

Interlaboratory and interkit evaluation of ELISA test for detection of specific IgG antibodies of Toxoplasma gondii

Mehrzaad Saraei¹, Mojtaba Shanazi¹, Hasan Jahanihashemi², Farhad Khabbaz¹,
Safar Ali Alizadeh¹, Somayeh Mohammad-Hosseine³

¹ Cellular & Molecular Research Institute, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

² Department of Biostatistics, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

³ Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

(Received 18 January, 2010; Accepted 19 April, 2010)

Abstract

Background and purpose: Toxoplasmosis is a parasitic protozoan disease producing severe complications in congenital and immunocompromised cases. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most common laboratory method for serodiagnosis of toxoplasmosis. Commercial kits have no unique procedure for standardization and this may influence the consistency of the results. The present study was designed to determine the reproducibility of results obtained by ELISA in different laboratories using similar commercial kits. Also, the results obtained from different commercial kits were compared.

Materials and methods: Three *Toxoplasma gondii* IgG-ELISA kits from different commercial companies were used and the results reported by three different university laboratories evaluated. Eighty one serum samples from patients referred to a private laboratory for serologic determination of toxoplasmosis were examined. The results of the tests were reported as qualitative values (positive, negative, borderline), and the agreement rates determined using the Kappa coefficient.

Results: Comparing three different kits, the results of 76 serum samples were similar and the Kappa coefficients calculated at 0.85, 0.90, and 0.97. When comparing different laboratories, the results of 80 serum samples among three laboratories were similar and the Kappa coefficients calculated at 0.97-1.

Conclusion: Based on the results of the present study, it could be concluded that the ELISA test for detection of antibodies to *T. gondii* has the potential to produce consistent results in different laboratories while using different kits.

Key words: *Toxoplasma gondii*, ELISA, immunoglobulin G, evaluation

ارزیابی بین آزمایشگاهی و بین کیتی آزمون الیزا برای تشخیص آنتی بادی های IgG اختصاصی علیه توکسوپلازما گوندی ای

مهرزاد سرائی صحنه سرائی^۱ مجتبی شهنازی^۱ حسن جهانی هاشمی^۲ فرهاد خباز^۳
صفرعلی علیزاده^۴ سمیه محمد حسینی^۵

چکیده

سابقه و هدف: توکسوپلاسموز بیماری انگلی است که در موارد مادرزادی و اختلال ایمنی عوارض شدیدی ایجاد می کند. رایج ترین روش تشخیص سرولوژیک آن الیزا است. کیت های الیزا توکسوپلاسموز از استانداردسازی واحدی برخوردار نیستند، لذا این ویژگی ممکن است بر نتایج آزمون ها تاثیر گذار باشد. برای ارزیابی این ویژگی در مطالعه حاضر توافق بین آزمایشگاهی و بین کیتی آزمون الیزا در مورد تشخیص توکسوپلاسموز تعیین گردید.

مواد و روش ها: سه کیت IgG-ELISA توکسوپلازما از شرکت های تجاری مختلف و سه آزمایشگاه دانشگاهی برای تشخیص آنتی بادی های IgG علیه توکسوپلازما به روش الیزا ارزیابی شدند. سرم های ۸۱ بیمار ارجاع شده به آزمایشگاه برای سرولوژی توکسوپلاسموز مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج آزمون ها به صورت کیفی (مثبت، منفی و حد مرزی) گزارش شد. میزان توافق نتایج آزمون ها با استفاده از ضریب کاپا تعیین گردید.

یافته ها: در مقایسه بین کیت ها، نتایج آزمایشات ۷۶ نمونه سرم بین سه کیت تجاری یکسان بود و ضریب کاپا ۰/۸۵، ۰/۹۰ و ۰/۹۷ تعیین گردید. در مقایسه بین آزمایشگاه ها، نتایج آزمایشات ۸۰ نمونه سرم بین سه آزمایشگاه یکسان بود و ضریب کاپا ۰/۹۷ تا ۱ بود.

استنتاج: از مطالعه حاضر نتیجه گیری می شود که آزمون الیزا توکسوپلاسموز از توافق بین آزمایشگاهی و بین کیتی بالایی برخوردار است.

