فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۹، بهار ۱۳۹۳، صفحه ۴۵- ۵۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۲۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۵

ردیابی مولکولی *کلامیدوفیلا فلیس* در ترشحات چشمی گربه‌های خانگی در تهران و اصفهان

حسن ممتاز: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران، hamomtaz@yahoo.com *
محمد علی‌رضایی: دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران، yashm_78@yahoo.com
پیمان کیهانی: استادیار بیماری‌های درونی دام‌های کوچک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران، p_keyhani@yahoo.com

چکیده

مقدمه: *کلامیدوفیلا فلیس* از جمله شایع‌ترین اجرام بیماری‌زای جدا شده از ترشحات چشمی در گربه‌های خانگی است. هدف از تحقیق حاضر، ردیابی حضور این میکروارگانیسم در نمونه‌های سواب چشمی اخذ شده از گربه‌های خانگی در دو شهر تهران و اصفهان بود.

مواد و روش‌ها: از تعداد ۲۲۴ گربه خانگی، نمونه‌های سواب چشمی اخذ و استخراج DNA انجام شد. نمونه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره ایی پلی مراز (PCR) بررسی و محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ارزیابی شدند.

نتایج: از مجموع ۲۲۴ نمونه بررسی شده، ۴۰ مورد (۱۷/۸۵ درصد) به *کلامیدوفیلا فلیس* آلوده بودند که در آزمون PCR مثبت تشخیص داده شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به این که جداسازی و تشخیص *کلامیدوفیلا فلیس* در محیط‌های کشت آزمایشگاهی مشکل و زمان‌بر است، روش PCR به عنوان یک روش سریع و مطمئن برای ردیابی این ارگانیسم در نمونه‌های بالینی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *کلامیدوفیلا فلیس*، گربه‌های خانگی، واکنش زنجیره ایی پلی مراز

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

کلامیدیاها، دسته‌ایی از انگل‌های اجباری داخل سلولی گرم منفی هستند که در چشم، دستگاه تنفس، دستگاه گوارش و موکوس دستگاه ادراری تناسلی انسان و بسیاری از حیوانات توانایی بقا دارند. این انگل‌ها قادر به ایجاد عفونت‌هایی بدون علائم بالینی تا عفونت‌هایی با علایم بالینی در میزبان‌های خود هستند (۱). *کلامیدوفیلا فلیس* (پنومونی گربه) که بیشتر با نام *کلامیدیا پسی تاسی* شناخته می‌شود، یکی از مهم‌ترین عوامل تورم ملتحمه در گربه است و توانایی ایجاد عفونت‌های حاد تا مزمن در گربه را دارد. عفونت ناشی از کلامیدوفیلا *فلیس* با علایم تورم شدید ملتحمه همراه با اسپاسم پلک چشم، پر خونی و خیز ملتحمه چشم و ترشح سروزی و موکوسی چرکی چشم مشخص می‌شود. همچنین همراه با تورم ملتحمه علائم خفیف تنفسی همراه با ترشح خفیف از بینی، سرفه و عطسه ممکن است مشاهده شود. به دنبال عفونت طبیعی، این باکتری ممکن است که در دستگاه گوارش و دستگاه تناسلی استقرار یابد (۲ و ۳). علایم بالینی این بیماری معمولاً چهار روز پس از عفونت ظاهر شده و تا ۳۰ روز ادامه دارد. به نظر می‌رسد که دوام طولانی مدت عفونت، علت بقای جرم در جمعیت گربه‌ها باشد زیرا که جرم بیش از ۱۵۰ روز پس از شروع عفونت از مهبل، سواب رکتوم و مخاط سطحی معده گربه جدا شده است (۴).

