جستجوی *کلامیدوفیلا آبورتوس* در موارد سقط جنین گوسفند در استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از روش Nested PCR

محمدرضا محزونیه[۱*]، شبنم گلبوی‌داغداری[۲] و راضیه پوراحمد[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲۰

چکیده

کلامیدوفیلا آبورتوس یکی از علل مهم سقط انزئوتیک میش‌ها و از دست دادن بره‌ها در هنگام آبستنی، در بعضی مناطق محسوب می‌شود. در عفونت با این باکتری، سقط جنین معمولاً در ۳-۲ هفته آخر آبستنی رخ می‌دهد و یا بره‌های مرده و ضعیف متولد می‌شوند. از آن جا که باکتری کلامیدوفیلا در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) رشد نکرده و معمولاً با آزمایش‌های تشخیصی روتین متوجه حضور آن نمی‌شوند، جستجوی آنتی‌ژن یا ژنوم آن توصیه می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی حضور این باکتری در تعدادی از جنین‌های سقطی گوسفند در استان چهار محال و بختیاری بود. برای این منظور ۴۸ نمونه‌ی محتویات آسپیره شده شیردان جنین‌های سقط شده در فاصله‌ی زمانی سال ۱۳۹۰-۱۳۹۱ با روش Nested PCR جهت شناسایی ژن ۱۶S rRNA، مورد آزمایش قرار گرفت. میزان آلودگی در نمونه‌های بررسی شده ۵۲ درصد بود. این میزان آلودگی نشان‌دهنده‌ی نقش این باکتری در موارد سقط جنین می‌باشد که تاکنون کمتر به آن اهمیت داده شده است و با توجه به تعداد گوسفند در ایران و میزان فراوانی سقط جنین و خسارات اقتصادی و نیز خطر عفونت انسانی، نیازمند توجه ویژه‌ای برای وسعت بخشیدن به تحقیقات و اجرای اقدامات پیشگیری و کنترل دارد.

کلمات کلیدی: سقط جنین، گوسفند، *کلامیدوفیلا آبورتوس*، چهارمحال و بختیاری، Nested PCR

مقدمه

سقط آنزوئوتیک میش‌ها (enzootic abortion of ewes) توسط *کلامیدوفیلا آبورتوس* (*Chlamydophila abortus*) ایجاد می‌شود. این باکتری که قبلاً آن را *کلامیدیا پسی‌تاسی* سروتیپ ۱ (*Chlamydia psittaci* serotype 1) می‌نامیدند، یکی از علل مهم سقط جنین میش و بز در اروپا و کشورهای در حال توسعه، محسوب می‌گردد (Longbottom and Coulter 2003). *کلامیدوفیلا آبورتوس* شایع‌ترین عامل سقط جنین در نشخوارکنندگان کوچک در سوئیس شناخته شده به طوری که آمار ارائه شده از مطالعات قبلی در سوئیس حاکی از آلودگی ۳۹ درصد گوسفندان و ۲۳ درصد بزهای سقط کرده با این عامل می‌باشد (Gerber et al. 2007). این باکتری متعلق به خانواده‌ی کلامیدیاسه و از جمله باکتری‌های داخل سلولی اجباری و گرم منفی می‌باشد. خانواده‌ی کلامیدیاسه شامل دو جنس کلامیدیا و کلامیدوفیلا و مشتمل بر ۹ گونه است (Everett et al. 1999). ارگانیسم در شرایط آزمایشگاهی رشد نمی‌کند و برای تشخیص روش‌های سرولوژی و یا جستجوی ژنوم استفاده می‌شود. عفونت با این باکتری به میزان کمتری در شتر، اسب، خوک و گوزن هم می‌تواند ایجاد بیماری کند (Longbottom and Coulter 2003). اولین علامت برجسته این بیماری در گوسفند سقط است که معمولاً در ۳-۲ هفته‌ی آخر آبستنی رخ

