«مقاله‌ی اصیل»

بررسی پرندگان زینتی یزد از نظر آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوای با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز

عبدالکریم زمانی مقدم[1]، حسین طهماسبی[2*]، ناصر صالحی[2]

۱ـ دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده بیماری های مشترک انسان و دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
تلفن و ایمیل: ۰۹۱۳۱۸۲۰۷۳۷
azamani2@yahoo.com

۲ـ دانشجوی دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده بیماری های مشترک انسان و دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
تلفن و ایمیل:
۰۹۱۳۷۳۲۵۰۷۱
H.Tahmasby@yahoo.com

۰۹۱۳۵۱۸۹۷۶۸
Dr6884@yahoo.com

* نویسندهٔ مسؤول:
حسین طهماسبی، ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده بیماری های مشترک انسان و دام
تلفن: ۰۹۱۳۷۳۲۵۰۷۱
Email: H.Tahmasby@yahoo.com

چکیده

زمینه: بیشتر پرندگان ممکن است گونه‌های لیستریا را در روده‌های بدون علامت و با شیوع متغیر حمل کنند و به انسان منتقل نمایند. جنس لیستریا دو گونه‌ی بیماری‌زا دارد: لیستریای مونوسیتوژنز و لیستریای ایوانوای که از این دو، لیستریای مونوسیتوژنز به عنوان عامل سقط، انسفالیت، سپتی سمی در انسان و حیوانات شناخته شده است. لیستریای آیوانوی یک پاتوژن حیوانی است و گاهاً در انسان نیز ایجاد عفونت می‌کند. در این مطالعه به ارزیابی آلودگی به لیستریای مونوسیتوژنز و ایوانوای در پرندگان زینتی یزد به روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) پرداخته شد.

روش: تعداد ۱۸۰ نمونه‌ی مدفوعی از پرندگان زینتی (۱۵۰ قناری و ۳۰ مرغ عشق) از نقاط مختلف یزد به وسیله‌ی سواب استریل جمع‌آوری گردید. سواب‌ها مستقیماً درون محیط Listeria enrichment broth قرار داده شدند. پس از غنی‌سازی، نمونه‌ها بر روی محیط Palcam agar کشت داده شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از روش PCR جهت بررسی وجود لیستریای مونوسیتوژنز و ایوانوای مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: گرچه شیوع جنس لیستریا در قناری ٤ درصد (٦ از ۱۵۰) بود، اما در هیچ‌کدام از نمونه‌ها لیستریای مونوسیتوژنز و ایوانوای یافت نشد.

نتیجه‌گیری: منبع گونه‌های لیستریا در پرندگان محیط و غذایی است که استفاده می‌کنند. از آن‌جایی که سطح بهداشتی، وضعیت تغذیه‌ای و محیط زندگی در پرندگان زینتی نسبت به سایر پرندگان کیفیت بالاتری دارد، احتمالاً به این علت در هیچ‌کدام از نمونه‌ها لیستریای مونوسیتوژنز و ایوانوای یافت نشد. این مطالعه نشان داد که نمی‌توان پرندگان زینتی این منطقه را منبع یا ناقل لیستریای مونوسیتوژنز و ایوانوای دانست.

واژگان کلیدی: لیستریا، پرندگان زینتی، روش واکنش زنجیره ای پلی مراز، سپتی سمی.

تاریخ دریافت: ۹۰/٦/۲۰ **تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۱۱**

www.SID.ir

مقدمه

جنس لیستریا دو گونه‌ی بیماری‌زا دارد: لیستریای مونوسیتوژنز و لیستریای ایوانوای که از این دو، لیستریای مونوسیتوژنز به عنوان عامل سقط، انسفالیت (encephalitis)، سپتی‌سمی در انسان و حیوانات شناخته شده است و لیستریای ایوانوای نیز به دلیل نقش در سقط، مرده‌زایی، سپتی‌سمی جنینی در عفونت‌های گوسفند و گاو، از اهمیت بالایی برخوردار است، همچنین گاهاً در انسان نیز ایجاد عفونت می‌کند (۱، ۲).

