

Analysis of the diagnostic power of direct immunofluorescence (DIF) method and Giemsa staining in comparison to the PCR method for detection of *Chlamydia trachomatis* in the conjunctiva samples of patients with follicular conjunctivitis referred to Farabi hospital in 1392

Zohreh Abedinyfar¹, Farahnoosh Doustdar¹, Fahimeh Asadi Amoli², Hossein Goudarzi¹,
Fateme Fallah^{1*}

1. Department of Microbiology, Faculty of medicine, Shahid Beheshti University of Medical sciences, Tehran, Iran.

2. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

(Received: 2015/03/1

Accept: 2015/11/28)

Abstract

Background: *Chlamydia trachomatis* is an obligate intracellular parasite responsible for ocular and genital infections in human. *Chlamydia trachomatis* is the most common cause of chronic follicular conjunctivitis and is also responsible for 20% of acute conjunctivitis cases. As a rapid diagnosis is important in the reducing the long-term sequel of the diseases, the objective of this study was to compare three methods including Direct immunofluorescence (DIF) method, Giemsa staining and PCR for detection of *chlamydia trachomatis* in patients with follicular conjunctivitis referred to Farabi hospital in 1392.

Material and methods: Conjunctival scraps (n=90) were obtained from patients who were referred to the diagnostic laboratory of Farabi hospital during 2012. Smears were prepared by rolling half the swab on to the center of a glass slide. Smears were fixed and used for direct immunofluorescence (DIF) method using a genus specific fluorescein isothiocyanate labelled *chlamydia* monoclonal antibody. In Giemsa stain, diagnosis was based on the presence of inclusions that were basophilic and stained pinkish-blue. PCR amplification after Extraction performed using CT1 and CT5 primers designed from *Omp1* gene.

Results: Of the 90 patients examined for *Chlamydia trachomatis* in the eyes, 28 (31. 1%) were positive by DIF and 13 (14. 4%) by Giemsa staining; and 35 patients (38. 8%) showed positive results in PCR. Sensivity, specificity, predictive positive value and negative predictive value of DIF in comparison to PCR respectively were calculated as 88. 33, 100, 100 and 88. 70. Sensivity, specificity, predictive positive value and negative predictive value of DIF in comparison to PCR respectively were calculated as 61. 40, 100, 100 and 71. 42. Therefore sensivity and negative predictive value of DIF are significantly higher than Giemsa staining.

Conclusion: According to results of this study DIF is more sensitive and more reliable than Giemsa staining for detection of *Chlamydia trachomatis* in the Conjunctiva Samples of Patients with follicular conjunctivitis.

Keywords: Outer Membrane protein (Omp), Follicular conjunctivitis, *Chlamydia trachomatis*

• Corrospoding author: Fateme Fallah
Tel/Fax: 982123872556
E-mail: F_doustdar@yahoo.com

بررسی قدرت تشخیصی روش‌های ایمونوفلورسانس مستقیم (DFA) و رنگ‌آمیزی گیمسا در مقایسه با روش PCR ژن *Omp1* برای شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه ملتحمة بیماران مبتلا به کونژنکتیویت فولیکولار مراجعه‌کننده به بیمارستان فارابی در سال ۱۳۹۲

زهره عابدینی فر^۱، فرحناوش دوستدار^۱، فهیمه اسدی آملی^۲، حسین گودرزی^۱، فاطمه فلاح^۱

۱- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۹/۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۱۰

چکیده:

