوژي آزمايش انجام مي‌شوند.

كيت Dipstick rK39 جهت تشخيص ليشمانيوز احشائی
بالا (مثبت)
پائين (منفی)



15 8 2005

ISNA
PHOTO: ISNA

روز اول
13 6 2005
روز آخر بعد 8 ماء

روز اول و عدم پذیرش پدر به درمان کود ک
پیشرفت بیماری
19 2 2006
پذیرش پدر به آغاز درمان کود ک
21 2 2006
درمان کامل
2 2007

Toxoplasma gondii

.

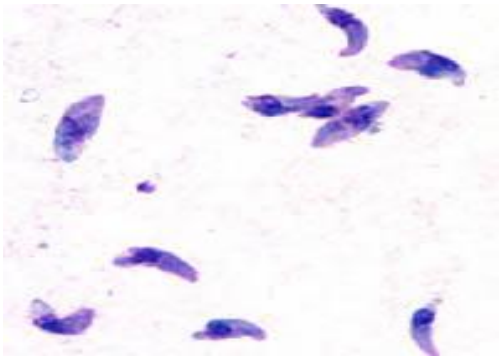
The most prevalent infection in the world.

In 1908 from *Ctenodactylus gondii*

MORPHOLOGY

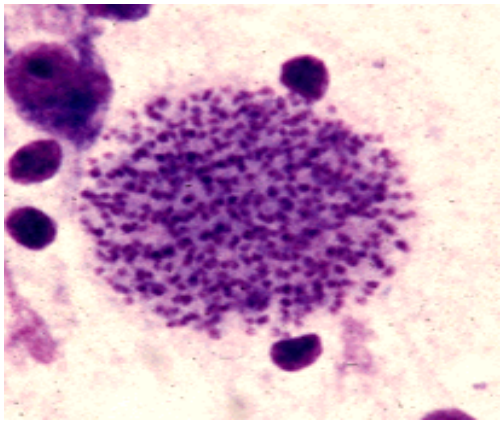
Tachyzoite

Proliferation in nuclleated cells



Tissue cyst

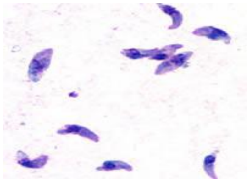
In brain, eyes, muscles



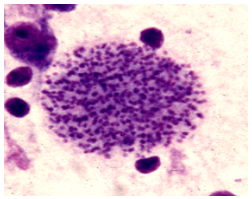
Oocyst

sheds unsporolated in cats feces

راههاي آلودگي انسان



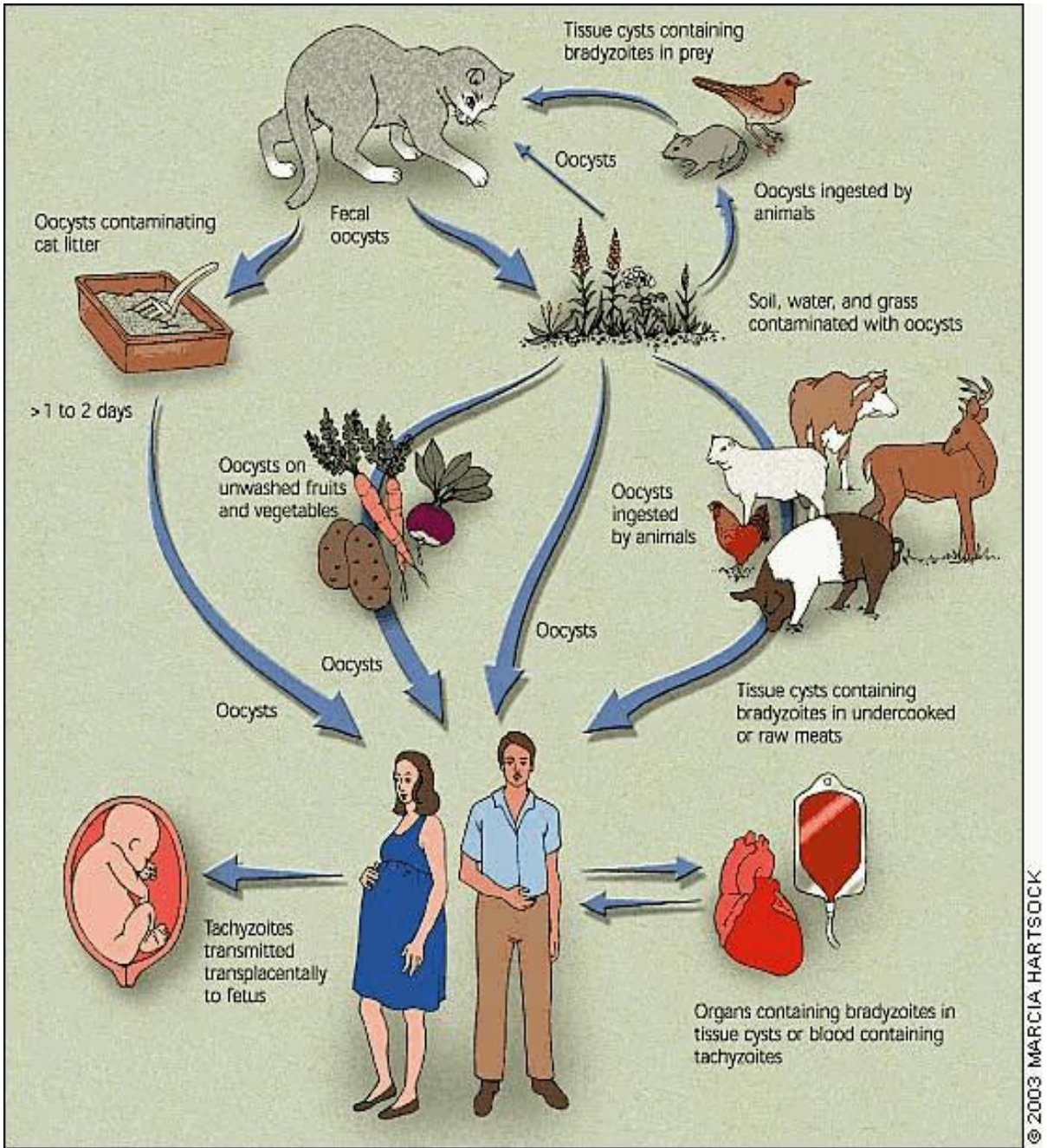
تاكي زوئيت: انتقال اختصاصاً ازراه جفت



كيست نسجي: خوردن گوشت آلوده خام يا كم پخته

ااسيست: از راه آب، سبزيجات و خاک

چرخه زندگی توکسوپلاسما



تظاهرات بالیني توکسوپلاسما

مادرزادی:.

در سه ماهه اول عوارض شدید:

مرده زایي ، هیدروسفالی ، میکروسفالي و کوریورتینیت

در سه ماهه دوم و سوم عوارض خفیف:

زردي، بزرگي کبد و طحال ، پنوموني و کند ذهني

توکسوپلاسموز اکتسابي

لنفادنوپاتیک
مغزی
