Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال۶۲، شماره ۶، صفحات ۴۴۹ تا ۴۵۶، (۱۳۸۳)

تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس و نایسریا گونوره‌آ در نمونه های ادراری-تناسلی بیماران مبتلا به اورتریت با روش PCR و Multiplex PCR

دکتر بهرام فتح الله‌زاده (دانشیار)*، دکتر اکبر میرصالحیان (دانشیار)*، دکتر بهرام کاظمی (دانشیار)**، دکتر حمید ارشدی (استادیار)*
بابک پوراکبری (کارشناس ارشد)*
* دانشگاه علوم پزشکی تهران- - دانشکده پزشکی - گروه میکروب شناسی
** دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

چکیده

مقدمه: از جمله عفونت‌های شایع در میان افراد فعال از نظر جنسی، عفونت‌های دستگاه ادراری- تناسلی می‌باشد که در ایجاد چنین عفونت‌ها دو باکتری نایسریا گونوره‌آ و کلامیدیا تراکوماتیس عوامل اصلی را تشکیل می‌دهند.

مواد و روش‌ها: در این بررسی از ٦٧ بیمار مبتلا به اورتریت که شامل ٦٢ مرد و ٥ زن بودند علاوه بر گرفتن سواب از ترشحات ابتدای مجرای ادرار جهت بررسی باکتریولوژیکی، ۱۵-۱۰ میلی لیتر از ابتدای ادرار صبحگاهی آنها نیز جمع آوری شد. پس از استخراج DNA از نمونه‌های ادرار، واکنش PCR و Multiplex PCR انجام گرفت و محصول آن بر روی ژل آگار بررسی شد. هر نمونه روی محیط کشت اختصاصی نایسریا گونوره‌آ نیز کشت داده شد.

یافته‌ها:: نتایج حاصل از Multiplex PCR و دو آزمایش PCR تاییدی دیگر نشان داد که تعداد ۳۱ (٤٦٪) مورد نمونه‌ها از نظر نایسریا گونوره‌آ و (۲۲/۴٪) ۱۵ مورد نمونه‌ها از نظر کلامیدیا تراکوماتیس مثبت بودند. در (۱۰/۴٪) ۷ مورد نمونه‌ها نیز آلودگی همزمان با دو باکتری مشاهده شد حالی که رشد نایسریا گونوره‌آ بر روی محیط اختصاصی تنها در ۲۵ مورد (۳۷/۳٪) مشاهده گردید. حساسیت و ویژگی Multiplex PCR نسبت به PCRهای جداگانه ۱۰۰٪ تعیین شد.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: روش Multiplex PCR یک روش غیرتهاجمی، سریع و با حساسیت و ویژگی بالا جهت شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس و نایسریا گونوره‌آ از ابتدای ادرار بیماران می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

از جمله عفونت‌های شایع در میان افراد فعال از نظر جنسی، عفونت‌های دستگاه ادراری- تناسلی می‌باشد (۱) که در ایجاد چنین عفونت‌های دو باکتری نایسریا گونوره‌آ و کلامیدیا تراکوماتیس عوامل اصلی را تشکیل می‌دهند (۲). اگر چه موارد گزارش شده ابتلا به عفونت نایسریا گونوره‌آ در چندین کشور صنعتی کاهش یافته است اما هنوز از عوامل مهم ایجاد کننده بیماری‌های مقاربتی (STIs: Sexually Transmitted Infections) در جهان محسوب می‌شود و تخمین زده می‌شود که سالیانه ۷۸ میلیون مورد جدید آن در جهان اتفاق می‌افتد (۳). ضمناً در حال حاضر کلامیدیا تراکوماتیس که ۵۰-۳۰ درصد اورتریتهای غیر گنوکوکی (NGU)را باعث می‌شود (٤) شایع ترین عامل باکتریایی در STI محسوب می‌گردد (۵). علائم و عوارض بیماری مقاربتی ناشی از نایسریا گونوره‌آ تقریبا شبیه به کلامیدیا تراکوماتیس می‌باشد و آلودگی همزمان نیز شایع است در نتیجه تشخیص کلینیکی را مشکل می‌سازد. سالهاست که شناسایی عفونت‌های ناشی از این دو باکتری به طور گسترده‌ای بر پایه روش‌های معمول چون کشت، آزمایش‌های بیوشیمیایی و بخصوص لام مستقیم برای نایسریا گونوره‌آ و کشت سلولی، الیزا و رنگ آمیزی ایمنو فلورسانت مستقیم برای کلامیدیا تراکوماتیس بوده است اما امروزه روش‌های آمپلی فیکاسیون مولکولی همچون Polymerase Chain Reaction (PCR)و Ligase Chain Reaction (LCR) این امکان را فراهم نموده تا با حساسیت و ویژگی بسیار بالا بتوانیم عوامل باکتریایی فوق را در نمونه‌های ادراری و یا از طریق سواب‌های ادراری- تناسلی شناسایی نماییم (۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱) و روش Multiplex PCR با حساسیتی در حدود ۱۰۰- ۹۲/۳ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد امکان ردیابی همزمان دو باکتری نایسریا گونوره‌آ و کلامیدیا تراکوماتیس را در نمونه های بالینی فراهم می آورد (۱۲،۱۳).