[۱*] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، پژوهشکده‌ی بیماری‌های مشترک انسان و دام، دانشگاه شهرکرد
E-mail: mahzounieh@vet.sku.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد
[۳] استادیار گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهرکرد

می‌دهد و گاهی منجر به تولد بره‌های مرده و ضعیف می‌شود (Aitken and Longbttom 2007). ترشحات واژن که بعد از سقط خارج می‌شوند و هم‌چنین جفت، جنین و پوشش بره‌ها حاوی مقادیر بالایی از باکتری می‌باشد که در انتشار بیماری نقش مؤثری دارد (Longbottom and Coulter 2003). عفونت می‌تواند از مادر به جنین نیز منتقل شود و به شکل عمودی هم گسترش یابد اگرچه شواهد کمی مبنی بر این احتمال در دست است (Papp 1996). آلودگی با *کلامیدوفیلا*، جدی و مهم بوده و برای زنان باردار تهدید کننده‌ی زندگی است از این رو آن‌ها بایستی در طول فصول بره‌زایی از تماس با گوسفندان اجتناب کنند (Longbottom and Coulter 2003). پیش‌گیری و کنترل و درمان بیماری، با واکسیناسیون یا تزریق اکسی‌تتراسایکلین امکان‌پذیر است. دو نوع واکسن غیرفعال کامل و زنده بدون حدت جهت پیش‌گیری وجود دارد که از وقوع سقط جنین تا حد زیادی می‌کاهد (Gerber et al. 2007). در مطالعه‌ای توسط راد و همکاران روی سقط جنین در ۱۶۸ نمونه‌ی بافتی از ۲۲ جنین سقط شده انجام شد، ۳۶ نمونه مثبت گزارش گردید. نتایج این مطالعه نشان داده است که پذیرش روش PCR جهت تشخیص روتین *Chlamydophila abortus* در نمونه‌های بافتی دارای حساسیت و سرعت بیش‌تری نسبت به کشت سلول می‌باشد (Rad et al. 2012). هدف از این پژوهش بررسی میزان سقط در اثر عفونت با این باکتری و ضرورت توجه به ارائه‌ی روش‌هایی مناسب در جهت کنترل و پیش‌گیری باکتری می‌باشد.

مواد وروش کار

نمونه‌گیری

نمونه‌های جمع‌آوری شده شامل ۴۸ نمونه‌ی مایع محتویات شیردان جنین‌های سقط شده که ۱۹ مورد آن از شهرستان شهرکرد و فارسان، ۶ مورد نمونه‌های ارجاعی به آزمایشگاه الفا مربوط به حومه‌ی شهرستان شهرکرد و ۲۳ نمونه از شهرستان لردگان در فاصله‌ی زمانی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۹۱ تهیه شد. پس از ارجاع جنین‌های سقط شده به شبکه‌ی دامپزشکی شهرستان شهرکرد، ناحیه‌ی بطنی باز و به روش آسپتیک محتویات شیردان آسپیره و در میکروتیوب استریل به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه ها تا زمان آزمایش و استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از جنین‌های سقط شده‌ی بالای ۴ ماه و دارای سابقه‌ی واکسیناسیون با واکسن Rev1 بودند.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA پس از لیز سلول‌ها با پروتئیناز K، DNA با روش فنل/ کلروفرم/ ایزو آمیل الکل استخراج گردید که به طور خلاصه به شرح زیر است:

۱ - برای لیز سلولی، ۱/۵ میلی‌لیتر محتویات شیردان به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر منتقل و سپس در دور ۸۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله‌ی بعدی مایع رویی را دور ریخته سپس به رسوب میزان ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (SDS+Tris-HCl+ EDTA) اضافه گردید. سپس ۳ میکرولیتر پروتئیناز K با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه کرده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد.

۲ - به نمونه‌ی لیز شده، میزان ۲۵۰-۲۰۰ میکرولیتر فنل اشباع شده اضافه و سپس ۲۵۰-۲۰۰ میکرولیتر محلول (۲۴:۱) کلروفرم - ایزوآمیل الکل اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه در محیط تکان داده شد و سپس در دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید.

