

روشهای تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس (*Chlamydia trachomatis*)

محمود جدی تهرانی

استادیار ایمنولوژی، مدیر گروه پژوهشی ایمنولوژی تولید مثل پژوهشکده ابن سینا.

چکیده

با شیوع پنجاه میلیون مورد آلودگی در سال، کلامیدیا تراکوماتیس شایعترین عفونت باکتریایی منتقله از راه تماس جنسی میباشد. جمع زیادی از افراد آلوده به آن، خصوصاً زنان بدون علائم هستند و این افراد نقش ناقل و منبع این آلودگی را ایفا میکنند. زنان همچنین در خطر ابتلا به مشکلات جدی دستگاه تناسلی بوده و این مشکل درجه شیوع بالایی نیز دارد. در راه برنامه‌ریزی برای جلوگیری از پخش این عفونتها، توجه زیادی به تشخیص و درمان زودرس آنها شده است. اقدام به استفاده از تستهای حساس و بسیار اختصاصی تکثیر اسیدهای نوکلئیک برای تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس، استفاده از تستهای غیرتخریبی (noninvasive tests) را در زنان بسیار مناسب و راحت کرده است. مطالعات اخیر نشان داده است که تستهای تکثیر اسیدهای نوکلئیک حساسیت کافی برای ردیابی کلامیدیا در اولین نمونه ادرار زنان را دارند. در مقایسه با تشخیص از طریق تستهای غیر کشتی استاندارد روی نمونه‌های endocervical، حساسیت تستهای تکثیر اسیدهای نوکلئیک در اکثر مطالعات از مرز ۹۵٪ فراتر رفته و در همان حال هنوز هم بسیار اختصاصی عمل میکنند.

واژه‌های کلیدی: کلامیدیا تریکوماتیس، کشت بافتی، PCR, EIA, PACE2.

آدرس مکاتبه: تهران، اوین، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده ابن سینا، صندوق پستی ۱۷۷-۱۹۸۳۵.

مقدمه

کلامیدیا تراکوماتیس شایعترین عفونت باکتریایی است که از طریق جنسی منتقل میشود و آمار شیوع سالیانه آن به حدود ۵۰ میلیون مورد میرسد (۱). گروه بزرگی از افراد مبتلا به این عفونت، خصوصاً زنان، بدون علائم هستند و این افراد بعنوان یک منبع اصلی این عفونت محسوب میشوند. همچنین زنان در معرض خطر جدی عفونت مجاری تناسلی با شیوع بسیار بالا بوسیله این عفونت قرار دارند. در حال حاضر به منظور جلوگیری از انتشار این عفونت توجه زیادی به تشخیص و درمان سریع آن شده است. ابداع روش‌های بسیار حساس و اختصاصی تکثیر اسیدهای نوکلئیک برای تشخیص کلامیدیا امکان استفاده از تست‌های غیرتخریبی (noninvasive) را در زنان میسر ساخته است. مطالعات اخیر نشان داده است که تست‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک به اندازه‌ای حساس هستند که میتوانند وجود عفونت این باکتری را در اولین نمونه ادرار زنان نشان دهند. هم‌اکنون میزان حساسیت این تست‌ها در مقایسه با تست‌های استاندارد بدون استفاده از کشت سلولی از مرز ۹۵٪ گذشته و این در حالی است که تست‌های مزبور در حد بسیار بالایی اختصاصی میباشند. از حدود ۵۰ میلیون مورد عفونت سالیانه این باکتری بیش از ۳ میلیون مورد آن در سال ۱۹۹۵ تنها در کشور آمریکا گزارش شده است (۲) این میزان آلودگی نه تنها عفونت کلامیدیایی را شایعترین عفونت از طریق انتقال جنسی بلکه آن را شایع‌ترین بیماری عفونی در آمریکا مینمایند. آمار جنسی کلامیدیا در سنین بلوغ بین زنان آمریکا اغلب بیش از ۲۰٪ میباشد (۱). ولی عفونت باکتریایی دهانه رحم (cervical infection) در بیش از ۷۰٪ زنان مبتلا بدون علائم میباشد. کلامیدیا تراکوماتیس یک عامل عفونت لگنی است که میتواند منجر به ناباروری و حاملگی نابجا گردد (۳). بعلاوه بچه‌هایی که از مادر آلوده زاده میگردند در معرض خطر