پرندگان ممکن است باکتری را از روده‌های خود به زنجیره‌ی غذایی منتقل کنند. به عنوان مثال پرندگان به محیط‌های فرآوری مواد غذایی وارد می‌شوند یا سبزیجاتی که در محیط‌های باز رشد می‌کنند یا می‌توانند غذاهایی که در بازار آزاد فروخته می‌شوند را آلوده نمایند (۳). همچنین پرندگان خانگی نیز به صورت بالقوه، می‌توانند میکروب‌های بیماری‌زا را در خود جای داده و به صاحبان خود منتقل کنند (٤).

مطالعات عمده‌ای در زمینه‌ی بررسی پرندگان مختلف از قبیل: کبوتر (۵)، پرندگان وحشی قفسی (٦) و پرندگان وحشی (۳) از نظر آلودگی به گونه‌های لیستریا انجام شده است. مطالعات صورت گرفته نشان داده‌اند که شیوع گونه‌های لیستریا به منابع تغذیه‌ای پرندگان، بسیار مرتبط است، چنانچه میزان آلودگی بسیار بالا به گونه‌های لیستریا در مرغان نوروزی به علت عادت به جست‌و جو در آشغال‌ها جهت غذا خوردن گزارش شده است (۷ ۱۰).

با توجه به این مهم، در این مطالعه به بررسی پرندگان زینتی یزد از نظر آلودگی به لیستریای مونوسیتوژنز و ایوانوای با روش PCR پرداخته شد.

روش

در این مطالعه که در زمستان سال ۱۳۸۹ صورت گرفت، در مجموع ۱۸۰ نمونه‌ی مدفوعی از پرندگان زینتی (۱۵۰ قناری و ۳۰ مرغ عشق) یزد اخذ گردید.

سواب‌ها مستقیماً درون محیط *Listeria* enrichment broth (Merck، ساخت آلمان) قرار داده شدند و در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ٤۸ ساعت انکوبه گردیدند. سپس، نمونه‌ها بر روی محیط Palcam agar (Merck، ساخت آلمان) کشت داده و به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند (۱۱). کلنی‌های کوچک، مورب و کمی محدب به عنوان پرگنه‌های مشکوک به لیستریای مونوسیتوژنز و ایوانوای برای تأیید از نظر رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، حرکت، احیای نیترات، همولیز، تست کمپ و تخمیر قندهایی چون رامنوز، گزیلوز، مانیتول مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌های مشکوک به لیستریای مونوسیتوژنز و لیستریای ایوانوای تا زمان انجام PCR در محیط TSB (Merck، ساخت آلمان) به صورت گلیسیرینه در دمای ۲۰درجه نگه‌داری شدند. کنترل مثبت لیستریای مونوسیتوژنز ATCC 19114 و لیستریای ایوانوای ATCC 19119 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه گردید. نمونه‌های مشکوک، جهت جستجوی لیستریای مونوسیتوژنز و لیستریای ایوانوای به وسیله‌ی PCR با استفاده از پرایمرهای درج شده در جدول ۱ (ساخت شرکت سیناژن ایران) که قبلاً توسط چوی (Choi) و همکاران (۱۲)، لیو (Liu) و همکاران (۱۳) و دومیس (Doumith) و همکاران (۱٤) به ثبت رسیده است، مورد آزمون قرار گرفتند. مواد PCR تهیه شده از شرکت سیناژن در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۰/۷۵ میلی‌مول MgCl2، ۰/۰۲ میلی‌مول dNTP، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلی‌مراز، یک میکرولیتر با غلظت ۱۰ میکرومولار از هر پرایمر، ۱ میکروگرم DNA الگو) در دستگاه Biorad (ساخت آمریکا) انجام شد و دماهای مورد استفاده در واکنش PCR در جدول ۱ درج شده است. در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز (ساخت شرکت سیناژن ایران) ۱/۵ درصد با مارکر ۱۰۰ جفت بازی

