نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۱۰۰، پاییز ۱۳۹۲

جستجوی *Listeria monocytogenes* در موارد آندومتریت گاوهای شهرکرد به روش PCR

• **افشین جعفری دهکردی**
استادیار 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
• **امیر مومنی**
دانشجوی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد
• **تقی تکتاز هفشجانی**
استادیار گروه مامایی و بیماری های تولیدمثل دام دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۹۰ تاریخ‌پذیرش: شهریور ماه ۱۳۹۱
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۷۳۲۵۰۷۱
Email: h.tahmasby@yahoo.com

چکیده

آندومتریت به عنوان یک ریسک فاکتور در ایجاد کیست تخمدانی، آنتروس و سایر مشکلات تناسلی مطرح می باشد و با اثر گذاری بر تولید شیر، به زیان های جدی اقتصادی منجر می شود. *L. monocytogenes* می تواند منجر به ایجاد آندومتریت گردد. با توجه به اهمیت آنچه ذکر گردید، مطالعهٔ حاضر جهت ردیابی *L. monocytogenes* در موارد آندومتریت گاو در شهرکرد انجام شد. مجموعاً ۱۸۰ نمونه از ترشحات رحمی به وسیلهٔ سواب استریل از موارد آندومتریت گاو از شهرکرد جمع آوری شد. سواب ها مستقیماً درون Listeria enrichment broth قرار داده شدند. سپس نمونه های غنی شده بر روی محیط Palcam agar به شکل خطی کشت داده شدند. کلنی های مشکوک به وسیله آزمون واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) مورد ارزیابی قرار گرفتند. هیچ نمونهٔ آلوده به *L. monocytogenes* یافت نشد. مطالعهٔ حاضر نشان دهندهٔ عدم حضور *L. monocytogenes* در موارد آندومتریت گاو در این منطقه است.

کلمات کلیدی: لیستریا، آندومتریت گاو، PCR

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 100 pp: 31-34

PCR detection of *Listeria monocytogenes* in bovine endometritis from Shahrekord, Iran

By: A. Jafari Dehkordi: Assistant Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine and Member of Research Institute of Zoonotic Diseases, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, H. Tahmasby: Student, Faculty of Veterinary Medicine and Member of Research Institute of Zoonotic Diseases, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, (Corresponding Author; Tel: +989137325071), A. Momeni: Student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, T. Taktaz Hafshejani: Assistant Professor, Department of Veterinary Reproduction and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Received: February 2012 **Accepted: September 2012**

Endometritis as a risk factor for cystic ovarian disease, anoestrus and other reproductive disorder, is characterized by impact of dairy production performance and causes serious economic losses. *Listeria monocytogenes* can cause endometritis. Considering the importance of what mentioned present study was conducted to detection of *L. monocytogenes* in bovine endometritis from Shahrekord, Iran. Altogether 180 vaginal discharge samples of bovine endometritis were collected with sterile cotton swabs from Shahrekord, Iran. The swabs were placed directly into Listeria enrichment broth. Secondly enrichments were streaked on Palcam agar. Suspected colonies were evaluated for detecting *L. monocytogenes* by polymerase chain reaction (PCR) method. *L. monocytogenes* was not found in any samples. Present study suggests absence of *L. monocytogenes* in bovine endometritis in the region.

Key words: Listeria, Bovine endometritis, PCR

مقدمه

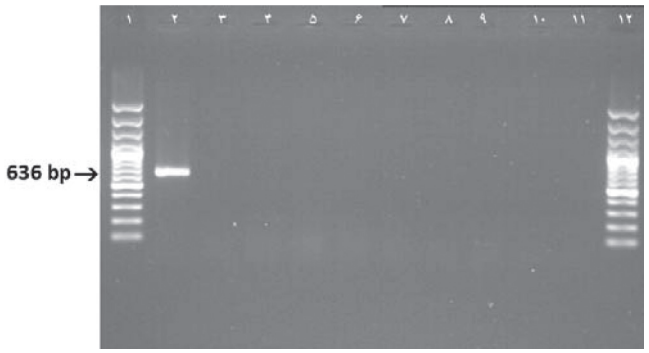
آندومتریت گاوهای شیری التهابی موضعی در آستر رحمی است. رخداد این بیماری بالا است و پس از زایمان به وسیله ی عفونت واحد و یا به همراه عفونت با سایر باکتری ها، ویروس ها، قارچ ها، مایکوپلاسما و ... ایجاد می شود (۳، ۵، ۶).

این بیماری به عنوان یک ریسک فاکتور در ایجاد کیست تخمدانی، آنتروس و سایر مشکلات تناسلی مطرح می باشد و با اثر گذاری بر تولید شیر، به زیان های جدی اقتصادی منجر می شود (۱، ۸).

