



## Genomic Detection of *Coxiella burnetii* in Cow's Milk Samples of Lorestan Province based on *IS1111* transposon Gene

Maryam Najafi Asl <sup>\*1</sup> , Shahriyar Mehrabi <sup>2</sup> 

1. Ph.D Student Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
2. DVSc Graduate of Large Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

### ABSTRACT

**Background and Aim:** The present study was conducted with the aim of molecular search for *Coxiella burnetii* in raw milk samples collected from cows of Lorestan province.

**Materials and Methods:** This is a cross-sectional and descriptive study in which 200 milk samples were randomly collected from the herds of traditional cattle farms belonging to two cities (Khorramabad and Poldakhtar) of Lorestan province. Collecting milk samples and recording the age of animals was done in the winter of 1400. The process of DNA extraction from all milk samples was also done. Then, Nested-PCR reaction was used to detect *C. burnetii* based on the *IS1111* transposon gene. Also, SPSS software and Chi-square method were used for statistical analysis.

**Results:** The results obtained from amplification of the *IS1111* transposon gene showed that 5% (95% CI: 0.7-55%) of the milk samples were positive for *C. burnetii* microbial load. It was found that there is a significant relationship between the age of the cow and the excretion of *C. burnetii* through the cow milk in Lorestan province ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Based on the findings of this study, it can be concluded that cow's milk can be considered as one of the important sources in the transmission of *C. burnetii* bacteria to the next hosts. Therefore, because of the long shelf life of *C. burnetii* due to the presence of the pseudospore form, the risk of transmission of *C. burnetii* through raw milk and unpasteurized dairy products cannot be ignored. Therefore, cow's milk should be considered as an important factor in the epidemiology of Q fever and public health in the central region of Lorestan province.

**Keywords:** Milk, Transposon gene, Nested-PCR, *Coxiella burnetii*.

Received: 2023/10/27;

Accepted: 2024/02/08;

Published Online: 08/02/2024

**Corresponding Information:** Maryam Najafi Asl, Ph.D Student Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Email: [maryamnajafiasl.mss@gmail.com](mailto:maryamnajafiasl.mss@gmail.com)



Copyright © 2023, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usage with proper citation.



## دو فصلنامه

بهداشت و بیماری های عفونی دام

سال ۱، شماره ۱

صفحه مجله: <https://jahid.lu.ac.ir/>

## جستجوی ژنومی کوکسیلا بورتتی در نمونه‌های شیر گاو استان لرستان بر اساس ژن ترانسپوزونی IS1111

مریم نجفی اصل<sup>۱\*</sup>، شهریار مهرابی<sup>۲</sup> 

۱. دانشجوی دکتری تخصصی باکتری شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲. دانشجوی دکتری تخصصی بیماری‌های داخلی دام‌های بزرگ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

## چکیده

**زمینه و هدف:** پژوهش حاضر با هدف جستجوی مولکولی کوکسیلا بورتتی در نمونه‌های شیر خام جمع آوری شده از گاوها در استان لرستان انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** این پژوهش به صورت مقطعی و توصیفی انجام شده است. تعداد کلی ۲۰۰ نمونه شیر به طور تصادفی از گله‌های گاوداری های سنتی متعلق به دو شهر (خرم‌آباد و پلدختر) استان لرستان، جمع‌آوری شد. نمونه‌های شیر در فصل زمستان سال ۱۴۰۰ جمع‌آوری شد، همچنین سن حیوانات ثبت شد. از همه نمونه‌های شیر DNA استخراج شد. سپس برای تشخیص کوکسیلا بورتتی بر اساس ژن ترانسپوزونی IS1111 از واکنش Nested-PCR استفاده شد. همچنین جهت آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS و روش کای دو مربع استفاده گردید.

**یافته‌ها:** نتایج به دست آمده از تکثیر ترانسپوزونی IS1111 نشان داد که ۵ درصد (۹۵ درصد CI: ۰/۷-۵۵ درصد) از نمونه‌های شیر مورد بررسی، از نظر بار میکروبی کوکسیلا بورتتی مثبت بودند. مشخص شد که بین سن گاو با دفع کوکسیلا بورتتی از طریق شیر گاوهای استان لرستان ارتباط معنی داری وجود دارد ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** بر اساس یافته‌های این پژوهش می‌توان به این نتیجه رسید که شیر گاو می‌تواند به عنوان یکی از منابع مهم در انتقال باکتری کوکسیلا بورتتی به میزبان‌های بعدی، در نظر گرفته شود. بنابراین، به دلیل ماندگاری بالای کوکسیلا بورتتی به علت وجود فرم شبه اسپور، خطر انتقال کوکسیلا بورتتی از طریق شیر خام و محصولات لبنی پاستوریزه نشده، نمی‌توان از آن چشم‌پوشی کرد. بنابراین، شیر گاو باید به عنوان عامل مهمی در اپیدمیولوژی تب کیو و سلامت عمومی در منطقه مرکزی استان لرستان در نظر گرفته شود.