برای انجام آزمایش کشت و لام مستقیم جهت شناسایی این عوامل باکتریایی نیاز به نمونه گیری تهاجمی می‌باشد (استفاده از سواب و وارد کردن آن در مجرای ادراری مردان یا سرویکس زنان) در صورتیکه با استفاده از روش PCR و انجام این آزمایش بر روی نمونه ادرار این معضل برطرف می شود و بیماران با رقبت بیشتری اقدام به دادن نمونه می‌نمایند.

آزمایش PCR در مدت ۸ ساعت که برابر بایک شیفت کاری است انجام می گیرد در صورتیکه کشت کلامیدیا علاوه بر نیاز داشتن به کشت سلولی (با توجه به مشکلات و محدودیت های این روش) بسیار وقت‌گیر است و حتی کشت و تدیی نتیجه گنوکوک نیز حداقل به ۴۸ ساعت زمان نیاز دارد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

تعداد ٦٧ بیمار مبتلا به اورتریت شامل ٦٢ مرد و ۵ زن از آبان ۱۳۸۰ تا فروردین ۱۳۸۱ به آزمایشگاه گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ارجاع شدند. این بیماران در دامنه سنی ۱۹ تا ٤٠ سال قرار داشتند و با تشخیص پزشک متخصص اورولوژی مشکوک به اورتریت بودند. پس از تکمیل پرسشنامه برای هر یک از آنها، دو سواب از ترشحات ابتدای مجرای ادرار مردان و دو سواب از ترشحات اندوسرویکس زنان گرفته شد. همچنین ۱۵-۱۰ میلی لیتر از ابتدای ادرار صبحگاهی آنان نیز جمع آوری گردید و پس از سانتریفوژ رسوب آنها تا زمان استخراج DNA در دمای منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

کشت

از هر نمونه یک سواب جهت بررسی رشد نایسریا گونوره‌آ بلافاصله به محیط اختصاصی تایر مارتین اصلاح شده(MTM) منتقل شد و در اتمسفر حاوی ۵ درصد CO_2 انکوبه گردید (۱۴). پلیتها پس از ٤٨ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند و کلنی‌های مشکوک به این باکتری با آزمایش اکسیداز، سوپراکسل و مصرف کربوهیدراتها تایید شدند. از

www.SID.ir

Archive of SID

سواب دیگر لام مستقیم تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی با متیلن بلو جهت مشاهده دیپلوکوکهای داخل یا خارج از پلی مورفونوکلئرها مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA

برای این کار از بافر لیز کننده (ساکارز ۳۲۰ میلی مولار، تریس ۱۰ میلی مولار، کلراید منیزیوم ۵ میلی مولار، سدیم دودسیل سولفات (SDS) یک درصد و آنزیم پروتئیناز g/ml ۴۰μ) استفاده شد. هم حجم نمونه بافر اضافه شد و ٤ ساعت در دمای ٦٠- ٥٥ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و به مدت ١٥-١٠ دقیقه جوشانده شد و پس از ١٠ دقیقه سانتریفیوژ با دور ١٠٠٠٠، مایع رویی جهت آزمایش PCR به لوله جدید منتقل گردید.

