لیزر در پزشکی ۱۳۹۹/ دوره ۱۷ / شماره ۴ / صفحات ۱۱-۱.

مقاله پژوهشی

بررسی شیوع کلامیدوفیلا آبورتوس در نمونه‌های شیر خوراکی با استفاده از روش PCR و الکتروفورز براساس نور فرابنفش

فریبا طاهری[۱]
عبدالغفار اونق[۲]*
کریم مردانی[۳]

چکیده

مقدمه: کلامیدوفیلاآبورتوس یکی از علل مهم سقط آنزئوتیک میش‌ها و از دست دادن بره‌ها در هنگام آبستنی در بعضی مناطق محسوب می‌شود. در عفونت با این باکتری، سقط جنین معمولاً در ۲ تا ۳ هفته آخر آبستنی رخ می‌دهد و بره‌های مرده و یا ضعیف متولد می‌شوند. از آنجایی که باکتری کلامیدوفیلا در شرایط آزمایشگاهی invitro رشد نمی‌کند و معمولاً با آزمایش‌های تشخیصی روتین متوجه حضور آن نمی‌شوند، جستجوی آنتی‌ژن یا ژنوم آن توصیه می‌شود.

روش بررسی: هدف از این مطالعه بررسی حضور باکتری کلامیدوفیلاآبورتوس در تعدادی از نمونه‌های شیر از گوسفندان و بزهای (با تاریخچه سقط جنین و بدون تاریخچه سقط جنین) در استان آذربایجان غربی بود. برای این منظور ۳۶۰ نمونه شیر در فاصله زمانی سال ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۸جهت شناسایی ژن 16S rRNA با روش Nested -PCR مورد آزمایش قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان آلودگی‌در نمونه‌های بررسی‌شده ۵/۵۵ درصد بود. بالاترین میزان آلودگی در منطقه ارومیه مشاهده شد و بالاترین میزان پراکندگی در فصل پاییز مشاهده گردید. این بررسی نشان داد که شیوع کلامیدوفیلا آبورتوس در دام‌هایی با سابقه سقط جنین بالاتر از دام‌هایی بدون ساقه سقط جنین می‌باشد. همچنین میزان آلودگی با باکتری کلامیدوفیلا آبورتوس در شیر گوسفند بیشتر از شیر بز بود.

نتیجه‌گیری و بحث: این میزان آلودگی نشان‌دهنده نقش این باکتری در موارد سقط جنین می‌باشد که تاکنون کمتر به آن اهمیت داده شده است و با توجه به تعداد گوسفند و بز 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.

واژه‌های کلیدی: سقط جنین، گوسفند، بز، کلامیدوفیلاآبورتوس، آذربایجان‌غربی، NestedPCR، 16SrRNA

۱- دانشجوی دکتری تخصصی باکتریولوژی، دپارتمان میکروبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه‌ارومیه،آذربایجان‌غربی
Email:fariba201282@yahoo.com .
شماره‌تماس:
۰۴۴۳۲۷۷۰۵۰۸۰۰۹۸۹۳۸۹۲۲۱۰۴۵

۲- دانشیارمیکروبیولوژی(پاتوبیولوژی)،دپارتمان میکروبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی.

۳ استاد اپیدمیولوژی مولکولی، دپارتمان بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی.

نویسندهٔ مسئول: عبدالغفار اونق،
پست الکترونیکی:
ownagh@urmia.ac.ir ownagh@yahoo.com
شماره فکس: ۰۴۴۳۲۷۷۱۹۲۶
شماره تماس: ۰۴۴۳۲۷۷۰۵۰۸

مقدمه:

کلامیدیا دارای گونه‌های متعددی هست که هر کدام باعث بیماری‌های متعدد می‌شوند. از جمله گونه‌های تراکوماتیس و پنومونیه که به ترتیب باعث بیماری‌های منتقله از راه جنسی و بیماری‌های تنفسی انسانی می‌شوند. از طرف دیگر سایر گونه‌های مهم که در دامپزشکی اهمیت بارزی دارند شامل abortus, pecorum, felis , caviae and suis می‌باشند که گونه آبورتوس (Chlamydia psittacosis serotype 1) به عنوان عامل گونه اصلی سقط جنین در دام‌ها از جمله گاو، گوسفند و بز می‌باشد[۱].

کلامیدوفیلاآبورتوس شایع‌ترین عامل سقط جنین در نشخوارکنندگان کوچک در سوئیس شناخته شده است به طوری که آمار ارائه‌شده از مطالعات قبلی در سوئیس حاکی از آلودگی ۳۹ درصد گوسفندان و ۲۳ درصد بزهای سقط کرده با این عامل می‌باشد[۲]. این باکتری متعلق به خانواده کلامیدیاسه و از جمله باکتری‌های داخل سلولی اجباری و گرم منفی می‌باشد. خانواده کلامیدیاسه شامل دو جنس کلامیدیا و کلامیدوفیلا و مشتمل بر ۹ گونه است[۳]. ارگانیسم در شرایط آزمایشگاهی رشد نمی‌کند و برای تشخیص از 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[٤]. اولین علامت برجسته این بیماری در گوسفند و بز سقط است[٥]. ترشحات واژن که بعد از سقط خارج می‌شوند و همچنین جفت و جنین و پوشش بره‌ها حاوی مقادیر بالایی از باکتری می‌باشند که در انتشار بیماری نقش مؤثری دارند[٤].

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.

آلودگی با کلامیدوفیلا جدی و مهم می‌باشد و برای زنان باردار تهدیدکننده زندگی است از این رو آن‌ها بایستی در طول فصول بره‌زایی از تماس با گوسفندان اجتناب کنند. پیشگیری و کنترل درمان بیماری با واکسیناسیون یا تزریق اکسی‌تتراسایکلین امکان‌پذیر است[٤].

نتایج مطالعات نشان داده است که پذیرش روش PCR در نمونه‌های بافتی جهت تشخیص Chlamydophila abort us دارای حساسیت و سرعت بیشتری نسبت به کشت سلول می‌باشد.

ژن 16S-rRNA

ژن 16S-rRNA یک جزئی از تحت واحد s ۳۰ از ریبوزوم پرویوکاریوت‌ها است که به توالی شاین‌دلگانو باند می‌شود. ژن 16S-rRNA در تمام باکتری‌ها وجود دارد و دارای یک منطقه مشترک ثابت در بین تمام گونه‌های باکتریایی است. پرایمرهای فراگیر ناحیه ثابت موجود در توالی ژن RNA ریبوزومی ۱۶ سوودبرگ 16S- RNA که در تمام باکتری‌ها ثابت است را تکثیر می‌نمایند. برای جستجوی توالی اختصاصی مربوط به ژن 16s - rRNA در کلامیدوفیلا در نمونه‌های DNA که از شیر استخراج شده است، از روش Nested PCR استفاده می‌شود[٦].

