Short Communication

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 2 (05-2015)

Journal homepage: www.ijmm.ir

# Genomic detection of *Coxiella burnetii* in cattle milk samples by Nested-PCR method, Iran

Peyman Khademi[1], Amin Jaydari[2] , Mahmoud Esmaeili[3]

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Iran.
2. Department of microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan university, Khorramabad, Iran.
3. Department of Food Hygiene and Quality, Shahrekord University, Iran.

## *Article Information*

**Article history:**
Received: 2014/11/09
Accepted: 2015/01/03
Available online:2015/06/10

**Article Subject:**
Zoonotic Diseases

**IJMM 1394; 9(2): 69-72**

**Corresponding author at:**

**Mr. Peyman Khademi**

**Pathobiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Iran.**

**Email:**
**khademi@stu.sku.ac.ir**

## *Abstract*

**Background and Aim:** Q fever is a febrile disease which may be appeared as abrupt symptoms such as chills, pain behind the eyes (retrobulbar), malaise, disorder, and profuse perspiration. Since this bacterium is mostly common in animals and it is possible to transfer it from contaminated milk, this study aimed to determine the prevalent rate of *Coxiella burentii* in raw milk samples obtained from dairy cattles in AjabShir-Iran.

**Materials and Methods:** This study was carried out from May 2014 to October 2014. Eighty milk samples were collected from 8 dairy cattle breeding complexes and the diagnosis of *Coxiella burnetii* was confirmed by Nested-PCR method.

**Results and Conclusion:** In this study, 20 out of 80 milk samples (25%) were positive in terms of Coxiella *burnetii*. Considering the importance of the bacterium, *Coxiella burnetii*, rapid and accurate diagnosis is of great significance. Molecular techniques, due to its high accuracy and high speed, are mostly effective in the diagnosis. The localization of molecular techniques in the diagnosis of Q fever is highly recommended. The results indicated that Cattle's milk could be a potential reservoir of *C. burnetii* in Iran.

**Key Words:** Q fever, *Coxiella burnetii*, Cattle, Nested- PCR.

Copyright © 2015 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

**How to cite this article**:

khademi P, Jaydari A, Esmaeili Koutamehr M. Genomic detection of Coxiella burnetii in cattle milk samples by Nested-PCR method, Iran. Iran J Med Microbiol. 2015; 9 (2) :69-72

مقاله کوتاه

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۹ – شماره ۲ – تابستان ۱۳۹۴

Journal homepage: www.ijmm.ir

# جستجوی ژنومی *کوکسیلا بورنتی* در شیر گاو به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای، ایران

پیمان خادمی[۱]، امین جایدری[۲]، محمود اسماعیلی کوتهمر[۳]

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۳. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، ایران.

***اطلاعات مقاله***

**تاریخچه مقاله**

**دریافت:۱۳۹۳/۰۸/۱۸**

**پذیرش:۱۳۹۳/۱۰/۱۳**

**انتشار آنلاین:۱۳۹۴/۰۳/۲۰**

**موضوع:**

بیماریهای مشترک انسان – دام

**IJMM 1394; 9(2): 69-72**

**نویسنده مسئول:**

**آقای پیمان خادمی**

**گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران.**

**تلفن:** ۹۸۹۱۶۹۶۹۷۱۴۸

**پست الکترونیک:**

**khademi@stu.sku.ac.ir**

## چکیده

**زمینه و اهداف:** تب کیو بیماری تب‌دار ریکتزیائی است که ممکن است با نشانه‌های ناگهانی مانند لرز، درد پشت چشم، ضعف، کسالت و تعریق شدید تظاهر نماید. با توجه به اینکه این باکتری در دامها شایع هست و امکان انتقال این باکتری از طریق شیرهای آلوده وجود دارد، این مطالعه با هدف تعیین میزان شیوع *کوکسیلا بورنتی* در نمونه هائ شیر خام جمع‌آوری شده از گاوهای شیری عجب شیر – ایران انجام گردید.

**مواد و روش کار:** این مطالعه از اردیبهشت ماه ۱۳۹۳ تا آبان ۱۳۹۳ انجام شد. در مجموع ۸۰ نمونه شیر از ۸ مجتمع پروش گاو شیری جمع‌آوری و از نظر حضور *کوکسیلا بورنتی* به روش Nested-PCR مورد آزمایش قرار گرفتند.