مقدمه: کلامیدیا تراکوماتیس یک باکتری داخل سلولی اجباری با اهمیت کلینیکی بالا است که عفونت‌های انسانی ناشی از این باکتری ترجیحاً چشم‌ها و دستگاه تناسلی را گرفتار می‌کنند. کلامیدیا تراکوماتیس، شایع‌ترین عامل کونژنکتیویت فولیکولار مزمن و عامل ۰۲ درصد موارد کونژنکتیویت حاد است. از آنجا که تشخیص سریع می‌تواند در کاهش عوارض طولانی مدت بیماری مؤثر باشد، در این تحقیق ۱ بر آن شدیم که روش‌های مختلف تشخیص کلامیدیا شامل رنگ‌آمیزی گیمسا، *DIF* (ایمونوفلورسانس مستقیم) و *RCP* ژن *Omp1* را در مورد نمونه‌های ملتحمة بیماران مبتلا به کونژنکتیویت فولیکولار مراجعه‌کننده به بیمارستان فارابی در سال ۱۳۹۲ را بررسی کنیم.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تشخیصی از نمونه ۹۰ بیمار مبتلا به کونژنکتیویت فولیکولار که در سال ۱۳۹۲ به آزمایشگاه بیمارستان فارابی مراجعه کرده بودند، استفاده شد. نمونه‌گیری با توجه به معیارهای ارائه شده از طرف سازمان بهداشت جهانی، با استفاده از اسکراب و از سطح ملتحمة فوقانی بیمار انجام شد. در رنگ‌آمیزی گیمسا انکلوژیون‌ها به رنگ ارغوانی دیده شدند. در *DIF* اجسام اولیه و انکلوژیون بادی پس از رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی کوژوگه با فلورسنتین به صورت فلورسانس سبز رنگ با میکروسکوپ ایمونوفلورسنتس دیده شدند. *PCR* با پرایمرهای *CT1*، *CT5* برای شناسایی ژن *Omp1* روی *DNA* استخراج شده از نمونه‌ها انجام شد. نتایج با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مشخص شد.

یافته‌ها: از ۹۰ بیمار با علایم کونژنکتیویت فولیکولار در ۲۸ نفر (۳۱/۱ درصد) با روش‌های ایمونوفلورسانس مستقیم و در ۱۳ نفر (۱۴/۴ درصد) با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا و در ۵۳ نفر (۸۳/۸ درصد) با روش *PCR* ژن *Omp1*، عفونت کلامیدیایی شناسایی شد. حساسیت و اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت و منفی روش ایمونوفلورسانس مستقیم در مقایسه با *PCR* به ترتیب معادل ۸۸/۳۳، ۱۰۰، ۱۰۰، ۸۸/۰۷ درصد و حساسیت و اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت و منفی روش رنگ‌آمیزی گیمسا در مقایسه با *PCR* به ترتیب معادل ۶۱/۴۰، ۱۰۰، ۱۰۰، ۷۱/۲۲ درصد محاسبه شد. بنابراین حساسیت و ارزش اخباری منفی روش ایمونوفلورسانس به صورت معناداری بالاتر از روش گیمسا بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به مطالعه انجام شده، ایمونوفلورسانس مستقیم در مقایسه با رنگ‌آمیزی گیمسا برای تشخیص کونژنکتیویت فولیکولار کلامیدیایی روشی حساس‌تر و قابل اعتمادتر است.

واژگان کلیدی: *Outer Membrane protein (Omp)*، کونژنکتیویت فولیکولار، کلامیدیا تراکوماتیس

مقدمه:

کلامیدیا تراکوماتیس یک باکتری اجباری داخل سلولی است که عفونت‌های انسانی ناشی از این باکتری ترجیحاً چشم‌ها و دستگاه تناسلی را گرفتار می‌کنند. کلامیدیا تراکوماتیس، شایع‌ترین عامل کونژنکتیویت فولیکولار مزمن و عامل ۰۲ درصد موارد کونژنکتیویت حاد است. از آنجا که تشخیص سریع می‌تواند در کاهش عوارض طولانی مدت بیماری مؤثر باشد، در این تحقیق ۱ بر آن شدیم که روش‌های مختلف تشخیص کلامیدیا شامل رنگ‌آمیزی گیمسا، *DIF* (ایمونوفلورسانس مستقیم) و *RCP* ژن *Omp1* را در مورد نمونه‌های ملتحمة بیماران مبتلا به کونژنکتیویت فولیکولار مراجعه‌کننده به بیمارستان فارابی در سال ۱۳۹۲ را بررسی کنیم.

