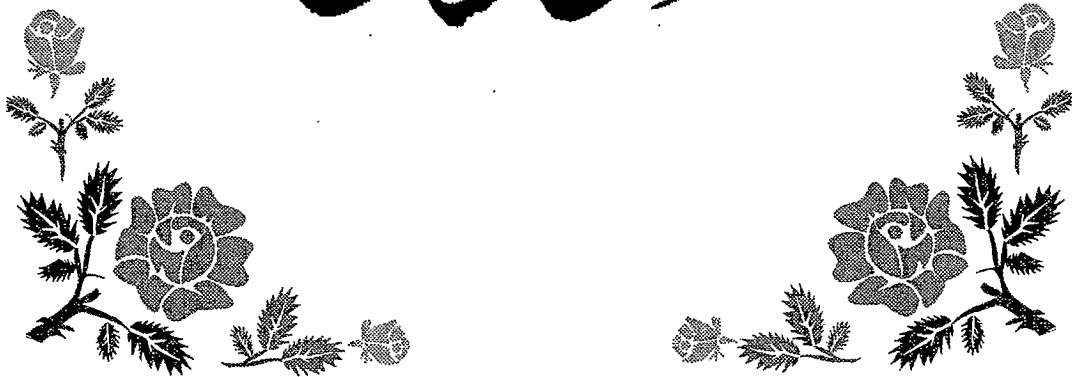




بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



۱۱۱۴۲



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین
دانشکده پزشکی شهید بابایی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای پزشکی عمومی

موضوع:

تعیین میزان توافق کاپا آزمون الایزا توکسوپلاسموز بین سه
آزمایشگاه مرکز توسعه تحقیقات علوم پایه، قدس و کوثر

۱۳۸۸ / ۱۲ / ۱۵

استاد راهنما:

استاد راهنما: دکتر مهرزاد سرایی
تیم مرکز

دکتر مهرزاد سرایی صحنه سرایی

استاد مشاور:

دکتر حسن جهانی هاشمی

نگارش:

سمیه محمدحسینی

سال تحصیلی: ۱۳۸۶-۸۷

شماره پایان نامه: ۷۰۷

۱۱۱۴۲۳

با تشکر از استاد ارجمند

جناب آقای دکتر مهرزاد سرایی صحنه سرایی

که با راهنمایی های ارزنده شان مرا در انجام این پژوهش یاری نمودند.

همچنین از جناب آقای فرهاد خباز و صفرعلی علیزاده

کارشناسان مرکز تحقیقات علوم پایه پزشکی تشکر می نمایم.

تقدیم به

مادرم

که مهر و محبت‌های عاشقانه او بزرگترین پشتوانه زندگیم می باشد،
باشد که گوشه ای از آنها را جبران کرده باشم.

و تقدیم به روح پاک پدرم

که هرچه دارم و هرچه هستم همه از اوست.

و با سپاس از خواهرم

سنگ صبور تنهایی هایم

فهرست مطالب

صفحه	موضوع
۱	چکیده
	فصل اول: مقدمه
۳	مقدمه
۲۶	اهداف و فرضیات
	فصل دوم: مروری بر متون
۲۷	مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه ارزیابی سرولوژی توکسوپلازما
۳۴	بیان مسئله و زمینه و ضرورت انجام مطالعه حاضر
	فصل سوم: مواد و روش کار
۳۶	نوع مطالعه
۳۸	مراحل انجام آزمون
۳۹	محاسبات و تفسیر
۴۰	گزارش نتایج
۴۰	آنالیز آماری
	فصل چهارم: نتایج
۴۱	نتایج
	فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری
۴۶	بحث و نتیجه گیری
۵۰	پیشنهادات
۵۱	منابع

فهرست جداول

صفحه

موضوع

- جدول ۱- مقایسه نتایج سرولوژی IgG-ELISA توکسوپلاسموز بین دو آزمایشگاه کوثر و مرکز توسعه تحقیقات علوم پایه ۱
- جدول ۲- مقایسه نتایج سرولوژی IgG-ELISA توکسوپلاسموز بین دو آزمایشگاه قدس و مرکز توسعه تحقیقات علوم پایه ۴۳
- جدول ۳- مقایسه نتایج سرولوژی IgG-ELISA توکسوپلاسموز بین دو آزمایشگاه کوثر و آزمایشگاه قدس ۴۴
- جدول ۴- مقایسه نتایج آزمون بین سه آزمایشگاه قدس، کوثر و مرکز توسعه تحقیقات علوم پایه ۴۵

