Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.39; No.2; 2015

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 Abedinyfar[1], Farahnoosh Doustdar[1], Fahimeh Asadi Amoli [2], Hossein Goudarzi[1], Fatemeh 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 squeal 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 isothyocyanate 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*

• *Corrosponding author: Fatemeh Fallah*
Tel/Fax: 982123872556
E-mail: F_doustdar@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-08-07]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور۳۹، شماره ۲، ۱۳۹۴، صفحات ۹۹ تا ۱۰۳

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

زهره عابدینی فر[۱]، فرحنوش دوستدار[۱]، فهیمه اسدی آملی[۲]، حسین گودرزی[۱]، فاطمه فلاح [۱]

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

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۹/۷

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 می کنند. 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 ا بر آن شدیم که روش‌های مختلف تشخیص کلامیدیا شامل رنگ‌آمیزی گیمسا، *DIF* (ایمونوفلورسانس مستقیم) و *RCP* ژن *pmO*۱ را در مورد نمونه‌های ملتحمه 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 اسکراپ و از سطح ملتحمه فوقانی بیمار انجام شد. در رنگ‌آمیزی گیمسا انکلوزیون‌ها به رنگ ارغوانی دیده شدند. در *DIF* اجسام اولیه و انکلوزیون بادی پس از رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی کونژوگه با فلورسئین به صورت فلورسانس سبز رنگ با میکروسکوپ ایمونوفلورسنس 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 *pmO*۱، 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، ۰۰۱، ۰۰۱، 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.

نتیجه گیری: 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:

گونه‌های کلامیدیا شایع‌ترین عوامل میکروبی ایجادکننده عفونت‌های مزمن ملتحمه هستند. کلامیدیا تراکوماتیس، شایع‌ترین عامل کونژنکتیویت فولیکولار مزمن است. این ارگانیسم سه سندرم تراخم، کونژنکتیویت انکلوزیونی بالغان و کونژنکتیویت نوزادان را ایجاد می‌کند. کونژنکتیویت فولیکولار به التهاب ملتحمه که غشای پوشاننده سطح چشم است، اطلاق می‌شود. کونژنکتیویت فولیکولاری که بیش از ۱۶ روز طول بکشد با عنوان کونژنکتیویت فولیکولار مزمن مطرح می‌شود. عفونت‌های چشمی کلامیدیایی در بالغان جوان فعال از نظر جنسی و در نوزادانی که عفونت را از طریق مادران کسب می‌کنند، دیده می‌شود (۲ و۱).

تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس کار دشواری است. برای تشخیص عفونت‌های چشمی کلامیدیایی در مطالعه‌های مختلف از روش‌های کشت سلولی، Direct Fluorescent Antibody (DFA)، Enzyme immunoassay (EIA) استفاده

نویسنده مسئول: دکتر فاطمه فلاح – استاد میکروب شناسی ، گروه میکرب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تلفن: ۹۸۲۱۲۳۸۷۲۵۵۶
F_doustdar@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-08-07]

می‌شود. روش برتر برای تشخیص کلامیدیا، کشت سلولی است که تکنیکی دشوار و زمان‌بر است. یکی دیگر از روش‌ها، رنگ‌آمیزی نمونه‌های ملتحمه با روش گیمسا است که در این روش انکلوزیون‌های کلامیدیایی رنگ‌آمیزی می‌شود. روش‌های متکی بر رنگ‌آمیزی 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 rRNA کلامیدیا) و تکثیر اسیدنوکلئیک مانند PCR برای شناسایی DNA کلامیدیا در نمونه‌های کلینیکی استفاده می‌شود (۴و ۳). 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 وآندوسرویکس زنان و نمونه ادرار افراد دارای علایم بالینی و بدون علایم بالینی به اثبات رسیده است (۴و ۳). 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 به‌عنوان 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 پروتئین‌های غنی از سیستئین نام برد(۶).

به‌طور کلی مطالعه‌های محدودی در مورد شیوع کلامیدیا در نمونه‌های کونژنکتیویت انکلوزیونی وجوددارد. در یکی این مطالعه‌هاکه 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 رنگ‌آمیزی گیمسا، DIF و PCR ژن Omp1 را در مورد نمونه‌های ملتحمه بیماران مبتلا به کونژنکتیویت فولیکولار مراجعه‌کننده به بیمارستان فارابی در سال ۱۳۹۲ بررسی شوند و حساسیت و اختصاصیت دو روش رنگ‌آمیزی گیمسا، DIF به‌عنوان 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 کونژنکتیویت فولیکولار که در سال ۱۳۹۲ به آزمایشگاه بیمارستان فارابی مراجعه کرده بودند، استفاده شد. ابتلا به کونژنکتیویت فولیکولار در بیماران از سوی پزشک متخصص چشم تأیید می‌شد.

