Archive of SID

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
تأسیس ۱۳۳۸ ، شماره ۵۵ (۱۳۸۱) ، صفحه ۱۷

مطالعه میزان کارایی PCR و فلورسنت آنتی بادی در تشخیص کلامیدیا پنمونیه

دکتر مسعود حاجیا[۱]

خلاصه

زمینه و اهداف: کلامیدیا ها همواره در عفونتهای انسانی از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده اند. معرفی دو گونه جدید *C.pneumoniae* و *C.pecorum* ، توجهات بیشتری را به این دسته از میکروارگانیسمها معطوف نموده است. از آنجایی که این باکتریها انگل اجباری داخل سلولی هستند، با روشهای معمول در آزمایشگاه میکروب شناسی نمی توان به تشخیص آنها اقدام نمود. بر این اساس عمده توجهات به روشهای تشخیص آنتی ژن و DNA اختصاصی ارگانیسم جلب شده است. در این بررسی نمونه های مشکوک به کلامیدیا پنومونیه با روش فلورسنت آنتی بادی و تکنیک PCR مورد آزمایش قرار گرفته و نتایج به دست آمده مورد مقایسه واقع شده است.

روش بررسی: در روش فلورسنت آنتی بادی از منوکلونال آنتی بادی اختصاصی کلامیدیا پنومونیه "A3" و ایمونوگلوبولین آنتی ماوس که با فلورسین ایزوتیوسیانات نشانه گذاری شده بود، استفاده به عمل آمد. جهت انجام PCR با به کارگیری پرایمر های $CpnB_2$ و CpnA برای تکثیر قطعه ای از ژن MOMP به طول ۵۷۲ جفت باز استفاده گردید. دو روش ابتدا با سویه های N16, IOL-207 و VR1310 که در آزمایشگاه کشت داده شده بودند، اپتیمایز گردیدند. به منظور ارزیابی میزان حساسیت دو تکنیک از ۱۰۶ سواب تنفسی که از ۳۰ بیمار HIV مثبت تهیه شده بودند، استفاده گردید.

یافته ها: بررسی هر دو روش با سویه های آزمایشگاهی تعیین نمود که میزان حساسیت دو تکنیک با نمونه های تکثیر شده در آزمایشگاه برای PCR ، تعداد ۱۰ کپی کروموزوم DNA و برای فلورسنت آنتی بادی ifu ۱۰ می باشد. بررسی نمونه های کلینیکی با دو روش، روشن ساخت که از مجموع نمونه های مورد آزمایش، ۳۹ مورد با PCR و ٤٢ نمونه با فلورسنت آنتی بادی مثبت گشتند.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه موید این نکته می باشد که هر دو روش از حساسیت تقریبا یکسان در تعیین ارگانیسم در نمونه های مشکوک برخوردار می باشند، اما به کار گیری PCR برای کار در آزمایشگاههایی که با نمونه های فراوان سرو کار دارند، مناسب تر بوده و به کار گیری فلورسنت آنتی بادی با وجود حساسیت مطلوب آن، نیازمند به دقت و صرف وقت بیشتری می باشد.

کلید واژه ها: واکنش زنجیره پلیمراز، آزمایش فلورسنت آنتی بادی، کلامیدیا پنومونیه

۱- دانشیار گروه میکروب شناسی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی همدان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

