آنالیز فیلوژنتیک کوکسیلابورنتی جدا شده از شیر گاوداری‌های استان تهران

چنگیز احمدی‌زاده[۱]، محمود جمشیدیان[۱]، فرهاد موسی‌خانی[*۲]

چکیده

تب کیو بیماری مشترک انسان و دام با انتشار جهانی است که توسط نوعی ریکتزیا به نام کوکسیلابورنتی ایجاد می‌شود. جرم عامل بیماری از طریق جنین سقط شده، ادرار، مدفوع و شیر دام آلوده دفع می‌شود. بنابراین مصرف شیر غیر پاستوریزه آلوده می‌تواند منبع عفونت برای انسان باشد. در این مطالعه از مجموع ۵۰ گاوداری‌های شیری اطراف تهران تعداد ۱۵۰نمونه شیر از تانک مخزن دریافت گردید و تمامی نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای ژن ترانسپوزان IS1111a اختصاصی کوکسیلا بورنتی، مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. که از کل نمونه‌های مورد آزمایش ۱۸ نمونه از نظر کوکسیلابورنتی مثبت بودند که به طور تصادفی ۱۲نمونه انتخاب و برای توالی یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. نتایج این پژوهش نشان داد که شیر گاو یکی از مخازن بالقوه کوکسیلابورنتی در ایران است. هدف از این مطالعه آنالیز فیلوژنتیک کوکسیلابورنتی‌های جدا شده از شیر گاوداری‌های استان تهران بود که پس از کسب توالی ژن مورد نظر باکتری کوکسیلا بورنتی، تمامی توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردید. حاصل این مقایسه نشان داد که ژن ترانسپوزان IS1111A کوکسیلا بورنتی جداشده از شیر گاوهای گاوداری‌های اطراف تهران بیش از ۹۹٪ با توالی‌های موجود در بانک ژن قرابت دارد.

واژگان کلیدی: *کوکسیلابورنتی، آنالیز فیلوژنتیک، PCR*

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹٤/۲/۱۸

مقدمه

تب کیویک بیماری مشترک بین انسان و دام با انتشارجهانی است که در نواحی جغرافیایی و آب و هوای متفاوت گزارش شده است. تب کیو (کیو از کلمه Query به معنای مورد سئوال گرفته شده است) اولین بار در سال ۱۹۳۷ توسط دریک (Dreick) به دنبال شیوع نوعی بیماری شبه آنفولانزا در کارگران کشتارگاهی واقع در بریسبان استرالیا توصیف گردید. تب کیو عفونت زئونوزی است که در سراسر دنیا بـه جز نیوزیلند شیوع دارد.عامل بیماری، کوکسیلا بورتنی (coxiella burnetii) باکتری گرم منفی، داخل سلولی اجباری است که در خانواده ریکتزیاسه قرار دارد. ارگانیسم در چرخه زندگی خود دو نوع واریانت سلولی کوچک (SCV) و واریانت سلولی بزرگ (LCV) را ایجاد می‌نماید که واریانت سلولی کوچک در شرایط محیطی تشکیل شده و ارگانیسم را از عوامل نامساعد محیطی مصون داشته و فرم عفونت‌زا محسوب می‌شود و پس از ورود به بدن میزبان به واریانت سلولی بزرگ که از نظر متابولیکی فعال است، تکامل می‌یابد. عبور از واریانت سلولی کوچک به بزرگ با تغییرات ژنتیکی در بیان پروتئین‌های سطحی همراه است. کوکسیلا بورنتی طیف وسیعی ازحیوانات ازقبیل گاو، گوسفند، بز، سگ، گربه، پریمات‌های غیر انسانی، خزندگان، دوزیستان، پرندگان (اهلی و وحشی)، ماهی و تعداد زیادی از کنه ها را می‌تواند آلوده کند (۱٦). از بین حیوانات اهلی، گاوهای شیری، گوسفند و بز بزرگترین مخازن این باکتری هستند. رحم و غدد پستانی حیوان اولین محل جایگزینی عامل بیماری در مرحله مزمن آلودگی با کوکسیلا بورنتی هستند. حیوانات آلوده این میکروارگانیسم را از طریق ترشحات دفعی، ترشحات رحمی وقطعاتی ازجفت درطی زایمان، به میزان زیاد به محیط دفع می‌کنند. یکی دیگر از مهمترین راه‌های دفع کوکسیلابورنتی به محیط، شیر دام‌های آلوده می‌باشد(۳و۲). این جرم در محیط به فرم شبه ـ اسپور تبدیل شده و به علت مقاومت به خشکی، حرارت و بسیاری از ضدعفونی کننده‌ها، قادر است برای مدت طولانی درمحیط زنده بماند. بیماری درحیوانات فـاقـد علائم بالینـی واضـح است. اما با این وجود سقط جنین،

۱ـ گروه میکروبیولوژی،واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*۲ـ گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران(farhadmoosakhani@yahoo.com)