**یافته‌ها و نتیجه گیری:** در این مطالعه در مجموع ۲۰ نمونه از ۸۰ نمونه شیر(۲۵ ٪) از نظر *کوکسیلا بورنتی* مثبت بودند. با توجه به اهمیت باکتری *کوکسیلا بورنتی*، تشخیص سریع و دقیق آن بسیار حائز اهمیت است. تکنیک‌های مولکولی به علت دقت بالا و سرعت زیاد در روند تشخیص می‌تواند بسیار موثر باشند. لذا بومی سازی تکنیک‌های مولکولی در کشور جهت تشخیصی عامل تب کیو توصیه می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد که شیر گاو می‌تواند یکی از مخازن بالقوه *کوکسیلا بورنتی* در ایران باشد.

**کلمات کلیدی :** تب کیو، *کوکسیلا بورنتی*، گاو، Nested- PCR

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

## مقدمه

عامل بیماری، *کوکسیلا بورنتی* که در خانواده ریکتزیاسه قرار دارد، کوکوباسیل پلی‌مورفیک، گرم منفی و داخل سلولی اجباری با اندازه در حدود ۰/۳ تا ۰/۷ نانومتری است (۱، ۲). بعضی از جنبه های همه گیری شناختی این بیماری ممکن است از کشوری به کشور دیگر متفاوت باشد، بطوری که در کانادا بیشتر به شکل پنومونی و در فرانسه به صورت هپاتیت تظاهر می‌نماید و در اسپانیا هر دو حالت بیماری شایع است و تفاوت چهره های بالینی بیماری، انعکاسی از نحوه انتقال *کوکسیلا بورنتی* می‌باشد به طوری که مصرف شیر آلوده بیشتر منجر به هپاتیت و استنشاق افشانه‌های آلوده بیشتر باعث ایجاد پنومونی می‌شود (۳، ۴)

هرچند این بیماری در بیشتر نقاط دنیا گزارش شده است، ولی میزان بروز واقعی آن به دلیل خفیف بودن نشانه‌های بالینی

بسیاری از موارد آن و مشکلات تشخیص بالینی و آزمایشگاهی، کمتر از موارد گزارش شده است. بیماری در بعضی از نواحی که مخازن حیوانی آن وجود دارد به صورت بومی شایع بوده و دامپزشکان، کارکنان صنایع گوشت، گوسفند داران و گاهی کارکنان صنایع شیر و کشاورزان را آلوده می‌کند (۴، ۵). از آنجا که تا به امروز مطالعه‌ای در مورد تب کیو در منطقه مورد نظر انجام نشده بوده و همچنین در مورد نقش گاو در پراکنده کردن *کوکسیلا بورنتی* در منطقه اطلاعاتی در دست نبوده و با توجه به اهمیت موضوع برای احتمال آلودگی انسان، مطالعه‌ی حاضر با هدف جستجوی ژنومی *کوکسیلا بورنتی* در شیر گاو به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای (Nested PCR) در شهر عجب شیر انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

### منطقه مورد مطالعه

شهرستان عجب‌شیر با وسعت ۷۳۸ کیلومتر مربع (۱/۶ ٪ مساحت استان) در ۱۰۰ کیلومتری تبریز واقع شده، این شهرستان در منطقه کوهستانی واقع شده و دارای تابستان‌های معتدل و زمستان‌های سرد و برفی می‌باشد (۷).