شرایط PCR

در این مطالعه پرایمرهای

BK1-5′- AAGATTTCGCTCTGCCGT- 3′
BK2 -5` TTTGGCGAAGACCTTCGA- 3′

از ژن cppB کریپتیک پلاسمید نایسریا گونوره‌آ و پرایمرهای

BP1-5′- AACCGTTTTTAATAGTGGCA-3′
BP2 -5′- TTCTGGCCAAGAATTATCC- 3′

از کریپتیک پلاسمید کلامیدیا تراکوماتیس با نرم‌افزار DNASIS طراحی و جهت سنتز به دو کمپانی فرمانتاس و ژنست الیگوس فرانسه سفارش داده شدند. جهت افزایش حساسیت آزمایش‌های PCR و Multiplex PCR، پرایمرها از ژن‌های ثابت پلاسمیدی موجود در هر دو باکتری طراحی شدند و از آنجا که در هر باکتری معمولاً چندین کپی از پلاسمید وجود دارد در نتیجه نسبت به ژن کروموزومی که معمولاً یک نسخه از آن در هر باکتری موجود است، حساسیت بیشتری را در واکنش PCR ایجاد می‌نماید. طراحی پرایمرها به نحوی بود که علاوه بر اختصاصیت آنها برای باکتری‌های مذکور، دمای آنلینگ برابری داشته باشند تا در Multiplex PCR مشکل ایجاد نگردد. از نکات دیگر در طراحی پرایمرها تفاوت اندازه محصول PCR برای عوامل مذکور می‌باشد (نایسریا گونوره‌آ ۶۰۳ جفت باز و کلامیدیا تراکوماتیس ۳۷۷ جفت باز) تا وجود هر کدام به راحتی روی ژل آگاروز قابل شناسایی باشد. جهت بررسی اختصاصیت آزمایش پرایمرهای طراحی شده با نرم‌افزار BLAST آزمایش شدند و عملاً با DNA باکتری‌های دیگر و DNA سلول‌های انسانی واکنش PCR آنها منفی بود (نوار DNA روی ژل آگاروز مشاهده نگردید).

پس از استخراج DNA از سویه های استاندارد کلامیدیا تراکوماتیس و نایسریا گونوره‌آ PCR با شرایط زیر انجام گرفت:

DNA	0.1-1 μg
MgCl2	1.5mM
dNTP	0.2 mM
Primers	20 pico mol.
Taq DNA poly.	1.5 units
10x PCR Buffer	5 μl

با آب مقطر حجم واکنش به ۵۰ میکرولیتر رسید و با ترموسایکلر اپندرف واکنشAmplification با این مراحل انجام گرفت؛ دناتوراسیون در ٩٤ درجه به مدت ٣٠ ثانیه، آنیلینگ در ٥٢ درجه به مدت ٤٥ ثانیه و Extension در ٧٢ درجه به مدت ٣٠ ثانیه انجام گرفت. این مراحل ٣٠ دفعه تکرار شدند و قبل از این مراحل پره دناتوراسیون به مدت ٥ دقیقه و بعد از مراحل فوق نیز Post extension به مدت ٥ دقیقه انجام شد. برای انجام Multiplex PCR از منیزیوم کلراید با غلظت ٢/٥ میلی مولار و dNTP با غلظت ٠/٤ میلی مولار استفاده شد.

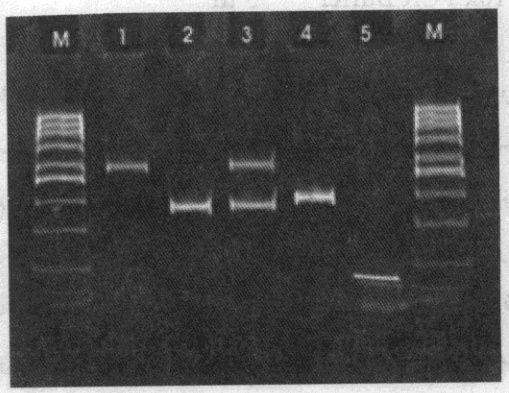
برای تأیید آزمایش PCR همه نمونه‌های مثبت و منفی با دو جفت پرایمر دیگر که قسمتی از کروموزوم نایسریا گونوره‌آ و کلامیدیا تراکوماتیس را Amplify می‌کنند مورد بررسی قرار گرفتند (١٥،١٦). محصول PCR روی ژل آگارز ٢ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نوارهای DNA توسط دستگاه UV Transilluminator قابل مشاهده شدند و از آنها عکس گرفته شد (شکل ١).

