# میزان توافق نتایج آزمون ایمونوفلورسانس غیر مستقیم توکسوپلاسموز بین چهار مرکز آزمایشگاهی

دکتر مهرزاد سرایی صحنه سرایی*- دکتر حسن جهانی هاشمی**

*استادیار انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

** استادیار آمار حیاتی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/٦/۲۷

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۲/٦

## چکیده

**مقدمه:** ایمونوفلورسانس غیرمستقیم(IFA) از روش‌های آزمون حساس و رایج در بررسی سرولوژی توکسوپلاسموز است. بسیاری از مطالعات سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسما در ایران با استفاده از این آزمون انجام شده‌است. مرور مطالعاتی که با استفاده از این آزمون در مناطق مختلف کشور با شرایط آب و هوایی متفاوت انجام شده، وضعیتی را نشان می‌دهد که با توجه به راه اصلی احتمالی انتقال توکسوپلاسما در ایران جای تأمل دارد و به نظر می‌رسد که این مغایرت‌های احتمالی به علت خطای آزمون در برخی از آزمایشگاه‌ها باشد.

**هدف:** تعیین میزان توافق نتایج آزمون IFA توکسوپلاسموز بین چهار مرکز آزمایشگاهی.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه از نوع ارزیابی بین چند مرکز است. با رعایت اخلاق تحقیق از صد نفر که در سال ۱۳۸۴ برای آزمون های پیش از ازدواج به آزمایشگاه مرکز پزشکی جامعه‌نگر قزوین مراجعه کرده‌بودند، نمونه سرم تهیه شد. هر نمونه را به چهار قسمت تقسیم کرده و در چهار آزمایشگاه مختلف از نظر ایمونوگلوبولین G (IgG) اختصاصی علیه توکسوپلاسما به روش IFA مورد آزمایش قرار دادیم. آزمون‌ها طبق پروتکل رایج همان مرکز انجام شد. در تمام آزمایشگاه‌ها رقت‌های ۱:۲۰، ۱:۱۰۰، ۱:۲۰۰ و بالاتر اندازه‌گیری و عیار ≥ ۱:۲۰ مثبت در نظر گرفته شد. ضریب کاپا بین نتایج هر دو مرکز محاسبه شد.

**نتایج:** میزان مثبت شدن سرولوژی آزمون IFA توکسوپلاسما در این چهار مرکز ۷۲ ، ٤٤ ، ٣٤ و ۲۳ درصد گزارش شد. ضریب کاپا در موارد مقایسه هر دو مرکز با یکدیگر در بالاترین حد ۰/۳۶ و در پایین‌ترین حد ۰/۱۶ بود.

**نتیجه‌گیری:** توافق نتایج گزارش شده بین چهار مرکز بیش از حد انتظار پایین بود. به نظر می رسد، انجام این آزمون در برخی از آزمایشگاه‌های کشور اشکال‌هایی دارد که باید برطرف شود.

بنابراین، توصیه می شود تأثیر هر یک از عوامل مؤثر بر نتایج آزمون IFA توکسوپلاسموز به تفکیک مورد بررسی قرار گیرد.

**کلید واژه‌ها:** تست‌های خون‌شناسی/ تکنیک ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم/ توکسو پلاسموز/ فنون و روش‌های آزمایشگاهی

## مقدمه

توکسوپلاسموز بیماری انگلی مهمی‌ست که به علت خوردن اووسیست‌های دفع شده با مدفوع گربه و خوردن گوشت خام یا نیم پز حاوی کیست‌های نسجی توکسوپلاسماگوندیی اتفاق می‌افتد. فرم مادرزادی آن به سبب انتقال تاکی‌زوئیت‌ها از راه جفت به جنین روی می‌دهد. توکسوپلاسموز در افراد با کفایت عملکرد ایمنی (Immunocompetent) معمولاً سیر خوش‌خیم و خودمحدودشونده دارد ولی در افراد دچار اختلال ایمنی (Immunocompromised) سبب بیماری شدیدی می‌شود که تهدیدکننده حیات است. این بیماری انگلی در موارد مادرزادی ممکن است سبب سقط، مرده زایی و عقب ماندگی جسمی و ذهنی شود.