گونه‌های کلامیدیا شایع‌ترین عوامل میکروبی ایجادکننده عفونت‌های مزمن ملتحمة هستند. کلامیدیا تراکوماتیس، شایع‌ترین عامل کونژنکتیویت فولیکولار مزمن است. این ارگانیسم سه سندرم تراخیم، کونژنکتیویت انکلوژیونی بالغان و کونژنکتیویت نوزادان را ایجاد می‌کند. کونژنکتیویت فولیکولار به التهاب ملتحمة که غشای پوشاننده سطح چشم است، اطلاق می‌شود. کونژنکتیویت فولیکولاری

نویسنده مسئول: دکتر فاطمه فلاح - استاد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تلفن: ۹۸۲۱۳۳۸۷۲۵۵۶

F_doustadar@yahoo.com

برای نگهداری نمونه برای PCR از محیط ۲SP transport medium (۰.۲ M phosphate; QUELAB Laboratories Inc., Montréal, Canada) استفاده شد و نمونه‌ها تا زمان انجام PCR فریزر -۲۰ قرار داده شدند. استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت Bioneer (AccuPrep® Genomic DNA Extraction Cat. (No.: K-۳۰۳۲) از دو پرایمر اختصاصی زیر استفاده شد.

پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر ناحیه OMP1 شامل پرایمرهای CT5: GCCGCTTTGAGTTCTGCTTCCTC و CT1: AATTACGTGAGCAGCTCTCTCAT هستند. PCR در حجم ۲۵ µl حاوی

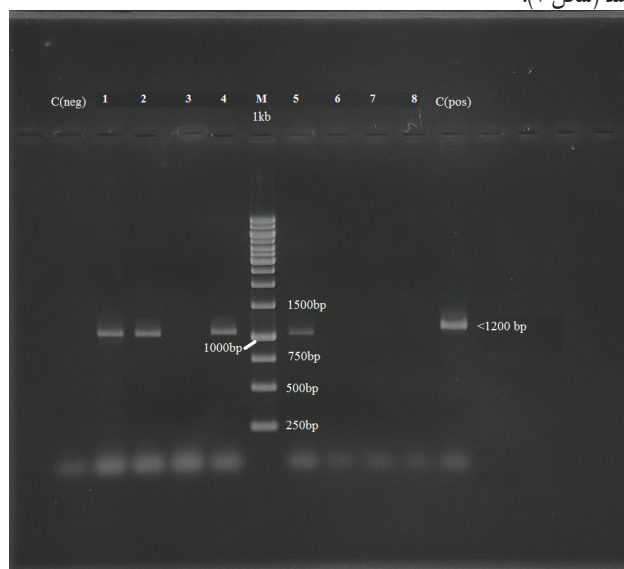
مواد زیر انجام شد: ۵۰ mM Tris-HCl, ۵۰ mM MgCl2, ۵۰ mM deoxynucleotide triphosphate, ۱ U Taq polymerase. برنامه PCR به شرح زیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و سنتز ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و سنتز نهایی ۷۲ درجه ۷ دقیقه (۹). محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد.

نتایج به دست آمده از روش‌های مختلف با استفاده از نرم افزار SPSS ver ۱۶. آنالیز آماری شدند. از تست آماری t test برای بررسی داده‌های کمی و از تست chi square و exact test Fisher برای آنالیز داده‌های کیفی استفاده شد.

یافته‌ها:

بیماران شامل ۴۱ زن (۴۵/۵ درصد) و ۴۹ مرد (۵۴/۵ درصد) بودند. بیشترین رنج سنی بیماران بین ۲۰ تا ۲۹ سال بودند (با میانگین سنی: ۴۸/۵ و انحراف معیار: ۲۸). بیشترین علائم بالینی که در بیماران مشاهده شد شامل قرمزی چشم و واکنش فولیکولر در ملتحمه و احساس جسم خارجی بود. ۱۸ بیمار (۲۰ درصد) سابقه عفونت ادراری- تناسلی داشتند.

در آزمایش PCR انجام شده روی نمونه‌های بیماران مبتلا به کوژنکتیویت فولیکولار، توسط پرایمرهای CT1 و CT5 در نمونه‌های مثبت، ژن OMP1 تکثیر شد و پس از الکتروفورز و رنگ آمیزی به صورت باند ۱۲۰۰ bp مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: محصول PCR ژن Omp1: C (neg): کنترل منفی، C (pos): کنترل مثبت (Chlamydia trachomatis strain) ATCC VR-886، مارکر Kb1، ردیف‌های ۱، ۲، ۴، نمونه‌های مثبت، ردیف‌های ۳، ۶، ۷، ۸ نمونه‌های منفی.