www.SID.ir

Archive of SID

یافته‌ها

انجام PCR روی ٦٧ نمونه ادرار نشان داد که ۴۶ مورد (۶۸/۶٪) حداقل حاوی DNA یکی از دو باکتری مذکور بودند. در این مطالعه شیوع نایسریا گونوره‌آ با استفاده از روش‌های PCR مجزا و Multiplex PCR و در نظر گرفتن ۹۵٪ حدود اطمینان ۴۶٪ (۵۴٪-۳۸٪) بدست آمد در صورتیکه با استفاده از روش کشت و لام مستقیم و با در نظر گرفتن همان حدود اطمینان شیوع این باکتری به ترتیب ۳۷٪ (۴۳٪- ۳۱٪) و ۳۹ (۴۳٪- ۳۱٪) حاصل شد (جدول ۱).



شکل ۱- نمایش محصولات PCR و Multiplex PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪

ستونهای M) شاخص‌های وزنی DNA (100bp)

ستون ۱) محصول PCR سویه استاندارد نایسریا گونوره‌آ با پرایمرهای پلاسمیدی

ستون ۲) محصول PCR سویه استاندارد کلامیدیا تراکوماتیس آ با پرایمرهای پلاسمیدی

ستون ۳) محصول Multiplex PCR سویه های استاندارد این دو باکتری با پرایمرهای پلاسمیدی

ستون ۴) محصول PCR سویه استاندارد نایسریا گونوره‌آ با پرایمرهای کروموزومی

ستون ۵) محصول PCR سویه استاندارد کلامیدیا تراکوماتیس آ با پرایمرهای کروموزومی

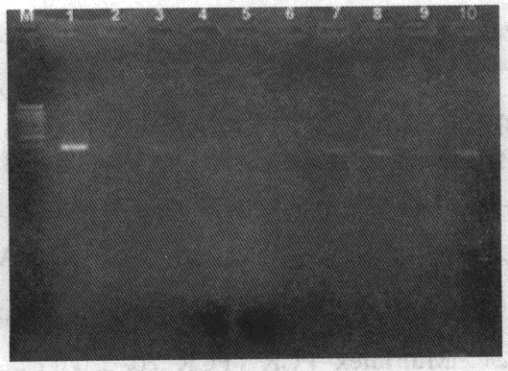
شکل ۲- نمایش محصولات PCR نایسریا گونوره‌آ بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪

ستون M) شاخص وزنی DNA (100bp)

ستون ۱) کنترل مثبت با DNA سویه استاندارد نایسریا گونوره‌آ

ستون ۲)کنترل منفی (بجای DNA از آب مقطر استریل استفاده شده است)

ستونهای ۳،۴،۵،۹ محصول PCR نایسریا گونوره‌آ انجام شده بر روی ۷ نمونه بیمار مبتلا به علایم اورتریت



شکل ۳- نمایش محصولات PCR کلامیدیا تراکوماتیس بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪

ستون M) شاخص وزنی DNA (100bp)

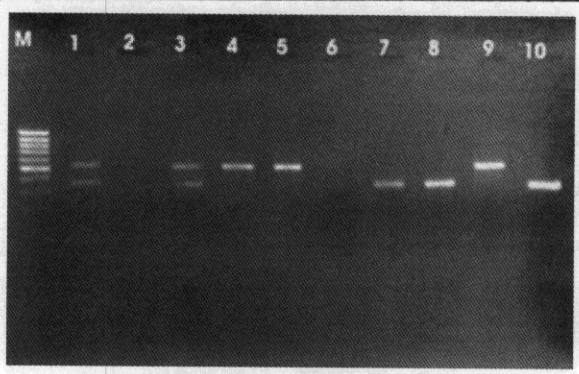
ستون ۱)کنترل مثبت با DNA سویه استاندارد کلامیدیا تراکوماتیس

ستون ۲)کنترل منفی (بجای DNA از آب مقطر استریل استفاده شده است)

ستونهای ۳،۷،۸،۱۰) محصول PCR کلامیدیا تراکوماتیس انجام شده بر روی ۷ نمونه بیمار مبتلا به علایم اورتریت

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- نمایش محصولات Multiplex PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪

ستون M) شاخص وزنی DNA (100bp)

ستون ۱) کنترل مثبت با DNA سویه های استاندارد این دو باکتری

ستون ۲) کنترل منفی (بجای DNA از آب مقطر استریل استفاده شده است)

ستونهای ۳،۴،۵،۹) محصول PCR نایسریا گونوره‌آ انجام شده بر روی ۷ نمونه بیمار مبتلا به علایم اورتریت

ستونهای ۳،۷،۸،۱۰) محصول PCR کلامیدیا تراکوماتیس انجام شده بر روی ۷ نمونه بیمار مبتلا به علایم اورتریت

ستون ۳) آلودگی همزمان به این دو باکتری

ستون ۶) برای هر دو باکتری، PCR مجزا و Multiplex PCR منفی است

فراوانی باکتری کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه های تحت بررسی با روش PCR مجزا و Multiplex PCR و در نظر گرفتن ۹۵٪ حدود اطمینان ۲۲٪ (۲۸٪-۱۶٪) مشخص گردید و شیوع همزمان این عوامل نیز ۱۰٪ (۱۲٪-۱۰٪) بدست آمد. شکل های شماره ۲ و ۳ نتایج PCR نایسریا گونوره‌آ و کلامیدیا تراکوماتیس را بر روی ۷ نمونه ادرار نشان می‌دهند و شکل شماره ۴ نشان دهنده نتایج حاصل از آزمایش Multiplex PCR بر روی همان ۷ نمونه است.

همه ٦٧ نمونه ادرار با دو جفت پرایمر دیگر که هدف کروموزومی برای نایسریا گونوره‌آ و کلامیدیا تراکوماتیس داشتند و به ترتیب باندهایی به اندازه ۳۹۰ bp و ۱۴۴bp در PCR مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱) و مغایرتی در نتایج ملاحظه نگردید. رشد نایسریا گونوره‌آ بر روی محیط اختصاصی تنها در ۲۵ مورد (۳۷/۳٪) مثبت بود و در این تحقیق برای نایسریا گونوره‌آ کشت مثبت ولی pcr منفی مشاهده نشد (جدول ۲). حساسیت Multiplex PCR در مقایسه با PCR برای نایسریا گونوره‌آ ۱۰۰٪ و در مقایسه با آزمایش pcr کلامیدیا تراکوماتیس نیز ۱۰۰٪ بدست آمد و ویژگی این روش در مقایسه با pcr مجزا هم برای نایسریا گونوره‌آ و هم برای کلامیدیا تراکوماتیس ۱۰۰٪ مشخص گردید.

جدول شماره ۱- توزیع فراوانی مطلق و نسبی ابتلا به نایسریا گونوره‌آ بر حسب روش

روش‌ها / نتایج	کشت		لام مستقیم		PCR		M-PCR	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
مثبت	۲۵	٪۳۷	۲۶	٪۳۹	۳۶	٪۵۴	۳۶	٪۵۴
منفی	۴۲	٪۶۳	۴۱	٪۶۱	۳۱	٪۴۶	۳۱	٪۴۶
جمع	۶۷	٪۱۰۰	۶۷	٪۱۰۰	۶۷	٪۱۰۰	۶۷	٪۱۰۰

جدول شماره ۲- مقایسه نتایج حاصل از دو روش کشت و PCR در شناسایی نایسریا گونوره‌آ

N.g- PCR / کشت / نایسریا گونوره‌آ	مثبت		منفی		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
مثبت	۲۵	٪۸۰/۶	۰	۰	۲۵	٪۳۷/۷
منفی	۶	٪۱۹/۴	۳۶	٪۱۰۰	۴۲	٪۶۲/۷
جمع	۳۱	٪۱۰۰	۳۶	٪۱۰۰	۶۷	٪۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

