بررسی زنومی کوکسیلا بورنتی در شیر خام و غیرپاتوبوژیک گاو در مراکز فروش لبنیات سنتی شهرستان خرم‌آباد استان لرستان در سال ۱۳۹۲

چکیده

پژوهشی مشترک با انشار و سیع است که به‌وسیله یک ارگانیسم داخل سلولی اجباری به نام کوکسیلا بورنتی ایجاد

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی توصیفی در مجموع 120 نمونه از تانک‌های شیر خام و غیرپاتوبوژیک گاو مراکز فروش

نکات‌های مهم: جمع آوری نمونه‌های شیر خام و غیرپاتوبوژیک گاو (15/12 درصد) از نظر کوکسیلا بورنتی مشتاق

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد تانک‌های دیگر شیر خام و غیرپاتوبوژیک گاو مراکز فروش لبنیات سنتی یک

آدرس مکاتبه: لرستان. خرم‌آباد. دانشگاه لرستان. دانشکده دامپزشکی. گروه پاتوبیولوژی.

نکات‌های کلیدی: تب کیو، شیر خام، واکنش زنجبیل‌های پلیمرز آشیانه‌ای، خرم‌آباد.

پست الکترونیک: nematshams1386@yahoo.com
مقدمه
تب کیوی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و دام
با کاسترت جهانی است که توسط نوع باکتری
کوکسیلا، گرو دو و داخل سلولی اجباری به نام
کوکسیلا برونی ایجاد می‌شود. این باکتری نسبت به
عوامل فیزیکی و شیمیایی نظیر جریان خارط بیالو
بخشی مقاوم بوده و در بیماری‌زا زایی پایین دارد (1) و
بدين جهت از سوی مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها
در گروه B سلماهای بیولوژیک میکروبی (CDC)
طبقه‌بندی شده است (2).)
مختصر اولیه و عمل انتشار بیماری در بین حیوانات
و حشرات، تعداد زیادی از این بیمار غیرشیب و
گوسفن و با کمیت کم‌تر در چنین حیواناتی قابل
ملاحظه می‌باشد. بنابراین، بیماری در حیوانات
مادری نیز برای نمونه‌گیری از استادی و در اقدام شد.

مواد و روش‌ها
جمع‌آوری نمونه
در این مطالعه مقطعی- توصیفی از آبان تا آذرما سال
1394 در مجموع تعداد 120 نمونه از این‌ها ذخیره
شده و غیربیماری‌زده کاملاً 120 مرکز فروش لیبلیت
ستی سطح شهرستان خرم‌آباد جمع‌آوری شد. آدرس و
مشخصات کلی مراکز فروش لیبلیت سنتی شیرستان
خمیرآباد از اثبات اضافی و مرکز بهداشت شیرستان خمیرآباد
به دو دانشگاه تحقیقاتی دانشگاه دانشگاه تحقیقاتی
انقراض و به‌منظور مراحل بعدی، نمونه‌ها در صورت مفعی

20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA
جفت استخراج DNA زنوتی کوکسیلا برونی در
نمونه‌ها از روش بروی و همکاران استفاده شد (12). میدین
منظور کپ میلی‌لیر از نمونه شیر را در میکروتیپ ریخته

مرکز ژنتیکی کوکسیلا برونی در شیرخانم و غیربیماری‌زده گاو…
بررسی زنونی کوکسیلا بورمنی در شیر خام و غیرپیامدهای گاو

میکروانیتر رسانه‌شده شد در ادامه میکروانیترها، در درست‌گاه

ترموسایکر (Primus 96, Germany) با برنامه‌های که

در جدول شماره یک نشان داده است قرار داده شد.

برای انجام مرحله دوم واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

آشیانه‌ای از پراپرهای 3 و 4 OMP استفاده شد.

در این مرحله مه شرایط از قبیل مخلوط واکنش گر های و برنامه زمانی و دمای مطلق مرحله اول اجرا شد

با این تفاوت که الگو در این مرحله ۲ میکروانیتر از محوال مرحله اول بوده است که به روش PCR محصول/PCR مرحله اول بوده است که به نسیمیت ۱ به

۲۰۰ رقیق /PCR. الکترافور مزور از PCR

از مرحله دوم توسط دستگاه الکترافورز (SinaClon, Iran) انجام شد.

