مطالعه مولکولی و تعیین توالی نوکلئوتیدی *کلامیدیا آبورتوس* جدا شده از جنین‌های سقط شده گوسفندان استان البرز

امیررضا عبادی[۱]، محمود جمشیدیان[۲]، فرهاد موسی‌خانی[۳*]

۱- دانش آموخته، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- استاد گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: Farhadmoosakhani@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۳/۱۲/۳ پذیرش نهایی: ۹۴/۱/۱۷)

چکیده

کلامیدیا جرمی داخل سلولی اجباری و گرم منفی کوکوباسیل است و یکی از عوامل مهم سقط جنین در نشخوارکنندگان به خصوص در میش می‌باشد. این بررسی با هدف مطالعه مولکولی و تعیین توالی نوکلئوتیدی *کلامیدیا آبورتوس* جدایه از جنین‌های سقط شده گوسفندان استان البرز انجام گرفت. در این مطالعه از ۱۰۰ جنین سقط شده از ۳۲ گله گوسفند مناطق مختلف استان البرز نمونه‌برداری صورت گرفت، سپس استخراج DNA انجام شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن IGS-Sr- RNA واکنش PCR صورت گرفته و از موارد مثبت جدا شده ۱۰ نمونه به‌طور تصادفی برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. در این مطالعه در مجموع ۳۷ نمونه از ۱۰۰ نمونه سقط جنین از نظر *کلامیدیا آبورتوس* مثبت بود. بعد از توالی‌یابی نمونه‌های مثبت بیش از ۹۹ درصد با توالی‌های موجود در بانک ژن شباهت داشت. نتیجه توالی‌یابی‌ها نشان می‌دهد که جدایه‌های مورد مطالعه بیشترین شباهت را با جدایه‌های LN554882. 1, CR848038. 1, AF051935. 1 موجود در بانک ژن دارا بوده و در یک خوشه قرار دارند. هم‌چنین نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که *کلامیدیا آبورتوس* یکی از عوامل اصلی سقط جنین میش در استان البرز می‌باشد.

کلید واژه‌ها: ***کلامیدیا آبورتوس*، تعیین توالی، البرز.**

مقدمه

اگرچه سقط جنین‌های ناشی از کلامیدیاها در گاو، گوسفند و بز اتفاق می‌افتد ولی سقط جنین آنزئوتیک در میش‌ها یک عامل عمده زیان اقتصادی و مسئله جدی در کشورهایی است که پرورش گوسفند حائز اهمیت است (Aitken *et al*., 1990). عامل سقط جنین

آنزئوتیک، *کلامیدیا* (کلامیدوفیلا) *آبورتوس* است که قبلاً با نام *کلامیدیا پسیتاسی* شناخته می‌شد، که دارای خصوصیات کلی سایر کلامیدیاها می‌باشد. این گونه جزو راسته کلامیدیالز و از خانواده کلامیدیاسه می‌باشد. کلامیدیاها باکتری‌هایی گرم منفی کوکوباسیل به اندازه ۲۰۰×۱۵۰۰ نانومتر با قطری حدود ۳۰۰-۲۰۰ نانومتر اجرام داخل سلولی اجباری و به عنوان انگل‌های انرژی می‌باشند (Gyles and Theon, 1993).

جایگاه طبیعی *کلامیدیا آبورتوس* پستانداران است که این جرم در پستانداران (گاو، گوسفند و بز) عفونتی غیرآشکار دارد و باعث سقط جنین و مرده‌زایی می‌گردد و به مدت طولانی از طریق مدفوع دفع می‌شود (Yvonne *et al*., 2010). تحت شرایط مناسب محیطی، جسم ابتدایی (elementary body) که شکل خارج سلولی کلامیدیا است و ذره عفونی نامیده می‌شود و نسبتاً مقاوم بوده و برای مدت چند روز زنده می‌ماند. پس از ورود به بدن از طریق عمل آندوسیتوز وارد سلول شده و به ذره غیرعفونی تبدیل که بزرگتر و از نظر متابولیکی فعال‌تر و به نام جسم شبکه‌ای (Reticular body) تبدیل می‌گردد. این ذره از طریق تقسیم دوتایی تکثیر و ذرات متعدد و مشابهی به وجود می‌آورند، سپس تبدیل به ذرات عفونی جسم ابتدایی می‌گردند (Qunin *et al*., 1994).