چکیده

توکسوپلاسموز بیماری انگلی ناشی از توکسوپلازما گوندی ای است که در موارد مادرزادی و اختلال ایمنی عوارض شدیدی ایجاد می کند. روش رایج تشخیص آزمایشگاهی آن سرولوژی است و رایج ترین آزمون های سرولوژی ELISA (الایزا) و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFA) است. قرائت نتایج الایزا سنجش دانسیته نوری و آزمون IFA با قضاوت میکروسکوپی فلورسنت اطراف انگل انجام می شود. با توجه به این که در مطالعه قبلی توافق بسیار پایینی بین نتایج آزمون IFA توکسوپلاسموز در بین چهار مرکز آزمایشگاهی وجود داشت. این مطالعه به منظور تعیین میزان توافق نتایج آزمون الایزا بین سه مرکز آزمایشگاهی انجام شد. در مطالعه حاضر، ۸۱ سرم بیماران مشکوک به توکسوپلاسموز در آزمایشگاه های مرکز توسعه تحقیقات علوم پایه و مراکز آموزشی درمانی قدس و کوثر قزوین با استفاده از کیت های تجاری IgG ELISA (Trinity, Biotech, USA) و بکارگیری از دستگاه های مختلف میکروپلیت ریدر مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج به صورت کیفی گزارش شد و ضریب توافق کاپا تعیین گردید. در ۸۰ مورد نتایج کاملاً توافق است و تنها در یک مورد نتیجه آزمون متفاوت بود که این مورد توسط این سه مرکز به ترتیب مثبت، منفی و حد مرزی گزارش شد. ضریب توافق کاپا در تمام موارد مقایسه ۰/۹۷۴ بود و میزان مثبت سرولوژیک به ترتیب ۰/۴۰/۷، ۰/۳۹/۵ و ۰/۴۰٪ بود. از

تعیین میزان توافق کاپا آزمون الیزا توکسوپلاسموز بین سه آزمایشگاه

مطالعه حاضر نتیجه گیری می شود، گرچه آزمون الیزا از استانداردسازی واحدی برخوردار نیست ولی به خوبی کنترل کیفی شده و توافق بسیار بالایی بین نتایج آنها در مراکز مختلف وجود دارد.

فصل اول

مقدمه و بیان مسأله

مقدمه

بیماری های انگلی از مشکلات مهم بهداشتی کشورهای عقب مانده و در حال توسعه محسوب شده و اغلب این کشورها در مناطقی از کره زمین قرار دارند که به جهت اقلیمی مستعد انتشار عفونت های انگلی هستند. با اقداماتی که در جهت کنترل و پیشگیری این عفونت ها انجام شده، میزان شیوع و شدت برخی از آنها در نقاطی از کره زمین به حد قابل توجهی کاسته شده، آنچنان که دیگر به عنوان یک مشکل مهم بهداشتی تلقی نمی شوند. در عوض دنیا در دو سه دهه اخیر با پدیده بیماری های انگلی بازپدید و نوپدید مواجه شده است. مالاریا که امید به ریشه کنی آن وجود داشت، امروزه به واسطه مقاومت انگل به دارو و مقاومت پشه ها به حشره کش ها به عنوان مهمترین بیماری بازپدید خودنمایی می کند. برخی از بیماری های انگلی که قبلاً در انسان گزارش نشده بود و یا آنکه بیماریزایی قابل توجهی نداشتند، با گسترش ایدز و کاربرد گسترده داروهای تضعیف کننده ایمنی به عنوان بیماری های انگلی نوپدید اهمیت روزافزون یافتند. در بین انواع انگل های بیماریزای انسان توکسوپلازما گوندی ای اهمیت خاص خود را دارد و به مرور زمان بر اهمیت آن افزوده شده است. نه به جهت آنکه انگلی بازپدید یا نوپدید محسوب می شود، بلکه به این دلیل که انگل پیچیده ای است و هنوز جنبه های مختلف بیولوژی، بیماریزایی، تشخیص و درمان آن ناشناخته ها و ابهاماتی دارد که جای تحقیق و بررسی دارد.

