بررسی مقایسه‌ای روشهای میکروایمونوفلئورسانس، الیزا، کیت تشخیص سریع Dima و رنگ‌آمیزی گیمنز در تشخیص سرویسیت کلامیدیایی

دکتر نور امیرمظفری I
هما فروهش تهرانی II
*لیلا گنجی III

چکیده

زمینه و هدف: کلامیدیا تراکوماتیس، یکی از متداول‌ترین باکتری‌های منتقل شونده از طریق جنسی است. این باکتری، عفونت‌های متعددی چون اورتریت، سرویسیت، اندومتریت، اپیدیدیمیت و لنفوگرانولوم آمیزشی را در دستگاه تناسلی ـ ادراری هر دو جنس مرد و زن، ایجاد می‌کند. میزان شیوع سرویسیت کلامیدیایی در جوامع مختلف، متغیر است. در یک مطالعه، میزان شیوع سرویسیت کلامیدیایی در زنانی امریکایی که از نظر جنسی فعال هستند، ۱۵-۵٪ و در زنان حامله، ۱/۲٪ تعیین شده است. هدف از این مطالعه، بررسی میزان شیوع سرویسیت کلامیدیایی و سپس مقایسه روشهای تشخیصی الیزا، میکروایمونوفلئورسانس(Microimmunofluorescence=MIF)، کیت تشخیص سریع Dima و روش میکروسکوپی مستقیم با رنگ‌آمیزی Giemenz، در تشخیص کلامیدیا بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی، ۱۳۷ خانم مبتلا به سرویسیت(بنا بر تشخیص پزشک متخصص زنان و زایمان) مراجعه کننده به درمانگاه ژنیکولوژی بیمارستان حضرت رسول اکرم(ص) و آزمایشگاه تشخیص طبی نیلو، مورد بررسی قرار گرفتند. به وسیله دو سواب، از اندوسرویکس بیماران نمونه‌برداری شد. یک سواب، جهت انجام تست تشخیص سریع با استفاده از کیت و سواب دیگر، جهت رنگ‌آمیزی Gimenez بکار گرفته شد. از بیماران، جهت انجام آزمایش‌های الیزا و میکروایمونوفلئورسانس نیز خونگیری بعمل آمد. نتایج بدست آمده، با استفاده از نرم‌افزار SPSS(version 12) و آزمون Mc Nemar تحلیل گردیدند.

یافته‌ها: با انجام روش الیزا، در ۱۸ بیمار، آنتی‌بادی IgG و در ٤ بیمار، آنتی‌بادی IgM بر علیه کلامیدیا تراکوماتیس مثبت گردید. با استفاده از روش میکروایمونوفلئورسانس، ۱۰ بیمار، دارای آنتی‌بادی IgG و ۳ بیمار، دارای آنتی‌بادی IgM بر علیه کلامیدیا تراکوماتیس بودند. کیت تشخیص سریع Dima، در ٥ بیمار مثبت شد. در هیچ یک از لامهای رنگ‌آمیزی شده به روش گیمنز، انکلوژن بادی کلامیدیایی دیده نشد.

نتیجه‌گیری: براساس روش میکروایمونوفلئورسانس که در بین روشهای سرولوژی، روش استاندارد طلایی در تشخیص عفونت کلامیدیایی می‌باشد، میزان شیوع سرویسیت کلامیدیایی در این مطالعه، ۷/۲٪ تعیین گردید. در مقایسه تعیین آنتی‌بادی IgM با روش الیزا و همچنین مقایسه کیت تشخیص سریع Dima و میکروایمونوفلئورسانس، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما در مقایسه تعیین آنتی‌بادی IgG با روشهای الیزا و میکروایمونوفلئورسانس، اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. بنابراین توصیه می‌شود که نتایج مثبت آنتی‌بادی IgG به روش الیزا، با روش میکروایمونوفلئورسانس تأیید گردد. همچنین رنگ‌آمیزی گیمنز در تشخیص سرویسیت کلامیدیایی توصیه نمی‌شود.

کلیدواژه‌ها: ۱ – کلامیدیا تراکوماتیس ۲ – میکروایمونوفلئورسانس ۳ – الیزا ۴ – سرویسیت

تاریخ دریافت: ۸۵/٤/۱۸، تاریخ پذیرش: ۸۵/۸/٦

مقدمه

کلامیدیا، کوچک‌ترین پارازیت اجباری داخل سلولی شناخته شده‌ای است که قادر به عبور از فیلترهای باکتریایی (۰/٤٥ میکرون) بوده و در محیط‌های کشت مصنوعی قادر به رشد نمی‌باشد. این باکتری اولین بار در سال ۱۹٦٥ با

I) دانشیار گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.
II) مربی گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.
III) کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).

استفاده از کشت سلولی و میکروسکوپ الکترونی شناسایی گردید. کلامیدیا، مکانیسم‌های تولید انرژی متابولیکی(سیکل کربس) را ندارد، بنابراین قادر به تولید ATP(Adenosine tri phosphate) نبوده و از این رو به ترکیبات پرانرژی سلول میزبان نیاز دارد. این ویژگی سبب گردیده که کلامیدیا به عنوان انگل اجباری درون سلولی محسوب گردد. از نظر طبقه‌بندی، کلامیدیا در راسته کلامیدیاله و خانواده کلامیدیاسه قرار دارد که در آن، یک جنس کلامیدیا و چهار گونه کلامیدیا تراکوماتیس، کلامیدیا پسی تاسی، کلامیدیا پنومونیه و کلامیدیا پکوروم تشخیص داده شده است. به استثنای کلامیدیا پکوروم، تمامی گونه‌ها، برای انسان بیماریزا هستند.

کلامیدیا در سیکل زندگی خود به دو شکل EB (elementary body) و RB(reticulate body) دیده می‌شود. فرم EB، به قطر ۰/۶-۰/۲ میکرومتر و از نظر متابولیکی، غیرفعال می‌باشد. عفونت کلامیدیایی با اتصال EB به سطح سلول میزبان آغاز می‌شود. گیرنده‌های سلول میزبان بخوبی شناخته نشده‌اند اما گلیکوزآمینوگلیکان‌ها ممکن است به عنوان گیرنده EB عمل کنند. باکتری برای ورود به درون سلول از چندین مکانیسم استفاده می‌کند. این مکانیسم‌ها عبارتند از:

۱- اندوسیتوز وابسته به گیرنده که از این طریق به درون حفرات مفروش شده با کلاترین راه می‌یابد.