تولد نوزاد نارس و ناباروری از مهمترین عوارض بیماری در بین حیوانات اهلی گزارش شده است (۷). علائم بیماری در انسان بسیارمتغیراست و حدود ٦۰٪ از افراد با تیتر سرمی مثبت علائم بالینی مشخصی از خود بروز نمی‌دهند. با این وجود در شکل حاد به صورت بیماری آنفلوآنزا، همراه با پنومونی یا هپاتیت غیر واضح بروزمی کند. علائمی چون تب، لرز، سردرد شدید، درد عضلانی و ظهور دانه‌های جلدی می‌باشد. در موارد مزمن بیماری اندوکاردیت و اختلالات کبدی از نشانه های بیماری است. میزان تلفات در موارد حاد بیماری ۱٪ و در موارد مزمن بیماری بیشتر می‌باشد(۱۱). این بیماری وقوع ناگهانی دارد و دراصل یک بیماری شغلی محسوب می‌شود ومعمولا در پرورش دهندگان حیوانات، شیردوشان، کارگران کشتارگاه ها، کارکنان واحدهای تولید شیر، شاغلین کارخانه‌های چرم، روغن وکود و یا افراد شاغل در آزمایشگاه‌ها مشاهده می‌شود. مهمترین راه انتقال در انسان از طریق استنشاق ریز قطره‌هاست. سایر راههای انتقال شامل، راه گوارشی، گزش کنه یا موارد تصادفی در آزمایشگاه می‌باشد. اپیدمیولوژی این بیماری با سایر عفونت‌های ناشی از ریکتزیاها متفاوت است. مطالعاتی که در آمریکا روی کنه‌های ناقل به عمل آمده نشان می دهند که تعداد زیادی از انواع کنه‌ها از قبیل درماستور آندرسونی (Dermacentor andersoni) و آمبلوبما آمریکانوم (Amblyomma americanum) بطور طبیعی آلوده به کوکسیلابورنتی می‌باشند(۱). حدت ارگانیسم‌های کوکسیلابرونتی در توانایی آنها در بقای داخل سلول‌های میلوئیدی با پیشدستی نمودن بر مکانیسم‌های ایمنی سلولی و ربایش تغییرات فاگوزمی صورت می‌پذیرد. تب کیو در سال‌های اخیر در برخی از کشورها به عنوان بیماری نوظهور شیوع پیدا کرده است، به طور مثال در شرق هلند که پرورش بز تمرکز بالایی دارد از سال ۲۰۰۷ تاکنون سه اپیدمی بزرگ رخ داده است که برای کنترل بیماری علاوه بر حذف بز و گوسفندان آلوده از اواخر سال ۲۰۰۹ تا فصل بره زایی در سال ۲۰۱۰ واکسیناسیون گسترده ای صورت گرفته است(۹). در کشورهای همسایه ایران نیز مانند ترکیه، نتایج تحقیقات حاکی از نوظهور بودن بیماری تب کیو در سال‌های اخیر است(۱۲). تب کیو بین سربازان آمریکایی مقیم عراق در سال ۱۳۸٦ با میزان حمله بالای ۵۰٪ و بروز تب همراه با علائم تنفسی و گوارشی با منشأ احتمالی شیوع گزش کنه یا استنشاق گرد و غبار آلوده، نشان داد که تب کیو می‌تواند عامل مهمی در تحت تأثیر قرار دادن سریع نیروهای نظامی باشد. واکسیناسیون کارگران کشتارگاه‌ها و دامداران استرالیا که از سال ۲۰۰۲ آغاز شده است در کنترل بیماری تب کیو در استرالیا بسیار موثر واقع شده است(۱۱ و ۱۰). کوکسیلابورنتی به دلیل داخل سلولی اجباری بودن تا کنون در محیط‌های آزمایشگاهی قابل کشت نبوده است و عمده راه های تشخیص، روشهای سرولوژیک بوده است. روشهای مولکولی طی دو دهه‌ی اخیر امکان مناسب‌تری برای تشخیص این میکروارگانیسم فراهم نموده است. اگرچه در سال های اخیر با ابداع محیط‌های کشت مایع و جامد امید جداسازی آنرا زنده کرده است ولی به نظر میرسد روش مولکولی می‌تواند راه را هموارتر کند. در مطالعه حاضر با استخراج DNA باکتری از نمونه‌های شیر گاوداری‌های اطراف تهران و آنالیز فیلوژنتیکی بین سویه‌ی جدا شده و قرابت و دوری آنها را با هم و همچنین با سایر جدایه‌های موجود در جهان مقایسه گردید.