Mahony و همکارانش در سال ۱۹۹۵ روش Multiplex PCR را برای دو باکتری مذکور راه‌اندازی نمودند و در سال ۱۹۹۷ این روش را به گونه‌ای تغییر دادند که بتواند برای شناسایی همزمان چهار باکتری بکار رود. در مطالعه سال ۱۹۹۵ آقای Mahony و همکارانش حساسیت و ویژگی Multiplex PCR نسبت به PCR نایسریا گونوره‌آ ۹۲/۳٪ و ۱۰۰٪ و نسبت به PCR کلامیدیا تراکوماتیس ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ مشخص گردید در صورتیکه در مطالعه سال ۱۹۹۷ این محقق و همکارانش حساسیت و ویژگی Multiplex PCR نسبت به PCR نایسریا گونوره‌آ ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ و نسبت به PCR کلامیدیا تراکوماتیس ۹۷/۸٪ و ۱۰۰٪ بدست آمد (۱۲،۱۳). در مطالعه ما حساسیت و ویژگی Multiplex PCR نسبت به PCR نایسریا گونوره‌آ و کلامیدیا تراکوماتیس ۱۰۰٪ مشخص گردید.

مطالعات اپیدمیولوژی مختلفی در ارتباط با این دو باکتری انجام شده است بطور مثال آقای Hayakawa و همکارانش در سال ۲۰۰۲ توانستند ۴۹/۸٪ آلودگی به نایسریا گونوره‌آ، ۱۱/۳٪ آلودگی به کلامیدیا تراکوماتیس و ۱۱/۱٪ آلودگی همزمان به این دو باکتری را در افراد مبتلا به اورتریت با روش PCR در کشور ژاپن شناسایی نمایند (۱۷). در همان سال آقای Zachariah و همکارانش در کشور ملاوی با روش LCR آلودگی به نایسریا گونوره‌آ را ۸۰٪ و آلودگی به کلامیدیا تراکوماتیس را ۲٪ در افراد مبتلا به اورتریت بدست آوردند (۱۸) در صورتی که آقای Pepin و همکارانش در ۷ کشور آفریقای غربی و با روش PCR آلودگی به نایسریا گونوره‌آ را ۶۱/۹٪ و آلودگی به کلامیدیا تراکوماتیس را ۱۳/۸٪ در سال ۲۰۰۱ مشخص نمودند (۱۹). آقای Morency و همکارانش با استفاده از روش PCR در سال ۲۰۰۱ آلودگی به نایسریا گونوره‌آ در افراد مبتلا به اورتریت در آفریقای مرکزی را ۶۹٪ و آلودگی به کلامیدیا تراکوماتیس را ۱۷٪ بدست آوردند (۲۰). درصد آلودگی به نایسریا گونوره‌آ در مطالعه ما ۴۶/۳٪ و آلودگی به کلامیدیا تراکوماتیس ۲۲/۳٪ تعیین شد و ۱۰/۴٪ موارد نیز آلودگی همزمان با این دو باکتری را نشان دادند. همانگونه که مشاهده می‌شود آمارهای جوامع مختلف برحسب فرهنگ، رفتارهای جنسی و روش تشخیصی متفاوت مختلف می‌باشند بنابراین انتظار می‌رود در جامعه ما نیز آمارها متفاوت باشد.

در مواردی که بیماران درمان آنتی‌بیوتیکی را شروع کرده بودند و نتیجه کشت و لام مستقیم آنها منفی بود آزمایش PCR و Multiplex PCR توانست آلودگی را شناسایی نماید (جدول ۲). در این مطالعه موردی که نتیجه کشت و یا لام مستقیم آن برای گنوکوک مثبت باشد ولی PCR و یا Multiplex PCR آن منفی باشد مشاهده نگردید. همچنین برای تأیید آزمایش‌های PCR و Multiplex PCR انجام شده بر روی نمونه‌های بالینی، تمام نمونه‌های مثبت و منفی با دو آزمایش PCR دیگر که با پرایمرهای کروموزومی کار می‌کردند مورد بررسی قرار گرفتند و خوشبختانه بین نتایج حاصل از PCR های مجزا و Muliplex PCR و دو PCR تأییدی دیگر هیچ اختلافی مشاهده نگردید.

اگر چه کشت ادرار برای تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس و یا انجام آزمایش الیزا برای تشخیص نایسریا گونوره‌آ از حساسیت بالایی برخوردار نمی‌باشد اما استفاده از این نمونه برای مردان و زنان در آزمایشات آمپلی‌فیکاسیون اسیدهای نوکلئیک ارجحیت دارد (۲۴،۲۵،۲۶). چندین مطالعه نشان داده‌اند که انجام واکنش PCR روی نمونه ادرار برای تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس بسیار حساس‌تر از کشت اورترال یا استفاده از روش الیزا بر روی نمونه‌های ابتدای ادرار است (۷،۹،۲۰،۲۴،۲۵،۲۶،۲۷،۲۸،۲۹).