۲- پینوسیتوز که از طریق حفرات غیر مفروش با کلاترین صورت می‌گیرد.

EB وارد شده در سلول میزبان به فرم RB تبدیل می‌شود که قطری معادل ۱/۵-۱ میکرومتر دارد. RB از نظر متابولیکی فعال بوده و با تکثیر از طریق تقسیم دوتایی، تولیدمثل کرده و به فرم EB تبدیل می‌شود. EBهای تولید شده در واکوئل‌های اندوسیتوزی به فرم اجسام درون سلولی بنام انکلوژن بادی قرار می‌گیرند.

از نظر ساختاری، ساختمان دیواره سلولی کلامیدیا از نظر وجود غشاء خارجی، مشابه باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. لیپوپلی‌ساکارید این باکتری که آنتی‌ژن اختصاصی گروه است از KDO(Keto-deoxy-octulonate) و Lipid A تشکیل شده و فاقد زنجیره پلی‌ساکاریدی(آنتی‌ژن Core) می‌باشد. فعالیت اندوتوکسینی آن نسبت به سایر باکتری‌های گرم منفی مانند E.coli، بسیار کمتر است. پروتئین بزرگ غشای خارجی باکتری(Major outer membrane protein=MOMP) که به میزان زیادی در EB و RB یافت شده، توسط ژن omp A کد می‌شود. سروتایپینگ باکتری براساس MOMP صورت می‌گیرد.[۱] کلامیدیاتراکوماتیس دارای ۱۹ سروتیپ A-K می‌باشد(A، B، Ba، C، D، Da، E، F، G، H، I، Ia، J، Ja، K، L1، L2، L2a، L3). سروتیپ‌های A، B و C عامل ایجاد کننده تراخم هستند. سروتیپ‌های L3، L2a، L2 و L1، عامل ایجاد لنفوگرانولوما ونروم(Lymphogranuloma =LGV venereum) می‌باشند که یک بیماری تهاجمی غدد لنفاوی بوده و در مردان همجنس‌باز به میزان بیش‌تری مشاهده می‌شود. سروتیپ‌های K و D، عامل اصلی بیماری‌های منتقل شونده از طریق جنسی می‌باشند. این باکتری عامل تقریباً ۲٤٪ از اورتریت‌های غیرگونوکوکی در مردان می‌باشد.[۲-٤]

اپیدیدیمیت و پروستاتیت، از دیگر بیماری‌هایی می‌باشند که این باکتری در ایجاد آنها در مردان نقش دارد.[۱و ۲] کلامیدیا تراکوماتیس در زنان، قادر به ایجاد بیماری‌هایی از قبیل سرویسیت، سالپنژیت و اندومتریت می‌باشد.[۱و ۵] ۸۰٪ زنان و ۵۰٪ مردان مبتلا، فاقد نشانه‌های بیماری هستند که می‌تواند موجب انتقال وسیع باکتری شود.[۱] تقریباً ۲۰-۱۰٪ نوزادان هنگام عبور از کانال زایمان در حین تولد به عفونت کلامیدیایی مادر آلوده می‌شوند که می‌تواند در آنها سبب بروز کونژکتیویت، پنومونی و عفونت حلق و روده شود.[۱] کلامیدیا تراکوماتیس عامل ۳۰-۲۰٪ پنومونی‌های ایجاد شده در نوزادان زیر ٦ ماه است.[٦] سرویسیت کلامیدیایی در ۳۰-۱۵٪ زنان مراجعه کننده به کلینیک‌های ژنیکولوژی گزارش شده است.[۱] انتقال بیماری از طریق مقاربت جنسی محافظت نشده صورت می‌گیرد. در مطالعات انجام شده، چسبیدن کلامیدیا تراکوماتیس به اسپرماتوزوای بدست آمده از حفره پریتوئن بیماران مبتلا، گزارش شده است. بنابراین اسپرماتوزوآ می‌تواند به عنوان ناقل(vector) در انتقال

کلامیدیا نقش داشته باشد.[۷] در ۸۰٪ موارد، احتمال انتقال کلامیدیا تراکوماتیس از مردان مبتلا به اورتریت به شرکاء جنسی آنها وجود دارد. در ٤٥-۳۵٪ زنان نیز همزمانی عفونت نایسریاگونوره‌آ با عفونت کلامیدیایی دیده شده است.[۱]

تشخیص آزمایشگاهی این باکتری از طریق روشهای زیر امکانپذیر است:

کشت سلولی: کلامیدیا در رده‌های سلولی Maccoy، Hela، BHK-21، HecB، Vero قادر به رشد است.

روشهای سرولوژیکی: میکروایمونوفلئورسانس، الیزا و تست تثبیت کمپلمان(Complement-fixation test=CFT)

روشهای تشخیص آنتی‌ژن: ایمونوفلئورسانس مستقیم (Direct immunofluorscence=DIF) و آنزیم ایمونواسی (Enzymeimmunoassay=EIA)

روشهای مولکولی: هیبریداسیون DNA و تکنیک‌های آمپلیفیکاسیون اسید نوکلئیک که خود شامل TMA (Transcription mediated amplification)، PCR (Polymerase chain reaction)، LCR (Ligase chain reaction) و SDA (Strand displacement amplification) است.

روشهای مستقیم سیتولوژی: رنگ‌آمیزی گیمسا، گیمنز و هماتوکسیلین نیز جهت تشخیص کلامیدیا بکار می‌روند.[۱و ۸-۱۰]

از آنجا که هر تست دارای محدودیت‌هایی در حساسیت (Sensitivity)، ویژگی(Specificity) و سرعت انجام آزمایش است؛ بنابراین ترکیبی از چند آزمایش توصیه می‌شود، زیرا در ٦۰-۳۰٪ بیماران، عامل بیماری شناسایی نمی‌گردد.[۱و ۱۱]

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۰ در پرتغال توسط Melles و همکارانش انجام شد، روشهای کشت سلولی، DIF(Direct immunofluorescent) و ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم(Indirect immunofluorescent) در تشخیص سرویسیت کلامیدیایی مورد بررسی قرار گرفتند.[۱۲]

در سال ۲۰۰۳ در دهلی‌نو، Makhija و همکاران، روشهای الیزا(ELISA) و ایمونوفلئورسانس مستقیم(DIF) را در تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس در بیماران مبتلا به PID (pelvic inflammatory disease) مورد مقایسه قرار دادند. در این مطالعه ۲۸٪ موارد توسط روش ELISA و ۳۲٪ موارد توسط روش DIF تعیین گردید.[۱۳]

