

شناسایی مولکولی عفونت کلامیدیا پسی تاسی در کبوترهای شهر ساری

ماهان مهدوی سعیدی^۱، سعید شاطری^{۲*}

^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

^{۲*} استادیار گروه علوم درمانگاهی دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

چکیده

کلامیدیا پسی تاسی (*Chlamydia psittaci*) یک باکتری گرم منفی، داخل سلولی اجباری است که سبب بیماری در پرندگان و انسان می شود. بیماری می تواند بصورت حاد، مزمن و یا بدون علامت باشد. این باکتری می تواند در بدن بیمار بدون هیچ علامت آشکاری برای مدتهای طولانی باقی بماند و از طریق تنفسی، تماس مستقیم و یا مدفوع خشک منتقل شود و این تهدیدی برای سلامت جامعه است. در این پژوهش ۷۳ نمونه مدفوعی از گونه های مختلف کبوتران (با و بدون علائم بالینی) در شهر ساری در میکروتیوب های استریل در سال ۱۴۰۲ جمع آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس با روش PCR ژن omp A (پروتئین غشای خارجی) از 16sRNA توسط پرایمرهای اختصاصی کلامیدیا پسی تاسی مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد ۱۵ نمونه از ۷۳ نمونه گرفته شده (۲۰/۵۴٪) مثبت بودند. با توجه به زئونوز بودن بیماری اقدامات بهداشتی جهت پیشگیری از بیماری در انسان و پرندگان ضروریست.

واژه های کلیدی: کبوتر، کلامیدیا پسی تاسی، شناسایی مولکولی.

۱- مقدمه

کلامیدیا پسی تاسی (*Chlamydia psittaci*) یک باکتری گرم منفی و داخل سلولی اجباری است که دارای دیواره سلولی ناقص و بدون پپتیدوگلیکان و دارای یک ژنوم کوچک با حدود ۱۰۰۰ ژن است (Borel et al., 2018). دارای چندین سروتیپ است که می‌توانند عفونت‌های مختلفی را در انواع مختلفی از میزبان‌ها ایجاد کنند (Laroucau et al., 2020). باکتری کلامیدیا پسی تاسی یا کلامیدیوفیلا پسی تاسی یکی از عوامل بیماری‌زای مهم در پرندگان و انسان‌ها است و به طور ویژه در پرندگان و طیور یافت می‌شود. (Stokes et al., 2020). پسیتاکوزیس یک بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام است (Hogerwerf et al., 2017). دوره نهفته بیماری در انسان ۵ تا ۱۴ روز است (House & Bailey, 2024). عفونت با این باکتری در انسان می‌تواند با علائمی شبیه به عفونت‌های تنفسی، تب، سرفه، تنگی نفس و التهاب شدید ریه همراه باشد (Knittler & Sachse, 2015). پسیتاکوز در انسان علائمی مشابه آنفلانزا دارد که می‌تواند منجر به ذات‌الریه و اندوکاردیت، میوکاردیت، مننژیت و ورم ملتحمه ایجاد کند (House & Bailey, 2024). در مطالعه Branley و همکاران بیان کردند که *C. psittaci* یک گونه مشترک بین انسان و دام است که باعث عفونت و ایجاد یک بیماری شدید در انسان به نام پسیتاکوز شود که می‌تواند در ۸۳٪ موارد منجر به ذات‌الریه و در صورت عدم درمان مرگ و میر قابل توجهی شود. از طرفی این بیماری در بین کارگران کارخانه‌های فرآوری طیور، دامپزشکان و فروشندگان پرندگان نیز گزارش شده است (Branley et al., 2014). از آنجایی که تمامی بیماران مبتلا به پسیتاکوز تاریخچه‌ای مبنی بر ارتباط با پرندگان ندارند، کلامیدیا پسیتاسی باید در بیماران دارای علائم بالینی مشکوک به پسیتاکوز مورد توجه قرار بگیرد (Knittler & Sachse, 2015). علاوه بر انتقال از طریق تماس مستقیم انسان با پرندگان به ویژه اگر پرندگان بیمار باشند یا به تازگی خریداری شده باشند، همچنین می‌تواند از طریق تماس محیطی غیر مستقیم نیز آلوده شود (House & Bailey, 2024). دامپزشکان، کارگران پرندگان فروشی‌ها، پرورش دهندگان طوطی‌سانان در معرض ابتلا به این بیماری هستند و عفونت‌های تحت بالینی و یا علامت‌دار و شبه آنفلانزا در این افراد ایجاد می‌شود (Knittler & Sachse, 2015). پیشگیری از عفونت با *C. psittaci* شامل اقدامات بهداشتی مانند استفاده از وسایل محافظتی در تماس با طیور آلوده و بهبود شرایط بهداشتی در محیط‌هایی که با طیور و پرندگان در ارتباط هستند، می‌شود (House & Bailey, 2024).