۳ - فاز بالایی که شفاف می‌باشد برداشت شد و به ویال ۱/۵ میلی‌لیتر جدید انتقال داده شد. سپس هم حجم الکل مطلق اضافه شد. به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از آن در

۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و سانتریفوژ شد.

۴ – در این مرحله باید مقدار بسیار کمی رسوب دیده شود. فاز رویی (الکل) را دور ریخته و مجدداً به رسوب ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ اضافه نموده، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه شدند.

۵ – الکل ۷۰٪ رویی را دور ریخته و کمی درب ویال‌ها را باز نگه داشته تا خشک شود.

۶ – رسوب را در ۴۰–۳۰ میکرولیتر آب تزریقی حل نموده و در ۲۰– درجه نگهداری می‌شود (Sambrook et al. 1989).

روش انجام Nested PCR

برای جستجوی توالی اختصاصی مربوط به 16S rRNA کلامیدوفیلا در نمونه‌های DNA استخراج شده، از روش Nested PCR استفاده شد . این روش قابلیت جستجوی ۵ واحد تولید کننده‌ی گنجیدگی در میلی‌لیتر را دارد، لذا حساسیت آن بسیار زیاد است. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است (Messmer et al. 1997). پرایمرها شامل یک جفت پرایمر اختصاصی مربوط به جنس و یک جفت پرایمر داخلی مربوط به گونه بود (در خانواده‌ی کلامیدیاسه تنها گونه‌ی *کلامیدوفیلا آبورتوس* در گوسفند و بز سقط می‌دهد) که با برنامه BLASTN (ver. 2.2.27) ویژگی آن‌ها مورد تأیید قرار گرفت. دور اول واکنش به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰/۵ µl محلول امپلیکون قرمز (شرکت پیشگامان ژن) حاوی Taq DNA Polymerase (Master Mix Red, Cat No. 190301, Amplicon)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای پیشرو و معکوس F و R مرحله‌ی اول (مربوط به جنس) با غلظت ۲۰پیکو مول، ۱۰/۵میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده بود که پس از تهیه در داخل دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler ABI Geneamp 9700, USA) قرار داده شد.

چرخه‌ی حرارتی استفاده شده در این مرحله شامل: سیکل اول ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، سیکل حرارتی دوم متشکل از ۳۵ سیکل بود که شامل: ۹۴ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و سیکل حرارتی سوم ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

در مرحله‌ی دوم، ۱ میکرولیتر از محصول PCR مرحله‌ی اول به عنوان نمونه‌ی الگو، جهت تکثیر استفاده گردید و تمام مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همانند مراحل قبل (به استثناء این که در این قسمت از پرایمرهای داخلی مربوط گونه استفاده گردید) تکرار گردید (Messmer et al. 1997) . جهت کاهش نتایج مثبت کاذب و کنترل آلودگی با محصول PCR یا نمونه‌های مثبت سعی شد تمام آزمایش‌ها در مکان جداگانه کار شود و برای تأیید نتایج آزمایش کنترل منفی هم گذاشته شد. برای کنترل مثبت از نمونه‌ی کلینیکی که در همین آزمایش با روش Nested PCR مثبت ارزیابی شد، پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی، ۱۰۰ درصد با توالی مربوط به ژن 16S rRNA *کلامیدوفیلا ابورتوس* مشابهت داشت استفاده شد.