توکسوپلاسموز بیماری انگلی ناشی از توکسوپلازما گوندی ای (*Toxoplasma gondii*) است که تک یاخته داخل سلولی اجباری مهره‌داران خونگرم بوده و گربه و گربه‌سانان میزبان نهایی و پرندگان و پستانداران میزبان واسط آن هستند. توکسوپلازما دارای سه شکل عفونی زاست، شامل؛ اووسیست، کیست بافتی و تاکی‌زوئیت. اووسیست‌ها با مدفوع گربه و گربه‌سانان دفع شده و در محیط مساعد (از نظر حرارت و رطوبت) پس از انجام اسپورولاسیون به فرم عفونی‌زا تبدیل شده و انسان با خوردن آب، غذا و سبزیجات خام آلوده می‌شود. کیست‌های بافتی در بافت‌های مختلف به ویژه مغز، قلب و عضلات تشکیل شده و انسان با خوردن گوشت خام یا نیم‌پز آلوده می‌شود. تاکی‌زوئیت‌ها عمدتاً به طریق مادرزادی و از جفت (Transplacental) منتقل می‌شوند.

چرخه زندگی توکسوپلازما شامل مراحل تکامل روده‌ای، خارج روده‌ای و محیطی است. تکامل روده‌ای انگل فقط در روده میزبان‌های نهایی (گربه، گربه‌سانان) انجام می‌شود. گربه‌ها بطور معمول با خوردن گوشت حاوی کیست‌های نسجی آلوده می‌شوند. گرچه اووسیست‌ها و تاکی‌زوئیت‌ها نیز برای گربه‌ها آلوده‌کننده هستند. با خورده شدن کیست‌ها، انگل‌های داخل آنها در دستگاه گوارش آزاد شده و وارد سلولهای دیواره روده

کوچک می شوند و پس از طی تکامل شیزوگونی و گامتوگونی، اووسیست ها تشکیل می-
شوند.

با پاره شدن سلول آلوده، اووسیست ها به داخل حفره روده گربه ریخته و با مدفوع گربه
دفع می شوند. اووسیست ها زمان دفع غیر هاگدار بوده و پس از قرار گرفتن در شرایط
مساعده محیطی طی ۵-۱ روز به اووسیست هاگدار (بالغ) تبدیل می شوند. تکامل خارج
روده ای توکسوپلازما هم در میزبانهای نهایی و هم در میزبانهای واسط انجام می شود. در
تکامل خارج روده ای پس از خورده شدن کیست های نسجی و یا اووسیست های بالغ،
انگل ها داخل دستگاه گوارش میزبان آزاد شده و به دیواره روده نفوذ کرده و به فرم تاکی-
زوئیت تبدیل می شوند. تاکی زوئیت ها از طریق گردش خون در بافتهای مختلف پراکنده
شده داخل آنها تکثیر یافته و سبب پارگی سلولها می شوند و انگلهای آزاد شده به سلولهای
دیگری تهاجم می برند. حدود یک هفته از شروع عفونت تعدادی از تاکی زوئیت ها پس از
ورود به سلول، کیست نسجی تشکیل می دهند. در میزبان های مقاوم به توکسوپلازما حدود
دو تا سه هفته از شروع عفونت تهاجم تاکی زوئیت ها به سلولها مهار شده و انگل ها با
تشکیل کیست های نسجی به صورت عفونت مزمن (نهفته) باقی می مانند. این کیست ها
دوام طولانی داشته و حتی می توانند مادام العمر باقی بمانند.

راههای اصلی انتقال توکسوپلازما عبارتند از:

۱. Oral - Fecal (مدفوعی - دهانی): در این طریق اووسیست های دفع شده با

مدفوع گربه به همراه خوردن آب، غذا و سبزیجات باعث آلودگی می شوند.

۲. گوشت خواری (Carnivorism): با خوردن گوشت خام یا نیم پز حاوی

کیست های نسجی اتفاق می افتد.