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۲ توسط Servaas A. Morre و همکارانش انجام گردید، مقایسه‌ای بین روشهای EIA، PELISA، SeroT و MIF به عنوان روش استاندارد طلایی، در تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه‌های گرفته شده از اندوسرویکس، صورت گرفت.[۱٤]

در سال ۲۰۰۲، آقای Rani و همکارانش در بیمارستان Royal Bolton در UK، نقش کیت‌های راپید را در تشخیص عفونت‌های کلامیدیا تراکوماتیس مورد بررسی قرار دادند. آنها از روش PCR(Polymerase chain reaction) به عنوان استاندارد طلایی استفاده کردند. در این مطالعه میزان حساسیت(Sensitivity) و ویژگی(Specificity) تست تشخیص سریع، به ترتیب ٦۵٪ و ۱۰۰٪ گزارش گردید. از آنجا که ارزش پیشگویی این تست برای موارد مثبت، ۱۰۰٪ می‌باشد و حساسیت آن قابل مقایسه با سایر روشهای آزمایشگاهی که پایه ایمونواسی دارند، می‌باشد، نویسنده برای موارد این تست، آزمایش مقایسه‌ای دیگری را توصیه نمی‌کند.[۱۵]

در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۸٦ توسط Kazar در جمهوری چک انجام شد، روشهای مختلفی در شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس مورد بررسی قرار گرفتند؛ او از روشهای مستقیم شامل رنگ‌آمیزی گیمنزو گیمسا جهت مشاهده انکلوژن بادی‌ها و از روشهای میکروایمونوفلئورسانس به منظور تعیین سطح آنتی‌بادی IgG بیماران استفاده نمود. در این مطالعه او به میزان شیوع کلامیدیا و اهمیت برنامه‌های غربالگری اشاره کرد.[۱٦]

از آنجا که کلامیدیا، یکی از عوامل شایع سرویسیت می‌باشد و حضور آن در آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی کشورمان کمتر مورد توجه قرار می‌گیرد، هدف از این مطالعه، بررسی میزان شیوع و همچنین ارزیابی و مقایسه روشهای تشخیصی آن بوده است تا براساس آن،

مناسب‌ترین روش برای تشخیص این باکتری در آزمایشگاه‌های کشورمان پیشنهاد شود.

روش بررسی

این مطالعه که از نوع توصیفی است، از بهار سال ۱۳۸٤ تا بهار سال ۱۳۸۵ انجام شد. در این مطالعه، تعداد ۱۳۷ بیمار که براساس نظر پزشک معالج متخصص زنان و زایمان، تشخیص سرویسیت برای آنها مطرح شده بود، از نظر وجود کلامیدیا، مورد بررسی قرار گرفتند. در تمامی این افراد، پزشک متخصص براساس علایم بالینی، تشخیص سرویسیت را مطرح کرده بود؛ این علایم شامل اروزیون یا سرخی سرویکس، وجود ترشحات چرکی در سرویکس، شکایت بیمار از درد به هنگام نزدیکی و درد ناحیه زیر شکم بود. تمامی بیماران تحت معاینه لگنی قرار گرفتند. بیماران مورد بررسی بین محدوده سنی ۵۰-۱۷ سال قرار داشتند و همگی از نظر حاملگی، منفی بودند.

محل نمونه‌گیری، آزمایشگاه تشخیص طبی نیلو و درمانگاه ژنیکولوژی بیمارستان حضرت رسول اکرم(ص) بود. ابتدا با استفاده از اسپکولوم استریل و مشاهده سرویکس، ترشحات اضافی سرویکس قبل از نمونه‌گیری توسط سواب برداشته شد. سپس به وسیله سواب‌های استریل از جنس داکرون که دسته پلاستیکی داشتند، نمونه‌برداری از سطح و داخل اندوسرویکس با چرخاندن سواب داخل اندوسرویکس و برداشت سلول، انجام گردید. ترشحات برداشت شده، بر روی لام تمیز جهت رنگ‌آمیزی Gimenez منتقل گردید. با تکرار نمونه‌برداری، ترشحات اندوسرویکس جهت تشخیص آنتی‌ژن کلامیدیا توسط کیت تشخیص سریع آنتی‌ژن Dima(ساخت کارخانه Hersteller آلمان) به وسیله سواب برداشته شد. سواب آغشته به ترشحات اندوسرویکس بلافاصله در داخل محلول استخراج آنتی‌ژن A قرار داده شد. بعد از ۲ دقیقه، محلول استخراج کننده B، به لوله اضافه گردید. سواب، در محلول تکان داده شد تا نمونه گرفته شده، کاملاً با محلول‌های استخراج کننده، مخلوط شود. سپس سواب از لوله خارج گردید. درب لوله با فیلتر، بسته و ۳ قطره از محلول، معادل ۱۵۰ میلی‌لیتر، بر روی نوار اختصاصی ریخته شد. پس از سپری شدن ۱۵ دقیقه، تشکیل باند رنگی بررسی گردید. همواره یک باند رنگی که معرف باند کنترل است، تشکیل می‌شود که بیانگر صحت کیت مصرفی می‌باشد. هنگامی که نمونه از نظر کلامیدیا، مثبت باشد، علاوه بر باند کنترل، باند رنگی دیگری نیز تشکیل می‌شود. این روش یک آزمون ایمونواسی کیفی است که اساس آن ایمونوکروماتوگرافی می‌باشد.

از هر بیمار نیز خونگیری بعمل آمد و سرم آن پس از جداسازی، جهت جستجوی آنتی‌بادی ضد کلامیدیا با استفاده از روشهای الیزا و میکروایمونوفلئورسانس مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام رنگ‌آمیزی، رنگ گیمنز مطابق دستورالعمل ذکر شده در منابع، ساخته شد و لامهای تهیه شده رنگ‌آمیزی گردیدند.[۱۷]

برای تعیین آنتی‌بادی IgG با روش الیزا، از کیت Trinity استفاده شد. اساس کیت‌های مورد نظر بر مبنای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز است که آنتی‌بادی توسط آن نشاندار شده است. سطح پایینی میکروپلیت‌ها توسط آنتی‌ژن کلامیدیا(اختصاصی سروتیپ) پوشیده(Coat) شده است که در صورت وجود آنتی‌بادی اختصاصی، با اضافه نمودن سرم، کمپلکس آنتی‌بادی ـ آنتی‌ژن تشکیل می‌شود. پس از شستشوی مواد اضافی، آنتی‌بادی آنتی‌هیومن گونژوگه به آنزیم پراکسیداز اضافه می‌شود که به کمپلکس Ab-Ag متصل می‌شود. در مرحله بعدی، محلول کروموژن ـ سوبسترا به هر چاهک(Well) اضافه می‌شود. در نتیجه واکنش آنزیم پراکسیداز با محلول سوبسترا، ترکیب رنگی ایجاد می‌شود. افزودن اسید سولفوریک، باعث توقف واکنش آنزیم با سوبسترا و جلوگیری از افزایش شدت رنگ می‌شود. میزان رنگ ایجاد شده در طول موج ٤٥٠ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود که متناسب با میزان آنتی‌بادی اختصاصی در سرم است.