ابتلا به بیماریهای چشمی (conjunctivitis) و یا ذات‌الریه قرار دارند (۴). لذا جهت جلوگیری از انتشار عفونت کوشش زیادی در جهت تشخیص و درمان سریع عفونت کلامیدیایی صورت پذیرفته است. در این مقاله سعی گردیده که روش‌های مختلف بکار گرفته شده در تشخیص کلامیدیا به اجمال معرفی گردند.

خصوصیات کلی روش‌های تشخیص کلامیدیا

تراکوماتیس

روش‌های تشخیص گوناگونی برای شناسایی کلامیدیا استفاده میشوند. این روشها بر اساس هدف، از انجام تست تشخیصی، منطقه جغرافیایی انجام آزمایش، در دسترس بودن امکانات و... متفاوت هستند اما بطور کلی جهت تشخیص کلامیدیا، تست‌های بکار برده شده باید خصوصیات داشته باشند که از آن جمله میتوان موارد زیر را نام برد:

- آسان بودن تست

هر چه تست تشخیصی آسانتر انجام گردد پیچیدگی تفسیر نتیجه آن کمتر بوده و تصمیم بر چگونگی برخورد با مورد مطالعه آسانتر انجام خواهد گرفت.

- سریع بودن تست

از آنجا که طولانی شدن تشخیص یک عفونت باکتریایی میتواند عواقب سختی برای بیمار داشته باشد هر چه تست تشخیص سریعتر انجام گردد عوارض کمتری عارض بیمار میگردد و نیز هر چه فاصله زمانی بین رسیدن نمونه به آزمایشگاه و آماده شدن پاسخ آزمایش کوتاهتر گردد اطمینان بر صحت اجرای تست بیشتر میشود.

- غیر تخریبی بودن نمونه برداری

هر چه تست تشخیصی بر پایه نمونه برداری آسانتر پایه گذاری گردد امکان بررسی تعداد بیماران بیشتر و پوشانیدن طیف سنی وسیعتری در بین بیماران امکان پذیرتر خواهد بود. در بررسی آماری شیوع

کلامیدیا تراکوماتیس استاندارد نشده‌اند و تغییرات زیادی در نتیجه کشت آن میان آزمایشگاه‌های مختلف وجود دارد (۵). همچنین گرفتن نمونه مناسب برای کشت کلامیدیا از زنان نیاز به معاینه لگنی (تست تخریبی) دارد که خود محدود کننده نحوه استفاده از این تست برای تشخیص کلامیدیا میباشد.

- استفاده از تست‌های غیر کشت بافتی برای تشخیص کلامیدیا در نمونه‌های کلینیکی

اولین بار تست‌های غیر کشتی در دهه ۱۹۸۰ مورد استفاده قرار گرفت. این تستها با استقبال دانشمندان مواجه شد چرا که برای انجام آنها نیاز به نمونه زنده نبود و بنابراین برخی از مشکلات نمونه برداری و حمل و نقل نمونه‌ها را که در رابطه با کشت بافتی وجود داشت شامل نمیشد. این تستها همچنین امکان تشخیص سریع یعنی آماده شدن پاسخ آزمایش در شرایطی که بیمار مستقیم پس از نمونه برداری منتظر آن بود را فراهم می‌کرد.