نمونه‌گیری از ملتحمه بیماران از سوی پزشک متخصص و به روش اسکراپ 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 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تهیه لام از نمونه‌ها برای انجام روش رنگ‌آمیزی گیمسا و ایمونوفلورسانس مستقیم بلافاصله هنگام نمونه‌گیری انجام شد. نمونه تهیه شده روی لام معمولی پس از فیکساسیون با متانول با گیمسا رنگ‌آمیزی شد. اجسام اولیه و انکلوزیون 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 آنتی‌بادی IgG منوکلونال کونژوگه با فلورسئین رنگ‌آمیزی شد. پس از رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ ایمنوفلورسانس با بزرگنمایی ۱۰۰۰ X لام بررسی شد. اجسام اولیه در این روش به صورت فلوئورسنت سبز رنگ دیده شدند (۹).

برای نگهداری نمونه برای PCR از محیط ۲SP transport medium (۰. M phosphate; QUELAB Laboratories ۰۲ .۰-M sucrose ۲ Inc. , Montréal, Canada) استفاده شد و نمونه‌ها تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- قرار داده شدند. استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت Bioneer (No.: K ۳۰۳۲-AccuPrep® Genomic DNA Extraction Cat.). ۱. براساس دستورالعمل انجام شد. برای تکثیر ناحیه OMP۱ از دو پرایمر اختصاصی زیر استفاده شد.

پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر ناحیه OMP1 شاملپرایمرهای CT1 :GCCGCTTTGAGTTCTGCTTCCTC و CT5: ATTTACGTGAGCAGCTCTCTCAT هستند. PCR در حجم ۲۵ µl حاوی مواد زیر انجام شد:

pM Primers, ۵۰ Mgcl2 1. 5mM, 200µM deoxynucleotide triphosphate, 1 U Taq polymerase. برنامه PCR به شرح زیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت شش دقیقه، ۳۰سیکل شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، آنلینگ 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 رنگ‌آمیزی شد.

نتایج به دست آمده از روش‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver ۱۶ آنالیز آماری شدند. از تست آماری t test برای بررسی داده‌های کمی و از تست chi square وexact 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 علایم 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 کونژنکتیویت فولیکولار، توسط پرایمرهای CT1 و CT5 در نمونه‌های مثبت، ژن OMP1 تکثیر شد و پس از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی به‌صورت باند ۱۲۰۰ bp مشاهده شد (شکل ۱).

شکل۱: محصول PCR ژن Omp1: C (neg): کنترل منفی، C (pos): کنترل مثبت M، (Chlamydia trachomatis strain) ATCC VR-886: مارکر Kb1، ردیف‌های ۱، ۲، ۴، نمونه‌های مثبت، ردیف‌های ۳، ۶، ۷، ۸ نمونه‌های منفی.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-08-07]

از ۹۰ بیمار با علایم کونژنکتیویت فولیکولار در ۲۸ نفر (۳۱/۱ درصد) با روش‌های ایمونوفلورسانس مستقیم و در ۱۳ نفر (۱۴/۴ درصد) رنگ‌آمیزی گیمسا و در ۳۵ نفر (۳۸/۸درصد) 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، ۱۰۰، ۸۸/۷۰ 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، ۷۱/۴۲ درصد محاسبه شد. سپس با استفاده از آزمون Fisher، p value محاسبه شد که به ترتیب در مورد مقایسه حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی دو روش رنگ‌آمیزی گیمسا و ایمونوفلورسانس مستقیم به ترتیب معادل ۰/۰۰۰۹، ۱، ۱و ۰/۰۰۴۷ محاسبه شد که در مورد حساسیت و ارزش اخباری منفی به طور کامل معنادار، ولی در مورد اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت بی‌معنا بود. جداول ۱ و ۲ به ترتیب مقادیر ارزش اخباری مثبت و منفی دو روش رنگ‌آمیزی گیمسا و ایمونوفلورسانس را در مقایسه با PCR و جدول ۳ مقایسه آن‌ها را نشان می‌دهد.