تشخیص توکسوپلاسموز در چهار گروه زنان حامله، جنین و نوزاد، بیماران دچار اختلال ایمنی و افراد مبتلا به کوریورتنیت بسیار حیاتی‌ست. برای تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز از روش‌های سرولوژی، هیستوپاتولوژی، ایمونوهیستوشیمی و مولکولی استفاده می‌شود. روش رایج آن انواع آزمون‌های سرولوژی است

**نویسنده مسئول:** دکتر مهرزاد سرایی صحنه‌سرایی؛ قزوین- دانشکده پزشکی شهید بابایی- مرکز تحقیقات علوم پایه

msaraei@qums.ac.ir

که امروزه رایج‌ترین آن آزمون الایزا Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) می‌باشد. در موارد حیاتی بکارگیری آزمون‌های IgG Avidity، Western Blot و Polymerase Chain Reaction (PCR) و توصیه شده است(۱). سرولوژی توکسوپلاسموز مشکلات و محدودیت‌هایی دارد که اساسی‌ترین آنها تمایز عفونت حاد(فعلی) و مزمن(قبلی) از یکدیگر است(۲). مورد مهم دیگر، استانداردسازی این آزمون‌هاست که تلاش‌هایی صورت می‌گیرد تا با تهیه آنتی ژن‌های نوترکیب به انجام برسد(۳).

انواع آزمون‌های سرولوژی توکسوپلاسموز از جنبه‌های مختلف ارزیابی شده‌اند. در این ارزیابی‌ها معمولاً حساسیت و ویژگی انواع آزمون‌ها(۴) یا انواع کیت‌های یک نوع آزمون(۵) مقایسه شده‌اند. آزمون Indirect Immunofluorescent Antibody (IFA) در این ارزیابی‌ها به عنوان آزمونی حساس پذیرفته شده و سال‌هاست که از آن در مراکز معتبر جهانی همچون Center for Disease Control and Prevention (CDC) استفاده می‌شود. آزمون IFA با وجود حساس‌بودن، استاندارد نیست. البته، ممکن است که در برخی از آزمایشگاه‌ها روش انجام آزمون استاندارد شده‌باشد(۶). ممکن‌ست عوامل مختلفی چون آنتی ژن، آنتی هیومن آنتی‌بادی کونژوگه، میکروسکوپ و خواندن میکروسکوپی نتایج بر گزارش عیار نهایی(End Point) آزمون تاثیر بگذارند.

سال‌هاست که در کشور ما از آزمون IFA برای تشخیص توکسوپلاسموز استفاده می‌شود و بسیاری از مطالعات سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسما با این آزمون انجام شده است. مرور برخی مطالعات انجام شده به کمک این آزمون در مناطق مختلف کشور با شرایط آب و هوایی متفاوت (۹-۷)، وضعیتی را نشان می‌دهد که با توجه به بیولوژی انگل و راه اصلی احتمالی انتقال توکسوپلاسما در ایران جای تأمل و بررسی دارد. به نظر می‌رسد که برخی از این گزارش‌ها نشان‌دهنده سیمای واقعی شیوع توکسوپلاسموز در آن منطقه نباشد. ممکن‌ست مغایرت‌های احتمالی مربوط به خطای آزمون باشد. به همین دلیل در این مطالعه مقدماتی میزان توافق نتایج آزمون IgG-IFA توکسوپلاسموز بین چهار مرکز آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

سرم: با رعایت اخلاق تحقیق نمونه سرم از صد نفر که در سال ۱۳۸۴ برای انجام آزمایش های پیش از ازدواج به آزمایشگاه مرکز پزشکی جامعه‌نگر قزوین مراجعه کرده‌بودند، تهیه شد. این مرکز عهده‌دار غربالگری (screen) آزمایش‌های الزامی پیش از ازدواج در استان قزوین است. هر نمونه به چهار قسمت تقسیم شد و در شرایط سرمایی به چهار مرکز انجام‌دهنده آزمون ارسال شد. نمونه‌های سرم تا هنگام آزمایش در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

روش بررسی: این مطالعه از نوع ارزیابی بین چند مرکز(multicenter evaluation) است. چهار مرکز ارزیابی شدند که سه تا دانشگاهی و چهارمی از مراکز پژوهشی کشور بود. با توجه به ضرورت مطالعه و جلب همکاری این مراکز، طبق موافقت قبلی از ذکر اسامی آنها و افراد همکار در این گزارش خودداری شد. این چهار مرکز با علایم A، B ، C و D مشخص شدند. همکاران، از پیش در مورد اهداف کاملاً توجیه شده بودند. برای ارزیابی قرار شد که آزمون IFA توکسوپلاسموز در هر مرکز طبق پروتکل رایج در همان مرکز انجام شود و هیچ کدام از کیت تجاریIFA توکسوپلاسموز استفاده نکردند. تمام آنها تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلاسما گوندیی را به عنوان آنتی ژن بکار بردند. در مراکز A و B، آنتی‌ژن یکسان و از یک دسته (batch) بود ولی مراکز B و C هر کدام از آنتی ژن تهیه شده خودشان استفاده کردند، تمام مراکز

پادتن IgG D ضدانسانی( Fluorescein Isothiocyanate-Antibody Conjugated Anti-human IgG) تجاری تهیه کردند که شرکت‌های تولیدکننده آنها متفاوت بودند. سرم‌ها در هر چهار مرکز با رقت‌های ۱:۲۰، ۱:۱۰۰، ۱:۲۰۰ و رقت‌های سریال بالاتر آزمایش شدند و رقت ≤ ۱:۲۰ مثبت در نظر گرفته شد. برای تعیین میزان توافق نتایج آزمون‌ها بین هر دو مرکز از ضریب کاپا استفاده شد.