- تست DFA

اولین تست تشخیص کلامیدیا به روش غیر کشت سلولی، تست مستقیم آنتی بادی مونوکلونال کوئزوگه شده با ماده فلورسانس Direct Fluorescein-Conjugated monoclonal antibody (DFA) بود که یک اپیتوپ اختصاصی گونه کلامیدیا تراکوماتیس را شناسایی میکند (۶). گرچه در این روش میتوان جواب را ظرف مدت ۳۰ دقیقه آماده نمود، ولی DFA را نمیتوان از نظر کلینیکی یک تست عملی اطلاق کرد، زیرا برای انجام آن به میکروسکوپ فلورسانس نیاز است که مطب اغلب پزشکان عاری از آن است. همچنین به یک تکنسین ورزیده برای خواندن نمونه‌ها نیز نیاز میباشد. بعلاوه هنوز معاینه لگنی برای گرفتن نمونه از ناحیه endocervical (تخریبی) نیاز است. حساسیت DFA از کشت سلولی کمتر بوده و حدود ۷۰-۹۰٪ میباشد که بستگی به محل نمونه برداری و شرایط کلینیکی بیمار

آلودگی به کلامیدیا، اگر تست تشخیصی بر پایه نمونه برداری تخریبی گذاشته شود عملاً نمونه برداری از تعداد کافی افراد مورد مطالعه امکان پذیر نبوده و به میزان کافی افراد داوطلب نمونه برداری در دسترس نخواهد بود. در صورتی که نمونه‌های غیر تخریبی مانند نمونه ادرار براحتی و به تعداد کافی در دسترس خواهد بود. البته در صورت نیاز به تشخیص افرادی که مشکوک به آلودگی کلامیدیایی هستند اگر موضوع در شرایط حاد قرار داشته باشد ممکن است نیاز به نمونه برداری تخریبی باشد که در این صورت اینگونه نمونه برداری اجتناب ناپذیر خواهد بود.

- حساسیت بالا و اختصاصی بودن

تست تشخیصی باید از حساسیت بالایی برخوردار باشد که در صورت مشکوک بودن به عفونت کلامیدیایی با میزان کم آلودگی، تست مربوطه توان تشخیص این نوع ضعیف عفونت را داشته باشد. هر چه تست تشخیصی توان شناسایی تعداد کمتری باکتری را داشته باشد از حساسیت و متعاقب آن از ارجحیت بیشتری برخوردار خواهد بود. ضمناً تست تشخیصی باید حتی المقدور اختصاصی باشد و بروز هر گونه واکنش متقاطع با ارگانسیم‌های دیگر میتواند تفسیر نتایج تست را مشکل‌تر و غیر قطعی‌تر نماید.

روشهای گوناگون تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس

- روش کشت بافتی

تا دهه ۱۹۸۰ میلادی تشخیص عفونت کلامیدیایی در درجه اول بر اساس جداسازی باکتری از کشت بافت قرار داشت. در این روش جمع آوری نمونه باید بسیار دقیق صورت میگرفت و نیز شرایط سخت و پیچیده برای انتقال نمونه به آزمایشگاه لازم بود و نمونه همواره باید در شرایط یخچالی حمل می‌شد. ضمناً انجام کشت سلولی برای جداسازی این میکروارگانسیم بین ۴۸ تا ۷۲ طول می‌کشید. بعلاوه روش‌های کشت

دارد، ولی اختصاصی بودن این تست بالا و بیش از ۹۵٪ است. لذا روش DFA برای جوامعی که دارای شیوع بالای عفونت کلامیدیایی بوده و در آنها امکانات کشت سلولی میسر نیست روشی بسیار مناسب تلقی می‌گردد. این در حالی است که به علت نوع و روش انجام تست نمیتوان از آن برای غربالگری تعداد زیاد نمونه استفاده کرد.

Enzyme Immunoassays (EIA)- پس از DFA روش‌های EIA عرضه شد. این فن آوری بیشترین انواع تست‌های تشخیصی تجاری را شامل شده است (۷). در این تست ها معمولاً یک آنتی بادی مونوکلونال یا پلی کلونال بر علیه آنتی ژن‌های لیپوپلی ساکاریدی باکتری که برای گونه باکتری اختصاصی باشند استفاده میشود. برخلاف DFA تست‌های EIA به صورت نیمه اتوماتیک انجام میشوند و برای بررسی تعداد زیادی نمونه مناسب میباشند. کارایی EIA نسبت به زمان شروع آن در دهه ۱۹۸۰ پیشرفت‌های زیادی کرده است. میزان حساسیت این تستها بر روی نمونه های برداشته شده از دهانه رحم حدود ۷۵-۸۰٪ بوده و حدوداً ۹۸٪ اختصاصی میباشند. برای تایید پاسخ‌های مثبت نیز تست‌های بلوک‌ان ابداع گردیده که باعث افزایش میزان اختصاصی بودن آنها تا ۹۹٪ شده است.