**کلیدواژه‌ها:** شیر، ژن ترانسپوزونی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای، کوکسیلا بورتتی

انتشار آنلاین: ۱۴۰۲/۱۱/۱۹

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۹

دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۵

۱. **اطلاعات نویسنده مسئول:** مریم نجفی اصل، دانشجوی دکتری تخصصی باکتری شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد،

مشهد، ایران

Email: [maryamnajafiasl.mss@gmail.com](mailto:maryamnajafiasl.mss@gmail.com)

حق چاپ © ۲۰۲۳، این یک مقاله با دسترسی آزاد اصلی است که تحت شرایط



Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License توزیع شده است که اجازه کپی و توزیع مجدد

مطالب را فقط در استفاده غیرتجاری با استناد مناسب می‌دهد.

## مقدمه

گفته شده، در سراسر جهان اطلاعات کافی از تب کیو وجود ندارد (۲). زیرا این بیماری به راحتی در سطح جمعیت دامی قابل کنترل نیست و همچنین در انسان ایجاد عفونت‌های بدون علائم بالینی می‌کند و از آنجا که تب کیو بیماری مشترکی بین انسان و حیوان است که می‌تواند به صورت اپیدمی ظهور پیدا کند و علاوه بر این با توجه به موقعیت و روش سنتی زندگی در بیشتر استان‌های ایران و تولید و مصرف انواع محصولات لبنی سنتی مانند پنیر لیقوان در تبریز، چال (دوغ حاصل از شیر شتر) در استان گلستان، کره مسکه در خراسان، پنیر کوزه در آذربایجان غربی و کردستان و انواع دیگر محصولات لبنی سنتی دیگر که در بیشتر مناطق مختلف کشور تولید و مصرف می‌شود (که در تهیه این محصولات معمولاً حرارت اعمال نمی‌شود یا از حرارت‌های خیلی پایین استفاده می‌شود) (۱)، این محصولات می‌توانند به عنوان یکی از عوامل اصلی انتقال این باکتری به انسان باشند و تهدیدی برای امنیت غذایی جامعه باشد. این مطالعه با هدف اصلی تشخیص مولکولی کوکسیلا بورتی در نمونه‌های شیر گاو با روش Nested-PCR در مناطق مختلف استان لرستان انجام شده است.

## روش کار

### جمع آوری نمونه‌های شیر

این بررسی که به صورت توصیفی مقطعی در زمستان سال ۱۴۰۰ انجام شد. تعداد ۲۰۰ نمونه شیر گاو از شهرستان‌های (خرم‌آباد و پلدختر) استان لرستان جمع‌آوری شد. برای گرفتن نمونه شیر ابتدا سرپرستانک‌های هر دام با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شد و سپس چند قطره از شیر پستان دور ریخته شد و از شیر میانی مقدار ۱۵ میلی لیتر نمونه به داخل لوله‌های فالکن استریل ریخته شد و در مرحله بعدی نمونه‌ها در کنار یخ داخل جعبه مخصوص نمونه به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دام‌پزشکی انتقال داده شدند. تعداد نمونه‌های جمع‌آوری بر اساس موقعیت جغرافیایی و گروه سنی در جدول ۱ آورده شده است.

