فراوانی کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه‌های تناسلی شهر کرمان با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

محمد خلیلی،[۲و۱*] منیژه عطاپور،[۲] بی‌بی‌شهناز عالی،[۳] غلام‌عباس عزیزاللهی،[۴] سعید عزیزاللهی[۵]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدباهنر کرمان
۲- کمیته عفونی و بیماریهای گرمسیری مرکز تحقیقات علوم پزشکی کرمان
۳- گروه بیماری‌های زنان و زایمان و مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۴- گروه ارولوژی
دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۵- دانشجوی دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدباهنر کرمان

*نویسنده مسئول، کرمان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، تلفن:۰۳۴۱۳۲۲۲۰۴۷
email: mdkhalily@mail.uk.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: کلامیدیا تراکوماتیس یک باکتری داخل سلولی اجباری است و به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل بیماری‌های مقاربتی قلمداد می‌گردد. اصلی‌ترین تظاهرات بالینی عفونت با کلامیدیا تراکوماتیس اورتریت و سرویسیت است. از بین روش‌های مرسوم در تشخیص باکتری کلامیدیاتراکوماتیس، روش‌های مبتنی بر تشخیص اسید نوکلئیک مانند PCR، به‌خاطر حساسیت و ویژگی بسیار بالا، از مقبولیت بیشتری برخوردارند. هدف از این مطالعه تشخیص فراوانی کلامیدیاتراکوماتیس در نمونه‌های تناسلی اخذ شده در شهر کرمان با روش PCR بود. ***روش بررسی:*** برای انجام مطالعه ۱۳۰ نمونه تناسلی توسط پزشکان متخصص مشتمل بر ۶۴ نمونه اندوسرویکال و ۶۶ نمونه اورترال به ترتیب از موارد سرویسیت و اورتریت اخذ گردید و با تست PCR فراوانی باکتری کلامیدیا تراکوماتیس مورد ارزیابی قرارگرفت. ***یافته‌ها:*** ۹/۲٪ از نمونه‌ها از نظر کلامیدیاتراکوماتیس مثبت تشخیص داده شد که از این میان، در چهار نمونه (۶/۲۵٪) از ۶۴ نمونه سرویست و هشت نمونه (۱۲/۱٪) از ۶۶ نمونه مردان با علائم اورتریت با روش PCR کلامیدیا تراکوماتیس تشخیص داده شد. ***نتیجه‌گیری:*** نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که این باکتری می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل بیماری‌های مقاربتی در شهر کرمان مطرح باشد و خصوصا در نمونه‌های اورتریت مردان در موارد مثبت باید درمان به موقع و اطلاع‌رسانی در جهت ممانعت از انتقال آن به شریک جنسی داده شود.