الکتروفورز

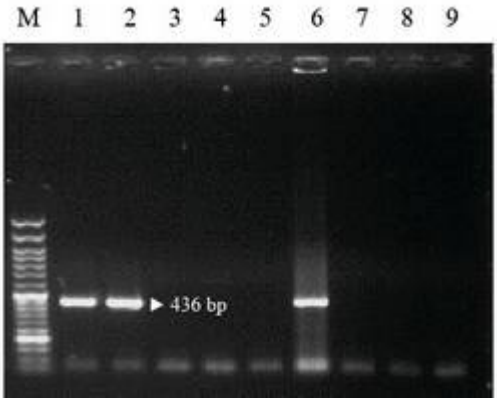
محصولات PCR مرحله ۱ و ۲ به ترتیب توسط ژل اگارز ۱/۲٪ و ۲/۵٪ الکتروفورز گردید. پس از پایان، ژل با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاه قرائت ژل تحت برخورد با اشعه‌ی ماوراء بنفش (UVitec, UK) مشاهده شد. باندهای مورد انتظار شامل باند ۴۳۶bp برای محصول PCR مرحله‌ی اول و باند ۱۲۷ bp برای محصول PCR مرحله‌ی دوم بود. تمام مواد این آزمایش از شرکت ژن فناوران و سینا کلون خریداری شده بود.

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه برای تکثیر 16S rRNA (Messmer 1997)

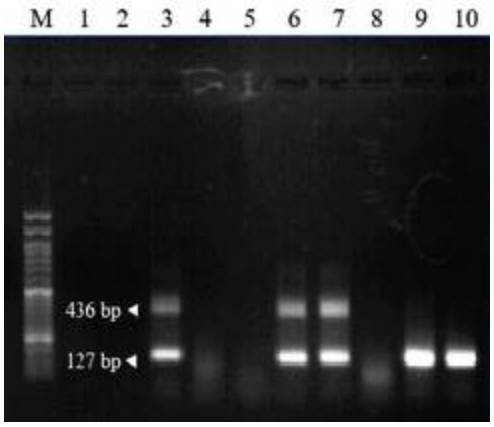
پرایمر		توالی پرایمر از جهت 3′→5′	وزن محصول (bp)
مرحله‌ی اول	F	ACGGAATAATGACTTCGG	۴۳۶
	R	TACCTGGTACGCTCAATT	
مرحله‌ی دوم	F	ATAATGACTTCGGTTGTTATT	۱۲۷
	R	ATAATGACTTCGGTTGTTATT	

نتایج

در این آزمایش از روش Nested PCR برای افزایش حساسیت و اختصاصی بودن نتایج استفاده شده است. در این آزمون از ۲ جفت پرایمر که اختصاصی بودن آن برای کلامیدوفیلا تأیید شده است، استفاده گردید که شامل یک جفت پرایمر اختصاصی مربوط به جنس و یک جفت پرایمر داخلی که مربوط به گونه است. این آزمایش در دو مرحله طراحی شد. الکتروفورز محصولات مرحله‌ی اول بیانگر حضور تعدادی از موارد مثبت در نمونه‌ها با باند مورد انتظار ۴۳۶ زوج بازی بود که در مرحله‌ی دوم الکتروفورز نیز با مشاهده‌ی باند مورد انتظار ۱۲۷bp، مثبت بودن نمونه‌ها تأیید گردید (شکل ۱ و ۲). نتایج مرحله‌ی دوم ملاک قضاوت روی نمونه بود. در تمام این مراحل از کنترل منفی برای کنترل احتمال وجود آلودگی در هنگام آزمایش و تأیید نتایج استفاده گردید. چون محصول مرحله‌ی اول از بین نمی‌رود و جهت انجام مرحله‌ی دوم نیاز است در نتیجه ممکن است روی ژل آگارز باند محصول دور اول مشاهده شود.