www.SID.ir
Archive of SID

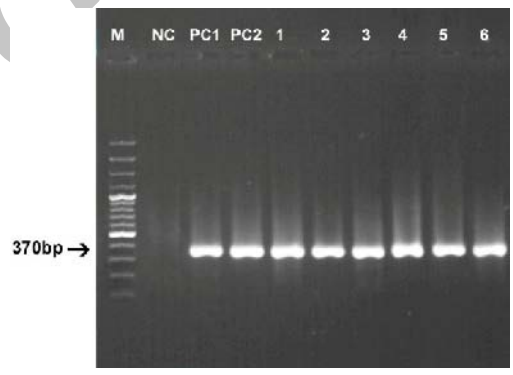
(Fermentas) الکتروفـورز (پایـاپژوهش پـارس، سـاخت ایران) گردید.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمرها	توالی پرایمرها	واسرشت	دمای Anealing	گسترش	سیکل	منبع	اندازه‌ی محصول
DG69 and DG74 (*L. monocytogenes*)	For: GTGCCGCCAAGAAAAGGTTA Rev: CGCCACACTTGAGATAT	۹٤°C ٤٥ S	٥٥°C ٤٥ S	۷۲°C ٤٥ S	۳۰	۱۲	636 bp
liv22-228 **F** and liv22-228 **R** (*L. ivanovii*)	For: CGAATTCCTTATTCACTTGAGC Rev: GGTGCTGCGAACTTAACTCA	۹٤°C ۲۰ S	٦۰°C ۲۰ S	۷۲°C ٤٥ S	۳۰	۱۳	436 bp
prs (all *Listeria* species)	For: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG Rev: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	۹٤°C ۲٤ S	٥۳°C ٦۹ S	۷۲°C ٦۹ S	۳٥	۱٤	370 bp

نتایج

در این مطالعه از ۱۸۰ نمونه‌ی مدفوعی از پرندگان زینتی (۱۵۰ قنـاری و ۳۰ مـرغ عشـق) کـه از نقـاط مختلـف یـزد جمع‌آوری گردید، استفاده شده اسـت. اگرچـه شـیوع جـنس لیستریا در قناری ٤ درصد (٦ از ۱۵۰) بـود (شـکل۱)، امـا در هـیچ‌کـدام از نمونـه‌هـا لیسـتریای مونوسـیتوژنز و لیسـتریای ایوانوای یافت نشد.



شکل۱) تصویر الکتروفورز ژل آگارز مربوط به جنس لیستریا. **M**: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، **NC**: کنترل منفی، **PC1**: کنترل مثبت لیستریای مونوسیتوژنز، **PC2**: کنترل مثبت لیستریای ایوانوای، ۱ تا ٦: ایزوله‌های مثبت برای جنس لیستریا

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

گزارش‌های متعددی در زمینه‌ی جداسازی لیستریای مونوسیتوژنز از پرندگان وجود دارد. وبر (Weber) و همکاران شیوع لیستریای مونوسیتوژنز را در کبوتر خانگی ۰/۹ درصد گزارش دادند (۵). در مطالعه‌ی دیگری علی‌رغم این‌که ٤۰۰ نمونه، مورد ارزیابی قرار گرفت، عدم وجود لیستریای مونوسیتوژنز در نمونه‌های مدفوعی کبوتر گزارش گردید (۱۵). شیوع لیستریای مونوسیتوژنز در پرندگان وحشی از وضعیت متفاوتی برخوردار است، به نحوی که کالوری (Kalorey) و همکاران لیستریای مونوسیتوژنز را به میزان ۲ درصد از پرندگان وحشی قفسی جداسازی نمودند (٦)، اما هلستروم (Hellstrom) و همکاران شیوع لیستریای مونوسیتوژنز را در پرندگان وحشی فنلاند ۳٦ درصد گزارش کرده‌اند و همچنین اظهار داشته‌اند که شیوع این پاتوژن در پرندگان وحشی که در اماکن دفع زباله‌ی شهری حضور دارند، نسبت به پرندگان وحشی شهری به میزان قابل توجهی بیشتر بوده است (۳). مشابه با مطالعه‌ی پیشین، باوترفروی (Bouttefroy) و همکاران نشان دادند که ٤٦ درصد از کلاغ‌های شهری، یک یا بیشتر از یکی از گونه‌های لیستریا را در خود جای داده‌اند و از میان نمونه‌های مورد ارزیابی ۳۳ درصد به لیستریای مونوسیتوژنز آلوده بوده‌اند (۱٦). در پرتغال، ۲۸۵ نمونه‌ی مدفوعی از مرغان نوروزی مورد بررسی قرار گرفت. میزان شیوع جنس لیستریا و گونه‌ی لیستریای مونوسیتوژنز به ترتیب ۹/۸ درصد و ٦ درصد گزارش گردید (۱۷). در پژوهشی که در کانادا بر روی مرغان نوروزی نوک گرد به عمل آمد، نشان داده شد که ۹/۵ درصد آن‌ها به لیستریای مونوسیتوژنز آلوده بودند (۱۸).