## نتایج

میزان مثبت شدن سرولوژی(Seropositivity Rate (SPR توکسوپلاسما در مراکز A، B، C و D به ترتیب ٤٤، ۲۳، ۳٤ و ۷۲ درصد بود.

مقایسه نتایج آزمون ها بین مراکز A و B در جدول ۱ نشان داده شده است. برای محاسبه ضریب کاپا جدول آن باید به‌صورت مربع باشد(با سطرها و ستون‌ها به تعداد مساوی). این ضریب بین دو مرکز مذکور در موارد منفی(<۱:۲۰) و ۲عیار ۱:۲۰ و ۱:۱۰۰ در ۸۴ نمونه سرم، ۰/۳۶ بدست آمد. در۶۲ مورد عیار یکسان بود و تنها در ۳ مورد در مرکز B بیشتر(با یک عیار اختلاف) و در بقیه موارد در مرکز A بالاتر بود، به طوری که در ۱۴ مورد یک عیار ، ۱۱ مورد دو عیار، ۶ مورد سه عیار، ۲ مورد چهار عیار و ۲ مورد پنج عیار بیش از مرکز B بود.

ضریب کاپا بین مراکز A و C برای موارد منفی و ۳ عیار ۱:۲۰ ، ۱:۱۰۰ و ۱:۲۰۰ در ۸۹ نمونه سرم، ۰/۳۳ بود. در این دو مرکز در ۶۰ مورد عیار یکسان بود و در ۶ مورد در مرکز C عیار بالاتری گزارش شد که ۵ مورد آن یک‌عیار و ۱مورد آن دو عیار اختلاف داشت. در بقیه موارد عیار گزارش شده مرکز A بالاتر بود، به طوری که در ۱۷ مورد یک عیار، ۹ مورد دو عیار، ۶ مورد سه عیار و ۲مورد چهار عیار بیشتر از مرکز B بود (جدول۲).

ضریب کاپا بین مراکز A و D برای موارد منفی و تمامی عیارها غیر از ۱:۳۲۰۰ در ۹۹ نمونه سرم، ۰/۱۷ بود. در این دو مرکز ۳۶ مورد عیار گزارش شده یکسان بود. در ۵ مورد عیار در مرکزA بالاتر بود که ۳ مورد آن یک عیار، ۱ مورد آن دو عیار و ۱ مورد آن سه عیار اختلاف داشت. در بقیه موارد عیار گزارش شده مرکز D بالاتر بود، به طوری که در ۲۷ مورد یک عیار ، ۱۷ مورد دو عیار، ۱۴ مورد سه عیار و ۱ مورد چهار عیار بیش از مرکز A بود (جدول ۳).

ضریب کاپا بین مراکز B و C برای موارد منفی و ۳ عیار ۱:۲۰ ، ۱:۱۰۰ و ۱:۲۰۰ در ۹۹ نمونه سرم، ۰/۱۶ بود. در این دو مرکز در ۶۲ مورد عیار گزارش شده یکسان بود. در ۲۶ مورد در مرکزC عیار بالاتری گزارش شد که ۲۳ مورد آن یک عیار و ۳ مورد آن دو عیار اختلاف داشت. در ۱۲ مورد عیار در مرکز B بالاتر بود، به طوری که ۱۰ مورد آن یک عیار و ۲ مورد آن دو عیار اختلاف داشت (جدول ۴).

ضریب کاپا بین مراکز B و D برای موارد منفی و ۳ عیار ۱:۲۰ ، ۱:۱۰۰ و ۱:۲۰۰ در ٦۲ نمونه سرم، ۰/۱٦ بود. در این دو مرکز در ۳۳ مورد عیار گزارش شده یکسان بود. تنها در ۱ مورد در مرکزB عیار بالاتری گزارش شد که ۲ عیار اختلاف داشت. در ۶۶ مورد عیار گزارش شده مرکزD بالاتر بود، به طوری که در ۲۱ مورد یک عیار ، ۱۳ مورد دو عیار، ۱۴ مورد سه عیار، ۱۰ مورد چهار عیار،۷ مورد پنج عیار و ۱ مورد شش عیار اختلاف داشت (جدول ۵).