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR مرحله‌ی اول، M: (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas)



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR مرحله‌ی دوم، M: (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas)، ۱= کنترل منفی، ۳، ۶، ۷ و ۹ = نمونه‌های مثبت، ۲، ۴، ۵ و ۸ = نمونه‌های منفی، ۱۰= کنترل مثبت

جدول ۲: فراوانی موارد مثبت آلوده به کلامیدوفیلا آبورتوس در نمونه‌های سقط جنین

مکان	شهرستان شهرکرد و فارسان	حومه شهرکرد	شهرستان لردگان	جمع
تعداد نمونه	۱۸	۶	۲۴	۴۸
تعداد موارد مثبت (درصد)	۱۱(٪۶۱)	۴(٪۶۶/۷)	۱۰(٪۴۱/۷)	۲۵ (٪۵۲)

درصد موارد مثبت آلودگی به *کلامیدوفیلا آبورتوس* ٪۵۲ در بین نمونه‌های مربوط به سقط جنین محاسبه شد. موارد مثبت در شهرستان شهرکرد؛ حومه شهرکرد و شهرستان لردگان به ترتیب ٪۶۱ ، ۶۶/۷ و ٪۴۱/۷ به دست آمد که بیش‌ترین میزان سقط توسط این باکتری در بین نمونه‌های بررسی شده در دامداری‌های حومه شهرکرد مشاهده شد. در این بررسی، بروسلا و سالمونلا از دیگر عوامل مهم سقط هم توسط پرایمرهای اختصاصی با روش PCR بررسی شد که بروسلا ٪۳۰ و سالمونلا ٪۲۰ موارد سقط را به خود اختصاص داده‌اند.

بحث

هدف از این مطالعه بررسی عفونت با *کلامیدوفیلا آبورتوس* در موارد سقط جنین در گوسفندان بود. اگر چه به این موضوع توجه ویژه و خاصی نشان داده نشده است، اما نتایج به دست آمده، گواه و دلیلی بر مهم بودن عفونت با این باکتری است چرا که خسارت اقتصادی ناشی از سقط جنین و سرعت بالای انتقال این باکتری جبران‌ناپذیر است. این آمار نشان دهنده‌ی میزان بالای سقط جنین کلامیدیایی در بین نمونه‌های بررسی شده در این استان است که می‌تواند مربوط به محل و سیستم پرورش گوسفند باشد. البته سقط بر اثر بروسلا و سالمونلا هم بررسی شد که بروسلا ٪۳۰ و سالمونلا ٪۲۰ موارد سقط را به خود اختصاص داده‌اند.

دامنه‌های سلسله جبال زاگرس در جنوب غربی و مرکز و سلسله جبال البرز در شمال ایران مناطق مناسبی برای پرورش گوسفند در ایران هستند. در استان چهار محال و بختیاری، پرورش گوسفند و بز به دو صورت روستائی و عشایری انجام می‌شود که جمعیت آن‌ها در سال ۱۳۸۷ برابر ۱/۶۳۲/۰۰۰ رأس گوسفند و بز گزارش گردیده است. در این سیستم پرورش، گوسفند و بز از اواسط پاییز تا اوایل بهار در جایگاه بسته نگهداری و در طول بهار و تابستان در خارج از جایگاه روی مراتع و مزارع نگهداری می‌شوند. بروز سقط جنین در این منطقه موجب بروز خسارات زیاد اقتصادی و مشکلات ناشی از آن می‌شود. آمار دقیقی از میزان سقط جنین در دست نیست و گاهی در بعضی موارد در بیش از ۵۰ درصد میش‌ها گزارش می‌شود ولی به طور معمول اگر ۱۵-۲۰ درصد سقط جنین و تلفات روزهای اول بره‌ها را در نظر بگیریم و براساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، عامل حدود ۵۰ درصد موارد سقط جنین در بین نمونه‌های بررسی شده را *کلامیدوفیلا آبورتوس* بدانیم، خسارت ایجادی در سال بیش از ۵ میلیارد تومان برآورد خواهد شد. از این رو اهمیت توجه به *کلامیدوفیلا آبورتوس* به عنوان یکی از عوامل سقط جنین مشخص می‌شود. در این مطالعه به بررسی احتمال حضور باکتری در موارد سقط جنین پرداخته شده است. این میکروارگانیسم از جمله عوامل باکتریایی سقط جنین در اواخر آبستنی محسوب می‌شود و در ۳-۲ هفته قبل از سقط جنین هیچ‌گونه علائم مشخص کلینیکی مشاهده نمی‌شود و معمولاً اولین علامت ناشی از عفونت به این باکتری سقط جنین و یا تولد بره‌های ضعیف و مرده است (Aitken and Longbottom 2007). میش‌های آلوده این باکتری را از طریق جفت و ترشحات رحمی وارد محیط می‌کنند و باعث آلودگی سایر گوسفندان از راه بلع یا تنفس می‌شوند (Aitken 1993). آلودگی انسان با کلامیدوفیلا اگرچه نادر است لیکن اگر اتفاق افتد اکثر موارد بدون علائم بالینی است. در صورت بروز، علائم