۳. انتقال مادرزادی (Congenital): تاکی زوئیت ها از طریق جفت

(Transplental) از مادر به جنین منتقل می شوند.

راههای نادر انتقال: توکسوپلازما قادر است از طریق پیوند عضو، انتقال خون.

شیر نجوشیده، تخم مرغ خام، حوادث آزمایشگاهی به هنگام کار با انگل زنده منتقل

شود.

انتشار جغرافیایی و میزان شیوع توکسوپلازما:

توکسوپلازما انتشار جهانی داشته و در مناطق گرم و مرطوب بویژه در مناطقی که وفور

گربه وجود دارد، شایع تر است. میزان شیوع توکسوپلازما با توجه به سن، وضعیت

اقتصادی، اجتماعی و جغرافیایی و عادات غذایی افراد متفاوت است. با افزایش سن، شیوع

توکسوپلازما افزایش می یابد. این تک یاخته نه تنها در کشورهای در حال توسعه انگل

شایعی است بلکه در برخی کشورهای توسعه یافته نیز بطور قابل توجهی شایع است. براساس مطالعات سرواپیدمیولوژیک ۴۰/۵٪ از ۷۵۲۱ جمعیت تحت مطالعه در هلند (Kortbeek et al, 2004) (۱۳)، ۲۰/۲۵٪ از ۳۸۵ دهنده خون در ترکیه (Yazar et al, 2006) (۲۶)، ۷۴٪ از ۲۱۲۶ زن حامله در برزیل (Spalding et al, 2005) (۲۰)، ۱۴ و ۲۵/۷٪ از زنان حامله در دو ناحیه مختلف سوئد (Birgisdóttir et al, 2006) (۳)، ۷۰٪ از ساکنین ۲۰ تا ۸۵ ساله جاکارتای اندونزی (Terazawa et al, 2003) (۲۴)، ۷/۴٪ از ۴۳۲ جمعیت عادی دهنده خون در مکزیک (Alvarado- Esquivel et al, 2007) (۲)، ۴۵/۸٪ از ۹۵۵ زن حامله در Cali کلمبیا (Rosso et al, 2008) (۱۸) و ۱۰/۸٪ از ۱۵۹۶۰ نفر جمعیت ۶ تا ۴۹ سال در ایالات متحده (Jones et al, 2007) (۹) از نظر سرولوژی توکسوپلاسم مثبت بودند.

براساس مطالعات انجام شده در نقاط مختلف کشور حداقل ۳۰٪ افراد در اکثر مناطق ایران از نظر سرولوژی توکسوپلاسم مثبت هستند. بر اساس گزارشات منتشره، ۳۴٪ از دختران در آستانه ازدواج استان قزوین (سرائی صحنه سرائی و جهانی هاشمی، ۱۳۸۶) (۳۲)، ۶۸٪ از زنان حامله در تهران (غروی، ۱۳۸۱) (۳۳)، ۳۴/۷٪ از دختران در آستانه ازدواج اردبیل (دریانی و سقا، ۱۳۸۱) (۳۰)، ۳۹٪ از مراجعه کنندگان به درمانگاه اسلام شهر تهران (کشاورز و همکاران، ۱۳۸۲) (۳۵)، ۵۱/۱٪ از معلولین ذهنی بهزیستی استان گیلان (حبیبی و

همکاران، ۱۳۸۲) (۲۹) و ۲۷/۶٪ از ۳۸۴ خانم باردار استان چهارمحال و بختیاری (محمودی و همکاران، ۱۳۸۳) (۳۶) از نظر توکسوپلاسمای مثبت بودند.

بیماری‌زایی و علائم بالینی توکسوپلاسموز:

بیماری‌زایی توکسوپلاسموز به مرحله حاد عفونت مربوط می‌شود، یعنی مرحله ای که انگل به فرم تاکی زوئیت به سلولها تهاجم می‌برد و باعث تخریب آنها می‌شود. بسته به عضو درگیر، شدت تهاجم و وضعیت ایمنی بیمار عوارض و علائم ناشی از توکسوپلاسموز متفاوت است. در مرحله مزمن که انگل به فرم کیست نسجی می‌باشد، هیچ نشانه پاتولوژیک در اطراف کیست مشاهده نمی‌شود و علائمی نیز به این مرحله نسبت داده نشده است. توکسوپلاسموز از نظر منشأ عفونت به دو دسته اکتسابی و مادرزادی تقسیم می‌شود