پرندگان مبتلا می‌توانند بدون علامت باشند. با این حال، علائم بالینی رایج عبارتند از کاهش وزن، اسهال، بی‌اشتهایی، پلی‌وری، علائم تنفسی (تنگی نفس)، ورم ملتحمه، هایپرترمی، دفع غیر طبیعی، کاهش تولید تخمک و مرگ ناگهانی است (Vanrompay, 2020). در مطالعه‌ای در استرالیا از هر ۳ پرنده‌ای که در بیمارستان حیوانات آزمایش شده بودند، یک پرنده به کلامیدیا مبتلا بودند (Jelocnik, 2019). Muroi و همکاران اولین تشخیص شیوع کلامیدیوز در پرندگان پسیتاسین را در یک فروشگاه حیوانات خانگی در ایتالیا گزارش کردند که شش پرنده از هفت پرنده (۸۵٪) از نظر ژنوتیپ بر اساس ژن A غشای خارجی (ompA) اختصاصی سویه‌های *C. psittaci* مثبت بودند (Muroi et al., 2022). در کبوتر و دیگر پرندگان مبتلا به عفونت مزمن، افزایش اندازه کبد و طحال ممکن است به پارگی آنها انجامد و جراحات فیبری حاد در کیسه‌های هوایی، ممکن است به جراحات گرانولوماتوز منتهی گردد. تغییرات پرولیفراتیو و نکروتیک در اندام‌های درگیر، به همراه التهاب نای (تراکئیت)، ذات‌الریه (پنومونی) و نکروزهای کانونی در کبد را تشکیل می‌دهند (Beeckman et al., 2009).

C. psittaci یک بیماری زئونوز با هشت سرووار و نه ژنوتیپ (A تا F و E/B در پرندگان) است. از ۴۶۷ گونه پرندگان و ۳۰ راسته شناسایی شده است. ژنوتیپ A و F عمده‌تاً از طوطی‌های آلوده، کاکادوها، طوطی‌ها، ژنوتیپ B در کبوتر و ژنوتیپ‌های C و D به ترتیب در اردک‌ها و بوقلمون‌ها شناسایی می‌شوند (Radomski et al., 2016). ژنوتیپ E از طیف وسیعی از پرندگان از جمله بوقلمون، اردک، کبوتر، شترمرغ جدا شده است، به طور مشابه، ژنوتیپ E/B با اردک، کبوتر و طوطی خاکستری مرتبط است (Golestani et al., 2020). اخیراً کلامیدیا آویوم به عنوان عضو جدیدی از این خانواده شناخته شده

بود که باعث بیماری تنفسی و اسهال در کبوتر می شود (Burt et al., 2018). همه ژنوتیپ های *C. psittaci* می توانند به انسان یا سایر پستانداران منتقل شوند و باعث پسیتاکوزیس شوند. از طریق تماس مستقیم با استنشاق آئروسل آلوده، ترشحات چشم، گرد و غبار پر، مدفوع حیوان آلوده و توسط پرندگانی که ناقلان بدون علامت هستند، انتشار یابند (Andersen & Franson, 2007).

شیوع *C. psittaci* در ۱۱ کشور اروپایی مانند سوئیس، اسلونی، اسپانیا، ایتالیا، آلمان، فرانسه، بلغارستان، کرواسی، بوسنی و هرزگوین با میزان آلودگی ۴۶ درصد می باشد (Magnino et al., 2009). در ایران این باکتری در کبوتران در استانهای چهارمهرال و بختیاری و تهران با درصد آلودگی به ترتیب ۳۳/۱۴ و ۵۰ گزارش شد (Golestani et al., 2020; Magnino et al., 2020). بیماری های مشترک انسان و دام همواره یکی از چالش های بهداشتی و بهره وری اقتصادی جوامع بوده اند. این بیماری ها باعث افت طراحی سیستم های بهداشتی و کشاورزی وارداتی در سراسر جهان شده و تأثیر مستقیم بر سلامت انسان و دام دارند. از آنجا که کبوتران به عنوان یکی از میزبانان این باکتری هستند، شناسایی مولکولی کلامیدیا پسی تاسی در فضولات این پرندگان از اهمیت بالایی برخوردار است (House & Bailey, 2024). در این تحقیق، با استفاده از تکنیک های مولکولی، این باکتری در فضولات کبوتران شهرستان ساری شناسایی شد.

۲- روش کار

نمونه گیری: تعداد ۷۳ نمونه مدفوعی از گونه های مختلف کبوترهای ساری (سطح شهر و پرند فروشی ها و کبوترهای خانگی) بدون توجه به علائم، در سال ۱۴۰۲ جمع آوری شدند. برای جمع آوری نمونه مدفوع (۱۰۰mg)، از میکروتیوب های استریل استفاده شد. نمونه ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

روش استفاده از کیت Viragene

۱۰۰ Mg- نمونه مدفوع کبوتر به یک میکروتیوب ۲ml استریل انتقال داده و به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. ۴۰۰ µl از Lysis Buffer را با نمونه به خوبی مخلوط شد. ۲۰۰ µl آنزیم Proteinase K اضافه و Vortex Spin شده و سپس به مدت یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در طول مدت زمان انکوباسیون هر ۱۵ دقیقه میکروتیوب را Vortex و Spin شد. میکروتیوب را به مدت پنج دقیقه با دور ۱۲۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت را به آرامی و با دقت به یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل جدید منتقل شد. ۲۰۰ µl از محلول Binding Buffer به آن افزوده و به خوبی مخلوط شد، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. ۱۰۰ µl ایزوپروپانول اضافه کرده و به خوبی پیپتاژ گردید.