تعیین DNA برای نمونه‌های OD

برای تعیین خلوص نمونه DNA یا RNA از نسبت طول موج ۲۸۰/۲٦۰ استفاده می‌شود. به طور کلی نسبت‌های معادل ۲ و ۱/۸ به عنوان نمونه خالص DNA شناخته می‌شوند. اگر میزان جذب ۲۸۰/۲٦۰ در نمونه‌های RNA و DNA به ترتیب کمتر از ۲ و کمتر از ۱/۸ باشد، احتمال آلودگی با پرتئین و یا فنول و یا سایرترکیب‌ها مطرح است.

برای دیدن باندهای PCR از الکتروفورزاستفاده می‌شود که بعد از این مرحله با اشعه ماوراءبنفش باندها در حضور مارکر رؤیت می‌شوند. امواج فرابنفش یا به اختصار Ultraviolet UV امواجی الکترومغناطیسی هستند با طول موجی در محدوده تا ٤۰۰ نانومتر که کوتاه‌تر از نور مرئی و بلندتر ازپرتوی ایکس هستند. خورشید ساطع‌کننده فرابنفش در هر سه باند UVB, UVC, UVA به مقدار فراوان است. اشعه ماوراء بنفش باعث تغییرات در بیان ژن و رؤیت باند ناشی از حضور باکتری می‌شود[۷].

A-UV دارای بیشترین میزان انرژی می‌باشد (۲۸۱ نانومتر) و دارای طول موج کمتر از C-UV می‌باشد (۹۲۱-۲۸۱ نانومتر) و باعث ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو در مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و آنزیم‌ها می‌شود. همچنین باعث ایجاد رادیکال‌های سمی اکسیژن می‌شود و باعث تغییر در ساختار DNA به صورت جهش و دایمر تیمین می‌شود. DNA یکی از مولکول‌های اصلی است و پایداری آن برای عملکرد صحیح و وجود همه سیستم‌های زنده از اهمیت بالایی برخوردار است. مواد شیمیایی و تشعشعات ژنوتوکسیک اثرات B-UV دارای سطح انرژی کمی می‌باشد.

سوئی بر ثبات ژنوم دارند. اشعه ماوراء بنفش UVR به طور عمده یکی از (UV-B: 280-315نانومتر) عوامل قدرتمندی است که می‌تواند با ایجاد انواع ضایعات DNA جهش‌زا و سیتوتوکسیک مانند دایمرهای سیکلوبوتان- پیریمیدین وضعیت طبیعی زندگی را تغییر دهد. UV-A در ایجاد آسیب در DNA راندمان ضعیفی دارد، زیرا توسط DNA طبیعی جذب نمی‌شود. UV-A و انرژی نور مرئی تا ۷۰۰-۶۷۰ نانومتر قادر به تولید اکسیژن منفرد هستند که می‌تواند از طریق واکنش‌های حساسیت‌زایی غیرمستقیم به DNA آسیب برساند [۸]. از آنجا که اسیدهای نوکلئیک در هنگام ضدعفونی با اشعه ماوراءبنفش استاندارد (۲۵٤ نانومتر) اهداف اصلی در باکتری‌ها هستند، میزان غیرفعال‌سازی باکتری نیز به ترمیم DNA بستگی دارد. با توجه به تغییرات DNA مربوط به اشعه ماوراءبنفش روش‌های مبتنی بر PCR امکان شناسایی مستقیم آسیب DNA و ترمیم آن هنگام ضدعفونی UV را فراهم می‌کنند[۹].

در این گزارش، DNA جداشده از ژل آگارز به عنوان یک سوبسترای برای نسخه‌برداری آزمایشگاهی، ترنسفورمیشن باکتری کلامیدیا و PCR مشخص شد. جالب اینجاست که با افزودن سیتیدین یا گوانوزین به بافر الکتروفورز، محافظت از DNA در برابر آسیب UV وجود دارد[۸]. هدف از پژوهش حاضر بررسی ژنومی کلامیدوفیلا آبورتوس به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای در نمونه‌های شیر گوسفند و بز در استان آذربایجان غربی، الکتروفورز ژنوم براساس نور فرابنفش و ضرورت توجه به ارائه روش‌هایی مناسب در جهت کنترل و پیشگیری می‌باشد.

روش بررسی

۱. نمونه‌گیری

الف) نمونه‌گیری مرحله اول:

در فصل بهار و تابستان۱۳۹۶، ۹۰ عدد نمونه شیر گوسفند و ۹۰ نمونه شیر بز از مناطق مختلف آذربایجان غربی اخذ شد. جهت استخراج چربی (خامه) شیر، نمونه‌ها را سانتریفیوژ و چربی با سواب جدا شد. رسوب‌ها به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام کارهای مولکولی نگهداری شدند.

ب) نمونه‌گیری مرحله دوم:

نمونه‌گیری به تعداد ۹۰ عدد شیرگوسفند و ۹۰ عدد شیر بز در فصل پاییز و زمستان ۱۳۹۶ از مناطق مختلف آذربایجان غربی صورت گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در کنار یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه ارومیه منتقل گردید. نمونه کنترل مثبت DNA مورد استفاده در این مطالعه از دانشگاه لرستان، دانشگاه تهران و دانشگاه مصطفی کمال ترکیه اخذ شد.