مهم‌ترین قسمت اصلی در سود اقتصادی مزارع پرورش گاوهای شیری منوط به عملکرد تولید مثل بهینه گله، به خصوص گوساله زایی است و هر علت و عاملی که باعث افت آن شود، موجب کاهش سود و خسارات اقتصادی می‌شود. سقط جنین مهم‌ترین عوامل اصلی کاهش گوساله زایی و زیان اقتصادی در گله‌های گاو شیری است. عوامل متعددی چه عفونی و غیر عفونی می‌توانند در ایجاد سقط جنین نقش داشته باشند. یکی از مهم‌ترین عوامل سقط جنین‌های عفونی در دام‌های اهلی باکتری است (۱). تب کیو، اولین بار در سال ۱۹۳۷ توصیف شد، که بیماری مشترکی بین انسان و دام در سراسر جهان است. به دلیل اینکه علائم و تشخیص این بیماری اغلب غیراختصاصی و چالش برانگیزند، عامل این بیماری میکروارگانیزی به نام کوکسیلا بورتی است که یک باکتری داخل سلولی است و عفونت در انسان بیشتر از طریق استنشاق باکتری‌های موجود در هوا رخ می‌دهد. که شناسایی و تشخیص آن وقت گیر بوده و اغلب قابل شناسایی نیست. مخازن اولیه کوکسیلا بورتی نشخوارکنندگان (گاو، گوسفند و بز) هستند. با وجود این، عفونت در گونه‌های متعددی از مهره داران، از جمله حیوانات حیات وحش، پستانداران دریایی، پستانداران اهلی، پرندگان و خزندگان تأیید شده است. در مطالعه راثوت و همکاران در سال ۲۰۰۰، تعداد ۴۷۷ مورد تب کیو در کشور فرانسه گزارش داده‌اند که در اثر مصرف پنیر غیر پاستوریزه بوده است. در سال ۲۰۰۸، ۱۶۷ مورد بیماری تب کیو گزارش شده است، که در مقایسه با سال ۲۰۰۰، ۱۷ مورد بیماری تب کیو گزارش شده است. بزرگ‌ترین اپیدمی تب کیو بین سال‌های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۷ بوده که ۴۰۰۰ مورد درگیری انسانی رخ داده است. نتایج پژوهشی در سال ۲۰۱۱، ۵ مورد ابتلا به تب در اثر مصرف شیر خام در ایالت میشگان آمریکا را نشان داده است (۲). سابقه دقیق ارتباط با دام، می‌تواند به مسئولان بهداشتی در تشخیص و شناسایی بیماری تب کیو کمک کند. در صورت تماس مستقیم داشتن با حیوانات، می‌بایست به انتقال کوکسیلا بورتی از طریق هوا و ابتلا به تب کیو، از طریق تنفسی شک کرد. بنابراین، برای درک بهتر اپیدمیولوژی کوکسیلا بورتی در منطقه لرستان، به ویژه مقایسه سویه‌های موجود در گاو و محصولات لبنی با سایر موارد انسانی و ارزیابی خطر شیر خام گاو برای مصرف کنندگان بررسی وجود کوکسیلا بورتی ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به مطالب

به کار رفته در واکنش، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت زیر استفاده شد. مقدار پنج میکرولیتر DNA الگو (۱۰ نانوگرم DNA الگو در هر واکنش)، یک میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۵ میکرو مولار (Trans1, Trans2) ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس به صورت آماده سپس به هر نمونه ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. ابتدا در مرحله Trans-PCR به منظور بهینه سازی، کاهش آلودگی‌ها، حذف ممانعت کننده‌ها و همچنین افزایش اختصاصیت و حساسیت واکنش از تاج دون پی‌سی‌آر استفاده شد، برنامه دمایی روش تاج دون در جدول ۳ آورده شده است. کنترل مثبت استفاده شده در این مطالعه سوپه استاندارد کوکسیلا بورنتی، *Coxiella burnetii* standard Nine Mile strain (RSA 493) بود که از طریق دانشگاه لرستان، دانشکده دام‌پزشکی تهیه شده بود و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۴).

غلظت مورد در هر واکنش	محصول PCR (جفت باز)	سکانس ۵'-----۳'	نام پرایمر	پروتکل
۲۵	۶۸۷	Trans 1	Trans 1	Trans-PCR
		TATGTATCCACCGTAGCCAGTC	Trans 2	
میکرومولار	۲۰۳	261F	261F	nested-PCR
		GAGCGAACCATTGGTATCG	463R	
		CTTTAACAGCGCTTGAACGT		

جدول ۲: پرایمر های مورد استفاده در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای جهت شناسایی ژن IS1111 (۳)

مرحله	دما	زمان	تعداد چرخه
واشرت‌سازی اولیه	۹۵	۲ دقیقه	۱
Touchdown PCR	واشرت‌سازی	۳۰ ثانیه	۵
	چسبیدن پرایمر	۶۱-۶۶	
	توسعه	۱ دقیقه	
Normal PCR	واشرت‌سازی	۳۰ ثانیه	۳۵
	چسبیدن پرایمر	۶۱	
	توسعه	۱ دقیقه	
	توسعه نهایی	۱۰ دقیقه	
	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

جدول ۳: برنامه و سیکل‌های دمایی PCR جهت شناسایی ژن IS1111 (۳)

### مرحله Nested-PCR

جهت انجام روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای از روش پرسی و همکاران استفاده شد. برای PCR مرحله دوم (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای) از پرایمرهای (261F و 463R) استفاده شد. در این مرحله همه شرایط، از قبیل مخلوط واکنش‌گرها به استثنای برنامه دمایی مطابق مرحله اول اجرا شد، با این تفاوت که

