نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۱۰۱، زمستان ۱۳۹۲

ارزیابی آلودگی به کمپیلوباکتر در پرندگان وحشی در اسارت در منطقه ی شهرکرد به روش PCR

• **عبدالکریم زمانی مقدم**
دانشیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی و عضو پژوهشکده بیماری های مشترک انسان و دام دانشگاه شهرکرد
• **حسین طهماسبی** (نویسنده مسئول)
دانشجوی دانشکده دامپزشکی و عضو پژوهشکده بیماری های مشترک انسان و دام دانشگاه شهرکرد
• **حسن ممتاز**
دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد
• **سید حسین هاشمی باباحیدری**
دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۹۱
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۷۳۲۵۰۷۱
Email: h.tahmasby@yahoo.com

چکیده

پرندگان وحشی در اسارت می توانند حامل بعضی از عوامل بیماری زای انسانی باشند و برخی از این عوامل ممکن است به مردم منتقل شوند. کمپیلوباکتر معمول ترین علت گاستروانتریت انسان در سراسر جهان است. با توجه به علاقه ی بسیاری از مردم در نگه داری از پرندگان وحشی در اسارت و توانایی بالقوه این پرندگان در انتقال کمپیلوباکتر به انسان در این مطالعه به ارزیابی آلودگی به کمپیلوباکتر در پرندگان وحشی در اسارت در شهرکرد با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) پرداخته شد. مجموعا ۸۰ نمونه مدفوعی از پرندگان وحشی در اسارت مختلف (طوطی، بلبل، مینا، سهره، فینچ، بلدرچین، مرغ بهشتی) از نقاط مختلف شهرکرد جمع آوری گردید و با استفاده از روش های باکتری شناسی و PCR به جست و جوی کمپیلوباکتر پرداخته شد. در هیچ کدام از نمونه ها کمپیلوباکتر یافت نگردید. مطالعه حاضر نشان می دهد که مدفوع پرندگان وحشی در اسارت شهرکرد منبع کمپیلوباکتر نیست.

کلمات کلیدی: کمپیلوباکتر، پرندگان وحشی در اسارت، PCR

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 101 pp: 22-25

Evaluation of campylobacter infection in wild cage birds from Shahrekord area, Iran

By: Zamani Moghaddam, A. Associate Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine and Research Institute of Zoonotic Diseases, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, Tahmasby, H. Student, Faculty of Veterinary Medicine and Research Institute of Zoonotic Diseases, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, (Corresponding Author; Tel: +989137325071) Momtaz, H. Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, Hashemi Babaheidari, S.H. Graduated Student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

Recieved: January 2012 **Accepted: November 2012**

Wild cage birds can be carriers of some human pathogens and some of these can be transmitted to people. Campylobacter bacteria are the most common bacteria that cause gastroenteritis worldwide. Considering people's interests to keep wild cage birds and the potential ability of wild cage birds to transmit Campylobacter to humans, the present study was conducted to evaluate Campylobacter infection in Shahrekord's wild cage birds by polymerase chain reaction (PCR). Altogether 80 samples of different wild cage birds (parrot, nightingale, mynah, goldfinch, finch, quail, kingbird) faeces were collected were collected with sterile cotton swabs from different areas of Shahrekord, Iran and evaluated for detection of Campylobacter by bacteriological and PCR methods. Campylobacter was not found in any samples. Present study suggests wild cage birds faeces is not source of Campylobacter in Shahrekord, Iran.

Keywords: Campylobacter, Wild cage birds, PCR

مقدمه

اســـهال حاد ســـالیانه در دنیا باعث مرگ ۲/۵ میلیون کودک می گردد. شـــایع ترین باکتـــری های مولد اســـهال در کودکان گونه های کمپیلوباکتر، سالمونلا، شیگلا و *E.coli* بوده و بیشترین میزان آلودگی به کمپیلوباکتر و ســـالمونلا در نوزادان مشـــاهده می گردد (۸). کمپیلوباکتر باکتری شایع ترین علت گاستروآنتریت در انسان شناخته شده (۱۷) و سالیانه ۴۰۰ تا ۵۰۰ میلیون نفر را در دنیا مبتلا می نماید (۱۲).

