

ندوة (داء القطط (المقوسات) ودورها في الاجهاض والتشوهات الخلقية في الانسان
وحيوانات المزرعة) الثلاثاء ٢٠١٢/١٢/١١

كيف نشخص الإصابة بداء المقوسة الكوندية:

إن للتشخيص أهمية كبيرة في حيوانات المزرعة وكذلك الإنسان وخاصة بالنسبة للنساء الحوامل وذلك لاتخاذ الإجراءات العلاجية المبكرة لتجنب الإصابة الخلقية للجنين حيث أن من أهم الأسباب التي تقف وراء انتشار داء المقوسات الكوندية التشخيص المتأخر للخمج ، وذلك لعدم وضوح العلامات السريرية ويمكن أن يتم التشخيص بطرائق عدة:

العلامات السريرية Clinical signs:

يعد حدوث الإجهاض أول شيء يثير الشكوك حول وجود الداء ، وكذلك الموت الولادي، والتشوهات الخلقية مثل موه الرأس، التهاب الدماغ، التهاب الشبكية والقرنية ، ويكون المولود المصاب ضعيفا وقد يموت خلال 3 - 4 أيام بعد الولادة حيث يظهر عليه ارتفاع درجات الحرارة وصعوبة التنفس، كما لوحظ تضخم العقد اللمفية مع طفح جلدي، لكن من الصعوبة الاعتماد على تشخيص المرض من الحالات السريرية فقط.

الاختبارات غير المصلية Non-serological tests:

عزل الطفيلي: إن أول إظهار للإصابة والتي يثبت وجودها هو عزل الطفيل من الطفل المولود حديثا. مع ذلك، فإن العزل عادة يأخذ فترة طويلة للتشخيص، يمكن أن يعزل الطفيل من خلال حقن نماذج مأخوذة من سوائل الجسم، كريات الدم البيضاء، دم الجنين، نخاع العظم، أو من مسحون المشيمة في بريتون فتران غير مصابة أو في مزرعة نسيجية ، وبعد حوالي إسبوعين أو أكثر يمكن أن يؤخذ منها السائل البريتوني ويفحص تحت المجهر للبحث عن الحويئات السريعة.

الفحص المجهرى المباشر: يعتمد هذا الفحص على وجود الطور السريع في السوائل الجسمية كالدّم وسائل النخاع الشوكي والسائل الأمنيوني والقشع، أو وجود الأكياس النسيجية في أنسجة الجسم مثل نسيج السخد والدماغ والأنسجة الأخرى ، ويتم عمل مقاطع نسيجية لأعضاء وأنسجة مختلفة من جسم المضيف للتحري عن وجود الأكياس النسيجية التي تكون عادة بالقرب من مناطق متخثرة وملتهبة.

ندوة (داء القطط (المقوسات) ودورها في الاجهاض والتشوهات الخلقية في الانسان
وحيوانات المزرعة) الثلاثاء ٢٠١٢/١٢/١١

التشخيص النسجي Histological Diagnosis:

يتم الفحص النسجي من خلال استخدام صبغة هيماتوكسلين وايوسين، أنزيم البيروكسيدز المناعي، صبغة كمزا والصبغة الصامدة للحامض (PAS) Periodic Acid Shiff. كذلك فإن الأكياس النسجية القريبة من مناطق الالتهاب أو التنخر يمكن أن تعتمد في التشخيص .

اختبار الجلد Skin test:

استخدم هذا الفحص لأول مرة من قبل Frenkel عام (1948)، حيث قد تؤدي الإصابة بالخمج إلى ظهور حالات فرط الحساسية للجلد والمتمثلة بظهور بقع حمراء بعد الإصابة.