جدول۱: ارزش اخباری مثبت و منفی روش ایمونو فلورسانس مستقیم

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

جدول۲: ارزش اخباری مثبت و منفی روش رنگ‌آمیزی گیمسا برای شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه ملتحمه بیماران مبتلا برای شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه ملتحمه بیماران

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

به کونژنکتیویت فولیکولار در مقایسه با PCR مبتلا به کونژنکتیویت فولیکولار در مقایسه با PCR

جدول۳: مقایسه ارزش اخباری مثبت و منفی دو روش رنگ‌آمیزی گیمسا و ایمونو فلورسانس مستقیم برای شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه ملتحمه بیماران مبتلا به کونژنکتیویت فولیکولار در مقایسه با PCR

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

بحث:

عفونت‌های کلامیدیایی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های چشمی هستند که در بسیاری از مطالعه‌ها، کلامیدیا تراکوماتیس را شایع‌ترین دلیل کونژنکتیویت فولیکولار مزمن و اصلی‌ترین دلیل کونژنکتیویت‌های باکتریال در نوزادان مطرح کرده‌اند (۴). در مجموع شیوع این عفونت در منابع مختلف بسیار متفاوت از ۲۰ تا ۹۰ درصد به موازات گروه‌های سنی عنوان شده است (۱۰). Tullo و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۱۹۸۱ در Bristol شیوع عفونت را یک در هر ۴۴ هزار نفر در جمعیت ۱۵ تا ۴۴ سال و یک در ۱۰۰هزار کل جمعیت نشان داده‌اند (۱۱). در مطالعه ما بیشتر بیماران در رده سنی ۲۰ تا ۳۰ سال بودند و به طور عمده نمونه‌ها شامل موارد کونژنکتیویت 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 فعال‌تر هستند، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که عفونت دستگاه تناسلی می‌تواند مهم‌ترین منبع آلودگی افراد به عفونت چشمی کلامیدیایی باشد. علایم تناسلی همزمان در ۲۰ درصد از بیماران مشاهده شد که از آنجاکه اکثر عفونت‌های کلامیدیایی بدون علامت هستند احتمال وجود بیماری کلامیدیایی بدون علامت در سایر بیماران وجود دارد.

روش‌های متعددی برای تشخیص آزمایشگاهی عفونت‌های ایجاد شده توسط کلامیدیا تراکوماتیس وجود دارد، تفاوت این روش‌ها در حساسیت، اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت و منفی آنها است. در مراکز با امکانات کمتر، روش مستقیم تهیه اسمیر و رنگ‌آمیزی به روش گیمسا برای مشاهده انکلوزیون‌های داخل سیتوپلاسمی یکی از روش‌های تشخیصی است. این روش در نوزادان مفید و در بالغان دارای حساسیت کمتری است. بنابراین به دلیل سهولت انجام و در دسترس بودن، از روش‌های تشخیص اولیه است، هر چند حساسیت بالایی ندارد. روش DIF روشی دارای حساسیت به نسبت بالا ۱۰۰-۷۰ درصد به نسبت کشت و اختصاصیت بیش از ۹۹-۸۷ درصد است و تنها تستی است که اجازه ارزیابی کیفیت نمونه را می‌دهد. برای این تست نمونه‌های با ۱۰ تا ۲۰ سلول استوانه‌ای یا اسکواموس متاپلاستیک قابل قبول هستند (۱۲). Isobe و همکاران در سال ۱۹۹۶ برای تشخیص کونژنکتیویت انکلوزیونی ناشی از کلامیدیا تراکوماتیس از نمونه‌های ملتحمه روش PCR را به کار بردند. در این تحقیق از ۳۸ سواب ملتحمه ۱۸ نمونه مثبت (۴۷/۳ درصد) شناسایی شد. همچنین در این تحقیق نشان داه شد که میزان شیوع عفونت‌های چشمی کلامیدیایی متناسب با بیماری ژنیتال است (۱۳). Bartolomeo و همکاران در مطالعه‌ای در آرژانتین در سال ۲۰۰۱ در باره کونژنکتیویت‌های نوزادی آمار ۷/۸ درصد را ارائه دادند (۱۴). در مطالعه‌ای که از سوی Palayekar و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام شد ۱۶/۸ درصد از نمونه‌ها با DIF و ۱۰ درصد با گیمسا مثبت شدند (۱۵). Haller و همکاران در سال ۱۹۹۶ در استرالیا ۵۵۸ اسکراپ ملتحمه و ۹۳ نمونه سرم را با روش‌های کشت، PCR و DFA بررسی کردند. موارد مثبت کلامیدیا در هشت مورد از ۹۳ بیمار (۸/۶ درصد) با روش‌های 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 مطالعه‌ای که از سوی Lin و همکاران در سال ۱۹۹۹ روی ۱۰۰ بیمار مبتلا به کونژنکتیویت با روش IF و رنگ‌آمیزی گیمسا انجام شد ۳۸ درصد با IF و ۲۹ درصد با رنگ‌آمیزی گیمسا نتایج مثبت نشان دادند (۱۷). به طور کلی مطالعه‌هایی که در مقایسه روش رنگ‌آمیزی گیمسا و DIF انجام شده‌اند، بیشتر روی نمونه‌های تناسلی انجام شده است. در ایران نیز مطالعه‌های انجام شده روی عفونت کونژنکتیویت فولیکولار ناشی از کلامیدیا محدود است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ از سوی سلطانزاده و همکاران روی ۱۷۰ نوزاد مبتلا به کونژنکتیویت در ایران انجام شده است، ۱۰ مورد (۶ درصد به روش DIF مثبت بود. در این مطالعه شیوع پایین کونژنکتیویت کلامیدیایی در نوزادان را در مقایسه با گزارش‌های غربی به دلیل شیوع پایین‌تر عفونت‌های 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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-08-07]