کمپیلوباکتـــر در طبیعت پراکندگی وســـیعی داشـــته و فلور طبیعـــی دســـتگاه گوارش حیوانات وحشـــی و اهلـــی مانند گاو، گوســـفند، خوک، بز، ســـگ، گربه، جوندگان و انواعی از پرندگان مـــی باشـــد. مخزن هـــای متنوع حیوانـــی احتمـــالاً منبع اغلب عفونت های روده ای ناشی از این باکتری هستند (۹).

پرندگان وحشی در اسارت می توانند بعضی از بیماری ها را در خود جای دهند و به صاحبان خود منتقل گردانند. اگرچه مالکیت پرندگان وحشی در اسارت بدون خطر نیست، اما بسیاری از مردم در منزل خود از این پرندگان مراقبت کرده و به این ترتیب خود را در معرض بسیاری از بیماری های مشترک باکتریایی، پروتوزوایی، قارچی، ویروسی یا انگلی قرار می دهند (۶).

با توجه به علاقه ی بســـیاری از مردم در نگه داری از پرندگان وحشـــی در اسارت و همچنین اهمیت بالای بیماری زایی باکتری کمپیلوباکتر در این مطالعه به ارزیابی آلودگی پرندگان وحشـــی در اســـارت به این باکتری در منطقـــه ی چهارمحال و بختیاری پرداخته شد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه

در این مطالعه که در زمســـتان سال ۱۳۸۹ و بهار سال ۱۳۹۰ صورت گرفت مجموعا ۸۰ نمونه مدفوعی از پرندگان وحشـــی در اسارت مختلف (۲۹ طوطی، ۲۱ بلبل، ۱۱ مینا، ۱۱ سهره، ۶ فینچ، ۱ بلدرچین، ۱ مرغ بهشتی) از نقاط مختلف شهرکرد به وسیله ی سواب استریل جمع آوری گردید.

کشت و تست های بیوشیمیایی

سواب ها مســـتقیماً درون Campylobacter enrichment broth (هایمدیا، ســـاخت هندوستان) که بدان Campylobacter selective supplement (هایمدیـــا، ســـاخت هندوســـتان) و ۵ درصد خون گوســـفند دفیبرینه شده افزوده شـــده، قرار داده شدند و در دمـــای ۴۲ درجه ســـانتی گـــراد به مدت ۴۸-۲۴ ســـاعت در شـــرایط Microaerophilic انکوبـــه گردیدنـــد. ســـپس بر روی محیط Campylobacter selective agar (هایمدیا، ســـاخت هندوســـتان) با مکمل آنتی بیوتیکی (هایمدیا، ســـاخت هندوستان) و ۵ درصد خون دفیبرینه ی گوســـفند کشت داده شدند. کلنی های تک رشـــد یافته، جهت تایید و تفکیک گونه های کمپیلوباکتر از نظر

رنگ آمیزی گرم، تولید کاتالاز، اکسیداز و مقاومت به سفالوتین مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های مشکوک به کمپیلوباکتر تا زمان انجام PCR در محیط TSB به صورت گلیسیرینه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری گردیدند.