### مواد و روش جستجوی ژنومی

به منظور ردیابی *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های شیر گاو، از روش Berri و همکاران استفاده شد (۸). برای بررسی حضور DNA ژنومی *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌ها، روش آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای (Nested-PCR) به کار رفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن *com1* که کد کننده پروتئین غشای خارجی *کوکسیلا بورنتی* می‌باشد، بر اساس روش مطالعه‌ی Zhang و همکاران (۱۹۹۸) و Fretz و همکاران (۲۰۰۷) بود (۹، ۱۰). برای انجام PCR در مرحله اول، غلظت بهینه مواد به کار رفته در واکنش، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت زیر استفاده شد. مسترمیکس آماده ساخت کشور دانمارک (Ampliqon CO., Denmark) به حجم ۹ میکرولیتر، DNA نمونه مشکوک به حجم ۴ نانوگرم و ۱ میکرومول از هر پرایمر (OMP1-5′-AGT AGAAGC ATC CCA AGC ATT G-3′) (OMP2-5′-TGC CTG CTA GCT GTA ACG ATT G-3′-pb501) با غلظت ۱۰ پیکومول و مابقی حجم را آب مقطر اضافه و سپس همه مواد به داخل یک میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری منتقل و پس از مخلوط کردن در دستگاه ترموسایکلر (Applied Bioscience, USA) قرار داده شد. برنامه دمایی به صورت ۹۴ درجه سلسیوس ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه بود و در ادامه مرحله نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه تنظیم گردید. جهت جلوگیری از نمونه‌های مثبت کاذب تمام مراحل ساخت مسترمیکس در زیر هود بیولوژیک انجام شد. برای PCR مرحله دوم از پرایمرهای OMP3-5′-TTG GAA GTT ATC ACG CAG TTG-3′ و (OMP4-5′-GAA GCG CAA CAA GAA GAA CAC-3′-pb438) استفاده شد. در این بررسی، کنترل مثبت DNA ژنومی *کوکسیلا بورنتی* استاندارد از کیت تشخیصی تجاری (K047, Genekam Biotechnology AG, Germany) استفاده شد. داده‌های حاصل، به کمک نسخه‌ی نوزدهم نرم‌افزار SPSS و با نجام آزمون آماری خی‌دو، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مرز معنی‌داری در $P<۰/۰۵$ قرار داده شده.

## یافته‌ها و بحث

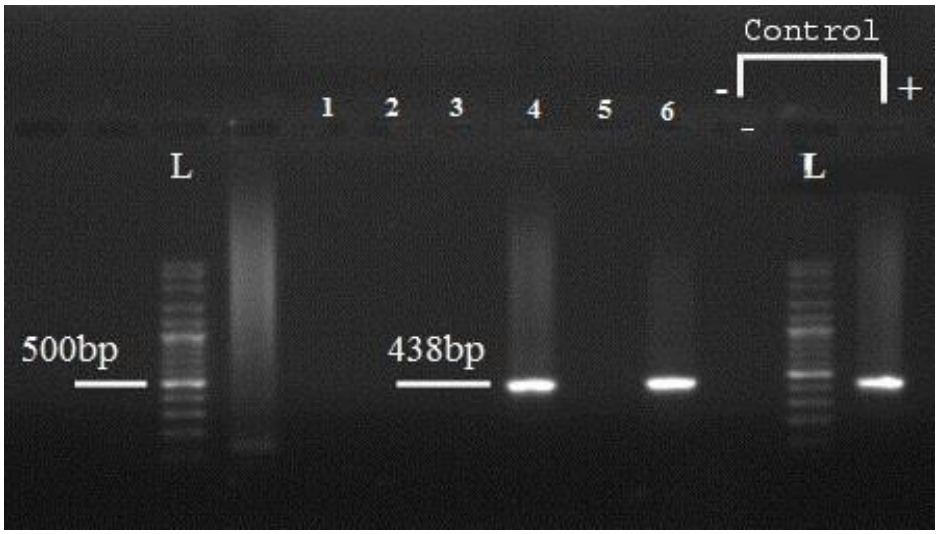
در این مطالعه ۸ دامداری سنتی مورد مطالعه قرار گرفت، که از مجموع ۸۰ نمونه شیر مورد مطالعه ۲۰ نمونه (۲۵٪) در آزمون Nested PCR مثبت بودند. نتایج ژل حاصل از نمونه‌های Nested PCR در تصویر ۲ نشان داده شده است. روش Nested-PCR نسبت به روش‌های کلاسیک از سرعت، دقت، اختصاصیت و حساسیت بالایی برخوردار است (۱، ۲۰).

در بررسی Kargar و همکاران در سال ۲۰۱۲، روی ۱۰۰ نمونه‌ی شیر گاو در شهرستان جهرم، میزان شیوع آلودگی ۱۱ ٪ گزارش شد (۱۱). در سال ۲۰۱۳، در مطالعه‌ای توسط Khanzadi و همکاران در خراسان رضوی روی ۲۳ نمونه‌ی شیر گوسفند، ۸ نمونه (۳۴/۷۸٪) مثبت بود (۱۲). در سال ۲۰۱۳، در مطالعه‌ی دیگری که توسط Ghlynchi و همکاران در استان قم انجام شد، ۱۴ نمونه از مجموع ۱۰۰ نمونه (۱۴٪) مثبت بود (۱۳). در سال ۲۰۱۴، در مطالعه‌ای توسط Khademi و همکاران در خرم‌آباد روی ۵۴ نمونه‌ی شیر بز، ۲۶ نمونه (۴۸ ٪) مثبت بود (۱۴).