شهرستان	تعداد نمونه گرفته شده	تعداد نمونه‌ها بر اساس سن		
خرم‌آباد	۱۰۰	کمتر از ۲ سال	۴۵۲ سال	بالتر از ۴ سال
		۳۵	۳۲	۳۳
پلدختر	۱۰۰	۳۰	۳۴	۳۶
جمع کل نتایج	۲۰۰	۶۵	۶۶	۶۹

جدول ۱: تعداد نمونه‌های شیر جمع آوری شده بر اساس منطقه جغرافیایی، گروه سنی

### استخراج DNA از شیر

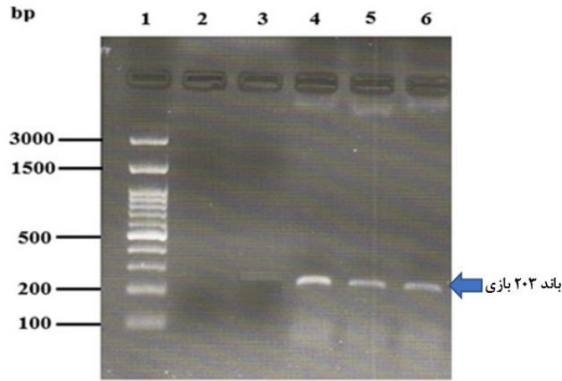
به منظور استخراج DNA از شیر از کیت استخراج DNA (Gene All cell SV mini 250p) استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از رسوب نمونه به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد، سپس ۲۰ میکرولیتر پروتیناز K به هر نمونه اضافه گردید. در مرحله بعد از بافر لیز کننده (BL) به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به میکروتیوب حاوی نمونه اضافه شد و میکروتیوب ورتکس شد. بعد از این مراحل میکروتیوب‌ها به بن ماری ۵۶ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انتقال داده شدند. پس از این مرحله یک سانتریفوژ کوتاه انجام شد و در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق به نمونه اضافه گردید. در این مرحله تمام نمونه به لوله‌های فیلتردار (SV) انتقال داده شد و به مدت یک دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفوژ شد، و مایع زیری جمع آوری شده در لوله زیر ستون تخلیه شد. بعد از این مرحله ۶۰۰ میکرولیتر بافر شست و شو دهنده (BW) اضافه شد و به مدت یک دقیقه در ۸۰۰ دور سانتریفوژ انجام شد. در مراحل بعد بافر شست و شو دهنده مرحله دوم به نام (TW) اضافه شد و به مدت یک دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید، و در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر بافر جدا کننده یا احیا کننده (AE) اضافه شد و به مدت یک دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد و در نهایت DNA به دست آمده تا زمان انجام مراحل PCR در دمای ۲۰- سانتی‌گراد فریز شود.

### بررسی DNA استخراج شده

جهت اطمینان از روش استخراج و ارزیابی میزان غلظت DNA به صورت تصادفی، جذب نوری تعداد ۱۰ نمونه از نمونه‌های استخراج شده به وسیله نانودارپ در طول موج ۲۶۰ قرائت شد و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ (DNA/protein) نیز تعیین شد.

### پی‌سی‌آر معمولی و تاج دون پی‌سی‌آر

برای انجام مراحل در مرحله اول از روش پرسی و همکاران، سال (۲۰۰۶) استفاده شد (۳). به منظور PCR مرحله اول، غلظت بهینه مواد



شکل ۱: آزمایش Nested-PCR شیر گاو

چاهک ۱ مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، چاهک‌های ۵ و ۶ نمونه‌های مثبت، چاهک ۲، ۳ کنترل منفی، چاهک ۴ کنترل مثبت (*C. burnetii* standard Nine Mile strain RSA 493)

### نتایج آزمایش Touchdown Nested-PCR در شیر گاو (براساس منطقه جغرافیایی)

بیشترین میزان آلودگی نمونه‌های شیرگرفته شده در منطقه مرکزی استان لرستان (پلدختر) مشاهده شد. یعنی از ۱۰۰ نمونه شیر اخذ شده، تعداد ۸ نمونه (۸ درصد) از نظر آلودگی به کوکسیلا بورتتی مثبت بودند (جدول ۱). بررسی نتایج این مطالعه نشان داد که بین فراوانی آلودگی شیر و نوع منطقه اختلاف معنی‌داری در استان لرستان وجود دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که منطقه جغرافیایی بر میزان عفونت ناشی کوکسیلا بورتتی و دفع از طریق شیر در گاو استان لرستان تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

### نتایج آزمایش Touchdown Nested-PCR در شیر گاو (براساس سن)

در این مطالعه سه گروه سنی به ترتیب (زیر ۲ سال، ۲ تا ۴ سال و بالای ۴ سال) در نظر گرفته شد. از مجموع ۶۵ نمونه شیر در گروه سنی زیر دو سال و از مجموع ۶۶ نمونه گروه سنی ۲ تا ۴ سال هیچ‌کدام از نمونه‌ها آلوده به کوکسیلا بورتتی نبودند. از تعداد ۶۹ نمونه در گروه سنی بالای چهار سال به بالا، ۱۱ نمونه (۱۶ درصد) آلوده به کوکسیلا بورتتی بودند. بررسی نتایج این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) بین آلودگی و حضور کوکسیلا بورتتی در شیر گاو وجود دارد.

