JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره هشتم، شماره اول، ۱۳۹۱، پیاپی ۲۴: ۳۸-۳۱

# تشخیص مولکولی میکروب *کلامیدوفیلا پسیتاسی* در تلفات و موارد مشکوک به عفونت با این عامل بیماری‌زا در طوطی‌سانان شهر تهران

**مظاهر شریعت نژاد[۱]، هادی حق بین نظرپاک[۲*]، نریمان شیخی[۳]**

*۱- دانش‌آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار، ایران*

*۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار، ایران*

*۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران*

تاریخ دریافت: ۲۵ دی ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: ۱۶ اردیبهشت ۱۳۹۱

**چکیده**

*میکروب کلامیدوفیلا یک ارگانیسم مشابه با باکتری‌های گرم منفی و داخل سلولی است که در خانواده کلامیدیاسه قرار دارد. در این خانواده گونه‌های مختلفی از کلامیدوفیلا قرار دارند که قادرند میزبان‌های خود را آلوده نمایند. گونه ایجادکننده بیماری در پرندگان، کلامیدوفیلا پسیتاسی است که در انسان هم منجر به بروز بیماری می‌شود. انتقال بیماری از طریق تماس با پرندگان آلوده و خصوصا پرندگان خانواده طوطی سانان و یا ترشحات و وسائل آلوده می‌باشد. هدف کلی از این مطالعه، تشخیص مولکولی میکروب کلامیدوفیلا پسیتاسی در بین پرندگان خانواده طوطی سانان مشکوک به حضور کلامیدوفیلا پسیتاسی در آنها در شهر تهران و با استفاده از روش واکنش زنجیره پلیمراز آشیانه‌ای می‌باشد. در این بررسی سوآب مدفوعی از ۲۳ نمونه طوطی مشکوک به همراه سو آب کلواک از ۷ نمونه لاشه مشکوک به حضور کلامیدوفیلا پسیتاسی گرفته شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. روش استخراج DNA با استفاده از فیلترهای سیلیکا صورت گرفت و در ادامه با استفاده از روش واکنش زنجیره پلیمراز آشیانه‌ای و بر اساس ژن 16 S rRNA مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج بدست آمده شامل ۱۰ مورد مثبت از بین ۳۰ نمونه مورد بررسی بود. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، اهمیت آموزش افراد نگهداری کننده از طوطی در جهت حفظ سلامت حیوان و پیشگیری از ابتلای انسان مشخص می‌شود.*

