JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره یازدهم، شماره دوم، ۱۳۹۴، پیاپی ۳۱: ۱۳۴-۱۲۹

بررسی *کوکسیلا بورنتی* به عنوان یکی از عوامل عفونی سقط جنین در نشخوارکنندگان کوچک با روش PCR در استان همدان

محمد خلیلی[۱]، سعید رضا نورالهی فرد[۱]، زینب عبیری[۱*]، حسین عدالتی شوکت[۱]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۲۲ خرداد ۱۳۹۳ *تاریخ پذیرش: ۱۸ آبان ۱۳۹۳*

چکیده

سقط جنین در نشخوارکنندگان به دلایل متعددی رخ می‌دهد و کثرت عوامل ایجاد کننده آن به حدی است که در کشورهای پیشرفته نیز با وجود امکانات تشخیصی پیشرفته، علت تعداد زیادی از موارد سقط جنین ناشناخته باقی می‌ماند. بیشترین عوامل عفونی جدا شده عبارتند از گونه‌های بروسلا، کمپیلوباکتر، لپتوسپیرا، لیستریا، سالمونلا، کلامیدوفیلا، مایکوپلاسما و تعدادی از ویروس‌ها و عوامل قارچی. باکتری کوکسیلا بورنتی نیز به عنوان عامل مسبب سقط در نشخوارکنندگان مطرح است که در ایران کمتر مورد توجه قرار گرفته است. به منظور بررسی نقش کوکسیلا بورنتی در سقط جنین نشخوارکنندگان کوچک در استان همدان از ۳۱ مورد جنین سقط شده از گوسفند و بز، نمونه-هایی از کبد، کلیه و محتویات شیردان جمع‌آوری گردید و با روش PCR، مورد بررسی قرار گرفت که تمام نمونه‌ها از لحاظ حضور DNA باکتری کوکسیلا بورنتی منفی بودند. با توجه به اینکه مطالعه اپیدمیولوژی جامعی در منطقه همدان انجام نگرفته است و در مطالعه‌ی حاضر، آزمایش PCR تنها روی جنین‌های ارجاعی به آزمایشگاه مرکزی شبکه دامپزشکی انجام گرفته و تعداد نمونه نیز محدود بوده لذا با منفی بودن نمونه‌های جنینی این مطالعه، نمی‌توان منطقه مورد مطالعه را عاری از کوکسیلا بورنتی دانست.

کلمات کلیدی: *کوکسیلا بورنتی، سقط جنین، گوسفند، بز، PCR*

**نویسنده مسئول: زینب عبیری*

آدرس: استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۵۹۳۵۰۱۷۸

پست الکترونیک: abiri@vet.uk.ac.ir

مقدمه

پرورش گوسفند و بز در سراسر دنیا در گستره‌ای از نواحی بیابانی و خشک تا نواحی سرد به منظور تولید پشم، شیر و گوشت صورت می‌گیرد (۱). بیماری‌های تولید مثلی و خسارات اقتصادی ناشی از آن، یکی از مشکلات اصلی در صنعت دامپروری است. این خسارات ناشی از سقط، تکرار تلقیح، هزینه‌ی درمان و انتقال عوامل عفونی در بین گله است (۱۴). عوامل متنوعی موجب موارد انفرادی سقط می‌شوند اما مسئله عمده، آن دسته از عوامل عفونی هستند که عمدتا در دو ماه آخر آبستنی منجر به سقط می‌شوند. علاوه بر مسائل اقتصادی، چون بیشتر عوامل منجر به سقط‌جنین به ویژه در گوسفند و بز، عفونی، واگیردار و مشترک بین انسان و دام می‌باشند، لذا اهمیت موضوع از نظر بهداشت عمومی نیز مورد توجه است (۱). بیشترین عوامل عفونی جداشده عبارتند از گونه‌های *بروسلا*، *کمپیلوباکتر*، *لپتوسپیرا*، *لیستریا*، *سالمونلا*، *کلامیدوفیلا*، *مایکوپلاسما* و تعدادی از ویروس‌ها و عوامل قارچی (۱۴). باکتری *کوکسیلا بورنتی* نیز به عنوان عامل مسبب سقط در نشخوارکنندگان مطرح است که در ایران کمتر مورد توجه قرار گرفته است. *کوکسیلا بورنتی*، باکتری داخل سلولی اجباری است و منجر به بیماری مشترک تب کیو می‌شود که در سراسر جهان به جز نیوزلند به صورت اندمیک رخ می‌دهد (۸). مخازن باکتری بسیار وسیع هستند و شامل پستانداران، پرندگان، آرتروپودها به ویژه کنه ها، گربه‌ها و... است. نشخوارکنندگان، مانند گاو ، گوسفند و بز به عنوان منابع اصلی عفونت انسان مطرح هستند این باکتری در دام‌ها معمولا به جز سقط‌های گهگاه، علائم کلینیکی ندارد و اغلب از طریق تنفس آئروسل‌هایی که با ترشحات زایمانی یا ادرار و مدفوع دام‌های مبتلا آلوده هستند، به انسان منتقل می‌شود (۵). در انسان بیماری مزمن تب کیو می‌تواند در ۵ درصد مبتلایان مشکلات و عوارض بالینی جدی مانند اندوکاردیت را در پی داشته باشد (۱۲). هدف از انجام این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری *کوکسیلا بورنتی* در جنین‌های سقط شده در استان همدان است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، از ۳۱ مورد جنین سقط شده گوسفند و بز که جهت تشخیص عامل ایجاد سقط به آزمایشگاه مرکزی اداره کل دامپزشکی استان همدان منتقل شده بود، از کبد، کلیه و محتویات شیردان نمونه‌گیری انجام شد و نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان منتقل گردید. برای انجام آزمایش PCR، DNA نمونه‌ها با روش خانگی فنول- کلروفرم- ایزوپروپانول استخراج گردید. برای اطمینان ازصحت انجام روش استخراج و ارزیابی میزان غلظت DNA به صورت تصادفی جذب نوری چند نمونه توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر قرائت و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ (DNA/protein) نیز تعیین شد.

