

«مقاله‌ی اصیل»

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

عبدالکریم زمانی مقدم<sup>۱</sup>، حسین طهماسبی<sup>۲\*</sup>، ناصر صالحی<sup>۲</sup>

### 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 مونوسیتوزنز و لیستریای ایوانوای که از این دو، لیستریای مونوسیتوزنز به عنوان عامل سقط، انسفالیت، سپتی سمی در انسان و حیوانات شناخته شده است. لیستریای ایوانوای یک پاتوژن حیوانی است و گاهاً در انسان نیز ایجاد عفونت می‌کند. در این مطالعه به ارزیابی آلودگی به لیستریای مونوسیتوزنز 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 مونوسیتوزنز و ایوانوای مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**نتایج:** گرچه شیوع جنس لیستریا در قناری ۴ درصد (۶ از ۱۵۰) بود، اما در هیچ‌کدام از نمونه‌ها لیستریای مونوسیتوزنز 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 مونوسیتوزنز و ایوانوای یافت نشد. این مطالعه نشان داد که نمی‌توان پرندگان زینتی این منطقه را منبع یا ناقل لیستریای مونوسیتوزنز و ایوانوای دانست.

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

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

۲- دانشجوی دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.  
تلفن و ایمیل: ۰۹۱۳۳۲۵۰۷۱  
H.Tahmasby@yahoo.com

۰۹۱۳۵۱۸۹۷۶۸  
Dr6884@yahoo.com

\* نویسندهٔ مسؤول:

حسین طهماسبی، ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام  
تلفن: ۰۹۱۳۳۲۵۰۷۱  
Email: H.Tahmasby@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۰

## مقدمه

سواب‌ها مستقیماً درون محیط *Listeria enrichment* (Merck) broth، ساخت آلمان) قرار داده شدند و در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۲ و ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. سپس، نمونه‌ها بر روی محیط *Palcam* (Merck) agar، ساخت آلمان) کشت داده و به مدت ۴۸ 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 نیترا، 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 (Merck) TSB، ساخت آلمان) به صورت گلیسرینه در دمای ۲۰ درجه 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 (۱۴) 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  $MgCl_2$ ، 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

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).

پرندها ممکن است باکتری را از روده‌های خود به زنجیره‌ی غذایی منتقل کنند. به عنوان مثال پرندها 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 پرندها خانگی نیز به صورت بالقوه، می‌توانند میکروب‌های بیماری‌زا را در خود جای داده و به صاحبان خود منتقل کنند (۴).

مطالعات عمده‌ای در زمینه‌ی بررسی پرندها مختلف از قبیل: کبوتر (۵)، پرندها وحشی قفسی (۶) و پرندها وحشی (۳) از نظر آلودگی به گونه‌های لیستریا انجام شده است. مطالعات صورت گرفته نشان داده‌اند که شیوع گونه‌های لیستریا به منابع تغذیه‌ای پرندها، بسیار مرتبط است، چنانچه میزان آلودگی بسیار بالا به گونه‌های لیستریا در مرغان نوروژی به علت عادت به جست و جو در آشغال‌ها جهت غذا خوردن گزارش شده است (۴، ۱۰).

با توجه به این مهم، در این مطالعه به بررسی پرندها 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 پرندها زینتی (۱۵۰ قناری و ۳۰ مرغ عشق) یزد اخذ گردید.

(Fermentas) الکتروفورز (پایاپژوهش پارس، ساخت ایران) گردید.