### بحث

تب کیو به عنوان بیماری مشترکی انسان و حیوان نوپدید و باز پدید در بسیاری از کشورها، از جمله ایران مطرح شده است. اگرچه این بیماری جنبه شغلی داشته و معمولاً در افرادی که تماس با حیوانات و

DNA الگو در این مرحله ۲/۵ میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول است که به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق و به مخلوط واکنش اضافه شد. لازم به ذکر است که در هر سری از آزمایش، کنترل مثبت و منفی استفاده شد. در مرحله Nested-PCR محصول مرحله اول به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد. (یعنی ۱ میکرولیتر محصول PCR در ۹۹ میکرولیتر آب مقطر حل شد). همه شرایط این مرحله از قبیل مخلوط واکنش‌گرهای PCR و برنامه زمانی و دمایی مطابق جدول ۴ اجرا شد.

مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد چرخه‌ها
واشرت سازی اولیه	۹۴	۳ دقیقه	۱
واشرت سازی	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
چسبیدن پرایمر	۵۴	۴۵ ثانیه	
توسعه	۷۲	۱ دقیقه	
توسعه نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

جدول ۴: برنامه و سیکل‌های دمایی واکنش پلیمراز آشیانه‌ای جهت شناسایی ژن IS1111 (۳)

### آنالیز آماری داده‌ها

جهت آنالیز آماری از برنامه آماری SPSS نسخه ۱۹ (IBM, USA) و روش کای دو مربع استفاده شد. درصد اطمینان ۹۵ درصد و حداقل  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### نتایج آزمایش Touchdown Nested-PCR در شیر گاو

در این مطالعه از مجموع ۲۰۰ نمونه شیر ۱۱ نمونه (۵/۵ درصد) از نظر وجود کوکسیلا بورتتی مثبت بود (جدول ۵) نتایج بر اساس مناطق مورد مطالعه در استان لرستان را نشان می‌دهد

شهرستان	خرم‌آباد	پلدختر	جمع کل نتایج
تعداد نمونه	۱۰۰	۱۰۰	۲۰۰
تعداد مثبت	۳ (۳ درصد)	۸ (۸ درصد)	۵/۵ درصد

جدول ۵: نتایج مطالعه بر اساس منطقه مورد مطالعه

شده است (۱۵).

مهمترین دلایلی که می‌تواند برای تفاوت گزارش شده در شیوع کوکسیلا بورتی در محصولات لبنی مناطق مختلف جهان آورده، تنوع در آب و هوا و مناطق جغرافیایی، نحوه بررسی، نوع و تعداد نمونه مورد مطالعه و فصلی که نمونه گیری انجام شده است (۱۶-۱۹).

طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ در سوئد انجام شد از ۳۵۹ نمونه شیر گاو جمع آوری شده از کارخانه‌های تولید پنیر، ۱۷ نمونه (۷/۴ درصد) به کوکسیلا بورتی آلوده بودند (۲۰). مطالعه‌ای که از سال ۲۰۱۳ انجام شد، کوکسیلا بورتی زنده را در محصولات لبنی (پنیر و شیر غیر پاستوریزه) به روش Nested-PCR جداسازی کردند (۲۱).

تشخیص ندادن DNA کوکسیلا بورتی در گله‌ها می‌تواند به این دلیل باشد که ارگانسیم برای مدت محدودی پس از زایمان در شیر حیوانات عفونی دفع می‌شود، به عبارت دیگر، PCR منفی بودن نمونه‌ها ممکن است به علت عفونت قبلی با کوکسیلا بورتی بدون دفع ارگانسیم در زمان نمونه گیری باشد. همچنین ممکن است که در زمان نمونه‌گیری از گله‌ها، باکتری در سایر ارگان‌ها غیر از پستان مستقر شده باشد. با این حال، ادامه پایش این گله‌ها در دراز مدت جهت تشخیص DNA کوکسیلا بورتی مفید است.