با گذشت تقریبا یک دهه از معرفی *C.pneumoniae* به عنوان یک گونه جدید، متاسفانه هنوز روش تشخیصی استانداردی برای این ارگانیسم مورد پذیرش قرار نگرفته است. روش کلاسیک تشخیصی یعنی جدا نمودن ارگانیسم در محیط کشت سلولی به کار گرفته شده است. این روش علاوه بر آنکه در مقایسه با گونه های دیگر دارای حساسیت کمتری می باشد (۲) از نظر سرعت دستیابی به نتیجه نیز از مقبولیتی برخوردار نمی باشد(۳). راه دیگر تشخیص استفاده از تستهای سرولوژیک می باشد. این روشها علاوه بر آنکه دارای واکنش متقاطع با سایر گونه های می باشد(٤)، برای تشخیص اختصاصی گونه، قابل اعتماد نمی باشد(٥). بر این اساس آزمایشگاههای تشخیصی به سایر تکنیکها توجه نموده اند (٦،٧). در تکنیک PCR شناسایی گونه های کلامیدیایی با ردیابی نواحی اختصاصی DNA در هر گونه باکتری امکان پذیر می باشد. این تکنیک با وجود تامین حساسیت و ویژگی بال،ا در گزارشهای متعدد دیده می شود که ژنهای متفاوت و پرایمر های گوناگون مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰-۸). چنین تنوعی تا حدود زیادی نیز در تکنیکهای مبتنی بر تعیین آنتی ژن نظیر ایمونوفلورسانت نیز دیده می شود. در مجموع به نظر می رسد تست فلورسنت آنتی بادی مستقیم و PCR از تستهایی می باشند که در مقایسه با سایر روشها در تشخیص کلامیدیا ها از نتایج بهتری برخوردار بوده اند (۲،۱۱). در تست فلورسنت آنتی بادی مستقیم، آنتی ژنهای اختصاصی گونه های کلامیدیایی در نمونه بالینی و یا کشت، مورد جستجو قرار گرفته و از سرعت بالاتری در مقایسه با روش غیر مستقیم برخوردار می باشد. البته روش PCR نیز تحولات متعددی داشته، به گونه ای که تعیین نواحی اختصاصی ژنها سبب تامین حساسیت و ویژگی مطلوب و همچنین ارایه پروتکل PCR سریع نیز سبب افزایش سرعت گردیده است (۱۵-۱۳). بر این اساس هدف از انجام این بررسی مقایسه کارایی این دو روش در تشخیص *C.pneumoniae* با استفاده از نمونه های بالینی بود.

مواد و روش تحقیق

نمونه های باکتریایی:: در این بررسی برای تعیین *C.pneumoniae* سویه IOL-207 (۱٦) مورد استفاده قرار گرفت. میکروارگانیسم در سلولهای McCoy باروش استاندارد (۳) کشت گردیده و انکلوژن بادی با روش ایمونوفلورسانت غیر مستقیم بااستفاده از منوکلونال آنتی بادی تولید شده بر علیهLPS باکتری تعیین گردید (تصویر ۱).

تصویر ۱، تصویر انکلوژن بادی با میکروسکوپ

سایر میکروارگانیسمهای استفاده شده در این بررسی همراه با نحوه تهیه آنها در جدول ۱ ذکر گردیده است.

نمونه های کلینیکی:

در این بررسی ابتدا دو تست با سویه های شناخته شده و DNA خالص شده کلامیدیا پنومونیه مورد آزمایش قرار گرفته و پس از اطمینان از میزان حساسیت و ویژگی مطلوب با نمونه های بالینی مورد آزمایش قرار گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱، سوشهای باکتریایی و منابع تهیه آنها

منابع تهیه میکروارگانیسمها	سویه های باکتریایی
دکتر کریستوفر استوری گروه میکروب شناسی دانشگاه لیدز،لیدز،انگلستان	C. pneumoniae(IOL-207) Avian C psittaci(serotype A,strain6BC) C.trachomatis(serotype E/T181)
مرکز کلکسیون باکتریایی انگلستان	M.pneumoniae Lefgionella pneumophila (strain 11150)
مجموعه باکتریایی دانشگاه منچستر، انگلستان	Streptococcus pneumoniae Haemophilus influenza Neiseria meningitides Klebsiella pneumoniae adenovirus

الف) تهیه نمونه غیر واقعی: پنج سواب حلقی از بیماران فاقد عفونت دستگاه تنفسی که نتیجه آزمایش PCR و ایمونوفلورسنت آن منفی بود، برای این منظور مورد استفاده قرار گرفت. از محیط ترانسپورت 2SP (2Sucrose phosphate) هرکدام ۵۰ میکرولیتر برداشته شد و پس از مخلوط نمودن، سویه IOL-207 باکتری *C.pneumoniae* که در آزمایشگاه تکثیر شده بود، به منظور تهیه نمونه مصنوعی آلوده به آن افزوده گردید. این نمونه پس از خالص شدن DNA با روش فنل-کلروفرم و شناور ساختن در۲۰۰ µl بافر TE (10mM tris/HCl pH 8.0K 1mM EDTA) , برای انجام آزمایش ۲µl از آن، مورد استفاده قرار گرفت.