مواد و روش کار

جهت اخذ نمونه بطور تصادفی از ۵۰ گاوداری صنعتی مناطق مختلف استان تهران در فصل بهار و تابستان اقدام به اخذ ۱۰۰ سی‌سی نمونه شیر تانک مخزن گردید. نمونه‌ها تحت شرایط استریل با سرنگهای ۵۰ سی‌سی استریل اخذ و در کنار یخ به آزمایشگاه ارسال گردید. نمونه‌ها توسط سانتریفیوژ یخچال دار و در لوله‌های فالکونی با دور ۱۵۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و جداسازی چربی گردیده از رسوب آنها ۲۰۰ میکرولیتر جهت استخراج DNA برداشت شد. کیت استخراج DNA شرکت سیناژن که شامل مواد زیر می‌باشد، در این مطالعه استفاده گردیده است:

Elution Lysis Buffer, Binding Buffer, Wash Buffer
Enzyme Proteins K, Buffer,

روش استخراج DNA

به منظور دستیابی به باکتری موجود در نمونه‌های شیر و استخراج مستقیم DNA آنها، ابتدا با کمک سانتریفیوژ چربی شیر گرفته و سپس با ریختن شیر پس چرخ در ریزلوله ۱/۵ میلی لیتری و سانتریفیوژ آن با دوازده هزار دور به مدت ۱۵ دقیقه، اجرام میکروبی در ته ریزلوله رسوب داده شد. با تخلیه شیر از ریزلوله، رسوب به جا مانده برای انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. برای استخراج DNA مرحله به مرحله مطابق روش کیت اقدام و سرانجام DNA استخراج شده از باکتری‌های رسوب شیر در ریزلوله‌های عاری از Rnase و Dnase برای انجام PCR حاصل شد.

انجام آزمایش PCR

برای انجام آزمایش PCR غلظت بهینه مواد به کار رفته در واکنش در مخلوط اصلی(Master Mix) در حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق جدول یک آماده شد.

پرایمر F $5' - TGGTATTCTTGCCGATGAC - 3'$

پرایمر R $5' - GATCGTAACTGCTTAATAAACCG - 3'$

پرایمرهای مورد استفاده با توالی‌های نوکلئوتیدی زیر و برنامه زمانی ـ دمایی جدول شماره ۲ به ریزلوله مخلوط اصلی اضافه شد.(۱۵)

جدول ۱ـ اجزای تشکیل دهنده‌ی Master Mix و مقادیر آنها در ریزلوله مخلوط اصلی

بافر 10x	۱۰/۳ میکرولیتر
MgC12	۲/۵ میکرولیتر
dNTP	۰/۵ میکرولیتر
پرایمر	۱ میکرولیتر از هر کدام
آب مقطر	٤/۷ میکرولیتر
Taq polymerase	۰/۵ واحد
DNA الگو	۵ میکرولیتر

برای انجام آزمایش PCR علاوه بر DNA استخراج شده، یک سویه کنترل مثبت و یک نمونه کنترل منفی اضافه شد. برای کنترل مثبت از نمونه مثبت جدا شده استفاده گردید و اشیرشیا کلی هم که هیچ قرابتی با این باکتری ندارد به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. کنترل مثبت، کنترل منفی و میکروتیوب Master Mix در ترموسایکر (Master cycler Gradient, Eppendorf, Germany) با مشخصات زمان و دمایی جدول شماره ۲ قرار داده شدند.(۱۵)

جدول ۲ـ برنامه‌ی زمانی ـ دمایی ترموسایکلر برای انجام PCR

برنامه	دما	زمان
جدا شدن اولیه	۵ دقیقه	۹٤oC
جدا شدن	۳۰ ثانیه	۹٤oC
جفت شدن	۳۰ ثانیه	۵۲ oC
طویل شدن	۳۰ ثانیه	۷۲oC
طویل شدن انتهایی	۷ دقیقه	۷۲ oC

پس از اتمام کار دستگاه نمونه را از آن خارج کرده و برای الکتروفورز آماده شد.

انجام الکتروفورز

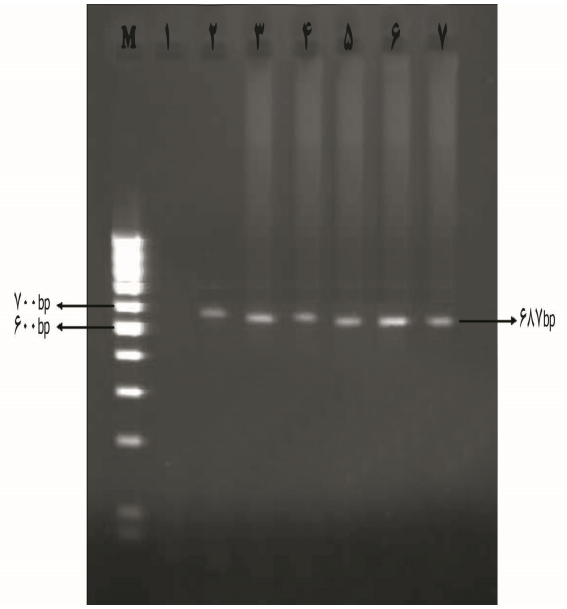
برای تهیه ژل الکتروفورز با غلظت ۱/۵٪ میزان ۱/۰۵ گرم آگارز را وزن کرده و میزان ۷۰ میلی بافر TBE به آن اضافه کرده و محلول را حرارت داده تا زمانی که آگارز داخل بافر کاملاً حل شود و محلول به صورت شفاف در بیاید. پس از خنک شدن محلول تا دمای ۵۰ درجه میزان ۱/۷ میکرولیتر اتیدیوم بروماید به آن اضافه کرده و محلول را درون کست که از قبل آنرا متعادل کرده و شانه را درون آن قرار داده شده ریخته شد و کمی بعد ژل بسته شد. برای رنگی شدن محلول PCR درون ژل از لودینگ بافر استفاده شد که به میزان ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR را با ۲ میکرولیتر لودینگ بافر مخلوط کرده و درون چاهک ژل تزریق گردید. این عمل برای تمام نمونه‌ها به صورت جداگانه انجام گردید. در انتها

