



نشریه آموزشی - پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۲۴، پاییز ۱۳۹۶

صص: ۹-۱۴

بررسی آلودگی به باکتری کوکسیلا بورتنی

در جمعیت شترهای شمال شرق ایران به روش qPCR

• م. ح. جنتی پیروز (نویسنده مسئول)

دانش آموخته دکتری تخصصی بیماری‌های داخلی دام‌های بزرگ، اداره کل دامپزشکی خراسان جنوبی

• غ. محمدی

استاد، گروه علوم درمانگاهی، بهداشت و پیشگیری بیماری‌های دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

• ج. مهرزاد

دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد

• م. عزیززاده

دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، بهداشت و پیشگیری بیماری‌های دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۵۰۳۸۳۲۲

Email: hoseinjannati1357@gmail.com

چکیده:

هدف از انجام این مطالعه، بررسی آلودگی به باکتری کوکسیلا بورتنی (عامل بیماری تب کیو) در جمعیت شترهای شمال شرق ایران می‌باشد. تعداد ۱۶۷ نفر شتر از ۱۱ واحد اپیدمیولوژیکی (استان‌های خراسان رضوی، جنوبی و شمالی) به روش نمونه‌گیری تصادفی خوشه‌ای انتخاب شدند. در مجموع از ۱۶۷ نمونه خون کامل شترها که مورد آزمایش qPCR قرار گرفتند، تعداد ۴ نمونه مثبت مشخص شد. شیوع مولکولی بیماری تب کیو ۲/۴ درصد (۰/۱ تا ۴/۷ درصد، با حدود اطمینان ۹۵ درصد) تعیین گردید. نتایج حاصل از این بررسی ارتباط معناداری بین متغیرها (سن، جنس و مکان نمونه‌گیری) و عفونت در آزمون آماری نشان نداد. نتایج حاصل از این مطالعه حضور ژنوم باکتری کوکسیلا بورتنی و عفونت فعال را در جمعیت شترهای این منطقه اثبات می‌نماید. با توجه به اهمیت اقتصادی، قابلیت انتقال بیماری از دام به انسان، بهداشت و سلامت جامعه در ارتباط با تب Q، لازم است، آزمایش‌ها و اقدامات ضروری برای جلوگیری از گسترش *C. burnetii* و به صفر رساندن خطر ابتلا به تب Q در حیوانات و انسان (به‌ویژه کسانی که در معرض خطرند) در مناطق مهم از لحاظ کشاورزی - محیط‌زیست و جغرافیایی ایران انجام شود.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌های مشترک دام و انسان، سلول‌های یوکاریوت، سلامت عمومی، شتر یک کوهانه، رگرسین لوجستیک،

روش گام به گام عقب‌گرد

Applied Animal Science Research Journal No 24 pp: 9-14

Investigation of *Coxiella burnetii* Infection in Camel Population of Northeast of Iran with qPCR.

By: M. H. J. Pirouz^{1*}, G. R. Mohammadi², J. Mehrzad³, M. Aziz zadeh⁴

1: DVM, DVSc. Iranian Veterinary Organization .

2: Professor, Department of Clinical Science. Ferdowsi University of Mashhad

3: Associated Professor, Department of Pathobiology Science. Ferdowsi University of Mashhad

4Associated Professor, Department of Clinical Science. Ferdowsi University of Mashhad

This survey was conducted to identify of *C.burnetii*s genome in camel population in northeast of Iran. The 167 camels in 11 epidemiological units of study area (Razavi, South and North Khorashan provinces) were selected by random multi-stage cluster sampling. In total, 4 of 167 camels whole blood samples which examined with qPCR were positive 2.4 % (0.1-4.7 % -0.95 % CI). The results of this study indicated that there was not significant difference in factors (age, sex and sampling regions) for incidence of infection. This study showed detection of genome of *C.burnetii*in whole blood samples of camels. Considering the economic, zoonotic and public health importance of Q fever, percussion measures are to be implemented to prevent spreading of *C.burnetii* and zeroing the risk of Q fever in animals and human (especially those who are at risk) in this agro- ecologically and geo-politically important region of Iran.

Key words: Backward stepwise, Eukaryote cells, Logistic regression, One hump camel, Public health, zoonotic.

مقدمه

دامها را مبتلا می‌نماید، مقاوم است، اما اکنون اثبات شده که شترها هم مانند دیگر دامها نسبت به بیماری‌ها و پاتوژن‌ها حساس هستند (Wilson, Araya and Melaku, 1990).