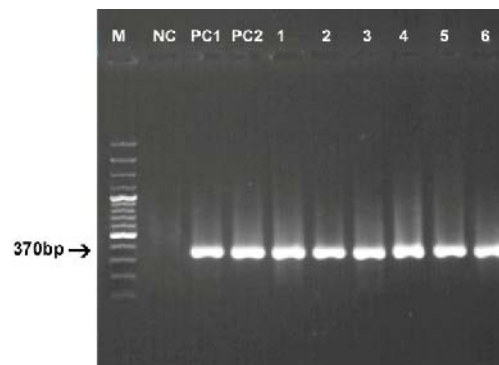
جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمرها	توالی پرایمرها	واسرشت	دمای Annealing	گسترش	سیکل	منع	اندازه‌ی محصول
DG69 and DG74 ( <i>L. monocytogenes</i> )	For: GTGCCGCCAAGAAAAGGTTA Rev: CGCCACACTTGAGATAT	۹۴°C ۴۵ S	۵۵°C ۴۵ S	۷۲°C ۴۵ S	۳۰	۱۲	636 bp
liv22-228 F and liv22-228 R ( <i>L. ivanovii</i> )	For: CGAATTCCTTATTCCTTGAGC Rev: GGTGCTGCGAACTTAACTCA	۹۴°C ۲۰ S	۶۰°C ۲۰ S	۷۲°C ۴۵ S	۳۰	۱۳	436 bp
prs (all <i>Listeria</i> species)	For: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG Rev: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	۹۴°C ۲۴ S	۵۳°C ۶۹ S	۷۲°C ۶۹ S	۳۵	۱۴	370 bp

### نتایج

جمع‌آوری گردید، استفاده شده است. اگرچه شیوع جنس لیستریا در قناری ۴ درصد (۶ از ۱۵۰) بود (شکل ۱)، اما در هیچ‌کدام از نمونه‌ها لیستریای مونوسیتوژنز و لیستریای ایوانوای یافت نشد.

در این مطالعه از ۱۸۰ نمونه‌ی مدفوعی از پرندگان زینتی (۱۵۰ قناری و ۳۰ مرغ عشق) که از نقاط مختلف یزد



شکل ۱) 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 ۶: ایزوله‌های مثبت برای جنس لیستریا

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 (۷-۱۰).

در این مطالعه نیز مشابه با مطالعه‌ی کاسانواس (Casanovas) و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۱۵) هیچ نمونه‌ی آلوده به لیستریای مونوسیتوزنز 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 زبیتی نسبت به سایر پرندگان در میزان بالاتری قرار دارد، احتمالاً به همین علت در هیچ کدام از نمونه‌ها لیستریای مونوسیتوزنز و ایوانوای یافت نشد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که نمی‌توان پرندگان زبیتی این منطقه را به عنوان منبع یا ناقل لیستریای مونوسیتوزنز 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.

گزارش‌های متعددی در زمینه‌ی جداسازی لیستریای مونوسیتوزنز از پرندگان وجود دارد. وبر (Weber) و همکاران شیوع لیستریای مونوسیتوزنز را در کبوتر خانگی ۰/۹ درصد گزارش دادند (۵). در مطالعه‌ی دیگری علی‌رغم این‌که ۴۰۰ نمونه، مورد ارزیابی قرار گرفت، عدم وجود لیستریای مونوسیتوزنز در نمونه‌های مدفوعی کبوتر گزارش گردید (۱۵). شیوع لیستریای مونوسیتوزنز در پرندگان وحشی از وضعیت متفاوتی برخوردار است، به نحوی که کالوری (Kalorey) و همکاران لیستریای مونوسیتوزنز را به میزان ۲ درصد از پرندگان وحشی قفسی جداسازی نمودند (۶)، اما هلستروم (Hellstrom) و همکاران شیوع لیستریای مونوسیتوزنز را در پرندگان وحشی فنلاند ۳۶ 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 ۴۶ 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 مونوسیتوزنز آلوده بوده‌اند (۱۶). در پرتغال، ۲۸۵ نمونه‌ی مدفوعی از مرغان نوروزی مورد بررسی قرار گرفت. میزان شیوع جنس لیستریا و گونه‌ی لیستریای مونوسیتوزنز به ترتیب ۹/۸ درصد و ۶ 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 مونوسیتوزنز آلوده بودند (۱۸).

**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 Tierärztliche 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, Hejlíček K, Tremel F, Smola J. *Salmonella* contamination of the environment and its incidence in wild birds. Zentralblatt für Veterinärmed. 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. 3<sup>rd</sup> 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- Duarte 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.

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

Abdolkarim Zamani Moghadam PhD<sup>1</sup>, Hossein Tahmasby DVM<sup>2\*</sup>, Naser Salehi DVM<sup>2</sup>

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. asymptotically 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 monocytogenes* 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