می‌شود. روش برتر برای تشخیص کلامیدیا، کشت سلولی است که تکنیکی دشوار و زمان‌بر است. یکی دیگر از روش‌ها، رنگ آمیزی نمونه‌های ملتحمه با روش گیمسا است که در این روش انکلوژیون‌های کلامیدیایی رنگ آمیزی می‌شود. روش‌های متکی بر رنگ آمیزی فاقد حساسیت بالا هستند، به همین دلیل از تست‌های شناسایی آنتی ژن‌های کلامیدیا تراکوماتیس با روش DFA یا EIA که نیاز به باکتری زنده در نمونه‌های بالینی نیست استفاده می‌شود. همچنین از روش‌های هیبریداسیون اسیدنوکلئیک (شناسایی tRNA کلامیدیا) و تکثیر اسیدنوکلئیک مانند PCR برای شناسایی DNA کلامیدیا در نمونه‌های کلینیکی استفاده می‌شود (۳ و ۴). مقایسه کشت، DFA یا EIA نشان داده است که DFA یا EIA حساسیت کمتری نسبت به کشت دارند. از طرف دیگر PCR حساسیت بالاتری نسبت به کشت و EIA دارا است. حساسیت بالاتر PCR برای انواع مختلف نمونه‌ها از جمله سواب مجرای تناسلی مردان و آندوسرویکس زنان و نمونه ادرار افراد دارای علائم بالینی و بدون علائم بالینی به اثبات رسیده است (۳ و ۴). حساسیت و اختصاصیت بالای روش‌های متکی بر PCR برای شناسایی سریع عفونت‌های کلامیدیایی در مقایسه با روش‌های دیگر از جمله روش سخت و زمانگیر کشت باکتری این روش را به عنوان روشی مطمئن برای شناسایی و تشخیص این باکتری معرفی کرده است (۵). در تحقیق‌های مختلف اهداف تکثیری متفاوتی برای انجام PCR تشخیصی کلامیدیا به کار گرفته شده است که از آن جمله می‌توان از ژن پلاسمیدی و ژن‌های کروموزومی شامل ژن پروتئین‌های غشای خارجی (Major Outer Membrane Proteins) MOMP و tRNA و پروتئین‌های غنی از سیستئین نام برد (۶).

به طور کلی مطالعه‌های محدودی در مورد شیوع کلامیدیا در نمونه‌های کوژنکتیویت انکلوژیونی وجود دارد. در یکی این مطالعه‌ها که از سوی مالاتی و همکاران در هند انجام شده از ۳۲۸ نمونه سواب چشمی ۱۶ نمونه (۴/۹ درصد) به روش PCR برای کلامیدیا مثبت شناسایی شد (۷).

با توجه به اینکه اکثر تحقیق‌ها روی نمونه‌های تناسلی انجام شده و تحقیق‌های کمتری در مورد نمونه‌های چشمی وجود دارد، بنابراین در این تحقیق هدف این است که روش‌های مختلف تشخیص کلامیدیا شامل رنگ آمیزی گیمسا، DIF و PCR ژن Omp1 را در مورد نمونه‌های ملتحمه بیماران مبتلا به کوژنکتیویت فولیکولار مراجعه کننده به بیمارستان فارابی در سال ۱۳۹۲ بررسی شوند و حساسیت و اختصاصیت دو روش رنگ آمیزی گیمسا، DIF به عنوان دو روش رایج تشخیص کلامیدیا در مقایسه با روش PCR سنجیده شود.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی- تشخیصی از نمونه ۹۰ بیمار مبتلا به کوژنکتیویت فولیکولار که در سال ۱۳۹۲ به آزمایشگاه بیمارستان فارابی مراجعه کرده بودند، استفاده شد. ابتدا به کوژنکتیویت فولیکولار در بیماران از سوی پزشک متخصص چشم تأیید می‌شد.