ستون را دخیل کالکشن قرار داده و محتویات میکروتیوب را به آرامی به ستون پیپت شد. ستون کالکشن را به مدت یک دقیقه با دور ۱۲۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ کرده و سپس محتویات داخل کالکشن را دور ریخته شد. در صورتی که حجم نمونه بیش از ۷۰۰ µl باشد، محتویات را مجدداً داخل ستون ریخته و سانتریفیوژ شد تا تمامی حجم نمونه مورد استفاده قرار گیرد.

۵۰۰ µl محلول Wash Solution را به آرامی و به صورت دورانی به ستون اضافه کرده و سپس به مدت یک دقیقه با دور ۱۲۰۰ rpm در دمای محیط سانتریفیوژ شد، پس از آن محتویات داخل کالکشن را دور ریخته و ستون را مجدداً داخل کالکشن قرار داده و مرحله قبل مجدداً تکرار شد. ستون کالکشن به مدت سه دقیقه و با دور ۱۲۰۰ rpm در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. کالکشن را دور ریخته و ستون استخراج را داخل میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار داده شد.

۱۰۰ ml از محلول Elution Buffer که در ابتدا در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید، به مرکز ستون اضافه کرده، درب آن را بسته و به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد و سپس به مدت یک دقیقه با دور 12000 rpm در دمای محیط سانتریفیوژ شد.

پرایمرهای مورد استفاده: در واکنش PCR مربوط به ژن مورد نظر، از دو جهت آغازگر اختصاصی مناسب جهت تکثیر ژن استفاده شد. آغازگرها توسط شرکت Bioneer کره جنوبی، سنتز شدند. ابتدا توالی ژن در سایت NCBI تعیین و سپس توالی آغازگرها با استفاده از نرم افزار Gen Runner، ردیف و سپس پرایمرهای طراحی شده BLAST گردید. پرایمرها در ابتدا به صورت لیوفیلیزه بوده که بر حسب مقدار در دستورالعمل پرایمر برای غلظت 100 پیکومول، آب مقطر استریل اضافه شد که برای انجام PCR از آنها غلظت ۱۰ پیکومول تهیه شد و این پرایمرها جهت استفاده در فریزر ۲۰- قرار گرفتند. یک محصول PCR ترادف سنجی شده و این توالی با توالی موجود در بانک ژنی همتراز یا بلست شده که در صورت مشابهت بالا به عنوان کنترل مثبت در PCR بعدی مورد استفاده قرار گرفت. در مخلوط واکنش PCR از آب به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول ۱- ژن هدف و پرایمرهای استفاده شده

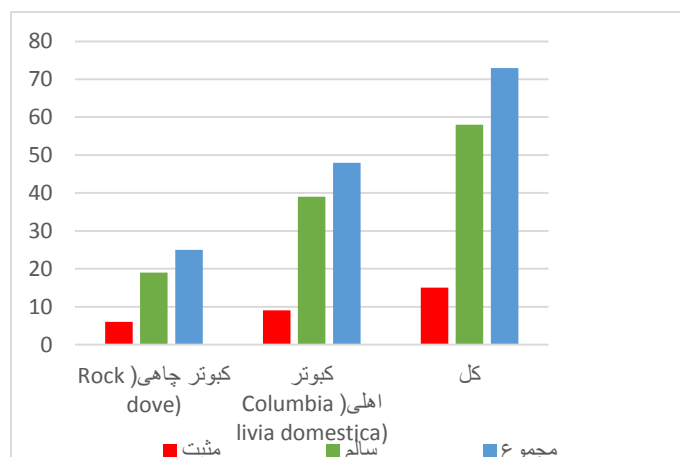
اندازه باند (bp)	توالی پرایمر (5'-3')	نام پرایمر	ژن هدف	اختصاصیت
436 bp	ACG GAA TAA TGA CTT CGG	Sense	16S rRNA	اختصاصی جنس
	TAC CTG GTA CGC TCA AAT	Antisense		
127 bp	ATA ATG ACT TCG GTT GTT AIT	C. p sense	16S rRNA	اختصاصی گونه
	TGT TTT AGA TGC CTA AAC AT	C. p antisense		

بررسی مقدار و کیفیت DNA: برای بررسی کیفیت DNA از دستگاه نانو دراپ استفاده شد و با توجه به جذب نوری نمونه در طول موج های مختلف و همچنین نسبت طول موج ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر میزان و درجه خلوص DNA محاسبه شد. اگر نسبت طول موج ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر حدود ۱/۸ تا ۲ باشد نشان دهنده خلوص خوب نمونه می باشد و کمتر بودن این نسبت از ۲ نشان می دهد DNA استخراج شده دارای پروتئین می باشد و همچنین بیشتر بودن این نسبت از ۲ نشان می دهد حاوی RNA زیاد می باشد و لذا در چنین مواردی DNA مجدداً استخراج می شد.