جهت تعیین آنتی‌بادی اختصاصی IgM کلامیدیایی با استفاده از روش الیزا نیز، از کیت الیزا ساخت کمپانی Viro-Immune استفاده شد.

سرمهای کنترل این کیت‌ها شامل سه نوع می‌باشد:

۱- کنترل منفی(Negative control) که از سرم انسانی یا پلاسمای دفیبرینه شده تهیه شده است و با آنتی‌ژن کلامیدیا واکنش نمی‌دهد.

۲- کنترل مثبت(Positive control) که از سرم انسانی یا پلاسمای دفیبرینه شده تهیه شده است و با آنتی‌ژن کلامیدیا واکنش نشان می‌دهد.

۳- Cut off که با آنتی‌ژن کلامیدیا واکنش نشان می‌دهد که در کیت Trinity به عنوان IgG و در کیت Viro-Immune به عنوان IgM کلامیدیایی است.

برای خواندن نتایج جذب نوری در طول موج ٤٥٠ نانومتر، سرمهای کنترل positive، Negative و cut off باید مورد توجه قرار گیرند. وجود یا عدم وجود IgG و IgMهای اختصاصی کلامیدیا، با مقایسه جذب نوری سرم مورد نظر با جذب نوری کنترل Cut off تعیین می‌شود. به این ترتیب که سرمهای با جذب نوری کمتر از کنترل cut off، به عنوان نمونه‌های غیر واکنش دهنده(Non reactive) و سرمهای با جذب نوری بیش‌تر از کنترل cut off، به عنوان نمونه‌های واکنش دهنده(Reactive) برای آنتی‌بادی‌های کلامیدیایی تلقی می‌شوند. نمونه‌هایی که دارای جذب نوری در محدوده (±۱۰٪) جذب نوری کنترل cut off هستند، مشکوک بوده و بایستی جهت تایید قطعی، مجدداً مورد آزمایش قرار گیرند. نمونه‌های Non reactive، از نظر IgG یا IgM کلامیدیایی، منفی و نمونه‌های Reactive، از نظر IgG یا IgM کلامیدیایی، مثبت در نظر گرفته می‌شوند.

لامهای میکروایمونوفلئورسانس مارک Ani Labsystem نیز، طبق دستورالعمل آماده گردیدند، بطوری که سرم بیمار بر روی هر یک از اسلایدها که قبلاً بر روی آنها آنتی‌ژن‌های(EB) هر سه گونه کلامیدیا(تراکوماتیس، پنومونیه و پسی‌تاسی) تثبیت شده بود، قرار داده شد و پس از طی مراحل انکوباسیون، افزودن کونژوگه و شستشو، لامها توسط میکروسکوپ ایمونوفلئورسانس مورد بررسی و مشاهده قرار گرفتند. اساس این تست(MIF)، برمبنای تشخیص غیرمستقیم آنتی‌بادی‌های IgG و IgM کلامیدیاتراکوماتیس است. هنگامی که در سرم بیمار آنتی‌بادی‌های ضد کلامیدیا تراکوماتیس وجود داشته باشد، با آنتی‌ژن‌های کلامیدیا تراکوماتیس ترکیب شده و به سطح شیشه‌ای اسلاید میکروسکوپی می‌چسبند و باقیمانده سرم بیمار توسط شستشو از بین می‌رود. هنگامی که کونژوگه فلئورسین اضافه می‌شود، به کمپلکس Ag-Ab متصل می‌شود که در زیر میکروسکوپ ایمونوفلئورسانس به صورت مناطق نورانی سبز رنگ مشاهده می‌شوند.

یافته‌ها

هدف از این مطالعه، بررسی مقایسه‌ای روشهای مختلف میکروایمونوفلئورسانس، الیزا، کیت تشخیص سریع Dima و رنگ‌آمیزی گیمنز در تشخیص سرویسیت کلامیدیایی بود که بر روی ۱۳۷ بیمار مراجعه کننده به کلینیک تخصصی ژنیکولوژی بیمارستان حضرت رسول اکرم(ص) و آزمایشگاه تشخیص طبی نیلو انجام گردید.

به منظور دسترسی به اهداف این مطالعه، داده‌ها و اطلاعات بدست آمده، به صورت جداول آماری و تصویر تهیه شده‌اند که به شرح زیر می‌باشند:

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار(SPSS(version 12 و انجام دادن آزمون‌های Mc Nemar صورت گرفت. در تحلیل نتایج، مقادیر P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

در این مطالعه آنتی‌بادی IgM با روش MIF، در ۲/۲٪ و با روش الیزا، در ۲/۹٪ افراد مثبت شده است که از نظر آماری، معنی‌دار نمی‌باشد(P<۱/۰۰۰)(جدول شماره ۱).