اختصاصی بودن آن ۹۹٪ > میباشد (۷). با وجود پیشرفت‌هایی که در حساسیت تست های نامبرده ایجاد شده این تست‌های غیر کشتی برای جوامع با درجه شیوع پایین زیاد مفید نیستند. بعلاوه همه این تست‌ها نیاز به نمونه برداری تخریبی دارند. اما در سال‌های اخیر علاقه زیادی به استفاده از تست‌های EIA روی نمونه ادرار (غیر تخریبی) خصوصاً در مردان نشان داده شده است. البته در این روش نیز ادرار باید سانتریفوژ شده و رسوب آن که حاوی سلولهای آلوده به کلامیدیا است برای تست بکار برده شود. بطور کلی تست‌های EIA بر روی نمونه های ادرار مردان با علائم عفونت به کلامیدیا بهترین عملکرد را نشان داده‌اند. زمانی که کشت مجرا با تست های EIA ادرار مردان مقایسه گردید، تست‌های EIA از خود حساسیتی حدود ۵۵-۸۶٪ نشان دادند و میزان اختصاصی بودن آنها ۹۴٪ > بود (۷).

استفاده از تست های تکثیر اسیدهای نوکلئیک در

تشخیص کلامیدیا

عملکرد ضعیف اینگونه تستها، استفاده از آنها بعنوان یک روش غربالگری را در جوامع با شیوع پایین عفونت کلامیدیایی غیر قابل توجیه می‌سازد. بعلاوه بعلت حساسیت پایین تست‌های EIA در نمونه‌های ادرار نمیتوان از آنها برای نمونه ادرار زنان استفاده کرد.

احتمالاً رایج‌ترین تست غیرکشتی برای تشخیص کلامیدیا یا تست PACE2 میباشد. این تست در آزمایشگاه‌های بسیاری از بیمارستانها و مراکز بهداشتی آمریکا استفاده میشود. در این تست مستقیماً از یک نشانگر (probe) اسید نوکلئیکی که به یک ناحیه اختصاصی 16S rRNA کلامیدیا تراکوماتیس هیبریدیزه میشود استفاده میشود و اینگونه از کلامیدیا را با استفاده از کمیلومینسانس بطور اختصاصی شناسایی میکند. عملکرد این تست شبیه تست های EIA موجود است و میزان حساسیت آن ۷۵-۸۰٪ و میزان

این پلاسמיד ۱۰ نسخه در هر سلول وجود دارد) روش دیگری که در آن از فن‌آوری تکثیر اسیدهای نوکلئیک استفاده می‌شود تست Transcription-Mediated Amplification (TMA) است (۷) که در آن RNA تکثیر می‌گردد. در این روش از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (Reverse Transcriptase, RT) و نیز یک RNA پلی‌مراز T7 استفاده می‌شود. از مشکلات LCR, PCR نیاز به دو دستگاه ترموسیکلر است، در حالی که چون TMA ایزوترمال است، نیازی به چنین دستگاهی ندارد. همانگونه که در جدول ۱ نشان داده شده است، کشت می‌تواند حدود ۱۰-۱۰۰ ارگانیزم را شناسایی کند. در حالی که تست‌های تکثیر DNA می‌توانند ۱-۱۰ ارگانیزم را بیابند. ابداع تست‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک مهمترین پیشرفت در تشخیص کلامیدیا پس از ابداع کشت بافت و جداسازی باکتری بوده است. بعلاوه حساسیت فوق‌العاده این تستها، امکان نمونه‌برداری غیرتخریبی (ادرار) برای انجام تست‌های غربالگری در مردان و زنان بدون علائم عفونت کلامیدیایی ایجاد شده است.