الکتروفورز: بعد از تهیه ژل آگارز با درصد مورد نیاز، ظرف حاوی ژل در تانک الکتروفورز قرار شد و بافر TBE1x به تانک اضافه شد. سپس به هر چاهک، ۷ میکرولیتر محصول PCR اضافه شد. در یک چاهک به میزان 2/5 میکرولیتر از مارکر ریخته شد. سپس به مدت ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۸۰ ولت و در دمای آزمایشگاه به جریان برق مستقیم متصل شد. چاهکها از سمت قطب منفی به سمت قطب مثبت بود. بعد از اتمام الکتروفورز ژل خارج شده و با استفاده از دستگاه ژل باند DNA مورد بررسی قرار گرفت (Muroni et al., 2022).

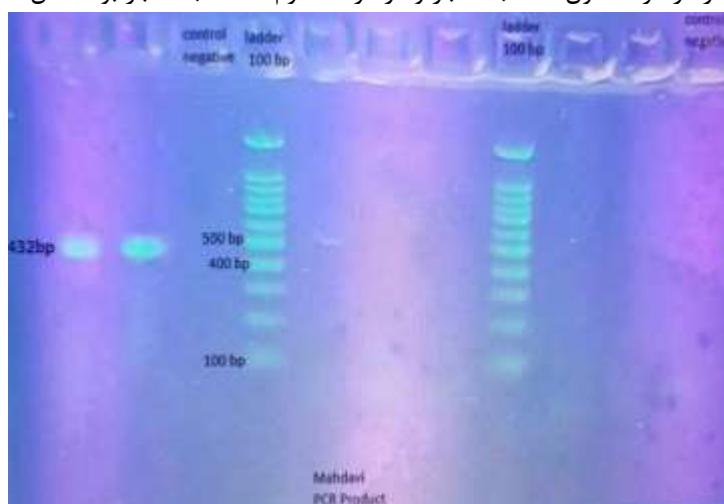
۳- یافته های تحقیق

در این مطالعه تعداد ۷۳ نمونه مدفوعی از گونه های مختلف کبوتر سطح شهر و پرند فروشی های شهرستان ساری برای وجود کلامیدیوز بر اساس روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. ۱۵ نمونه از ۷۳ کبوتر تست شده (۲۰/۵۴ درصد) با استفاده از پرایمرهای مورد استفاده برای ژن، 16S rRNA مثبت گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱- درصد فراوانی نمونه های مبتلا و سالم

نتایج بررسی کیفیت DNA/ استخراج شده توسط ژل آگارز ۱٪ (الکتروفورز افقی): DNA نمونه های مدفوع با استفاده از کیت DNP ساخت شرکت سیناکلون ایران، مطابق با دستورالعمل کارخانه سازنده، جداسازی و غلظت آن توسط اسپکتروفتومتری با جذب نور ماورای بنفش در طول موج های ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد، که نمونه های با خلوص مناسب که نسبت جذب نوری حدود ۱/۸ داشتند، مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور بررسی کیفیت DNA استخراج شده، از روش الکتروفورز افقی استفاده گردید. بعد از بررسی کیفیت DNA استخراج شده، تشخیص کلامیدیا پسی تاسی به وسیله PCR و بر اساس ژن های 16S rRNA و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PCR ژن omp A (پروتئین غشای خارجی) جنس کلامیدیا صورت گرفت. محصولات PCR در ژل آگاروز ۲ درصد و در کنار کنترل های منفی و مثبت و شاخص اندازه گیری DNA الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و در معرض UV با دستگاه ژل مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه باند مورد انتظار در مرحله اول ۴۳۶ جفت باز و در مرحله دوم، ۱۲۷ جفت باز بود (شکل ۱).



شکل ۱- محصول PCR روی ژل الکتروفورز

۶- بحث و نتیجه گیری

کلامیدوز پرندگان یک بیماری عفونی، سیستمیک و مشترک بین انسان و طوطی سانان، پرندگان وحشی و اهلی است. این بیماری به دلیل علاقه انسان به پرندگان و اهمیت سلامت عمومی در بسیاری از کشورها گزارش شده است. کلامیدیا پسی تاسی، یکی از مستندترین گونه های کلامیدیا که مشترک بین انسان و دام بوده و پرندگان میزبان اصلی آن هستند (House & Bailey, 2024).