توکسوپلاسموز اکتسابی:

متعاقب آلودگی فرد با خوردن کیست های نسجی یا اووسیست های انگل بوجود می‌آید و تظاهرات بالینی آن با توجه به وضعیت ایمنی بیمار متفاوت می‌باشد. در افراد با کفایت عملکرد ایمنی (Immunocompetent) ۸۰ - ۹۰٪ موارد آلودگی ها بدون تظاهراتی از بیماری است. شایعترین تظاهر بیماری در این گروه لنفادنوپاتی است و عمدتاً به صورت Asymptomatic Cervical Lymphadenopathy تظاهر می‌کند که عارضه ای

خودمحدود شونده است. غده لنفاوی متورم، غیر چرکی و معمولا بدون درد بوده و ندرتا از ۳ سانتی متر تجاوز می کند. برآورده شده که عامل حدود ۳ تا ۷٪ موارد مهم بالینی لنفادنوپاتی ها توکسوپلاسماست. ندرتا در این گروه افراد تظاهرات بالینی به صورت میو کاردیت، پنومونی، هپاتیت و یا انسفالیت تظاهر پیدا می کند (Montoya et al, 2005)(۱۵).

توکسوپلاسم در بیماران اختلال ایمنی یک بیماری شدید و تهدید کننده حیات است گروههای در معرض خطر عمدتا بیماران مبتلا به نقض ایمنی اکتسابی (ایدز)، گیرندگان پیوند عضو و مبتلایان به بدخیمی های خونی می باشند. توکسوپلاسم در عفونت های اولیه و یا عفونت نهفته فعال شده، بطور پیشرونده و به فرم تاکی زوئیت به سلولها تهاجم می برد و باعث تخریب آنها می شود. در بیماران مبتلا به ایدز تظاهرات بالینی توکسوپلاسموز عمدتا مغزی است و شایع ترین تظاهر آن در این بیماران آنسفالیت توکسوپلاسمایی (TE) است. توکسوپلاسم یک علت شایع ضایعات کانون سیستم عصبی مرکزی در بیماران ایدزی است. طیف وسیعی از علائم بالینی توکسوپلاسموز ممکن است در مبتلایان به ایدز بروز کند. شامل: اختلالات نورولوژیک، مننژیت، تغییر وضعیت ذهنی، تظاهرات عصبی - روانی. اختلالات حرکتی و حسی. گاهی اوقات بیماری به صورت منتشره با درگیری ارگانهای حیاتی مختلف تظاهر پیدا می شود که در این صورت می تواند سریعاً کشنده باشد.

بیماریهای ریوی - قلبی و چشمی نیز در مبتلایان به ایدز گزارش شده است. کوریوتینیت

توکسوپلاسمایی در بیماران مبتلا به ایدز نسبتاً غیر شایع است (۱۵).

گزارشات متعددی از توکسوپلاسموز متعاقب پیوند قلب، کلیه، کبد، مغز استخوان

صورت گرفته است. بروز توکسوپلاسموز در بیماران پیوند مغز استخوان ۰/۳ تا ۰/۵ درصد

برآورد شده است که غالباً به صورت درگیریهای ریوی تظاهر می کند و مرگ و میر بالایی

دارد (۱۵).

توکسوپلاسموز مادرزادی:

زمانی اتفاق می افتد که مادر نخستین بار در زمان بارداری به توکسوپلاسموز آلوده شده

باشد. با توجه به دوره بارداری احتمال انتقال مادرزادی و شدت بیماری متفاوت است. در

یک سوم مادران با عفونت اولیه دوران بارداری، آلودگی جنینی اتفاق می افتد. در اوایل

بارداری امکان انتقال مادرزادی به جنین کمتر و توکسوپلاسموز مادرزادی شدیدتر است و

در اواخر بارداری بالعکس. در فرم شدید ممکن است باعث سقط، مرده زایی، عقب ماندگی

جسمی و ذهنی شود. در فرم خفیف، بسیاری از نوزادان با توکسوپلاسموز مادرزادی در

زمان تولد هیچ تظاهر آشکاری از بیماری نشان نمی دهند و برخی از آنها در اوایل تولد

ممکن است علائمی از قبیل هپاتواسپلنومگالی، لنفادنیت و راش تظاهر پیدا کنند. در تعداد