در حال حاضر هر سه نوع تست تکثیر اسیدهای نوکلئیک نامبرده برای تشخیص کلامیدیا در نمونه‌های سوآب دهانه رحم، نیز ادرار زنان توسط اداره نظارت بر مواد غذایی و داروی آمریکا (FDA) تایید شده است. این تستها حدود ۲۵-۳۰٪ حساسیت بیشتری نسبت به روش کشت بافت دارند (۷). مطالعات مختلف نشان داده است که هر یک از این تستها حساسیتی ۸۰-۱۰۰٪ >

تست	حداقل تعداد ارگانیزم
تکثیر DNA/RNA	$10^1 - 1$
کشت	$10^2 - 10$
DFA	$10^2 - 10$
EIA	$10^0 - 10^4$
پروب DNA	$10^3 - 10^4$

جدول ۱: حد نسبی روش‌های مختلف برای ردیابی و تشخیص

دارند در حالیکه حساسیت معادل آن در روش کشت ۶۵-۸۸٪ است. ضمناً این تستها با وجود حساسیت بالا از درجه اختصاصی بودن بالایی نیز برخوردارند (۹۵-۱۰۰٪) (۷). تست‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک از تست‌های EIA و تست‌های غیرتکثیری با استفاده از پروب DNA که در حال حاضر معمول هستند، حساستر می‌باشند. به عنوان مثال حساسیت PCR ۳۷٪ بیش از تست پروب DNA می‌باشد. در کنار مزایای فوق‌العاده تست‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک باید معایب آنها را نیز در نظر داشت. نتیجه منفی کاذب که در اثر وجود مهارکننده‌های پلی‌مراز DNA بوجود می‌آید از مشکلات بزرگ این تست‌ها است. این مهارکننده‌ها بیشتر در نمونه‌هایی که از دهانه رحم برداشته می‌شوند یافت می‌شود و نیز می‌توانند شامل مهارکننده‌های موجود در ادرار مثل BHCG، کریستالها، نیتريت‌ها و هموگلوبین باشند. تست LCR حساسیت کمتری به مهارکننده‌ها در مقایسه با PCR دارد. در کیت‌های تشخیص کلامیدیا که در حال حاضر مصرف می‌شوند هیچگونه کنترلی برای مهار تست گنجانده نشده است. بعلاوه از آنجا که هدف تست‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک پلاسמיד خاصی از کلامیدیا است (Cryptic plasmid) نمونه‌های نادری از کلامیدیا تراکوماتیس هستند که فاقد این پلاسמיד بوده و لذا قابل تشخیص با روش‌های فعلی PCR, LCR نمی‌باشند (۸). مهارکننده‌های موجود در ادرار عوامل عمده بروز نتیجه منفی کاذب در این تستها است. Mahony و همکارانش (۹) میزان بروز مهارکننده‌هایی که باعث مهار کامل تکثیر اسیدنوکلئیک شده بودند را برای PCR ۹/۴٪ برای LCR ۶/۲٪ و ۵/۷٪ برای TMA گزارش کردند. اکثر این اثر مهار (۸۴-۱۰۰٪) را می‌توان بوسیله نگهداری نمونه ادرار در طول شب در 4°C یا 70°C و ده برابر رقیق کردن نمونه خنثی نمود. و اگر چنانچه به سادگی روش‌های فوق نتوان

مهارکننده‌ها را خنثی کرد لازم است اسیدهای نوکلئیک به روش فنل کلروفوم استخراج شوند.

استفاده از تست‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک برای تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس در ادرار

در جمع‌آوری نمونه ادرار برای انجام این تستها بیمار نبایستی یک ساعت قبل از نمونه‌برداری مثانه خود را خالی کرده باشد و بانوان نبایستی قبل از دادن نمونه مخرج ادرار را پاک کنند. باید ۲۰-۱۰ میلی‌متر مکعب اول ادرار را در یک ظرف تمیز جمع‌آوری نموده و فوراً به دمای ۸-۲۰ سانتی‌گراد منتقل کرد. اگر بیش از ۳ ساعت بین نمونه برداری و تخلیه ادرار قبلی فاصله بیفتد میتواند باعث کم‌شدن حساسیت تستهای آنتی‌ژنی در زنان گردد. ولی بر روی نتیجه تست مردان تاثیری ندارد، ولی این افزایش زمان در نتیجه تستهای تشخیصی کلامیدیا با روش تکثیر اسیدهای نوکلئیک نه در زنان و نه در مردان تاثیری ندارد. زمانی را که نمونه ادرار در دمای اتاق نگهداری میشود باید به حداقل رساند