نمونه‌های جمع‌آوری‌شده شامل ۳٦۰ نمونه شیر گوسفندان و بزان دارای تاریخچه سقط جنین و بدون سابقه سقط جنین که ۱۲۰ مورد از شهرستان سلماس، ۱۲۰ مورد از شهرستان خوی و ۱۲۰ نمونه دیگر از شهرستان ارومیه در فاصله زمانی سال‌های ۹۸-۹٦ تهیه گردید. نمونه‌های شیر در میکروتیوب‌های استریل به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل گردید. نمونه‌ها تا زمان آزمایش و استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲. استخراج DNA

استخراج با کیت (Gene All cell SV mini 250 p) محصول شرکت پیشگام طبق دستورالعمل سازنده انجام گردید. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از رسوب نمونه به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. حجم نمونه‌هایی که کمتر از ۲۰۰ میکرولیتر بود با (PBS) به حجم ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به نمونه‌ها اضافه گردید. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (BL) به تیوب اضافه شد و ورتکس گردید و سپس در بن‌ماری ٥٦ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. پس از آن یک سانتریفوژ کوتاه انجام شد و در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق به نمونه اضافه گردید. سپس یک ورتکس و سانتریفوژ کوتاه انجام شد و سپس کل حجم نمونه به لوله‌های (SV) منتقل شدند. در ۸۰۰۰ دور به مدت یک دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع زیر جمع‌آوری‌شده در لوله زیر ستون تخلیه شدند و سپس ٦۰۰ میکرولیتر بافر شستشو (BW) اضافه شد. یک دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفوژ صورت گرفت و مایع زیری خارج شد و در مرحله بعد ۷۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی مرحله دوم (TW) اضافه شد و یک دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد برای اینکه بافرهای باقی مانده حذف شوند، با سرعت ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ انجام داده شد. در پایان ۲۰۰ میکرولیتر بافر جداکننده یا احیاء (AE) اضافه شد و مدت یک دقیقه

در دمای اتاق نگهداری شد، در پایان لوله‌ها با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند و نمونه‌های جمع‌شده داخل میکروتیوب برای انجام آزمایشات در مراحل بعد فریز شدند.

پس از سانتریفوژ کردن نمونه‌ها و جداسازی چربی از رسوب حاصل برای استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA استفاده می‌شود. کیفیت و مقدار DNA استخراج‌شده به روش اسپکتروفتومتری با محاسبه نسبت طول موج ۲٦۰ به ۲۸۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. DNA استخراج‌شده تا زمان انجام PCR در فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری خواهد شد[۹].

۳. انجام Nested PCR

برای جستجوی توالی اختصاصی مربوط به 16s-rRNA کلامیدوفیلا در نمونه‌های DNA استخراج‌شده از روش Nested PCR استفاده می‌شود. این روش قابلیت جستجوی ۵ واحد تولیدکننده گنجیدگی در میلی‌لیتر را دارد لذا، حساسیت آن بسیار زیاد است. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است[٦]. پرایمرها شامل یک جفت پرایمر اختصاصی مربوط به جنس و یک جفت پرایمر داخلی مربوط به گونه می‌باشد (در خانواده کلامیدیاسه تنها گونه کلامیدوفیلا آبورتوس در گوسفند و بز سقط می‌دهد) که با برنامه BLASTN (ver.2.2.27) ویژگی‌های آن‌ها مورد تأیید قرار گرفت. چرخه حرارتی استفاده‌شده در این مرحله شامل: سیکل اول ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه سیکل حرارتی دوم متشکل از ۳۵ سیکل بود که شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و سیکل حرارتی سوم ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

در مرحله دوم، یک میکرولیتر از محصول مرحله اول به عنوان نمونه الگو جهت تکثیر استفاده گردید و تمام مراحل واکنش زنجیره‌ای جهت کاهش نتایج PCR پلیمراز همانند مراحل قبل (به استثناء این که در این قسمت از پرایمرهای داخلی مربوط گونه استفاده گردید) تکرار گردید[۱۰].

۴- الکتروفورز

در این تحقیق از دستگاه (Gel documentation) مدل ساخت کشورهای (UK ،Ingenius Syngene Bio Imaging) استفاده شد.

الکتروفورز ژل مقدماتی DNA دورشته‌ای معمولاً شامل رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم‌بروماید و سپس روشنایی با نور ماوراء بنفش است. محصولات PCR مرحله ۱ و ۲ به ترتیب توسط ژل الکتروفورز گردید. پس از پایان، ژل با محلول اتیدیوم‌بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاه قرائت ژل تحت برخورد با اشعه ماوراء بنفش (UVitec, UK) مشاهده شد. باندهای مورد انتظار شامل باند ۴۳۶ bp برای محصول مرحله اول و باند 127bp محصول مرحله دوم بود[۶]. تمام مواد این آزمایش از شرکت تکاپوزیست و پیشگامان خریداری شد.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای برای ردیابی ژن *16S-rRNA*

جهت بررسی آماری داده‌های به دست آمده از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. پس از ترسیم نمودارهای توصیفی توسط نرم‌افزار Microsoft Excel جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها آزمون مربع کای استفاده شد. (P<۰/۰۵) به عنوان سطح اختلاف معنی‌دار آماری آزمون‌ها در نظر گرفته شد.

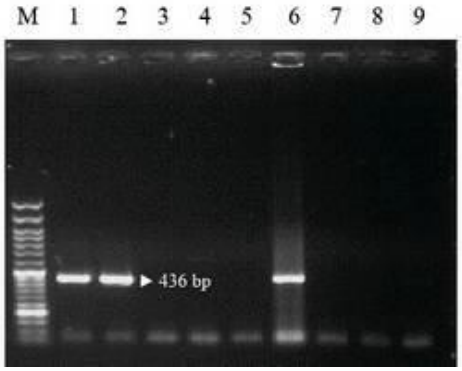
جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای برای ردیابی ژن *16S-rRNA*

Target	Primer	Sequence 5/----3/	Gene detected	Amplimer length (bp)	PCR conditions C/ of S				PCR cycles	Refrences
					pre Denaturation	Denaturation	Annealing	Extension		
16SIGF/16SIGR-PCR	16SIGF	ACG GAA TAA TGA CTT CGG	16S-rRNA	436	94/2m	94/1m	55/30s	72/1m	35	[6]
	16SIGR	TAC CTG GTA CGC TCA ATT								
16SIG nested-PCR	F	ATA ATG ACT TCG GTT GTT ATT	16S-rRNA	127	94/2m	94/1m	55/30s	72/1m	35	
	R	TGT TTT AGA TGC CTA AAC AT								