ب)نمونه های واقعی: به منظور مقایسه کارایی دو روش در نمونه های بالینی، ۱۰۶ سواب تنفسی که از ۳۰ بیمار HIV مثبت بستری در بخش عفونی بیمارستان منچستر(انگلستان) که در طی یک دوره شش ماهه جمع آوری شده بود، مورد بررسی قرار گرفت(۱۷).

خالص سازی DNA : برای خالص نمودن DNA باکتریایی و نمونه های بالینی روش پروتئیناز K مخلوط گردید و به مدت ۲ ساعت در ٥٦ oC حرارت داده شد، سپس DNA باروش فنل-کلروفرم به صورت زیر خالص گردید(۱۸). ابتدا مخلوط فنل-کلروفرم و ایزوآمیل الکل به ترتیب به نسبت ۲، ٤٨، ۵۰ درصد آماده شد، هم حجم نمونه از مخلوط فوق بدان اضافه گردید. پس از آنکه نمونه و فنل کلروفرم به خوبی مخلوط گردید، در g× ۱۲۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه در درجه حرارت اتاق به منظور جداسازی دو لایه سانتریفوژگردید. لایه فوقانی به لوله جدید منتقل شد و این مرحله مجددا تنها با کلروفرم تکرار گردید. پس از انتقال محلول فوقانی به لوله جدید، یک دهم حجم آن، استات سدیم و دو حجم، اتانل سرد اضافه نموده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰ ^{o}C نگهداری شده، سپس در g × ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول را خارج نموده و به ته نشین µl ۵۰۰ اتانل ۷۰٪ اضافه گردید. در انتها پس از سانتریفوژ نمودن در g × ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، ته نشین را در بافر µl ۵۰ شناور ساخته و µl ۲ از آن در هر آزمایش استفاده شد.

تکثیر PCR (PCR amplification) و الکتروفورز محصول آزمایش: در این بررسی از دو پرایمر CpnA1 با ردیف 5`CTCCTTACAAGCCTGCCTGAGTTT3` و CpnB با ردیف 5`CATTCCCATAAGGCTCCACG3` که قبلاً طراحی و مقدار آنها اپتیمایز شده بود(۱۹)، استفاده گردید. مخلوط واکنشی PCR در یک حجم µl ۵۰ تهیه گردید که شامل mM ۰/۲ از هر یک dNTP[2] و M ۰/۳ از هر یک از پرایمر ها[۲] mM ۲/۵ از $MgCl_2$, ۰/۵U آنزیم Taq پلیمراز[۳] بود. بافرPCR حاوی tris HCl (pH8.3) 10 mM و ۵۰ mM از KCl بود. این مخلوط در دستگاه ترموسیکلر طبق برنامه تنظیمی قرار داده شد، (یک دقیقه در ^{o}C ۹۲ برای جدا شدن دو رشته از یکدیگر، یک دقیقه در ^{o}C ٦۰ برای اتصال با پرایمرها و یک دقیقه و نیم در ^{o}C ۷۲ برای همانند سازیDNA)، سیکل مزبور ٤۰ بار مورد تکرار قرار گرفت. بعد از اتمام آزمایش µl ۱۰ از محصول در ژل آگارز الکتروفورز که حاوی TBE[٤] بافر بود مورد آنالیز قرار گرفت و برای رنگ آمیزی DNA از ethidium bromide استفاده گردید.

2. Sigma
3. Boehringer Mannheim
4. Fluorecin-isothiocyanate-labelled anti-mouse immunoglubolin 0mM EDTA,89mMtris/HCl ,89mMBoric acid

www.SID.ir

Archive of SID

روش تعیین کمیت: جهت به دست آوردن تخمینی از باکتری، با استفاده از شمارش تعداد انکولوزیونی تولید شده، به تعداد المنتری بادیهای اولیه پس برده شد. سلولهای حاوی اینکلوژن برای این منظور با روش ایمونوفلورسانس با استفاده از منوکلونال آنتی بادی اختصاصی کلامیدیا رنگ آمیزی شدند.