میزان ۳/۵ میکرولیتر محلول مارکر درون یک چاهک تزریق اضافه شد پس از انجام الکتروفورز، برای مشاهده باندهای تشکیل شده، ژل از تانک الکتروفورز خارج گردیدو درون دستگاه ژل داک قرار داده شد سپس تصویر ژل به وسیله دوربین نصب شده روی دستگاه و کامپیوتر متصل به آن مشاهده گردید. مشاهده باند در نمونه، نشانه‌ی مثبت بودن آن و عدم وجود باند، نشانه‌ی منفی بودن است.

پس از وصول نتایج، ۱۲ نمونه بطور تصادفی از ۱۸ نمونه مثبت انتخاب وبرای تعیین توالی نوکلئوئیدی (Sequencing) به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. سپس توالی‌های بدست آمده، در بانک ژن(NCBI)ثبت گردیده وتوالی‌های جداشده مورد آزمون BLAST در بانک ژن با نرم افزار Bioedit و DNA star آنالیز فیلوژنتیک شدند. اینک با در اختیار داشتن تعداد ۱۲ نمونه ژن ترانسپوزانIS1111a کوکسیلا بورنتی منتشر در گاوداری‌های اطراف تهران، به آنالیز فیلوژنتیک آنها اقدام گردید که تماماً مربوط به قطعه ژنی با ٦٨٧ جفت باز موجود در DNA کوکسیلا بورنتی منتشر در بین گاوداری‌های اطراف تهران می‌باشد. با استفاده از نرم افزار Bioedit وهمچنین DNA star، فیلوژنتیک توالی‌های ژن‌های شناسایی شده با آزمون Blastدر بانک ژن آنالیزگردیدند. منشا شجره عامل های جدا شده ترسیم شد.آنالیز فیلوژنتیک بدست آمده در این مطالعه با یافته های سایر کشورها مقایسه و نتایج تحلیل و تفسیر گردید.

نتایج

پس از آزمون PCR بر روی ۱۵۰ نمونه شیر گاوداری‌های مشکوک در مجموع تعداد ۱۸ نمونه مثبت از شیر مخزن به دست آمد که موید وجود باکتری در ۱۲٪ نمونه‌های شیر مورد بررسی بود که تصویر باندهای تشکیل شده‌ی نمونه‌های مثبت در نگاره ۱ مشاهده می‌شود.