در سال ۱۹۹۸، Lyytikainen و همکاران در آلمان، بالاترین میزان شیوع آلودگی گوسفندان به *کوکسیلا بورنتی* را در طول فصول زمستان و بهار گزارش کردند (۱۵). در سال ۲۰۱۲، Gyuranecz و همکاران، مطالعه‌ای در کشور مجارستان روی ۲۱۵ نمونه از تانک‌های شیر انجام دادند که ۶۶/۷٪ از آن‌ها از نظر وجود *کوکسیلا بورنتی* مثبت بودند(۱۶). برخی مطالعات دیگر، طیف‌های مختلفی از وجود *کوکسیلا بورنتی* را در شیر گزارش کرده‌اند که به عنوان مثال در کشور ایتالیا ایالت باسک ۲۲ ٪ و در کشور ژاپن ۱۷/۱٪ مثبت بودند (۱۷,۱۸). در سال ۲۰۱۱، در مطالعه‌ای توسط Abbasi و همکاران، از مجموع ۲۹۶ نمونه‌ی شیر، ۱۲ نمونه یعنی ۴/۱٪ مثبت بود (۱۹). در سال ۱۳۹۲، در مطالعه سرولوژیکی که توسط Borujeni و همکاران در اهواز روی گله‌های گوسفند صورت گرفت، درصد شیوع سرمی تب کیو ۱۳/۱۸٪ اعلام شد که نشان دهنده‌ی آلودگی کمتر گوسفند نسبت به بز است (۶).

این اختلافات مشاهده شده ممکن است به علت متفاوت بودن گونه‌ی حیوانی، محل جغرافیایی و در نتیجه، شرایط آب و هوایی مناطق و نحوه‌ی مدیریت باشد.

با توجه به شواهد سرولوژیکی اولیه به‌دست آمده به نظر می‌رسد که تب کیو در حال حاضر در ایران وجود دارد و به خاطر مطالعات اندک موجود، بیماری مورد توجه قرار نمی‌گیرد یا با بیماری‌های تب‌دار دیگر مثل تب مالت یا آنفلوانزا اشتباه می‌شود. به دلیل طبیعت زئونوزی بیماری و آلودگی احتمالی گسترده حیوانات میزبان، لازم است دستگاه‌ها و سازمان‌های مسئول دامپزشکی و زیر مجموعه‌های وزارت بهداشت تعامل گسترده و نزدیکی جهت شناسایی مخازن و پیشگیری و کنترل بیماری با همدیگر داشته باشند. با توجه به اهمیت بهداشتی و اقتصادی بیماری در انسان و دام پیشنهاد می‌شود تا نشخوارکنندگان مخزن بیماری پس از شناسایی کشتار گردند و افراد در معرض خطر از قبیل دامپزشکان، دامداران و کارگران کشتارگاه‌ها واکسینه گردند.




شکل ۱: ژل حاصل از آزمایش Nested PCR روی شیر خام گاوهای مورد مطالعه جهت شناسایی *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های شیر خام شهرستان عجب شیر (ستون L- مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون_های ۱،۲،۳،۵ نمونه‌های منفی، ستون‌های ۴ و ۶ نمونه‌های مثبت، ستون(-) نمونه منفی و ستون (+) کنترل مثبت).

**تقدیر و تشکر**

این پژوهش، بر گرفته از طرح دانشجویی می‌باشد. مجریان طرح بر خود واجب می‌دانند که از مساعدت و همکاری دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان و همچنین، از مهندس محمود اسماعیلی کوتهمر که در تهیه نمونه‌های شیر ما را یاری نمودند، تقدیر و تشکر به عمل آوردند.

**تعارض منافع:**

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

## References


1. Zabihi R, Majidzade K, Mohseni AH, Soleimani M. Review on the Laboratory diagnosis of Q-Fever. J Army Univ Med Sci. 2014; 11 (4) : 383-388.