PCR

کنترل مثبت از کلکسیون باکتری های گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد تهیه گردید. نمونه های مشکوک جهت جست و جوی کمپیلوباکتر به وسیله ی PCR با استفاده از پرایمرهای توصیف شده توسط Linton و همکاران (۱۶S rRNAF:۵´GGATGACACTTTTCGGAGC۳´، ۱۶S rRNA R:۵´CATTGTAGCACGTGTGTC۳´) با اندازه محصول ۸۱۶ جفت باز مورد آزمون قرار گرفتند (۷). مواد PCR از شرکت سینا‌ژن ساخت ایران تهیه شد و واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR ، ۰/۷۵ میلی مول $MgCl_2$، ۰/۰۲ میلی مول dNTP ، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلی مراز، یک میکرولیتر با غلظت ۱۰ میکرومولار از هر پرایمر، ۱ میکروگرم DNA الگو) انجام گردید. برنامه های دمایی مطابق با برنامه حرارتی Linton و همکاران (واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه) (۷) در دستگاه ترموسایکلر (Biorad، ساخت آمریکا) صورت پذیرفت. در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز (ساخت سینا‌ژن، ایران) ۱/۵ درصد الکتروفورز (ساخت پایاپژوهش پارس، ایران) گردید.

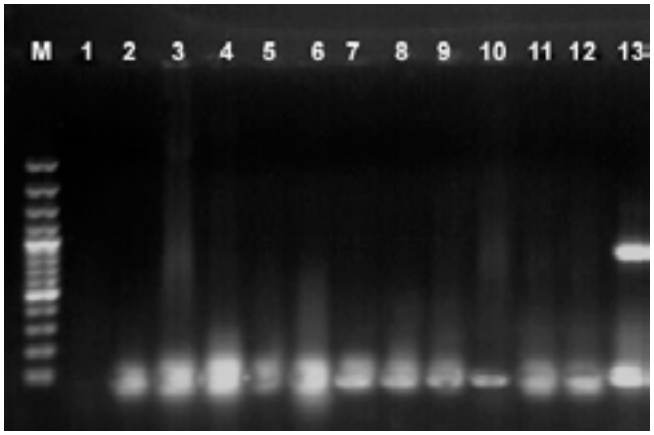
نتایج

در هیچ کدام از نمونه ها کمپیلوباکتر یافت نگردید.

بحث

متاسفانه به وضعیت آلودگی پرندگان به کمپیلوباکتر در ایران و نقش آن ها در انتقال این عامل بیماری زا به انسان چندان توجهی صورت نگرفته است و وضعیت آلودگی به این عامل بیماری زا در این منطقه چندان واضح و روشن نیست.

مطالعاتی که بر روی پرندگان زینتی صورت گرفته شیوع متفاوتی را در پرنده های مختلف در جاهای مختلف نشان می دهد. در مطالعهٔ Tresierra-Ayala و همکاران در پرو میزان آلودگی به این باکتری در طوطی های مورد بررسی قرار گرفته ۸ درصد گزارش گردید (۱۳). در مطالعه ی دیگر صورت گرفته بر روی طوطی های گونه های مختلف میزان شیوع کمپیلوباکتر ۷ درصد اعلام شد (۱۴). در مطالعهٔ Wedderkopp و همکاران در سال ۲۰۰۳ شیوع آلودگی به کمپیلوباکتر در تعدادی از پرندگان کمیاب که جهت سرگرمی (game birds) مورد استفاده قرار می گرفتند گزارش گردید (۱۶).



شکل۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز ردیابی جنس کمپیلوباکتر. M: مارکر۱۰۰ جفت بازی، ۱: آب مقطر، ۲ تا ۱۱: نمونه های تست شده، ۱۲: کنترل منفی، ۱۳: کنترل مثبت کمپیلوباکتر (۸۱۶ جفت باز)

در کبوتر نیز آلودگی به کمپیلوباکتر از صفر تا درصدهای بالا گزارش شده است. Jeffrey و همکاران طی یک مطالعه ی ۳ مرحله ای بر کبوترهای کالیفرنیای آمریکا اعلام نمودند که میزان شیوع کمپیلوباکتر ژژونی در مرحله ی اول، دوم و سوم به ترتیب ۱۱/۱ درصد، صفر درصد و ۴/۸ درصد می باشد (۴). Piccoli و همکاران در بررسی کبوترهای ونیز ایتالیا اعلام نمودند که در کل ۲۶/۲۵ درصد از نمونه ها از نظر میزان آلودگی به *C.jejuni* مثبت هستند (۱۰). در بررسی Vučemilo و همکاران در کبوترهای Zagreb (پایتخت کشور کرواسی) اعلام گردید که ۸/۱ درصد از نمونه ها آلوده به کمپیلوباکتر می باشد (۱۵).