(Mage, England) انجام شد.

زوال‌ها با استفاده از دستگاه زل داک

مورد بررسی قرار گرفتند.

در این بررسی از DNA زنونی کوکسیلا بورمنی

Genek Biotechnology AG, Germany Ref. (Number: K047)

به عنوان کنترل منبیت استفاده شد.

PCR کنترل منبیت شامل مخلوط کلیه واکنش گرهای بدون حضور DNA نزدیک گرفته و به جای آب

مقطع استریل به میکروانیتر اضافه شد.

و در دور g ۱۳۰۰۰ به مدت ۶۰ دقیقه سانتی‌فریوز گردید و

پس از جاده‌سازی جریجو بر میکروانیتر با آب مقطر

استریل شستشو داده شد. پس از جاده‌سازی جریجو شیر، از

کیت (Gene All cell SV mini 250) ۵۰۰ میکرون مورد آزمایش قرار گرفت.

استریل جریجو تا زمان انجام PCR در دمای منفی

۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

Nested-PCR

برای بررسی حساسیت DNA کوکسیلا بورمنی در نمونه‌ها

از آزمایش - PCR استفاده شد. توالی نواکتوری

بکر (Bacteroides fragilis) از یک کپنک سلبی خارجی

با رزگذاری می‌کند بر اساس مطالعات فرانت و همکاران

(۳۱) و زانگ و همکاران (۳۲) انتخاب و انجام گرفت.

قطعات نتایج یافته و توالی پراپرهای در جدول ۱

نشان داده شده است. جهت انجام PCR در مرحله اول ۹

میکروانیتر مسیر میکروانیتر (Ampliqon C Denmark)

میکروانیتر نمونه مشکوک و یک میکروانیتر از

پراپرهای OMP2 و OMP1 با غلظت ۱۰ پیکومول

استفاده گردید و سپس با آب دوپه شده حجم نهایی به

جدول 1. پراپرهای مورد استفاده برای بررسی زنونی کوکسیلا بورمنی در نمونه‌های تانک ذخیره شیر خام و غیرپیامدهای گاو در مراکز

فرش لیبتیتی سنتی-ظری آباد

<table>
<thead>
<tr>
<th>فاز</th>
<th>سکاس (۳-۴)</th>
<th>پراپرهای (匽)</th>
<th>قطعات (匽)</th>
<th>پلاکت (匽)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>اول</td>
<td>F-AGT AGA AGC ATC CCA AGC ATT</td>
<td>OMP1</td>
<td>501</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>R-TGC CTG CTA GCT GTA ACG ATT G</td>
<td>OMP2</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>F-GAA GCG CAA CAA GAA GAC CAC</td>
<td>OMP3</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>R-TTG GAA GTT ATC ACG CAG TTG</td>
<td>OMP4</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>دوم</td>
<td>۷۴</td>
<td>۳دقیقه</td>
<td>واشرت اولیه</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>۹۴</td>
<td>۴دقیقه</td>
<td>واشرت اولیه</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>۵۵</td>
<td>۴دقیقه</td>
<td>واشرت اولیه</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>۷۴</td>
<td>۴دقیقه</td>
<td>واشرت اولیه</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>۷۲</td>
<td>۴دقیقه</td>
<td>واشرت اولیه</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>۲۲</td>
<td>۴دقیقه</td>
<td>واشرت اولیه</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>۳۰</td>
<td>چرخه دمایی</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>۳۱</td>
<td>چرخه دمایی</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>۳۲</td>
<td>چرخه دمایی</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>۳۳</td>
<td>چرخه دمایی</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
نتایج حاصله از زل الکتروفورز محصولات مرحله دوم نشان داد که از مجموع 120 نمونه تاک Nested PCR شیر خام و غیرباستیوزی ظهوری شده در مراکز فروش لبنیات سنتی شهرستان خرم‌آباد (نمونه 9/7/15) استفاده می‌کرد. نظر دو تک تک اختصاصی زن 1Comi در گروه بر روی مثبت بودند. در کلیه نمونه‌های مثبت باند مشاهده شد (شكل 1). داده‌های به دست آمده به کمک نخه 19 نرم‌افزار اسپس با استفاده از آزمون مربع کای با حدود 95 درصد اطمینان مورد تجربه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