تب کیو^۱ یک بیماری مشترک بین انسان و تعداد زیادی از انواع حیوانات است که به وسیله باکتری کوکسیلا بورتی^۲ (کوکوباسیل کوچک، گرم منفی، هوازی و انگل اجباری داخل سلول‌های یوکاریوت^۳) ایجاد می‌شود (Angelakis and Raoult, 2010). مهم‌ترین راه انتقال باکتری کوکسیلا بورتی از نشخوارکنندگان اهلی به انسان، تنفس آئرسل‌های تولیدمثلی می‌باشد (Angelakis and Raoult, 2010). شیوع بیماری تب کیو در ایران در مناطق و حیوانات مختلف مورد بررسی قرار

با افزایش روزافزون جمعیت جهان و کاهش ذخائر غذایی، بحران غذا مهم‌ترین و جدی‌ترین تهدید زندگی بشر را به وجود می‌آورد. جهت فائق آمدن بر این مشکل استفاده بهینه از منابع غذایی موجود و توجه بیشتر به منابع غذایی که به دست فراموشی سپرده شده الزامی است. شتر به‌عنوان یکی از منابع با ارزش و با کیفیت خوب در تولید گوشت، شیر و دیگر محصولات باید نقش مهم‌تری از آنچه تاکنون داشته را ایفا نماید (Abbas, Saint-Martin and Planchenauct, 1993). بنابراین باید نسبت به افزایش کمی و کیفی تولیدات این دام همت گذاشت. توجه به مدیریت بهداشت و شیوع بیماری‌ها در شتر اهمیت و توجه بیشتری را می‌طلبد. در گذشته اعتقاد بر این بود که شتر نسبت به بیماری‌هایی که دیگر

¹Q fever
²*Coxiella Burnetii*
³ Eukaryote

استخراج DNA از سلول‌های یوکاریوت در خون کامل، نمونه‌های بافتی و پلت‌های سلولی را فراهم می‌کند. استخراج DNA براساس پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده انجام گرفت.

انجام آزمایش qPCR: جهت انجام آزمایش از کیت CoxiellaBurnetiigenesig® Standard Kit ساخت شرکت Primerdesign کشور انگلیس با ظرفیت ۱۵۰ واکنش PCR استفاده گردید. حجم نهائی واکنش PCR طبق توصیه شرکت سازنده برای هر نمونه ۲۰ میکرولیتر بود

تجزیه و تحلیل آماری

شیوع مولکولی بیماری با حدود اطمینان ۹۵ درصد به‌طور کلی و برای سطوح هریک از متغیرهای مورد مطالعه به تفکیک محاسبه شد. رابطه‌ی سن، جنس و شهرستان محل نمونه‌گیری با میزان شیوع مولکولی توسط آزمون آماری کای‌مربع^۸ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. متغیرهایی که به احتمال ۰/۲ با آلودگی ارتباط داشتند، وارد مدل رگرسیون لوجستیک^۹ شدند. روش گام به گام عقب‌گرد^{۱۰} برای انتخاب متغیرهایی که به احتمال ۵ درصد با آلودگی ارتباط داشتند، استفاده شدند.

نتایج

از میان ۱۶۷ نفر شتر که مورد آزمایش qPCR قرار گرفتند، ۴ نفر شتر از نظر وجود باکتری کوکسیلا بورتی مثبت شدند و شیوع مولکولی ۲/۴ درصد (۰/۱ تا ۴/۷ درصد، با حدود اطمینان ۹۵ درصد) به‌دست آمد (نمودار ۱).

تمام چهار نمونه‌هایی که از نظر مولکولی مثبت بودند از جنس ماده بودند و سن بالای ۳ سال داشتند (۱ مورد ۳ تا ۷ سال و ۳ مورد بالای ۷ سال). رابطه‌ای بین سن، جنس و مکان با آلودگی مولکولی وجود نداشت.

گرفته است. به‌طور مثال در گله‌های گاو شیری در شمال‌شرق، در گوسفند و بز در خراسان رضوی و گوسفند در کرمان (Azizzadeh, et al., 2014; Keyvani Rad, et al., 2010; Sakhaee and Khalili, 2010). شیوع بیماری در جمعیت شتر کشور فقط در یک مطالعه در استان اصفهان با آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معمولی^۴ مورد بررسی قرار گرفته است (Doosti, Arshi and Sadeghi, 2012). بنابراین در جمعیت شتر کشور، مطالعه خاص و وسیعی در ایران انجام نشده است. تعیین وضعیت شیوع و پراکنش بیماری تب‌کیو در جمعیت شترهای ایران نیاز به مطالعات پایه‌ای و گسترده دارد تا برای پیشگیری بهتر و مناسب‌تر این بیماری تصمیم‌گیری شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

نمونه‌گیری با استفاده از روش تصادفی خوشه‌ای چندمرحله‌ای^۵ صورت گرفت. به این شکل که از میان شهرستان‌های استان‌های خراسان تعدادی به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. در این شهرستان‌ها، تعدادی گله شتر و در هر گله تعدادی شتر به شکل تصادفی انتخاب و عمل خون‌گیری از آن‌ها به‌عمل آمد. مجموعاً تعداد ۱۶۷ نمونه خون کامل از شترهای ۱۱ شهرستان سه استان خراسان دریافت شد. از هر دام ۱۰ میلی‌لیتر خون دریافت و در لوله آزمایش فاقد ماده ضدانعقاد ریخته شد. سپس خون کامل در دو میکروتیوب^۶ ۱/۵ میلی‌لیتری تخلیه شده و شماره نمونه با مژیک روی میکروتیوب نوشته شد. میکروتیوب‌ها در فریزر و در برودت ۲۰- درجه سلسیوس منجمد و تا زمان انجام آزمایش‌های موردنظر در فریزر ۸۰- درجه نگه‌داری شدند.