یافته‌ها و بحث

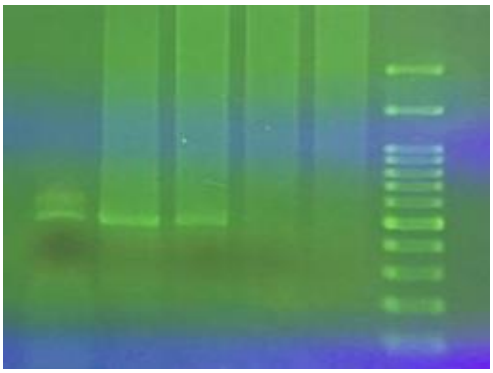
در این آزمایش از روش مولکولی برای افزایش حساسیت و اختصاصی بودن نتایج استفاده شده است. در این آزمون از دو جفت پرایمر که اختصاصی بودن آن برای کلامیدوفیلا تأیید شده است، استفاده گردید که شامل یک جفت پرایمر اختصاصی مربوط به جنس و یک جفت پرایمر داخلی که مربوط به گونه است. این آزمایش در دو مرحله طراحی شد. الکتروفورز محصولات مرحله اول بیانگر حضور تعدادی از موارد مثبت در نمونه‌ها با باند مورد انتظار ٤٣٦ زوج بازی بود که در مرحله دوم الکتروفورز نیز با مشاهده باند مورد انتظار ۱۲۷ زوج بازی، مثبت بودن نمونه‌ها تأیید گردید (شکل۱، ۲و ۳). نتایج مرحله 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 مرحله اول از بین نمی‌رود و جهت انجام مرحله دوم نیاز است در نتیجه ممکن است روی ژل آگارز باند محصول دور اول مشاهده شود.

مشاهده باندهای مولکولی تشخیص کلامیدیا آبورتوس با استفاده از نور فرابنفش (اولتراویولت):

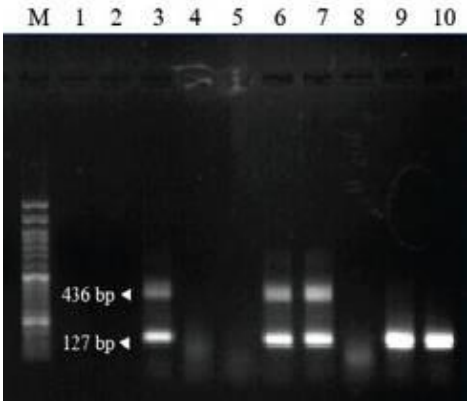


شکل۱: شکل ژل الکتروفورز باکتری کلامیدوفیلاآبورتوس با استفاده از نور فرابنفش، محصول مرحله اول PCR، M: bp DNA Ladder, Fermentas ، GeneRuler 50). نمونه‌های مثبت کلامیدوفیلا آبورتوس در شیر: شماره ۱ و ۲، کنترل منفی کلامیدوفیلا آبورتوس: شماره ۹، کنترل مثبت: شماره ۶

5 4 3 2 1 M



شکل۲: شکل ژل الکتروفورز باکتری کلامیدوفیلاآبورتوس با استفاده از نور فرابنفش، محصول مرحله اول PCR، M: bp DNA Ladder, Fermentas ، GeneRuler 100). نمونه‌های مثبت کلامیدوفیلاآبورتوس در شیر: شماره ۴ و ۵، کنترل منفی کلامیدوفیلاآبورتوس: شماره ۱، نمونه منفی کلامیدوفیلاآبورتوس: شماره ۲، کنترل مثبت: شماره ۳



شکل۳: شکل ژل الکتروفورز باکتری کلامیدوفیلاآبورتوس با استفاده از نور فرابنفش، محصول مرحله دوم PCR، M: bp DNA Ladder, Fermentas ، GeneRuler 50). کنترل منفی: شماره۱، نمونه‌های مثبت کلامیدوفیلاآبورتوس: شماره‌های ۳، ۶، ۷ و ۹، نمونه‌های منفی: شماره ۴ و ۵، کنترل مثبت کلامیدوفیلاآبورتوس: شماره۱۰

جدول ۲: آنالیز آماری متغیر مرتبط با شیوع کلامیدوفیلاآبورتوس در گوسفندان و بزهای منطقه آذربایجان غربی

متغیر	طبقه‌بندی	تعداد دام آزمایش‌شده	تعداد شیر دام‌گوسفند مثبت	تعداد شیردام بز مثبت	درصد نمونه‌های مثبت (%95CI)
منطقه	ارومیه	۱۲۰	۸	۳	۹.۱۷ (۰۵.۲۰-۱۵.٦۷)
	خوی	۱۲۰	۲	٤	۵.۰۰ (۲.۳۱-۱۰.٤۸)
	سلماس	۱۲۰	۲	۱	۲/۵۰ (۸.۵۰-۷.۰۹)
تاریخچه سقط جنین	دارای تاریخچه سقط	۱۸۰	۱۱	۵	۸.۸۹ (۵.۵۵-۱۳.۹۵)
	بدون تاریخچه سقط	۱۸۰	۳	۱	۲.۲۲ (۸.۷۰-۵.۵۷)
فصل	بهار	۹۰	۱	۰	۱.۱۱ (۲.۰۰-٦.۰۳)
	تابستان	۹۰	۳	۱	٤.٤٤ (۱.۷٤ -۱۰.۸۷)
	پاییز	۹۰	۸	٤	۱۳.۳۳ (۷.۷۹-۲۱.۸۷)
	زمستان	۹۰	۳	۰	۳.۳۳ (۱.۱٤-۹.۳٤)
گونه	گوسفند	۱۸۰	۱۲		٦/٦۷
	بز	۱۸۰	۸		٤/٤٤
کل		۳٦۰	۲۰		۵.۵۵%

درصد موارد مثبت آلودگی به کلامیدوفیلاآبورتوس ۵/۵۵ درصد در بین نمونه‌های مربوط به شیر محاسبه شد. موارد مثبت در شهرستان ارومیه و حومه، شهرستان سلماس و شهرستان خوی به ترتیب ۹/۱۷، ۲/۵۰ و ۵ درصد به دست آمد که بیشترین میزان آلودگی توسط این باکتری در بین نمونه‌های بررسی‌شده در دامداری‌های حومه ارومیه (۹/۱۷ درصد) مشاهده شد. همچنین در بررسی فصلی مشاهده شد که بالاترین شیوع باکتری کلامیدیاآبورتوس در فصل پاییز ۱۳/۳۳ درصد بود. در بررسی تعداد موارد مثبت این باکتری از لحاظ سابقه سقط جنین مشاهده گردید که دام‌هایی که دارای سابقه سقط جنین بودند، دارای آلودگی بالاتری (۸/۸۹ درصد) از دام‌های بدون سابقه سقط جنین هستند و در نهایت اینکه گوسفندها در مقایسه با بزها مستعدتر به آلودگی با کلامیدیاآبورتوس هستند، به طوری که درصد آلودگی در گوسفندها ۶/۶۷ درصد بود در حالی که در بزها ۴/۴۴ درصد بود.