![شکل 1: نتایج Nested PCR منفی (نمونه‌های منفی) منفی.](image)

### بحث و نتیجه‌گیری

تب کیو به عنوان یک زمینه نویدیده و باید پدید در بسیاری از کشورهای اجمع ایران مطرح می‌باشد. اگرچه این بیماری جنیه شگلی داشته و در افرادی که در ناسی با حیوانات و محصولات آنها هستند، فراوانی بیشتری دارد، اما با توجه به مقادیر بالای عامل بیماری در محیط و انتقال و راز، امکان پذیری سایر افراد جمعیت نیز وجود دارد و امرزه به عنوان یکی از مخاطرات مهم سلامتی انسان به صورت طبیعی و غیرطبیعی (بیوتوریسم) مطرح می‌باشد. مطالعه‌ای در آمریکا نشان می‌دهد تست سرولیزیک نسبت به کوکسیل بهترین منفی 10/7 درصد از افرادی که از شیر خام مصرف کردها مثبت بوده است.
در 28/9٪ نمونه تاکیدکننده ذخیره شیر مورد بررسی، بیدا
شد (24). در مطالعه کم که در سال 1392، بویژه اینگلی و
همگان روا 307 نمونه تاکید شیر انجام شد (6٪/81/4٪ از
نمونه‌ها دارای آنتی‌باید کوکسیلا بورنتی با روش الایزا
بودند و DNA کوکسیلا بورنتی در 3/18٪ از نمونه‌ها با
نشخچ داده شد Real - time PCR استفاده از روش

(25).

از دلایل اختلاف بین شیوع کوکسیلا بورنتی در
نمونه‌های شیر در مناطق مختلف، می‌توان به گونه‌های
میزبانی، قصل و منظومه جراحی می‌باشد. روش انجام
ازمایش، نوع و اندازه و روش نمونه‌گیری اشاره کرد. در
گله‌های گاو بدون علامت عفونت کوکسیلا بورنتی مختصاً در
شیر دفع می‌شود، این ممکن است برای جنگل‌های ماه
باقی بماند و ممکن است به طور منظم صورت بگیرد.
درنتیجه این امر به‌pływ‌باداری ایجاد می‌شود. در می‌توان
برای انتقال این بیماری در نظر گرفت. همچنین
فصل نیز در بروز عفونت کوکسیلا بورنتی در حیوانات
تأثیرگذار است به طوری که در زاین سپاری از موارد تب
کبوتری در حیوانات در زمستان گزارش شده، از سوی دیگر
بیشتر موارد حیوانات در آلما در فصل تابستان و در
قیس فصل پاییز گزارش شده است (27،28).

متأسفانه اطلاع دقیقی در مورد شیوع تب کبوتر در
ایران وجود ندارد. زیرا برای کنترل گزارش‌های در سپیتم
سالنامه‌ی ایران محدود می‌شود و به علت مصرف شیر
خام و مصرف فراورده‌های آن در کشور، احتمالاً بروز
ت تب کبوتری دارد که در این جمعیت تا تیم آن‌ها تبدیل
شده کاملاً کبوتری در ایران در لزوم است اقدامات
متناسب انجام شود. از آنجا که تولید فراورده‌های
لبنی در ایران در کارگاه‌های کوکسیلا فاقد مجوز
بهداشتی بوده و در این کارگاه‌ها از شیر خام یا پاستوریزه
نشده استفاده می‌شود، لذا نهی‌ی که واکسن مناسب

29 نمونه شیر خام مخلوط بر منفی گزارش گردید در حالی که
از 359 نمونه شیر مخلوط گاو 17 نمونه (24/7٪) مشتبه
شدند (13) که نتایج به دست آمده از مطالعه ما
همخوانی دارد.

