

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

چکیده

زمینه و هدف: کلامیدیا تراکوماتیس، یکی از متدائل‌ترین باکتری‌های منتقل شونده از طریق جنسی است. این باکتری، عفونت‌های متعددی چون اورتیت، سرویسیت، اندومنتیت، اپیدیدیمیت و لندوگرانولوم آمیزشی را در دستگاه تناسلی - 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 زنان امریکایی که از نظر جنسی فعال هستند، ۵-۱۵٪ 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 رنگ آمیزی Giemenz، در تشخیص کلامیدیا بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی، ۱۷ خانم مبتلا به سرویسیت (بنا بر تشخیص پزشک متخصص زنان و زایمان) مراجعه کننده به درمانگاه ژئنیکولوژی بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) و آزمایشگاه تشخیص طبی نیلو، مورد بررسی قرار گرفتند. به وسیله دو سواب، از اندوسرویکس بیماران نمونه برداری شد. یک سواب، جهت انجام تست تشخیص سریع با استفاده از کیت و سواب دیگر، جهت رنگ آمیزی 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 ۴ 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 ۵ بیمار مثبت شد. در هیچ یک از لامهای رنگ آمیزی شده به روش گیمنز، انکلوژن بادی کلامیدیایی دیده نشد.

نتیجه‌گیری: براساس روش میکروایمونوفلئورسانس که در بین روش‌های سروولوژی، 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 رنگ آمیزی گیمنز در تشخیص سرویسیت کلامیدیایی توصیه نمی‌شود.

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

تاریخ دریافت: ۸۵/۴/۱۸، تاریخ پذیرش: ۸۵/۸/۶

مقدمه

کلامیدیا، کوچکترین پارازیت اجباری داخل سلولی شناخته شده‌ای است که قادر به عبور از فیلترهای باکتریایی

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

است از KDO (Keto-deoxy-octulonate) و Lipid A (Keto-deoxy-octulonate) تشکیل شده و قادر 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) در EB و RB یافت شده، توسط ژن MOMP کد می‌شود. سروتاپینگ باکتری براساس Aomp صورت می‌گیرد.^(۱) کلامیدیاتراکوماتیس دارای ۱۹ سروتیپ A-K می‌باشد^(۲). A-K، B، C، Ba، D، Da، E، F، G، H، I، J، L، L2، L2a، L3، L1، K عامل ایجاد کننده تراخم هستند. سروتیپ‌های L3، L2a و L1، عامل ایجاد Lymphogranuloma =LGV ایجاد لنفوگرانولوما و نروم (venereum) می‌باشند که یک بیماری تهاجمی غدد لنفاوی بوده و در مردان همجنث باز به میزان بیشتری مشاهده می‌شود. سروتیپ‌های K و D، عامل اصلی بیماری‌های منتقل شونده از طریق جنسی می‌باشند. این باکتری عامل تقریباً ۲۴٪ از اورتیت‌های غیرگونوکوکی در مردان می‌باشد.^(۳) اپیدیدیمیت و پروستاتیت، از دیگر بیماری‌هایی می‌باشند که این باکتری در ایجاد آنها در مردان نقش دارد.^(۴) کلامیدیاتراکوماتیس در زنان، قادر به ایجاد بیماری‌هایی از قبیل سرویسیت، سالپیت و اندومتریت می‌باشد.^(۵) ۵۰٪ مردان مبتلا، قادر نشانه‌های بیماری هستند که می‌تواند موجب انتقال وسیع باکتری شود.^(۶) 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.^(۷) کلامیدیاتراکوماتیس عامل ۳۰-۲۰٪ پنومونی‌های ایجاد شده در نوزادان زیر ۶ ماه است.^(۸) سرویسیت کلامیدیایی در ۳-۱۵٪ زنان مراجعه کننده به کلینیک‌های ژنیکولوزی گزارش شده است.^(۹) انتقال بیماری از طریق مقاربت جنسی محافظت نشده صورت می‌گیرد. در مطالعات انجام شده، چهارین کلامیدیاتراکوماتیس به اسپرماتوزوا ابد است آمده از حفره پریتوئن بیماران مبتلا گزارش شده است. بنابراین اسپرماتوزوا می‌تواند به عنوان ناقل (vector) در انتقال