مرغان نوروزی می‌توانند ناقل میزان بالایی از باکتری‌های بیماری‌زا باشند. علت این امر می‌تواند این مسأله باشد که این پرندگان جهت غذا خوردن در آشغال‌ها به جستجو می‌پردازند (۷ـ۱۰).

در این مطالعه نیز مشابه با مطالعه‌ی کاسانواس (Casanovas) و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۱۵) هیچ نمونه‌ی آلوده به لیستریای مونوسیتوژنز و لیستریای ایوانوای در پرندگان مورد مطالعه یافت نشد.

نتیجه‌گیری

توضیح احتمالی می‌تواند این نکته باشد که منبع گونه‌های لیستریا در پرندگان، غذا و محیطی است که مورد استفاده قرار می‌دهند (۳). از آن‌جایی که سطح بهداشتی وضعیت تغذیه‌ای و محیط زندگی در پرندگان زینتی نسبت به سایر پرندگان در میزان بالاتری قرار دارد، احتمالاً به همین علت در هیچ‌کدام از نمونه‌ها لیستریای مونوسیتوژنز و ایوانوای یافت نشد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که نمی‌توان پرندگان زینتی این منطقه را به عنوان منبع یا ناقل لیستریای مونوسیتوژنز و ایوانوای تلقی نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پژوهشکده‌ی بیماری‌های مشترک انسان و دام و حوزه‌ی معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد به جهت تأمین منابع مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