مراحل انجام آزمایش qPCR

استخراج DNA: جهت استخراج DNA از کیت تجاری MBST^۷ ساخت مؤسسه گروه پژوهشی انتقال سامانه‌های زیست مولکولی تهران، استفاده شد که روشی سریع و ساده جهت

⁴ Conventional polymerase chain reaction

⁵ Multi stage cluster sampling

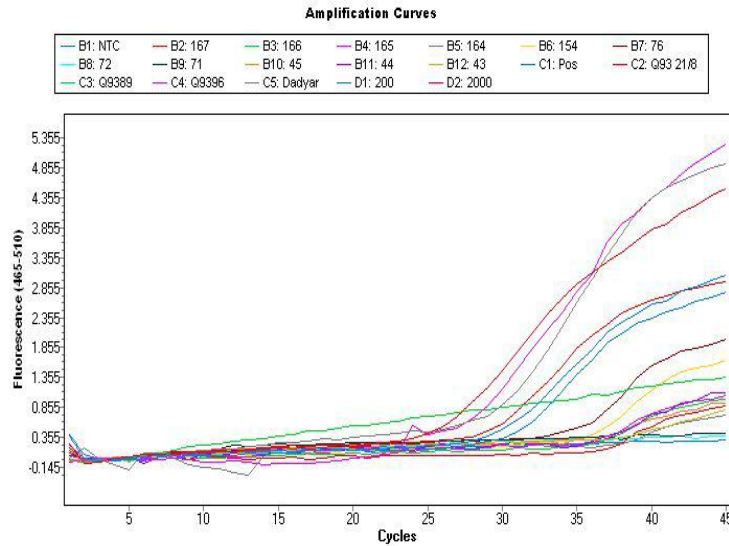
⁶ Microtib

⁷ Molecular biological system transfer

⁸ Chi-Square

⁹ Logistic regression

¹⁰ Backward stepwise



نمودار ۱: منحنی‌های تکثیر حاصل از آزمایش qPCR که نشان‌دهنده موارد مثبت می‌باشند

بحث

حاضر حساسیت و ویژگی کمتری دارد و می‌تواند بر نتایج حاصله تاثیرگذار باشد.

در مطالعه‌ای که توسط رحیمی و همکاران (۲۰۱۱) انجام گرفت، روش PCR آشیانه‌ای^{۱۱} روی ۷۰ نمونه شیر مخزن از ۲۲ گله شتر شیری در استان اصفهان جهت شناسایی ژنوم باکتری کوکسیلا بورتنتی انجام شد، یک نمونه از ۷۰ نمونه مثبت (۱/۴ درصد)، اثبات‌کننده حضور بیماری در جمعیت شترها و دفع باکتری در شیر شترها می‌باشد (Rahimi, et al., 2009).

در مطالعه‌ای منصور و همکاران (۲۰۱۵)، در کشور عربستان، ۸۲ نمونه خون کامل شترها را مورد آزمایش Nested-PCR قرار دادند و ۱۵/۸ درصد مثبت گزارش شد که بالاتر از نتیجه مطالعه حاضر است (Mansour, et al., 2015). تفاوت شرایط بررسی، تراکم شترهای دو کشور و مدیریت مختلف نگهداری شتر، می‌تواند از عوامل اختلاف در نتایج دو مطالعه باشد.

با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر پیرامون شیوع مولکولی که نشان‌دهنده حضور فعال باکتری کوکسیلا بورتنتی در جمعیت

تنها مطالعه جهت بررسی شیوع تب کیو در جمعیت شترها در ایران توسط دوستی و همکاران (۲۰۱۱) انجام گرفته است. در این مطالعه ۱۳۰ نمونه خون کامل شترهای کشتار شده در کشتارگاه-های استان اصفهان با استفاده از روش آزمایشگاهی PCR معمولی^{۱۱} مورد آزمایش قرار گرفتند. شیوع مولکولی ۱۰/۷ درصد گزارش شده است (Doosti, Arshi and Sadeghi, 2012). اختلاف نتایج مطالعه فوق با بررسی کنونی را می‌توان بدین علت دانست که در مطالعه حاضر نمونه‌گیری میدانی بوده و از گله‌های شتر حاضر در واحدهای اپیدمیولوژیک به صورت تصادفی تعدادی شتر انتخاب شده است و در نمونه‌گیری انجام شده توزیع سنی رعایت شده است. اما در مطالعه دوستی و همکاران، (۲۰۱۱)، نمونه‌گیری کشتارگاهی بوده و احتمال کشتار شترهای با سن بالا مطرح می‌باشد. بدیهی است با افزایش سن احتمال برخورد با باکتری افزایش می‌یابد. به علاوه روش آزمایشگاهی PCR معمولی که در بررسی محققین فوق استفاده شده است، نسبت به روش qPCR به کار گرفته شده در مطالعه

¹¹ Conventional PCR

¹² Nested-PCR