نحوه آزمایش ایمونوفلورسانت غیر مستقیم: نمونه های میکروارگانیسم که از زرده تخم مرغ به دست آمده بودند، ابتدا توسط PBS به حجم یک میلی لیتر رسانده شده NaCL 8.0g,KCl0.2g,Na2HPO4 0.2g) مخلوط فوق در حجم ۱۰۰ میلی لیتر با آب مقطر دوبار تقطیر و در pH ۷/۳ تهیه و پس از اتوکلاو نمودن در حرارت اتاق نگهداری شد، سپس با استفاده از ورتکس آن را مخلوط نموده و پس از انتقال به یک لوله آزمایش ۱/۵ میلی لیتری (اپندورف) درg ×۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانترفوژ گردید. مایع رویی خارج شده و ته نشین در ۱۰۰µl از PBS شناور گردید. از مخلوط فوق µl ۱۰در روی لام قرار داده شد. پس از خشک شدن در هوا لامها در متانول ۹۹٪ به مدت ۱۰ دقیقه برای فیکس شدن قرار داده شد و سپس اسلاید ها توسط PBS شسته شد. ۱۰ میکرولیتر از آنتی بادی منوکلونال اختصاصی کلامیدیا پنومونیه (۲۳) بر روی آن افزوده شد و در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط مرطوب برای ۳۰ دقیقه نگهداری شد. پس از زمان مذکور و شستشوی مجدد با استفاده از رقت $^{1}/_{50}$ آنتی ماوس، نشانه گذاری شده با فلورسین ایزوتیوسیانات که IgG نشان دار(کنژوگه) بود، سطح لام پوشانیده شد و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شده و نهایتا با PBS شسته شد. اسلاید ها توسط مخلوط ۵۰٪ گلیسرول -PBS پوشانیده شد و توسط میکروسکوپ با بزرگ نمایی ٦۳ آزمایش گردیدند.

یافته ها

به منظور مقایسه میزان کارآیی دو تست با نمونه های غیر واقعی و واقعی ضروری است ابتدا حساسیت و ویژگی دو روش با DNA خالص شده از محیط تعیین گردد.

آزمایش تعیین حساسیت و ویژگی: جهت تعیین میزان حساسیت دو روش، دو حجم مساوی از کلامیدیا پنومونیه شامل10^{5} ifu برای هر کدام از دو روش مورد استفاده قرار گرفت. نمونه تهیه شده به صورت یک دهم رقیق گردید. آزمایش رقتهای تهیه شده روشن ساخت که روش ایمونوفلورسانت قادر به تعیین ۱۰ عدد ارگانیسم می باشد. برای تعیین میزان حساسیت PCR ابتدا DNA موجود در نمونه خالص شده و پس از شناور ساختن ته نشین در µl ۵۰ بافر TE رقتهای متفاوتی از آن تهیه شد. پس از خاتمه آزمایش مشخص گردید که حساسیت تست ۱۰ کپی کروموزوم می باشد (تصویر ۲).

تصویر ۲، تست تعیین حساسیت در مقادیر متفاوت فلورسنت DNA ارگانیسم: ردیفهای ٤، ۳، ۲، ۱ به ترتیب شامل ۱۰، 10^{2}، 10^{3}، 10^{4} کپی از DNA ارگانیسم می باشد

کلیه میکروارگانیسمهای لیست شده در جدول شماره ا با هر دو روش آزمایش گردیدند تا میزان ویژگی دو روش مورد بررسی قرار گیرد. نتایج حاصل تایید نمود که هیچ کدام از میکروارگانیسمها با روش PCR و ایمونوفلورسانس دارای واکنش مثبت نبودند که نشان دهنده وجود ویژگی مطلوب برای هر دو روش می باشد.