ضریب کاپا بین مراکز C و D برای موارد منفی و عیار ۱:۲۰ در ۵۴ نمونه سرم، ۰/۲ بود. در این دو مرکز در ۳۳ مورد عیار گزارش شده یکسان بود. تنها در ۱ مورد در مرکز C عیار بالاتری گزارش شد که یک عیار اختلاف داشت. در ۶۶ مورد عیار گزارش شده مرکز D بالاتر بود، به طوری که در ۲۵ مورد یک عیار ، ۱۳ مورد دو عیار، ۱۲ مورد سه عیار، ۱۳ مورد چهار عیار و ۳ مورد پنج عیار اختلاف داشت (جدول ۶).

جدول ۱: مقایسه نتایج آزمون **IgG-IFA Toxoplasmosis** یکصد سرم* بین مراکز **A** و **B**

| مرکز A / مرکز B | منفی | ۱:۲۰ | ۱:۱۰۰ | ۱:۲۰۰ | ۱:۴۰۰ | ۱:۸۰۰ | ۱:۱۶۰۰ | جمع |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| منفی | ۵۴ | ۱۱ | ۶ | ۳ | ۲ | ۱ | – | ۷۷ |
| ۱:۲۰ | ۲ | ۶ | ۲ | ۲ | ۱ | – | ۱ | ۱۴ |
| ۱:۱۰۰ | – | ۱ | ۲ | – | ۲ | ۲ | – | ۷ |
| ۱:۲۰۰ | – | – | – | – | ۱ | ۱ | – | ۲ |
| جمع | ۵۶ | ۱۸ | ۱۰ | ۵ | ۶ | ۴ | ۱ | ۱۰۰ |

* سرم ها از افرادی است که برای انجام آزمایشات قبل از ازدواج به آزمایشگاه مراجعه کردند.

جدول ۲: مقایسه نتایج آزمون IgG-IFA Toxoplasmosis یکصد سرم* بین مراکز A و C

| مرکز A / مرکز C | منفی | ۱:۲۰ | ۱:۱۰۰ | ۱:۲۰۰ | ۱:۴۰۰ | ۱:۸۰۰ | ۱:۱۶۰۰ | جمع |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| منفی | ۵۲ | ۹ | ۴ | ۱ | – | – | – | ۶۶ |
| ۱:۲۰ | ۴ | ۷ | ۵ | ۳ | ۴ | ۱ | – | ۲۴ |
| ۱:۱۰۰ | – | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۶ |
| ۱:۲۰۰ | – | ۱ | – | – | ۱ | ۱ | – | ۳ |
| ۱:۴۰۰ | – | – | – | – | – | ۱ | – | ۱ |
| جمع | ۵۶ | ۱۸ | ۱۰ | ۵ | ۶ | ۴ | ۱ | ۱۰۰ |

* سرم ها از افرادی است که برای انجام آزمایشات قبل از ازدواج به آزمایشگاه مراجعه کردند.

جدول ۳: مقایسه نتایج آزمون IgG-IFA Toxoplasmosis یکصد سرم* بین مراکز A و D

| مرکزA / مرکز D | منفی | ۱:۲۰ | ۱:۱۰۰ | ۱:۲۰۰ | ۱:۴۰۰ | ۱:۸۰۰ | ۱:۱۶۰۰ | جمع |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| منفی | ۲۶ | ۱ | ۱ | – | – | – | – | ۲۸ |
| ۱:۲۰ | ۱۹ | ۴ | ۲ | – | ۱ | – | – | ۲۶ |
| ۱:۱۰۰ | ۹ | ۱ | ۱ | – | – | – | – | ۱۱ |
| ۱:۲۰۰ | ۱ | ۲ | ۳ | – | – | – | – | ۶ |
| ۱:۴۰۰ | ۱ | ۱۰ | ۱ | ۱ | ۱ | – | – | ۱۴ |
| ۱:۸۰۰ | – | – | ۲ | ۳ | ۳ | ۳ | – | ۱۱ |
| ۱:۱۶۰۰ | – | – | – | ۱ | ۱ | – | ۱ | ۳ |
| ۱:۳۲۰۰ | – | – | – | – | – | ۱ | – | ۱ |
| جمع | ۵۶ | ۱۸ | ۱۰ | ۵ | ۶ | ۴ | ۱ | ۱۰۰ |

*سرم ها از افرادی است که برای انجام آزمایشات قبل از ازدواج به آزمایشگاه مراجعه کردند.

جدول ۴ : مقایسه نتایج آزمون IgG-IFA Toxoplasmosis یکصد سرم* بین مراکز B و C

| مرکز B / مرکز C | منفی | ۱:۲۰ | ۱:۱۰۰ | ۱:۲۰۰ | جمع |
|---|---|---|---|---|---|
| منفی | ۵۸ | ۷ | ۱ | – | ۶۶ |
| ۱:۲۰ | ۱۸ | ۳ | ۲ | ۱ | ۲۴ |
| ۱:۱۰۰ | ۱ | ۳ | ۱ | ۱ | ۶ |
| ۱:۲۰۰ | – | ۱ | ۲ | – | ۳ |
| ۱:۴۰۰ | – | – | ۱ | – | ۱ |
| جمع | ۷۷ | ۱۴ | ۷ | ۲ | ۱۰۰ |

*سرم ها از افرادی است که برای انجام آزمایشات قبل از ازدواج به آزمایشگاه مراجعه کردند.