هنگام استفاده از قسمت ابتدایی ادرار جهت انجام آمپلی‌فیکاسیون اسیدهای نوکلئیک باید به وجود بازدارنده‌های واکنش PCR در نمونه توجه داشت و با قرار دادن نمونه های ادرار به مدت یک شب در یخچال $4^{\circ}C$+ و استخراج DNA با فنل- کلروفرم آنها را حذف نمود و یا به حداقل رساند ولی گاهی بعضی بازدارنده‌های ناشناخته در ادرار باقی می‌مانند و مانع انجام واکنش می‌شوند که در این موارد باید

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش را با DNA رقیق شده تکرار کرد که انتظار می‌رود میزان بازدارنده‌ها نیز رقیق شود و واکنش انجام گیرد بنابراین آزمایش Multiplex PCR بر روی قسمت ابتدایی ادرار یک روش حساس، اختصاصی، سریع و غیرتهاجمی برای تشخیص عفونت‌های ناشی از نایسریا گونوره‌آ یا کلامیدیا تراکوماتیس می‌باشد و می‌تواند وسیله‌ای روتین برای غربالگری افراد در خطر ابتلا به عفونت های ناشی از این عوامل باکتریایی باشد.

منابع

1. De Schryver A, Meheus A: epidemiology of sexually transmitted disease: the globol picture. Bull WHO. 1990; 68: 639-654.

2. Centers for disease control and prevention. Sexually transmitted disease surveillance 1992. Center for disease control and prevention, Atlanta, Ga. 1993.

3. World Health Organization: Bridging the gaps. Who Report 1995. World Health Organization, Geneva, 1995.

4. Bowie WR: Urethritis in males. In Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, Wiesner PJ: Sexually transmitted disease, 2nd ed. McGraw-Hill, New York, 1989; PP. 627-639.

5. Centers for disease control and prevention: Recommendations for the prevention and management *of Chlamydia trachomatis* infections, 1993. MMWR 1993; 42 (No. RR-12):1-9.

6. Bauwens, J. E., A. M. Clark, M. J. Loffelholz, S. A. Herman, and W. E. Stamm. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Urethritis in men by polymerase chain reaction assay of first catch urine. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 3013-3016.

7. Chernesky, M. A., D. Jang, H Lee, J. D. Burczak, h. Hu, J. Sellors, S. J. Tomazic Allen, and J. B. Mahony. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in men and women by testing first Void Urine with Ligase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 2682-2685.

8. Ho, B.S. W., W G. Feng, B. K. C. Wong, and S. I. Egglestone. Polymerase chain reaction for detection of Neisseria gonorrhoae in clinical specimens. J. Clin. Pathol. 1992; 45: 439-442.

9. Jaschek, G., C. A. Gaydos, L. E. Welsk, and T. C. Quinn. Direct detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoae* in urine specimens from symptomatic and asymptomatic men by using a rapid polymerase chain reaction assay. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:1209-1212.

10. Smith, K. R., S. Chiang, H. Lee, Y. Ohhashi, H. Y. Hu, H.C. Fisher III, and E., W. hook III. Evaluation of ligase chain reaction for use with urine for identification of *Neisseria gonorrhoae* in females attending a sexually transmitted disease clinic. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 455-457.

11. Stamm, W.E., and K. K. Holmes. *Chlamydia trachomatis* infections of the adult. In K. K. Holmes(ed.), Sexually transmitted disease. McGraw-Hill, New York, N.Y. 1984. 285-269.

12. Mahony J.B., K. E. Luinstra, M. Tyndall, J. Sellors, J.Krepel, M. Chernesky. Multiplex PCR for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoae* in genitourinary specimens. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 3049-3053.

13. Mahony J.B., D. Jang, S. Chong, K. Luinstra, Sellors, J. Tyndall, M. Chernesky. Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, Ureaplasma Urealyticum, and Mycoplasma genitalium in first void urine specimens by Multiplex polymerase chain reaction. Mol. Diagn. 1997. 2: 161-68.