نمونه‌گیری از ملتحمه بیماران از سوی پزشک متخصص و به روش اسکراب با Kimura spatula یا سواب داکرون استریل انجام می‌شد (۴). قبل از نمونه‌گیری پر کردن فرم اطلاعاتی به عمل آمد. باکتری Chlamydia trachomatis strain ATCC VR-۸۸۶ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تهیه لام از نمونه‌ها برای انجام روش رنگ آمیزی گیمسا و ایمنوفلورسانس مستقیم بلافاصله هنگام نمونه‌گیری انجام شد. نمونه تهیه شده روی لام معمولی پس از فیکساسیون با متانول با گیمسا رنگ آمیزی شد. اجسام اولیه و انکلوژیون بادی‌ها به صورت اجسام بنفش تیره در نزدیکی سلول‌های اپیتلیال دیده شدند (۸). نمونه برای DIF پس از تهیه روی لام مخصوص و فیکس شدن طبق روش ذکر شده در کیت (C. trachomatis DFA kit; Code: PL ۱۰۱۰; Manufacturer: Pro-Lab Diagnostics, Canada) با استفاده از آنتی بادی IgG مونوکلونال کوژنوگه با فلورسئین رنگ آمیزی شد. پس از رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ ایمنوفلورسانس با بزرگمایی ۱۰۰۰ X لام بررسی شد. اجسام اولیه در این روش به صورت فلوئورسنت سبز رنگ دیده شدند (۹).

بحث:

عفونت های کلامیدیایی یکی از شایع ترین بیماری های چشمی هستند که در بسیاری از مطالعه ها، کلامیدیا تراکوماتیس را شایع ترین دلیل کوئزکتیویتی فولیکولار مزمن و اصلی ترین دلیل کوئزکتیویتی های باکتریال در نوزادان مطرح کرده اند (۴). در مجموع شیوع این عفونت در منابع مختلف بسیار متفاوت از ۲۰ تا ۹۰ درصد به موازات گروه های سنی عنوان شده است (۱۰). Tullo و همکاران در مطالعه ای در سال ۱۹۸۱ در Bristol شیوع عفونت را یک در هر ۴۴ هزار نفر در جمعیت ۱۵ تا ۴۴ سال و یک در ۱۰۰ هزار کل جمعیت نشان داده اند (۱۱). در مطالعه ما بیشتر بیماران در رده سنی ۲۰ تا ۳۰ سال بودند و به طور عمده نمونه ها شامل موارد کوئزکتیویتی فولیکولر مزمن بالغان بود. با توجه به اینکه بیشتر بیماران در این تحقیق در رده سنی است که در آن افراد از لحاظ فعالیت جنسی فعال تر هستند، می توان نتیجه گیری کرد که عفونت دستگاه تناسلی می تواند مهم ترین منبع آلودگی افراد به عفونت چشمی کلامیدیایی باشد. علایم تناسلی همزمان در ۲۰ درصد از بیماران مشاهده شد که از آنجا که اکثر عفونت های کلامیدیایی بدون علامت هستند احتمال وجود بیماری کلامیدیایی بدون علامت در سایر بیماران وجود دارد.