چشمی
افراد نقص ایمني

اپيدميولوژي

آلودگي از تمام نقاط جهان گزارش شده است .
در مناطق معتدل و مرطوب بسيار شايع ،
در مناطق گرم و خشك موارد كمتر و
در مناطق سرد حداقل است.

تشخیص آزمایشگاهي در این افراد بسیار مهم است:

زنانی که در دوره بارداری عفونت یافته اند
جنین و نوزادی که به صورت مادرزادی آلوده شده است
افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی
مبتلایان به کوریورتینیت

روشهاي تشخيص آزمايشگاهي

- روش پاتولوژي
- روشهاي پارازيتولوژي
- روشهاي سرولوژي
- روشهاي ملكولي
- روشهای اويديتی

روشهاي سرولوژی مورد استفاده در تشخيص توكسوپلاسما

روش رنگي سابين – فلدمن **(DT)**،
فيكساسيون كمپلمان **(CF)**
هماگلوتيناسيون غيرمستقيم **(IHA)** ،
فلورسنت آنتي بادي غيرمستقيم **(IFA)** ،
آگلوتيناسيون اصلاح شده **(MAT)** ،
لاتكس آگلوتيناسيون **(LA)** ،
اليزا **(ELISA)**،

IFA، ELISA و**MAT** براي تشخيـص IgM اصلاح شده اند.

وسترن بلاتينگ

روش اويديتي

روشهاي اخير مورد استفاده در تشخيص توكسوپلاسموزحاد

- روش IgG اويديتی در نمونه سرم
- روش PCR با استفاده از مايعات و بافتهای بدن
- وسترن بلات مادر و نوزاد

آزمایش‌های سرولوژی در تشخیص توکسوپلاسموز عملی و متداول هستند، ولی این روش‌ها اطلاعات غیرمستقیم بدست می‌دهند که باید به‌دقت تفسیر شوند.