در معاینه‌هایی که از سوی چشم پزشک انجام شد و این افراد مشکوک به عفونت کلامیدیایی تشخیص داده شده بودند، فراوانی موارد کلامیدیا در مطالعه ما را توجیه می‌کند. با توجه به اینکه PCR به‌عنوان روش حساس‌تر و قابل قبول‌تر برای تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه‌های کلینیکی تأیید شده است (۱۶)، در این مطالعه نتایج دو روش رنگ آمیزی گیمسا و ایمونو فلورسانس مستقیم با PCR مورد مقایسه قرار گرفت. در این مطالعه روشهای رنگ‌آمیزی گیمسا، ایمونوفلورسانس مستقیم و PCR ژن Omp1 به ترتیب ۱۴/۴ درصد، ۳۱/۱ درصد و ۳۸/۸ درصد موارد مثبت کلامیدیا را در نمونه‌های 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 رنگ‌آمیزی گیمسا و ایمونو فلورسانس مستقیم (۷۱/۴۲ در مقایسه با ۸۸/۷۰ درصد) به‌طور معناداری این متغیر در مورد روش ایمونو فلورسانس مستقیم بالاتر بود، اما در مورد اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت این دو روش تفاوت معناداری را نشان ندادند.

نتیجه‌گیری:

با توجه به مطالعه انجام شده ایمونوفلورسانس مستقیم در مقایسه با رنگ‌آمیزی گیمسا برای تشخیص کونژنکتیویت فولیکولار کلامیدیایی از حساسیت و ارزش اخباری منفی بالاتری برخوردار است و در آزمایشگاه‌هایی که امکان انجام PCR به‌عنوان روش حساس‌تر وجود ندارد، بهتر است از روش ایمونوفلورسانس مستقیم به‌عنوان روش جایگزین برای تشخیص عفونت‌های 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 حمایتهای معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و آزمایشگاه پاتوبیولوژی بیمارستان فارابی.

منابع

1. Yanoff M, Sassanio JW. Ocular pathology ,4th edition 1996;p 71-73.

2. 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.

3. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology, 4th ed. W. B. Saunders Company 2011. p. 548-58.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. Malathi J1, 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.

8. Patricia M. Tille. Bailey &Scott's Diagnostic Microbilogy, 13th ed. Mosby Inc, Elsevier Inc 2014. p. 468-72.

9. 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.

10. 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.

11. 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 program1998-2005,sexually transmitted diseases 2008 April; volum 35: Issue 4,368 – 371.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. Palayekar W,Joshi JV,Hazari KT,Shah RS,Chitlange SM. Comparison of four nonculture diagnostic tests for Chlamydia trachomatis. JAssoc Phyicians India 2000;48 (5): 481-3.

16. Haller EN, Grumbach PA, Stuenzner 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. Graefe's Arch Clin and Exp Ophthalmol 1996; 234: 510-514.

17. Lin J,Li Y,Zhang J,Feng G,Zhang P,Zheng J,Zheng H. Rapid diagnosis of chlamydial conjunctivitis in laboratory. Yan Ke Xue Bao1999;15 (3): 191-4.

18. Soltanzadeh MH. Epidemiological study of neonatal conjunctivitis, 24th international congress of pediatrics, Cancun, Mexico. 2004; 15-20.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-08-07]