در این تحقیق مجموعاً ۷۳ نمونه مدفوعی از گونه های مختلف کبوتران در شهر ساری مورد بررسی قرار گرفتند. که از این میان ۱۵ نمونه (۲۰.۵۴٪) از ۷۳ مدفوع کبوتر های تست شده با استفاده از پرایمرهای مورد استفاده برای ژن، *16S rRNA* مثبت شدند. در این مطالعه توجهی به علائم بالینی نشد و نمونه ها فارغ از داشتن یا نداشتن علائم بررسی شدند، با توجه به اینکه علی رغم عدم وجود علائم بالینی ۱۵ نمونه تست مثبت وجود داشته است، اهمیت این بیماری به عنوان یک بیماری زئونوز را نشان می دهد. Sariya و همکاران (*Chlamydophila psittaci* (*C. psittaci*) در کبوترهای بدون علامت را در مرکز تایلند بررسی کردند. ۱۰/۸ درصد از کبوترهای وحشی نمونه مثبت بودند (Magnino et al., 2015). در مطالعه ای که در لهستان توسط Piasecki و همکاران انجام شد میزان ابتلا ۳/۱۰٪ گزارش شد (Piasecki et al., 2012). در پژوهشی که روی ۹۵ طوطی آمازون در برزیل توسط Raso Freitas de و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام شد. با روش ایمونوفلورسانس مستقیم به طور میانگین در ۳ گروه C و B، A و C شیوع بیماری ۶/۳۱٪ و با آزمایش در نمونه های سرمی ۵/۸۲ درصد گزارش شد و در مقایسه با مطالعه ما کمتر است (de Freitas Raso et al., 2002). Ghorbanpoor و همکاران حضور کلامیدیا پستیاسی در سواب های حلقی جمع آوری شده از ۲۸۰ کبوترهای بدون علامت با روش PCR در فصول گرم و سرد در مناطق مختلف اهواز را با ۲ نمونه مثبت (۰.۷٪) گزارش نمودند که نسبت به مطالعه ما کمتر بود (Ghorbanpoor et al., 2015). Gartrella و همکاران در نیوزلند، از روش PCR برای تشخیص کلامیدیا پسی تاسی در گنجشکان بومی وحشی این کشور استفاده کردند. علاوه بر این، گونه های مختلف کلامیدیا را می توان با استفاده از آزمایش های هیبریداسیون ریزآرایه DNA متمایز کرد. ایمونوفلورسانس، ایمونوپراکسیداز و ایمونوهیستوشیمی به عنوان روش های رنگ آمیزی برای تشخیص آنتی ژن های کلامیدیا استفاده شده است مشخص شده است که آنتی بادی های مونوکلونال نسبت به برخی آنتی ژن های کلامیدیا به عنوان لیپوپلی ساکاریدها یا پروتئین اصلی غشای خارجی حساس تر از روش های تشخیص هیستوشیمیایی هستند (Gartrell et al., 2013).

محزونیه و همکاران تعداد ۳۰۰ نمونه مدفوع کبوتران شهرستان های مختلف استان چهارمهل و بختیاری جمع آوری نمودند و با واکنش PCR فراوانی کلامیدیا در این مطالعه ۳۳/۱۴ درصد گزارش گردید که نشان داد کلامیدیا پسی تاسی در میان کبوتران استان چهارمهل و بختیاری شایع است و نسبت به پژوهش ما بیشتر بود (Mahzounieh et al., 2020). در سال ۲۰۰۶، Heddema و همکاران در کشور هلند بررسی شیوع این باکتری را در کبوتران وحشی شهر آمستردام را انجام دادند. در نمونه برداری های انجام شده، به طور کلی *C. psittaci* در ۴/۹ درصد و *C. avium* در ۲۳/۸۱٪ نمونه های تلفیقی شناسایی شد (Heddema et al., 2006). Sheleby-Elías و همکاران از ۱۱۷ نمونه مدفوع از کبوترها در سن خوزه، کاستاریکا جمع آوری کردند. تنها ۴ نمونه از ۱۱۷ نمونه PCR مثبت (۳/۴٪) بودند و نمونه های مثبت بیشتر تحت تعیین توالی و ژنوتیپ قرار گرفتند. این مطالعه اولین گزارشی است که حضور این ارگانیسم را در کبوترهای کاستاریکا نشان می دهد (Sheleby-Elías et al., 2013). Smith و همکاران نیز نشان دادند برخی از گونه های پرندگان، به خصوص پرندگان مسن تر در طوطی سانان، ممکن است با وجود عفونت کلامیدیا بدون علامت تحت بالینی، ارگانیسم را برای مدت طولانی در ترشحات بینی و مدفوع انتشار دهند. شایان به ذکر است عوامل استرس زا مانند ازدحام بیش از حد، کمبود تغذیه، حمل و نقل و تغییرات دما و عواملی از این دست در دفع ارگانیسم تاثیر گذار است به طوری که این شرایط می تواند عفونت کلامیدیا متناوب تحت بالینی را به عفونت حاد تبدیل کنند. بنابراین این امکان نیز وجود دارد که میزان موارد مثبت، حتی بیش از میزان بدست آمده در این مطالعه باشد. علاوه بر این ممکن است میزان دفع ارگانیسم در طی عفونت، با شدت بیماری، میزان عفونت و وضعیت ایمنی میزبان متفاوت باشد (Smith et al., 2011). مطالعات نشان داد که تعداد نمونه های مثبت بیشتری از سواب های کلواکال که معمولاً برای تشخیص *C. psittaci* از پرندگان زنده استفاده می شوند، شناسایی شده اند (Ravichandran et al., 2021). در بررسی که Harkinezhad و همکاران در بلژیک روی ۳۵۹ نفر انجام دادند، شیوع باکتری در حدود ۲۲/۷ درصد برای افراد در ارتباط با پرندگان اعلام شده است که حدود ۵/۲۲ درصد افرادی که روزانه با پرندگان ارتباط داشتند، از نظر وجود DNA باکتری مثبت شده اند که اهمیت پرندگان و به خصوص کبوتر را از نظر سلامت