در سال 1392، در مطالعه خامی و همگان که
روی 80 نمونه شیر خام جمع‌آوری شده از گلوهای شیری
عصبی انجام گردید، 25٪ نمونه‌ها از نظر کوکسیلا
بیماری مشتبه بودند (18). در مطالعه دیگری که توسط
خامی و همگان در سال 1392، روی 120 نمونه شیر
گاو در بنام انجام شد، 20/16٪ نمونه‌ها مشتبه بودند
(19). لازم به ذکر است که در هر دو مطالعه از روش
بر روی شیر هر روز گاو استفاده شده است که به ترتیب
عصبی و زیرهای عصبی یا ناشناخته، برای دلیل تفاوت در
نمونه‌برداری مطلوب نداشت. در همین راستا در مطالعه
کیمی و همگان در سال 2016، ارائه مشابه
کوکسیلا بورنتی در شیر خام جمع‌آوری گل‌های گاو
کبوتری سیبیار بالاتر و بیش از ۹۰ دصد گزارش گردیده
است (26). در سال 1394 در مطالعه‌ی پیم، گاو و
همگان که به منظور تعیین شیوع کوکسیلا بورنتی در
شیر گاو، یک بیماری مصنوعی شده بود، از مجموع
50 نمونه تاکید ذخیره شیر گاو 6٪ نمونه‌ها مشتبه شد (21).

در سال 1391، گیورانک و همگان مطالعه‌ی در کشور
مجری‌انداز رون 315 نمونه گرفته ذخیره شیر انجام
دادند که 66/7٪ از نمونه‌ها از نظر وجود کوکسیلا بورنتی
مشتبه بودند (26). در مطالعه بی‌پورور و همگان در سال
1393، 20 از همان مجموع 130 نمونه ذخیره شیر
PCR 7٪ آنها از نظر حضور زنون کوکسیلا بورنتی با
مشتبه بودند (27). در مطالعه‌ی در سال 1392 که توسط
اوسا و همگان در عربستان سعودی رون حیوانات
مختل از جمله شیر، گاو و گوشت ذخیره شده بود، 16
PCR عدد از 148 نمونه شیر از گل‌های مختلف، آزمایش
آنها مشتبه شد و در نمونه‌های گاو
کوکسیلا بورنتی DNA
برای گروه‌های پرخطر می‌تواند روشی کنترل مناسبی بوجود و از طرف دیگر اجباری شدن استاندارد جستجوی کوکسیلا برونتی در شیر ضروری به نظر می‌رسد.

نتایج مطالعه حاضری بانگر آلودگی پایین تانک‌های ذخیره شیر گاو (5/1 درصد) به کوکسیلا برونتی در شهرستان خرم‌آباد است. این بررسی نشان میدهد تانک‌های ذخیره شیر خام و غیرپاستوریزه گاو در مراکز فروش لبنیات سنتی یک میزان مهم کوکسیلا برونتی در شهرستان خرم‌آباد می‌باشد و با توجه به اینکه درای تهیه فراورده‌های لبنیاتی از شیر خام پاستوریزه نشده استفاده می‌شود و به دلیل عدم پاسوریزاسیون امکان
References


Genomic Detection of *Coxiella burnetii* in Raw and Unpasteurized Cow Milk of Traditional domestic dairy products Vendors in Khorramabad, Lorestan Province in 2015

Etemadfar L¹, Shams N², Jaidari A ²
1. MSc of Bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran. nematshams1386@yahoo.com

Received: 10 April 2017  Accepted: 2 May 2017

**Abstract**

**Background:** Q fever is a widespread zoonotic disease that is caused by obligate intracellular bacteria, *Coxiella burnetii*. Raw milk or dairy products that are produced from unpasteurized milk may contain virulent *Coxiella burnetii*. The objective of this study was to determine the prevalence rate of *C. burnetii* in raw and unpasteurized cow bulk tank milk samples of traditional domestic dairy products vendors in Khorramabad, Iran.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional study a total of 120 raw and unpasteurized cow bulk tank milk samples in traditional domestic dairy products vendors were collected from October 2015 to November 2015 and tested for *C. burnetii* used a nested PCR assay.

**Results:** In this survey, 9 out of 120 (7.5%) raw and unpasteurized cow bulk tank milk samples were found PCR positive for *C. burnetii*.

**Conclusion:** The Results of this study indicate that raw and unpasteurized cow bulk tank milk samples in traditional domestic dairy products vendors are an important source of *C. burnetii* infection in Khorramabad.

**Keywords:** Nested PCR, Q-fever, Raw milk, Khorramabad.