الاختبارات المصلية Serological tests:

تعد هذه الاختبارات من الطرائق الرئيسية للتشخيص حيث يتم فيها الكشف عن الأضداد للمقوسة الكوندية ، هذه الأضداد تكون على أنواع هي:
أضداد **IgG** تظهر عادة خلال 1 - 2 أسبوع من الإصابة وتصل قممتها بحدود 1 - 2 شهرا،
اما أضداد **IgM** فهي تظهر **IgM** مع بداية الإصابة في معظم الحالات، وهذا الضد يمكن أن يختفي خلال بضعة أشهر في بعض المرضى، في حين الضد **IgA** ثبت أنها أكثر حساسية من تلك التي تعتمد أضداد **IgM** في الجنين المولود حديثا اما الضد **IgE** فيمكن إظهارها بفحص الإليزا في البالغين المصابين إصابة حادة، والأجنة المولودين حديثا، وكذلك الأطفال المصابين إصابة خلقية الذين تظهر عليهم أعراض التهاب الشبكية المشيمي.

تختلف هذه الفحوصات في درجة حساسيتها ونوعيتها والوقت اللازم لإجرائها، وهي ذات كفاءة جيدة إذ تعطي صورة واضحة عن الإصابة لكن هذه الإختبارات تتأثر بعوامل عدة منها مرحلة الإصابة، مصدر الإصابة، نوعية الاختبار، لذلك يفضل إجراء أكثر من اختبار مصلي للحصول على صورة واضحة للإصابة . وتشمل الإختبارات المصلية ما يأتي:

ندوة (داء القطط (المقوسات) ودورها في الاجهاض والتشوهات الخلقية في الانسان
وحيوانات المزرعة) الثلاثاء ٢٠١٢/١٢/١١

فحص الصبغة لسابين وفيلدمان Sabin–Feldman Dye Test:

يسمى أيضا اختبار الصبغة Dye test، ومبدأ الاختبار مبني على أساس فقدان الطفيل لألفته لصبغة أزرق المثيلين ، فالطفيل المتحلل بفعل الأضداد لا يصبغ بصبغة المثيلين الزرقاء القاعدية بسبب التحلل الجزيئي لغشاء الطفيل بواسطة الأضداد المتخصصة فضلا عن عوامل مساعدة في المصل، في حين يصبغ الطفيل غير المتحلل بهذه الصبغة

اختبار التلازن الدموي Heamagglutination Test:

يتم فيه الكشف عن الكلوبولينات المناعية من نوعي IgG و IgM. يتميز بسهولة إجرائه وكلفته المناسبة وقلة الوقت والجهد اللازمين لإجرائه ، ويشمل هذا الاختبار أنواعا عدة منها اختبار التلازن المباشر (Direct Agglutination Test (DAT) ، ويعتمد مبدأ الفحص على استخدام الطفيل بأكمله المعامل بالفورمالين كمستضد . أما النوع الآخر من اختبار التلازن الدموي فهو اختبار تلازن جزيئات اللاتكس Latex Agglutination Test (LAT) وذلك باستخدام حبيبات اللاتكس الخاملة المصنوعة من متعدد الستيرين (Polystyrenes) والمحسنة بمستضدات الحوين السريع التكاثر وجزيئات اللاتكس، وهذه تتلازن عند تفاعلها مع الأضداد المتخصصة للطفيلي الموجودة في المصل الموجبة . ولزيادة الكفاءة التشخيصية لهذا الاختبار تعامل المصل الحاوية على الأضداد المتخصصة للطفيلي والموجبة بمادة 2-Mercapto-ethanol (2-ME) وذلك للتخلص من الأضداد المتخصصة نوع IgM، في حين تبقى الأضداد نوع IgG في هذه المصل ومن خلال ذلك يمكن تشخيص نوع الإصابة فيما إذا كانت حادة أم مزمنة .

اختبار التلازن الدموي غير المباشر

Indirect Heam Agglutination Test (IHA):

ومبدأ الاختبار يتضمن استخدام مستضدات الطفيلي الذائبة التي لها القدرة على الالتصاق على سطوح كريات الدم الحمراء التي تتلازن مع مصل المريض الحاوي على الأضداد بعد مدة تحضين مناسبة حيث تظهر بشكل شبكة تلاحظ بالعين المجردة . يمتاز هذا الفحص بسهولة إجرائه إلا أنه أقل حساسية من فحص الاليزا في كشف إصابة النساء الحوامل.