شبیه انفلوانزا است و با سر درد، تب و لرز، درد مفاصل و سرفه‌های بدون خلط همراه است. از آن‌جا که آزمایش‌های سرمی نمی‌تواند بین آلودگی با گونه‌های مختلف تمایز ایجاد کنند، میزان بروز سالیانه عفونت با آن مشخص نیست (DERFA 2011). در زمان حاملگی عفونت جدی و مهم بوده و ممکن است برای زنان باردار یک خطر حیاتی باشد از این رو آن‌ها بایستی در طول فصول برهزایی از تماس با گوسفندان اجتناب کنند (Leonard et al. 1993). تاکنون آزمایش‌های متعدد سرولوژیک جهت تشخیص عفونت‌های ناشی از کلامیدوفیلا و بر اساس آنتی‌ژن‌های کلامیدوفیلایی صورت گرفته است، اما به علت واکنش‌های متقاطع فراوان بین آنتی‌ژن‌های کلامیدیایی با یکدیگر و سایر باکتری‌های گرم منفی (موری‌بختیاری و همکاران ۱۳۹۰) نیاز به روشی دقیق و مناسب جهت تشخیص این باکتری می‌باشد. در این بررسی نمونه‌ها از محتویات شیردان جنین‌های سقط شده که منبع مهم باکتری محسوب می‌شود تهیه شد (Longbottom 2003). طی این مطالعه ۵۲٪ نمونه‌ها از نظر آلودگی به *کلامیدوفیلا آبورتوس* مثبت گزارش شد. به دست آوردن این نتایج در حالی است که در انگلستان، ۴۵٪ موارد سقط بر اثر EAE است (Aitken et al. 1990) و تخمین زده شده است ۸/۶٪ از گله‌ها متأثر از این عفونت است (Leonard et al. 1993) که برابر با سالانه ۱/۵ میلیون گوسفند است. طبق تحقیقات انجام شده در انگلستان توسط Aitken و همکاران در سال ۱۹۹۰ این عامل را در ۵۰٪ موارد سقط جنین شناسایی کردند. این نتایج در حالی است که در انگلستان و UK گوسفندان در هنگام برهزایی به شدت مدیریت می‌شوند. این مطالعات همراه با پژوهش انجام شده اذعان دارد که EAE تأثیر مهمی در سقط جنین گوسفند دارد. در یک مطالعه‌ی سرولوژیک که توسط Ghorbanpoor و همکاران در منطقه‌ی خوزستان در سال ۲۰۰۷ روی میش‌هایی که سقط داشتند انجام شد، شیوع آلودگی سرمی در اهواز ۸/۹٪ گزارش گردید. هم‌چنین در ترکیه طبق آزمایش‌های Gokce و همکاران در سال ۲۰۰۷، شیوع آلودگی سرمی ۵/۴٪-۱۸/۲۹ ٪ برآورد شده است. در مطالعه‌ای در شهرکرد در سال ۲۰۱۱ که به بررسی *کلامیدیا پسیتاسی* در موارد سقط جنین در گاو پرداخته شده است در ۱۹/۱۵٪ موارد سقط ارگانیسم شناسایی شد (Arshi et al. 2011). در مطالعه‌ای که در ساردینیا ایتالیا طی سال‌های ۲۰۰۹-۲۰۰۳ انجام شد باکتری به میزان ۲/۴٪ از نمونه‌های جنینی و ۶/۵٪ از نمونه‌های جفت جدا گردید (Masala et al. 2007)، اختلاف موجود در این مطالعه با نتایج گزارش شده می‌تواند به شرایط نگهداری و اقتصادی پرورش گوسفند و محل مورد مطالعه مرتبط باشد. احتمالاً علت کمبود مطالعات انجام شده در ایران عدم رشد این باکتری در محیط‌های کشت متداول باکتری‌هاست و عدم توجه به نقش این باکتری در ایجاد سقط جنین در گوسفند است، لذا در بیشتر مطالعات منتشر شده به نقش گونه‌های بروسلا و سالمونلا و گاهی توکسوپلاسما در ارتباط با موارد سقط جنین اشاره شده است. بیان ۵۰٪ موارد سقط در بین نمونه‌های بررسی شده در مطالعه‌ی حاضر و مقایسه با مطالعات انجام شده در انگلستان و UK با وجود مدیریت صحیح گوسفندان در هنگام برهزایی می‌تواند تأیید کننده نتایج به دست آمده در این پژوهش باشد.