آزمایش با نمونه های غیر واقعی: پنج سواب تهیه شده از بیماران بدون علایم تنفسی با هر دو روش مورد آزمایش قرار گرفت پس از اطمینان نسبت به منفی بودن نتیجه، ضروری بود که نسبت به میزان دخالت ممانعت کننده های همراه با نمونه نیز اطمینان کسب گردد. لذا به تهیه نمونه غیر واقعی اقدام گردید. آزمایش دررقتهای متفاوت انجام شده تایید نمود که بند های ایجاد شده هیچ گونه کاهشی را در مقایسه با کنترل مثبت نشان ندادند.

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش با نمونه های واقعی: از تعداد ۱۰۶ نمونه که با هر دو روش آزمایش گردیدند، ۳۹ مورد با PCR و ۴۲ مورد با ایمونوفلورسانت مثبت بودند. مقایسه نتایج تایید نمود که تمامی ۳۹ مورد مثبت شده با PCR با آزمایش ایمونوفلورسنت مطابقت داشته است.

بحث و نتیجه گیری

تشخیص کلامیدیا پنومونیه با استفاده از روشی که بتواند حداکثر موارد مثبت بیماری را با حداقل خطا شناسایی نماید یکی از مباحثی است که موضوع بسیاری از تحقیقات انجام یافته در این زمینه را تشکیل داده است. در بررسی حاضر دو تکنیک FAT و PCR مورد مقایسه قرار گرفت. دو تکنیک پس از اپتیمایز شدن با نمونه های آزمایشگاهی ، از نظر میزان حساسیت مورد بررسی قرار گرفتند که نتیجه به دست آمده مؤید وجود حساسیت یکسانی برای هر دو روش بود. از طرفی آزمایشهای انجام یافته با نمونه های بالینی نشان دهنده وجود اختلاف بارزی بین دو روش نبود .

اطمینان نسبت به دخالت ممانعت کننده ها: نکته مهمی که در روشPCR میباید در نظر گرفت نتایج مثبت و منفی کاذب می باشد. وجود نتایج مثبت کاذب بواسطه آلودگی فضا، وسایل و مواد با محصولات تکثیر یافته است که ارتباط مستقیم به فرد آزمایش کننده و شرایط آزمایشگاه دارد. نتایج منفی کاذب می تواند بواسطه باقی ماندن ممانعت کننده ها پس از مراحل خالص سازی باشد که ارتباط مستقیمی به نوع روش خالص سازی خواهد داشت(۲۲).

در این بررسی، آزمایش با نمونه های غیر واقعی پس از این انجام شد که نتیجه آزمایش با تعدادی از نمونه های تهیه شده منفی بود. به منظور اطمینان نسبت به واقعی بودن نتیجه کسب شده و عدم دخالت ممانعت کننده ها آزمایش با نمونه های غیر واقعی مورد نظر قرار گرفت. این اطمینان قبل از آزمایش با نمونه های واقعی می تواند تضمین کننده حساسیت به دست آمده با DNA خالص شده باکتری باشد. افزودن ارگانیسم به نمونه نشان داد که هیچ گونه کاهشی در مقایسه با کنترل مثبت دیده نشد. این نکته مؤید عدم دخالت ممانعت کننده ها در منفی شدن پاسخ تست می باشد. بدیهی است در صورتی که نمونه مورد آزمایش غیر از سواب تنفسی باشد می باید آزمایشها مجدداً به منظور کسب اطمینان لازم نسبت به عدم دخالت ممانعت کننده ها تکرار گردد.

نمونه های کلینیکی: در یک بررسی که توسط Ostergaaard و همکاران وی (۲۰) برای تعیین *C.trachomatis* در سوابهای تناسلی و نمونه ادرار با دو روش PCR و FAT صورت گرفت، گزارش شده که از مجموع ۳٦٦ نمونه ۱۱۹ نمونه با هر دو روش مثبت و ۲٤۱ نمونه منفی و شش نمونه تنها با PCR مثبت بود که حکایت از وجود حساسیت تقریبا یکسان هر دو روش داشت. گرچه حساسیت PCR بر طبق گزارش Ostergaard اندکی بهتر بوده است. در حالی که در بررسی بالا نتایج حاصل از نمونه های بالینی نشان داد که سه نمونه ای که با روش FAT مثبت بودند با PCR منفی گردیدند. علت اختلاف نتایج دو تست در دو بررسی را جدا از وجود تفاوت در مواد تشکیل دهنده هر تست، می باید در متفاوت بودن گونه مورد جستجو و نمونه مورد بررسی دانست. بدیهی است حساسیت این دو روش نسبت به نوع نمونه مورد آزمایش، ارگانیسم مورد جستجو و عناصر تشکیل دهنده آن دارای تفاوتهایی باشد(۲۱). در جستجوی علت وجود تفاوت اندک بین دو تست در بررسی بالا با توجه به نتایج حاصل از نمونه های غیر واقعی، دلایل منفی شدن سه نمونه فوق الذکر را در موارد زیر می توان جستجو نمود.