کلمات کلیدی: کلامیدیا تراکوماتیس، PCR، اورتریت، سرویسیت و کرمان

مقدمه

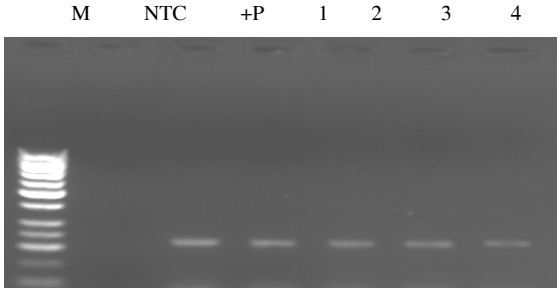
کلامیدیا تراکوماتیس (*Chlamydia trachomatis*) یک باکتری داخل سلولی اجباری است و به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل بیماری‌های مقاربتی قلمداد می‌گردد.[۱و۲] طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی (WHO) از سال ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۹در سرتاسر دنیا برآورد می‌شود بیش از۹۲ میلیون نفر به کلامیدیا تراکوماتیس مبتلا شده‌اند. تظاهرات بالینی عفونت‌های تناسلی کلامیدیائی در مردان اورتریت، اپیدیدمیت و در زنان سرویسیت موکوسی چرکی، بیماری التهاب مزمن لگنی، حاملگی نابجا و ناباروری است. عفونت ناشی از این باکتری خصوصا در زنان بیش از ۶۰ تا ۸۰ درصد مواقع بدون علامت است. توصیه سازمان بهداشت جهانی (WHO) در جهت کنترل و پیشگیری این عفونت تأکید بر شناسائی و درمان سریع آن است. بیش از ۵۰ درصد از اورتریت‌های غیر گونوکوکی در مردان توسط این باکتری ایجاد می‌شود.[۲-۵] این باکتری ۱۵ سروار داشته که سرووارهای D-K در عفونت‌های تناسلی چشمی و سرووارهای L1-L3 در لنفوگرانولومای آمیزشی همراه است.[۲] در گذشته راه تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس، جداسازی باکتری در روی کشت سلول بود. این روش علی‌رغم داشتن اختصاصیت بالا از حساسیت پائینی برخوردار بوده و حداقل به ۷۲ ساعت زمان نیاز دارد. الیزا دیگر روش به‌کار رفته در تشخیص این باکتری است که از حساسیت و ویژگی کمتری برخوردار است. بیش از یک دهه است که از روش‌های مبتنی بر تشخیص اسید نوکلوئیک مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و واکنش زنجیره‌ای لیگاز (LCR) به‌خاطر حساسیت و ویژگی بسیار بالا در آزمایشگاه‌های تشخیصی برای تشخیص این عفونت استفاده می‌شود.[۶-۸] از آنجائی که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در کرمان روی فراوانی کلامیدیاتراکوماتیس در عفونت‌های تناسلی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-12]

صورت نگرفته، هدف این مطالعه بررسی فراوانی باکتری کلامیدیا تراکوماتیس در عفونت‌های تناسلی مردان و زنان مراجعه‌کننده به کلینیک‌های درمانی شهر کرمان با روش PCR است.

روش بررسی

این تحقیق یک مطالعه مقطعی از ۱۳۰ نفر است که با علائم بیماری‌های تناسلی (اورتریت و سرویسیت) بنا به تشخیص پزشک متخصص، از تاریخ بهمن ۸۴ تا آبان ۸۵ به کلینیک‌های بیمارستان افضلی‌پور کرمان مراجعه نموده‌اند. از این تعداد ۶۴ نمونه اندوسرویکال از زنان و ۶۶ نمونه اورترال از مردان با سواپ‌های استریل توسط پزشکان متخصص اخذ گردید. نمونه‌ها پس از اخذ در محیط ترانسپورت ویژه کلامیدیا (Mastazyme، اروپا) انتقال و در دمای منهای ۸۰ درجه برای مطالعه نگهداری شد. استخراج اسید نوکلئویک: اسید نوکلئویک نمونه‌ها توسط کیت استخراج DNA مبتنی بر میکروکالومن (Bioneer، کره) استخراج گردید. اولیگونوکلئوتیدها: در این مطالعه از پرایمرهای منتشر شده توسط Storm استفاده شد، این پرایمر قابلیت تکثیر نمودن ناحیه مشترک و اختصاصی به طول ۲۲۵ جفت باز از ژن omp2 کلامیدیا تراکوماتیس را داراست.[9] پرایمرها توسط شرکت Bioneer، کره ساخته شد. ویژگی این پرایمرها در سایت blast کنترل شد. توالی پرایمرها عبارت است از: GtF1: (5-CCT GGA GAT CTT GTG TTG GGA GAT-3)، (5-AGT ACC ACA GTC AGA GCA GCT CTT-3): CtR1. شرایط PCR در غلظت‌های مختلف پرایمر و یون منیزیم کلراید و دماهای مختلف آنلینگ با سوش رفرانس کلامیدیاتراکوماتیس سرووار L2 (Mastazyme، اروپا) بهینه‌سازی گردید و بهترین شرایط واکنش به شرح زیرانجام گردید. پرایمرها با غلظت ۲۰ پیکومول، dNTPs(Biozyme، دانمارک) ۰/۲ میلی‌مولار، Mgcl 2 ۱/۵ میلی‌مولار، PCR بافر x ۱۰، ۲/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq (Biozyme، دانمارک) دو واحد و نهایتا دو میکرولیتر از DNA به میکروتیوب اضافه شد. حجم نهائی با آب مقطر دیونیزه به ۲۵ میکرولیتر رسید. در کنار نمونه‌های تست از سوش رفرانس به‌عنوان کنترل مثبت و همچنین از یک کنترل منفی (NTC) واجد همه مواد واکنش به استثنای DNA استفاده گردید. نمونه‌ها در داخل دستگاه ترمال سایکلر (Corbett، استرالیا) قرار گرفت و مراحل پیش دناتوراسیون در ۹۴ درجه به مدت سه دقیقه،