گسترش عفونت عمدتاً در زمان بره‌زایی صورت می‌گیرد. بدین‌صورت که میش آبستن، جسم ابتدایی را از میش سقط کرده از راه گوارش کسب می‌کند و چند هفته بعد خود دچار سقط می‌شود. بقای جرم عامل سقط در مدفوع، خود گویای چگونگی بقای جرم از یک فصل زایش تا فصل زایش بعدی است. سقط جنین در دو سه هفته آخر آبستنی اتفاق می‌افتد و جفت‌ماندگی اغلب وجود دارد و ترشحات مهبلی تا چندین روز بعد از سقط جنین ادامه دارد (Timony *et al*., 1988). با توجه به این‌که علایم بالینی سقط جنین ناشی از کلامیدیا مشابه سقط جنین سایر عوامل عفونی مثل *کمپیلوباکتر فتوس* و بروسلا و تب کیو و... می‌باشد، لذا در گله‌ای که سابقه‌ای از این جرم‌ها وجود ندارد می‌توان به سقط جنین کلامیدیایی مشکوک شد. به هر حال تفریق آن از سایر اجرام عامل سقط جنین الزامی است. نمونه‌برداری جهت تشخیص شامل محتویات معده جنین و کوتیلدون می‌باشد. در اولین مرحله تشخیص امتحان مستقیم میکروسکوپی گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده اگرچه مفید است ولی تائید تشخیص بر اساس کشت نمونه بر روی تخم مرغ جنین‌دار ۷-۶ روزه از طریق کیسه زرده و نیز کشت سلول می‌باشد. در یک مطالعه‌ای روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی گسترش‌های تهیه شده از غشای جنینی تشخیص جسم ابتدایی مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که استفاده از روش رنگ‌آمیزی متیلن بلو مطمئن‌تر از روش‌های گیمسا و ذیل نلسون اصلاح شده می‌باشد (Dagnall, 1990).

با توجه به اینکه در ایران پرورش و نگه‌داری گوسفند به ویژه در بین عشایر بسیار مرسوم است، سالیانه خسارت زیادی به دلیل بروز سقط جنین ایجاد می‌شود. در این مطالعه با اخذ نمونه از گوسفندان سقط جنین کرده عامل *کلامیدیا آبورتوس* به عنوان یکی از عوامل ایجاد سقط جنین در گوسفند در استان البرز بررسی شد و با مطالعه مولکولی نسبت به تعیین هویت و مقایسه و آنالیز فیلوژنتیکی بین سویه‌های جدا شده و قرابت و

دوری آن‌ها با هم و هم‌چنین با سایر جدایه‌های موجود در جهان مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۱۰۰ جنین سقط شده از ۳۲ گله گوسفند مناطق مختلف استان البرز، نمونه‌برداری به صورت تصادفی انجام گرفت. جنین به همراه جفت مربوطه انتخاب و نمونه‌ها در کنار یخ و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه ارسال شد. وضعیت جنین قبل از کالبدگشایی از نظر امکان انجام آزمایش در آزمایشگاه بررسی، سپس پوست جنین با دقت شستشو و با الکل ضد عفونی شد. کالبدگشایی و نمونه‌برداری از محتویات ناحیه شیردان جنین‌های سقط شده انجام شد. در شرایط مناسب نگه‌داری و در آزمایشگاه مبنا واکنش PCR انجام شد تا عامل مربوطه شناسایی گردد.

برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن (DNA Purification DNP TMKIT) استفاده شد و DNAهای استخراج شده تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. واکنش‌گرهای مربوط به PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با هم مخلوط گردیدند. این مخلوط شامل ۵ میکرولیتر از DNAی الگو، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر، ۲۵۰ میکرومول dNTPMix، ۵ میکرومول MgCl2 و ۵ میکرولیتر بافر PCR و ۲/۵ واحد از آنزیم Tag DNA Polymerase که همگی از شرکت سیناژن تهیه گردیدند. واکنش‌گرهای PCR روی یخ با هم مخلوط شد و بلافاصله نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf , Germany) قرار داده شدند و برنامه حرارتی مورد استفاده شامل: ۹٤ درجه سلسیوس ۵ دقیقه، سپس ۹٤ درجه سلسیوس یک دقیقه، ۵۰ درجه سلسیوس یک دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس ۲ دقیقه با تکرار ٤۰ سیکل و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سلسیوس با ۱۰ دقیقه تنظیم گردید.

آزمون PCR به منظور تشخیص و شناسایی مولکولی *کلامیدیا آبورتوس* قطعه 352bp ژن IGS-Sr RNA به کار گرفته شده و دو زنجیر زیر توالی پرایمرهای ژن مذکور را نشان می‌دهد (Borel *et al*., 2006).