واژه های کلیدی: توکسوپلازما گوندی ای، الیزا، ایمونو گلوبولین G، ارزیابی

مقدمه

توکسوپلازما گوندی ای (*Toxoplasma gondii*) افراد در اکثر مناطق ایران از نظر سرولوژی توکسوپلازما مثبت می باشند (۴-۱) و بالاترین آلودگی از استان های شمالی کشور گزارش شده است (۵، ۶). در کشورهای

توکسوپلازما گوندی ای (*Toxoplasma gondii*) تک یاخته ای با انتشار جهانی بوده که طیف وسیعی از مهره داران خونگرم را آلوده می کند. حداقل ۳۰ درصد

E-mail: msaraei@qums.ac.ir

مؤلف مسئول: مهرزاد سرائی صحنه سرائی - قزوین: بلوار شهید باهنر، دانشکده پزشکی شهید باایی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

۱. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

۲. گروه آمار حیاتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

۳. کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

۴. گروه میکروپ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

۵. دکتری حرفه ای پزشکی

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۸/۱۲/۱۹ تاریخ تصویب: ۸۹/۱/۳۰

توسعه یافته نیز حداقل ۱۰ درصد افراد به این انگل آلوده می‌باشند و بالاترین آلودگی از فرانسه گزارش شده است (۷). انسان به طور معمول با خوردن آب، غذا و سبزیجات حاوی اوسیست‌های دفع شده با مدفوع گربه و یا خوردن گوشت خام و نیم پز حاوی کیست‌های نسجی آلوده می‌شود. عفونت در افراد با کفایت عملکرد ایمنی (immunocompetent) اغلب بدون تظاهرات بالینی است و شایع‌ترین تظاهر توکسوپلاسموز در این افراد لنفادنوپاتی گردنی است که سیر خوش خیم و خود محدود شونده دارد. توکسوپلازما در افراد با اختلال ایمنی (immunocompromised) خصوصاً در مبتلایان به نقص ایمنی اکتسابی (ایدز)، فرصت طلب بوده و بیماری و خیمی ایجاد می‌کند که عمدتاً مغزی بوده و تهدیدکننده حیات است. بیماری مادرزادی آن تظاهرات خفیف تا شدید دارد که در فرم شدید سبب هیدروسفالی یا میکروسفالی، کلسیفیکاسیون مغزی و کوریورتنیت می‌شود (۸).

روش رایج تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز سرولوژی است که با آزمون‌های مختلف انجام می‌شود و رایج‌ترین آن Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) است. این آزمون معمولاً با استفاده از کیت‌های تجاری انجام می‌شود و نتایج آن به کمک دستگاه قرائت‌کننده میکروپلیت قرائت می‌گردد. الایزا آزمون حساسی است ولی از استانداردسازی واحدی برخوردار نیست. انواع کیت‌های آن ممکن است از نظر اجزای آنتی‌ژنی و منشاء آنتی‌ژن-آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با آنزیم (کوئزوگه) با همدیگر متفاوت باشند. این تفاوت‌ها ممکن است بر حساسیت و ویژگی آزمون الایزای توکسوپلاسموز تاثیرگذار باشد. مطالعات متعددی که در زمینه ارزیابی حساسیت و ویژگی انواع کیت‌های تجاری الایزا (۹، ۱۰) و مقایسه آن با سایر آزمون‌های سرولوژی توکسوپلاسموز (۱۳-۱۱) انجام شده است، دلالت بر آن دارد که به طور کلی کیت‌ها و یا آزمون‌هایی که از حساسیت بالاتری برخوردار بوده از