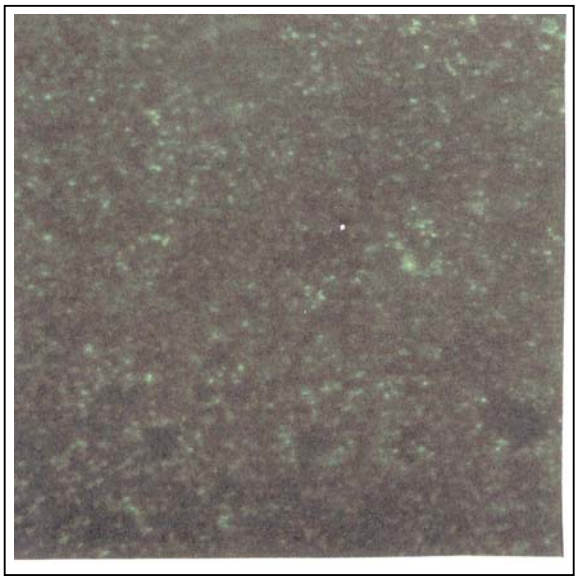
جدول شماره ۱- توزیع فراوانی نسبی و مطلق آنتی‌بادی IgM سرمی علیه کلامیدیا تراکوماتیس با روشهای الیزا و MIF

نتیجه تست	+		-		جمع	
نوع آزمایش	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
MIF	۳	۲/۲	۱۳٤	۹۷/۸	۱۳۷	٪۱۰۰
ELISA	٤	۲/۹	۱۳۳	۹۷/۱	۱۳۷	٪۱۰۰

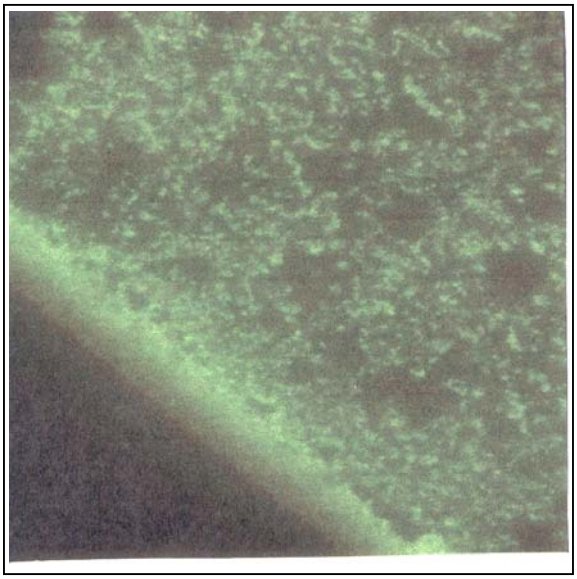
با روش MIF، آنتی‌بادی IgG در ۷/۲٪ و با روش الیزا، در

۱۳/۱٪ افراد مثبت گردیده است. تفاوت نتیجه بدست آمده از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد(P<۰/۰۳۹)(جدول شماره ۲).

در روش میکروایمونوفلئورسانس، با استفاده از میکروسکوپ ایمونوفلئورسانس، موارد مثبت آنتی‌بادی کلامیدیا تراکوماتیس به صورت نقاط سبز رنگ فلئورسانس شدند(شکل شماره ۱و ۲).



الف



ب

شکل شماره ۱- آنتی‌بادی IgG مثبت کلامیدیا تراکوماتیس در زنان مبتلا به سرویسیت با روش MIF(بزرگنمایی ٤٠×)

جدول شماره ۲- توزیع فراوانی نسبی و مطلق آنتی‌بادی IgG سرمی علیه کلامیدیا تراکوماتیس با روشهای الیزا و MIF

نتیجه تست	+		-		جمع	
نوع آزمایش	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
MIF	۱۰	۷/۲	۱۲۷	۹۲/۷	۱۳۷	٪۱۰۰
ELISA	۱۸	۱۳/۱	۱۱۷	۸۵/٤	۱۳۷	٪۱۰۰

شکل شماره ۲- آنتی‌بادی IgM مثبت کلامیدیا تراکوماتیس در زنان مبتلا به سرویسیت با روش MIF (بزرگنمایی ٤٠×)

آنتی‌بادی IgG با انجام روش الیزا، در ۱۳/۱٪ افراد مثبت گردیده است، از طرفی با انجام روش MIF، در ٦/٦٪ موارد (۹ بیمار) آنتی‌بادی IgG بر علیه کلامیدیا پنومونیه مثبت گردید. این دو روش در ٥/۱٪ موارد اشتراک داشتند.

با استفاده از کیت تشخیص سریع آنتی‌ژن Dima، در ۳/٦٪ بیماران آنتی‌ژن کلامیدیا تراکوماتیس شناسایی گردید، در حالی که با روش MIF، آنتی‌بادی IgM در ۲/۲٪ بیماران مثبت گردید. بین نتایج فوق از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود ندارد(P<۰/٦۲٥)(جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳- توزیع فراوانی نسبی و مطلق آنتی‌بادی IgM سرمی علیه کلامیدیا تراکوماتیس با روش MIF و موارد مثبت با کیت تشخیص سریع آنتی‌ژن Dima

نتیجه تست	+		-		جمع	
نوع آزمایش	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
MIF	۳	۲/۲	۱۳٤	۹۷/۸	۱۳۷	٪۱۰۰
Dima TEST	٥	۳/٦	۱۳۱	۹٥/٦	۱۳۷	٪۱۰۰

در هیچ یک از لامهای رنگ‌آمیزی شده به روش گیمنز، انکلوژن بادی مشاهده نشد.

بیش‌ترین موارد ابتلا به کلامیدیا در سنین ۲۸ سال دیده شد(Std.Deviation=۷/۰٦) که با گروه سنی زنانی که سرویسیت غیر کلامیدیایی داشتند، اختلاف معنی‌داری نداشت(P<۰/۲۱۹)(جدول شماره ٤).

جدول شماره ۴- توزیع فراوانی مطلق و نسبی زنان مورد مطالعه برحسب سن

سن بیمار	مورد	
	تعداد	درصد
<۲۰	۲	٪۱/٥٤
۲٤-۲۰	۲۲	٪۱٦/۰٥
۲۹-۲٥	٥۲	٪۳۷/۹٥
۳٤-۳۰	۲۷	٪۱۹/۷
۳۹-۳٥	۱٦	٪۱۱/٦۷
>٤۰	۱۸	٪۱۳/۱۳
جمع	۱۳۷	٪۱۰۰
میانگین	۲۸/۱٦	
انحراف معیار	۷/۰٦	

بحث

التهاب غشای مخاطی گردن رحم، تحت عنوان سرویسیت شناخته شده است. سرویسیت توسط عوامل عفونی متعددی چون کلامیدیا تراکوماتیس، هرپس تناسلی، نایسریا گونوره‌آ، مایکوپلاسما ژنیتالیوم، مایکوپلاسما اوره‌آ لیتیکوم و استرپتوکوکسی‌ها ایجاد می‌شود.[٥]

ترشحات زرد یا سبز رنگ، خونریزی بویژه بعد از نزدیکی، لکه بینی(spotting) و افزایش تعداد سلولهای پلی‌مورفونوکلئار(PMNs)، از جمله علایم بیماری سرویسیت چرکی ـ حاد(mucopurulent cervicitis) هستند. تشخیص بالینی به وسیله معاینه گردن رحم توسط اسپکولوم صورت می‌گیرد. وجود سرویکس متورم چرکی و همراه با اروزیون (سرخی)، مؤید سرویسیت می‌باشد.