***کلمات کلیدی:*** *کلامیدوفیلا پسیتاسی، طوطی سانان، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای، تهران.*

*نویسنده مسئول: هادی حق بین نظرپاک

آدرس: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار. تلفن: ۰۹۱۱۱۲۳۰۴۸۷

پست الکترونیک: *hhaghbinnazarpak@iau-garmsar.ac.ir*

## مقدمه

میکروب *کلامیدوفیلا* عامل ایجادکننده بیماری کلامیدیوز می‌باشد که در انسان و طوطی سانان به نام پسیتاکوز یا تب طوطی شناخته می‌شود و در سایر پرندگان به نام اورنیتوز نامیده می‌شود. میکروب *کلامیدوفیلا* یک ارگانیسم مشابه با باکتری‌های گرم منفی، کوکوئیدی داخل سلولی اجباری می‌باشد و تنها گونه‌ای از آن که منجر به ایجاد بیماری در پرندگان می‌شود، *کلامیدوفیلا پسیتاسی* است. همانطور که از نام این گونه برمی‌آید عامل اصلی انتقال آن پرندگان آلوده از خانواده طوطی سانان می‌باشند و در مرحله بعد پرندگانی چون بوقلمون، اردک، کبوتر و سایر پرندگان می‌توانند باشند. پرندگان مبتلا ممکن است فاقد علائم بالینی باشند و صرفا به عنوان ناقل بیماری، این میکروب را در محیط دفع نمایند. دفع این ارگانیسم در پرنده بیمار حالت دوره‌ای دارد و پرنده مبتلا به صورت دائمی‌این ارگانیسم را دفع نمی‌کند. عوامل استرس‌زا چون حمل و نقل، غذای با کیفیت پایین، سرماخوردگی، تولید مثل می‌تواند میزان دفع را افزایش دهد. حساسیت پرندگان جوان نسبت به این بیماری بیشتر است (۲). علائم بالینی متفاوت بوده و به شدت بیماری و سن پرنده بستگی دارد. بیشترین علائم بالینی در پرندگان خانگی شامل کاهش وزن، کاهش اشتها، اسهال زرد یا سبزرنگ، سینوزیت و درگیری‌های تنفسی است. دوره نهفته بیماری در پرندگان مبتلا با میزان توان بیماریزائی در انواع *کلامیدوفیلا پسیتاسی* درگونه‌های مختلف میزبان متفاوت است و می‌تواند ۳ روز، چند هفته و یا حتی بیشتر به طول بیانجامد. میکروب *کلامیدوفیلا* قادر است که منجر به بروز بیماری در انسان هم شود، به خصوص در افرادی که با پرندگان آلوده چون طوطی در تماس می‌باشند و یا افرادی که در مزارع پرورش طیور و کشتارگاه طیور فعالیت می نمایند. علائم بالینی در انسان چیزی شبیه به علائم آنفلوآنزا است شامل تب، سر درد و درد عضلانی و آبریزش بینی و علائم تنفسی می‌باشد. دوره نهفته بیماری در انسان معمولا ۱۴–۵ روز است که موارد بیشتر از آن هم دیده شده است (۲). این بیماری تهدیدی برای سلامت عمومی محسوب شده و به ندرت در انسان خطر مرگ را به همراه دارد. آگاهی از خطرات بیماری، تشخیص و درمان آن در مراحل اولیه بسیار مهم است. انتقال بیماری زمانی رخ می‌دهد که یک پرنده یا یک شخص، مدفوع خشک شده و یا ترشحات مجاری تنفسی پرندگان بیمار را به صورت ذرات معلق در هوا استنشاق نماید. بطور کلی درمعرض قرار گرفتن باعوامل فوق و حتی وسائل آلوده می‌تواند منتهی به عفونت شود. با توجه به اینکه این بیماری در طوطی سانان شیوع بیشتری دارد و از بیماری‌های مشترک با انسان است و همچنین تمایل افراد جامعه به نگهداری از این پرندگان، تصمیم به بررسی جهت تعیین حضور احتمالی و میزان فراوانی میکروب *کلامیدوفیلا پسیتاسی* در تلفات و موارد مشکوک طوطی‌های شهر تهران گرفته شد، تا بدین طریق در جهت افزایش آگاهی گام مثبتی برداشته شده و دوستداران پرندگان زینتی با دانش بیشتری نسبت به نگهداری پرندگان زینتی در منازل اقدام نمایند.

## مواد وروش کار

در این بررسی تعداد ۲۳ نمونه سوآب مدفوعی (از موارد مشکوک) و ۷ نمونه سوآب کلوآک (از لاشه) از پرندگان خانواده طوطی سانان که واجد علائم تنفسی یا گوارشی بیماری در شهرتهران بودند، اخذ گردید.

نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. روش استخراج DNA در این بررسی با استفاده از فیلترهای سیلیکا و با استفاده از کیت Accuprep® (Bioneer, Korea) صورت گرفت. نمونه کنترل مثبت نیز از دانشکده بهداشت دانشگاه تهران دریافت شد و درعوض نمونه کنترل منفی از نمونه blank (فاقد DNA) استفاده شد. پس از استخراج DNA، مرحله اول PCR انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز براساس ژن 16SrRNA و با پرایمرهای اختصاصی جنس (Messmer, O.T., 1997) مطابق ذیل صورت پذیرفت (۶).

Chla/GeSp/St1/F: 5'- ACG GAA TAA TGA CTT CGG -3'
Chla/GeSp/St1/R: 5'- TAC CTG GTA CGC TCA ATT -3

چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ چرخه سه مرحله‌ای شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۰/۴ میکرومول از پرایمرهای مذکور، ۱ واحد Taq DNA Polymerase (شرکت سیناژن) و ۱ میکرولیتر DNA انجام گرفت. طول محصول PCR مرحله اول ۴۳۶bp بود. مرحله دوم (Nested)PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس که در آزمایشگاه به صورت زیرطراحی شد، انجام پذیرفت.