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه بررسی اپیدمیولوژیک عفونت با کلامیدوفیلا-آبورتوس در نمونه‌های شیر گوسفند و بز (دارای تاریخچه سقط جنین و بدون تاریخچه سقط جنین) در استان آذربایجان غربی در ۳ منطقه (ارومیه، خوی و سلماس) بود. اگرچه به این موضوع توجه ویژه نشان داده نشده است، اما نتایج به دست آمده گواه و دلیلی بر مهم بودن عفونت با این باکتری است زیرا خسارت اقتصادی ناشی از سقط جنین و سرعت بالای انتقال این باکتری و خطرات سلامتی برای انسان جبران‌ناپذیر است.

با توجه به حضور گسترده دام در مناطق شهری و روستایی استان آذربایجان غربی و درصد شیوع بالا و احتمال آلوده شدن افراد به‌خصوص دامپزشکان و کودکان، کلامیدوفیلاآبورتوس از نظر بهداشت عمومی اهمیت بالایی دارد. بنابراین نیاز به آموزش عمومی نسبت به خطرات ابتلای افراد و به خصوص مادران باردار و کودکان بیش از پیش احساس می‌شود.

در آنالیز نمونه‌های شیر با روش Nested PCR، شیوع و فراوانی کلامیدیاآبورتوس در گوسفندان و بزهای منطقه آذربایجان غربی ۵/۵۵ درصد بود که بالاتر از شیوع در منطقه گرم مکزیکو (۴/۸۷ درصد) بود[۱۲] که این آمار نشان‌دهنده میزان بالای آلودگی کلامیدیایی در بین نمونه‌های بررسی‌شده در این استان می‌باشدکه می‌تواند مربوط به محل و سیستم پرورش گوسفند باشد.

شمال شرقی ایران مناطق مناسبی برای پرورش گوسفند و بز درایران هست. در استان آذربایجان غربی پرورش گوسفند و بز به دو صورت روستایی و عشایری انجام می‌شود. در این جمعیت شیردوشی به دو روش سنتی و صنعتی صورت می‌گیرد. 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 (خطر تهدید سلامت انسان) 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 ۲۰- ۱۵ درصد سقط جنین و تلفات روزهای اول بره‌ها را در نظر بگیریم و براساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، عامل حدود ۵/۵۵ درصد موارد آلودگی شیر در بین نمونه‌های بررسی‌شده را کلامیدوفیلاآبورتوس بدانیم، خسارت

ایجادی در سال بیش از ۱۰ میلیارد تومان برآورد خواهد شد. از این رو اهمیت توجه به کلامیدوفیلا آبورتوس به عنوان یکی از عوامل آلودگی شیر مشخص می‌شود. در این مطالعه به بررسی احتمال حضور باکتری در نمونه‌های شیر پرداخته شده است. این میکروارگانیسم ازجمله عوامل باکتریایی سقط جنین در اواخر آبستنی و متعاقباً آلودگی شیر محسوب می‌شود و در ۳-۲ هفته قبل از سقط جنین هیچ‌گونه علایم مشخص کلینیکی مشاهده نمی‌شود و معمولاً اولین علامت عفونت به این باکتری سقط جنین و تولد بره‌های مرده و ضعیف است[۵].

آلودگی انسان اگرچه با کلامیدوفیلا نادر است، لیکن اگر اتفاق افتد اکثر موارد بدون علایم بالینی است. در صورت بروز، علایم شبیه آنفلوانزا است و با سردرد، 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[۱۳].

عفونت‌های کلامیدیایی یکی از شایع‌ترین و پرضایعه‌ترین بیماری‌های منتقله از راه جنسی در جوامع مختلف است. کلامیدیاتراکوماتیس در ایجاد پارگی زودرس کیسهٔ آب، زایمان زودرس، سقط، وزن کم نوزاد، مرگ نوزادی و بسیاری از اختلالات دیگر در دوران بارداری نقش مهمی دارد و از مشکلات موجود، کنترل عفونت کلامیدیایی و عوارض آن می‌باشد. کلامیدیاآبورتوس در زمان حاملگی عفونت جدی و مهم است و ممکن است برای زنان باردار یک خطر حیاتی باشد[۱۴].

مطالعات قبلی در ایران توسط قربانپور و همکاران و محزونیه و همکاران در خوزستان و شهرکرد نشان داده است که شیوع عفونت با کلامیدیاآبورتوس در این مناطق در مزارع پرورش گوسفند به ترتیب ۹ و ۲۵ درصد بوده است که دارای آنتی‌بادی علیه کلامیدیاآبورتوس بودند[۱۵و۱۶].

در یک مطالعه سرولوژیک که توسط قربانپور و همکاران در منطقه خوزستان در سال ۲۰۰۷ روی میش‌هایی‌که سقط داشتند انجام شد، شیوع آلودگی سرمی در اهواز ۸/۹ درصد گزارش گردید[۱۶].

بالا بودن درصد فراوانی (۵/۵۵ درصد) کلامیدیاآبورتوس در منطقه آذربایجان غربی با درصد فراوانی در دیگر کشورها از جمله مکزیک (۳۱/۱ درصد) مطابقت ندارد[۱۷].

براساس اطلاعات گزارش‌شده شیوع و پراکندگی کلامیدیاآبورتوس در مناطق جغرافیایی مختلف، متفاوت است که دلیل این تفاوت در پراکندگی می‌تواند به سطح بهداشت مزرعه، نوع دامپروری، منطقه جغرافیایی و آب و هوا مرتبط باشد.

تاکنون آزمایش‌های متعدد سرولوژیک جهت تشخیص عفونت‌های ناشی از کلامیدوفیلا و براساس آنتی‌ژن‌های کلامیدوفیلایی صورت گرفته است اما، به علت واکنش‌های متقاطع فراوان بین آنتی‌ژن‌های کلامیدیایی با یکدیگر و سایر باکتری‌های گرم منفی نیاز به روشی دقیق و مناسب جهت تشخیص این باکتری می‌باشد[۱۸]. در این بررسی نمونه‌های شیر از دام‌های دارای سابقه سقط جنین که منبع مهم باکتری می‌باشد و دام‌های بدون سابقه سقط جنین تهیه شد.

در مطالعه‌هایی که در ساردینیا ایتالیا طی سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۹ انجام شد باکتری به میزان ۲/٤ درصد از نمونه‌های جنینی و ٦/٥ درصد از نمونه‌های جفت جدا گردید[۱۹]، اختلاف موجود در این مطالعه با نتایج گزارش‌شده می‌تواند به شرایط نگهداری و اقتصادی پرورش گوسفند و محل مورد مطالعه مرتبط باشد.