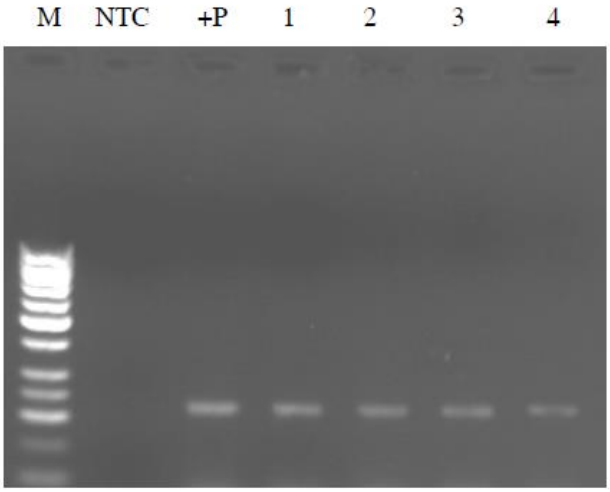
FP (5"-CAAGGTGAGGCTGATGAC-3")
RP (5"-TCGCCTKTCAATGCCAAG-3")

برای انجام تست PCR علاوه بر DNA نمونه‌های کار شده، یک عدد کنترل مثبت و یک عدد کنترل منفی لازم بود. پس از آماده‌سازی مواد تمامی واکنش‌گرهای PCR ماسترمیکس یا همان میکروتیوب اصلی در داخل دستگاه Termocycler گذاشته شد و الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد توسط اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شد و با استفاده از نور UV مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های حاصل از استخراج از روی ژل، همراه با پرایمرهای مربوط جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. سپس توالی‌های به‌دست آمده در بانک ژن ثبت و با انجام آزمون BLAST به وسیله نرم افزارهای Bio edit و DNA star آنالیز فیلوژنتیک انجام گرفت و با یافته‌های سایر کشورهای موجود در بانک ژن مقایسه و نتایج تحلیل و تفسیر گردید.

یافته‌ها

کیفیت DNAهای استخراج شده پس از الکتروفورز روی ژل آگارز مشاهده و مورد تائید قرار گرفت. ۳۷ مورد از نمونه‌های کار شده از نظر تست PCR مثبت

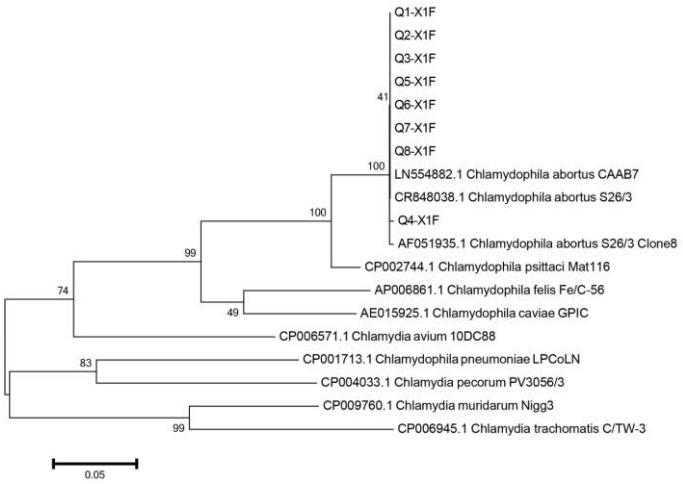
شدند که ۱۰ نمونه به‌طور تصادفی انتخاب و با همکاری شرکت ماکروژن کره تعیین توالی نوکلئوتیدی گردید (شکل ۱). با توجه به استفاده از کنترل مثبت (نمونه‌ای از *کلامیدیا آبورتوس* که قبلاً با IGS-Sr RNA توالی‌یابی و تأیید شده بود) و منفی (آب مقطر) در تمامی مراحل آزمون‌های انجام شده، نمونه‌هایی که به این روش از لحاظ حضور *کلامیدیا آبورتوس* مثبت گزارش شدند از دقت کافی با ارزش تشخیصی و کاربردی برخوردارند.



شکل ۱- نمایش محصولات PCR، M مارکر ۱۰۰bp، NTC (Non Template Control) کنترل منفی P+ (کنترل مثبت)، ۴-۱ نمونه‌های تست مثبت

مقایسه توالی نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنتیکی

نتیجه توالی‌یابی‌ها پس از بلاست در دیتابانک NCBI با یکدیگر و جدایه‌های موجود در Gene Bank مقایسه شد و توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Bio edit و DNA star آنالیز فیلوژنتیک انجام شد. پس از Alignment توالی مورد هدف با دیگر توالی‌های ثبت شده در NCBI ترسیم درخت شباهت به صورت زیر انجام شد (شکل ۲). توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های ثبت شده در NCBI بالای ۹۹ درصد شباهت را نشان داد (جدول ۱).



