نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۴ پاییز ۱۳۹۳

ردیابی مولکولی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی در موارد سقط گاو در شهرکرد

• **حسین طهماسبی**
فارغ التحصیل دانشکده دامپزشکی و عضو پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام دانشگاه شهرکرد (نویسنده مسئول)
• **امیر مومنی**
فارغ التحصیل دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد
• **تقی تکتاز هفشجانی**
استادیار گروه مامایی و بیماری‌های تولیدمثل دام دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد، شهرکرد
• **سمانه مهرابیان**
دانشجوی دانشکده دامپزشکی و عضو پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام دانشگاه شهرکرد
• **حسن ممتاز**
دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد شهرکرد
تاریخ دریافت: خرداد ماه ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: مهرماه ۱۳۹۲

Email: h.tahmasby@yahoo.com

چکیده

سقط جنین می‌تواند به زیان‌های جدی اقتصادی منجر شود. لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی می‌توانند ناباروری و سقط جنین ایجاد نماید. با توجه به اهمیت آنچه ذکر گردید، مطالعه ی حاضر جهت ردیابی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی در و سقط گاو در شهرکرد انجام شد. ترشحات واژنی ۳۶ گاو سقط کرده جهت ردیابی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها با روش مغذی دو مرحله‌ای با استفاده از محیط‌های آبگوشت مغذی لیستریا به عنوان محیط مغذی اولیه و محیط آبگوشت فریزر به عنوان محیط مغذی ثانویه مورد بررسی قرار گرفتند. سپس از دومین محیط مغذی بر روی محیط پالکام آگار کشت داده شد. کلنی‌های مشکوک جهت ردیابی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی به وسیله آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) مورد ارزیابی قرار گرفتند. لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی در هیچ یک از نمونه‌ها یافت نشدند. اگرچه راجع به آلوده نبودن نمونه‌های مورد بررسی به باکتری لیستریا نمی‌توان به طور قطع صحبت کرد و برای اظهار نظر دقیق تر، از روش PCR به طور مستقیم بر روی بافت‌های مشکوک نیز بهتر است استفاده شود اما با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می‌رسد لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی در ایجاد سقط جنین گاو در این منطقه احتمالا تاثیر چندانی ندارند و ممکن است عوامل عفونی دیگری در ابتلا به سقط گاو در این منطقه نقش اصلی را ایفا کنند که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین بررسی‌های بیشتر خصوصا روی بافت‌های مشکوک در این زمینه توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: لیستریا مونوسیتوژنز، لیستریا ایوانوی، سقط، گاو، PCR

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 104 pp: 60-63

Molecular detection of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* from bovine abortion in Shahrekord

By: Tahmasby, H., Graduated Student, Faculty of Veterinary Medicine and Member of Research Institute of Zoonotic Diseases, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, (Corresponding Author)

Momeni, A., Graduated Student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

Taktaz Hafshejani, T., Assistant Professor, Department of Veterinary Reproduction and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Mehrabiyan, S., Student, Faculty of Veterinary Medicine and Member of Research Institute of Zoonotic Diseases, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

Momtaz, H., Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Received: May 2013 Accepted: July 2013

Abortion can lead to major economic losses. *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* can cause infertility and abortion. Considering the importance of what mentioned, present study was conducted to detection of *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* in bovine abortion from Shahrekord, Iran. Vaginal discharge from 36 aborted cows were investigated to detection of *L. monocytogenes* and *L. ivanovii*. The samples were analyzed by two-stage enrichment techniques, Listeria Enrichment Broth (LEB) as primary enrichment and Fraser Secondary Broth as secondary enrichment. Secondly enrichments were streaked on Palcam agar. Suspected colonies were evaluated for detecting *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* by polymerase chain reaction (PCR) method. *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* were not found in any sample. However, we cannot discuss about absence of Listeria in the samples certainly and perhaps it is more accurate that suspicious tissues would be tested by direct PCR method, according to the results of this study it is thought that *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* may have little impact on the incidence of cattle abortion in this region and other infectious agents may play a major role in cattle abortions in this region that has not been investigated in this study. Therefore, further investigations especially in the suspected tissues are recommended.

Key words: *Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii*, bovine, abortion, PCR

مقدمه

سقط جنین می‌تواند باعث خسارات مهم اقتصادی و بهداشتی شود. عوامل متعددی در ایجاد سقط جنین می‌توانند نقش داشته باشند. یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده و تاثیرگذار در سقط جنین، عوامل میکروبی هستند. عوامل بیماری‌زای باکتریایی از قبیل لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی می‌توانند جنین را آلوده کنند و منجر به سقط جنین در گاو گردند (۴، ۳).

تست‌های مولکولی جهت تشخیص دقیق تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها بکار برده شده اند. همچنین تست‌های مولکولی در مقایسه با تست‌های بیوشیمیایی، خطای کمتری دارند. روش PCR جهت شناسایی اختصاصی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی به عنوان یک روش اختصاصی، حساس و دقیق بکار گرفته شده است (۷، ۲). تست PCR، ژنوم باکتری‌های مرده (غیر فعال) و زنده (فعال) را تکثیر می‌کند و فرقی بین باکتری‌های مرده و زنده نمی‌گذارد.