کلامیدوفیلا فلیس توانایی ایجاد بیماری‌هایی از قبیل تورم ملتحمه، بزرگ شدگی کبد و طحال، عفونت‌های کلیوی و عفونت آبشامه قلب را در انسان نیز دارد. از آن‌جایی که این اجرام توانایی بقا در محیط بیرون از بدن میزبان را ندارند، این بیماری بیشتر از طریق تماس مستقیم با ترشحات آلوده و ریز قطره‌های تنفسی انتقال می‌یابد (۴ و ۵).با توجه به این موضوع، تشخیص سریع و قطعی حیوانات مشکوک از اهمیت خاصی برخوردار است. با توجه به این‌که کشت این اجرام مشکل بوده و آزمایش‌های میکروبیولوژی از جمله جداسازی باکتری از سواب چشمی و واژینال زمان‌بر است و آزمون‌های سرولوژی دقت کافی را در تشخیص عفونت یاد شده ندارند ، به کارگیری یک روش سریع و دقیق در تشخیص عفونت از اهمیت زیادی برخوردار است. واکنش زنجیره ایی پلیمراز (PCR) به منظور تشخیص DNA به عنوان شاخص حضور یک میکروارگانیسم بسیار کارآمد بوده و برای تشخیص *کلامیدوفیلا فلیس* به عنوان مطمئن‌ترین و سریع‌ترین روش شناخته شده است (۶ و ۷). بنابراین، این تحقیق با هدف جستجوی آلودگی با *کلامیدوفیلا فلیس* در گربه‌های خانگی در دو شهر بزرگ ایران (تهران و اصفهان) به روش PCR انجام شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در کلینیک‌های حیوانات خانگی دو شهر تهران و اصفهان انجام شد. نمونه‌ها، از گربه‌های مراجعه کننده به این کلینیک‌ها پس از معاینه و ثبت مشخصات از قبیل سن، جنس، سابقه واکسیناسیون قبلی و سابقه عفونت‌های تنفسی با استفاده از یک سواب مرطوب از چشم انجام شد. در تحقیق حاضر ۲۲۴ نمونه سواب چشمی به شکل تصادفی شامل: ۸۰ نمونه از تهران و ۱۴۴ نمونه از اصفهان در سه گروه سنی زیر یک سال (۳۲ نمونه)، ۱ تا ۳ سال (۱۴۴ نمونه) و ۳ تا ۶ سال (۴۸ نمونه) از دو جنس نر (۱۵۲ نمونه) و ماده (۷۲ نمونه) تهیه شد. ۶۴ نمونه مربوط به گربه‌های به ظاهر سالم، ۱۱۲ نمونه از گربه‌های واجد علائم چشمی (تورم ملتحمه چشم و آبریزش از چشم) و ۴۸ نمونه به گربه‌های مبتلا به عفونت‌های تنفسی متعلق بود. از نمونه‌های تهیه شده، ۱۵۶

گربه سابقه استفاده از واکسن سه گانه گربه‌ها را داشتند و ۶۸ گربه از این واکسن استفاده نکرده بودند. سواب‌های اخذ شده در محلول ۱ درصد PBS به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد شهرکرد منتقل و تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در فریزر منفی ۷۰ درجه نگهداری شدند.

واکنش زنجیره ایی پلیمراز (PCR)

استخراج DNA از محلول PBS آغشته به سواب با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن ایران[1] طبق دستورالعمل کیت انجام شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق از مطالعه انجام شده توسط سیکز و همکاران[2] (۸) که به تکثیر قطعه ای به طول ۱۰۹۴ جفت باز از ژن *ompA* *کلامیدوفیلا فلیس* می‌انجامد با توالی زیر انتخاب شد.

F: ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG
R: CAAGATTTTCTAGACTTCATTTTGTT

واکنش گرهای مربوط به واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲/۵ میکرولیتر از DNA الگو، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول dNTP Mix (فرمنتاس، آلمان)، ۱/۵ میکرومول $MgCl_2$، ۵/۲ میکرولیتر بافر PCR و ۱ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase (فرمنتاس، آلمان) انتخاب شد. بلافاصله نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر[3] قرار داده شدند و برنامه دمایی به شکل زیر تنظیم شد:

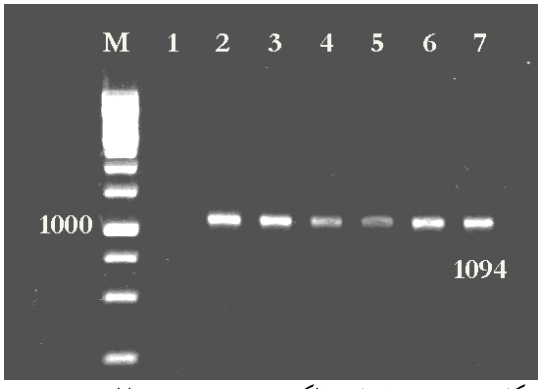
یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه دمایی تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۸ دقیقه.

