نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۸، بهار ۱۳۹۲

بررسی آلودگی به *Listeria monocytogenes* و *Listeria ivanovii* در پرندگان وحشی قفسی 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
• **میلاد عادل**
دانشجوی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد
• **عبدالله کیانی سلمی**
کارشناس گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد
تاریخ دریافت: آذر ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۱۳۹۱
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۷۳۲۵۰۷۱
Email: h.tahmasby@yahoo.com

چکیده

بیشتر پرندگان ممکن است گونه های لیستریا را در روده های خود بدون علامت و با شیوع متغیر حمل کنند و به انسان منتقل نمایند. جنس لیستریا دو گونه بیماری زا به نام های *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* دارد. از این دو، *L. monocytogenes* به عنوان عامل سقط، انسفالیت، سپتی سمی در انسان و حیوانات شناخته شده است. *L. ivanovii* یک پاتوژن حیوانی است و گاهاً در انسان نیز ایجاد عفونت می کند. در این مطالعه به ارزیابی آلودگی به *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* در پرندگان وحشی قفسی شهرکرد به روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) پرداخته شد. تعداد ۱۰۳ نمونه ی مدفوعی از پرندگان وحشی قفسی از نقاط مختلف شهرکرد به وسیله ی سواب استریل جمع آوری گردید. سواب ها مستقیماً درون محیط لیستریا اینریچمنت براث[1] قرار داده شدند. پس از غنی سازی، نمونه ها بر روی محیط پالکام[2] آگار کشت داده شدند. سپس نمونه ها با استفاده از روش PCR جهت بررسی وجود *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* مورد ارزیابی قرار گرفتند. در هیچ کدام از نمونه ها *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* یافت نشد. نتایج این مطالعه نشان داد پرندگان وحشی قفسی این منطقه احتمالاً نقشی در انتقال *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* ندارند.

کلمات کلیدی: لیستریا، پرندگان وحشی قفسی، PCR، سپتی سمی

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 98 pp: 22-25

Investigation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* infection in wild cage birds in Shahrekord by PCR

By: A. Zamani Moghaddam: Associate 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), M. Adel: Student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, A. Kiani Salmi: Lab Technician, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Received: December 2011 **Accepted: May 2012**

Most birds probably can carry Listeria spp. asymptomatically in their intestines with varying prevalence and can transmit the pathogens to human. The genus-listeria has two pathogenic species namely, *L. monocytogenes* and *L. ivanovii*. *L. monocytogenes* is a well-known cause of abortion, encephalitis and septicaemia in man and animals. *L. ivanovii* is an animal pathogen and in rare cases cause human infection. Hence, This study was conducted to determine the occurrence of pathogenic *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* in wild cage birds faeces from Shahrekord. Altogether 103 samples of bird faeces were collected with sterile cotton swabs from different areas of Shahrekord, Iran. Swabs were placed directly into Listeria enrichment broth. Secondly enrichments were streaked on Palcam agar. Then evaluated to detect *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* by polymerase chain reaction (PCR) method. Neither *L. monocytogenes* nor *L. ivanovii* were found in birds of this study. The present result suggested that wild cage birds may have no role in the transmission of *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* in the region.

Key words: Listeria, Wild cage birds, PCR, Septicaemia

مقدمه

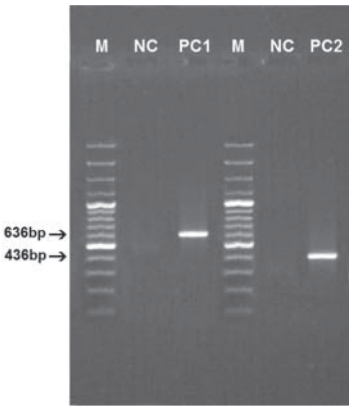
جنس لیستریا دو گونه بیماری زا دارد: *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* که از این دو، *L. monocytogenes* به عنوان عامل سقط، انسفالیت، سپتی سمی در انسان و حیوانات شناخته شده است و *L. ivanovii* نیز به دلیل نقش در سقط، مرده زایی، سپتی سمی جنینی در عفونت های گوسفند و گاو، از اهمیت بالایی برخوردار است همچنین گاها در انسان نیز ایجاد عفونت می کند (۴، ۷).