جدول ۵ : مقایسه نتایج آزمون IgG-IFA Toxoplasmosis یکصد سرم* بین مراکز B و D

| مرکز B / مرکز D | منفی | ۱:۲۰ | ۱:۱۰۰ | ۱:۲۰۰ | جمع |
|---|---|---|---|---|---|
| منفی | ۲۸ | – | – | – | ۲۸ |
| ۱:۲۰ | ۲۰ | ۵ | – | ۱ | ۲۶ |
| ۱:۱۰۰ | ۱۱ | – | – | – | ۱۱ |
| ۱:۲۰۰ | ۵ | – | ۱ | – | ٦ |
| ۱:٤۰۰ | ۸ | ۵ | ۱ | – | ۱٤ |
| ۱:۸۰۰ | ٤ | ۲ | ٤ | ۱ | ۱۱ |
| ۱:۱٦۰۰ | ۱ | ۲ | – | – | ۳ |
| ۱:۳۲۰۰ | – | – | ۱ | – | ۱ |
| جمع | ۷۷ | ۱٤ | ۷ | ۲ | ۱۰۰ |

*سرم ها از افرادی است که برای انجام آزمایشات قبل از ازدواج به آزمایشگاه مراجعه کردند.

جدول۶: مقایسه نتایج آزمون IgG-IFA Toxoplasmosis یکصد سرم* بین مراکز C و D

| مرکز C / مرکز D | منفی | ۱:۲۰ | ۱:۱۰۰ | ۱:۲۰۰ | ۱:٤۰۰ | جمع |
|---|---|---|---|---|---|---|
| منفی | ۲۷ | ۱ | – | – | – | ۲۸ |
| ۱:۲۰ | ۲۰ | ٦ | – | – | – | ۲٦ |
| ۱:۱۰۰ | ۹ | ۲ | – | – | – | ۱۱ |
| ۱:۲۰۰ | ۳ | ۲ | ۱ | – | – | ٦ |
| ۱:٤۰۰ | ۵ | ۷ | ۱ | ۱ | – | ۱٤ |
| ۱:۸۰۰ | ۲ | ۵ | ۲ | ۱ | ۱ | ۱۱ |
| ۱:۱٦۰۰ | – | ۱ | ۲ | – | – | ۳ |
| ۱:۳۲۰۰ | – | – | – | ۱ | – | ۱ |
| جمع | ٦٦ | ۲٤ | ٦ | ۳ | ۱ | ۱۰۰ |

*سرم ها از افرادی است که برای انجام آزمایشات قبل از ازدواج به آزمایشگاه مراجعه کردند.

## بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه ما میزان توافق نتایج آزمون IFA توکسوپلاسموز بین چهار مرکز بیش از حد انتظار پایین بود. این حد تفاوت پذیرفتنی نیست و نیاز به بررسی دارد. البته، تفاوت نتایج در حد اندک می‌تواند به ماهیت آزمون مربوط باشد. عوامل مختلف می‌توانند بر نتایج آن تاثیر بگذارند. مهم‌ترین آنها، آنتی‌ژن، کونژوگه آنتی‌هیومن آنتی‌بادی کونژوگه، میکروسکوپ و قضاوت چشمی فلورسنت اطراف تاکی زوئیت هاست. برای تهیه آنتی‌ژن از پیکره کامل تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسماگوندیی استفاده می‌شود. تاکی‌زوئیت‌ها را از تکثیر داخل صفاقی در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی یا تکثیردر کشت سلولی بدست می‌آورند. پونکسیون صفاقی، حاوی تاکی‌زوئیت‌های داخل و خارج سلولی و سلول‌های عاری از تاکی‌زوئیت‌هاست. تاکی‌زوئیت‌ها را می‌توان با صافی‌های پلی‌کربنات خالص کرد ولی این کار در ایران معمول نیست، در نتیجه آنتی‌ژن‌هایی که از تکثیر داخل صفاقی تاکی‌زوئیت‌ها در هر موش تهیه می‌شوند از نظر نسبت تاکی زوئیت‌ها به سلول‌های صفاقی قدری تفاوت خواهند داشت. انواع کونژوگه‌های تجاری نیز تفاوت‌های جزیی دارند که ممکن است این تفاوت آنها از نظر تمایل، نحوه کونژوگه کردن یا حیوانی باشد که

آنتی‌هیومن آنتی‌بادی از آن تهیه می‌شود، باشند. در بررسی ما کونژوگه‌ها از شرکت‌های تجاری مختلف تهیه شده‌بودند. قضاوت میکروسکوپی خواندن نتایج آزمون نیز تعیین‌کننده است. به نظر می‌رسد که در گزارش‌دهی عیار نهایی با تشخیص میکروسکوپ بین افراد مجرب و کم تجربه، تفاوت وجود داشته باشد. ممکن است انواع میکروسکوپ‌های ایمونوفلورسانس نیز از نظر فیلتر، طول موج و عمر لامپ فلورسنت با یکدیگر متفاوت باشند. خطای ناشی از کشیدن سمپلر نیز محتمل است.