عمومی نشان می دهد. با توجه به مطالعات پیشین انجام شده و مقایسه با این تحقیق در کبوتران شهر ساری، نشان می دهد که شیوع این باکتری در کبوتران شهر ساری بالا است و می تواند خطری برای سلامت عمومی ایجاد کند (Harkinezhad et al., 2009). Golestani و همکاران ۲۷۰ نمونه سواب حلق به طور تصادفی از کبوترهای بدون علامت ۳۰ پرندگان کبوتر استان تهران جمع آوری شد. DNA با کیت اختصاصی استخراج و با پرایمرهای اختصاصی در اولین PCR و ژن پروتئین غشای خارجی (ompA) در PCR دوم تکثیر شد. نشان داد که ۱۶ قلاذه از ۳۰ پرنده کبوتر (۵۳٪) از نظر *Chlamydia spp* مثبت بودند. *C. psittaci* در ۵۰ درصد پرندگان کبوتر شناسایی شد که در استان تهران از میزان بالایی برخوردار است. با توجه به اینکه *C. psittaci* یک بیماری زئونوز و تهدید کننده حیات برای انسان است، این نتایج حاکی از اهمیت تشخیص آن در کبوترهای بدون علامت است (Golestani et al., 2020). Pal و همکاران در مطالعه نشان دادند که بیماری کلامیدوز یک بیماری مشترک بین انسان و طیور بوده و میزان مرگ و میر در بیماران درمان نشده می تواند ۱۰ تا ۲۰ درصد باشد و ضروری است که بیمار مبتلا به پنومونی آتیپیک و سابقه تماس با پرندگان از نظر عفونت *C. psittaci* بررسی شود (Pal, 2017).

روش های مبتنی بر PCR قبلاً توسط چندین محقق جهت شناسایی DNA در نمونه های مدفوعی و کلوآکی مورد استفاده قرار گرفته است نتایج به دست آمده از این مطالعه تایید می کند که آنالیز PCR به طور قابل توجهی حساسیت بیشتری نسبت به تست ایمونوفلورسانس مستقیم دارد. روش PCR می تواند یک تشخیص سریع، ایمن، حساس و خاص ارائه دهد. علاوه بر این، آزمایش های مبتنی بر اسید نوکلئیک می توانند ظرفیت ژنوتیپ سازی سویه را فراهم کنند (Sheleby-Elías et al., 2013; Harkinezhad et al., 2009).

نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر و مطالعات گذشته، نشان از شیوع بالای کلامیدیا پسی تاسی در جمعیت کبوتران شهر ساری است. البته در مطالعات پیشین موقعیت های جغرافیایی مختلف با اقلیم های متفاوت و نحوه نگهداری بررسی شد که در این مطالعه توجه چندانی به این مسئله نشد. در ضمن در تحقیق حاضر، نمونه گیری از پرندگانی انجام شد که توجهی به علایم بالینی آن ها نشد، طبیعی است که پرندگان مبتلا به شکل بالینی، آلودگی بالاتری نشان می دهند. همچنین از دیگر ضعف های مطالعه تنها اتکا به نمونه مدفوعی کبوتران بود و از سواب حلقی برای نمونه گیری استفاده ای نشد و اگر نمونه مدفوع منفی شود نمی توان با قطعیت حضور باکتری در آن پرند را رد کرد چون دفع باکتری از مدفوع مدام صورت نمی گیرد و ممکن است در زمان جمع آوری نمونه ژنوم باکتری دفع نشده اما کبوتر از مبتلایان باشد.

تماس مستقیم با پر، مدفوع خشک و بافت پرندگان آلوده مهمترین مسیر عفونت انسان را نشان می دهد. از آنجایی که *C. psittaci* بسیار مسری است، کارفرمایان باید اقدامات امنیتی را اجرا کنند و مفیدترین استراتژی را برای کاهش خطر انتقال اتخاذ کنند. به عنوان مثال، جداسازی واضح آب و غذا که می تواند وسیله ای برای انتقال عامل اتیولوژیک یا قرنطینه مناسب پرندگان بیمار و تازه معرفی شده باشد. پرندگان وارداتی باید تحت یک دوره قرنطینه و فقط سالم باشند. پرندگانی که از نظر *C. psittaci* توسط PCR و/یا آزمایشات سرولوژیکی منفی شدند، باید فروخته یا وارد شوند (Ravichandran et al., 2021). جداسازی پرندگانی که آزمایش آنها مثبت بود از پرندگانی که آزمایش آنها منفی بود یک اقدام کنترلی توصیه شده است (Balsamo et al., 2017). روشهای تایید شده توسط مقام ذیصلاح قرنطینه آنها باید ۲ ماه تمدید شود، در پایان این مدت باید دوباره آزمایش شوند. اگر مثبت بودن ادامه یابد، قرنطینه برای ۲ ماه دیگر تمدید می شود و باید درمان دیگری انجام شود. با این حال، این روش ها به طور معمول توسط صاحبان فروشگاه های حیوانات خانگی دنبال نمی شود و موارد مثبت در بین حیوانات خانگی مکرر است. این تحقیق با چندین محدودیت و نقطه ضعف مواجه بود. اولین محدودیت، تعداد کم نمونه های مدفوع بود. اگر تعداد نمونه ها بیشتر بود، می توانست نتایج دقیق تری به دست آورد. دومین محدودیت، عدم امکان انجام تست های تاییدی برای نمونه های مثبت بود. اگر از روش های دیگری مانند کشت باکتری یا تست سرولوژیک برای تایید