پرندگان ممکن است باکتری ها را از روده های خود به زنجیره غذایی منتقل کنند. به عنوان مثال پرندگان به محیط های فراوری مواد غذایی وارد می شوند یا سبزیجاتی که در محیط های باز رشد می کنند یا غذاهایی که در بازار آزاد فروخته می شوند را می توانند آلوده نمایند (۹). همچنین پرندگان خانگی نیز به صورت بالقوه می توانند میکروب های بیماری زا را در خود جای داده و به صاحبان خود منتقل کنند (۱۱). با توجه به این مهم، در این مطالعه به ارزیابی آلودگی به *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* در پرندگان وحشی قفسی شهرکرد به روش PCR پرداخته شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه که در زمستان سال ۱۳۸۹ صورت گرفت مجموعاً تعداد ۱۰۳ نمونه مدفوعی به وسیله ی سواب استریل از پرندگان وحشی قفسی (۳۱ طوطی، ۲۵ بلبل، ۱۲ مینا، ۱۱ سهره، ۸ طاووس، ۸ قرقاول، ۶ فینچ، ۱ بلدرچین، ۱ مرغ بهشتی) شهرکرد اخذ گردید.

سواب ها مستقیماً درون محیط لیستریا اینریچمنت براث (مرک، ساخت آلمان) قرار داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. سپس نمونه ها بر روی محیط پالکام آگار (مرک، ساخت آلمان) کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند (۸). کلنی های کوچک، مورب و کمی محدب به عنوان پرگنه های مشکوک به *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* جهت



شکل۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز کنترل مثبت *L. monocytogenes* و *L. ivanovii*
M: مارکر۱۰۰ جفت بازی، NC: کنترل منفی، PC۱: کنترل مثبت *L. monocytogenes*،
PC۲: کنترل مثبت *L. ivanovii*

تاییـد از نظر رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتـالاز، حرکت، احیا نیترات، همولیز، تست کمپ و تخمیر قندهایی چون رامنوز، گزیلوز، مانیتول مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه های مشـکوک به به *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* تا زمان انجام PCR در محیط تریپتون سـوی براث (مرک، ساخت آلمان) به صورت گلیسیرینه در دمای ۲۰- نگه داری شدند.

کنترل مثبـت ATCC *L. monocytogenes* ۱۹۱۱۴ ATCC *L. ivanovii* ۱۹۱۱۹ از مرکـز کلکسـیون قـارچ هـا و باکتری هـای صنعتی ایـران تهیه گردید. نمونـه های مشـکوک جهـت جسـت و جـوی *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* به وسـیله ی PCR با اسـتفاده از پرایمرهایی که قبلا توسط Choi و Hong (۳) و Liu و همکـاران (۱۲) بـه ثبت رسـیده اسـت مورد آزمون قرار گرفتند. واکنش PCR با اسـتفاده از مواد تهیه شـده از شـرکت سـیناژن در حجـم ۲۵ میکرولیتـر (۲/۵ میکرولیتر بافـر PCR ۱۰X ، ۱/۵ میکرولیتـر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مـولار، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ واحـد آنزیم Taq پلی مـراز، ۱ میکرولیتر با غلظـت ۱۰ میکرومولار از هـر پرایمـر، ۱ میکرولیتر DNA الگو) انجام شـد. برنامه های دمایی مطابق بـا برنامه حرارتی Choi و Hong (۳) و Liu و همکاران (۱۲) در دسـتگاه ترموسایکلر (بایورد، ساخت آمریکا) صورت پذیرفت (۱۳). در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (سـاخت سیناژن، ایران) الکتروفورز (ساخت پایاپژوهش پارس، ایران) گردید.

نتایج

در هیچ کدام از نمونه ها *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* یافت نشد.