در انجام PCR از DNA استخراج شده از نمونه ای که در آزمایش مستقیم میکروسکوپی (رنگ آمیزی گیمسا) واجد اجرام کلامیدیایی بود به عنوان نمونه کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد. در پایان محصول PCR مربوط به نمونه‌های آزمایش شده روی ژل ۱ در صد آگاروز حاوی اتیدیوم بروماید در حضور مارکر ۱ کیلوبازی DNA (فرمنتاس، آلمان) در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز و نتیجه با نور UV مشاهده و ثبت شد.

نتایج

از مجموع ۲۲۴ نمونه اخذ شده تعداد ۴۰ نمونه (۱۷/۸۵ درصد) در روش PCR واجد ژنوم *کلامیدوفیلا فلیس* بودند. میزان آلودگی گربه‌ها در شهرستان تهران ۲۰ درصد و شهرستان اصفهان ۱۶/۶۶ درصد برآورد شد که در تجزیه و تحلیل آماری، اختلاف آماری معنی‌داری بین میزان آلودگی گربه‌ها به *کلامیدوفیلا فلیس* در دو شهرستان تهران و اصفهان دیده نشد (P= 1. 021).

تصویر مربوط به الکتروفورز تعدادی از نمونه‌های مثبت شده در آزمایش PCR با دارا بودن قطعه ۱۰۹۴ جفت بازی DNA در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- تصویر حاصل از الکتروفورز نمونه‌های مطالعه شده روی ژل آگاروز

ستون M = مارکر ۱ کیلوبازی DNA

ستون ۱= نمونه کنترل منفی

ستون ۲= نمونه کنترل مثبت

ستون‌های ۳ تا ۷= نمونه‌های مثبت مطالعه شده

گربه‌های مطالعه شده در سه گروه سنی زیر ۱ سال، ۱ تا ۳ و ۳ تا ۶ سال بررسی شدند که کم‌ترین میزان آلودگی در گربه‌های زیر ۱ سال با ۱۲/۵ درصد آلودگی و بیش‌ترین مقدار در گروه سنی ۳ تا ۶ سال با ۳۳/۳۳ درصد آلودگی تعیین شد. بررسی آماری نتایج نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار بین این دو گروه سنی به ویژه بین گربه‌های زیر ۱ سال و ۳ تا ۶ سال در شهرستان اصفهان بود ($P= 0.021$).

از مجموع ۲۲۴ نمونه اخذ شده، ۱۵۲ گربه نر و ۷۲ گربه ماده بودند. فراوانی حضور *کلامیدوفیلا فلیس* در جمعیت گربه‌های نر ۱۸/۴۲ درصد و در جمعیت گربه‌های ماده ۱۶/۶۶ درصد تعیین شد اما اختلاف آمار معنی‌داری بین میزان آلودگی با جنسیت گربه‌ها مشاهده نشد ($P= 0.924$).

۱۵۶ گربه از جمعیت مطالعه شده دارای سابقه واکسیناسیون بر علیه عفونت‌های تنفسی گربه‌ها (واکسن سه گانه گربه‌ها) بودند که ۳/۸۴ درصد از آن‌ها حاوی DNA *کلامیدوفیلا فلیس* بودند. میزان آلودگی در گروه گربه‌های فاقد سابقه واکسیناسیون معادل ۵۰ درصد برآورد شد. تحلیل آماری نتایج این قسمت نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار ($P= 0.003$) بین استفاده از واکسن سه گانه گربه‌ها در گربه‌های مطالعه شده با آلودگی آن‌ها به *کلامیدوفیلا فلیس* بود.

از جمعیت گربه‌های مطالعه شده، ۱۱۲ گربه دارای علایم چشمی، ۴۸ گربه دارای علایم تنفسی و ۶۴ گربه به ظاهر سالم و فاقد علایم بالینی بودند. پس از انجام آزمون PCR، ۸۵/۱۷ درصد از گربه‌های واجد علایم چشمی، ۲۵ درصد از گربه‌های مبتلا به عوارض تنفسی و ۱۲/۵ درصد از گربه‌های به ظاهر سالم از نظر حضور *کلامیدوفیلا فلیس* آلوده بودند. تجزیه و تحلیل آماری نتایج اختلاف آماری معنی‌داری را بین میزان آلودگی با *کلامیدوفیلا فلیس* و وجود ضایعات تنفسی و چشمی در گربه‌ها نشان داد ($P= 0.042$).