برای به حداقل رساندن عوامل ممانعت کننده در آزمایش PCR از DNA استخراج شده از رقت ۱:۱۰۰ استفاده شد.

همچنین به منظور اطمینان از انجام واکنش PCR در حضور عوامل مهاری موجود در DNA استخراج شده، یک کنترل داخلی طراحی شد. به این ترتیب که ۱ میکرولیتر از DNA نمونه کنترل مثبت با ۴ میکرولیتر از DNA استخراج شده از یکی از نمونه‌های مورد بررسی مخلوط و همراه با بقیه‌ی نمونه‌ها در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شد. برای تشخیص کوکسیلا بورنتی با

روش PCR، ژن ترانسپوزون (IS1111) باکتری *کوکسیلا بورنتی* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (Cox-F, Cox-R) مورد ردیابی قرار گرفت (جدول ۱) (۱۱). به منظور تایید روش انجام آزمایش PCR و نتایج آن، کنترل مثبت و منفی مورد استفاده قرار گرفت که سویه استاندارد *C. burnetii* Nine Mile RSA 493 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در ادامه محصولات PCR در ژل آگاروز ۱/۲٪ الکتروفورز شده و جهت بررسی حضور باندهای مورد نظر ژل الکتروفورز شده با دستگاه ترانس‌لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

نتایج قرائت جذب نوری تعدادی از نمونه‌های DNA استخراج شده در جدول ۲ مشخص می‌باشد.

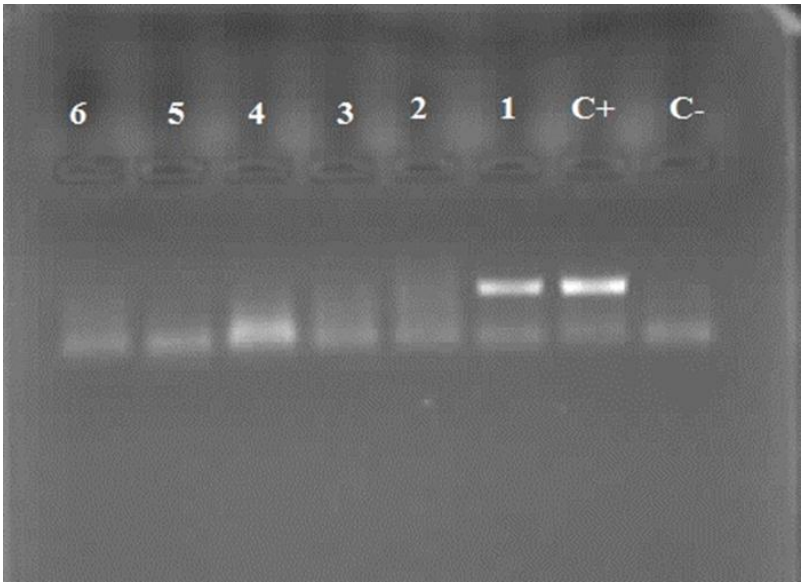
نتیجه آزمایش PCR جهت تشخیص *کوکسیلا بورنتی* در رقت DNA۱:۱۰۰ استخراج شده از ۳۱ نمونه اخذ شده از جنین‌های سقط شده گوسفند و بز، واکنش PCR صورت گرفته بود و عوامل ممانعت‌کننده با تهیه رقت سازی کاهش یافته بودند اما در هیچ یک از نمونه‌ها حضور *کوکسیلا بورنتی* به عنوان عامل سقط جنین تایید نشد (شکل ۱).