2. Angelakis E, Raoult D. Q Fever. Vet Microbiol 2010; 140 (3-4): 297-309.

3. Bosnjak E, Hvass AM, Villumsen S, Nielsen H. Emerging evidence for Q fever in humans in Denmark: role of contact with dairy cattle. Clin Microbiol Infect 2010; 16(8): 1285-8.

4. Muskens J, van Engelen E, van Maanen C, Bartels C, Lam TJ. Prevalence of Coxiella burnetii infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. Vet Rec. 2011; 168:79.

5. Banazis MJ, Bestall AS, Reid SA, Fenwick SG, A survey of Western Australian sheep, cattle and kangaroos to determine the prevalence of Coxiella burnetii. Vet Miccrobiol, 2010; 143: 337-345.

6. Borujeni PM, Gharibi D, Gouranejad S, Zamiri S. Seroprevalence of coxiellosis in Ahvaz sheep. Iran Vet J 2013;9(1):11–8.

7. I.R. Of East Azarbayjan Meteorological Organization [Internet] Available from: http://www.eaz.ir/farsi

8. Berri M, Arricau N, Rodolakis A. PCR-based detection of Coxiella burnetii from clinical samples. Methods Mol Biol, 2003;12:153–61.

9. Fretz R, Schaeren W, Tanner M, Baumgartner A. Screening of various foodstuffs for occurrence of Coxiella burnetii in Switzerland. Int J Food Microbiol, 2007;116:414–8.

10. Zhang GQ, Nguyen SV, To H, Ogawa M, Hotta A, Yamaguchi T, et al. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of Coxiella burnetii in human serum samples. J Clin Microbiol, 1998;36:77–80.

11. Kargar M, Rashidi A, Doosti A, Ghorbani-Dalini S, Najafi A. Prevalence of Coxiella burnetii in bovine bulk milk samples in southern Iran. Com Clin Pathol. 2012; doi:10.1007/s00580-012-1406-9.

12. Khanzadi S, Jamshidi A, Razmyar J, Borji SH. Identification of Coxiella burnetii by touch-down PCR assay in unpasteurized milk and dairy products in North-East of Iran. Iran J Vet Med 2014;8:15–9.

13. Ghlynchi LA, Babakhani R, Zolfaghari N, Majidzadeh KA, Morovvati A, Soleimani M. Detection of Coxeilla brunetii in bulk tank milk samples from dairy bovine farms using nested-PCR in Qom, Iran, 2011. Iran J Vet Med 2013; 7:207–11.

14. Khademi P, Mahzounieh MR, Ebrahimi Kahrizsangi A, Shdravan E. Genomic detection of Coxiella burnetii in goat milk samples in animal farms Khorramabad Township, Iran . Pajoohandeh Journal. 2014; 19 (3) :166-172

15. Lyytikainen O, Ziese T, Schwartlander B, Matzdorff P, Kuhnhen C, Jager C, Peterson L. An outbreak of sheep-associated Q fever in a rural community in Germany. Eur J Epidemiol. 1998; 14: 193-199.

16. Gyuranecz M, Dénes B, Hornok S, Kovács P, Horváth G, Jurkovich V, et al. Prevalence of Coxiella burnetii in Hungary: screening of dairy cows, sheep, commercial milk samples, and ticks. Vector Borne Zoonotic Dis 2012;12:650–3.

17. Garcia-perez AL, Astobiza I, Barandika JF, Atxaerandio R, Hurtado A, Juste RA. Short communication: investigation of Coxiella burnetii occurrence in dairy sheep flocks by bulk-tank milk analysis and antibody level determination. Journal of Dairy Science 2009; 92: 1581-1584

18. Hirai A, Nakama A, Chiba T, Kai A. Development of a method for detecting Coxiella burnetii in cheese samples. J Vet Med Sci, 2012; 74: 175- 180. (Persian)

19. Abbasi S, Farzan R, Momtaz H. Molecular detection of Coxiella burnetii in goat bulk milk samples in some provinces of Iran. Afr J Biotechnol 2011;10:18513–18515.

20. Kirkan S, Kaya O, Tekbiyik S, Parin U. Detection of Coxiella burnetii in cattle by PCR. Turk J Vet Anim Sc, 2008; 32: 215-220.