14. Bovin P, Handsfield HH. Isolation of *Neisseria gonorrhoae* on selective and nonselective media in a sexually transmitted disease clinic. J. Microbiol. 1984;19: 218-20.

15. B S W Ho, W G Feng, B K Wong, S I Egglestone. Polymerase chain reaction for the

www.SID.ir

Archive of SID

detection of *Neisseria gonorrhoae* in clinical samples. J Clin Pathol 1992;43:439-442.

16. Dutilh B., C. bebear, P. Rodrigues, A. Vkris, J. Bonnet, M. Garret. Specific amplification of a DNA sequence common to all *Chlamydia trachomatis* serovars using the PCR. Res. Microbiol. 1989;140:7-16.

17. Morency P, Dubois MJ, Gresenguet G, Frost E, Masse B, Deslandes S, Somse P, Samory A, Mberyo-Yaah F, Pepin J. Etiology of urethral discharge in Bangui, Central African Republic. Sex Transm Infect. 2001 Apr; 77(2):125-9.

18. Hayakawa T, Mitsuya H, Kojima M, Hayase Y. The clinical evaluation of 414 cases of male urethritis. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 2002 Mar; 93(3): 450-6.

19. Pepin J, Sobela F, Deslandes, S, Alary M, Wegner K, Khonde N, Kintin F, Kamuragiye A, Sylla M, Zerbo PJ, Baganizi E, Kone A, Kane F, Masse B, Viens P, Frost E. Etiology of urethral discharge in West Africa: the role of *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis*. Bull World Health Organ 2001; 79(2):118-26.

20. Zachariah R, Harries AD, Nkhoma W, Arendet V, Nchingula D, Chantulo A, Chimtulo F, Kirpach P. Behavioural characteristics, prevalence of *Chlamydia trachomatis* and antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoae* in men with urethral discharge in Thyolo, Malawi. Trans R Trope Med Hyg 2002 May-Jun;96(3): 232-5.

21. Cano RJ, JC Palomares, MJ Torres and RE Klem. Evaluation of fluorecscent DNA hybridization assay for detection of N. gonorrhoeae. Eur J Clin Microbiol Infet Dis 1992; 11: 602-609.

22. Chernesky MA, S Castriciano, J Sellors, I Stewart, I Cunningham, S Landis, W Seidelman, L Grant, C Devlin and J Mahony. Detection of Chlamydia trachomatis antigens in urine as an alternative to swabs and culture. J Infect Dis 1990; 161: 124-126.

23. Bauwens JE, AM Clark, MJ Loeffelholz, SA Herman, and WE Stamm. Diagnosis of Chlamydia trachomatis uerthritis in men by polymerase chain reaction assay of first- catch urine. J Clin Microbiol 1993; 31: 3013-3016.

24. Schachter J, F Pang, RM Parks, RF Smith, and AS Armestrong. Use of gonozyme on urine sediment for diagnosis of gonorrhea in males. J Clin Microbiol 1986; 23: 124-125.

25. Mahony JB, KE Luiastra, JW Sellors, D Jang and MA Chernesky. Confirmatory polymerase chain reaction testing for Chlamydia trachomatis in first void urine from asymptomatic and symptomatic men. J Clin Microbiol 1992; 30: 2241-2245.

26. Palmer, H. M., C. B. Gilroy, B. J. Thomas, P. E. Hay, C. Gilchrist, and D. Taylor-Robinson. 1991. Detection of *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction in swabs and urine from men with non-gonococcal urethritis. J. Clin. Pathol. 44:321–325.

27. Mahony JB, KE Lainstra, JW Sellors, L. Pickard, S Chong D Jang and MA Chernesky. Role of confirmatory PCRs in determining performance of Chlamydia amplicor PCR with endocervical specimens from women with a low hlamydia of infection. J Clin Microbiol 1994; 32: 2490-2493.

28. Ossewarde JM, M Rieffe, M Rozenberg-Arska, PM Osseakoppele, RP Nawrocki, and AM Van Loon. Development and clinical evaluation of a polymerase chain reaction tests for detection of Chlamydia trachomatis. J Clin Microbiol 1992; 30: 2122-2128.

29. Stamm WE, M Tam, M Koester and L Cles. Detection of Chlamydia trachomatis inclusion in McCoy cell cultures with flurescein-conjugated monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1983; 17: 666-668.

www.SID.ir