ندوة (داء القطط (المقوسات) ودورها في الاجهاض والتشوهات الخلقية في الانسان
وحيوانات المزرعة) الثلاثاء ٢٠١٢/١٢/١١

اختبار تثبيط المتمم (CFT) Complement Fixation Test:

إن مبدأ هذا الفحص هو الكشف عن الأجسام المضادة لمستضدات الطفيل (مستضدات ذائبة أو مرتبطة بسطح الخلايا) وعادة ما تؤخذ هذه المستضدات من النضحة البريتونية للفئران أو الأغشية الجنينية لأجنة الدجاج المخمجة .

اختبار التبقيع البروتيني (Westron Blott) Protein Blotting Technique:

يتم خلال هذه التقنية فصل المستضدات البروتينية المحضرة سابقا باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية إلى حزم ونقلها إلى غشاء النايتروسيليلوز، ومن ثم إضافة الأضداد الموجودة في مصل المريض. ويكشف عن المعقدات المتكونة بإضافة الضد للكلوبيولينات المناعية نوع IgM , IgG , IgA المعلم بالأنزيم، الذي سيلتصق بالأضداد الموجودة التي سيتحرى عنها بإضافة المادة الأساس للأنزيم. تمتاز هذه التقنية بحساسية عالية للخمج منذ الأيام الأولى من الخمج .

اختبار تحديد شراهة IgG- Avidity Test:

يعد هذا الاختبار من الاختبارات القياسية التي يتم فيها استبعاد الإصابة القديمة، وذلك لكون الكلوبيولين المناعي IgG ذي الألفة الواطئة للارتباط مع المستضدات يشير إلى الطور الحاد من الخمج، فتكون عادة شراهة ضعيفة بعد 3 أشهر من الإصابة

اختبار تآلق الضد غير المباشر: Indirect Fluorescent Antibody Test:

يعتمد على مبدأ ارتباط مستضدات الطفيل المثبتة بالفورمالين مع الأضداد النوعية الموجودة في مصل المريض وبعد التحضين يتم الكشف على مدى الارتباط بإضافة مضاد الكلوبيولين المناعي المعلم بالفلوروسين، وعند فحص الشريحة تحت المجهر التآلقي يظهر الضد متألقا بلون أخضر مصفراً ساطعاً مؤشراً إلى النتيجة الايجابية للفحص، وبلون أحمر معتم عندما تكون النتيجة سالبة للفحص .

ندوة (داء القطط (المقوسات) ودورها في الاجهاض والتشوهات الخلقية في الانسان
وحيوانات المزرعة) الثلاثاء ٢٠١٢/١٢/١١

اختبار ارتباط الأنزيم للترشيح المناعي

Enzyme Linked Immunofiltration Assay (ELIFA):

يستخدم هذا الاختبار لتمييز الأنواع المختلفة من الأضداد في الأطفال حديثي الولادة والمصابين خلقيا وأمهاتهم، إذ تؤخذ 3 عينات من الدم، الأولى من الأم والثانية من الحبل السري والثالثة من الطفل المولود بعمر اسبوع لتمييز الأضداد للكلوبيولينات المناعية المختلفة , IgE , IgG , IgM , IgA الموجودة في مصل الدم .

اختبار ارتباط الأنزيم للإدمصاص المناعي

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA):

ويشمل نوعين من الاختبارات:

اختبار ELISA-IgG: يعد هذا الاختبار من أكثر الاختبارات دقة ، والذي يستعمل للكشف عن IgG، وفيه يستخدم الطفيل بأكمله أو مستضداته الذائبة، حيث يتم لصق المستضد على السطح الداخلي للحفر المصنعة من البولستيرون والمرتبطة بشكل صفائح لقياس المعيارية . وعند إضافة المصل يتم الكشف عن الأضداد المرتبطة مع المستضد بإضافة الكلوبيولين المناعي المضاد والمعلم بالأنزيم، فيتم القياس الكمي للأنزيم بإضافة المادة الأساس وتفاعله معها ليعطي اللون الذي يمكن قياس شدته الذي يتناسب طرديا مع كمية الأضداد المرتبطة.