زمانی‌که می‌خواهیم عوامل بیماری‌زای فعال در یک نمونه‌ی کلینیکی را مورد مطالعه و بررسی قرار دهیم، بهتر است اول روی محیط کشت تکثیر کنیم و بعد از آن از PCR استفاده کنیم و روی نمونه‌ها PCR به طور مستقیم انجام ندهیم.

از آنجاییکه سقط جنین می‌تواند باعث زیان‌های جدی اقتصادی شود، مطالعات زیادی در نقاط مختلف دنیا در زمینه بررسی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی در موارد سقط جنین گاو انجام شده است (۱۳، ۱۴، ۱۰، ۶). اما متاسفانه اطلاعات چندانی در مورد وضعیت آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی در موارد سقط جنین گاو در کشور وجود ندارد و نقش احتمالی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی در ایجاد سقط جنین در گاو در این منطقه درهاله‌ای از ابهام قرار گرفته است، در این مطالعه به ردیابی مولکولی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی در موارد سقط جنین در گاوهای شهرکرد پرداخته شد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

در این مطالعه که در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۰ انجام پذیرفت به وسیله ی سواب استریل از ترشحات واژنی ۳۶ گاو سقط کرده در منطقه ی شهرکرد، نمونه گیری صورت گرفت.

جدول ۱) مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمرها	توالی پرایمرها	واسرشت	دمای Annealing	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	٤٠	۲	**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	٤٠	۷	**436 bp**

کشت و آزمایش‌های بیوشیمیایی

سواب‌ها مستقیما درون محیط آبگوشت مغذی لیستریا (مرک، ساخت آلمان) قرار داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. یک میلی لیتر از محیط‌های مغذی اولیه به ۹ میلی لیتر از محیط آبگوشت فریزر (هایمدیا، ساخت هندوستان) افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. سپس نمونه‌ها بر روی محیط پالکام آگار (مرک، ساخت آلمان) کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. کلنی‌های کوچک، مورب و کمی‌محدب به عنوان پرگنه‌های مشکوک به لیستریا جهت تایید از نظر رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، حرکت، احیا نیترات، همولیز، تست کمپ و تخمیر قندهایی چون رامنوز، گزیلوز، مانیتول مورد آزمایش قرار گرفتند (۱۱، ۸). نمونه‌های مشکوک به لیستریا جهت تشخیص دقیق تر تا زمان انجام PCR در محیط آبگوشت تریپتون سوی (مرک، ساخت آلمان) به صورت گلیسیرینه در دمای ۲۰- نگهداری شدند.

PCR

کنترل مثبت لیستریا مونوسیتوژنز ATCC ۱۹۱۱۴ و لیستریا ایوانوی ATCC ۱۹۱۱۹ از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه گردید.

نمونه‌های مشکوک جهت جست و جوی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی به وسیله ی PCR با استفاده از پرایمرهای مندرج در جدول ۱ مورد آزمون قرار گرفتند (۲ و ۷). واکنش PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR، ۱/۵ میکرولیتر MgCl۲ ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلی مراز، ۱ میکرولیتر با غلظت ۱۰ میکرومولار از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر DNA الگو) انجام شد. برنامه‌های دمایی در دستگاه ترموسایکلر (بایورد، ساخت آمریکا) انجام شد. در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (ساخت سیناژن، ایران) الکتروفورز (ساخت پایاپژوهش پارس، ایران) گردید.

یافته‌ها

در نتایج تست‌های بیوشیمیایی برای کلنی‌هایی که از نظر ظاهری مشکوک به لیستریا بودند، در هیچ یک از نمونه‌ها هیچ کدام از گونه‌های لیستریا شناسایی نشد. همچنین جهت بررسی دقیق تر که از آزمون PCR جهت جستجوی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی استفاده شد، در هیچ کدام از نمونه‌های مشکوک لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی یافت نشد. نتایج PCR و تست‌های بیوشیمیایی با هم مطابقت داشتند.

بحث

با در نظر گرفتن اینکه سقط جنین می‌تواند باعث زیان‌های جدی اقتصادی شود، انجام مطالعات تعیین کننده ی میزان آلودگی به باکتری‌های بیماری زا در پروسه ی رخداد سقط، می‌توانند نقش مهمی‌در شناسایی وضعیت آلودگی به عوامل بیماری زای مختلف و تعیین استراتژی مناسب برای درمان و مقابله با سقط ایفا کنند.

در مورد سقط جنین در گاو مطالعاتی در زمینه ی بررسی عوامل بیماری زای مختلف از قبیل بروسلا، لپتوسپیرا، کمپیلوباکتر و کلامیدیا در کشور صورت گرفته است (۱۲، ۹، ۵، ۱). اما متاسفانه اطلاعات چندانی در مورد وضعیت آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی در موارد سقط گاو در کشور وجود ندارد و نقش احتمالی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی در ایجاد بیماری‌های تناسلی و سقط در گاو در این منطقه درهاله‌ای از ابهام باقی مانده است.