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه در مقایسه با جدایه‌های سایر نقاط مختلف جهان بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی

جدول ۱- درصد شباهت و تفاوت‌های موجود در توالی‌های جدا شده سویه‌های مورد مطالعه با جدایه‌ها و گونه‌های کلامیدیا جدا شده از سایر نقاط جهان

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
1		100.0	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	95.0	84.1	83.3	78.2	77.0	74.6	74.9	74.8	1	Q1-X1F
2	0.0		100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	95.0	84.1	83.3	78.2	77.0	74.6	74.9	74.8	2	Q2-X1F
3	0.0	0.0		99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	95.0	84.1	83.3	78.2	77.0	74.6	74.9	74.8	3	Q3-X1F
4	0.2	0.2	0.2		99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.5	94.8	84.1	83.1	78.2	77.2	74.8	75.2	74.8	4	Q4-X1F
5	0.0	0.0	0.0	0.2		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	95.0	84.1	83.3	78.2	77.0	74.6	74.9	74.8	5	Q5-X1F
6	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	95.0	84.1	83.3	78.2	77.0	74.6	74.9	74.8	6	Q6-X1F
7	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	99.8	95.0	84.1	83.3	78.2	77.0	74.6	74.9	74.8	7	Q7-X1F
8	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	99.8	95.0	84.1	83.3	78.2	77.0	74.6	74.9	74.8	8	Q8-X1F
9	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	99.8	95.0	84.1	83.3	78.2	77.0	74.6	74.9	74.8	9	LN554882_Chlamydophila_abortus_CAAB7
10	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.8	95.0	84.1	83.3	78.2	77.0	74.6	74.9	74.8	10	CR848038_Chlamydophila_abortus_S263
11	0.2	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		95.0	84.1	83.3	78.2	76.8	74.4	74.9	74.6	11	AF051935_Chlamydophila_abortus_S263_Clo
12	5.2	5.2	5.2	5.4	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2		85.5	85.1	79.6	76.5	76.2	75.4	75.1	12	CP002744_Chlamydophila_psittaci_Mat116
13	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	16.4		87.6	79.8	75.4	76.6	76.8	74.6	13	AP006861_Chlamydophila_felis_FeC-56
14	19.5	19.5	19.5	19.8	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	17.0	13.6		79.9	74.6	76.9	76.4	74.5	14	AE015925_Chlamydophila_caviae_GPIC
15	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	24.2	23.9	23.9		77.0	76.4	77.1	76.0	15	CP006571_Chlamydia_avium_10DC88
16	28.2	28.2	28.2	27.8	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.5	28.7	30.5	31.9	28.0		74.7	79.2	75.8	16	CP001713_Chlamydophila_pneumoniae_LPCoL
17	31.9	31.9	31.9	31.5	31.9	31.9	31.9	31.9	31.9	31.9	32.3	29.3	28.2	28.1	28.6	31.4		76.8	82.4	17	CP009760_Chlamydia_muridarum_Nigg3
18	31.1	31.1	31.1	30.7	31.1	31.1	31.1	31.1	31.1	31.1	31.1	30.3	28.2	29.1	27.6	24.6	28.0		72.9	18	CP004033_Chlamydia_pecorum_PV30563
19	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.8	30.9	31.5	31.8	29.4	29.7	20.7	34.2		19	CP006945_Chlamydia_trachomatis_CTW-3
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		

بحث و نتیجه‌گیری

بدلیل مشکلات جدی تکنیکی در جداسازی عامل بیماری‌های ناشی از کلامیدیاها در چند دهه گذشته تحقیقات عمده‌ای در این خصوص صورت نگرفته است. پس از متداول شدن روش‌های مولکولی در شناسایی بیماری‌های میکروبی طی حدود یک یا دو دهه اخیر، مطالعاتی در ردیابی این باکتری در بیماری‌های مختلف انجام شده است. اکثر مطالعات انجام پذیرفته در شناسایی کلامیدیاها بیشتر روی سویه‌های مورد انسانی بوده و تحقیقات کمتری روی عامل *کلامیدیا آبورتوس* در گوسفند به‌خصوص روی عمل آنالیز فیلوژنتیکی آن در ایران و کشورهای دیگر انجام پذیرفته است. محققان چه در ایران و یا دیگر کشورها در گذشته با روش‌های کشت سلول و تخم‌مرغ جنین‌دار و در سال‌های اخیر به روش PCR و Real time PCR روی تشخیص مولکولی باکتری تحقیق نموده‌اند. عامل در مطالعه حاضر متعاقب استخراج DNA اختصاصی گونه آبورتوس با کمک روش PCR، توالی نوکلئوتیدی آن به کمک روش Sequencing تعیین گردید و آنالیز فیلوژنتیکی *کلامیدیا آبورتوس* و قرابت و دوری

سویه‌ها به‌دست آمد و با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن و ثبت شده در آن بررسی گردید. در بسیاری از مطالعات امروزه از روش‌های مولکولی مثل PCR و توالی‌یابی جهت شناسایی کلامیدیاها استفاده می‌شود، چرا که نسبت به روش‌های رایج قبلی مثل کشت و رنگ‌آمیزی که در بسیاری از موارد ابهام‌آمیز می‌باشد روش قابل اعتمادتری بوده و قادر به شناسایی جنس و گونه‌های نزدیک به هم می‌باشد.