شکل- ۱: نمایش محصولات PCR. M: مارکر ۵۰ bp، NTC: کنترل منفی؛ (Non Template Control)، +P: کنترل مثبت. ۱-۴: نمونه‌های تست مثبت.

۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، آنیلینگ در ۶۰ درجه به مدت یک دقیقه و Extension در دمای ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. بعد از مراحل فوق نمونه‌ها توسط دستگاه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه و سپس در دمای چهار درجه نگهداری می‌شد. الکتروفورز محصولات نمونه‌های تست به‌همراه کنترل‌های مثبت و منفی روی ژل آگاروز ۱٪ حاوی اتیدیوم برماید (فرمنتاس، آلمان) به میزان ۰/۵ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر ژل و مارکر bp ۵۰ (فرمنتاس، آلمان) الکتروفورز شدند (شکل ۱).

یافته‌ها

انجام PCR روی ۱۳۰ نمونه سواپ اخذ شده نشان داد که ۱۲ مورد (۹/۲٪) از نمونه‌ها از نظر کلامیدیاتراکوماتیس مثبت هستند، که از این میان، از ۶۴ نمونه زنان با علائم سرویست چهار نمونه (۶/۲۵٪) و از ۶۶ نمونه مردان با علائم اورتریت هشت نمونه (۱۲/۱٪) مثبت شد (شکل ۱).

بحث

هدف از انجام این مطالعه بررسی فراوانی کلامیدیا تراکوماتیس در بین مراجعین به کلینیک‌های بیماری‌های تناسلی زنان و مردان در شهر کرمان بود. کلامیدیا تراکوماتیس به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل اورتریت و سرویسیت مطرح می‌باشد.[1و2] نتایج مطالعات متعدد توسط محققین مختلف حاکی از اینست که روش PCR در تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس از حساسیت بسیار بیشتری نسبت به روش کشت دارا است. حساسیت و ویژگی تست PCR روی نمونه‌های تناسلی به ترتیب ۱۰۰-۹۰٪ و ۹۹٪ می‌باشد. این در حالی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-12]

است که حساسیت روش کشت در تشخیص کلامیدیاتراکوماتیس بین ۵۰ تا ۶۲٪ گزارش شده است.[۱۲و۱۱و۸و۶] در این مطالعه برای بالا بردن حساسیت تست PCR در جهت حذف عوامل ممانعتی PCR در استخراج اسید نوکلئیک از روش میکروکالومن با استفاده از کیت‌های تجاری استفاده گردید و همچنین طبق پیشنهاد سایر محققین در جهت زدودن عوامل ممانعتی نمونه‌ها به ترتیب ۲۴ ساعت در ۸۰- درجه سانتیگراد و سپس در دمای یخچال به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند.[۱۳] در این مطالعه میزان فراوانی کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه‌های اورتریت ۱۲/۱٪ و در نمونه‌های سرویسیت ۶/۲۵٪ با روش PCR مشخص گردید. مطالعات اندکی در ایران روی اپیدمیولوژی کلامیدیا تراکوماتیس وجود دارد: در مطالعه فتح‌الله‌زاده در۲۲/۴٪ از نمونه‌های اورتریت کلامیدیا تراکوماتیس مثبت بود.[۱۴] مطالعات دیگر که در مورد سرویسیت انجام شده حاکی از تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس به‌میزان ۱۴/۹ و ۱۵/۵٪ از نمونه‌ها می‌باشد.[۱۶و۱۵] مطالعات مختلف از نقاط مختلف آسیا حاکی از ابتلا ۵/۶٪ در تایلند تا ۱۷٪ از هند را گزارش می‌نماید. بیشترین ابتلا نیز از کشور آفریقائی گینه نو به‌میزان ۲۷٪ گزارش شده است.[۱۹-۱۷] آنچه که از مجموع مطالعات بر می‌آید آن است که شیوع کلامیدیا تراکوماتیس مانند دیگر عوامل بیماری‌های مقاربتی قابل انتقال از کشوری به کشور دیگر و حتی در داخل کشورها متفاوت می‌باشد و برای روشن شدن میزان واقعی شیوع این باکتری در ایران نیاز به مطالعات بیشتر می‌باشد.