احتمالاً علت کمبود مطالعات انجام‌شده در ایران عدم رشد این باکتری در محیط‌های کشت متداول باکتری‌ها است و عدم توجه به نقش این باکتری در ایجاد سقط جنین در گوسفند است لذا، در بیشتر مطالعات منتشرشده به نقش گونه‌های بروسلا و سالمونلا و گاهی توکسوپلاسما در ارتباط با موارد سقط جنین اشاره شده است. بیان ۵۰ درصد موارد سقط در بین نمونه‌های بررسی‌شده در مطالعه حاضر و مقایسه با مطالعات انجام‌شده در انگلستان و با وجود مدیریت صحیح گوسفندان در هنگام بره‌زایی می‌تواند تأییدکننده 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 ویژه درخصوص 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[۲۰].

شیوع کلامیدیاآبورتوس در شیر گوسفندان بالاتر (۶/۶۷ درصد) از شیر بزها (۴/۴۴ درصد) بود. مطالعات قبلی اثبات کردند که گوسفندها دارای حساسیت بالاتری نسبت به این باکتری هستند[۲۰]. در تأیید بررسی‌های ما فقط یک گزارش از کشور مکزیک وجود دارد که نشان می‌دهد درصد آلودگی به کلامیدیاآبورتوس در گوسفند (۲۲/۶ درصد)

بالاتر از بز (۴/۹ درصد) بوده است[۱۲].

در این بررسی‌ها ما انتظار داشتیم که درصد شیوع کلامیدیاآبورتوس در گوسفند و بز یکسان باشد. وضعیت گله در ایران بسیار مهم است زیرا در بعضی از مناطق در بین کشاورزان این باور سنتی وجود دارد که در صورت نگهداری گوسفندان پیر (بیش از ٤ سال) احتمال تولد بره ماده افزایش می‌یابد. این می‌تواند باعث نگهداری طولانی‌مدت گوسفندان آلوده و شیوع عفونت در بین گله شود. یک مشکل بزرگ در مورد ذبح گوسفند و بز، وابستگی عاطفی کشاورزان به آن‌ها می‌باشد. این از آنجا مهم است که دامداران حیوانات آلوده را برای مدت طولانی نگهداری می‌کنند و حیوانات ممکن است آلودگی را در بین گله‌ها گسترش دهند. گوسفندان حساس کلامیدیا را از جفت آلوده، ترشحات رحم، بره‌های مرده و بسترهای آلوده استنشاق می‌کنند یا بلع می‌کنند. ذرات عفونی (اجسام اولیه) ممکن است هفته‌ها در دمای پایین محیط زنده بمانند. شیوع کمتر در بزها در مقایسه با گوسفندان، می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که کلامیدیاآبورتوس در منطقه آذربایجان غربی در گوسفندها به علت جمعیت بالای آن‌ها شیوع بیشتری دارد. برای تأیید این فرضیه باید مطالعات بیشتری انجام شود. با این حال این اختلاف را می‌توان با تفاوت در مدیریت گله نیز توضیح داد، از آنجا که سیستم‌های تولیدات حیوانات کاملاً متفاوت هستند در حالی که گوسفندان کشور ایران تحت یک سیستم سنتی دامداری گسترده نگهداری می‌شوند، بزهای موجود در مطالعه حاضر تحت سیستم دامپروری فشرده و مدرن نگهداری می‌شوند.

ارتباط بین سابقه سقط جنین و وجود کلامیدیاآبورتوس در این مطالعه قابل توجه بود. به همین دلیل است که وقتی گوسفندان غیربردار آلوده می‌شوند، ایمنی محافظتی ایجاد نمی‌شود و بنابراین عفونت در این حیوانات منجر به سقط جنین می‌شود[۲۱و۲۲]. یافته‌های مطالعه حاضر با مطالعات مشابه ایران و سایر کشورها مطابقت دارد[۲۳]. در مطالعه حاضر شیوع کلامیدیاآبورتوس گوسفندان و بزهای دارای سابقه سقط جنین (۸/۸۹ درصد) بیشتر از دام‌های بدون سابقه سقط جنین (۲/۲۲ درصد) بود.

فقط یک گزارش در مورد شیوع کلامیدیاآبورتوس در ترکیه گزارش شده است[۲۴]، آن‌ها گزارش کردند که شیوع کلامیدیاآبورتوس در شیر گوسفند ۲/۱ درصد بوده است. مطالعاتی در ایران و سایر کشورها وجود دارد که از شیوع کلامیدیاآبورتوس در شیرهای خام گوسفند و بز با سابقه سقط خبر می‌دهند.

نتایج این بررسی نشان داد که گوسفندان و بزها کمترین خطر ابتلا به عفونت کلامیدیاآبورتوس را در منطقه سلماس آذربایجان غربی داشتند. گوسفندان و بزها بیشترین شیوع را در منطقه ارومیه آذربایجان غربی احاطه‌شده توسط کوه و فلات داشتند. دلایل این اختلافات در شیوع کلامیدیاآبورتوس ممکن است به دلیل سطح بهداشت مزارع، نوع دامداری، منطقه جغرافیایی و آب و هوا باشد. شیوع پایین‌تر (۲/۵۰ درصد) کلامیدیاآبورتوس درگوسفندها و بزهای منطقه سلماس آذربایجان غربی در مقایسه با سایر استان‌های ایران و نواحی دیگر استان آذربایجان غربی ممکن است به دلیل جمعیت کم گوسفند و بز دراین منطقه باشد[۱۵و۲٤]. با این حال موقعیت جغرافیایی به عنوان یک عامل خطر برای عفونت کلامیدیاآبورتوس در گوسفند و بز نشان داده شده است. براساس داده‌های گزارش‌شده شیوع کلامیدیاآبورتوس در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت است.