چه در این صورت PH اسیدی و مقدار زیاد اوره میتواند باعث دناتورشدن سریع DNA موجود در نمونه شده و دردمای بیش از ۲۵°C این عمل تسریع میگردد. انجماد ادرار تاثیری روی تست LCR ندارد ولی این عمل برای تست PCR هنوز تایید نشده. البته یخ زدن و آب کردن نمونه ادرار در واقع ممکن است با از بین بردن مهارکننده‌های ناپایدار نمونه، باعث افزایش حساسیت PCR نیز بشود. گرچه اکثر زنانی که دچار عفونت کلامیدیایی دستگاه تناسلی هستند، در ناحیه Urethra دچار عفونت نمیشوند، امکان یافتن اسیدهای نوکلئیک کلامیدیایی در نمونه ادرار آن بخوبی وجود دارد که احتمالاً بعلت ریزش سلولهای آلوده بداخل ادرار میباشد. همانگونه که در جدول ۲ نشان داده شده است، بررسی‌های اخیر عملکرد تست‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک برای تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس در ادرار زنان را ارزیابی کرده‌اند. این بررسیها

مؤلف - سال (شماره رفرنس)	تعداد افراد مورد مطالعه	نوع تست	شیوع %	حساسیت %	اختصاصی بودن %
Mouton et al 1997(10)	۴۵۶	PCR	۱۵	۸۴/۳	۹۸/۸
Guinn et al 1996(11)	۵۲۵	PCR	۸	۹۳/۳	۹۷/۶
Pasternack et al 1996(12)	۶۶۶	PCR	۵/۹	۸۲	۹۷/۷
Pualakkainen et al 1998(13)	۴۴۲	PCR	۶/۳	۹۶/۴	۹۹/۸
Vincelette et al 1999(14)	۱۲۵۳	PCR	۳/۶	۹۵/۱	۹۹/۸
Lee et al 1995(15)	۱۹۳۷	LCR	۸	۹۴	۹۹
Puolakkainen et al 1998(13)	۴۴۳	LCR	۵/۶	۹۲/۶	۱۰۰
Sary et al 1998(16)	۳۰۸	LCR	۸/۱	۹۶	۱۰۰
Crotchfelt et al 1998(17)	۴۸۰	TMA	۱۲/۵	۹۳/۸	۱۰۰
Sary et al 1998(16)	۳۰۸	TMA	۸/۱	۷۶	۹۹/۳
Ferrero et al 1998(18)	۶۰۷	TMA	۱۵/۴	۹۲/۳	۹۸/۶

جدول ۲- مطالعات اخیر برای ارزیابی تستهای تکثیر اسیدهای نوکلئیک که برای تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس در ادرار زنان استفاده شده‌اند (وقتی که این روش با کشت و یا با تستهای غیرکشتی که روی نمونه‌های آندوسرویکال یا مجرای انجام شده بودند مقایسه شد).

تست نمونه‌های follow up ادرار بیمارانی که ابتداً با PCR و نیز ۳/۷۳٪ نمونه‌هایی که ابتداً با LCR مثبت شده بودند یک تا سه روز بعد از درمان با یک دوز آزیترومایسین (Azithromycin) هنوز مثبت بودند. در واقع پانزده روز پس از درمان بود که کلیه نمونه‌ها از خود پاسخ منفی نشان دادند. هرچه عدد مربوطه کوچکتر باشد حساسیت تست بیشتر است.