تحقیقات وسیع صورت گرفته در بسیاری از کشورها نشان می‌دهد که کلامیدیاها به‌ویژه *کلامیدیا آبورتوس* برخلاف تصور گذشته یکی از عوامل عمده سقط جنین در گوسفند می‌باشد.

در مطالعه حاضر از ۳۲ گله گوسفند در مناطق مختلف استان البرز ۱۰۰ نمونه جنین سقط شده به‌طور تصادفی انتخاب گردید. بعد از عمل PCR، ۳۷ نمونه مثبت بودند که ۱۰ نمونه به‌طور تصادفی انتخاب و عمل سکانس و تعیین توالی نوکلئوتیدی توسط شرکت ماکروژن کره انجام شد. بعد در سایت NCBI عمل BLAST و توسط نرم افزارهای Bio edit و DNA star آنالیز فیلوژنتیکی انجام و درختچه فیلوژنتیکی ترسیم گردید. جدول دوری و یا نزدیکی سویه‌های مورد مطالعه و سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن بررسی و به این نتیجه رسیدیم که از ۱۰ نمونه مورد مطالعه ۸ جدایه از نظر عمل سکانس دارای جواب بوده و ۱۰۰ درصد شبیه هم می‌باشند. سویه‌های دیگر موجود در بانک ژن که نزدیک و دارای تشابه زیادی به سویه‌های ما می‌باشد شامل موارد زیر هستند:

LN554882/1 Chlamydophila abortus CAAB7
CR848038/1 Chlamydophila abortus S26/3
AF051935/1 Chlamydophila abortus S26/3 colone8

که هر سه این سویه‌ها از کشور انگلستان در بانک ژن ثبت شده‌اند. سویه‌ها و گونه‌های دیگر در این درختچه دارای تفاوت و از سویه‌های مورد مطالعه ما دور هستند.

در مطالعه‌ای که توسط هیدتو و همکاران در سال ۱۹۹۷ در ژاپن تحت عنوان آنالیز فیلوژنتیکی جنس‌های کلامیدیا بر اساس سکانس ژنی 16s rRNA انجام گرفته، ۱٤مورد *کلامیدیا پسیتاسی* جدا گردید که از این تعداد ۷ مورد از گربه، ۲ مورد از پرنده، ۲ مورد از انسان، و از گاو، گوسفند و خوک یک مورد جداسازی شدند. ۵ مورد نیز *کلامیدیا پکوروم* بود که ۳ مورد از گاو و از گوسفند و کوآلا نیز هر کدام یک مورد جداسازی شد. ۹ سویه *کلامیدیا تراکوماتیس* جداسازی شده بود که از این تعداد ٦ مورد انسانی و ۲ مورد مربوط به خوک و یک مورد هم از موش جداسازی شده است. طبق آنالیز و درختچه فیلوژنتیکی این سویه‌ها در ۸ خوشه قرار گرفتند (Hideto, *et al.*, 1997).

وانگ و همکاران در سال ۲۰۰۱ برای جداسازی *کلامیدیا آبورتوس*، نمونه‌هایی از موارد سقط جنین گاو و بز و همچنین نمونه‌هایی از حیوانات سالم تهیه کردند و با استفاده از روش PCR و پرایمرهای PSI، CPI، CHOMP371 و CTU و تخم‌مرغ جنین‌دار عامل را جداسازی نمودند. ایشان نمونه‌هایی را که در PCR مثبت بودند به تخم مرغ جنین‌دار ۷-٦ روزه تلقیح کردند. در بررسی فوق ٤٥/۲ درصد گاوهای سالم و ۳٤/۹ درصد گاوهای سقط کرده و همینطور ۳۸/۹ درصد بزهای سالم و ۲۹/٤ درصد بزهای سقط کرده با آزمون PCR از نظر *کلامیدیا آبورتوس* مثبت بودند.

نتیجه تلقیح به تخم مرغ جنین‌دار در مورد نمونه‌های مثبت در PCR نیز که مربوط به دام‌های سقط کرده بودند به ترتیب در گاوها و بزها ۲۲/۷ درصد،۳۳/۳ درصد بودند (Wang and Shieh, 2001).