با توجه به اینکه شیر مورد بررسی در این پژوهش فقط از گاو گرفته شده، مقایسه نتایج این پژوهش با مطالعات دیگران مشکل است:

با توجه به اینکه تعداد نمونه‌های شیر مورد آزمایش در این مطالعه به منظور تخمین شیوع عفونت در گله‌های گاو کم است، همین علت ممکن است باعث تخمین بیش از حد واقعی شیوع عفونت شود. هدف اصلی فقط جستجوی ژنومی کوکسیلا بورتی در گله‌های مورد مطالعه بوده، نه شیوع عفونت کوکسیلا بورتی. با این حال، شیوع عفونت کوکسیلا بورتی در شیر مخزن به وسیله PCR در سایر کشورها نیز بررسی شده است. در پژوهشی که فرتر و همکاران (۲۰۰۷) در کشور سوئیس و همچنین واندن بروم و همکاران (۲۰۱۲) در هلند روی شیر انجام دادند، مشابه پژوهش رحیمی و همکاران (۲۰۱۰) در استان چهارمحال و بختیاری هیچ یک از گله‌های گوسفند در آزمایش PCR مثبت نبودند. هر چند در مطالعه‌ای که در ایالت باسک اسپانیا انجام شد، ۲۲ درصد شیر گله‌های گوسفند در آزمایش PCR مثبت بودند. در مطالعه‌ای دیگر در سوئیس هیچ یک از ۳۹ نمونه شیر بزها مثبت نبوده‌اند. در ایران در پژوهش رحیمی و همکاران (۲۰۱۰) در استان چهارمحال و بختیاری، فقط یکی از ۵۶ نمونه شیر مخزنی ۲۰ گله بز با PCR مثبت بود. با این حال، به نظر می‌رسد بزها نسبت به تب کیو

محصولات آن‌ها هستند، فراوانی بیشتری دارد. اما با توجه به مقاومت بالای عامل بیماری‌زا در محیط و قابلیت انتقال آن از طریق هوا، امکان آلودگی سایر افراد جمعیت نیز وجود داشته و امروزه به‌عنوان یکی از مخاطرات مهم سلامتی انسان مطرح است (۵، ۶).

تب کیو تأثیر عمده‌ای در سلامت عمومی در هنگام شیوع دارد. شیوع آن پی‌درپی و در سرتاسر جهان گزارش می‌شود. شیوع آن معمولاً از لحاظ جغرافیایی بومی شده و محدود به قسمت خاصی است. گوسفند، بز، گاو و گاو میش به‌عنوان منبع اصلی این باکتری در بیشتر شیوع‌های گزارش شده مطرح‌اند. بنابراین، شناسایی منبع و تأیید ارتباط با بیماری انسان ترجیحاً با ژنوتیپ گونه‌های کوکسیلا بورتی انجام می‌شود.

با توجه به مطالعات سرولوژی و مولکولی، بروز تب کیو در حیوانات در ایران به‌خوبی اثبات شده است. اهمیت نشخوارکنندگان در این بیماری مشخص است و دفع کوکسیلا بورتی از طریق شیر خطر عفونت مرتبط با مصرف شیر خام گاو را برجسته کرده است. با این حال، تاکنون اطلاعات کمی برای ارزیابی خطر عفونت مرتبط با مصرف پنیر در دسترس است. با توجه به مقاومت بالای کوکسیلا بورتی در برابر حرارت پایین و بالا و همچنین روند تولید و فرآوری پنیرها، پذیرفتنی است که مصرف پنیر تهیه شده از شیر خام یا شیر غیر پاستوریزه دلیل ایجاد عفونت در انسان باشد (۷، ۸).

براساس مطالعات انجام شده در مناطق مختلف جغرافیایی ایران شیوع ۰ تا ۴۸ درصد در نمونه‌های شیر را نشان داد. برای مواردی، میزان آلودگی در مناطق مرکزی (چهارمحال و بختیاری)، جنوبی (چهرم)، آذربایجان غربی، شمال غربی (بناب) و جنوب غربی (خوزستان) به ترتیب ۶/۲ درصد، ۱۱ درصد، ۱۶/۹ درصد، ۲۶ درصد و ۱/۱ درصد بوده است. علاوه بر این، در پژوهش خادمی و همکاران در سال ۲۰۲۰، به روش Nested-PCR میزان آلودگی شیر گوسفند و بز به ترتیب ۷/۶ و ۱۶/۶ درصد گزارش شده است (۷، ۹-۱۱).