علاوه‌بر این در گروه فصلی، شیوع عفونت کلامیدیاآبورتوس از ۱/۱۱ درصد تا ۱۳/۳۳ درصد متغیر بود و اختلاف معنی‌داری از این باکتری در گروه فصلی مشاهده شد به طوری که بیشترین میزان شیوع در فصل پاییز (۱۳/۳۳ درصد) مشاهده شد که بیش از ۱۳ بار بیشتر از گروه بهار (۱/۱۱ درصد) که کمترین شیوع را داشتند، خطر ابتلا به عفونت کلامیدیاآبورتوس را داشتند. نکته قابل توجه میزان مثبت عفونت کلامیدیاآبورتوس به تدریج از پاییز به بهار آینده کاهش می‌یابد که نشان می‌دهد تغییر در نرخ مثبت می‌تواند به طور مستقیم با فصل (یا آب و هوا) مرتبط باشد که نیاز به مطالعه بیشتر دارد. یافته‌های مطالعه حاضر با همکاران در بررسی فصلی Hu Shi-Feng مطالعات مشابه ایران و سایر کشورها مطابقت دارد. در مطالعه کلامیدیاآبورتوس، بیشترین شیوع سال در فصل پاییز بود که یافته‌های ما آن را تأیید می‌کند[۲۵].

پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مولکولی تا حد زیادی به تمایز ساده گونه‌های متعلق به جنس کلامیدیا و کلامیدوفیلا کمک کرد. تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه تشخیص کلامیدیا در شیر با روش PCR در ایران گزارش نشده است. ما جستجوی خود را به کلامیدیاآبورتوس محدود کردیم و بنابراین پرایمرهای PCR مورد استفاده برای شناسایی خاص این گونه انتخاب شدند[۶].

سقط جنین آنزیماتیک در گوسفند به طور مداوم با تشخیص اجسام اصلی کلامیدوفیلاآبورتوس در اسمیر رنگ‌آمیزی‌شده از جفت با رنگ‌آمیزی – زیل نلسون اصلاح شده تشخیص داده می‌شود[۲۶].

تعیین میزان شیوع بیماری و فاکتورهای خطر باعث می‌شود که بار بیماری بر جمعیت برای مسئولین بهداشتی نمایان گردد و امکانات و تجهیزات لازم جهت کنترل و پیشگیری و نیز اولویت‌های پژوهشی مشخص شود.

روش اصلي و معمول تشخیص آزمایشگاهی کلامیدیا در گوسفند رنگ‌آمیزی گسترش فشاری از کوتیلدون و پرده‌های جنینی به روش ذیل نلسون می‌باشد. اما، این روش از حساسیت چندان بالايي برخوردار نمی‌باشد از دیگرروش‌های توصیه‌شده PCR و کشت سلولی می‌باشد و PCR به عنوان حساس‌ترین روش مطرح می‌باشد. از این رو جهت تشخیص کلامیدوفیلاآبورتوس در نمونه‌ها ابتدا از محتویات شیردان جنین‌ها نمونه‌برداری و استخراج DNA صورت می‌گیرد و سپس به کمك پرایمر اختصاصی ژن ompA تکثیر DNA انجام و با اختصاصیت بالای 95 درصد تشخیص‌گونه صورت می‌گیرد[۲۷و۲۸].

در تحقیقی توسط Hasan ongor و همکاران در ترکیه از نمونه‌های شیر گوسفند با روش IMS–PCR برای جداسازی کلامیدیا استفاده کردند که در این آنالیز از ۲۰۱ نمونه شیر، ۲/۱درصد کلامیدیاآبورتوس با اندازه ۴۷۹ bp تشخیص داده‌شد[۲۳].

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 تخم‌مرغ جنین‌دار، PCR و رنگ‌آمیزی گسترش‌ها با رنگ‌آمیزی گیمنز، رنگ‌آمیزی مستقیم آنتی‌بادی منوکلونال کونژگه‌شده به فلورسین در زیر میکروسکوپ مشاهده گردید. نتیجه مطالعه فوق نشان داد که ۵ درصد نمونه‌های تلقیح‌شده به تخم‌مرغ جنین‌دار دارای آلودگی کلامیدیایی است. در گسترش‌های تهیه‌شده از کیسه زرده که با رنگ‌آمیزی مستقیم آنتی‌بادی مونوکلونال کونژوگه‌شده به فلورسین رنگ‌آمیزی شدند، ۵/۵ درصد نمونه‌ها در گوسفندان فاقد علامت و ۶/۵ درصد در دام‌های بیمار مثبت شدند. در مورد نمونه‌های مربوط به بز نیز درصد موارد مثبت در دام‌های فاقد علامت و در دام‌های بیمار به ترتیب ۵/۶ و ۷/۵ درصد بود. در رنگ‌آمیزی گسترش‌های تهیه‌شده از کیسه زرده با روش ایمونوپراکسیداز در گوسفندان 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 ۴۲/۹ درصد بود[۲۷].

در یک بررسی توسط Biesenkamp و همکاران در سال ۲۰۰۷ در آلمان اهمیت Chlamydophila abortus در عفونت ورم پستان و صنایع لبنی و انتقال بیماری به انسان را تأییدکردند[۲۹].

جهت بهبود موقت از بیماری کلامیدیا توسط واکسن‌درمانی نشان داده شده، واکسیناسیون گاو در برابر Chlamydophila می‌تواند به عنوان یک میدان آزمایش برای استفاده واکسن در برابر عفونت‌های کلامیدیایی انسان مورد بررسی قرار گیرد[۲۹].

در آخر، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که شیر خام گوسفند و بز می‌تواند از منابع مهم عامل کلامیدوز باشد. شیوع کلامیدیا در شیر از الگوی فصلی و منطقه‌ای پیروی می‌کند. مشخص شد که گوسفند و بز می‌توانند در اپیدمیولوژی کلامیدیوز در آذربایجان غربی نقش مهمی داشته باشند و از نظر بهداشت عمومی باید مورد توجه قرار گیرند. درنتیجه مطالعات بیشتر در مورد گله‌های سقط‌شده توسط کلامیدوفیلا برای به دست آوردن داده‌های کمی در مورد میزان دفع کلامیدیاآبورتوس در شیر و درنتیجه تعیین نقش بالقوه شیر در انتقال عامل به بره‌ها و انسان ضروری است. علاوه بر این حساسیت و ویژگی Nested-PCR در تشخیص مستقیم کلامیدوفیلا از نمونه‌های بالینی باید ارزیابی شود. این مطالعه وجود کلامیدیاآبورتوس در گوسفندان و بزها را نشان داد و شیوع ۵/۵۵ درصد از ۳۶۰ گوسفند و بز در استان آذربایجان غربی بود که نشان می‌دهد پرورش‌دهندگان گوسفند و بز (نر و ماده)، جنین یا منی باید از مزارع دیگر بدون اطلاع از وضعیت سلامتی عفونت کلامیدیاآبورتوس یا از مناطقی که قرنطینه ندارند خریداری نکنند. منطقه، فصل و سابقه سقط جنین به عنوان عوامل خطر برای عفونت کلامیدیاآبورتوس نیز در این مطالعه تأیید شد. این اولین تحقیق برای تشخیص شیوع عفونت کلامیدیاآبورتوس در شیر گوسفند و بز ارائه داده‌های اساسی برای پیشگیری و کنترل عفونت این باکتری در گوسفند و بز در استان آذربایجان غربی ایران است.