سرویسیت بیماری شایعی می‌باشد که تقریباً نیمی از زنان در طول زندگیشان آن را تجربه می‌کنند. عوامل مستعد کننده ابتلا به بیماری، شامل مقاربت جنسی در سنین کم، رفتارهای پرخطر جنسی، شرکای جنسی متعدد و سابقه ابتلا به بیماری‌های منتقله از طریق جنسی است. سرویسیت کلامیدیایی در اغلب موارد فاقد علامت می‌باشد. موارد درمان نشده سرویسیت کلامیدیایی می‌تواند منجر به عفونت مزمن سرویکس شود؛ ارگانیسم از طریق حفره اندومتر به لوله‌های فالوپ و تخمدان‌ها، راه یافته و سبب بیماری التهابی لگن (PID)، سالپنژیت، آبسه‌های تخمدانی و در نهایت حاملگی خارج رحمی(Ecotopic pregnancy) و نازایی به دلیل انسداد لوله‌های فالوپ می‌گردد. در واقع کلامیدیا تراکوماتیس، مهم‌ترین عامل نازایی اکتسابی می‌باشد.[۱و ٥]

در سال ۱۹۹۷، Chaisi Wattana، میزان شیوع کلامیدیا تراکوماتیس را با بکارگیری روش هیبریداسیون DNA در زنان حامله که از نظر HIV، منفی بودند، ۹/۱٪ و در زنان حامله که از نظر HIV مثبت بودند، ۱٦/۲٪ گزارش کرد.[۱۸]

Bustein در سال ۱۹۹۸، میزان شیوع کلامیدیا تراکوماتیس را در زنان، ۱٦/٤٪ و در مردان، ۲/۱٪ تعیین نمود.[۱۹]

شیوع عفونت کلامیدیا تراکوماتیس در زنان ارتش امریکا و با استفاده از روش LCR، ۱۲/۲-۹/۲٪ تعیین گردید که زنان ۱۷ سال به بالا، بیش‌ترین میزان عفونت را داشتند.[۲۰]

در مطالعه‌ای که توسط دکتر بادامی در سال ۱۳۸۲ صورت گرفت، میزان شیوع سرویسیت کلامیدیایی در زنان مراجعه کننده به درمانگاه ژنیکولوژی بیمارستان شهید

اکبرآبادی با استفاده از روش ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم، ۱۴٪ گزارش گردید.[۲۱] همچنین در مطالعه دیگری که توسط دکتر کجباف در اهواز انجام گرفت، با بکارگیری روشهای رنگ‌آمیزی گیمسا و ایمونوفلئورسانس مستقیم، میزان شیوع، ۱۱/۷٪ گزارش گردید.[۲۲] در بررسی حاضر میزان شیوع سرویسیت کلامیدیایی براساس روش میکروایمونوفلئورسانس، ۷/۲٪ تعیین گردید.

روش میکروایمونوفلئورسانس در بین سایر روشهای سرولوژی به عنوان استاندارد طلایی(Gold standard) در تشخیص کلامیدیا شناخته شده است. در بررسی اخیر در تعیین IgM با روش میکروایمونوفلئورسانس و مقایسه آن با کیت تشخیص سریع Dima، اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید(P<۰/۶۲۵).

همچنین با مقایسه آنتی‌بادی IgM کیت الیزا و آنتی‌بادی IgM میکروایمونوفلئورسانس نیز، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد(P<۱/۰۰۰)، اما نتایج تعیین آنتی‌بادی IgG با روش الیزا و میکروایمونوفلئورسانس، حاکی از اختلاف معنی‌دار می‌باشد(P<۰/۰۳۹). براساس نتایج، این دو روش تنها در ۱۰ مورد با یکدیگر همخوانی داشتند. از آنجایی که روش MIF قادر به شناسایی آنتی‌بادی‌های دو گونه کلامیدیا پنومونیه و کلامیدیا پسی‌تاسی نیز می‌باشد، از این رو درک اختلاف بین دو روش، امکانپذیر می‌گردد. آنتی‌ژن بکار رفته در طراحی کیت الیزا، لیپوپلی‌ساکارید باکتری می‌باشد که به علت اشتراک آنتی‌ژن با سایر گونه‌های کلامیدیا از جمله کلامیدیا پنومونیه، می‌تواند موجب واکنش متقاطع شود. تمام مواردی که در آنها آنتی‌بادی IgG کلامیدیاتراکوماتیس با بکارگیری روش الیزا، مثبت شده بود، اما در روش MIF، منفی گزارش گردیده بود، در حقیقت مثبت کاذب می‌باشند، زیرا آنتی‌بادی IgG بر علیه کلامیدیا پنومونیهٔ همان نمونه‌ها، با روش MIF مثبت گردید؛ در واقع بیمار، فاقد آنتی‌بادی IgG بر علیه کلامیدیاتراکوماتیس بوده است.

حساسیت(Sensitivity) و ویژگی(Specificity) برای روشهای الیزا، به ترتیب ۵۵/۵٪ و ۹۴/۰۷٪ و برای تشخیص سریع Dima، ۶۶/۶٪ و ۹۹/۲٪ بدست آمد. با استفاده از کیت Dima که منجر به تشخیص سریع می‌گردد، ۵ مورد مثبت شده بود که می‌تواند اهمیت نمونه‌برداری صحیح از اندوسرویکس و مرحله بیماری را خاطر نشان سازد، زیرا این کیت در مرحله حاد بیماری که ارگانیسم به تعداد کافی موجود می‌باشد، نتایج قابل قبولی خواهد داشت؛ بنابراین نتایج منفی آن، عفونت کلامیدیایی را منتفی نمی‌سازد، در حالی که نتایج مثبت بدست آمده با این روش، دارای ارزش تشخیصی می‌باشند(Specificity=٪۹۹/۲). از مزایای این روش، قیمت مناسب و سهولت انجام آن است، ولی نیاز به افراد با تجربه در نمونه‌برداری از سرویکس را می‌توان از معایب این روش نام برد. بنابراین استفاده از کیتهای تشخیص سریع در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و همینطور در درمانگاه‌های ژنیکولوژی کشورمان می‌تواند در شناسایی سریع کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه‌های سرویکس بیماران سودمند باشد.