جدول ۱: توالی پرایمرهای به کار رفته در آزمایشPCR

پرایمر	سکانس الگوی نوکلئوتیدی ´۳ ⟵ ´۵	اندازه محصول(bp)
Cox-F	GTCTTAAGGTGGGCTGCGTG	۲۹۵
Cox-R	CCCCGAATCTCATTGATCAGC	

جدول ۲: نتایج حاصل از قرائت جذب نوری چند نمونه تصادفی

شماره نمونه	رقت	OD (µg/ml)	۲۶۰/۲۸۰
۱	۱:۱۰۰	۱۴/۹	۱/۷۰
۶	۱:۱۰۰	۱۵/۳	۱/۶۹
۱۲	۱:۱۰۰	۲۲/۱	۱/۶۶
۳۰	۱:۱۰۰	۷/۷	۱/۵۶



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز مربوط به PCR, DNA با رقت ۱:۱۰۰ نمونه‌های سقط جنین،+ C , -C: کنترل مثبت و منفی، ۱:کنترل داخلی، ۲,۳,۴,۵,۶: محصولات PCR مربوط به نمونه‌های سقط جنین

بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی نمونه‌ها با روش PCR، DNA *کوکسیلا بورنتی* در هیچ یک از نمونه‌های گرفته شده از بافت-های کبد، کلیه و محتویات شیردان تشخیص داده نشد. با توجه به اینکه هیچ‌گونه مطالعه اپیدمیولوژی در منطقه همدان انجام نگرفته است بعلاوه در مطالعه‌ی حاضر، آزمایش PCR تنها روی جنین‌های ارجاعی به درمانگاه دانشکده دامپزشکی بدون تاریخچه‌ای از سرولوژی تب کیو انجام گرفته و تعداد نمونه نیز محدود بوده لذا منفی بودن نمونه‌های جنینی در این مطالعه را نمی‌توان دلیلی بر عدم نقش تب کیو در بروز سقط یا عدم حضور باکتری *کوکسیلا* در منطقه مورد مطالعه دانست. همان گونه که در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است در صورت امکان نمونه‌گیری از جنین‌های سقط شده‌ی گله‌هایی که از نظر سرولوژی مثبت باشند احتمال شناسایی DNA *کوکسیلا بورنتی* نیز بیشتر خواهد بود (۳). به هر حال عفونت با *کوکسیلا بورنتی* به عنوان یک عامل معمول سقط در بز در چندین کشور مطرح است و میزان بالای سقط و مرده‌زایی در گله‌های بز مشاهده شده است (۷،۳). در ایران برای بررسی شیوع باکتری *کوکسیلا بورنتی* در مناطق مختلف مطالعات سرولوژیک انجام گرفته و حضور باکتری ثابت شده است، خلیلی و همکاران در کرمان، تمام گله‌های بز را از نظر حضور آنتی‌بادی ضدکوکسیلا مثبت گزارش کردند و از بین ۸۵ نمونه‌ی سرمی که از بین ۱۰ گله گوسفند جمع‌آوری شده بود، در ۲۵ نمونه سرم (۲۹/۴۲٪) آنتی‌بادی ضدکوکسیلا *بورنتی* شناسایی کردند (۸،۹). اسدی و همکاران نیز در طی یک مطالعه سرواپیدمیولوژیک در سال ۲۰۱۲ میزان شیوع *کوکسیلا بورنتی* را در مناطق مرکزی، جنوب‌غربی و غرب ایران به ترتیب ۲۶/۹، ۲۰/۶ و ۱۹/۸ درصد گزارش کردند (۲). این مطالعات بیانگر این هستند که *کوکسیلا بورنتی* در ایران نیز مانند سایر کشورهای خاورمیانه به صورت آندمیک وجود دارد و با توجه به اینکه تب کیو به عنوان یک بیماری مشترک بین انسان و دام دارای اهمیت بهداشت عمومی است، توجه بیشتری جهت کنترل و پیشگیری تب کیو از جنبه بهداشت عمومی و اقتصادی ناشی از سقط گوسفند و بز نیاز است و باید به بزها به ویژه به عنوان مهمترین مخزن کوکسیلا بورنتی توجه خاص شود و حتی الامکان بزها از گوسفندان جدا پرورش داده شوند و به طور کلی باید برنامه ریزی در جهت صنعتی کردن پرورش گوسفند و بز در ایران انجام شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش از لحاظ مالی توسط شورای پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان پشتیبانی شده است، بدین وسیله مراتب قدردانی خود را ابراز می‌داریم.