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری دستگاه تنفس فوقانی[۴] یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در گربه‌ها است که بیشتر توسط *کلامیدوفیلا فلیس*، *هرپس ویروس یک گربه‌ها* و *کلیسی ویروس گربه‌ها* ایجاد می‌شود. *کلامیدوفیلا فلیس* از جمله مهم‌ترین اجرام بیماری‌زا در گربه‌ها است که بیشتر باعث عفونت چشم و دستگاه تنفس می‌شود. عوامل *کلامیدیایی* توانایی ایجاد عفونت‌های غیر آشکار تا عفونت‌های شدید بالینی در میزبان‌های مختلف (دام، انسان و پرندگان) را دارد و به عنوان یکی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا زئونوتیک محسوب می‌شوند که از طریق تماس مستقیم با ریز قطرات معلق در هوا بین انسان و یا دام منتقل می‌شوند.

هدف از این مطالعه به کارگیری آزمایش PCR برای ردیابی حضور *کلامیدوفیلا فلیس* در سواب چشمی گربه‌های خانگی دو شهر تهران و اصفهان و بررسی ارتباط بین میزان آلودگی با متغیرهایی نظیر سن، جنس، سابقه واکسیناسیون قبلی و وجود ضایعات تنفسی در گربه‌ها بود که با روش مولکولی (PCR) انجام شد. از جمع ۲۲۴ گربه مطالعه شده، ۴۰ گربه (۱۷/۸۵ درصد) با روش PCR واجد ژنوم *کلامیدوفیلا فلیس* بودند. فراوانی آلودگی با این میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در گربه‌های به ظاهر سالم (فاقد عوارض چشمی و تنفسی) معادل ۱۲/۵ درصد و درگروه گربه‌های واجد عوارض چشمی ۱۷/۸۵ درصد تعیین شد.

در مطالعه انجام شده توسط سیکز و همکاران در سال ۲۰۰۱ در استرالیا سواب‌های چشمی و چشمی- حلقی اخذ شده از ۱۰۴ گربه خانگی مبتلا به بیماری‌های دستگاه

تنفس فوقانی از نظر آلودگی به سه عامل *کلامیدیا پسی تاسی*، *هرپس ویروس یک گربه* و *کلیسی ویروس گربه* به روش PCR بررسی شد. *هرپس ویروس یک گربه* در ۱۸ گربه (۱۷/۳ درصد) و *کلامیدیا پسی تاسی* در ۱۲ نمونه (۱۱/۵ درصد) از گربه‌های خانگی ردیابی شد که تا حدودی معادل میزان آلودگی تعیین شده در مطالعه حاضر است. در این مطالعه، روش مولکولی Multiplex RT- PCR و PCR به عنوان روشی ارزشمند در بررسی همه‌گیر شناسی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ی دستگاه تنفس فوقانی گربه‌ها معرفی شد (۸).

در مطالعه دیگری از سیکز و همکاران دو روش کشت و PCR از نظر ارزیابی حضور *کلامیدیا پسی تاسی* در گربه‌های بیمار درمان شده با داکسی سیکلین و درمان نشده مقایسه شدند. در روش کشت، سواب‌های چشمی اخذ شده از گربه‌ها پس از شروع درمان با ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داکسی سیکلین تا یک روز پس از شروع درمان مثبت شدند اما با روش PCR، نمونه‌ها تا ۵ روز پس از درمان نتیجه مثبت نشان دادند. در روش PCR، ۷/۸۵ درصد با روش کشت و ۷۲/۹ درصد از گربه‌های درمان نشده مثبت بودند. بنابراین، در این مطالعه نیز PCR به عنوان روشی بسیار حساس در تشخیص گربه‌های مبتلا به بیماری‌های دستگاه تنفس فوقانی معرفی شد (۹).