در مورد پرندگان وحشی نیز وضعیت مشابهی وجود دارد. Keller و همکاران با بررسی نمونه های مدفوعی پرندگان وحشی به روش Multiplex-PCR شیوع کمپیلوباکتر را در ۶ خانواده از پرندگان وحشی در ایالات متحده آمریکا مورد بررسی قرار داد و میزان شیوع آن را در کل، ۷/۲ درصد اعلام نمود (۵). در بررسی Hughes و همکاران به روش PCR در پرندگان وحشی انگلستان شمالی اعلام گردید که ۱/۴ درصد از نمونه ها آلوده به کمپیلوباکتر می باشد (۳). French و همکاران در بررسی پرندگان وحشی نیوزیلند به روش کشت وpulsed-field gel electrophoresis (PFGE) اعلام نمودند که در کل ۱۲/۵ درصد از نمونه ها از نظر میزان آلودگی به *C.jejuni* مثبت هستند. میزان شیوع *C.jejuni* در نمونه های مدفوعی خشکیده ۶/۷ درصد و در نمونه های مدفوعی تازه ۱۵/۲ درصد بدست آمد (۲).

نتایج این مطالعه نیز مشابه با بعضی از مطالعات صورت گرفته در سایر کشورها، عدم وجود کمپیلوباکتر را در پرندگان منطقه مورد بررسی قرار گرفته، نشان می دهد به نحوی که Brangenberg و همکاران طی مطالعه ای که در نیوزیلند انجام دادند هیچ نمونه ی مثبتی

از کمپیلوباکتـــر در طوطی های مورد بررســـی قرار گرفتـــه نیافتند (۱). در تحقیقی نیز که توسط Soncini و همکاران جهت بررسی میزان آلودگی به کمپیلوباکتر در قرقاول صورت گرفت هیچ نمونه ی مثبتی یافت نشد (۱۱).

از علل عدم شیوع کمپیلوباکتر در این مطالعه شاید بتوان این مسئله را ذکر کرد که سرد و خشک بودن آب و هوا بر کاهش بقای میکروب ها بسیار موثر است. این مطالعه در فصل زمستان و بهار که بقای میکروب ها در آن کاهش می یابد و همچنین در شهرکرد که منطقه ای است با آب و هوای سرد و خشک انجام شده است. این مســـائل بر شـــیوع صفر درصدی گزارش شده در این مطالعه می توانند بسیار موثر باشند. اگرچه نمی توان پرندگان وحشی در اســـارت این منطقه را به عنوان منبع یا حامل کمپیلوباکتر تلقی نمود اما ممکن اســـت که پرندگان وحشی در اسارت این منطقه، ناقل سایر عوامل بیماری زا باشـــند که با توجه به اهمیت مسئله تحقیقات بیشتر در این زمینه توصیه می گردد.

منابع مورد استفاده

1 - Brangenberg, N., McInnes, C., Connolly, J.H. and Rogers, L.E. (2003) Absence of *Salmonella* and *Campylobacter* species in fecal and cloacal swab samples from Kakapo (*Strigops habroptilus*) on Codfish Island, New Zealand. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 17(4) pp: 203-205.

2 - French, N.P., Midwinter, A., Holland, B., Collins-Emerson, J., Pattison, R., Colles, F.M. and Carter, P. (2009) Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* Isolates from wild-bird fecal material in children's playgrounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(3) pp: 779–783.