نتایج PCR استفاده می‌شد، اطمینان بیشتری از صحت تشخیص داشت. سومین محدودیت، عدم دسترسی به اطلاعات دقیق در مورد سن، جنس، وضعیت سلامتی و منشأ کبوتران بود. با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، این میزان آلودگی در کبوترهای شهر ساری و با توجه به ژئونوز بودن بیماری خطر ناک است. حضور گسترده کبوتر در مناطق شهری و روستایی و احتمال آلوده شدن افراد به خصوص دامپزشکان و کودکان، کلامیدیا پستیاسی از نظر بهداشت عمومی اهمیت بالایی دارد. بنابراین نیاز به آموزش عمومی نسبت به خطرات ابتلای افراد بیش از پیش احساس می‌شود. توصیه می‌شود که افراد حساس مانند کودکان، سالمندان، افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی و حتی افراد سالم تا آنجا که ممکن است از تماس نزدیک غیر ضروری با کبوتران خودداری کنند. دامپزشکان نیز به دلیل برخورد با پرندگان، احتمال وجود عامل بیماریزا در آنها بسیار بیشتر است، در تماس با پرندگان اصول حفاظتی را رعایت کنند. نویسندگان پیشنهاد می‌کنند که با توجه به ژنوتیپهای متفاوت باکتری، در مطالعات آتی، ژنوتیپهای خاص مناطق و همچنین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نیازمند مطالعات گسترده تری است.

منابع

- 1-Borel N, Polkinghorne A, Pospischil A. A review on chlamydial diseases in animals: still a challenge for pathologists?. *Veterinary pathology*. 2018 May;55(3):374-90.
- 2-Laroucau K, Ortega N, Vorimore F, Aaziz R, Mitura A, Szymanska-Czerwinska M, Cicerol M, Salinas J, Sachse K, Caro MR. Detection of a novel *Chlamydia* species in captive spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*) in southeastern Spain and proposal of *Candidatus Chlamydia testudinis*. *Systematic and applied microbiology*. 2020 Mar 1;43(2):126071.
- 3-Stokes HS, Martens JM, Jelocnik M, Walder K, Segal Y, Berg ML, Bennett AT. Chlamydial diversity and predictors of infection in a wild Australian parrot, the Crimson Rosella (*Platycercus elegans*). *Transboundary and Emerging Diseases*. 2021 Mar;68(2):487-98.
- 4-Hogerwerf L, De Gier B, Baan B, Van Der Hoek W. *Chlamydia psittaci* (psittacosis) as a cause of community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology & Infection*. 2017 Nov;145(15):3096-105.
- 5-House HR, Bailey OE. *Chlamydophila psittaci* (Psittacosis) Attack. In: *Ciotto's Disaster Medicine* 2024 Jan 1 (pp. 779-781). Elsevier.
- 6-Knittler MR, Sachse K. *Chlamydia psittaci*: update on an underestimated zoonotic agent. *Pathogens and disease*. 2015 Feb 1;73(1):1-5.
- 7-Branley JM, Weston KM, England J, Dwyer DE, Sorrell TC. Clinical features of endemic community-acquired psittacosis. *New microbes and new infections*. 2014 Jan 1;2(1):7-12.
- 8-Vanrompay D. Avian chlamydiosis. *Diseases of poultry*. 2020 Jan 13:1086-107.
- 9-Jelocnik M. Chlamydiae from down under: The curious cases of chlamydial infections in Australia. *Microorganisms*. 2019 Nov 22;7(12):602.
- 10-Muroni G, Pinna L, Serra E, Chisu V, Mandas D, Coccollone A, Liciardi M, Masala G. A *Chlamydia psittaci* Outbreak in Psittacine Birds in Sardinia, Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022 Oct 30;19(21):14204.
- 11-Beeckman DS, Vanrompay DC. Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. *Clinical microbiology and infection*. 2009 Jan 1;15(1):11-7.
- 12-Radomski N, Eienkel R, Müller A, Knittler MR. Chlamydia-host cell interaction not only from a bird's eye view: some lessons from *Chlamydia psittaci*. *FEBS letters*. 2016 Nov;590(21):3920-40.