با توجه به این که گزارشات متعددی در زمینه جداسازی *L. monocytogenes* از موارد آندومتریت وجود دارد (۹، ۱۳)، در این مطالعه به ارزیابی وضعیت آلودگی به *L. monocytogenes* در موارد آندومتریت گاو در شهرکرد به روش PCR پرداخته شد.

در این تحقیق که از زمستان سال ۱۳۸۹ تا پاییز سال ۱۳۹۰ صورت گرفت مجموعاً تعداد ۱۸۰ نمونه از ترشحات رحمی به وسیلهٔ سواب استریل از موارد آندومتریت گاو در منطقه ی شهرکرد اخذ گردید. سواب ها مستقیماً درون محیط Listeria enrichment broth (Merck، ساخت آلمان) قرار داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. یک میلی لیتر از محیط های مغذی اولیه به ۹ میلی لیتر از محیط Himedia Frazer broth، ساخت هندوستان افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. سپس نمونه ها بر روی محیط Palcam agar (Merck، ساخت آلمان) کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. کلنی های کوچک، مورب و کمی محدب به عنوان پرگنه های 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. نمونه های مشکوک به لیستریا تا زمان انجام PCR در محیط TSB (Merck، ساخت آلمان) به صورت گلیسیرینه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند.

کنترل مثبت *L. monocytogenes* ATCC ۱۹۱۱۴ از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران تهیه گردید. نمونه های مشکوک جهت جست و جوی *L. monocytogenes* به وسیله ی PCR با استفاده از پرایمرهایی که قبلاً توسط Choi و Hong (۴) به ثبت رسیده است (DG۶۹: ۵'-GTGCCGCCAAGAAAAGGTTA-۳' و DG۷۴: ۵'-CGCCACACTTGAGATAT-۳') با اندازه ی محصول ۶۳۶ جفت باز مورد آزمون قرار گرفتند. واکنش PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۱ 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 و برنامه های دمایی مطابق با برنامه حرارتی Choi و Hong (۴) در دستگاه ترموسایکلر (Biorad، ساخت آمریکا) صورت پذیرفت. در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (ساخت سیناژن، ایران) الکتروفورز (ساخت پایاپژوهش پارس، ایران) گردید.



شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز جستجوی *Listeria monocytogenes*. ۱ و ۱۲: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۲: کنترل مثبت (۶۳۶ جفت باز)، ۳: کنترل منفی، ۴ تا ۱۱: نمونه های مشکوک مورد آزمون قرار گرفته.

در نتایج تست های بیوشیمیایی برای کلنی هایی که از نظر ظاهری مشکوک به لیستریا بودند، در هیچ کدام از نمونه ها هیچ یک از گونه های لیستریا شناسایی نگردیدند. همچنین جهت ارزیابی دقیق تر که از آزمون PCR جهت جستجوی *L. monocytogenes* استفاده گردید، در هیچ کدام از نمونه های مشکوک *L. monocytogenes* یافت نشد (شکل ۱).

اگرچه در تحقیقات منتشر شده در زمینهٔ جستجوی *L.monocytogenes* در نمونه های واژنی از بوفالو در هندوستان عمدتاً *L. monocytogenes* یافت نشده است (۲) اما در بعضی از مطالعاتی که اخیرا صورت گرفته نمونه های آلوده به لیستریا یافت شده است. چنانچه در مطالعه ی Chaudhari و همکاران در هندوستان، از واژن بوفالوهای ذبح شده در کشتارگاه Bareilly، ۱۲۵ نمونه سواب اخذ گردید که میزان آلودگی به *L. monocytogenes* ۲/۴ درصد و *L. ivanovii* ۰/۸ درصد اعلام شد (۲). همچنین در مطالعه ی Shakuntala و همکاران (۲۰۰۶) به روش PCR در هندوستان روی بوفالوهایی که مشکل دستگاه تناسلی داشتند و توانایی زایمان در آن ها وجود نداشت آلودگی به *L. monocytogenes* را ۴/۴۴ درصد اعلام کردند (۹).

طبق گزارشات منتشر شده، آلودگی به لیستریا در گاو مقداری بیشتر از بوفالو است، چنانچه در مطالعه ی *L. ivanovii*، Thakur از نمونه های واژنی در موارد repeat breeding و سقط در گاو به ترتیب ۴/۶۸ و ۸/۶۹ درصد جداسازی شده است (۱۳). در یک بررسی که توسط Sharda و همکاران در سال ۱۹۹۱ صورت گرفته است شیوع *L.monocytogenes* بین گاوها و بوفالوهای هندوستان به میزان ۶ درصد گزارش شده است (۱۰). در مطالعه ای دیگر که توسط Ramisse و همکاران در فرانسه، *L. monocytogenes* را از ۳ درصد نمونه های جنینی و ۶ درصد نمونه های جفتی در ۸۹ مورد سقط گاو جداسازی کردند (۷).