پژوهش‌های به عمل آمده روی وضعیت آلودگی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی در موارد سقط گاو شیوع متفاوتی را در جاهای مختلف نشان می‌دهد. در تنها گزارش در دسترس در مورد آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز در زمینه ی سقط گاو در ایران که در یزد انجام شد، از میان ۵۶ مورد سقط و مرده‌زایی که مورد بررسی قرار گرفت تنها ۳ مورد (۵/۳ درصد) لیستریا مونوسیتوژنز جداسازی شد (۶). در مطالعه‌ای که در فرانسه انجام شد از ۸۹ مورد سقط گاو، لیستریا مونوسیتوژنز را از ۳ درصد نمونه‌های جنینی و ۶ درصد نمونه‌های جفتی جداسازی کردند (۱۰). در مطالعه ی Thakur لیستریا ایوانوی از موارد سقط در گاو به میزان ۸/۶۹

درصد جداسازی گردید (۱۴). در مطالعه ی Shindang و همکاران (۲۰۱۰) روی سقط جنین گاو در نواحی شمالی نیجریه در ۱۲/۲ درصد از موارد، لیستریا مونوسیتوژنز شناسایی گردید (۱۳).

نتیجه‌گیری

اگرچه راجع به آلوده بودن یا نبودن نمونه‌های مورد بررسی به باکتری لیستریا نمی‌توان به طور قطع صحبت کرد و برای اظهار نظر دقیق تر از روش PCR به طور مستقیم بر روی بافت‌های مشکوک نیز بهتر است استفاده شود اما با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می‌رسد لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانوی در ایجاد سقط جنین گاو در این منطقه احتمالا تاثیر چندانی ندارند و ممکن است عوامل عفونی دیگری در ابتلای به سقط در این منطقه نقش اصلی را ایفا کنند که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین بررسی‌های بیشتر خصوصا روی بافت‌های مشکوک در این زمینه توصیه می‌شود.

منابع مورد استفاده

Arshi, A., Doosti, A., Sharifzadeh, A. (2011). PCR assay for detection of abortion rate caused by *Chlamydia psittaci* in Iranian cattle. Bangkok, Thailand; Int Conf Adv Biotechnol Pharm Sci, December.

Choi, W.S., Hong, C. (2003). Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using competitive PCR. International Journal of Food Microbiology, 84(1): 79-85.

Cummins, A.I., Fielding, A.K. (1994). McLauchlin J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. Journal of Infection, 28(1): 89–91

Elischerova, K., Cupkava, E., Urgeova, E., Lysy, J., Sesevikova, A. (1990). Isolation of *Listeria ivanovii* in Slovakia. Czechoslovak Epidemiology Microbiology Immunology, 39(4): 228–236

Hamali, H., Nofouzi, K., Jafari, R. (2011). A molecular (PCR) survey on abortions caused by Campylobacter spp. in the dairy cattle of Tabriz-Iran. Online Journal of Animal and Feed Research, 1(5): 205-208

Karimi, O., Vanyousefi, J., Jandaghian, A.A., Hassani Tabatabaiee, A.M. (2000). Survey on the incidence of clinically listeriosis in cows of Yazd province. Yazd Agricultural and Natural Resources Research Center, FAO Report Number: 17871.

Liu, D., Ainsworth, A.J., Austin, F.W., Lawrence, M.L. (2004). PCR detection of a putative N-acetylmuramidase gene from *Listeria ivanovii* facilitates its rapid identification. Veterinary Microbiology, 101(2): 83-9.

McClain, D., Lee, W.H. (1988). Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. Journal of Association of Official Analytical Chemists, 71(3):660-4.

Moshkelani, S., Javaheri-Koupaei, M., Rabiee, S., Moazeni, M. (2011). Detection of Brucella spp. and Leptospira spp. by multiplex polymerase chain reaction (PCR) from aborted bovine, ovine and caprine fetuses in Iran. African Journal of Microbiology Research, 5(26): 4627-4630

Ramisse, J., Lepareur, F., Pourdelet, E., Poudelet, M., Priouzeau, M. (1986). Epidemiological survey of non-Brucella abortion among cows in Vendee, France, Point-Veterinaire, 18, 81–88.

Seeliger, H.P.R., Jones, D. (1986). Listeria. In: Sneath PHA, Maine NS, Sharpe ME, Holt JG (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland; 1235–1245.

SharifZadeh, A., Doosti, A., Jafarian Dehkordi, M., Rafiee, A. (2009). A multiplex PCR for the diagnosis of important cause of abortion. Journal of Modern Veterinary Researches; 2(1): 19-26

Shindang, J. (2010). The role of *Listeria monocytogenes* and other bacteria in meningitis and spontaneous abortion in some towns in northern Nigeria. A thesis in the Department of Botany, Faculty of Natural Sciences. Submitted to the School of Postgraduate Studies, University of Jos.

Thakur, S. (2000). Studies on Listeric infections in organized farms. MVSc Thesis, Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, India.