اختبار ELISA-IgM: تقنية جديدة للتحري عن IgM لتشخيص داء المقوسات، يتم لصق مضاد الكلوبيولين المناعي IgM على السطح الداخلي لحفر قياس المعيارية وإضافة مصل المريض الحاوي على أضداد الكلوبيولين IgM حيث يحصل الارتباط بين المستضد والضد، ويكشف عن IgM بإضافة مستضد الطفيل المعلم بالأنزيم الذي سوف يلتصق بالضد. تضاف المادة الأساس للأنزيم وتتفاعل معه ليعطي اللون الذي يمكن قياس شدته، الذي يتناسب طرديا مع كمية الأضداد الموجودة في المصل المراد تشخيصه.

ندوة (داء القطط (المقوسات) ودورها في الاجهاض والتشوهات الخلقية في الانسان
وحيوانات المزرعة) الثلاثاء ٢٠١٢/١٢/١١

اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR): Polymerase Chain Reaction Test

يعد من الاختبارات الحديثة في تشخيص الإصابة بالطفيل، وكذلك للتعرف على عتر الطفيليات، وفي تحديد طرائق جديدة للعلاج والسيطرة على الأمراض معتمدة على التغيرات الجينية، وهو من الإختبارات البديلة عن الإختبارات المصلية إذ يعتمد هذا الفحص على مضاعفة قطعة الدنا المنتخبة من المادة الوراثية الكلية إنزيميا ملايين المرات خارج الجسم الحي *in vitro* بوجود البادئات primers التي ترتبط بالنتابع المكمل لها على شريط الدنا قالب DNA template المستخلص من المصول والسوائل الجسمية المختلفة . ويمتاز هذا الفحص بخصوصيته العالية إذ تصل 100% وحساسيته المرتفعة 97.4% إذ يتحسس اقل من 10 من الحويبات سريعة التكاثر . وقد عدت التقنية وبمدة وجيزة أحد أهم التقنيات العلمية الأكثر انتشاراً لاسيما في التشخيص الدقيق والسريع، بل هي الأرخص ثمناً مقارنة ببقية الفحوصات الأخرى حيث تم استخدامها في تشخيص المسببات المرضية كالجراثيم والفيروسات والطفيليات والفطريات خلال مدة قصيرة جداً بدلاً من استخدام الطرائق التقليدية المعتمدة على الصفات المظهرية والزرعية والمقاومة للمضادات الحيوية فضلاً عن صعوبة تنمية بعض المسببات المرضية خارج الخلية . إن الهدف الأساس من تفاعل البلمرة المتسلسل هو عمل عدد كبير وضخم من النسخ لجزء من المادة الوراثية، إذ إن عملية التضخيم هذه تتألف من 30-40 دورة يتم خلالها تضاعف سلسلة DNA خلال ثلاثة مراحل وهي مرحلة المسخ وارتباط البادئ ومرحلة الاستطالة وتعاد هذه المراحل في كل دورة بصورة تلقائية لمدة زمنية محددة من أجل الحصول على ملايين النسخ لقطعة معينة من DNA في نهاية التفاعل. إن تكرار القطعة المحددة من الجين يتم بوساطة أنزيم البلمرة Polymerase بعدد من الدورات لتتكون في الدورة الأولى نسختان من شريط DNA المزدوج لتصبح أربع نسخ في نهاية الدورة الثانية وثمانية نسخ في الدورة الثالثة وهكذا تتضاعف النسخ خلال الدورات اللاحقة إلى أن يتم الحصول على ملايين النسخ في نهاية التفاعل .

ندوة (داء القطط (المقوسات) ودورها في الاجهاض والتشوهات الخلقية في الانسان
وحيوانات المزرعة) الثلاثاء ٢٠١٢/١٢/١١

متطلبات تقنية PCR:

لغرض إتمام تفاعل البلمرة المتسلسل يجب توفير المتطلبات الآتية وهي DNA القالب
DNA-template، وأنزيم البلمرة *Taq polymerase*، والبادئات Primers، والنيوكلوسيدات
منقوصة الأوكسجين الثلاثية الفوسفات Deoxy nucleoside tri-phosphates والمحلول
المنظم للتفاعل PCR buffer الذي يحوي على أيونات المغنيسيوم بالإضافة إلى جهاز المبلمر
الحراري Thermocycler .