روش های متعددی برای تشخیص آزمایشگاهی عفونت های ایجاد شده توسط کلامیدیا تراکوماتیس وجود دارد، تفاوت این روش ها در حساسیت، اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت و منفی آنها است. در مراکز با امکانات کمتر، روش مستقیم تهیه اسمیر و رنگ آمیزی به روش گیمسا برای مشاهده انکلوژیون های داخل سیتوپلاسمی یکی از روش های تشخیصی است. این روش در نوزادان مفید و در بالغان دارای حساسیت کمتری است. بنابراین به دلیل سهولت انجام و در دسترس بودن، از روش های تشخیص اولیه است، هر چند حساسیت بالایی ندارد. روش DIF روشی دارای حساسیت به نسبت بالا ۷۰-۱۰۰ درصد به نسبت کشت و اختصاصیت بیش از ۸۷-۹۹ درصد است و تنها تستی است که اجازه ارزیابی کیفیت نمونه را می دهد. برای این تست نمونه های با ۱۰ تا ۲۰ سلول استوانه ای یا اسکواموس متاپلاستیک قابل قبول هستند (۱۲). Isobe و همکاران در سال ۱۹۹۶ برای تشخیص کوئزکتیویتی انکلوژیونی ناشی از کلامیدیا تراکوماتیس از نمونه های ملتحمة روش PCR را به کار بردند. در این تحقیق از ۳۸ سواب ملتحمة ۱۸ نمونه مثبت (۴۷/۳ درصد) شناسایی شد. همچنین در این تحقیق نشان داده شد که میزان شیوع عفونت های چشمی کلامیدیایی متناسب با بیماری ژنیتال است (۱۳). Bartolomeo و همکاران در مطالعه ای در آرژانتین در سال ۲۰۰۱ در باره کوئزکتیویتی های نوزادی آمار ۷/۸ درصد را ارائه دادند (۱۴). در مطالعه ای که از سوی Palayekar و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام شد ۱۶/۸ درصد از نمونه ها با DIF و ۱۰ درصد با گیمسا مثبت شدند (۱۵). Haller و همکاران در سال ۱۹۹۶ در استرالیا ۵۵۸ اسکرپ ملتحمة و ۹۳ نمونه سرم را با روش های کشت، PCR و DFA بررسی کردند. موارد مثبت کلامیدیا در هشت مورد از ۹۳ بیمار (۸/۶ درصد) با روش های کشت و PCR شناسایی شد، ولی روش DFA حساسیت کمتری را نشان داد. این مطالعه نشان داد که PCR یک جایگزین مناسب برای کشت و DFA روشی مفید برای تشخیص سریع است (۱۶). در مطالعه ای که از سوی Lin و همکاران در سال ۱۹۹۹ روی ۱۰۰ بیمار مبتلا به کوئزکتیویتی با روش IF و رنگ آمیزی گیمسا انجام شد ۳۸ درصد با IF و ۲۹ درصد با رنگ آمیزی گیمسا نتایج مثبت نشان دادند (۱۷). به طور کلی مطالعه هایی که در مقایسه روش رنگ آمیزی گیمسا و DIF انجام شده اند، بیشتر روی نمونه های تناسلی انجام شده است. در ایران نیز مطالعه های انجام شده روی عفونت کوئزکتیویتی فولیکولر ناشی از کلامیدیا محدود است. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۴ از سوی سلطانزاده و همکاران روی ۱۷۰ نوزاد مبتلا به کوئزکتیویتی در ایران انجام شده است، ۱۰ مورد (۶ درصد) به روش DIF مثبت بود. در این مطالعه شیوع پایین کوئزکتیویتی کلامیدیایی در نوزادان را در مقایسه با گزارش های غربی به دلیل شیوع پایین تر عفونت های منتقله از راه جنسی در ایران دانستند (۱۸). در مطالعه ما از ۹۰ نفر بیمار (۳۸/۸ درصد) ۳۵ نفر با روش PCR ژن Omp1 عفونت کلامیدیایی را نشان دادند. با توجه به اینکه

از ۹۰ بیمار با علایم کوئزکتیویتی فولیکولار در ۲۸ نفر (۳۱/۱ درصد) با روش های ایمونوفلورسانس مستقیم و در ۱۳ نفر (۱۴/۴ درصد) رنگ آمیزی گیمسا و در ۳۵ نفر (۳۸/۸ درصد) با روش PCR ژن Omp1، عفونت کلامیدیایی شناسایی شد. بنابراین حساسیت و اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت و منفی روش ایمونوفلورسانس مستقیم در مقایسه با PCR به ترتیب معادل ۸۸/۳۳، ۱۰۰، ۸۸/۷۰، ۱۰۰ درصد و حساسیت و اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت و منفی روش رنگ آمیزی گیمسا در مقایسه با PCR به ترتیب معادل ۶۱/۴۰، ۱۰۰، ۷۱/۴۲ درصد محاسبه شد. سپس با استفاده از آزمون Fisher's p value محاسبه شد که به ترتیب در مورد مقایسه حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی دو روش رنگ آمیزی گیمسا و ایمونوفلورسانس مستقیم به ترتیب معادل ۰/۰۰۰۹، ۱، ۰/۰۰۴۷ و ۰/۰۰۰۹ محاسبه شد که در مورد حساسیت و ارزش اخباری منفی به طور کامل معنادار، ولی در مورد اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت بی معنا بود. جدول ۱ و ۲ به ترتیب مقادیر ارزش اخباری مثبت و منفی دو روش رنگ آمیزی گیمسا و ایمونوفلورسانس را در مقایسه با PCR و جدول ۳ مقایسه آن ها را نشان می دهد.