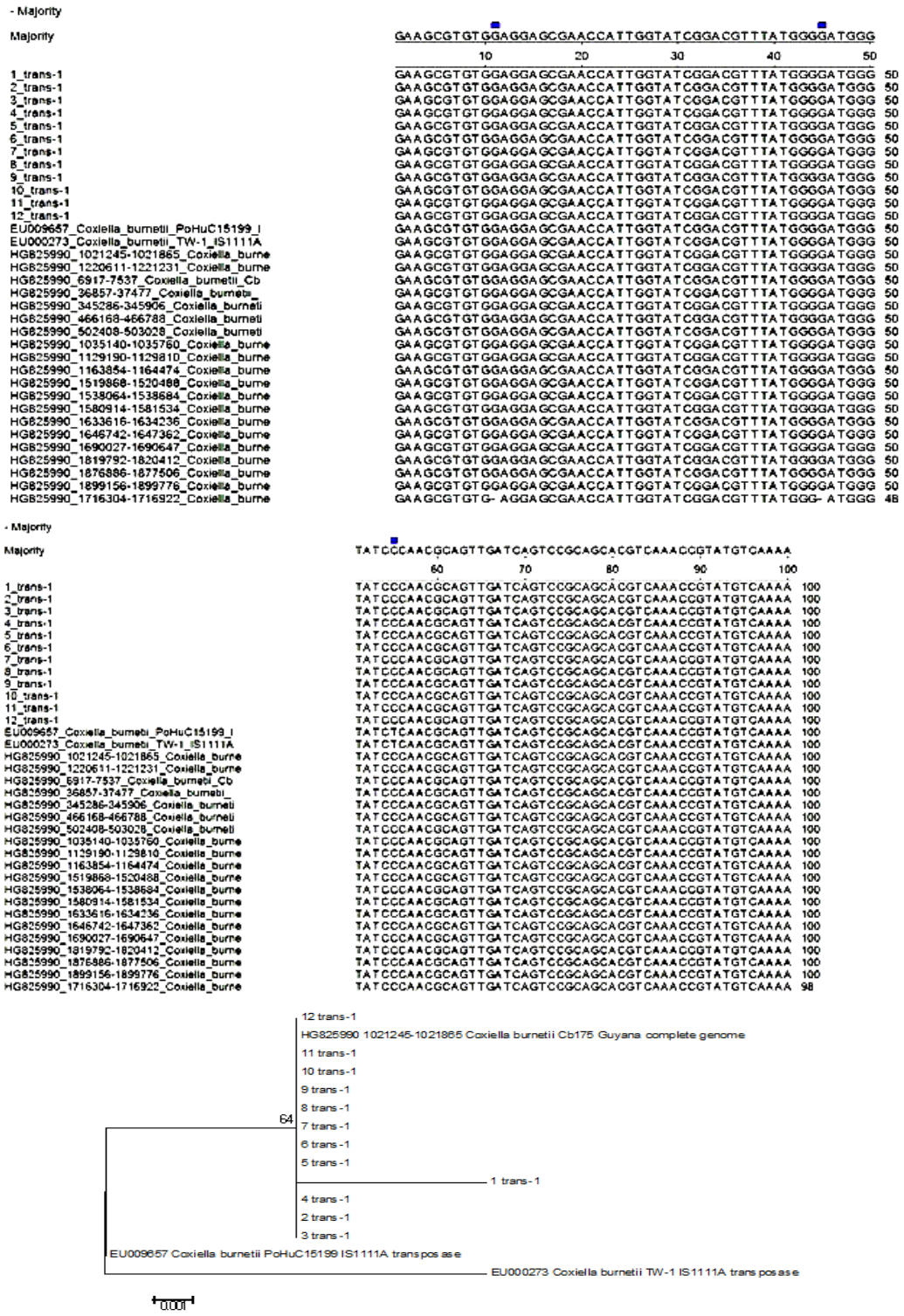


نگاره ۱ـ نتایج PCR : M مارکر شرکت فرمانتاز (۱۰۰bp)
۱- کنترل منفی(باکتری اشریشیاکولای)
۲ـ کنترل مثبت باکتری کوکسیلابورنتی
۷-۳: نمونه‌های مثبت کوکسیلابورنتی

بررسی و مقایسه توالی نوکلئوتیدهای قطعه مورد مطالعه

نتیجه توالی‌یابی‌ها پس از بلاست در دیتابانک NCBI با یکدیگر و جدایه‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد و توالی‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار Bioedit و DNA star آنالیز فیلوژنتیک انجام گردید. سپس توالی مورد هدف با دیگر توالی‌های ثبت شده در NCBI مقایسه و ترسیم درخت شباهت به صورت زیر انجام شد. توالی‌های بدست آمده با توالی‌های ثبت شده در NCBI بالای ۹۹٪ شباهت را نشان داد(نگاره ۲).

بررسی و مقایسه توالی نوکلئوتیدهای قطعه مورد مطالعه با توالی‌های ثبت شده در Gene Bank (بخش اول ژن ترانسپوزان، bp ۱۰۰)



نگاره ۲: درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه همراه با ۳ جدایه از نقاط مختلف جهان

جدول ۳ـ شباهت و تفاوت موجود در توالی‌های جدا شده با جدایه‌های سایر نقاط مختلف جهان

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
1		99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.5	99.2	99.8	99.8	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.8	1
2	0.2		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.7	99.4	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	2
3	0.2	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.7	99.4	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	3
4	0.2	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.7	99.4	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	4
5	0.2	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.7	99.4	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	5
6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.7	99.4	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	6
7	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.7	99.4	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	7
8	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	99.7	99.4	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	8
9	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	99.7	99.4	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	9
10	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	99.7	99.4	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	10
11	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	99.7	99.4	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	11
12	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.7	99.4	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	12
13	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3		99.7	99.7	99.7	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.7	13
14	0.8	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.3		99.4	99.4	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.4	14
15	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.6		100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	15
16	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.6	0.0		99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	16
17	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	17
18	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	18
19	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	19
20	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	20
21	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	21
22	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	22
23	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	23
24	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	24
25	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	25
26	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	26
27	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	27
28	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	28
29	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	29
30	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	99.8	30
31	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	99.8	31
32	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	99.8	32
33	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.8	33
34	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.6	0.0	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		34
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	