بری و همکاران در فرانسه در سال ۲۰۰۹ با استفاده از روش PCR و با پرایمرهای 821R- PMPF,PMP توانستند سه عامل *کوکسیلا بورنتی*، *کلامیدیا آبورتوس* و *کلامیدیا پکوروم* را با حساسیت و ویژگی خوبی از یکدیگر تفریق کنند. نمونه‌هایی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند از گله‌هایی بودند که عارضه سقط را نشان داده بودند. از بین آن‌ها ۱۳ نمونه سوآپ واژن و ۳ نمونه جفت از نظر *کلامیدیا آبورتوس* با این آزمون مثبت بودند (Berri *et al*., 2009).

کرلان و همکاران در سال ۲۰۰۰ از روش‌های PCR وتلقیح به سلول‌های MCcoy و رنگ‌آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده و فلورسنت آنتی‌بادی جهت تشخیص *کلامیدیا آبورتوس* استفاده نمودند. در این مطالعه ۳۷/۲ درصد نمونه‌ها مربوط به جفت، ۱۳/۹ درصد نمونه‌های ریه و ۹/۵ درصد نمونه‌های جمع‌آوری شده از شکمبه در کشت سلول مثبت شدند. هم‌چنین، ۳۱/٦ درصد نمونه‌ها در آزمون PCR و ۵۰/٦ درصد در FAT و در نهایت ۲۷/٤درصد در رنگ‌آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده مثبت بودند (Creelan and Mc cullough, 2002).

امین در سال ۲۰۰۳ در کشور مصر و از گله‌هایی که سابقه عفونت کلامیدیایی داشتند، نمونه‌های از منی گاو، بوفالو و قوچ تهیه نمود. تمامی نمونه‌ها را با دو روش کشت سلول و PCR جهت تشخیص گونه مورد بررسی قرار داد. رده سلولی مورد استفاده در مطالعه ایشان BHK بود و برای رنگ آمیزی از ایزوتیوسیانات فلورسئین کونژکه شده با آنتی‌بادی کلامیدیا استفاده شد. همچنین در روش PCR قطعه هدف، ژن OMP2 و پرایمر مورد استفاده قادر به شناسایی گونه‌های کلامیدیا بود. این محققین نشان دادند که در نمونه‌های منی گاو، بوفالو و قوچ تعداد مورد مثبت با آزمایش PCR به ترتیب ۱۸، ۷ و ۱۱ می‌باشد. در حالی که با روش کشت سلول تعداد نمونه‌های مثبت به ترتیب برابر ۱۰، ٤ و ۷ بود. همچنین نتیجه بررسی ایشان نشان داد که تمامی نمونه‌های مثبت کشت سلول با PCR نیز مثبت شدند، در حالی که ۱۵ نمونه PCR مثبت در کشت سلول منفی بودند. امین در مطالعه خود مشخص نمود که حساسیت روش PCR در مورد نمونه منی گاو ، بوفالو و قوچ به ترتیب برابر با ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد و حساسیت کشت سلول در این حیوانات به ترتیب برابر است با ۵۸/۵، ۵۷/۱ و ۷۰ درصد، که این میزان تفاوت قابل توجه می‌باشد. هم‌چنین ویژگی PCR در این مطالعه به ترتیب برابر ۹۹، ۱۰۰ و ۹۷/۸ درصد و ویژگی کشت سلول به ترتیب برابر با ۱۰۰، ۱۰۰ و۱۰۰ درصد بوده، که این مقدار نشان می‌دهد که تفاوت چندانی بین ویژگی این دو روش وجود نداشته است (Amin, 2003).

سامارو و همکاران در سال ۲۰۱۲ در ولز با نمونه‌گیری از جفت میش و ماده بزهایی که در اواخر آبستنی دچار سقط جنین شده بودند، میزان حساسیت ٤ روش رنگ‌آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده، PCR، جداسازی از سلول MC COY وتخم مرغ جنین‌دار را با یکدیگر مقایسه نمودند. نمونه‌های مذکور به تخم‌مرغ جنین‌دار عاری از پاتوژن در روز ۷ تلقیح شد. در روش PCR با استفاده از ژن‌های 23s، 16s، putative

helicase، OMP و OMP2 انجام پذیرفت. در این بررسی ۹۸/۵ درصد نمونه‌ها در رنگ آمیزی ذیل نلسون، ۷٤/٦ درصد در PCR و ۹۸/٤ درصد در کشت سلول و در نهایت ۹۳/۳ درصد در تخم‌مرغ جنین‌دار مثبت شدند. برخلاف سایر مطالعات، نتیجه این تحقیق مشخص نمود که حساسیت روش‌های کشت سلول و جداسازی از تخم مرغ جنین‌دار بیشتر از PCR است که با توجه به نتایج غیرمنتظره، احتمالاً در روش PCR انجام شده در مطالعه ایشان اشکال وجود دارد و لازم است مورد ارزیابی مجدد قرار گیرد (Samooro *et al.*, 2012).