طبق مطالعات انجام شده در جهان میزان شیوع کوکسیلا بورتی در شیر گاو با روش PCR ۵۶/۶ درصد گزارش شده است (۱۲). در تحقیقی که در کشور ترکیه انجام شد، ۳/۵ درصد از ۴۰۰ نمونه شیر از ۲۳ گله گوسفند برای کوکسیلا بورتی مثبت گزارش شد (۱۳). در بررسی دیگری که در سال ۲۰۱۰ در ایالات متحده انجام شد، از ۲۱ نمونه شیر، ۹ نمونه برای کوکسیلا بورتی مثبت گزارش شد (۱۴). همچنین نتایج مشابهی در شیر گوسفند به روش Nested-PCR، از ترکیه (۴ درصد)، مجارستان (۴ درصد)، فرانسه (۱۹ درصد) و اسپانیا (۲۲ درصد) گزارش



## نتیجه گیری

در نهایت نتایج نشان داد که شیر گاو می‌تواند نقش مهمی در اپیدمیولوژی کوکسیلا بورتی (تب کیو) در منطقه استان لرستان داشته باشد. با توجه به اینکه آلودگی شیر گاو تأیید شد، شیر گاو می‌تواند به‌عنوان مهم‌ترین منابع آلودگی برای انسان در منطقه استان لرستان باشد. با توجه به این مسئله نیاز به مطالعات بیشتر و راهکاری جهت بررسی میزان آلودگی در مناطق کشور و کنترل مناسب و پیشگیری به موقع بیماری را بیش از پیش نشان می‌دهد.

## تقدیر و تشکر

نویسندگان از همکارانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنند.

## تضاد منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچگونه تضاد منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

## منابع

1. Sarbazi M, et al., 2015. Effect of pasteurization and packaging on the physicochemical and sensory properties of pot (kope) cheese. *Journal of Food Research*, 507-517.
2. Raoult D, 2012. Chronic Q fever: expert opinion versus literature analysis and consensus. *Journal of Infection*, 65(2):102-8.
3. Parisi A, et al., 2006. Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. *Veterinary microbiology*, 118.1-2: 101-106.
4. Philip CB, 1948. Comments on the name of the Q fever organism. *Public Health Reports*, 63 (2).
5. Hirai A, et al., 2012. Development of a method for detecting *Coxiella burnetii* in cheese samples. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(2):175-80.
6. Reichel R, et al., 2012. Description of a *Coxiella burnetii* abortion outbreak in a dairy goat herd, and associated serology, PCR and genotyping results. *Research in veterinary science*,
7. Rozental T, et al., 2020. First molecular detection of *Coxiella burnetii* in Brazilian artisanal cheese: a neglected food safety hazard in ready-to-eat raw-milk

حساس ترند و مخزن مهم تری از کوکسیلا بورتی بوده و می‌توانند نقش بیشتری در انتشار بیماری ایفا کنند. در نهایت با توجه به اینکه در این پژوهش گونه‌های مختلف حیواناتی مطالعه نشده‌اند و نمی‌توان از نظر نوع دام مقایسه انجام داد، ولی مهم این است که DNA کوکسیلا بورتی در گله‌های مشکوک به تب کیو تشخیص داده شده است (۲۲-۲۵). در پژوهش اعتمادفر و همکاران (۲۰۱۷)، از مجموع ۱۲۰ نمونه شیر تانک‌های ذخیره‌شده شیر خام گاو و غیر پاستوریزه به روش Nested-PCR، ۹ نمونه (۵/۷ درصد) از نظر کوکسیلا بورتی مثبت بودند (۲۶). از دلایل اختلاف بین شیوع کوکسیلا بورتی در نمونه‌های شیر در مناطق مختلف، می‌توان به گونه‌های میزبانی، فصل و منطقه جغرافیایی متفاوت، روش انجام آزمایش، نوع و اندازه و روش نمونه‌گیری اشاره کرد. در گله‌های گاو بدون علامت کوکسیلا بورتی منحصراً در شیر دفع می‌شود، این دفع ممکن است برای چندین ماه باقی بماند و ممکن است به‌طور متناوب انجام شود، در نتیجه این امر باعث پایداری ارگانیزم در محیط می‌شود. بنابراین گاوهای به ظاهر سالم مخازن بالقوه‌ای برای انتقال این بیماری در نظر گرفته می‌شود. همچنین فصل‌ها نیز در بروز عفونت کوکسیلا بورتی در حیوانات تأثیر گذارند؛ به‌طوری که در ژاپن بسیاری از موارد تب کیو در حیوانات در زمستان گزارش شده، از سوی دیگر بیشتر موارد حیوانی در آلمان در فصل تابستان و قبرس فصل پاییز گزارش شده است.