ویژگی پایین تری برخوردار هستند و برعکس. فقدان استانداردسازی واحد آزمون‌های سرولوژی توکسوپلاسموز ایجاب می‌کند تا به منظور تضمین کیفیت تشخیص سرولوژیک توکسوپلاسموز ارزیابی چند مرکزی در هر کشوری انجام شود. در مطالعه قبلی آزمون Indirect Fluorescent Antibody Assay (IFA) توکسوپلاسموز بین چهار مرکز مورد ارزیابی قرار گرفت که میزان توافق نتایج بدست آمده بین آنها به طور معنی‌دار پایین بود (۱۴). با توجه به اینکه امروزه در کشور ما الایزا رایج‌ترین آزمون سرولوژی توکسوپلاسموز است و تاکنون مطالعه‌ای در زمینه ارزیابی بین آزمایشگاهی و بین کیتی این آزمون در ایران انجام نشده است، مطالعه حاضر طراحی شد که هدف اصلی آن تعیین میزان توافق بین کیتی و بین آزمایشگاهی آزمون الایزا توکسوپلاسموز است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر مشاهده‌ای، از نوع ارزیابی (evaluation study) بود. نمونه سرم‌ها از سرم ۸۱ بیمار تهیه شد. بیماران افرادی بودند که برای انجام آزمون سرولوژی توکسوپلاسموز به آزمایشگاه خصوصی رازی قزوین مراجعه نموده بودند. در این آزمایشگاه آزمون روتین توکسوپلاسموز برای بیماران انجام شد و از باقی مانده سرم‌های آنها برای انجام مطالعه حاضر استفاده شد. سرم‌ها تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. این مطالعه در دو مرحله جداگانه انجام شد و در هر دو مرحله از سرم‌های واحدی استفاده شد. در مرحله اول میزان توافق نتایج سه کیت تجاری سنجش آنتی‌بادی‌های IgG توکسوپلازما از تولیدات سه شرکت تجاری مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. کیت‌ها شامل (۱) Captia™ Toxoplasma gondii IgG ELISA (Trinity Biotech, USA)، (۲) ELAgen Toxoplasma IgG kit (Adaltis, Italy) و

و مقادیر بین این دو حد مرزی در نظر گرفته شد. طبق دستورالعمل کیت ELAgen Toxoplasma IgG kit (Adaltis, Italy)، مقادیر IgG کمتر از ۱۰ IU/ml منفی و بیشتر مساوی ۱۰ IU/ml مثبت لحاظ شد و مطابق دستورالعمل کیت Toxoplasma IgG ELISA Kit (Genesis, UK) مقادیر IgG کمتر از ۱۵ IU/ml منفی و بیشتر یا مساوی ۱۵ IU/ml، مثبت در نظر گرفته شد.

از ضریب کاپا برای محاسبه میزان توافق نتایج آزمون‌ها بین هر دو کیت و یا هر دو آزمایشگاه استفاده شد. نتایج حد مرزی در آنالیز داده‌ها لحاظ نشد.

یافته‌ها

به طور کلی، نتایج ۷۶ نمونه (۹۳/۸ درصد) از ۸۱ سرم مورد آزمایش بین ۳ کیت تجاری Trinity، Genesis و Adaltis کاملاً توافق داشت و در ۵ مورد باقیمانده متفاوت بود. بیشترین میزان توافق بین نتایج حاصل از کیت‌های Trinity و Adaltis وجود داشت. به طوری که نتایج آزمون ۸۰ نمونه سرم یکسان بود و تنها در یک مورد اختلاف وجود داشت. این یک نمونه با کیت Adaltis مثبت و با کیت Trinity منفی بود. میزان توافق کاپا بین این دو کیت ۰/۹۷ تعیین شد. کمترین میزان توافق بین کیت‌های Adaltis و Genesis وجود داشت. نتایج ۵ نمونه بین این دو کیت متفاوت بود، به طوری که نتایج ۳ نمونه با کیت Genesis، مثبت و با کیت Adaltis، منفی و نتایج دو نمونه دیگر برعکس بود. میزان توافق کاپا بین این دو کیت ۰/۸۵ محاسبه شد. مقایسه نتایج آزمون‌ها بین کیت‌های Trinity و Genesis در ۴ مورد اختلاف نشان داد که در ۳ مورد نتایج با کیت Genesis، مثبت ولی با کیت Trinity، منفی بود. در یک مورد باقیمانده نتیجه برعکس بود. میزان توافق کاپا بین این دو کیت ۰/۹ محاسبه شد. مقایسه نتایج آزمون بین سه کیت تجاری در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

میزان آلودگی به توکسوپلازما در ۸۱ بیمار ارجاع

Toxoplasma IgG ELISA Kit (Genesis, UK) (۳) بود. آزمون‌ها مطابق با دستورالعمل هر کیت به انجام رسید و نتایج آنها با استفاده از دستگاه (Anthos 2020, Anthos Labtec Instruments, Austria) میکروپلیت قرائت گردید. آزمایشات این مرحله تماماً در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد.