در مجموع باید اذعان داشت با توجه به اهمیت پرورش گوسفند در استان و خسارات بالای اقتصادی ناشی از سقط جنین توسط این باکتری و عدم وجود اطلاعات صحیح و کافی نیاز به توجه ویژه‌ای در خصوص این موضوع احساس می‌شود تا در صورت تأیید این نتایج، تحقیقات گسترده در سایر مناطق و مطالعات در مورد راه‌های کنترل و پیشگیری آغاز شود، تا بتوان از شیوع و خسارات ناشی از آن کاست.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات خانم فاطمه یکتنه کارشناس آزمایشگاه میکروبشناسی دانشکده‌ی دامپزشکی و خانم مرضیه صفر پور که در انجام آزمایشات کمک کردند و سرکار خانم دکتر خدیجه خاکسار کارشناس محترم اداره‌ی کل دامپزشکی استان چهارمحال بختیاری و جناب آقای مختاری کارشناس محترم آزمایشگاه آلفا شهرکرد که در تهیه‌ی نمونه‌ها مساعدت نمودند، قدردانی می‌شود.

منابع

موری‌بختیاری، نغمه؛ صیفی‌آبادشاپوری، مسعودرضا؛ قربانپورنجف‌آبادی، مسعود و وگورانی‌نژاد، سعد (۱۳۹۰). کلونینگ و بیان قطعه‌ای از ژن POMP90 *کلامیدوفیلا آبورتوس* سویه ۲۶/۳ در اشرشیا کلی، فصلنامه‌ی دامپزشکی ایران، دوره‌ی هفتم، شماره‌ی ۳، ۸۰-۷۴.

Aitken, I.D. (1993). Ovine chlamydial abortion. In: Woldehiwet Z, Ristic M, editor. Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals. Oxford: Pergamon Press; pp. 349–360.

Aitken, I.D.; Clarkson, M.J. and Linklater, K. (1990). Enzootic abortion of ewes. Veterinary Record, 126(6): 136-138.

Aitken, I.D. and Longbottom, D. (2007). Chlamydial abortion. In: Aitken, I.D. (4th Ed.), Diseases of Sheep. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 105–111.

Anonymous, DEFRA (2011). Department for Environment, Food and Rural Affair, UK. Zoonoses Report, available at: https:// www.gov.uk/ government/ uploads/ system/ uploads/ attachment_data/file/69313/pb13571-zoonoses2009-110125.pdf. Last visited: 23. 06. 2014.

Arshi, A.; Doosti, A. and Sharifzadeh, A. (2011). PCR Assay for Detection of Abortion Rate Caused By *Chlamydia Psittaci* in Iranian Cattle. International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Sciences. (ICABPS'2011) Bangkok .