- تغییر غلظت مواد به کار رفته در مخلوط واکنشی
- از دست رفتن DNA در حین مراحل خالص سازی در حین انتقال از لوله ای به لوله دیگر
- تلقیح ناکافی DNA خالص شده به مخلوط واکنشی
- عدم استفاده از حجم ناکافی محصول تکثیر شده در آزمایش الکتروفورز

البته با توجه به آنکه مخلوط واکنشی در یک حجم کلی تری تهیه می شود، مورد اول نمی تواند دارای نقش مهمی باشد، لذا ضروری است به سه عامل دیگر توجه شود.

محدودیت هریک از دو روش: نکته دیگری که می باید مورد توجه قرار گیرد، محدودیتهای هر کدام از دو روش می باشد. مراحل آزمایش با FAT با آنکه از سرعت مطلوبی برخوردار می باشد، ولی برای مطالعه میکروسکپی در هر نمونه بویژه در نمونه های ضعیف احتیاج به صرف وقت کافی می باشد. همچنین بسیار اتفاق می افتد که نمونه های ضعیف که رنگ آمیزی آن از کیفیت مطلوب برخوردار نباشد، ممکن است با نتیجه منفی گزارش شوند. بنابر این مهارت فردی شخص آزمایش کننده عامل مهمی می باشد. البته از مزیتهای این تکنیک، این مطلب را می توان تاکید نمود که به کارگیری آن تنها احتیاج به میکروسکپ فلورسنت داشته ، انجام روش فلورسنت آنتی بادی با آنکه نیازمند مهارت فردی شخص آزمایش کننده و وجود میکروسکپ UV می باشد، با این وجود در بسیاری از آزمایشگاهها قابل انجام بوده و قادر به ارایه

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج اختصاصی و با حساسیت بالا می باشد. این روش با آنکه به نظر می رسد از حساسیت بالایی برخوردار باشد، در آزمایشگاههای معتبر هم اکنون مورد استفاده قرار می گیرد. این روش نیازمند به وجود فضای مناسب و آزمایشگاههای مخصوص به خود می باشد تا امکان کار تضمین گردد.

آزمایشهای انجام یافته در این بررسی نشان دهنده وجود اختلاف بارزی بین نتایج به دست آمده نبود، لذا برای پی بردن به ارجحیت یک روش نسبت به روش دیگر علاوه بر فاکتور های تاثیر گذار در دقت هر روش، ضروری است به عوامل دیگری نظیر در اختیار داشتن دستگاههای مناسب، وجود فضای مناسب، امکان کار کردن با نمونه های فراوان و آسان بودن نتایج کار توجه نمود.

References:

1. Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA, Wang S. Chlamydia pneumoniae sp. nov. for Chlamydia sp. strain TWAR. Int J Sys Bacteriol 1989; 39: 88-90
2. Kou CC, Jackson LA, Grayston JT. Chlamydia pneumoniae (TWAR). Clin Microbiol Rev 1995; 8(4): 451-461
3. Richmond SJ, Bailey JMG, Bailet AS, Mearns G. Primary isolation of Chlamydia trachomatis and Chlamydia psittaci in in vitro cell culture. In: Isolation and identifcation of microorganisms of medical and veterinary importance. Collins CH and Grange JM (eds.), New York: Academic press 1985; P: 297- 312
4. Maurin M, Etienne J, Raault D. Serological cross-reactions between Bartonell and Chlamydia Species: Implications for diagnosis. J Clin Microbiol 1997; 35(9):2283-2287.
5. Grayston JT. Chlamydia pneumoniae (TWAR): Principles and Practice of Infectious Diseases, 4th edition, Mandell G L, Bennett J E, Dolin R, (eds.) Churchill Livingstone 1995; P:1696-1700
6. Verkooyen RP, Willemse D, Hiep-van Castern SCAM, Mousavi Joulandan SA. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of Chlamydia pneumoniae respiratory infections. J Clin Microbiol 1998;36(8):2301-2306
7. Hajia M, Storey CC. Comparison of four PCR tests for the detection Mycoplasma pneumoniae. Med J Islamic Republic of Iran 1999; 13(1): 75-9
8. Hajia M, Storey CC. Simultaneous detection of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae by PCR. Med J Islamic Republic of Iran 1999;12(4):387-391
9. Tjhie HTJ, Roosendaal R, Walboomers JMM, Theuissen JJH, Tjon Lim Sang RRM, Meijer CJLM, MacLaren DM, van den Brule AJC. Detection of Chlamydia pneumoniae using a general Chlamydia polymerase chain reaction with species differentiation after hybridization. J Microbiol Method 1993; 18:137-150
10. Gaydos CA, Quinn TC, Bobo LD, Eiden JJ. Identification of Chlamydia pneumoniae by DNA amplification of the 16s rRNA. J Clin Microbiol 1992; 30: 796-800
11. Sillis M, White P, Caul EO, Paul ID, Treharne JD. The differentiation of chlamydia species by antigen detection in sputum specimens from pateints with community-acquired acute respiratory infections. J Infection 1992; 25(Suppl I): 77-86

۱۲. رحیمی ف. مقایسه قدرت تشخیصی آزمونهای ایمونوفلورسانس مستقیم نمونه سرویکس با تست سرولوژی و سیتولوژی مهبل سرویسیتهای کلامیدیایی. مجله پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۷۵ شماره ۳، صفحات ۴۸-۳۹.

13. Wittwer CT, Reed GB, Ririe KM. Rapid Cycle DNA amplification. Mullis KB, Ferr F, Gibbs RA (eds.) The Polymerase Chain Reaction. Brikhauser, Boston USA. 1994
14. Storey CC, Hajia M. Chlamydia infection: A natural history. Contemporary Review of Obstet Gynaecol 1996; 8: 159-163

۱۵. حاجیا مسعود. تاثیر کاهش حجم مخلوط واکنشی و افزایش سرعت آمپلیفیکاسیون DNA بر روی حساسیت تکنیک واکنش زنجیره پلیمراز، مجله علمی دانشگاه گیلان، ۱۳۷۸،شماره ۲۱-۲۰، صفحات ۱۹-۱۴.

16. Dwyer RS, Treharne JD, Jones BR, Herring J. Chlamydial infection. Results of microimmunofluorescence tests for the detection of type specific antibody in certain chlamydial infection. Br J Ven Disease 1972; 48: 452-458
17. Khoo SH, Bailey AS, de Jong JC, Mandal BK. Adenovirus infection in human immunodeficiency virus-positive patients: Clinical features and molecular epidemiology. J Infect Disease 1995; 172: 929-937

www.SID.ir

Archive of SID

18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989;Vol 1, Chapter 1and 3

۱۹. حاجیا مسعود، استوری ک. تشخیص افتراقی عوامل پنومونی کلامیدیایی Chlamydia pneumoniae و Chlamydia psittaci به وسیله واکنش زنجیره پلیمراز. دانشگاه علوم پزشکی همدان ۱۳۷۷،شماره ۱۰، صفحات ۹-۵.

20. Ostergaard L, Moller JK. Use of PCR and direct immunofluorescence microscopy for confirmation of results obtained by Syva Micro Trak Chlamydia enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1995; 33(10): 2620-3

۲۱. حاجیا مسعود. جستجوی استاندارد طلایی در تشخیص آزمایشگاهی عفونتهای کلامیدیایی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان.

22. Vaneechoutte M, Van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. J Med Microbiol 1997; 46:188-194

23. Storey CC. Evidence for C. pneumoniae of non-human oigin. J Gen Microbiol 1993; 139:2621-2626

www.SID.ir