علت تفاوت در میزان آلودگی گربه‌ها به *کلامیدوفیلا فلیس* در مطالعه حاضر با سایر مطالعات انجام شده می‌تواند به دلایل مختلف از جمله، شرایط نگهداری گربه‌ها در پناه‌گاه‌ها یا محیط‌های بسته، تراکم گربه‌های نگهداری شده، وضعیت بهداشتی محل‌های نگهداری و پرورش گربه‌ها، انجام واکسیناسیون و وضعیت ایمنی گربه‌های خانگی، تفاوت در حساسیت روش‌های مختلف PCR، نوع و موضع آناتومیکی محل اخذ نمونه و وضعیت بهداشتی و سلامتی کل گله مطالعه شده باشد. در یک مطالعه عنوان شده که به علت برخی مشکلات، ردیابی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زاهای تنفسی به ویژه عوامل ویروسی در سواب‌های اخذ شده از سطوح مخاطی سخت است. زیرا که ذرات ویروسی بسیار کوچک و حساسند، همچنین حضور آنزیم RNase در سطوح موکوسی مخاطات می‌تواند احتمال ردیابی ویروس‌هایی نظیر *کلیسی ویروس گربه* را کاهش دهد (۸).

میزان آلودگی در مناطق مختلف متفاوت است به نحوی که در مطالعه حاضر، فراوانی آلودگی در شهر تهران ۲۰ درصد و در گربه‌های اصفهان ۱۶/۶۶ درصد تعیین شد. در مطالعات قبلی نیز *کلامیدوفیلا فیلس* و *هرپس ویروس یک گربه* به عنوان شایع‌ترین عوامل عفونت‌های تنفسی گربه‌ها در ایتالیا و ژاپن معرفی شده (۱۰ و ۱۱) در حالی که شیوع این دو میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در استرالیا و ایالات متحده آمریکا کمتر است (۸ و ۱۲).

در تحقیق انجام شده، اختلاف آماری معنی داری بین جنسیت گربه و آلودگی آن‌ها به *کلامیدوفیلا فلیس* یافت نشد که این موضوع در مطالعات قبلی نیز به اثبات رسیده و جنس گربه به عنوان یک عامل مستعد کننده در ایجاد و شیوع آلودگی معرفی نشده است (۱۲ و ۱۳).

در مطالعه حاضر بیشترین فراوانی آلودگی در گربه‌های ۳ تا ۶ سال (۳۳/۳۳ درصد) و کمترین درصد آلودگی در گربه‌های جوان زیر ۱ سال با ۱۲/۵ درصد آلودگی تعیین شد. در حالی که در بیشتر مطالعات انجام شده، شیوع بالایی از آلودگی در گربه‌های زیر ۱ سال گزارش شده است (۱۳ تا ۱۵). این امر می‌تواند مربوط به شرایط ایمنولوژیکی بدن، وجود پادتن‌های مادری منتقل شده به بچه گربه‌ها و در معرض قرار گرفتن بیشتر گربه‌ها

در سنین بالاتر باشد. در مطالعه زیکولا و همکاران[5] در بلژیک، میزان آلودگی به *کلیسی ویروس گربه* و *هرپس ویروس یک گربه* در گروهی از گربه‌های مشابه به روش PCR و RT-PCR بررسی شد. در این گروه میزان آلودگی با *کلیسی ویروس* (۳۳/۱ درصد) بالاتر از *هرپس ویروس یک گربه* (۲۰/۱ درصد) بود. در گربه‌های آلوده به *کلیسی ویروس* التهاب لثه[6] و در گربه‌های آلوده با *هرپس ویروس یک گربه* درگیری‌های تنفسی غالب بود. میانگین سنی گربه‌های آلوده به *کلیسی ویروس* (۳۸ ماهه) به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از متوسط سن گربه‌های درگیر با *هرپس ویروس یک گربه* (۲۹/۹ ماه) بود. در این بررسی، گزارش شد که میزان آلودگی گربه‌ها با *هرپس ویروس یک گربه* در چهار ماهه دوم و چهارم سال و شیوع درگیری با *کلیسی ویروس* در چهار ماهه اول و دوم سال نسبت به سایر مواقع سال بیشتر است و شیوع بالای عوامل عفونی، اهمیت کاربرد دقیق‌تر اصول بهداشتی و پیشگیری کننده را در مراکز نگهداری گربه‌ها بیش از پیش مشخص می‌کند (۱۳).

رعایت اصول بهداشتی و انجام برنامه منظم واکسیناسیون در مراکز پرورش و نگهداری گربه‌ها یکی از عوامل مهم در کاهش شیوع عفونت‌های تنفسی در گربه‌ها است. شایان ذکراست که در مطالعه حاضر نیز فراوانی آلودگی با *کلامیدوفیلا فلیس* در گروه گربه‌هایی که سابقه برنامه منظم واکسیناسیون (به ویژه واکسن سه گانه گربه‌ها) را داشتند به شکل در خور توجهی پائین‌تر از گروه گربه‌هایی بود که واکسیناسیون قبلی در آن‌ها انجام نگرفته بود.