برای آزمون IFA، سرم در رقت‌های پیاپی آزمایش می‌شود و بالاترین عیاری که فلورسنت سبز درخشان یکپارچه را در سطح تاکی زوئیت‌ها نشان دهد، به عنوان عیار نهایی گزارش می‌شود. در سرم‌های مثبت از نظر پادتن‌های ضدتوکسوپلاسما، تعیین دقیق عیار نهایی آنها چندان ساده نیست، زیرا در عیار پایین آنتی‌بادی بیشتری در سرم وجود دارد و فلورسنت اطراف تاکی زوئیت ها درخشان‌تر خواهد بود ولی با افزایش عیار و رقیق‌تر شدن سرم از میزان آنتی‌بادی‌ها کاسته شده و فلورسنت آن ضعیف‌تر می‌شود. بنابراین، وقتی نتیجه آزمونی واحد توسط دو نفر خوانده شود، تفاوت یک عیار در گزارش‌دهی آنها محتمل است ولی تفاوت بیش از آن قابل توجیه نیست. در مطالعه ما این وضعیت در تمام موارد مقایسه به ویژه در مقایسه با نتایج مرکز D محسوس‌تر بود. مثلاً، سرمی که عیار آن در مرکز C، ۱:۲۰ گزارش شد، در مرکز D، ۱:۱۶۰۰ بدست آمد یا سرمی با عیار ۱:۲۰ در مرکز B، در مرکز A، ۱:۱۶۰۰ گزارش شد. عیار ۱:۲۰ در مرکز B، در مرکز C، ۱:۲۰۰ بود و سرم منفی در مرکز A در مرکزD، ۱:۴۰۰ گزارش شد. به نظر می‌رسد وقتی بیش از یک عیار تفاوت وجود داشته‌باشد، عواملی غیر از قضاوت میکروسکوپی نیز دخالت داشته‌باشند. اگر تفاوت یک عیار آنتی‌بادی قابل قبول باشد، بیشترین میزان توافق بین مراکز B و C بدست آمد. این دو مرکز سال‌هاست که در زمینه تشخیص توکسوپلاسموز در کشور فعالیت دارند و بسیاری از مطالعات سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسما را در مناطق مختلف کشور هدایت کرده‌اند.

به طور کلی عیارهای گزارش شده در این چهار مرکز به صورت $B < C < A < D$ بود. با توجه به قضاوت میکروسکوپی نتایج آزمون IFA، انتظار داریم که الگوی گزارش افراد در مقایسه با هم بر یک روال خاص باشد. به عبارتی اگر فردی در مقایسه با فرد دیگر عیار پایین‌تر یا بالاتر گزارش کند، بایستی در تمام موارد چنین باشد. ولی در مطالعه ما این مورد عمومیت نداشت. مثلاً، عیار سرمی که در مرکز B، ۱:۲۰۰ بود در مرکز C، ۱:۲۰ گزارش شد. سرمی که مرکز C، عیار ۱:۲۰۰ داشت، در مرکز A، ۱:۲۰ گزارش شد. سرمی که در مرکز D، ۱:۲۰ بود در مرکز A، ۱:۴۰۰ بدست آمد و عیار سرمی که در مرکز D، ۱:۴۰۰ بود در مرکز A، ۱:۲۰ گزارش شد.

در مطالعه ما همچون بسیاری از بررسی‌های سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسما که به کمک آزمون IFA انجام شده است (۱۲-۷ )، سرم‌های با عیار بیشتر یا مساوی ۱:۲۰، مثبت در نظر گرفته شد. با این عیار مورد قبول، SPR صد سرم همسان بین این چهار مرکز از ۱۰ تا ٤۹ درصد تفاوت داشت. این مقدار تفاوت در سروپرولانس سرم‌های یکسان دور از انتظار است و نیاز به بررسی دارد.

چون بسیاری از بررسی‌های سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسما در کشور با استفاده از این آزمون انجام شده، پیشنهاد می‌کنیم تا این مطالعات بازنگری شده و بررسی جامعی با استفاده از یک آزمون مناسب سرواپیدمیولوژی مانند Modified Agglutination Test (MAT) (۱۳) در کشور انجام شود تا سیمای واقعی‌تری از توزیع جغرافیایی توکسوپلاسموز بدست آید.