Chla/GeSp/St2/F: 5'- CGA CCG CTA ATA CCG AAT GT -3'
Chla/GeSp/St2/R: 5'- GTG CTT TAC AAC CCT AGA GC -3'

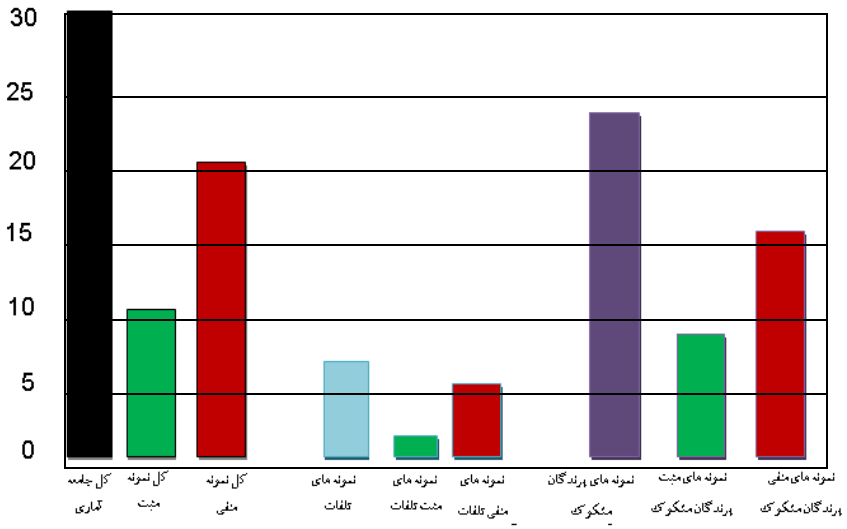
با اضافه نمودن ۲ میکرولیتر از محصولات PCR اول به تیوب‌های جدید انجام شد و مجددا تا ۳۰ چرخه انجام گرفت، سایر شرایط PCR مرحله دوم مشابه PCR مرحله اول بود. در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول PCR دوم روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد و سپس با استفاده از دستگاه UV Transilluminator بررسی شد تا کیفیت و طول قطعه تکثیر شده مورد ارزیابی قرار گیرد. طول باند محصول PCR مرحله دوم ۳۰۰bp بوده است.

## نتایج

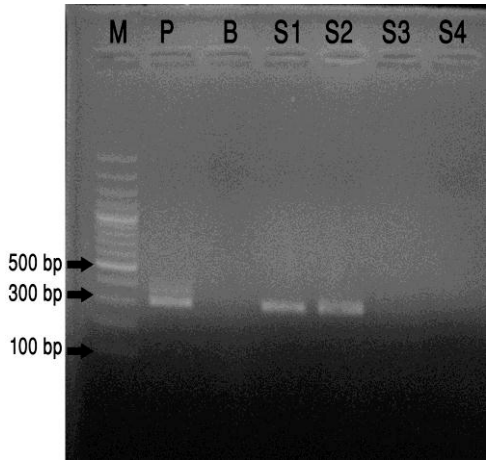
با بررسی طول باند ایجاد شده در ژل آگارز پس از الکتروفورز، از بین ۳۰ نمونه مورد آزمایش، تعداد ۱۰ نمونه مثبت (۳۳/۳٪) با ایجاد باند ۳۰۰bp در مرحله دوم PCR رویت شد که از این بین هشت نمونه مربوط به کاسکو (طوطی خاکستری آفریقایی)، یک نمونه مربوط به طوطی قرمز و یک نمونه مربوط به شاه طوطی می‌باشد (جدول-۱).