در مطالعه عثمان و همکاران در سال ۲۰۱۱ در کشور مصر، سوآپ مدفوع گوسفندان و بزها با روش‌های کشت سلول در رده سلولی ورو(vero)، جداسازی در تخم مرغ جنین‌دار، PCR و رنگ‌آمیزی گسترش‌ها با رنگ‌آمیزی گمینز، رنگ‌آمیزی مستقیم آنتی‌بادی منوکلونال کونژوگه شده با فلورسئین و ایمنو پراکسیداز از جهت حضور گونه‌های کلامیدیا مورد بررسی قرار گرفتند. گسترش تهیه شده از کیسه زرده عفونی شده با رنگ‌آمیزی گمینز و رنگ‌آمیزی مستقیم آنتی‌بادی منوکلونال کونژگه شده به فلورسئین در زیر میکروسکوپ مشاهده می‌گردید. نتیجه مطالعه فوق نشان داد که ۵ درصد نمونه‌های تلقیح شده به تخم‌مرغ جنین‌دار دارای آلودگی کلامیدیایی است. در گسترش‌های تهیه شده از کیسه زرده که با رنگ‌آمیزی مستقیم آنتی‌بادی منوکلونال کونژگه شده به فلورسئین رنگ‌آمیزی شدند، ۵/۵ درصد نمونه‌ها در گوسفندان فاقد علامت و ٦/۵ درصد در دام‌های بیمار مثبت شدند. درمورد نمونه‌های مربوط به بز نیز درصد موارد مثبت در دام‌های فاقد علامت و در دام‌های بیمار به ترتیب ۵/٦ و ۷/۵ درصد بود. در رنگ‌آمیزی گسترش‌های تهیه شده از کیسه زرده با روش ایمونوپراکسیداز در گوسفندان بدون علامت و بیمار به ترتیب ۵/٦ و ٦/۷ درصد و در بزهای بدون علامت و بیمار به ترتیب ۵ و ۵/۷ درصد موارد مثبت بودند. این در حالی است که با روش PCR درصد موارد مثبت ٤۲/۹ درصد بود (Osman *et al.*, 2011).

تحقیقات صورت گرفته در سوئیس که توسط برل و همکاران در سال ۲۰۰٤ انجام شده نشان داده است که ۳۹ درصد از سقط جنین‌های گوسفند و ۲۳ درصد از سقط جنین‌های بز در اثر کلامیدیا بوده است. این در حالی است که در همین تحقیق درصد آلودگی سرمی این گوسفندان با کلامیدیا تا ٤۳ درصد گزارش شده است (Borel *et al.*, 2006).

از جمله روش‌های مولکولی مورد استفاده در تشخیص کلامیدیاها PCR می‌باشد. مزیت PCR این است که حساسیت بالایی دارد و آسان بوده و وقت کمی برای انجام آن صرف می‌شود. ضمن این‌که می‌توان با استفاده از آن بر روی تعداد نمونه‌های زیادی کار کرد (Domeika *et al.*, 1994). درکشور ما عدم استفاده از روش‌های مناسب تشخیصی سقط جنین و همین‌طور عدم توجه به عوامل ویروسی و کلامیدیایی در بررسی‌ها از نقاط ضعف مطالعات سقط جنین محسوب می‌شود.

پیشنهاد می‌گردد با توجه به اهمیت *کلامیدیا آبورتوس* در ایران همانند بروسلا و سایر عوامل عفونی دیگر به عنوان عامل سقط جنین در گوسفند و بز در نظر گرفته شود. مثبت بودن نمونه‌های مورد مطالعه

حاضر خود می‌تواند موید این مسئله مهم باشد. به نظر می‌رسد وفور این جرم در گله‌های گوسفند در ایران بیش از آنی باشد که تاکنون تصور می‌شد و لذا توصیه می‌شود در کنار سایر عوامل مهم سقط جنین گوسفند، بررسی *کلامیدیا آبورتوس* مورد توجه بیشتری قرار گیرد. کشت سلولی در جنین تخم‌مرغ اگر چه هنوز استاندارد طلایی محسوب می‌شود ولی با گسترش آزمون‌های مولکولی از جمله PCR در سطح آزمایشگاه‌های تشخیصی و فراهم بودن ملزومات آن در بسیاری از آزمایشگاه‌ها و سهولت و سرعت و صحت انجام آن می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های سخت کشت سلولی باشد که همپای روش‌های سرولوژیک برای تشخیص سقط جنین آنزئوتیک در گوسفند بکار گرفته شود. توصیه می‌شود با انجام تحقیقات کلان‌تر در سطح دیگر استان‌ها و حتی کشور، این عامل از یاد رفته سقط جنین گوسفندان بهتر شناسایی گردد و روش‌های مناسب پیش‌گیری از قبیل واکسیناسیون نیز بدین منظور در نظر گرفته شود.