Gerber, A.; Thoma, R.; Vretou, E.; Psarrou, E.; Kaiser, C.; Doherr, M.G. et al. (2007). Ovine Enzootic Abortion (OEA): a comparison of antibody responses in vaccinated and naturally-infected Swiss sheep over a two year period. BMC Veterinary Research.; 3: 24.

Ghorbanpoor, M.; Goraninejad, D. and Heydari, R. (2007). Serological study on enzootic abortion of ewes in Ahvaz, Iran. Journal of Animal and Veterinary Advances, 6(10): 1194-1196.

Gokce, H.I.; Kacar, C.; Genc, O. and Sozmen, M. (2007). Seroprevalance of *Chlamydophilia abortus* in aborting ewes and dairy cattle in the north-east part of Turkey. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 51: 9-13.

Everett, K.D.E.; Bush, R.M. and Anderson, A.A. (1999). Emended description of the order chlamydiales proposal of parachlamydiaceae fam. nov . and simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family chlamydiaceae, including a new genus and five new species and standards for the identification of organisms. International Journal of Systematic Bacteriology, 49: 415-440.

Leonard, C.; Caldow, G.L. and Gunn, G.J. (1993). An estimate of the prevalence of enzootic abortion of ewes in Scotland. Veterinary Record, 133: 180-183.

Longbottom, D. and Coulter, L.J. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. Journal of Comparative Pathology. 128: 217–244.

Masala, G.; Porcu, R.; Daga, C.; Denti, S.; Canu, G.; Patta, C. et al. (2007). Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 19: 96-98.

Messmer, T.O.; Skelton, S.K.; Moroney, J.F.; Daugharty, H. and Fields, B.S. (1997). Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. Journal of Clinical Microbiology, 35(8):2043-2046.

Papp, J.R. and Shewen, P.E. (1996). Pregnancy failure following vaginal infection of sheep with *Chlamydia psittaci* prior to breeding. Infection and Immunity, 64: 1116-1125.

Rad, M., Naseri, Z. and Malvandi, A.M. (2012). Detection of *Chlamydophila Abortus* from Ovine Abortion by Cell Culture and PCR. The 13th Iranian and the 2nd International Congress of Microbiology

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y, USA.

Detection of *Chlamydophila abortus* in sheep abortions in Chaharmahal va Bakhtiari Province using Nested PCR

Mahzounieh, M.[1]; Golbuy Daghdari, Sh.[2] and Pourahmad, R.[3]

Received: 6.05.2013 Accepted: 11.12.2013

Abstract

Chlamydophila abortus, the aetiological agent of enzootic abortion of ewes (EAE) is a major cause of lamb loss in many sheep-rearing countries throughout the world. Usually the first clinical manifestation of disease is abortion in the last 2–3 weeks of gestation or when the ewe gives birth to stillborn or weak lambs. Because Chlamydophila does not grow *in vitro*, organisms usually are not found by routine diagnostic tests. Therefore, it is recommended to detect antigen or genome. The aim of this study was to investigate the presence of these bacteria in aborted sheep fetuses in Chaharmahal va Bakhtiari province. Samples included 48 aspirated liquid from abomasums of aborted fetuses during two lambing seasons, 2011- 2012. The samples were tested by Nested PCR to identify specific 16S rRNA sequence. In this study, EAE accounted for around 52% of all diagnosed abortions. It suggests that *C.abortus* was a main abortion agent in tested samples and caused considerable reproductive losses particularly in areas where flocks were kept closely congregated during lambing season. Therefore, due to the severe economic losses and the risk of human infection, more research should be planned and done for prevention and control of *C.aborus* infection.

Key words: Abortion, Sheep, *Chlamydophila abortus*, Chaharmahal va Bakhtiari

1- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine and Research Institute of Zoonotic Diseases, Shahrekord University, Iran
2- MSc. Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Iran
3- Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Sciences, Shahrekord University, Iran
Corresponding Author: Mahzounieh, M., Email: mahzounieh@vet.sku.ac.ir