استفاده از کشت سلولی و میکروسکوپ الکترونی شناسایی گردید. کلامیدیا، مکانیسم‌های تولید انرژی متابولیکی (سیکل Adenosine triphosphate) را ندارد، بنابراین قادر به تولید ATP می‌باشد. این ویژگی سبب گردید که کلامیدیا به عنوان انگل اجباری درون سلولی محسوب گردد. از نظر طبقه‌بندی، کلامیدیا در راسته کلامیدیاله و خانواده کلامیدیا سه 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 (reticulate body) و RB (elementary body) دیده می‌شود. فرم EB، به قطر ۶-۲۰ میکرومتر و از نظر متابولیکی، غیرفعال می‌باشد. عفونت کلامیدیایی با اتصال EB به سطح سلول میزان آغاز می‌شود. گیرنده‌های سلول میزان بخوبی شناخته نشده‌اند اما گلیکوز‌آمینوکلیکان‌ها 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 میزان به فرم RB تبدیل می‌شود که قطری معادل ۱-۱/۵ میکرومتر دارد. RB از نظر متابولیکی فعال بوده و با تکثیر از طریق تقسیم دوتایی، تولید مثل 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

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.^(۱۲)

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۲ توسط Servaas A. Morre و همکارانش انجام گردید، مقایسه‌ای بین روش‌های MIF، SeroT، PELISA، EIA طلایی، در تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه‌های گرفته شده از اندوسروپیکس، صورت گرفت.^(۱۴)

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 Polymerase chain reaction (PCR) به عنوان استاندارد طلایی استفاده کردند. در این مطالعه میزان حساسیت (Sensitivity) و ویژگی (Specificity) تست تشخیص سریع، به ترتیب ۶۵٪ 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 ۱۹۸۶ 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.^(۱۶)

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،

کلامیدیا نقش داشته باشد.^(۷) در ۸۰٪ موارد، احتمال انتقال کلامیدیا تراکوماتیس از مردان مبتلا به اورتیت به شرکاء جنسی آنها وجود دارد. در ۴۵-۴۵٪ زنان نیز همزمانی عفونت نایسیریاکونورهآ با عفونت کلامیدیایی دیده شده است.^(۱)

تشخیص آزمایشگاهی این باکتری از طریق روش‌های زیر امکان‌پذیر است:

کشت سلولی: کلامیدیا در رده‌های سلولی Maccoy، Vero، HecB، BHK-21، Hela قادر به رشد است. روش‌های سرولوژیکی: میکروایمونوفلئورسانس، الیزا و (Complement-fixation test=CFT) تست تثیت کمپلمان (Direct immunofluorescence=DIF) و آنزیم ایمونواسی (Enzymeimmunoassay=EIA)

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

است.

روش‌های مستقیم سیتولوژی: رنگ‌آمیزی گیمسا، گیمنزو و هماتوکسیلین نیز جهت تشخیص کلامیدیا بکار می‌روند.^(۱۰-۱۱)

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 ۶۰-۳۰٪ بیماران، عامل بیماری شناسایی نمی‌گردد.^(۱۱)

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

در سال ۲۰۰۳ در دهلی نو، Makhija و همکاران، روش‌های الیزا (ELISA) و ایمونوفلئورسانس مستقیم (DIF) را در

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 - آنتی‌ژن تشکیل می‌شود. پس از شستشوی مواد اضافی، آنتی‌بادی آنتی‌هیومون گونزگه به آنزیم پراکسیداز اضافه می‌شود که به کمپلکس Ab-Ag متصل می‌شود. در مرحله بعدی، محلول کروموزن - 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 ۴۵۰ 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.