بحث

گزارشـات متعـددی در زمینـه جداسـازی *L. monocytogenes* از پرندگـان وجـود دارد. Weber و همکاران شـیوع لیسـتریا مونوسـیتوژنز را در کبوترهـای خانگـی ۰/۹ درصـد گـزارش دادنـد (۱۵). در مطالعه ی دیگـری علـی رغم اینکـه ۴۰۰ نمونه مـورد ارزیابی قرار گرفـت عدم وجود *L. monocytogenes* در نمونـه های مدفوعـی کبوتر گزراش گردید (۲). شـیوع *L. monocytogenes* در پرندگـان وحشـی از وضعیـت متفاوتی برخوردار اسـت به نحوی که Kalorey و همکاران *L. monocytogenes* را به میزان ۲ درصد از پرندگان وحشـی قفسـی جداسـازی نمودند (۱۰) اما Hellström و همکـاران شـیوع *L. monocytogenes* را در پرندگـان وحشـی فنلاند ۳۶ درصد گـزارش کرده اند و همچنین اظهار کردند شـیوع این پاتوژن در پرندگان وحشـی که در اماکن دفع زباله ی شـهر حضور دارند نسـبت به پرندگان وحشـی شـهری به میزان قابل توجهی بیشتر بوده است (۹). مشـابه با مطالعه ی پیشـین، Bouttefroy و همکاران نشان دادند ۴۶ درصـد از کلاغ های شـهری یکی و یا بیشـتر از یکی از گونه های لیسـتریا را در خـود جـای داده اند و از میـان نمونه های مـورد ارزیابی ۳۳ درصد به *L. monocytogenes* آلوده بوده اند (۱). در پرتغال ۲۸۵ نمونه ی مدفوعی از مرغـان نوروزی مورد بررسـی قرار گرفت. میزان شـیوع جنس لیسـتریا و گونـه ی *L. monocytogenes* بـه ترتیب ۹/۸ درصـد و ۶ درصد گزارش گردیـد (۶). در پژوهشـی کـه در کانادا بر روی مرغان نـوروزی نوک گرد به عمل آمد نشـان داده شد ۹/۵ درصد آن ها به *L. monocytogenes* آلوده بودند (۱۴).

در این مطالعه نیز همچون مطالعه ی Casanovas و همکاران (۲) هیچ نمونه ی آلوده به *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* در پرندگان مورد مطالعه یافت نشد.

نتیجه گیری

با توجه نتایج این مطالعه به نظر می رسـد پرندگان وحشـی قفسی این منطقه نقشی در انتقال *L. monocytogenes* و *L. ivanovii* ندارند.

منابع مورد استفاده

1- Bouttefroy, A., Lemaitre, J.P., Rousset, A. (1997) Prevalence of Listeria sp. in droppings from urban rooks (*Corvus frugilegus*), *Journal of Applied Microbiology*. 82, 641 -647

2- Casanovas, L., de Simón, M., Ferrer, M.D., Arqués, J., Monzón, G. (1995) Intestinal carriage of campylobacters, salmonellas, yersinias and listerias in pigeons in the city of Barcelona, *Journal of Applied Microbiology*. 78, 1, 11–13

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

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

5- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR, *Journal of Clinical Microbiology*. 42, 3819–3822

6- Duartea, E.L., Guerra, M.M., Bernardo, F.M. (2002) Salmonella and Listeria spp. carriage by gulls (larids), *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 97 (544) 181-187

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

8- Harrigan, W.M. (1998) *Laboratory methods in food microbiology*, 3rd edition. Aspen Publisher, Inc., Gaithersburg, 485-510

9- Hellström, S., Kiviniemi, K., Autio, T., Korkeala, H. (2008) *Listeria monocytogenes* is common in wild birds in Helsinki region and genotypes are frequently similar with those found along the food chain, *Journal of Applied Microbiology*. 104, 883–888

10- Kalorey, D.R., Kurkure, N.V., Warke, S.R., Rawool, D.B., Malik, S.V.S., Barbuddhe, S.B. (2006) Isolation of pathogenic Listeria monocytogenes in faeces of wild animals in captivity. Comparative Immunology, *Microbiology & Infectious Diseases*. 29, 295–300

11- Krauss, H., Weber, A., Appel, M., Enders, B., d.Isenberg, H.d., Schiefer, H.G., Slenczka, W., Graevenitz, A.V. (2003) *Zoonoses: Infectious Diseases Transmissible From Animals to Humans*, 3rd ed.

Washington, DC: American Society for Microbiology Press.

12- 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, 83–89

13- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Yolken, R.H. (2003) Listeria and Erysipelothrix, *Manual of Clinical Microbiology*. 1: 4619.

14- Quessy, S., Messier, S. (1992) Prevalence of Salmonella spp. Campylobacter spp. and Listeria spp. in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*), *Journal of Wildlife Disease*. 28, 526-531.

15- Weber, A., Potel, J., Schafer-Schmidt, R. (1995) The occurrence of Listeria monocytogenes in faecal samples of pigeons, *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift.* 108, 26-27.