هزینه این تحقیق طی طرح شماره ۸۴/۴۲ از طرف معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان پرداخت گردید و انجام آزمایشات PCR در آزمایشگاه سلولی مولکولی مرکز تحقیقات علوم و اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان صورت گرفته است. بدین وسیله مراتب قدردانی خود را از مراکز فوق ابراز می‌داریم.

References

1. Beagley KW, Timms P. Chlamydia trachomatis infection: incidence, health costs and prospects for vaccine development. *J Reprod Immunol* 2000; 48: 47-68.
2. Jeffrey FP. Genital chlamydial Infections. *N Engl J Med* 2003; 349: 2424-30.
3. Grant JB, Costello CB, Sequeira PJ, Blacklock NJ. The role of Chlamydia trachomatis in epididymitis. *Br J Urol* 1987; 60: 355-9.
4. Jones RB. Chlamydia Trachomatis. In: Mandell G, Douglas R, Bennett J, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Churchill Livingstone: New York: 2000; p. 2242-57.
5. World Health organization. Global prevalence and incidence of selected curable. WHO report 2000; World Health organization 2000, Geneva.
6. Crotchfelt KA, Pare B, Gaydos C, Quinn TC. Detection of Chlamydia trachomatis by the Gen-Probe AMPLIFIED Chlamydia Trachomatis Assay (AMP CT) in urine specimens from men and women and endocervical specimens from women. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 391-4.
7. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 160-84.
8. Johnson RE, Green TA, Schachter J, Jones RB, Hook EW 3rd, Black CM, et al. Evaluation of nucleic acid amplification tests as reference tests for Chlamydia trachomatis infections in asymptomatic men. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4382-6.
9. Storm M, Gustafsson I, Herrmann B, Engstrand L. Real-time PCR for pharmacodynamic studies of Chlamydia trachomatis. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 361-7.
10. Fredlund H, Falk L, Jurstrand M, Unemo M. Molecular genetic methods for diagnosis and characterisation of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: impact on epidemiological surveillance and interventions. *APMIS* 2004; 112: 771-84.
11. Higgins SP, Klapper PE, Struthers JK, Bailey AS, Gough AP, Moore R, et al. Detection of male genital infection with Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae using an automated multiplex PCR system (Cobas Amplicor). *Int J STD AIDS* 1998; 9: 21-4.
12. Van Der Pol B, Quinn TC, Gaydos CA, Crotchfelt K, Schachter J, Moncada J, et al. Multicenter evaluation of the AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for detection of Chlamydia trachomatis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1105-12.
13. Toye B, Woods W, Bobrowska M, Ramotar K. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for Chlamydia trachomatis testing. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2356-8.
۱۴. فتح الله زاده ب، میرصالحیان ا، کاظمی ب، ارشدی ح، پوراکبری. تشخیص کلامیدیاتراکوماتیس و نایسریاگونوره آدر نمونه های ادراری-تناسلی بیماران مبتلا به اورتریت با روش PCR وMultiplex PCR. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۱۳۸۳: سال ٦٢، شماره ٦، صفحات ٤٤٩ تا ٤٥٦.
15. Fallah F, Kazemi B, Goudarzi H, Badami N. Detection of Chlamydia trachomatis from Urine Specimens by PCR in Women with Cervicitis. *Iranian J Publ Health* 2005; 34: 20-6.
16. Zaeimi Yazdi J, Khorramizadeh MR, Badami N, Kazemi B, Aminharati F, Eftekhar Z, et al. Comparative Assessment of Chlamydia trachomatis Infection in Iranian Women with Cervicitis: A Cross-Sectional Study. *Iranian J Publ Health* 2006; 35: 69-75.
17. Kilmarx PH, Black CM, Limpakarnjanarat K, Shaffer N, Yanpaisarn S, Chaisilwattana P, et al. Rapid assessment of sexually transmitted diseases in a sentinel population in Thailand: prevalence of chlamydial infection, gonorrhoea, and syphilis among pregnant women: 1996. *Sex Transm Infect* 1998; 74: 189-93.
18. Passey M, Mgone CS, Lupiwa S, Suve N, Tiwara S, Lupiwa T, et al. Community based study of sexually transmitted diseases in rural women in the highlands of Papua New Guinea: prevalence and risk factors. *Sex Transm Infect* 1998; 74: 120-7.
19. Paul VK, Singh M, Gupta U, Buckshee K, Bhargava VL, Takkar D, et al. Chlamydia trachomatis infection among pregnant women: prevalence and prenatal importance. *Natl Med J India* 1999; 12: 11-4.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-12]