3 - Hughes, L.A., Bennett, M., Coffey, P., Elliott, J., Jones, T.R., Jones, R.C., Lahuerta-Marin, A., McNiffe, K., Norman, D., Williams, N.J. and Chantrey, J. (2009) Molecular epidemiology and characterization of Campylobacter spp. isolated from wild bird populations in northern England. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(10) pp: 3007–3015.

4 - Jeffrey, J.S., Atwill, E.R. and Hunter, A. (2001) Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* at a Squab (Young Pigeon) Processing Plant. *Poultry Science*. 80, pp: 151–155.

5 - Keller, J.I., Shriver, W.G., Waldenström, J., Griekspoor, P. and Olsen, B. (2011) Prevalence of *Campylobacter* in Wild Birds of the Mid-Atlantic Region, USA. *Journal of Wildlife Diseases*. 47(3) pp: 750-754.

6 - Krauss, H., Weber, A., Appel, M., Isenberg, H.D., Schiefer, H.G., Slenczka, W., Von Graevenitz, A. and Zahner, H. (2003) Zoonoses: Infectious Diseases Transmissible From Animals to Humans, 3rd ed. Washington, DC: *American Society for Microbiology Press*.

7 - Linton, D., Owen, R.J. and Stanley, J. (1996) Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. Research in Microbiology. 147, pp: 707–718.

8 - Marcus, R. (2008) New information about pediatric food borne infections: the view from food net. *Current Opinion in Pediatrics*. 20, pp: 79-84.

9- Nachmkin Irvin, G. (1999) Campylobacter and arcobacter. In: Murray, Patrick R., Baron, Ellen Jo., Pfaller, Michael A., Tenover, Fred C., Yolken, Robert H. Manual of clinical microbiology, 7 th ed., washington DC, *American Society for Microbiology Press,* pp: 716-722.

10- Piccoli, L., Berzero, R., Crescente, M.D. and Capelli, G. (1994) Presence of *Campylobacter* and *Salmonella* in faeces of pigeon (*Columba livia*) [domestic strain] in the city of Venice [Veneto]. *Obiettivi e Documenti Veterinari*. 15(12) pp: 53-56.

11- Soncini, G., Valnegri, V.L., Vercellotti, L., Colombo, F., Valle, D., Franzoni, M. and Bersanii, C. (2006) Investigation of *Campylobacter* in Reared Game Birds. Journal of Food Protection. 69 (12), pp: 3021-3024.

12- Talukder, K.A., Aslam, M., Islam, Z., Azmi, I.J., Dutta, D.K., Hossain, S., Nur-E-Kamal, A., Nair, G.B., Cravioto, A., Sack, D.A. and Endtz, H.P. (2008) Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *Journal of Clinincal Microbiology*. 46(4) pp: 1485-1488.

13- Tresierra-Ayala, A., Bendayan, M.E., Bernuy, A., Espinoza, F. and Fernandez, H. (1995) Carriage of the classical thermotolerant *Campylobacters* in healthy domestic animals from eastern Peru. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 37(6) pp: 537-9.

14- Tresierra-Ayala, A. and Bendayan, M.E. (1998) Thermotolerant *Campylobacter* species isolated from psittaciformes in the Peruvian Amazon region. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 40(4) pp: 263-4.

15- Vučemilo, M., Vlahović, K., Dovč, A., Mužinić, J., Pavlak, M., Jerčić, J. and Zupančić, Z. (2003) Prevalence of *Campylobacter jejuni, Salmonella typhimurium,* and avian *Paramyxovirus* type 1 (PMV-1) in pigeons from different regions in Croatia. *Zeitschrift fur Jagdwissenschaft*. 49, pp: 303-313.

16- Wedderkopp, A., Madsen, A.M. and Jorgensen, P.H. (2003) Incidence of *Campylobacter* species in hobby birds. *Veterinary Record*. 152(6) pp: 179-80.

17- Wieczorek, K. and Osek, J. (2008). Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 52, pp: 211-216.