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

روش بررسی

این مطالعه که از نوع توصیفی است، از بهار سال ۱۳۸۴ 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 سرویسک، وجود ترشحات چرکی در سرویسک، 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 ۱۷-۵۰ 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 اسپیکولوم استریل و مشاهده سرویسک، ترشحات اضافی سرویسک قبل از نمونه‌گیری توسط سواب برداشته شد. سپس به وسیله سواب‌های استریل از جنس داکرون که دسته پلاستیکی داشتند، نمونه‌برداری از سطح و داخل اندوسرویسک با چرخاندن سواب داخل اندوسرویسک و برداشت سلول، انجام گردید. ترشحات برداشت شده، بر روی لام تمیز جهت رنگ‌آمیزی Gimenez منتقل گردید. با تکرار نمونه‌برداری، ترشحات اندوسرویسک جهت تشخیص آنتی‌ژن کلامیدیا توسط کیت تشخیص سریع آنتی‌ژن Dima (ساخت کارخانه Hersteller آلمان) به وسیله سواب برداشته شد. سواب آغشته به ترشحات اندوسرویسک 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

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 ژنیکولوزی 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 $P < 0.05$ 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 ($P < 0.001$). (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
	-	+							
%۱۰۰	۱۳۷	۹۷/۸	۱۳۴	۲/۲	MIF	۳			
%۱۰۰	۱۳۷	۹۷/۱	۱۳۳	۲/۹	ELISA	۴			

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

سرمهای کنترل این کیت‌ها شامل سه نوع می‌باشد:

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

۲- کنترل مثبت(Positive control) که از سرم انسانی یا پلاسمای دفیرینه 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 ۴۵۰ نانومتر، سرمهای کنترل positive cut off و Negative باشد. توجه قرار گیرند. وجود یا عدم وجود IgM و IgG ایمونوهای 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 تعیین می‌شوند. نمونه‌هایی که دارای جذب نوری در محدوده (±۱۰٪) جذب نوری کنترل cut off هستند، مشکوک بوده و با پایستی تأیید 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 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) ثبت 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

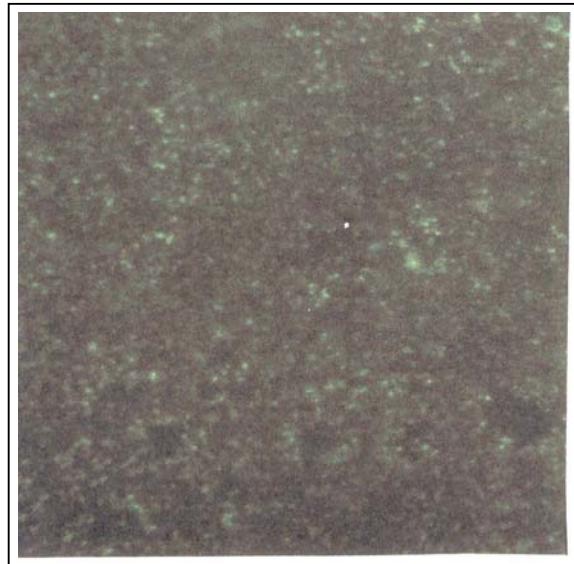
جدول شماره ۲ - توزیع فراوانی نسبی و مطلق آنتی‌بادی IgG سرمهی علیه کلامیدیا تراکوماتیس با روش‌های الیزا و MIF

نوع آزمایش	تعداد	درصد	تعداد		درصد	تعداد	درصد	نوع آزمایش	تعداد	درصد	تعداد	درصد	نوع آزمایش	تعداد	درصد	
			-	+												
MIF	۱۰	۱۰۰	۷/۲	۱۲۷	۹۲/۷	۱۳۷	۱۳۷	%۱۰۰	ELISA	۱۸	۱۲/۱	۱۱۷	۸۵/۴	۱۳۷	۱۳۷	%۱۰۰