مطالعه حاضر نشان داد که ضایعات چشمی نظیر التهاب ملتحمه و ریزش ترشح چشمی و عوارض تنفسی از مهم‌ترین علایم درگیری گربه‌ها با *کلامیدوفیلا فلیس* است. رامپازو و همکاران[7] و هارتمن و همکاران[8]، رابطه معنی داری از حضور *کلامیدوفیلا فلیس* در التهاب ملتحمه چشم را گزارش کردند (۱۱ و ۱۶). بیشتر یک چهارم از گربه‌های آلوده به *هرپس ویروس یک گربه* و یک پنجم از گربه‌های درگیر با *کلامیدوفیلا فلیس* هیچ گونه علایم بالینی آشکاری را نشان نمی‌دهند. در مطالعه حاضر نیز ۱۲/۵ درصد از گربه‌های به ظاهر سالم حامل *کلامیدوفیلا فلیس* بودند این حالت ممکن است به دلیل دوره انتقال مخفی بیماری و اشکال تحت بالینی آن باشد که توسط محققینی نظیر کانگ[9] و پارک[10] در سال ۲۰۰۸ توصیف شده است (۱۷).

در مطالعه‌ای که نخستین بار در سال ۲۰۱۱ توسط سیبیتز و همکاران[11] در اتریش برای ردیابی گونه‌های مختلف *کلامیدیا* به ویژه گونه خطرناک و زئونوتیک *کلامیدوفیلا پنومونیا* در گربه‌های مبتلا به التهاب ملتحمه چشم انجام شد، ۲۵ گربه ی به ظاهر سالم و ۴۹ گربه ی واجد عوارض چشمی با دو روش Read time- PCR و کشت سلولی ارزیابی شدند. در این مطالعه، ۵ عدد از گربه‌های مبتلا به التهاب ملتحمه چشم آلوده به *کلامیدوفیلا پنومونیه* و ۲ عدد از گربه‌های درگیر آلوده به *کلامیدوفیلا فلیس* بودند (۱۸).

از آنجایی که امکان ردیابی گونه‌های کلامیدیایی به وابستگی آن‌ها به سلول زنده در محیط‌های آزمایشگاهی به ویژه به روش کشت میکروبی مشکل و زمان بر است، روش‌های مولکولی نظیر PCR برای ردیابی این عوامل نظیر *کلامیدوفیلا فلیس* در گربه‌ها به عنوان یک روش سریع و مطمئن و دقیق استفاده شده است. اما توصیه می‌شود که مطالعات جامع‌تری در خصوص پراکنش گونه‌های مختلف *کلامیدیا* در میزبان‌های دامی و انسانی به ویژه پرندگان زینتی در شهرهای مختلف کشور انجام شده و آماری دقیق و جامع از آلودگی با این گونه‌ها در انسان و دام ارائه شود.

References

(1) Everett KD, Bush RM, Andersen AA. 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. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49(Pt 2): 415-40.

(2) Helps C, Reeves N, Egan K, Howard P, Harbour D. Detection of *Chlamydophila felis* and *feline herpesvirus* by multiplex real-time PCR analysis. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6): 2734-6.

(3) Hoover EA, Kahn DE, Langloss JM. Experimentally induced feline chlamydial infection (feline pneumonitis). *Am J Vet Res* 1978; 39(4): 541-7.

(4) Herrmann B, Pettersson B, Everett KD, Mikkelsen NE, Kirsebom LA. Characterization of the *rnpB* gene and RNase P RNA in the order Chlamydiales. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50(Pt 1): 149-58.

(5) Sykes JE. Feline chlamydiosis. *Clin Tech Small Anim Pract* 2005; 20(2): 129-34.

(6) McDonald M, Willett BJ, Jarrett O, Addie DD. A comparison of DNA amplification, isolation and serology for the detection of *Chlamydia psittaci* infection in cats. *Vet Rec* 1998; 143(4): 97-101.