قابل توجهی از نوزادانی که در زمان تولد علائمی از توکسوپلاسموز مادرزادی نشان نمی-

دهند، در سالهای بعد تظاهرات چشمی توکسوپلاسموز بروز می کند. اکثرا علائم و نشانه-
های بالینی توکسوپلاسموز مادرزادی غیر اختصاصی و مشابه سایر ارگانیزم ها شامل هرپس
سیمپلکس، سایتومگالو ویروس و روبلا است. علائم توکسوپلاسموز مادرزادی شامل:
کورئورینیت، لوچی، کوری، عقب ماندگی ذهنی، کم خونی، اپی لپسی، راش، پتشی به
علت ترومبوسیتوپنی، آنسفالیت، پنومونی، میکروسفالی، کلسیفکاسیون داخل مغز و
هیدروسفالی است (۱۵).

مروری بر تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز:

توکسوپلاسموز دارای اشکال مختلف بالینی است که تظاهرات غیراختصاصی دارد. بنابراین باید به دقت از سایر بیماریها تشخیص افتراقی داده شود. تشخیص افتراقی لنفادنیت توکسوپلاسمایی شامل لنفوما، منونوکلئوز عفونی، منونوکلئوز CMV (سایتومگالوویروس) بیماری Cat scarath، سارکوئیدوز، توبرکولوز، تولارمی و کارسینوما می باشد. اشتباه مهم تشخیصی لنفادنوپاتی توکسوپلاسمبا با هوچکین و لنفوما اتفاق می افتد.

تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز شامل روشهای متفاوتی است که با توجه به مورد بالینی آن (شامل اختلال ایمنی، چشمی، حاملگی و مادرزادی) باید روش مناسب اتخاذ شود. انواع روشهای تشخیص توکسوپلاسموز عبارتند از:

۱. جداسازی توکسوپلاسموز

۲. تشخیص هیستولوژیک

۳. Polymerase Chain Reaction

۴. آزمونهای سرولوژی

جداسازی توکسوپلاسم:

روش رایجی برای تشخیص توکسوپلاسموز نیست و ممکن است در موارد خاص انجام شود. جداسازی ممکن است از بافت یا مایعات بدن صورت گیرد. بدین ترتیب که نمونه

بافتی یا مایعات بدن به موشهای سفید آزمایشگاهی (سوری) تلقیح شده و بعد از مدتی انگل در بدن موش جستجو می شود. با جداسازی انگل از مایعات بدن مثل مایع مغزی نخاعی (CSF)، عفونت حاد محرز می شود ولی جداسازی انگل از بافتهای بدن در تمام موارد نشان دهنده عفونت حاد نیست. جداسازی از بافتهای جنین، جفت و نوزاد اهمیت تشخیصی دارد ولی جداسازی انگل از بافتهای بیچه های بزرگتر و بالغین متمایز کننده عفونت حاد از مزمن نیست.

تشخیص هیستولوژیک:

براساس مشاهده تاکی زوئیت ها در مقاطع یا گسترش های مایعات بدن (مایع مغزی- نخاعی، مایع آمنیون) است و با تشخیص آن عفونت حاد محرز شود. اثبات تاکی زوئیت ها در بافتها مشکل است. همچنین، مشاهده تعداد زیادی کیست نسجی در مجاورت لیزیون نکروتیک التهابی احتمالا اثبات کننده بیماری است. از تکنیک رنگ آمیز ایمونوپراکسیداز برای رنگ آمیزی بافت استفاده می شود که این روش حساس و اختصاصی است و برای نشان دادن ارگانیزم در سیستم عصبی مرکزی (CNS) بیماران مبتلا به آنسفالیت توکسوپلاسمایی (TE) مفید می باشد (۱۵).

PCR: روش بسیار ارزشمندی است و برای موارد خاص و حیاتی تشخیص

توکسوپلاسموز استفاده می شود. از این روش بطور موفقیت آمیز برای تشخیص DNA