در بررسی متون تاکنون مطالعه مشابهی در کشور بدست نیامد. کوشش برای دستیابی به نتیجه مطالعات مشابه در سایر کشورها موفقیت‌آمیز نبود. لذا، مقایسه با نتایج

دیگران میسر نشد. البته، بررسی‌های متعددی برای ارزیابی آزمون‌های سرولوژی توکسوپلاسموز انجام شده که در آنها همبستگی و توافق بالایی بین انواع آزمون‌ها یا انواع کیت‌ها بدست‌آمده‌است. در مطالعه Herbrink و همکاران، ضریب همبستگی نتایج آزمون بین چهار آزمایشگاه از نظر سه آزمون سرولوژی توکسوپلاسموز در حد بالایی معنی دار بود(۱۴). در مطالعه Takahashi و Rossi، سه تکنیکELISA ، Antibody Capture ELISA و Antibody Capture Agglutination حساسیت و ویژگی بالا و نزدیک به هم داشت(۱۵). در مطالعه Marca و همکاران، نتایج بسیار مشابهی با دو آزمون IFA و MAT بدست آمد (۱۶) و در مطالعه Petersen و همکاران، ضریب همبستگی بین سیستم تمام اتوماتیک LIAISON که بر مبنای Chemiluminescence عمل می‌کند و آزمون VIDAS IgG Avidity، ۰/۸۱ بود (۱۷). از بررسی ما می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً بکارگیری آزمون IFA توکسوپلاسموز در برخی از آزمایشگاه‌های کشور اشکال‌هایی داشته‌باشد. بنابراین، باید این آزمون در کشور بازنگری شده و تمام عوامل مؤثر بر نتایج آن به تفکیک بررسی شدند. امیدواریم یافته‌های این مطالعه مورد توجه تمام محققان انگل‌شناس داخل کشور بویژه دست‌اندرکاران تحقیق بر توکسوپلاسموز قرار گیرد و به تشخیص آزمایشگاهی این بیماری انگلی بیش از پیش توجه شود.

## تشکر و قدردانی

از کمک‌های شورای محترم پژوهشی دانشگاه و همکاری مرکز تحقیقات علوم پایه دانشکده پزشکی قزوین قدردانی می‌شود. از همکاران ارجمند در سایر مراکز که همکاری بسیار صمیمانه‌ای در اجرای این تحقیق داشتند و به علت ملاحظه اخلاقی و کسب اجازه، از ذکر اسامی آنها خودداری شده است سپاسگزاری می‌کنیم. از همکاری مرکز تحقیقات علوم پایه دانشکده پزشکی و مرکز پزشکی جامعه نگر قزوین به ویژه آقای فرهاد خباز، آقای دکتر غلامرضا درگاهی و آقای یحیی عبادی نیز سپاسگزاری می‌کنیم.

## منابع

1. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2004; 42:941-945.

2. Piergili Fioretti D. Problems and Limitations of Conventional and Innovative Methods for the Diagnosis of Toxoplasmosis in Humans and Animals. Parasitologia 2004; 46:177-181.

3. Beghetto E, Spadoni A, Bruno L, Buffolano W, Gargano N. Chimeric Antigens of Toxoplasma Gondii: Toward Standardization of Toxoplasmosis Serodiagnosis Using Recombinant Products. J Clin Microbiol 2006; 44:2133-2140.

4. Marca MC, Ramos JJ, Loste A, Saez T, Sanz MC. Comparison of Indirect Immunofluorescent Antibody Test and Modified Direct Agglutination Test Methods for Detection of Toxoplasma Gondii Antibodies in Adult Sheep in Spain. Vet Parasitol 1996; 67:99-103.

5. Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C, Ware D. Evaluation of Six Commercial Kits for Detection of Human Immunoglobulin M Antibodies to Toxoplasma Gondii. The FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group. J Clin Microbiol 1997; 35:3112-3115.

6. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of Animals and Man. Florida; CRC press, 1988.

۷. دریانی، احمد؛ سقا، محسن: سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسموز در زنان مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهر اردبیل جهت انجام آزمایش های قبل از ازدواج. خلاصه مقالات چهارمین همایش سراسری انگل شناسی و بیماری های انگلی ایران. مشهد؛ دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۳۸۲، صص: ۱۰٤.

۸. سرایی صحنه سرایی، مهرزاد؛ جهانی هاشمی، حسن؛ دمیرچلی، مه لقا؛ درگاهی، غلامرضا: شیوع توکسوپلاسما گوندیی در دختران مراجعه کننده به

سومین کنگره سراسری انگل شناسی پزشکی ایران. ساری؛ دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران، ۱۳۷۹، صص: ۱۲۰.

12. Ghorbani M, Edrissian GH, Assad N. Serological Survey of Toxoplasmosis in Northern Part of Iran, Using Indirect Fluorescent Antibody Technique. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978; 72:369-371.