**جدول-۱- اطلاعات مربوط به نمونه‌های ارزیابی شده مثبت**

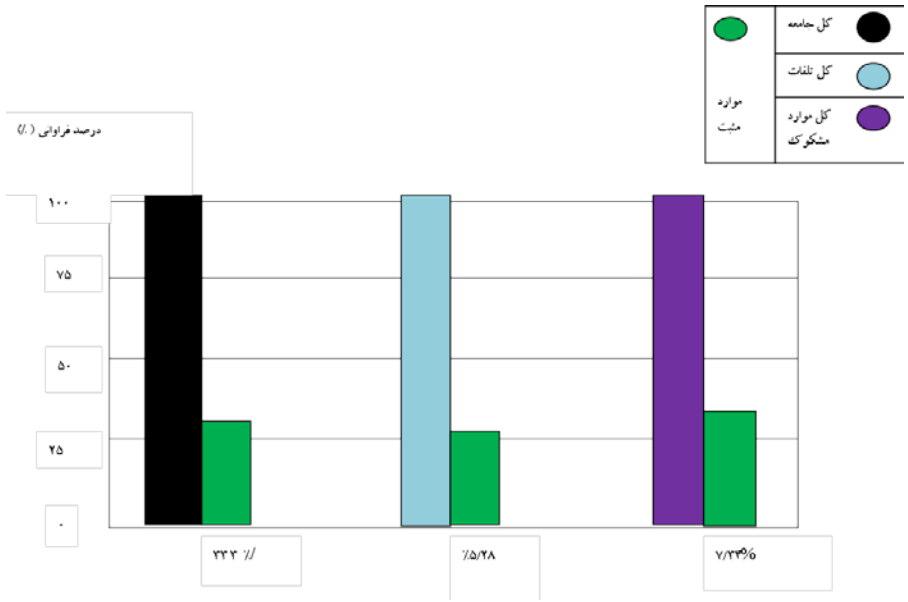
| شماره | نوع طوطی | تاریخ اخذ | محل اخذ | علائم بالینی | روش نمونه‌گیری | نتایج |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | کاسکو (لاشه) | ۸۷/۵/۴ | کلینیک | اسهال کز کردگی | سواب کلواک | مثبت |
| ۲ | طوطی قرمز(لاشه) | ۸۷/۳/۹ | کلینیک | اسهال و تورم سینوس زیرچشم | سواب کلواک | مثبت |
| ۳ | کاسکو | ۸۸/۲/۲۱ | کلینیک | تورم چشم | سواب مدفوعی | مثبت |
| ۴ | شاه طوطی | ۸۸/۳/۹ | کلینیک | اسهال و آبریزش چشم | سواب مدفوعی | مثبت |
| ۵ | کاسکو | ۸۸/۳/۹ | کلینیک | اسهال | سواب مدفوعی | مثبت |
| ۶ | کاسکو | ۸۸/۴/۷ | کلینیک | بی اشتهایی و اسهال | سواب مدفوعی | مثبت |
| ۷ | کاسکو | ۸۸/۲/۲۷ | کلینیک | خس خس، تورم چشم و سینوس | سواب مدفوعی | مثبت |
| ۸ | کاسکو | ۸۸/۵/۲۲ | کلینیک | اسهال و کزکردگی | سواب مدفوعی | مثبت |
| ۹ | کاسکو | ۸۷/۱۲/۲۰ | پارک | خس خس و اسهال | سواب مدفوعی | مثبت |
| ۱۰ | کاسکو | ۸۷/۱۲/۲۱ | پرنده فروشی | آبریزش از بینی | سواب مدفوعی | مثبت |




**نمودار-۱- موارد تفکیک شده مثبت و منفی در تلفات و موارد مشکوک به صورت مجزا در مطالعه حاضر**




**شکل-۱- رویت موارد مثبت با ایجاد باند ۳۰۰ bp درالکتروفورز محصولات حاصل از روش Nested PCR**




**نمودار-۲- درصد فراوانی نمونه های مثبت به صورت تفکیکی در کل جامعه آماری، تلفات و نمونه های مشکوک**

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی بیانگر این موضوع می‌باشد که آلودگی با میکروب *کلامیدوفیلا پسیتاسی* در تلفات و موارد مشکوک واجد علائم تنفسی یا گوارشی طوطی‌های شهر تهران وجود دارد. در بین موارد مثبت اسهال عمده ترین نشانه بالینی می باشدکه در ۹ مورد از نمونه‌های مثبت وجود داشت.

در مطالعه‌ای در استان خوزستان توسط دکتر میاحی و قربانپور که به بررسی سرمی بیماری کلامیدیوز در بوقلمون‌های استان خوزستان در سال۱۳۸۶ پرداخته شد، نتایج بیانگر وجود ۵۸/۹٪ نمونه مثبت از میان ۲۷۰ نمونه مورد آزمایش بود (۱). Heddema و همکاران مطالعه‌ای بر روی شیوع *کلامیدیا* در نمونه‌های مدفوعی از کبوترهای وحشی و با آزمون PCR انجام دادند و در این بررسی تعداد ۳۳۱ نمونه مدفوعی گرفته شد که تعداد ۱۶۰ نمونه قبل از فصل تولیدمثل و ۱۷۱ نمونه در طول این دوره اخذ گردید و نتایج نشان داد که در بین ۱۶۰ نمونه قبل از فصل تولیدمثل ۸ مورد (۵٪) و در بین ۱۷۱ نمونه دوره تولیدمثلی ۱۸ مورد (۱۰٪) از نمونه‌ها مثبت بودند که این امر نشاندهنده تأثیر دو برابری فصل تولیدمثل بر روی افزایش دفع *کلامیدیا* می‌باشد (۵). Celebi و همکاران تعداد ۹۶ نمونه مدفوعی از پرندگان زینتی و بصورت تصادفی از پرنده فروشی‌ها و منازل تهیه کردند و DNA آنرا استخراج نموده و به داخل تخم مرغ جنین دار ۶ روزه تلقیح کردند. پس از ۳ روز با استفاده از روش PCR، روش رنگ آمیزی گیمنز (MGS) و فلوئورسنت آنتی بادی (FA) به مطالعه نمونه‌ها پرداختند. در روش PCR، ۳۳ نمونه (۳۴/۴٪) و در روش MGS، ۲۱ نمونه (۲۱/۹٪) و در روش FA، ۲۹ نمونه (۳۰/۲٪) مثبت شدند. این تحقیق بیانگر توانمندی بالاتر آزمون PCR در ردیابی حضور آلودگی در نمونه‌های آزمایشگاهی بدست آمده بود (۴). Schwarzova و همکاران از بین ۹۱ نمونه سواب کلواک و حلقی از ۳۰ گونه مختلف پرندگان مهاجر، با بررسی آزمون PCR، *کلامیدوفیلا پسیتاسی* را فقط از سوآب های کلواک در ۶ پرنده (۱۶/۶٪) از ۴ گونه مختلف جدا نمودند و تحقیق فوق موفقیت بالاتر سوآب‌های کلواک را در مقایسه با نمونه‌های اخذ شده