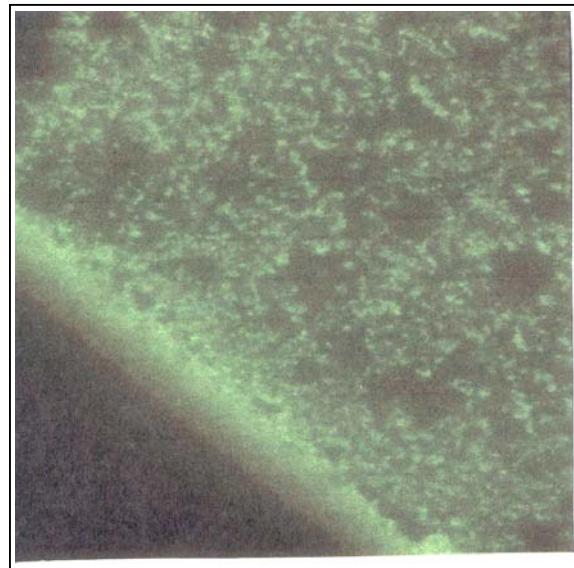
۱۲/۱٪ افراد مثبت گردیده است. تفاوت نتیجه بدست آمده از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد($P<0.039$)(جدول شماره ۲). در روش میکروایمونوفلئورسانس، با استفاده از میکروسکوپ ایمونوفلئورسانس، موارد مثبت آنتی‌بادی کلامیدیا تراکوماتیس به صورت نقاط سبز رنگ فلئورسانس شدند(شکل شماره ۱ و ۲).



شکل شماره ۲ - آنتی‌بادی IgM مثبت کلامیدیا تراکوماتیس در زنان مبتلا به سرویسیت با روش MIF (بزرگنمایی $\times 40$)



الف



ب

شکل شماره ۱ - آنتی‌بادی IgG مثبت کلامیدیا تراکوماتیس در زنان مبتلا به سرویسیت با روش MIF (بزرگنمایی $\times 40$)

آنتی‌بادی IgG با انجام روش الیزا، در ۱۳/۱٪ افراد مثبت گردیده است، از طرفی با انجام روش MIF، در ۶/۶٪ موارد (۹ بیمار) آنتی‌بادی IgG بر علیه کلامیدیا پنومونیه مثبت گردید. این دو روش در ۵/۱٪ موارد اشتراک داشتند.

با استفاده از کیت تشخیص سریع آنتی‌زن Dima، در ۳/۶٪ بیماران آنتی‌زن 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($P<0.625$)(جدول شماره ۳).

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 - حاد (mucopurulent cervicitis) هستند. تشخیص بالینی به وسیله معاینه گردن رحم توسط اسپیکولوم 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 مقاومت 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 اندومنتر به لوله‌های فالوپ و تخمدان‌ها، راه یافته و سبب بیماری التهابی لگن (PID)، سالپینژیت، آبسه‌های تخمدانی و در نهایت حاملگی خارج رحمی (Ecotopic pregnancy) و نازایی به دلیل انسداد لوله‌های فالوپ می‌گردد. در واقع کلامیدیایی تراکوماتیس، مهم‌ترین عامل نازایی اکتسابی می‌باشد.^(۱۵)

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، ۱۶/۲٪ گزارش کرد.^(۱۶) Bustein در سال ۱۹۹۸، میزان شیوع کلامیدیا تراکوماتیس را در زنان، ۱۶/۴٪ و در مردان، ۲/۱٪ تعیین نمود.^(۱۷)

شیوع عفونت کلامیدیا تراکوماتیس در زنان ارتش امریکا و با استفاده از روش LCR، ۹/۲-۱۲/۲٪ 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

جدول شماره ۳- توزیع فراوانی نسبی و مطلق آنتی‌بادی IgM علیه کلامیدیا تراکوماتیس با روش MIF و موارد مثبت با کیت تشخیص سریع آنتی‌D₁ma