در مرحله دوم میزان توافق نتایج آزمون IgG-ELISA توکسوپلازما بین سه آزمایشگاه مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های کوثر و قدس قزوین و آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین در این مطالعه مشارکت داشتند. در هر سه آزمایشگاه از کیت تجاری Captia™ Toxoplasma gondii IgG ELISA (Trinity Biotech, USA) استفاده شد. دستگاه قرائت کننده نتایج آزمون‌ها در سه مرکز متفاوت بود، به طوری که در مرکز آموزشی درمانی کوثر از دستگاه مدل Sunrise™ ساخت کمپانی Tecan group Ltd (Switzerland)، در مرکز آموزشی درمانی قدس از دستگاه مدل Stat Fax® 3200 ساخت کمپانی Awareness Technology Inc (USA) و در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی از دستگاه مدل Anthos 2020 ساخت کمپانی Anthos Labtec Instruments (Austria) استفاده شد.

نتایج آزمون‌ها در هر دو مرحله با استفاده از دستگاه‌های قرائت کننده (میکروپلیت) قرائت شد. دانسیته نوری (optical density) آنها تعیین و طبق دستورالعمل هر کیت به واحد بین المللی در میلی‌لیتر (IU/ml) تبدیل گردید. مقایسه بین کیتی و بین آزمایشگاهی آزمون‌ها با استفاده از نتایج کیفی آنها (مثبت، منفی و حد مرزی) انجام شد. براساس دستورالعمل کیت Captia™ Toxoplasma gondii IgG ELISA (Trinity Biotech, USA)، مقادیر IgG کمتر یا مساوی ۱۷/۴ IU/ml منفی، بیشتر یا مساوی ۲۱/۹ IU/ml مثبت

بحث

در مطالعه حاضر توافق بسیار بالایی در نتایج آزمون IgG-ELISA توکسوپلاسموز بین سه کیت تجاری وجود داشت که موافق مطالعات قبلی است (۱۰، ۹). با این تفاوت که در مطالعه حاضر آنتی‌بادی‌های IgG و در مطالعات دیگران آنتی‌بادی‌های IgM علیه توکسوپلازما مورد سنجش قرار گرفت. آنتی‌بادی IgM شاخص عفونت حاد توکسوپلاسموز در نظر گرفته می‌شود و برای تمایز عفونت‌های فعلی از قبلی مفید است (۱۵). آنتی‌بادی IgG شاخص خوبی برای اثبات آلودگی به این تک باخته است که در آلودگی‌های فعلی و قبلی قابل شناسایی بوده و مناسب مطالعات سرواپیدمیولوژی توکسوپلازماست. از آنجایی که در مطالعه حاضر کاربرد سرواپیدمیولوژی آزمون الایزا مورد نظر بود، آنتی‌بادی‌های IgG علیه توکسوپلازما مورد سنجش قرار گرفت. همچنین، در مطالعه دیگران از آزمون رفرانس استفاده شد ولی در این مطالعه چنین نبود. اصولاً در مطالعات ارزیابی به این جهت از آزمون رفرانس استفاده می‌شود تا حساسیت و ویژگی آزمون‌ها تعیین شده و برتری یک آزمون بر آزمون یا آزمون‌های دیگر و یا برتری یک کیت بر کیت یا کیت‌های دیگر مشخص شود که در مطالعه حاضر چنین هدفی مورد نظر نبود.

در مطالعه حاضر توافق بالایی در نتایج آزمون الایزا توکسوپلازما بین سه آزمایشگاه مختلف وجود داشت که موافق با نتایج مطالعه‌ای است که در آن توافق بین آزمایشگاهی انواع آزمون‌های الایزا و ایمونوبات ارزیابی شد (۱۳). ولی برخلاف نتایجی است که از ارزیابی بین آزمایشگاهی آزمون IFA توکسوپلازما بدست آمد (۱۴). به نظر می‌رسد علت اصلی این تفاوت‌ها به نحوه قرائت نتایج آزمون‌های الایزا و IFA مربوط می‌شود. به طوری که نتایج آزمون الایزا با استفاده از دستگاه قرائت کننده میکروپلیت قرائت می‌شود ولی در آزمون IFA از میکروسکوپ ایمونوفلورسانس استفاده می‌شود که با استفاده از آن فلورسنت سطح

شده به آزمایشگاه برای سرولوژی توکسوپلاسموز با استفاده از کیت‌های Trinity، Adaltis و Genesis به ترتیب ۴۰/۷ درصد (۳۳ مورد)، ۴۲ درصد (۳۴ مورد) و ۴۳/۲ درصد (۳۵ مورد) تعیین شد.