از حلق در ردیابی حضور *کلامیدوفیلا پسیتاسی* نشان داد که در تحقیق حاضر مد نظر قرار گرفت (۱۰). Sareyyupoglu و همکاران از بین ۴۷ نمونه مدفوعی از پرندگان داخل قفس از ۴ مکان مختلف نگهداری پرندگان که در تاریخچه این پرندگان علائم تنفسی شدید تا خفیف به همراه اسهال وجود داشت با استفاده از آزمون PCR، ۴۳ مورد (۹۱/۵%) کلامیدیوز مثبت شناسایی کردند (۹). Muluping و همکاران در کشور فیلیپین مطالعه‌ای روی جداسازی آنتی بادی‌های *کلامیدوفیلا پسیتاسی* در یکی از پارک‌های شهر کوئینزن انجام دادند که از ۳۶ پرنده از گونه‌های مختلف با استفاده از آزمون الایزا در ۹ نمونه (۲۵٪) از نظر سرمی مثبت بودند (۷). Bougerol و همکاران نیز در مطالعه‌ای در فرانسه از ۱۷۴ قطعه پرنده دست‌آموزی که عمدتاً از طوطی سانان بودند، ۱۱۵مورد (۷۱/۸۳٪) را با آزمایشات سرمی و جستجوی آنتی ژن، آلوده تشخیص دادند (۳). Raso و همکاران شیوع *کلامیدوفیلا پسیتاسی* را در ۹۵ نمونه سوآب کلواک از سه گروه طوطی‌های آمازون (A, B, C) با روش ایمونوفلورسانس بررسی نمودندکه نتایج مثبت به ترتیب شامل ۱۶/۷٪، ۲۲/۲٪ و ۵۶/۱٪ بود (۸).

هر چند که نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر با توجه به نتایج تحقیقات دیگر انجام شده در سایر نقاط دنیا قابل تصور می‌باشد، اما بیانگر اهمیت دقت نظر بیشتر در مورد این عامل بیماریزا، برای سلامت عمومی جامعه خصوصاً در بین افرادی که با این پرندگان در تماس بیشتری قرار دارند است و از آنجائی‌که پرندگان قفسی خصوصاً طوطی سانان آلوده، عمده‌ترین عامل انتقال بیماری به انسان می‌باشند در نتیجه لزوم وضع و اجرای یک برنامه هدفمند در جهت جلوگیری از شیوع بیماری احساس می‌شود. نظارت بیشتر در جلوگیری از ورود غیرقانونی پرندگان از سایر کشورها و اجرای یک قرنطینه صحیح و درمان قبل از انتقال پرندگان مشکوک به مراکز خرید و فروش، یقیناً مناسب‌ترین راه در جهت پیشگیری از شیوع آلودگی در بین پرندگان و افراد جامعه است.آگاهی‌رسانی همگانی در ارتباط با خطرات و بیماری‌هایی که از طریق پرندگان می‌تواند ایجاد شود و ایجاد مراکز خرید و فروش معتبر تحت نظارت سازمان دامپزشکی کشور نیز یکی دیگر از راهکارهائی است که می‌تواند در اجرای این برنامه هدفمند یاری کننده باشد.همچنین انجام تحقیقی بر روی جمعیت پرندگان مورد نگهداری در منازل چه واجد علامت بیماری و چه فاقد آن با تعداد نمونه‌ها و گونه‌های بیشتری از پرندگان به منظور ارزیابی فراوانی *کلامیدوفیلا پسیتاسی* و برآورد دقیق‌تری از مخاطرات بهداشتی عقلانی به نظر می‌رسد.