جدول ۱: ارزش اخباری مثبت و منفی روش ایمونوفلورسانس مستقیم

تشخیص به روش PCR	تشخیص به روش رنگ آمیزی گیمسا		جمع
	مثبت	منفی	
مثبت	۱۳	۰	۱۳
منفی	۲۲	۵۵	۷۷
جمع	۳۵	۵۵	۹۰

جدول ۲: ارزش اخباری مثبت و منفی روش رنگ آمیزی گیمسا برای شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه ملتحمة بیماران مبتلا برای شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه ملتحمة بیماران

تشخیص به روش PCR	تشخیص به روش ایمونوفلورسانس		جمع
	مثبت	منفی	
مثبت	۲۸	۰	۲۸
منفی	۷	۵۵	۶۲
جمع	۳۵	۵۵	۹۰

به کوئزکتیویتی فولیکولار در مقایسه با PCR مبتلا به کوئزکتیویتی فولیکولار در مقایسه با PCR

جدول ۳: مقایسه ارزش اخباری مثبت و منفی دو روش رنگ آمیزی گیمسا و ایمونوفلورسانس مستقیم برای شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه ملتحمة بیماران مبتلا به کوئزکتیویتی فولیکولار در مقایسه با PCR

تشخیص روش	مثبت حقیقی		مثبت + منفی کاذب		جمع
	مثبت حقیقی	مثبت + منفی کاذب	مثبت حقیقی	مثبت + منفی کاذب	
رنگ آمیزی گیمسا	۱۳	۵۵	۰	۲۲	۹۰
ایمونوفلورسانس	۲۸	۵۵	۰	۷	۹۰

بود، اما در مورد اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت این دو روش تفاوت معناداری را نشان ندادند.

نتیجه گیری:

با توجه به مطالعه انجام شده ایمونوفلورسانس مستقیم در مقایسه با رنگ آمیزی گیمسا برای تشخیص کونژنکتیویت فولیکولار کلامیدیایی از حساسیت و ارزش اخباری منفی بالاتری برخوردار است و در آزمایشگاه هایی که امکان انجام PCR به عنوان روش حساس تر وجود ندارد، بهتر است از روش ایمونوفلورسانس مستقیم به عنوان روش جایگزین برای تشخیص عفونت های کلامیدیایی استفاده شود.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق قسمتی از پایان نامه دکترای خانم زهره عابدینی فر به راهنمایی خانم دکتر فاطمه فلاح است. با تشکر از حمایت های معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و آزمایشگاه پاتوبیولوژی بیمارستان فارابی.

در معاینه هایی که از سوی چشم پزشک انجام شد و این افراد مشکوک به عفونت کلامیدیایی تشخیص داده شدند، فراوانی موارد کلامیدیا در مطالعه ما را توجیه می کند. با توجه به اینکه PCR به عنوان روش حساس تر و قابل قبول تر برای تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه های کلینیکی تأیید شده است (۱۶)، در این مطالعه نتایج دو روش رنگ آمیزی گیمسا و ایمونوفلورسانس مستقیم با PCR مورد مقایسه قرار گرفت. در این مطالعه روش های رنگ آمیزی گیمسا، ایمونوفلورسانس مستقیم و PCR ژن Omp1 به ترتیب ۱۴/۴ درصد، ۳۱/۱ درصد و ۳۸/۸ درصد موارد مثبت کلامیدیا را در نمونه های چشمی بیماران شناسایی کردند که در نتیجه حساسیت روش ایمونوفلورسانس مستقیم (۸۸/۳۳ درصد) در مقایسه با روش گیمسا (۶۱/۴۰) به طور مشخص بالاتر و Pvalue آن در مقایسه معنادار بود. همچنین در مورد ارزش اخباری منفی دو روش رنگ آمیزی گیمسا و ایمونوفلورسانس مستقیم (۷۱/۴۲ در مقایسه با ۸۸/۷۰ درصد) به طور معناداری این متغیر در مورد روش ایمونوفلورسانس مستقیم بالاتر