13. Thulliez P, Remington JS, Santoro F, et al. A New Agglutination Test for Diagnosis of Acute and Chronic Toxoplasma Infection. Pathol Biol 1986; 34: 173-177.

14. Herbrink P, Van Loon AM, Rotmans JP, et al. Interlaboratory Evaluation of Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Antibody Capture Enzyme-linked Immunosorbent Assay, and Immunoblotting for Detection of Immunoglobulin M Antibodies to Toxoplasma Gondii. J Clin Microbiol 1987; 25:100-105.

15. Takahashi EE, Rossi CL. Use of Three Immunological Techniques for the Detection of Toxoplasma Specific IgA Antibodies in Acute Toxoplasmosis. J Clin Pathol 1994; 47:1101-1104.

16. Marca MC, Ramos JJ, Loste A, et al. Comparison of Indirect Immunofluorescent Antibody Test and Modified Direct Agglutination Test Methods for Detection of Toxoplasma Gondii Antibodies in Adult Sheep in Spain. Vet Parasitol 1996; 67:99-103.

17. Petersen E, Victoria Borobio M, Guy E, et al. European Multicenter Study of the LIAISON Automated Diagnostic System for Determination of Toxoplasma Gondii- Specific Immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG Avidity Index 2005; 43:1570-1574.

مرکز پزشکی جامعه نگر قزوین جهت انجام آزمایشات قبل از ازدواج، سال ۱۳۸۱. خلاصه مقالات چهارمین همایش سراسری انگل شناسی و بیماری های انگلی ایران. مشهد؛ دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۳۸۲، صص: ۱۰۹.

۹. فتاحی بافقی، علی؛ انوری، محمد حسین؛ صادقیان، حسین علی؛ ملک پور دهکردی، زهرا؛ جوکار، نرگس؛ مختاریان، کبری؛ جمال الدین اردکانی، شهربانو: بررسی سرواپیدمیولوژیک توکسوپلاسموزیس در دختران در شرف ازدواج شهر یزد ۹- ۱۳۷۸. خلاصه مقالات سومین کنگره سراسری انگل شناسی پزشکی ایران. ساری؛ دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران، ۱۳۷۹ ، صص: ۱٦۸.

۱۰. اسماعیلی رستاقی، احمد رضا؛ آسمار، مهدی؛ قربانی، مهدی: بررسی توکسوپلاسموز مادرزادی در شهرستان آمل. خلاصه مقالات دومین کنگره سراسری بیماری های انگلی ایران. تهران؛ دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، ۱۳۷٦ ، صص: ۱۱۸.

۱۱. کشاورز، حسین؛ ناطق پور، مهدی؛ اسکندری، سید اسماعیل: بررسی سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسموز در شهرستان اسلام شهر در تابستان ۱۳۷۷. خلاصه مقالات

# Toxoplasmosis Indirect Immunofluorescent Antibody Test

# Agreement Rate among Four Laboratory Centers

Saraei Sahnesaraei M.(Ph.D)., Jahani Hashemi H.(Ph.D)


## Abstract

**Introduction:** Indirect immunofluorescent antibody (IFA) test is one of the most common serological tests for toxoplasmosis. Some of Toxoplasma seroepidemiological studies used this test in Iran. Review the studies which were performed by this test in different areas of the country with different climates, shows according to main way of transmission of Toxoplasma gondii in Iran, performing the test needed consideration. It seems that these probable contradictions are due to mistakes of the test procedure in some of the laboratories.

**Objective:** This study was performed to determine the agreement rate of IFA toxoplasmosis test among 4 laboratory centers.

**Materials and Methods:** The study is a multicenter evaluation. With the consideration of ethical values, serums were prepared from 100 subjects' who had reffered for pre-marriage examinations to Qazvin medical community center in the year 2006. Each serum divided to four parts and in each laboratory was examined for specific IgG anti-Toxoplasma antibodies with the IFA test. The tests in each center were performed according to common protocol of that center. The sera in all laboratories were examined at 1:20, 1:100, 1:200 and above. The titration ≥ 1:20 was considered as positive. The kappa coefficient between each 2 centers was calculated.

**Results:** The seropositivity rates of IgG-IFA Toxoplasma test in the 4 centers were 72%, 44%, 34% and 23%. The kappa coefficient in comparing with 2 centers, for upper limit was 0.36 and for the lower limit was 0.16.

**Conclusion:** In the present study, the agreement rates among the four centers were very lower than our expect. It seems that, performing this test in some of laboratories in country accompanied with some defects that should be corrected. Therefore, we recommend to survey separately.


**Key words**: Hematologic Tests/ Immuno Fluorescent Technique, Indirect/ Laboratory Techniques and Procedures Toxoplasmosis