براساس پژوهش انجام شده توسط استین و همکاران (۲۰۱۳)، نمونه‌های شیر بز براساس ژن Com1 غلظت ژنومی کوکسیلا بورتی را بین  $10^2$  تا  $10^6$  بکتیری کوکسیلا بورتی در میلی لیتر تخمین زده شده است. در حالی که این غلظت در نمونه‌های شیر گاو براساس ژن *IS1111*،  $10^1$  تا  $10^4$  تخمین زده شده است. بنابراین یکی از دلایل اختلاف بین میزان آلودگی و شیوع کوکسیلا بورتی می‌توان انتخاب نوع ژن هدف در مطالعات انجام شده و نوع دام یا حیوان مطالعه شده باشد (۲۷).

کوکسیلا بورتی به دلیل دارا بودن فرم شبه اسپور بسیار مقاوم است (۲۸-۳۰). بنابراین با توجه به اینکه جهت تولید و فراوری لبنی از شیر مانند پنیرهای سنتی از حرارات و پاستوریزاسیون استفاده نمی‌شود، بنابراین خطرات ناشی از کوکسیلا بورتی برای انسان از طریق مصرف شیر و محصولات شیر غیر پاستوریزه (از جمله پنیر) قابل اغماض نیست.

22. Esmaeili S, et al., 2019. Molecular prevalence of *Coxiella burnetii* in milk in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Tropical Animal Health and Production*, 51(6):1345-55.
23. Khademi P, et al., 2019. Prevalence of *Coxiella burnetii* in milk collected from buffalo (water buffalo) and cattle dairy farms in Northwest of Iran. *Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases*, 67:101368.
24. Khademi P, et al., 2020. Prevalence of *C. burnetii* DNA in sheep and goats milk in the northwest of Iran. *International Journal of Food Microbiology*, 108716.
25. Nokhodian Z, et al., 2017. Epidemiology of Q fever in Iran: a systematic review and meta-analysis for estimating serological and molecular prevalence. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 22.
26. Etemadfar L, et al., 2015. Genomic Detection of *Coxiella burnetii* in Raw and Unpasteurized Cow Milk of Traditional domestic dairy products Vendors in Khorramabad, Lorestan Province in 2015. *Yafte*, 19(2):1-5.
27. Sting R, et al., 2013. Quantitative real-time PCR and phase specific serology are mutually supportive in Q fever diagnostics in goats. *Veterinary microbiology*, 167(3-4):600-8.
28. Rozental T, et al., 2020. First molecular detection of *Coxiella burnetii* in Brazilian artisanal cheese: a neglected food safety hazard in ready-to-eat raw-milk product. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 24(3):208-12.
29. Jaydari A, et al., 2019. Engineering cloning and expression of interleukin 2-Com1 chimera with aim of recominant subunit vaccine production against *Coxiella burnetii*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25:1127-1133.
30. Lorestani S., et al., 2015. Genomic detection of *Coxiella burnetii* in sheep milk samples by Nested-PCR method in Khorramabad, Iran. *Journal of food science and technology (Iran)*, 13(56):165-171
- product. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 24:208-12.
8. KHalili M, et al., 2010. Q fever a forgotten disease in Iran. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 17(1):93-7.
9. Rahimi E, et al., 2010. An assay to determine the seasonal prevalence of *Coxiella burnetii* in cow milk using nested PCR. *Journal of Microbial World*, 3(1):56-62.
10. Khanzadi S, et al., 2014. Identification of *Coxiella burnetii* by touch-down PCR assay in unpasteurized milk and dairy products in North-East of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 8:15-9.
11. Khademi P, et al., 2014. Genomic detection of *Coxiella burnetii* in goat milk samples in animal farms Khorramabad Township, Iran. *Pajoohandeh Journal*, 19(3):162-8.
12. Muskens J, et al., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. *Veterinary Record*, 168(3):79-79.
13. Öngör H, et al., 2004. Detection of *Coxiella burnetii* by immunomagnetic separation-PCR in the milk of sheep in Turkey. *Veterinary record*, 154(18):570-2.
14. Loftis AD, et al., 2010. Detection of *Coxiella burnetii* in commercially available raw milk from the United States. *Foodborne pathogens and disease*, 7(12):1453-6.
15. Cerf O, Condron R, 2006. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiology & Infection*, 134(5):946-51.
16. Kim SG, et al., 2005. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerging infectious diseases*, 11(4):619.
17. Maurin M, Raoult Df. 1999. Q fever. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 518-553.
18. Rahimi E, et al., 2010. An assay to determine the seasonal prevalence of *Coxiella burnetii* in cow milk using nested PCR.
19. Rodolakis A, et al., 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *Journal of dairy science*, 90(12):5352-60.
20. Guatteo R, et al., 2006. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Veterinary Research*, 37(6):827-33.
22. Eldin C, et al., 2013. *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 88(4):765-9.