چون پادتن توکسوپلاسما در خون بسیاری از جمعیت‌های انسانی وجود دارد، یک آزمایش سرولوژی مثبت به تنهائی نشان‌دهنده عفونت موجود نیست، بلکه آلودگی‌های مربوط به گذشته را نیز نشان می‌دهد به همین جهت وجود پادتن توکسوپلاسما در خون نمی‌تواند دلیل وجود بیماری توکسوپلاسموز باشد.

از طرف دیگر، بالابودن میزان عیار پادتن توکسوپلاسما در خون اگرچه راهنمای مناسبی برای ارزیابی‌های تشخیص است، ولی جهت اثبات بیماری حاد توکسوپلاسموز کافی نیست.

-تست Anti Toxoplasma IgM یک هفته پس از ورود انگل افزایش می یابد و ظرف 2-3 ماه به حداکثر می رسد و سپس در مدت یک سال به سطحی غیر قابل سنجش (Undetectable) می رسد.
-تستAnti Toxoplasma IgG دو هفته پس از تلقیح انگل شروع به افزایش نموده، در طی 2-3 ماه به اوج می رسد و سپس در طی 6 ماه تا سطح پایینی کاهش می یابد، اما ثابت باقی می ماند.
- تیتر پایین IgG به طور ویژه نشانه عفونت گذشته و وجود ایمنی در برابر انتقال عفونت حاد به جنین است. تیتر بالا یا افزایش تیتر IgGیا IgMنشانه عفونت حاد در بزرگسالان یا نوزادان است.

- افزایش چهار برابری تیتر IgGتوأم با افزایش فزاینده IgMنشاندهنده عفونت توکسوپلاسموز فعال یا حاد می باشد. اما تیتر پایین قابل ملاحظه IgGنشانه آلودگی به انگل در گذشته است.

تیتر غیر فزاینده بالای IgGاحتمالاً نشانه عفونت حاد در طی 12- 3 ماه قبل از آزمایش می باشد.

- **روش اويديتى (اويديتي IgG اليزا)**
- تست Toxo Avidity IgG يكي از ابزارهاي كشف مراحل حاد يا مزمن بيماري هاي عفوني مانند توكسوپلاسما گوندي است.

بعضي مواقع به دلايل مختلف ارزيابي صرفا IgM براي مراحل حاد توكسوپلاسما گوندي مفيد نيست:

پاسخ هاي طولاني مدت IgM،

تاخير در توليد اين آنتي بادي

پاسخ هاي غير اختصاصي پلي كلونال IgM (Polyclonal) بر عليه فاكتورهاي گوناگون

در سال هاي اخير كشف روش الايزاي اويديتي در بررسي عفونت هاي اخير با انگل توكسوپلاسما گوندي راهكاري مناسب براي اين موضوع است كه فقط به ارزيابي آنتي بادي از كلاس IgG مي پردازد.

در اوايل عفونت مقدار ميل تركيبی آنتي بادي در اتصال به آنتي ژن در حالت كم (Low Avidity) قرار دارد و با ادامه عفونت تمايل آنتي بادي مذكور براي اتصال به آنتي ژن انگل توكسوپلاسما گوندي افزايش مي يابد و در حالت (High Avidity) قرار مي گيرد كه نشانه عفونت طولاني مدت مي باشد.

بنابراين اگر ميل تركيبی آنتی بادی در منطقه Low Avidity قرار گيرد نشانه عفونت اخير در فرد و انجام آمنيوسنتز و انجام Toxoplasmosis درPCR مايع آمنيون پيشنهاد می شود.

وسترن بلاتینگ IgG , IgM مادر و نوزاد

اساس : مشاهده باندهای IgGو IgMدر سرم مادر و نوزاد با روش وسترن بلاتینگ

هر گاه عفونت از مادر به جنین منتقل گردد و جنین آنتی بادی بسازد در الگوی وسترن بلاتینگ در سرم این دو تفاوت وجود خواهد داشت.

PCR

روش مفیدی برای تشخیص عفونت مادرزادی ، چشمی و موارد نقص ایمنی با استفاده از نمونه های:

مایع آمینوتیک ، بافتهای جنینی و مغزی، خون کامل، مایع مغزی نخاعی، مایع داخل چشمی ، مایع برونکوآلوئلار و مایع صفاق

ژنهای مورد استفاده: ژن B1 ، AF146527 (قطعه ای از DNA با 200-300 کپی)

استفاده از این روش در توکسوپلاسموز جنینی از هفته 18 به بعد حساستر و سالمتر است.

Real –time PCR

با سپاس فراوان از توجه شما