Archive

www.SID.ir

References

1- Elischerova K, Cupkava E, Urgeova E, Lysy J, Sesevikova A. Isolation of *Listeria ivanovii* in Slovakia. Czechoslovak Epidemiology Microbiology Immunology. 1990; 39: 228–36.
2- Cummins AI, Fielding AK, McLauchlin J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. Journal of Infection. 1994; 28: 89–91.
3- Hellström S, Kiviniemi K, Autio T, Korkeala H. *Listeria monocytogenes* is common in wild birds in Helsinki region and genotypes are frequently similar with those found along the food chain. Journal of Applied Microbiology. 2008; 104: 883–8.
4- Krauss H, Weber A, Appel M, Isenberg HD, Schiefer HG, Slenczka W, et al. Zoonoses: Infectious diseases transmissible from animals to humans, 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 2003.
5- Weber A, Potel J, Schafer-Schmidt R. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in faecal samples of pigeons. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift. 1995; 108: 26-7.
6- Kalorey DR, Kurkure NV, Warke SR, Rawool DB, Malik SV, Barbuddhe SB. Isolation of pathogenic *Listeria monocytogenes* in faeces of wild animals in captivity. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 2006; 29: 295–300.
7- Kapperud G, Rosef O. Avian wildlife reservoir of campylobacter fetus subsp. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 1983; 45: 375-80.
8- Cízek A, Literák I, Hejlícek K, Treml F, Smola J. *Salmonella* contamination of the environment and its incidence in wild birds. Zentralblblatt für Veterinarmed. 1994; 41: 320-7.
9- Hubálek Z, Sixl W, Mikulásková M, Sixl-Vogel B, Thiel W, Halouzka J, et al. *Salmonella* in gulls and other free-living birds in the Czech Republic. Central European Journal of Public Health. 1995; 3: 21-4.
10- Palmgren H, Sellin M, Bergström S, Olsen B. Enteropathogenic bacteria in migrating birds arriving in Sweden. Scandinavian Journal of Infectious Disease. 1997; 29: 565-8.
11- Harrigan WM. Laboratory methods in food microbiology. 3rd edition. Gaithersburg: Aspen Publisher, Inc; 1998: 485-510.
12-Choi WS, Hong C. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using competitive PCR. International Journal of Food Microbiology. 2003; 84: 79-85.
13- Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML. PCR detection of a putative N-acetylmuramidase gene from *Listeria ivanovii* facilitates its rapid identification. Veterinary Microbiology. 2004;101:83-9.
14- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42: 3819–22.
15- Casanovas L, de Simón M, Ferrer MD, Arqués J, Monzón G. Intestinal carriage of *campylobacters*, *salmonellas*, *yersinias* and *listerias* in pigeons in the city of Barcelona. Journal of Applied Microbiology. 1995; 78: 11-3.
16- Bouttefroy A, Lemaitre JP, Rousset A. Prevalence of *Listeria* sp, in droppings from urban rooks (Corvus frugilegus). Journal of Applied Microbiology. 1997; 82: 641-7.
17- Duartea EL, Guerra MM, Bernardo FM. *Salmonella* and *Listeria* spp, carriage by gulls (larids). Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. 2002; 97 (544): 181-7.
18- Quessy S, Messier S. Prevalence of *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp and *Listeria* spp in ring-billed gulls (Larus delawarensis). Journal of Wildlife Disease. 1992; 28: 526-31.

www.SID.ir

Evaluation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* infection in cage birds in Yazd, Iran by polymerase chain reaction

Abdolkarim Zamani Moghadam PhD[1], Hossein Tahmasby DVM[2*], Naser Salehi DVM[2]

1- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine and Research Institute of Zoonotic Diseases, University of Shahrekord , Shahrekord, Iran.

2- Student of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine and Research Institute of Zoonotic Diseases, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

**Corresponding Author: Hossein Tahmasby Faculty of Veterinary Medicine and Research Institute of Zoonotic Diseases, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.*
Tell: 09137325071
Email: H.Tahmasby@Yahoo.com

Abstract

Background: Most birds probably can carry Listeria spp. asymptomatically in their intestines with varying prevalence and can transmit the pathogens to humans. The genus-Listeria has two pathogenic species namely, Listeria monocytogenes and Listeria ivanovii. Of these, L. monocytogenes is a well-known cause of abortion, encephalitis and septicaemia in man and animals. Listeria ivanovii is an animal pathogen and in rare cases cause human infection. Hence, a study was conducted to determine the occurrence of pathogenic Listeria monpcytogenes and Listeria ivanovii in cage birds faeces from Yazd.

Methods: Altogether 180 (150 canaries and 30 lovebirds) samples of bird faeces were collected with sterile cotton swabs from different areas of Yazd, Iran. Swabs were placed directly into Listeria enrichment broth. Secondly enrichments were streaked on Palcam agar. Then evaluated to detect Listeria monocytogenes and Listeria ivanovii by polymerase chain reaction (PCR) method.

Results: Considering although overall prevalence of Listeria species in canaries were 4% (6 out of 150), no L. monocytogenes and no L. ivanovii found in our study.

Conclusion: The origins of *Listeria spp*. in birds are the foods they eat and living environments. Nutritions and living environments hygiene level of pet birds is higher than other birds, no L. monocytogenes and no L. ivanovii found in any samples. The present result is suggesting that cage birds are not source of Listeria monocytogenes and Listeria ivanovii in the region.

Keywords: Listeria, cage birds, PCR, septicaemia.

Received: 11.09.2011 **Accepted: 02.11.2011**

www.SID.ir
Archive of SID