## منابع


۱- قربانپور، م.، میاحی، م. (۱۳۸۶). بررسی سرم‌شناسی کلامیدیوز در بوقلمون‌های استان خوزستان. *مجله تحقیقات دامپزشکی*، جلد ۶۳، شماره ۱، صفحات ۶۱-۵۹.

2. Andersen, A.A., Vanrompay, D. (2008). *Avian chlamydiosis* (psittacosis, ornithosis). *In: Diseases of Poultry*, 12th edition. Saif, Y.M., Iowa State University Press, Chapter 24: 971-86.
3. Bougerol, C., Peirano, V., Matics, N. (1997). *Chlamydia psittaci* infection in pet birds: A serological and antigenic study of a sample of birds. *Recueil de Medicine Veterinaire* **173**: 43-8.
4. Celebi, B.S., Ak, S. (2006). A comparative study of detecting *Chlamydophila psittaci* in pet birds using isolation in embryonated egg and

polymerase chain reaction. *Avian Disease* **50**: 489-93.

5. Heddema, E.R., Ter Sluis, S., Buys, J.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Van Wijnen, J.H., Visser, C.E. (2006). Prevalence of *Chlamydophila psittaci* in fecal droppings from feral pigeons in Amsterdam, The Netherlands. *Applied and Environmentl Microbiology*, **72**: 4423-5.
6. Messmer, O.T., Skelton, S.K., Moroney, J.F., Daugharty, H., Fields, B.S. (1997). Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 2043-6.
7. Muluping, R.P., Oronan, R.B., Toledo, S.U. (2007). Detection of *Chlamydophila psittaci* antibodies from captive birds at the Ninoy Aquino parks and wildlife nature center, Quezon City, Philippines. *Annals of Agricultural and environmental Medicine* **14**:191-3.
8. Raso T.de.F., Junior, A.B., Pinto, A.A. (2002). Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive Amazon parrots in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **33**: 118-21.
9. Sareyyupoglu, B., Cantekin, Z., Bas, B. (2007). *Chlamydophila psittaci* DNA detection in the faeces of cage birds. *Zoonoses Public Health* **54**: 237-42.
10. Schwarzova, K., Betakova, T., Nemeth, J., Mizakova, A. (2006). Detection of *Borrelia burgdorferi sensulato* and *Clamydophila psittaci* in throat and cloacal swabs from birds migrating through Slovakia. *Folia Microbiol (Praha)* **51**: 653-8.

*Journal of Veterinary Microbiology, Volume 8, Issue 1, 2012*

# Molecular Detection of *Chlamydophila Psittaci* among Dead and Suspected Cases of Parrots in Tehran

***Shariatnejhad, M.[1], Haghbin Nazarpak, H.[2]*, Sheikhi, N.[3]***

*1-Graduate of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran*
*2-Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran*
*3-Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

*Received Date: 14 Jan 2012* *Accepted Date: 5 May 2012*

***Abstract:*** *Chlamydophila is an organism similar to geram negative and interacellular bacteria that is classified in Chlamydiacae family. Various types of Chlamydophila exist in this family that can infect their hosts. The species that infects birds is Chlamydophila psittaci. It can cause diseases in humans. The disease is transmitted via touching or secretions and the infected objects of infected birds, especially psittacine birds. The purpose of this research is the Molecular detection of Chlamydophila psittaci among dead and suspected cases of psittacine birds in Tehran. In this study, 23 excrement swabs of suspicious parrots and 7 cloacal swabs of dead but suspicious to the existence of Chlamydophila were investigated. The samples were kept in -20 C degrees up to the extraction time. The method of DNA extraction was performed by Celica filters, and then was examined by using Nested PCR Method based on 16SrRNA genom of chlamydophila. The findings obtained from 10 positive cases among 30 tested samples. The results showed the importance of giving more information to the psittacine birds' keepers about Chlamydophila in order to have healthy parrots and to prevent their keepers from the disease.*

***Keywords:*** *Chlamydophila psittaci, psittacine birds, Nested PCR, Tehran*

**Corresponding author: Haghbin Nazarpak, H.*
*Address: Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University. Tel: 09111230487*
*Email: hhaghbinnazarpak@iau-garmsar.ac.ir*