1_trans-1
2_trans-1
3_trans-1
4_trans-1
5_trans-1
6_trans-1
7_trans-1
8_trans-1
9_trans-1
10_trans-1
11_trans-1
12_trans-1
EU009657_Coxiella_burnetii_PoHuC15199_I
EU000273_Coxiella_burnetii_TW-1_IS1111A
HG825990_1021245-1021865_Coxiella_burne
HG825990_1220611-1221231_Coxiella_burne
I HG825990_5917-7537_Coxiella_burnetii_Cb
HG825990_36857-37477_Coxiella_burnetii_
HG825990_345286-345906_Coxiella_burneti
HG825990_466168-466788_Coxiella_burneti
HG825990_502408-503028_Coxiella_burneti
HG825990_1035140-1035760_Coxiella_burne
HG825990_1129190-1129810_Coxiella_burne
HG825990_1163854-1164474_Coxiella_burne
HG825990_1519868-1520488_Coxiella_burne
HG825990_1538064-1538684_Coxiella_burne
HG825990_1580914-1581534_Coxiella_burne
HG825990_1633616-1634236_Coxiella_burne
HG825990_1646742-1647362_Coxiella_burne
HG825990_1690027-1690647_Coxiella_burne
HG825990_1819792-1820412_Coxiella_burne
HG825990_1876886-1877506_Coxiella_burne
HG825990_1899156-1899776_Coxiella_burne
HG825990_1716304-1716922_Coxiella_burne

بحث

اگرچه تب کیو به طور اولیه یک بیماری شغلی محسوب می‌شود، اما مصرف شیر وفرآورده های آلوده آن نیز می‌تواند نقش مهمی در اپیدمیولوژی بیماری در انسان داشته باشد. مطالعه ای در آمریکا نشان می دهد تست سرولوژیک کوکسیلا بورنتی در افرادی که از شیر خام استفاده نموده‌اند ۱۰/۷٪ مثبت می‌باشد. اما این میزان در افراد استفاده کننده از لبنیات پاستوریزه، ۰/۷٪ گزارش گردید(۸). همچنین نتایج مشابهی در انگلستان، بلغارستان، اسلواکی واسپانیا گزارش شده است. شیوع کوکسیلا بورنتی در نمونه شیرهای مورد پژوهش در این مطالعه با سایر پژوهش های انجام شده در دنیا، مشابه است. رحیمی و همکاران دوسال ۲۰۰۹ میزان شیوع آلودگی شیر گاو را در استان چهار محال و بختیاری ٦/۲٪ گزارش نمودند (۱۸). هم چنین کارگر وهمکاران در سال ۲۰۱۲ با ارزیابی ۱۰۰ نمونه تهیه شده از شیر گاو در شهرستان جهرم، میزان شیوع آلودگی را ۱۱٪ گزارش نمودند (١٤). ازطرفی مطالعه مشابهی از سوئد در سال ۲۰۰۷ نشان دادکه از ۳۹۹ نمونه شیرگاو جمع آوری شده ازکارخانجات پنیر سازی، ۱۷ نمونه (٤/۷٪) آلودگی به کوکسیلابورنتی دارند(۱۰). در تحقیقی Hendrik و همکاران در بررسی اپیدمیولوژی مولکولی کوکسیلابورنتی در نشخوار کنندگان در هلند و به این نتیجه رسیدند پس زمینه های ژنتیکی از کوکسیلابورنتی در نشخوار کنندگان مسئول شیوع تب کیو در انسان است (۱۳). Astobiza و همکاران در سال ۲۰۱۲ در طی تحقیقی تحت عنوان ژنوتایپینگ کوکسیلابورنتی جدا شده از نشخوار کنندگان اهلی در شمال اسپانیا انجام داده اند و به این نتیجه رسیدند تنوع ژنتیکی قابل توجهی از کوکسیلابورنتی در میان نشخوارکنندگان اهلی در شمال اسپانیا وجود دارد(٤). بشیری بُد و همکاران در سال ۱۹۷٦ به ترتیب حاکی از موارد مثبت آلودگی احشام به کوکسیلا در استان کرمانشاه و نیز در ۷درصد گاو، ۳/۲درصد گوسفند و ۱/۷درصد بز در استان لرستان بوده است(٦). Rehacek در سال ۲۰۰۱ در ۱۲/۲٪ گوسفند، ۹/۷٪ بز و ٤/٤٪ گاو در مناطق جنوبی جمهوری چک آلودگی به کوکسیلابورنتی دارند(۱۹). Muskens و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش نمودند که ۷۸/٦٪ نمونه‌های شیر گاو مورد مطالعه حاوی آنتی‌بادی بر علیه کوکسیلابورنتی می‌باشد. محققین یاد شده نشان دادند که میزان شیوع این باکتری در نمونه‌های بررسی شده به روش واکنش زنجیره ای پلی مراز ٥٦/٦٪ است(۱۷). Banazis و همکاران در سال ۲۰۱۰ شیوع سرمی تب کیو در استرالیا را در گاو۳۲۹ نمونه و گوسفند ۵۰ نمونه به روش الیزا بررسی نمودند و نشان دادند که شیوع در