References:

1. Vila-Corcoles A, Ochoa-Gondar O, Rodriguez-Blanco T, RagaLuria X, Gomez-Bertomeu F. Epidemiology of communitya cquired pneumonia in older adults: a population-based study. Respir Med 2009; 103: 309–16.

2. Greco G, Corrente M, Buonavoglia D, Campanile G, Di Palo R, Martella V. Epizootic abortion related to infections by Chlamydophila abortus and Chlamydophila pecorum in water buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology 2008; 69: 1061-9.

3. Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales, proposal Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the famil Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int J Syst Bacteriol. 1999; 49: 415–40.

4. Longbottom, D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. Journal of Comparative Pathology. 2003; 128: 217–44.

5. Aitken I.D, Clarkson MJ, Linklater K. Enzootic abortion of ewes. Veterinary Record 1990; 126: 136-8.

6. Messmer TO, Skelton SK, Moroney JF, Daugharty H, Fields BS. Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. Journal of Clinical Microbiology, 1997; 35(8): 2043-6.

7. Alscher R, Donahue J, d Cramer C. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells, Physiologia Plantarum 1997; 100: 224–33.

8. Jacqueline S, Sabrina V, Ursula O, Thomas S. Application of a molecular biology concept for the detection of DNA damage and repair during UV disinfection Water Res 2009; 43(15):3705-16.

9. GründemannD, SchömigE. ProtectionofDNA during preparative agarose gel electrophoresis against damage induced by ultraviolet light . Biotechniques.1996;21(5):898-903.

10. White CH, Bishop JR, Morgan DM. Microbiological methods for dairy products. In: Marshall, R. T. (ed.), Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 1993; 16: 287–308.

11. Campos H, Vazquez-Chagoyan E, Salem AZM, Saltijeral-Oaxaca JA, Escalante-Ochoa C, Lopez-Heydeck SM, Oca-Jimenez RM. Prevalence and molecular identification of Chlamydia abortus in commercial dairy goat farms in a hot region in mexico. Trop. Anim. Health Prod 2014; 46: 919-24.

12. DeGraves FJ, Gao D, Hehnen HR, Schlapp T, Kaltenboeck B. Quantitative Detection of Chlamydia psittaci and C. pecorum by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in Cattle. J Clin Microbiol 2003; 41: 1726-9.

13. Leonard C, Caldow GL, Gunn GJ. An estimate of the prevalence of enzootic abortion of ewes in Scotland. Veterinary Record, 1993; 133: 180-3.

14. Mahzouniyeh M, Golboui daghdari SH, Pourahmad R. Detection of Chlamydophila abortus abortions in sheep in the Chaharmahal-va-Bakhtiyari province, using Nested PCR. Vet J 2014; 2: 74-80.

15. Ghorbanpoor M, Moori Bakhtiari N, Mayahi M, Hana Moridveisi. Detection of Chlamydophila psittaci frompigeons by polymerase chain reaction in Ahvaz. Iran J Microbiol 2015; 7: 18-22.

16. Jiménez-Estrada JM, Escobedo-Guerra MR, Arteaga-Troncoso G, López-Hurta- do M, de Haro-Cruz M, Oca Jiménez R, Guerra-Infante F. Detection of Chlam• ydophila abortus in Sheep (Ovis aries) in Mex- ico. Am J Anim Vet Sci. 2008; 3: 91-5.

17. Longbottom D, Fairley S, Chapman T, Psarrou E, Vretou E, Livingstone M. Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the Polymorphic outer membrane protein POMP90 of Chlamydophila abortus. J Clin Microbiol 2002; 40(11): 4235- 43.

18. Masala G, Porcu R, Daga C, Denti S, Canu G, Patta C, Tola S. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples in Sardinia, Italy by PCR. J Vet Invest 2007; 19: 96-8.

19. Teankum K, Pospischil A, Janett F, Burgi E, Brugnera E, Hoelzle K. Detection of chlamydiae in boar semen and genital tracts. Vet Microbiol 2006; 116(1-3): 149-57.

20. Rocchi MS, Wattegedera S, Meridiani I, Entrican G. Protective adaptive immu- nity to Chlamydophila abortus infection and control of ovine enzootic abortion (OEA). Vet Microbiol. 2009; 135: 112–21.

21. Entrican G, Buxton D, Longbottom D. Chlamydial infection in sheep: im- mune control versusfetalpathology.JRSocMed.2001;94:273–7.

22. O¨ngo¨rH, C¸etinkaya B, Karahan, Bulut H. Detection of Chlamydophila abortus in Ovine Milk by Immunomagnetic Separation–Polymerase Chain Reaction,Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Elazig, Turkey.J.Vet.Med.B2004;50:43–5.

23. Esmaili H., Hamedi M., Boromanfar S., Rezaei E. National Guidelines for diagnosis, investigation and management of abortion complications ruminants.1 nd ed.Theran: Academic Press, 1391; 103-10.

24. Shi-Feng Hu, Fen Li, Wen-Bin Z, and Guo-Hua L. Seroprevalence and Risk Factors of Chlamydia abortus Infection in Goats in Hunan Province, Subtropical China VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES Volume XX, Number XX, 2018; Mary 2 Ann Liebert, Inc.

25. Godin A, Björkman C, Englund S, Johansson K, Niskanen R, Alenius S. Investigation of Chlamydophila spp. in dairy cows with reproductive disorders. Acta Veterinaria Scandinavica 2008; 50:39.

26. Osman KM, Elajakee JA. Chlamydia psittaci and chlamydia pecorum infections in goats and sheep in Egypt. Revue Scientifique of technique off int Epiz, 2011; 30(3): 939-48.

27. Creelan JL, McCullough SJ. Evaluation of strain-speciec primer sequences from an abortifacient strain of ovine Chlamydophila abortus (Chlamydia psittaci) for the detection of EAE by PCR. FEMS Microbiol Lett 2000; 190(1): 103-8.

28. Binet R, Maurelli AT. Frequency of development and associated physiological cost of azithromycin resistance in Chlamydia psittaci 6BC and C. trachomatis L2. Antimicrob. Agents Ch, 2007; 51: 4267-75.