		سریع آنتی‌D ₁ ma			نتیجه تست	
		-			+	جمع
نوع آزمایش	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
MIF	۱۲۷	۹۷/۸	۲/۲	۱۰۰	۳	۱۲۴
Dima TEST	۱۲۷	۹۵/۶	۲/۶	۱۰۰	۵	۱۲۱

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

بیشترین موارد ابتلا به کلامیدیا در سنین ۲۸ سال دیده شد (Std.Deviation=۷/۰/۶) که با گروه سنی زنانی که سرویسیت غیر کلامیدیایی داشتند، اختلاف معنی‌داری نداشت ($P<0.219$) (جدول شماره ۴).

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

سن بیمار	مورد	تعداد	درصد
<۲۰	۲	۲	۱/۵۴
۲۰-۲۴	۲۲	۲۲	۱۶/۰۵
۲۵-۲۹	۵۲	۵۲	۳۷/۹۵
۳۰-۳۴	۲۷	۲۷	۱۹/۷
۳۵-۳۹	۱۶	۱۶	۱۱/۶۷
>۴۰	۱۸	۱۸	۱۲/۱۳
جمع	۱۲۷	۱۲۷	۱/۱۰
میانگین	۲۸/۱۶	۲۸/۱۶	۷/۰۶
انحراف معیار			

بحث

التهاب غشای مخاطی گردن رحم، تحت عنوان سرویسیت شناخته شده است. سرویسیت توسط عوامل عفونی متعددی چون کلامیدیا تراکوماتیس، هرپس تناسلی، نایسیریا گونوره، آ، مایکوپلاسما ژنیتالیوم، مایکوپلاسما اوره‌آلیتیک و استرپتوكوکسی‌ها ایجاد می‌شود.^(۲۱)

Dima که منجر به تشخیص سریع می‌گردد، ۵ مورد مثبت شده بود که می‌تواند اهمیت نمونه‌برداری صحیح از اندوسروپیکس 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 منتفقی نمی‌سازد، در حالی که نتایج مثبت بست 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 سروپیکس 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 سروپیکس 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، روشنی 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.

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، ۱/۷٪ 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 G 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 در که اختلاف بین دو روش، امکان‌پذیر می‌گردد. آنتی‌زن بکار رفته در طراحی کیت الیزا، لیپوپلی‌ساکارید باکتری می‌باشد که به علت اشتراک آنتی‌زن 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 می‌باشدند، زیرا آنتی‌بادی IgG بر علیه کلامیدیا پنومونیه همان نمونه‌ها، با روش MIF مثبت گردید؛ در واقع بیمار، قادر آنتی‌بادی IgG بر علیه کلامیدیاتراکوماتیس بوده است.

حساسیت(Sensitivity) و ویژگی(Specificity) برای روش‌های الیزا، به ترتیب ۵۵/۵٪ و ۹۴/۰٪ و برای تشخیص سریع Dima، ۶۶/۶٪ و ۹۹/۲٪ بست آمد. با استفاده از کیت

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 ایمونوفلئورسنس)، 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 urethritis: implication for STD policy 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 cryopreservation of human spermatozoa. Fertil Steril 1985; 43: 664-6.

در مواردی که میزان شیوع کلامیدیا تراکوماتیس بالاتر از ۶-۴٪ 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.^(۲۲) با توجه به میزان شیوع سرویسیت ناشی از این باکتری (۷/۷٪) 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 میکروایمونوفلئورسنس 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 لیپوپلی‌ساقاریدی استفاده شده، نمی‌تواند نشان دهنده عفونت قطعی با کلامیدیا تراکوماتیس باشد، زیرا واکنش متقطع 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.

- 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- Mahmudovic 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, Connell 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 //
H. Fororesh, MSc *
///
*L. Ganji, MSc

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 prevalence 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 established gynecological protocols) who referred to Rasool Akram hospital and Nilo private clinical 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)