گاو ۰/۶۱٪ و گوسفند ۰٪ است، این درحالی است که در بررسی مدفوع و ادرار این گاوها به روش PCR به ترتیب شیوع ٤/۳ و ۳/٦٪ و در بررسی مدفوع گوسفندان شیوع ۱۲٪ بوده است(۵). با توجه به حضور باکتری در کشورهای همسایه و همچنین ترکیه و خود ایران، به نظر می رسد کوکسیلابورنتی در سطح این کشورها به سهولت انتقال یافته و همچنین شیوع بالای بیماری در کشورهایی که در جدول صفحه قبل ملاحظه گردید، می‌توان این طور برداشت کرد که گله‌های گاو شیری از مخازن اصلی آلودگی به کوکسیلابورنتی به شمار می‌آیند و مثبت بودن ۱۲٪ گله‌های مورد بررسی ما از این رو تاییدکننده این مطلب است که نتایج ما با نتایج سایر محققین همخوانی دارد و لزوم توجه ویژه به این بیماری کاملاً مشهود می‌باشد. با توجه به مطالب مذکور و براساس نتایج به دست آمده از بین نمونه‌های شیر تانک مخزن مورد بررسی با آزمایش PCR، در مجموع ۱۸ نمونه مثبت از مخزن شیر در آزمایش PCR مثبت بودند و DNA کوکسیلابورنتی در آنها تشخیص داده شد. با توجه به اینکه کوکسیلابورنتی در نشخوار کنندگان کوچک بیشتر از نشخوارکنندگان بزرگ باعث سقط می‌شود. همچنین با مطالعه سایر مقالات تب کیو کمتر از یک درصد عامل سقط جنین در گاو می‌باشد. از تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که توالی کوکسیلابورنتی جدا شده از گاوداری های استان تهران شباهت بالای ۹۹٪ را با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن دارد و باعث رخداد زیان های اقتصادی از جمله سقط و ناباروری در سطح گله و خسارت مالی و جانی باشد و از طرفی می‌تواند از طریق شیرهای آلوده به انسان انتقال یابد. از این رو این تحقیق با بررسی حضور آلودگی در منطقه ایجاد بستری برای انجام تحقیقات بعدی نموده است. در نهایت با وجود همه ی مقالات چاپ شده و تحقیقات انجام گرفته در مورد بیماری تب کیو و یافتن عامل بیماری یعنی کوکسیلابورنتی در تمام نقاط دنیا، با اهمیت به نظر می‌رسد. طبق مقالاتی که در مجله‌های معتبر دامپزشکی به چاپ رسیده و همینطور با مروری بر مطالب عنوان شده در این مطالعه، در کل می‌توان عنوان کرد که گوسفند، بز و گاو سه گونه نشخوار کننده ای هستند که از مخازن اصلی کوکسیلابورنتی در تمام دنیا محسوب می‌شوند. با تأکید بر اینکه درصد آلودگی در گله‌های گاو شیری بیشتر از نشخوار کنندگان کوچک می‌باشد. ضمناً استفاده از محصولات شیر غیر پاستوریزه ریسک بالایی برای انتقال کوکسیلابورنتی به انسان محسوب می‌شود.

تفاوت‌های موجود در توالی جدایه‌های جدا شده با توالی‌های سایر نقاط جهان:در جدایه HG825990-1716304-1716922-Coxiella-burne در جایگاه شماره ۱۱ گوانین حذف شده است.

ـ در جدایه HG825990-1716304-1716922-Coxiella-burne در جایگاه شماره ٤۵ گوانین حذف شده است.

ـ در جدایه EU009657 ، EU000273 در جایگاه شماره ۵۵ به جای سیتوزین، تیمین وجود دارد.

ـ در جدایه EU000273، در جایگاه شماره ۲۲۰ به جای سیتوزین، تیمین وجود دارد.

ـ در جدایه Trans 1، در جایگاه شماره ٤۷۸ به جای تیمین، گوانین وجود دارد.

ـ در جدایه EU009657، EU000273 در جایگاه شماره ۵۲۵ به جای سیتوزین، گوانین وجود دارد.

ـ در جدایه Trans 1,4، در جایگاه شماره ۵۹۵ به جای گوانین وجود دارد.و در بقیه جدایه‌ها گوانین حذف شده است.

ـ در جدایه EU000273، در جایگاه شماره ٦۱۹ به جای تیمین، گوانین وجود دارد.