در مورد میزان توافق نتایج بین آزمایشگاه‌ها، نتایج ۸۰ نمونه (۹۸/۷ درصد) از ۸۱ نمونه سرم مورد آزمایش بین سه آزمایشگاه بیمارستان‌های کوثر، قدس و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی کاملاً توافق داشت و تنها در یک مورد نتایج بین آنها متفاوت بود که این یک نمونه سرم توسط این آزمایشگاه‌ها به ترتیب حد مرزی، منفی و مثبت گزارش شد. ضریب کاپا در تمام موارد مقایسه بین ۱-۰/۹۷ بود. میزان توافق نتایج آزمون‌ها بین این مراکز در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

میزان آلودگی به توکسوپلازما در ۸۱ بیمار فوق در آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های قدس و کوثر و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه پزشکی قزوین به ترتیب ۳۹/۵ درصد (۳۲ مورد)، ۴۰ درصد (۳۲ مورد) و ۴۰/۷ درصد (۳۳ مورد) تعیین شد.

جدول شماره ۱: مقایسه نتایج سرولوژی IgG-ELISA توکسوپلاسموز بین ۳ کیت تجاری Genesis، Adaltis و Trinity

جمع	A-	A+		
۳۲	۰	۳۲	G+	T+
۱	۰	۱	G-	
۳	۳	۰	G+	T-
۴۵	۴۴	۱	G-	
۸۱	۴۷	۳۴		جمع

T: کیت Trinity، G: کیت Genesis و A: کیت Adaltis

جدول شماره ۲: مقایسه نتایج سرولوژی IgG-ELISA توکسوپلاسموز بین آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های قدس و کوثر و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

جمع	K-	K+		
۳۲	۰	۳۲	C+	Q+
۰	۰	۰	C-	
۱	۰	۱	C+	Q-
۴۸	۴۸	۰	C-	
۸۱	۴۸	۳۳		جمع

K: بیمارستان کوثر، Q: بیمارستان قدس و C: مرکز تحقیقات
 * سرم یک بیمار در آزمایشگاه بیمارستان قدس منفی، در مرکز تحقیقات مثبت و در آزمایشگاه بیمارستان کوثر حد مرزی گزارش شد. این سرم در آنالیز آماری لحاظ نشد

انجام شده است (۵-۱). با توجه به نتیجه‌ای که از ارزیابی بین آزمایشگاهی آزمون IFA توکسوپلاسم بدست آمد (۱۴)، به نظر می‌رسد که شایسته است سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسم در ایران مورد بازنگری قرار گیرد و براساس نتایج حاضر، استفاده از آزمون الایزا برای این منظور توصیه می‌شود.

از مطالعه حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که آزمون الایزا توکسوپلاسموز از توافق بین آزمایشگاهی و بین کیتی بالایی برخوردار است.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و با همکاری مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. از جناب آقای دکتر عقیلی رئیس آزمایشگاه خصوصی رازی قزوین به سبب در اختیار قرار دادن سرم‌های بیماران قدردانی می‌شود. همچنین از همکاری آقای دکتر محمد مهدی دانشی کهن و خانم دکتر فاطمه حاج منوچهری سپاسگزاری می‌شود. این گزارش مربوط به طرح تحقیقاتی و پایان‌نامه دانشجویی خانم دکتر سمیه محمد حسینی می‌باشد.

References

1. Gharavi MJ. Seroepidemiological survey of Toxoplasmosis in pregnant women in Tehran. *Hakim Research Journal* 2002; 2(5): 91-97 (Persian).
2. Fallah M, Matini M, Taher Khani H, Rabiei S, Haji Looei M. Seroepidemiology of toxoplasmosis among pregnant women in Hamadan city. *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences & Health Services* 2006; 39(13): 33-37 (Persian).
3. Keshavarz H, Nateghpour M, Eskandari SE. A seroepidemiologic survey of Toxoplasmosis in Islamshahr district of Tehran, Iran. *Modarres*

تاکی زوئیت‌ها به طریق چشمی قرائت می‌شود. بدیهی است، خطای قرائت چشمی محتمل‌تر از خطای قرائت دستگاهی است.