حساسیت‌هایی را در حدود ۹۶٪-۷۶٪ و نیز درجه اختصاصی بودن ۱۰۰٪-۹۷٪ را نشان می‌دهند. در این رابطه آمار شیوع عفونت ۱۵٪-۶/۳٪ گزارش شده است (۱۰-۱۸). ارزیابی موفقیت درمان Test of Cure بکار روند Gaydos و همکارانش (۲۰) مشاهده کردند که ۴۰٪ ادرار احتمالاً تا تست‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک بر روی نمونه‌های ۳ هفته بعد از درمان نباید بعنوان

References

- 1- Qyubb TC. Recent advances in the diagnosis of sexually transmitted diseases. Sex transm Dis. 1994;24: (wuppl 2): S 19-S 27.
- 2- Centers for Disease Control and prevention. Ten leading nationally notifiable infectious diseases-US. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1996;45:883-884.
- 3- Centers for disease control and prevention recommendations for the prevention and management of Chlamydia trachomatis infections, 1993. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1993; 42: (RR-12): 1-39.
- 4- Hammerschlag MR. Chlamydia trachomatis trachomatis in children *pediatr Ann*, 1994; 23:349-353.
- 5- pate SP, Hook EW. Laboratory to laboratory variation in Chlamydia trachomatis culture practices. Sex transm Dis. 1995;22:322-326.
- 6- Tam M.R., Stamm W.E., Handsfield H.H., et al. Culture independent diagnosis of Chlamydia trachomatis infection using monoclonal antibodies. *N. Engl J Med*. 1984;310:1146-1150.
- 7- Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infection. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:160-184.
- 8- An Q, Olive DM. Molecular cloning and nucleic acid sequencing of Chlamydia trachomatis 16s-RNA from patient samples lacking the cryptic plasmid. *Mol Cell Probes*. 1994; 8:429-435.
- 9- Mahoney J, Chong S, Jang D, et al. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of Chlamydia trachoma is nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription mediated-amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *J Clin Microbiol*. 1998;36:3122-3126.
- 10- Mouton JW, Verkoonyen R, Vandermeijden WI, et al. Detection of Chlamydia trachomatis in male and female urine specimens by using the amplified Chlamydia trachomatis test. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1369:1372.
- 11- Quinn TC, Welsh L, Lentz A, et al. Diagnosis by AMPLICOR PCR of Chlamydia trachoma is infection in urine samples from women and men attending sexually transmitted disease clinics. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:1401-1406.
- 12- Pasternack R, Vuorinen P, Kuukankorpi A, Pitkajarvi T, Miettinen A. Detection of Chlamydia trachoma is infections in women by amplicor PCR: comparison of diagnostic performance with urine and cervical specimens. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:995-998.
- 13- Puolakkainen M, Hiltunen-Back, Reunula T, et al. Comparison of performances of two commercially available tests, a PCR assay and a ligase chain reaction test, in detection of urogenital Chlamydia trachomatis infection. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1489-1493.
- 14- Vincelette J, Schirm J, Bogard M, et al. Multicenter evaluation of the fully automated COBAS AMPLICOR PCR test for detection of Chlamydia trachomatis in urogenital specimens. *H Clin Microbiol*. 1999;37:74-80.
- 15- Lee HH, Chernesky MA, Schacher J, et al. Diagnosis of Chlamydia trachomatis genitourinary tract infection in women by ligase chain reaction assay of urine. *Lancet*. 1995; 345:213-216.

- 16- Stary A, Schuh E, Kerschenbaumer M, G tz B, Lee H. Performance of transcription-mediated amplification and ligase chain reaction assays for detection of Chlamydia infection in urogenital samples obtained by invasive and noninvasive methods. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2666-2670.
- 17- 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; 36:391-394.
- 18- Ferrero DV, Meyers HN, Schultz DE, Willis SA, Performance of the Gen Probe AMPLIFIED Chlamydia trachomatis assay in detecting Chlamydia trachomatis in endocervical and urine specimens from women and urethral and urine specimens from men attending sexually transmitted disease and family planning clinics. *J Clin Microbiol.* 1998;3230-3233.
- 19- Gaydos CA, Crotchfelt KA, Howell MR, Kralian S, Hauptman P, Quinn TC. Molecular amplification assays to detect Chlamydia infection in urine specimens from high school female students and to monitor the persistence of chlamydial DNA after therapy. *J Infect Dis.* 1998;417-424.