در گوسفند و بز نیز گزارشاتی در زمینه ی جداسازی لیستریا وجود دارد، به این صورت که در مطالعه ی Sharma و همکاران (۲۰۰۸) در هندوستان از میان گله های بررسی شده، *Listeria ivanovii* به همراه *L. monocytogenes* در یک گوسفند یافت گردید (۱۲). در یک بررسی دیگر *L. monocytogenes* را از نمونه های واژنی گوسفند (۳/۷ درصد) و بز (۳/۳۲ درصد) جداسازی نموده اند. در این مطالعه *L. ivanovii* نیز در ۰/۹۳ درصد از موارد نمونه های واژنی گوسفند جداسازی گردید (۱۱).

جداسازی *L. monocytogenes* در حیوانات به ظاهر سالم و بدون علائم کلینیکی ممکن است نشان دهندهٔ این مسئله باشد که این حیوانات در دورهٔ انکوباسیون بیماری هستند یا نشان دهندهٔ مقاومت آن حیوان به *L. monocytogenes* باشد (۱۴).

اما در بعضی از بررسی های صورت گرفته در نمونه های واژنی اخذ شده از حیوانات مختلف، لیستریا یافت نشده است، به عنوان مثال در مطالعهٔ Yadav و همکاران، از گوسفندانی که از نظر ظاهری سالم بودند در نمونه سواب های اخذ شده از واژن، هیچ یک از گونه های لیستریا یافت نگردید (۱۴). همان طور که اشاره شد، عمدتاً در تحقیقات منتشر شده در هندوستان در زمینهٔ جستجوی *L. monocytogenes* در نمونه های واژنی از بوفالو نیز *L. monocytogenes* یافت نشده است (۲). با توجه به اینکه در این مطالعه نیز *L. monocytogenes* یافت نگردید به نظر می رسد که نمی توان *L. monocytogenes* را به عنوان عامل موثر در موارد آندومتریت گاو در این منطقه تلقی نمود. مطالعات تکمیلی جهت تعیین عوامل تاثیرگذار بر موارد آندومتریت گاو این منطقه توصیه می گردد.

از پژوهشکده بیماری های مشترک انسان و دام دانشگاه شهرکرد به جهت تامین منابع مالی این طرح تشکر و قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

1- Bicalho, R.C., Machado, V.S., Bicalho, M.L., Gilbert, R.O., Teixeira, A.G., Caixeta, L.S. and Pereira, R.V. (2010) Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*, *Journal of Dairy Science*. 93, 5818-5830.

2- Chaudhari, S.P., Malik, S.V., Chatlod, L.R. and Barbuddhe, S.B. (2004) Isolation of pathogenic *Listeria monocytogenes* and detection of antibodies against phosphatidylinositol-specific phospholipase C in buffaloes, *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 27(2):141-8.

3- Coleman, D.A., Thayne, W.V. and Dailey, R.A. (1985) Factors affecting reproductive performance of dairy cows, *Journal of Dairy Science*. 68, 1793-1803.

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

5- Dubuc, J., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Walton, J.S. and Leblanc, S.J. (2011) Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows, *Journal of Dairy Science*. 94, 1339-1346.

6- Griffin, J.F., Hartigan, T.P. and Nunn, W.R. (1974) Nonspecific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum,

Theriogenology. 3, 91-106.

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

8- Ruder, C.A., Sasser, R.G., Williams, R.J., Ely, J.K., Bull, R.C. and Butler, J.E. (1981) Uterine infection in the postpartum cow. II. Possible synergistic effect of *Fusobacterium necrophom* and *Corynebacterium pyogenes, Theriogenology*. 66, 573-580.

9- Shakuntala, I., Malik, S.V., Barbuddhe, S.B. and Rawool, D.B. (2006) Isolation of *Listeria monocytogenes* from buffaloes with reproductive disorders and its confirmation by polymerase chain reaction, *Veterinary Microbiology*. 117, 229-234.

10- Sharda, R., Moghe, M.N. and Tanwani, S.K. (1991) Antibiotic sensitivity pattern of bacteria isolated from repeat breeding animals, *Indian Veterinary Journal.* 68, 197–200.

11- Sharma, M., Batta, M.K., Katoch, R.C., Asrani, R.K., Nagal, K.B. and Joshi, V.B. (1996) Listeria monocytogenes abortions among migratory sheep and goats in Himachal Pradesh, *Indian Journal of Animal Sciences*. 66, 1117–9.

12- Sharma, M., Batta, M.K., Katoch, R.C. and Andersen, A.A. (2008) A field investigation of bacterial etiology of abortions among migratory sheep and goats in North-West hill states of India, *Veterinarski Arhiv.* 78 (1), 65-71

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

14- Yadav, M.M. and Roy, A. (2009) Prevalence of Listeria spp including *Listeria monocytogenes* from apparently healthy sheep of Gujarat State, India, *Zoonoses Public Health.* 56(9-10), 515-24.