با بررسی این تفاوت‌ها و شباهت‌ها و با توجه به درخچه فیلوژنتیک ترسیم شده. ۱۱ مورد از جدایه‌ها شباهت ۱۰۰٪ با هم داشته و تنها جدایه ۱ شماره ۱ تفاوت با جدایه‌های جدا شده دارد. و در مورد شباهت جدایه‌ها با جدایه‌های ثبت شده در GENE Bank بیشترین شباهت را با HG825990-1021245-1021865 کشور فرانسه را دارد و بیشترین اختلاف

را با EU000273 دارد. علت تفاوت‌ها بین توالی‌های جدا شده و توالی‌های موجود در ژن بانک به نظر می رسد در اثر جهش یا تأثیر عوامل محیطی باشد و شباهت بین آنها نشان می‌دهد که همه این باکتری‌ها از یک منشاء می‌باشند. در مجموع جدایه‌های جدا شده بیش از ۹۹٪ شباهت را با توالی‌های موجود در GENE Bank نشان دادند. امید است با پیشرفت تکنیک‌های کشت بتوان این باکتری را نیز همانند سایر باکتری‌ها در محیط کشت آزمایشگاهی به طور روتین کشت داد. در آن صورت اطلاعات تکنیکی بسیاری کسب خواهد شد.

تشکر و سپاسگزاری

نگارندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از پرسنل آزمایشگاه مبنا که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند اعلام می‌دارند.

فهرست منابع

۱. راد، م.ع. (۱۳۸۸): بیماری‌های مشترک حیوان و انسان، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران: ۱۲۱ـ۱۱۶.

۲. طباطبایی، ع.ح.، فیروزی، ر. (۱۳۸۹): بیماری‌های باکتریایی دام، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران: ٤٩٩.

3. Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A. (2005): Is Q fever an emergin or re-emerging zoonoses.Vet. Res. 36: 327-350.

4. Astobiza, I., Tilburg, J., Pinero, A., Hurtado, A., García-Pérez, A. L. (2012): Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern spain.BMC.Vet.Res.8:241-249.

5. Banazis, M.J., Bestall, A.S., Reid, S.A., Fenwick, S.G. (2010): Survey of western Australian sheep, cattle and kangaroos to determine the prevalence of *Coxiella burnetii*. Vet .Microb. 143: 337-345.

6. Bashiribod, H., Sixl, W., Stuenzner, D. (1976): Qfever in iran. abstracts of II internationales arbeitskolloqium ueber naturherde von infektionskrankheiten in zentraleuropa. Graz-Austria. 25: 323-6.

7. Bildfell, R.J., Thomson, G.W., Haines, D.M., McEwen, B.J., Smart, N. (2000): *Coxiella burnetii* infection is associated with placentitis in cases of bovine abortion. J. Vet. Diagn. Invest. 12: 419-425.

8. Cerf, O., Condron, R. (2006): *Coxiella burnetii* and milk pasteurization an early application of the precautionary principle. Epidemiol. Infect. 134: 946-951.

9. Delsing, C.E., Kullberg, B.J. (2008): Q fever in the netherlands: a concise overview and implications of the largest ongoing outbreak. Net. J. Med. 66 (9):365-7.

10. Fretz, R., Schaeren, W., Tanner, M., Baumgartner, A. (2007): Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in switzerland. Int. J.Food. Microbiol. 116: 414-418.

11. Gidding, H.F., Wallace, C., Lawrence, G., McIntyre, PB. (2009): Australia's national q fever vaccination program. Vaccine. 27(14): 2037–4114.

12. Gozalan, A., Esen, B., Rolain, JM., Akin, L., Raoult, D. (2005): Is q fever an emerging infection in turkey east mediterr .Health .J. 11(3): 384-91

13. Hendrik, I.J., Robin, C., Jeroen, J.H.C., Tilburg, M.H., Nabuurs-Franssen, C., Klaassen, P.V. (2011): Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in q Fever outbreak, the netherlands. Em. Infect. Dis.17(4):668-675.

14. Kargar, M., Rashidi, A., Doosti, A., Ghorbani-Dalini, S., Najafi., A. (2012): Prevalence of *Coxiella burnetii* in bovine bulk milk samples in southern Iran. Com. Clin. Pathol. 12:1406-9

15. Kirkan, S., Kaya, O., Tekbiyik, S., Parin U. (2008): Detection of Coxiella burnetii in cattle by pcr. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 32(3): 215-220.

16. Maurin, M., Raoult, D. (1999): Q fever. Clin. Microbiol. Rev. 12: 518-553.

17. Muskens, J., Engelen, E., van Maanen, C., Bartels, C., Lam, T.J. (2011): Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. Vet. Rec. 168:79.

18. Rahimi, E., Doosti, A., Ameri, M., Kabiri, E., Sharifian, B. (2009): Detection of *Coxiella burnetii* by nested PCR in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, and caprine herds in Iran. Zoon. and Pub. Heal. 57: 38-41.

19. Rehacek, J., Literak, I. (2001): Coxiellosis among domestic animals in the Czech republic. Vet.Med.Praha. 46(4):54-9.