- 13-Golestani N, Khoshkhoo PH, Hosseini H, Azad GA. Detection and identification of Chlamydia spp. from pigeons in Iran by nested PCR and sequencing. Iranian journal of microbiology. 2020 Aug;12(4):331.
- 14-Burt SA, Röring RE, Heijne M. Chlamydia psittaci and C. avium in feral pigeon (Columba livia domestica) droppings in two cities in the Netherlands. Veterinary Quarterly. 2018 Jan 1;38(1):63-6.
- 15-Andersen AA, Franson JC. Avian chlamydiosis. Infectious diseases of wild birds. 2007 Apr 4:303-16.
- 16-Magnino S, Haag-Wackernagel D, Geigenfeind I, Helmecke S, Dovč A, Prukner-Radovčić E, Residbegović E, Ilić V, Laroucau K, Donati M, Martinov S. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. Veterinary microbiology. 2009 Mar 16;135(1-2):54-67.
- 17-Mahzounieh M, Moloudizargari M, Abadi MG, Baninameh Z, Khoei HH. Prevalence rate and phylogenetic analysis of Chlamydia psittaci in pigeon and house sparrow specimens and the potential human infection risk in chahrmahal-va-bakhtiari, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2020 Apr 30;15(2).
- 18-Sariya L, Prompiram P, Tangsudjai S, Poltep K, Chamsai T, Mongkolphan C, Rattanaivibul K, Sakdajivachareon V. Detection and characterization of Chlamydophila psittaci in asymptomatic feral pigeons (Columba livia domestica) in central Thailand. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2015 Feb 1;8(2):94-7.
- 19-Piasecki T, Chrzastek K, Wieliczko A. Detection and identification of Chlamydophila psittaci in asymptomatic parrots in Poland. BMC veterinary research. 2012 Dec;8:1-6.
- 20-de Freitas Raso T, Júnior ÂB, Pinto AA. Evidence of Chlamydophila psittaci infection in captive Amazon parrots in Brazil. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2002 Jun;33(2):118-21.
- 21-Ghorbanpoor M, Bakhtiari NM, Mayahi M, Moridveisi H. Detection of Chlamydophila psittaci from pigeons by polymerase chain reaction in Ahvaz. Iranian journal of microbiology. 2015 Feb;7(1):18.
- 22-Gartrell BD, French NP, Howe L, Nelson NJ, Houston M, Burrows EA, Russell JC, Anderson SH. First detection of Chlamydia psittaci from a wild native passerine bird in New Zealand. New Zealand Veterinary Journal. 2013 May 1;61(3):174-6.
- 23-Heddema ER, Ter Sluis S, Buys JA, Vandenbroucke-Grauls CM, van Wijnen JH, Visser CE. Prevalence of Chlamydophila psittaci in fecal droppings from feral pigeons in Amsterdam, The Netherlands. Applied and Environmental Microbiology. 2006 Jun;72(6):4423-5.
- 24-Sheleby-Elías J, Solórzano-Morales Á, Romero-Zuñiga JJ, Dolz G. Molecular detection and genotyping of Chlamydia psittaci in captive psittacines from Costa Rica. Veterinary Medicine International. 2013 Sep 18;2013.
- 25-Smith KA, Campbell CT, Murphy J, Stobierski MG, Tengelsen LA. Compendium of measures to control Chlamydophila psittaci infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis), 2010 National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV). Journal of Exotic Pet Medicine. 2011 Jan 1;20(1):32-45.
- 26-Ravichandran K, Anbazhagan S, Karthik K, Angappan M, Dhayananth B. A comprehensive review on avian chlamydiosis: a neglected zoonotic disease. Tropical animal health and production. 2021 Sep;53(4):414.
- 27-Harkinezhad T, Geens T, Vanrompay D. Chlamydophila psittaci infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. Veterinary microbiology. 2009 Mar 16;135(1-2):68-77.

- 28-Pal M. Chlamydia psittaci as an emerging zoonotic pathogen of global significance. International Journal of Vaccines and vaccination. 2017;4(3):00080.
- 29-Balsamo G, Maxted AM, Midla JW, Murphy JM, Wohrle R, Edling TM, Fish PH, Flammer K, Hyde D, Kutty PK, Kobayashi M. Compendium of measures to control Chlamydia psittaci infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis), 2017. Journal of avian medicine and surgery. 2017 Sep;31(3):262-82.

Molecular detection of *Chlamydia psittaci* infection in pigeons in Sari city

Mahan Mahdavi Saeidi¹, Saeed Shateri^{2*}

¹Graduated student. Bob.C. Islamic Azad University, Babol, Iran.

^{2*}Department of Veterinary Medicine. Bob.C. Islamic Azad University, Babol, Iran

Abstract

Chlamydia psittaci is an obligate intracellular, gram negative, zoonotic pathogen. The infections can manifest as an acute, or chronic disease or asymptomatic. *C. psittaci* can persist in the host for long periods often without causing obvious illness, therefore poses a threat for public health. In this research, 73 stool samples from different species of pigeons (with and without clinical symptoms) were collected in Sari city in sterile microtubes in ۲۰۲۳ and transported to the laboratory in the vicinity of ice. Then, omp A gene (outer membrane protein) was identified from 16sRNA by specific primers of *Chlamydia psittaci*. The results of this study showed that 15 samples out of 73 samples (20.54%) were positive. Since the infection rate of *C. psittaci* is high, it is necessary to observe the health standards in keeping birds. Due to the zoonosis of the disease, health measures are necessary to prevent the disease in humans and birds.

Keywords: Pigeon, *Chlamydia psittaci*, molecular identification.