Tehran University Medical Journal; Vol. 66, No. 2, May 2008: 127-130

Frequency of *Chlamydia trachomatis* in genital specimens: Kerman city, PCR method

Khalili M.[*1,2]
Atapour M.[2]
Aali S.[3]
Azizollahi GA.[4]
Azizollahi S.[5]

1- Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman
2- Committee of Infectious and tropical disease Kerman University of Medical Sciences

3- Department of Obstetrics and Gynecology and Physiology Research Kerman University of Medical Sciences

4- Department of Urology Kerman University of Medical Sciences

5- Student of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman

*Corresponding author: Shahid Bahonar University of Kerman, Veterinary Medicine, Kerman, Iran.
Tel: +98-341-3222047
email: mdkhalily@mail.uk.ac.ir

Abstract

***Background*:** *Chlamydia trachomatis* (CT) is an obligate intracellular bacterium that causes genital disease and the most common sexually transmitted infection in the world. The most frequent risk factors associated with chlamydial infection are related to sexual behavior, multiple partners, and inconsistent condom use. Presenting primarily as urtheritis in men and cervicitis in women, CT a major cause of chronic pelvic inflammatory disease and subsequent infertility in women, eye and lung infection in newborns and other manifestations. Identification of CT-infected patients may prevent its spread and thereby reduce the high morbidity associated with CT infections. Polymerase chain reaction (PCR) is a sensitive and specific method for the detection of small quantity of bacterial DNA in clinical samples. The aim of this study was to determine the frequency of *C. trachomatis* by PCR in genital samples from patients in the city of Kerman.

***Methods*:** A total of 130 genital samples including 64 endocervical and 66 urethral swab samples were collected by physicians. Nucleic acid was extracted from each sample using a commercial DNA extraction kit. PCR primers specific for a conserved region of the *C. trachomatis omp2* gene, encoding an outer membrane protein, were used for amplification.

***Results*:** A total of 9.2% (6.25% of cervicitis and 12.1% of urethritis) of the samples were found positive for CT using this PCR method.

Conclusions: The present study shows a high prevalence of CT infection, especially in men with urethritis. Such patients should be referred to genitourinary clinics for treatment and partner notification. Given its worldwide prevalence, further CT studies on more populations are needed to assess potential public health implications of these infections.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, PCR, uerthritis, cervicitis, kerman.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-12]