با توجه به نتایج متفاوت الیزا و میکروایمونوفلئورسانس، پیشنهاد می‌شود در مواردی که تست الیزا مثبت است، نتایج آن با روش میکروایمونوفلئورسانس تأیید گردد.

از آنجایی که وجود IgM، نمایانگر مرحله حاد بیماری می‌باشد، تعیین وجود آن، در درمان و جلوگیری از انتشار بیماری حائز اهمیت می‌باشد.

با توجه به عدم تفاوت در نتایج تعیین آنتی‌بادی IgM با دو روش الیزا و میکروایمونوفلئورسانس و در نظر داشتن آنکه روش MIF، روشی نسبتاً گران و نیازمند امکانات (میکروسکوپ ایمونوفلئورسانس و کارشناس متبحر) است، می‌توان از روش الیزا در تعیین آنتی‌بادی IgM استفاده نمود.

با توجه به عدم مشاهده انکلوژن‌های کلامیدیا در لامهایی که رنگ‌آمیزی گیمنز شده بودند، این رنگ‌آمیزی جهت تشخیص بیماری سرویسیت پیشنهاد نمی‌شود. در واقع رنگ‌آمیزی گیمنز در موارد تراخم ایجاد شده به وسیله کلامیدیا تراکوماتیس کاربرد بیش‌تری دارد.

میانگین سنی زنانی که مبتلا به سرویسیت کلامیدیایی بودند، ۲۸/۱۶ سال بود که دال بر آن است که این باکتری در زنان جوان و فعال از نظر جنسی شیوع بیش‌تری دارد.

در مواردی که میزان شیوع کلامیدیا تراکوماتیس بالاتر از ٦-٤٪ باشد، برنامه‌های غربالگری(screening) باید اجرا شوند، زیرا هزینه‌های مورد نیاز جهت غربالگری، به مراتب کمتر از هزینه‌های مورد نیاز جهت درمان پیامدهای ناشی از این باکتری است.[٢٣] با توجه به میزان شیوع سرویسیت ناشی از این باکتری(٧/٢٪) در مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد انجام برنامه‌های اجرایی در جهت تشخیص و درمان بیماران مبتلا به عفونت کلامیدیایی ضرورت داشته باشد. همچنین آموزش زنان جوان و فعال از نظر جنسی برای مراجعه به درمانگاه‌های ژنیکولوژی جهت انجام معاینات دوره‌ای لگنی حائز اهمیت به نظر می‌رسد.

از جمله محدودیت‌های این مطالعه، مشکلات نمونه‌برداری، عدم همکاری بیمار و پزشک، محدود بودن بررسی به موارد سرویسیت، در دسترس نبودن کیت میکروایمونوفلئورسانس و سفارش آن از خارج از کشور و هزینه بالای آن و همچنین در دسترس نبودن کیت تشخیص آنتی‌ژن سریع Dima و سفارش آن از خارج از کشور بود.

نتیجه‌گیری

نتایج بررسی آنتی‌بادی IgG بر علیه کلامیدیا تراکوماتیس با روش الیزا حتی با حساس‌ترین کیت‌های موجود در کشورمان که در آنها از آنتی‌ژن‌های لیپوپلی‌ساکاریدی استفاده شده، نمی‌تواند نشان دهنده عفونت قطعی با کلامیدیا تراکوماتیس باشد، زیرا واکنش متقاطع با سایر گونه‌های کلامیدیا از جمله کلامیدیا پنومونیه و کلامیدیا پسی‌تاسی نیز ممکن است مشاهده گردد. از این رو فقط در مواردی که آنتی‌بادی IgG با استفاده از کیت‌های الیزا که در آنها آنتی‌ژن‌های پروتئینی MOMP بکار گرفته شده، تعیین گردیده باشد، می‌توان به نتایج بدست آمده اطمینان نمود.

در این بررسی، روش MIF استاندارد طلایی محسوب می‌گردد که علی‌رغم حساسیت و ویژگی بالای آن، به دلیل هزینه بالا و نیاز به مهارت و تجربه کافی در مشاهده لامهای میکروسکوپی، معمولاً در مرکز تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

کیت‌های تشخیص سریع آنتی‌ژن با مارک Dima هر چند که در زمان کوتاهی آنتی‌ژن را در نمونه کلینیکی تشخیص می‌دهند، ولی به دلیل ماهیت مزمن بیماری، فقط در موارد حاد بیماری و انجام نمونه‌گیری مناسب، نتایج خوبی ارایه خواهند داد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات بی‌دریغ آقای دکتر سارنگ یونسی مسؤول فنی آزمایشگاه تشخیص طبی نیلو(به علت همکاری در مراحل پژوهش)، آقای محسن قلمان(به علت همکاری در تهیه و مشاهده لامهای ایمونوفلئورسانس)، خانم مریم طارم‌چی(به علت همکاری در نمونه‌گیری) و خانم محمودی تقدیر و تشکر می‌گردد.

فهرست منابع

1- Ward ME, Ridgway G. Chlamydia. In: Collier L, Balows B, Sussman A. Microbiology and microbial infection. 9th ed. London: Arnold Press; 1998. p. 1331-44.

2- Zeline JM, Robinson AJ, Ridgway GL, Allason-Jones E, Williams P. Chlamydial urethritis in heterosexual men attending a genitourinary medicine clinic: prevalence, symptoms, condom usage and partner change. Int J STD 1995; 6(1): 27-30.

3- La Montagne DS, Fine DN, Marrazzo JM. Chlamydia trachomatis infection in asymptomatic men. Am J Prev Med 2003; 24(1): 36-42.

4- Ciemin L, Flood J, Charlotte K, Shaw RN, Rowniak S, Monkada J, et al. Reexamining the prevalence of chlamydia trachomatis infection among gay men with uretritis: implication for STD policiy and HIV prevention activities. J STD 2000; 27(5): 249-51.

5- Sobel J. Vaginitis, Vulvitis and cervicitis. In: Armstrong D, Gohen J. Infection disease. London: Mosby Press; 2000. p. 52.1-52.8.

6- Smith JR, Taylor Robinson D. Infection due to chlamydia trachomatis in pregnancy and the newborn. Baillieres Clin Obstet Gynecol 1993; 7(1): 237-55.

7- Sherman JK, Jordan GW. Cryosurvival of chlamydia trachomatis during crypreservation of human spermatozoa. Fertill Steril 1985; 43: 664-6.