منابع

- Yanoff M, Sassano JW. Ocular pathology ,4th edition 1996;p 71-73.
- Garland S M, Malatt A, Tabrizi S, Grando D, Lees M I, Andrew J H. et al. Chlamydia trachomatis_ conjunctivitis. Prevalence and association with genital tract infection. Med J Aust. 1995; 3,162 (7): 363-6.
- Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology, 4th ed. W. B. Saunders Company 2011. p. 548-58.
- Rours I, Hammerschlag M, Ott A, Faber T, Verbrugh H, Groot R, et al. Chlamydia trachomatis as a cause of neonatal conjunctivitis in Dutch infants. Pediatrics 2008; 121 (2): 321-326.
- Abrishami M, Hashemi B, Abrishami M, Abnous K, Razavi-Azarkhiavi K, Behravan J. PCR detection and identification of bacterial contaminants in ocular samples from post-operative endophthalmitis. J Clin Diagn Res. 2015; 9 (4): 1-3.
- Hsieh YH, Bobo LD, Quinn TC, West SK. Determinants of trachoma endemicity using Chlamydia trachomatis ompA DNA sequencing. Microbes and Infection 2001; (3): 447-458.
- Malathi JI, Madhavan HN, Therese KL, Joseph PR. A hospital based study on the prevalence of conjunctivitis due to Chlamydia trachomatis. Indian J Med Res. 2003; 117: 71-5.
- Patricia M. Tille. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 13th ed. Mosby Inc, Elsevier Inc 2014. p. 468-72.
- Bell TA, Kuo CC, Stamm WE, Tam MR, Stephens RS, Holmes KK. et al. Direct fluorescent monoclonal antibody stain for rapid detection of infant chlamydia trachomatis infections. Pediatrics. 1984; 74 (2): 224-8.
- Takourt B. , Barbeyrac B, Khyatti M. , Radouani F, Bebear C. , Dessus-Babus S. , et al. Direct genotyping and nucleotide sequence analysis of VS1 and VS2 of the Omp1 gene of Chlamydia trachomatis from Moroccan trachomatous specimens. Microbes and Infection. 2001; 3: 459-466.
- Riduan JM, Hillard WS. Johnson RE. Factors associated with Recurrent Chlamydial infection and failure to return for retesting in young women entering national job training program 1998-2005, sexually transmitted diseases 2008 April; volum 35: Issue 4, 368 – 371.
- Tullo AB, Richmond SJ, Easty DL. The presentation and incidence of paratrachoma in adults J Hyg. Camb. 1981; 87: 63-69.
- Henry, Clinical diagnosis & Management by laboratory methods. 20th 2007; 1002-3.
- Isobe K, Aoki K, Itoh N, Ohno S, Takashima I, Hashimoto N. Serotyping of Chlamydia trachomatis from inclusion conjunctivitis by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Jpn J Ophthalmol. 1996; 40 (2): 279-85.
- Di Bartolomeo S, Mirta DH, Janer M, Rodriguez F, Sauka D, Magarinos F, et al. Incidence of Chlamydia trachomatis and other potential pathogens in neonatal conjunctivitis. Int J Infect Dis 2001; 5 (3): 139-43.
- Palayekar W, Joshi JV, Hazari KT, Shah RS, Chitlange SM. Comparison of four nonculture diagnostic tests for Chlamydia trachomatis. J Assoc Physicians India 2000; 48 (5): 481-3.
- Haller EN, Grumbach PA, Stuenkel D, Kessler HH, Pierer K, Zenz H, et al. Evaluation of two nonculture antigen tests and three serotests for detection of anti-chlamydial antibodies in the diagnosis of ocular chlamydial infections. Graefes Arch Clin and Exp Ophthalmol 1996; 234: 510-514.
- Lin J, Li Y, Zhang J, Feng G, Zhang P, Zheng J, Zheng H. Rapid diagnosis of chlamydial conjunctivitis in laboratory. Yan Ke Xue Bao 1999; 15 (3): 191-4.
- Soltanzadeh MH. Epidemiological study of neonatal conjunctivitis, 24th international congress of pediatrics, Cancun, Mexico. 2004; 15-20.