منابع

۱. قره خانی، ج.، کریمی مخصوص، ا.، صادقی، ب. (۱۳۹۰). بررسی عوامل باکتریایی سقط جنین گوسفندان در استان همدان. *مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی*، دوره ۵، شماره۳، صفحات ۱۴-۹.

2. Asadi, J., Khalili, M., Kafi, M., Ansari-Lari, M., Hosseini, S.M. (2012). Risk factors of Q fever in sheep and goat flocks with history of abortion. *Comparative Clinical Pathology* **23**: 625-30.
3. Aurrica-Bouvery, N., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A. (2003). Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Veterinary Research* **34**: 423-33.
4. Berri, M., Laroucau, K., Rodolakis, A. (2000). The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown

polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* **72**: 293-85.

5. Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P., Rodolakis, A. (2001). Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Veterinary Record* **148**: 502-5.
6. Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A., Seegers, H. (2006). Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk-shedder cows using a Real-time PCR applied to bulk tank milk. *Zoonoses and Public Health* **54**: 191-4.
7. Hendrik, I.J.R., Robin, C.R., Jeroen, J.H.C., Marrigje, H.NF., Corné, H.W.K., Piet, V., René, V.D.B., Daan, D., Willem, W., Marcel, A.H.S., Arco, N. V.D.S., Rob, B., Albert, G.D.B., Peter, Th.J.W., Fred, G., Van. Z. (2011). Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, Netherlands**.** *Emerging Infectious Disease* **17**: 668-74.
8. Khalili, M., Sakhaee, E. (2009). An update on a serologic survey of Q fever in domestic animals in Iran. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **80**: 1031-2.
9. Khalili, M., Shahabi-Nejad, N., Golchin, M. (2010). Q fever serology in febrile patients in southeast Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **104**: 623-4.
10. Khalili, M., Sakhaee, E., Aflatoonian, M.R., Shahabi-Nejad, N. (2011). Herd-prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in dairy cattle farms based on bulk tank milk analysis. *Asian Pacific Journal of Tropical medicine* **4**: 58-60.
11. Klee, S.R., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., Appel, B. (2006). Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of Coxiella burnetii. *BMC Microbiology* **6**: 1-8.
12. OIE terrestrial manual (2010). Chapter 2.1.1.2. Q fever [Internet]. Paris: OIE; [update 2010 may 20; cited 2012]. Available from: http://www.OIE.int. 1-13.
13. Sharma, M., Kumar Batta, M., Chand Katoch, R., Andersen, A.A. (2008). A field investigation of bacterial etiology of abortions among migratory sheep and goats in north-west hill states of India. *Veterinary Archives* **78**: 65-71.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 11, Issue 2, 2015

Detection of Coxiella burnetii as one of the causes of infectious abortions in small ruminants by PCR in the Hamedan province

Khalili, M.[1], Nourollahifard, S.R.[1], Abiri, Z.[*1], Edalati Shokat, S.[1]

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kerman Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Received Date: 12 June 2014 *Accepted Date: 10 October 2014*

Abstract: *Abortion in ruminants occurs for many reasons such that in developed countries despite the relatively complete diagnostic facilities the large number of abortions remains unknown. Most frequently isolated agents include: Brucella spp., Campylobacter spp., Leptospira spp., Listeria spp., Salmonella spp., Chlamydophila spp., Mycoplasma spp. and a variety of viruses and mycotic agents. Coxiella burnetii also cause abortion in ruminants, which is less considered in Iran. To detect the role of Coxiella burnetii in small ruminant's abortion in Hamedan province, 31 samples from liver and kidney and also abomasum contents of aborted fetuses of sheep and goats are taken and test with PCR method. The results of whole samples were negative. Since comprehensive epidemiological study has not been conducted in Hamadan and PCR test was done only on fetus samples referring to the central veterinary laboratories and also the limited number of samples so negative results in this study cannot be the reason for the lack of C. burnetii in the Hamedan province.*

Keywords: *Coxiella burnetii, Abortion, Sheep, Goat, PCR:*

**Corresponding author: Abiri, Z.*
Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kerman Shahid Bahonar University, Kerman, Iran
Tel: +989159350178
Email: abiri@vet.uk.ac.ir