8- Schachter J, Stamm WE, Chlamydia. In: Muray P, Baron E, Pfller M, Tenover F, Yolken R. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington DC: ASM press; 1999. p. 795-806.

9- Mondat PE, Jonson AP, Thomas BJ, Robinson T. A comparison of the sensitivity of immunofluorescence and Gimesa staining chlamydia trachomatis inclusions in cycloheximide-treated MyCoy cells. J Clin Pathol 1980; 33: 177-9.

10- Mahmutovic S, Beslagic E, Hamzic S, Aljicevic M. Demonstration of different endocervical staining methods and their usefulness in the diagnosis of the chlamydial infection in exfoliated cells advantages and disadvantages. Bosn J Basic Med Sci 2004; 4(1): 41-5.

11- Schachter L, Ridgway G, Collier L. Chlamydial disease. In: Collier L, Balows B, Sussman A. Microbiology and microbial infection. 9th ed. London: Arnold Press; 1998. p. 977-92.

12- Melles HH, Colombo S, Linhares IM, Siquira LF. Evaluation of parameters for laboratory diagnosis of genital female infection by chlamydia trachomatis. Rev Soc Bras Med Trop 2000; 33(4): 355-61.

13- Makhija M, Malhorta V, Puri M, Jain M, Lakshmi A, Dhali TK, et al. Comparison of direct immunofluorescence and ELISA for detection of chlamydia trachomatis antigen in the patients of pelvic inflammatory disease. J Common Dis 2003; 35(1): 32-5.

14- Morre S, Munk CH, Persson K, Meijer CH, Van den Brule A. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G(IgG) and IgA assay to microimmunofluorescence assay for detection of chlamydia trachomatis antibodies. J Clin Microbiol 2002; 40(2): 584-7.

15- Rani R, Corbitt G, Killough R, Curless E. Is there any role for rapid tests for chlamydia trachomatis? Int J STD AIDS 2002; 13(1): 22-4.

16- Kazar J, Stencl J, Loksa V, Tacovsky L, Kovacova E. Evidence of chlamydia trachomatis infection in gynecological patients. Czech Med 1986; 9(2): 70-7.

17- Baron EJ, Finegold SM. Diagnostic microbiology baily & scotts. 8 th ed. St Louis: Mosbypress; 1990. p. A39-40.

18- Chisilwattana P, Chuachoowong R, Siriwasin W, Bhadrakom CH, Mangclavirag Y, Young N, et al. Chlamydial and gonococcal cervicitis in HIV-Seropositive and HIV-Seronegative pregnant women in bangkok: prevalence, risk factors, and relation to perinatal HIV transmission. J STD 1997; 24(9): 495-502.

19- Burstein G, Waterfield G, Joffe A, Znilmnp J, Quinn T, Gaydos CH. Screening for gonorrhea and chlamydia by DNA amplification in adolescents attending middle school health centers: opportunity for early intervention. J STD 1998; 25(8): 395-402.

20- Charlotte A Gaydos, M Rene Howell, Pare B, Kathryn L Clark, Dorothy A Ellis, Rose Marie Hendrix, et al. Chlamydia trachomatis infections in female military recruits. N Eng J Med 1998; 339(11): 739-44.

21- Badami N, Amin Harati F, Saghafi F. Study on incidence of chlamydia cervicitis by indirect immunofluorecens method. Abstract book of 6 th Iranian congress of microbiology. 1st ed. Tehran, Iran: Institute of special disease; 2004. P. 32.

22- Kajbaf MJ, Akbarian MR. Frequency of chlamydia trachomais in cervicitis and urethritis. Abstract book of 6 th Iranian congress of microbiology. 1st ed. Tehran, Iran: Institute of special disease; 2004. P. 46.

23- Marrazzo M, Celum L, Conniel L, Hillis D, Susan D, Delisle S, et al. Performance and Cost-Effectiveness of selective screening criteria for chlamydia trachomatis infection in women: Implications for a National Chlamydia Control Strategy. J STD 1997; 24(3): 131-41.

Comparison of Microimmunofluorescence, ELISA, Rapid Detection Kit(DIMA) and Gimenez Staining for Detection of Chlamydial Induced Cervicitis

N. Amirmozafari, PhD [I] ***H. Forohesh, MSc*** [II] ****L. Ganji, MSc*** [III]

Abstract

Background & Aim: Chlamydia trachomatis is one of the most prevalent causative agents of sexually transmitted diseases. It causes a variety of genital tract complications such as urethritis, cervicitis, endometritis, epididymitis and lymphogranuloma venereum. The prevalence rate of chlamydia induced cervicitis varies in different societies. In a recent study, the prevalnce of chlamydia cervicitis in sexually active American women was in the range of 5-15% and in pregnant women was 1.2%. The purpose of this study was to evaluate the prevalence of different detection techniques, such as ELISA, MIF, DIMA rapid test and direct microscopy after Gimenez staining.

Patients and Methods: A total 137 women with cervicitis(diagnosed according to stablished gynecological protocols) who referred to Rasool Akram hospital and Nilo private clincial laboratory were admitted for this study. Two endocervical swabs were obtained. One of them was used for the rapid Dima test and the other swab was subjected to Gimenez staining. Blood samples were also obtained for serological tests.

Results: ELISA tests indicated that 18 patients had positive IgG antibody levels in their blood and 4 of them had IgM antibodies against Chlamydia trachomatis. Ten patients had significant IgG levels and 3 of them had anti-Chlamydia IgM according to the MIF test results. Dima rapid detection test was able to show positive results for only 5 patients. We were not able to detect any Chlamydia inclusion bodies with direct microscopy after Gimenez staining.

Conclusion: According to the results obtained with MIF technique which is generally considered to be the "Gold standard" serological detection method, the prevalence of chlamydia induced cervicitis was shown to be 7.2%. There was no statistically significant difference in IgM titers detected by ELISA and MIF methods. But there was statistically different IgG titer rates between ELISA and MIF techniques. Therefore, it is suggested that any ELISA positive IgG titer samples to be rechecked and reconfirmed by MIF method. Due to the lack of chlamydia inclusion body detection by direct microscopy, Gimenez staining is not recommended as a diagnostic tool.

Key Words: 1) Chlamydia Trachomatis 2) Microimmunofluorescence 3) ELISA 4) Cervicitis

I) *Associate Professor, Microbiology group, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.*
II) *MPH, Instructor of Microbiology group, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.*
III) *MSc Microbiology, Medical College, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*