در مطالعه حاضر، میزان سروولوژی مثبت توکسوپلاسم در ۸۱ بیمار ارجاع شده به آزمایشگاه برای سروولوژی توکسوپلاسموز بین سه مرکز ۰/۵ تا ۱/۲ درصد و بین سه کیت ۱/۲ تا ۲/۵ درصد تفاوت داشت. با در نظر داشتن کاربرد سرواپیدمیولوژی آزمون الایزا، شیوع بالا توکسوپلاسم و فقدان استاندارد سازی واحد برای تولید کیت‌های این آزمون، تفاوت مشاهده شده قابل اغماض است.

علیرغم آنکه کیت‌های تجاری الایزا توکسوپلاسم از استاندارد سازی واحدی برخوردار نیستند ولی به استناد نتایج مطالعه حاضر می‌توان ادعا کرد که کیت‌های مورد مطالعه از کنترل کیفی خوبی برخوردار بودند.

یکی از اهداف جنبی مطالعه حاضر ارزیابی آزمون الایزا برای انجام مطالعه جامع سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسم در کشور بوده است. گرچه اکثر گزارشات سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسم از سایر کشورها با بهره‌گیری از آزمون الایزا بوده است (۱۶-۱۸) ولی عمده این نوع مطالعات در ایران با استفاده از آزمون IFA

- Journal of Medical Sciences 2003; 2(6): 111-119 (Persian).
4. Saraei-Sahnesaraei M, Jahani Hashemi H. Seroprevalence of Toxoplasma gondii among females referred to Qazvin community-based medicine center for pre-marriage examinations. *The Journal of Qazvin University of Medical Sciences & Health Services* 2007; 1(11): 12-17 (Persian).
5. Ajami A, Sharif M, Ziaei H. Serological study of toxoplasmosis in Mazandaran rehabilitation centers. *J Mazand Univ Med Sci* 2005; 46(15): 64-68 (Persian).

6. Shah Moradi A, Daryani A, Hadji Zadeh E. A seroepidemiology of toxoplasmosis in Roudsar city. Daneshvar, Scientific-research Journal of Shahed University 1997; 15-16(4): 7-12 (Persian).
7. Berger F, Goulet V, Le Strat Y, Desenclos JC. Toxoplasmosis among pregnant women in France: risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. Rev Epidemiol Sante Publique 2009; 57(4): 241-248.
8. Montoya JG, Kovacs JA, Remington JS. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. editors. Mandel, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. P 3170-3198.
9. Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C. 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(12): 3112-3115.
10. Joynson DH, Payne RA, Balfour AH, Prestage ES, Fleck DG, Chessum BS. Five commercial enzyme linked immunosorbent assay kits for toxoplasma specific IgM antibody. J Clin Pathol 1989; 42(6): 653-657.
11. Kodym P, Machala L, Roha'cova' H, Sirocka' B, Malý M. Evaluation of a commercial IgE ELISA in comparison with IgA and IgM ELISAS, IgG avidity assay and complement fixation for the diagnosis of acute toxoplasmosis. Clin Microbiol Infect 2007; 13(1): 40-47.
12. Spranzi E, Thulliez P. 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. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1570-1574.
13. Herbrink P, Van Loon Am, Rotmans JP, Van Knapen F, Van Dijk WC. 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(1): 100-105.
14. Saraei-Sahnesaraei M, Jahani Hashemi H. Toxoplasmosis indirect immunofluorescent antibody test agreement rate among four laboratory centers. J Med Faculty Guilan Univer of Med Sci & Health Services 2008; 64(16): 51-59 (Persian).
15. Kaul R, Chen P, Binder SR. Detection of Immunoglobulin M Antibodies Specific for *Toxoplasma gondii* with Increased Selectivity for Recently Acquired Infections. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5705-5709.
16. Kamani J, Mani AU, Eqwu GO, Kumshe HA. Seroprevalence of human infection with *Toxoplasma gondii* and the associated risk factors in Maiduguri, Borno state, Nigeria. Ann Trop Med Parasitol 2009; 103(4): 317-321.
17. Tamer GS, Dundar D, Caliskan E. Seroprevalence of *Toxoplasma*, Rubella and Cytomegalovirus among pregnant women in western region of Turkey. Clin Invest Med 2009; 32(1): 43-47.
18. Liu Q, Wei F, Gao S, Jiang L, Lian H, Yuang B, et al. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. Trans R Soc Trop Med Hyg 2009; 103(2): 162-166.