(7) TerWee J, Sabara M, Kokjohn K, Sandbulte J, Frenchick P, Dreier KJ. Characterization of the systemic disease and ocular signs induced by experimental infection with *Chlamydia psittaci* in cats. *Vet Microbiol* 1998; 59(4): 259-81.

(8) Sykes JE, Allen JL, Studdert VP, Browning GF. Detection of *feline calicivirus, feline herpesvirus 1* and *Chlamydia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. *Vet Microbiol* 2001; 81(2): 95-108.

(9) Sykes JE, Studdert VP, Browning GF. Comparison of the polymerase chain reaction and culture for the detection of feline *Chlamydia psittaci* in untreated and doxycycline-treated experimentally infected cats. *J Vet Intern Med* 1999; 13(3): 146-52.

(10) Cai Y, Fukushi H, Koyasu S, Kuroda E, Yamaguchi T, Hirai K. An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. *J Vet Med Sci* 2002; 64(3): 215-9.

(11) Rampazzo A, Appino S, Pregel P, Tarducci A, Zini E, Biolatti B. Prevalence of *Chlamydophila felis* and *feline herpesvirus 1* in cats with conjunctivitis in northern Italy. *J Vet Intern Med* 2003; 17(6): 799-807.

(12) Bannasch MJ, Foley JE. Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. *J Feline Med Surg* 2005; 7(2): 109-19.

(13) Zicola A, Saegerman C, Quatpers D, Viandier J, Thiry E. *Feline herpesvirus 1* and *feline calicivirus* infections in a heterogeneous cat population of a rescue shelter. *J Feline Med Surg* 2009; 11(12): 1023-7.

(14) Binns SH, Dawson S, Speakman AJ, Cuevas LE, Hart CA, Gaskell CJ, et al. A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with *feline calicivirus* and *feline herpesvirus*. *J Feline Med Surg* 2000; 2(3): 123-33.

(15) Di Martino B, Di Francesco CE, Meridiani I, Marsilio F. Etiological investigation of multiple respiratory infections in cats. *New Microbiol* 2007; 30(4): 455-61.

(16) Hartmann AD, Hawley J, Werckenthin C, Lappin MR, Hartmann K. Detection of bacterial and viral organisms from the conjunctiva of cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease. *J Feline Med Surg* 2010; 12(10): 775-82.

(17) Kang BT, Park HM. Prevalence of *feline herpesvirus 1*, *feline calicivirus* and *Chlamydophila felis* in clinically normal cats at a Korean animal shelter. *J Vet Sci* 2008; 9(2): 207-9.

(18) Sibitz C, Rudnay EC, Wabnegger L, Spergser J, Apfalter P, Nell B. Detection of *Chlamydophila pneumoniae* in cats with conjunctivitis. *Vet Ophthalmol* 2011; 14 (Suppl 1): 67-74.

[1] DNP™ Kit
[2] Sykes et al
[3] Master cycler Gradient, Eppendorf, Germany
[4] Upper respiratory tract disease
[5] Zicola et al
[6] Gingivitis
[7] Rampazzo et al
[8] Hartmann et al
[9] Kang
[10] Park
[11] Sibitz et al

Molecular detection of *Chlamydophila felis* in ocular discharge of domestic cats in Tehran & Isfahan

Hassan Momtaz *
Associated Professor of Microbiology,Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Iran, hamomtaz@yahoo.com
Mohammad Alirezaie
Graduated of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Iran, yashm_78@yahoo.com
Peyman Keyhani
Assistant Professor of Small Animal Internal Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Iran, p_keyhani@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Chlamydophila felis* is one of the most common pathogens isolated from ocular discharges in domestic cats. The aim of the present study was to detect this microorganism in ocular discharges collected from domestic cats in Tehran and Isfahan cities

Materials and methods: From a total of 224 domestic cats, ocular swabs were collected and DNA was extracted. Samples were studied using the Polymerase Chain Reaction method and their products were analyzed using agarose gel.

Results: From a total of 224 samples studied, 40 samples (17.85%) were infected with *Chlamydophila felis* which were diagnosed as positive in PCR test.

Discussion and conclusion: According to the difficulties and time-consuming process of isolation of *Chlamydophila felis* in laboratory culture media, the PCR technique has been suggested as a rapid and safe method for detection of this organism in clinical samples.

Key words: *Chlamydophila felis*, Domestic cats, Polymerase Chain Reaction

* Corresponding author
Received: August 19, 2013 / **Accepted:** November 6, 2013