نتایج تحقیق حاضر نمایانگر توانایی و دقت آزمایش طراحی شده برای تشخیص و تکثیر مناسب ژن IGS-s-s-rRNA به‌طول bp۳۵۲ می‌باشد که *کلامیدیا آبورتوس* را به‌عنوان یکی از عوامل سقط جنین گوسفند شناسایی کند.

با بررسی این شباهت‌ها و تفاوت‌ها و با توجه به درختچه فیلوژنتیکی ترسیم شده ۸ مورد از توالی‌ها شباهت ۱۰۰ درصدی با هم داشته و در مورد شباهت توالی‌های مورد مطالعه با توالی‌های ثبت شده در ژن بانک بیشترین شباهت را با جدایه‌های AF051935. 1، CR848038. 1 و LN554882. 1 دارد و بیشترین اختلاف را با گونه‌های دیگر کلامیدیای ثبت شده در بانک ژن دارد. برحسب آنالیز فیلوژنتیکی، تمام جدایه‌های مورد مطالعه در یک دودمان قرار دارند که این نکته بیانگر منشأ مشترک جدایه‌ها می‌باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان کمال تشکر و قدردانی خود را از پرسنل آزمایشگاه مبنا که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند، اعلام می‌دارند.

منابع

- Aitken, I.D., Clarkson, M.J. and Linklater, K. (1990). Enzootic abortion of ewes. Veterinary Record, 126: 136-138.
- Amin, A.S. (2003). Comparison of polymerase chain reaction and cell culture for the detection of chlamydophila species in the semen of bulls, buffalo and rams. Veterinary Journal, 166(1): 88-92.
- Berri, M., Rekiki, A. and Boumedine, K.S. (2009). Simultaneous differential detection of Chlamydophila abortus, Chlamydophila pecorum and Coxiella burnetii from aborted ruminants clinical samples using multiplex PCR. BioMed Central Microbiology, 9: 1-8.

- Borel, N., Thoma, R., Spaeni, P., Weilenman, R., Teankum, K., Brugnera, E., *et al*. (2006). Chlamydia-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland. Veterinary Pathology, 43: 702-708.
- Creelan, J.L. and Mc cullough, S.J. (2002). Evaluation of strain specific primer sequences from an abortifacient strain of ovine Chlamydophila abortus for the detection of EAE by PCR, Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters, 190: 103-108.
- Dagnall, G.J.R. (1990). A simple staining method of the identification of Chlamydial elementary bodies in the foetal membranes of sheep affected by ovine enzootic abortion. Veterinary Microbiology, 21: 233-239.
- Domeika, M., Ganusauska, A. and Bassiri, M. (1994). Comparison of polymerase chain reaction direct immunofluorescence. Veterinary Microbiology, 42: 273-280.
- Gyles, C.L., Theon, C.O. (1993). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 2nd ed., USA: Iowa State University, pp: 312-319.
- Hideto, F., Pudjiatmoko, M., Yoshitsugu, O. and Tsuyoshi, Y. (1997). Phylogenetic analysis of the genus Chlamydia based on 16s rRNA gene sequences. Internatinal Journal of Systemic, Bacteriology, 47(2): 425-431.
- Osman, K.M., Ali, H.A. and Elajakee, J.A. (2011). Chlamydia psittaci and chlamydia pecorum infections in goats and sheep in Egypt. Revue Scientifique of technique off int Epiz, 30(3): 939-948.
- Qunin, P.J., Carter, M.E. and Markey, B. (1994). Clinical Veterinary Microbiology. UK: Mosby, Wolf, pp: 310-315.
- Samooro, S.A., Murray, R.D. and Woldehiwet, Z. (2012). Comparisons of polymerase chain reaction and isolation in cell culture and embryonated hen's egg for the detection of chlamydophila abortus in aborted ovine and caprine placenta. Veterinary World, 2: 32-39.
- Timoney, J.F., Gillespie, J.H. and Scott, F.W. (1988). Hagan and Bruners Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8th ed., Comstock Publishing Associates, pp: 356-381.
- Wang, F.I. and Shieh, H. (2001). Prevalence of chlamydophila abortus infection in domesticated ruminants in Taiwan. Journal Veterinary Medicine Science, 63(11): 1215-1220.
- Yvonne, P. and Veerle, D. (2010). Multi locus sequence typing of chlamydia reveals an Association between chlamydia psittaci Genotypes and Host species. Plos one Journal, 5(12): 1-9.