نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۳؛ ۱۸(۲): ۱۱۹-۱۲۸.
http://doi.org/10.22034/IJVCS.2025.14898.1103

بررسی میزان آلودگی نمونه‌های شیر خام نشخوارکنندگان استان چهارمحال‌وبختیاری به *کوکسیلا بورنتی* با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای

اصغر کریمیان[۱]، مسعود قربانپور[۲*]، زهرا همتی[۲]، لیلی شکوهی‌زاده[۳]

۱. دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان- ایران.

دریافت: ۲۳ مردادماه ۱۴۰۳ **پذیرش:** ۲۳ دی‌ماه ۱۴۰۳

چکیده

کوکسیلا بورنتی یک باکتری گرم منفی، داخل سلولی اجباری و عامل بیماری زئونوز تب کیو است. گاو، گوسفند و بزها منابع اصلی عفونت انسانی هستند و عامل را از طریق شیر دفع می‌کنند. این مطالعه باهدف تعیین وضعیت آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های شیر خام گله‌های گاو، گوسفند و بز در استان چهارمحال‌وبختیاری انجام شد. در فاصله زمانی مهرماه ۱۴۰۱ تا دی‌ماه ۱۴۰۲، در مجموع ۲۵۰ نمونه شیر انفرادی از ۵۰ گله گاو، گوسفند و بز شیری در مناطق مختلف استان به‌طور فصلی جمع‌آوری و از نظر آلودگی به *کوکسیلا بورنتی*، به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای بر اساس ژن ترانسپوزونی *IS1111* مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۹ نمونه (۳/۶ درصد) از ۲۵۰ نمونه شیر خام شامل ۷ مورد از ۱۰۰ نمونه شیر گاوی (۷ درصد) و ۲ مورد از ۷۵ نمونه شیر بزی (۲/۶۶ درصد) مثبت بودند. همهٔ ۷۵ نمونه شیر گوسفندی منفی گردیدند. ارتباط معنی‌دار بین میزان آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های شیر خام مورد بررسی با نوع دام وجود داشت (P=۰/۰۴۲)؛ ولی در ارتباط با فصل، منطقه، سابقه ورم‌پستان و تراکم گاوداری‌ها اختلاف معنی‌داری یافت نشد. نتایج این مطالعه نشان داد که شیر خام گاو و بز می‌تواند یکی از منابع عفونت *کوکسیلا* بورنتی در منطقه مورد بررسی باشد.

واژه‌های کلیدی: تب کیو، *کوکسیلا بورنتی*، شیر، گاو، گوسفند، بز، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای.

مقدمه

تب کیو یک بیماری مشترک بسیار مسری است که توسط باکتری گرم منفی و داخل سلولی اجباری به نام *کوکسیلا بورنتی* (*Coxiella burnetii*) عارض می‌شود (۳۷). این باکتری در محیط به شکل شبه‌اسپوری تبدیل شده، به خشکی، حرارت و بسیاری از ضدعفونی‌کننده‌ها مقاوم می‌گردد و قادر است برای مدت طولانی در محیط زنده بماند (۱۷ و ۲۶). به دلیل قدرت سرایت بالای این باکتری که ناشی از دز عفونی‌کننده ۵۰ درصد پایین آن (۱۰ جرم) و پایداری بالای ذرات عفونی است، این باکتری از سوی مرکز کنترل بیماری‌های (Central for Disease Control) آمریکا در دسته B عوامل بیوتروریسمی قرار گرفته است (۴۳ و ۴۶).

تب کیو برای اولین‌بار در کارکنان یک کشتارگاه در استرالیا گزارش شد و در حال حاضر در سراسر جهان به جز نیوزلند به‌عنوان یک بیماری بومی معرفی شده است (۹). *کوکسیلا بورنتی* می‌تواند، انسان، حیوانات اهلی و وحشی، حیوانات خانگی، بندپایان (به‌ویژه کنه‌ها)، ماهی و پرندگان را آلوده کند. از بین حیوانات اهلی گاوهای شیری، گوسفند و بز از منابع اصلی آلودگی انسان به شمار می‌روند (۲، ۲۱ و ۲۳). آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* در گاو، گوسفند و بز معمولاً بدون علامت است، ولی در برخی موارد با اختلالات تولیدمثلی نظیر سقط‌جنین، مرده‌زایی و ناباروری همراه است (۱۱). حیوانات آلوده *کوکسیلا بورنتی* از راه ادرار، شیر و مدفوع به محیط دفع نموده و دام‌های آبستن، به‌ویژه موقع زایمان یا سقط‌جنین عامل را به

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ghorbanpoor-m@sku.ac.ir

همراه جفت و ترشحات دفع می‌کنند. در حیوان آلوده، مدت زمان دفع باکتری بسته به راه دفع و گونه حیوان متفاوت است و ممکن است از چند روز تا چند ماه ادامه داشته باشد (۴۰).

انتقال عامل به انسان به طور عمده از طریق آئروسل‌های آلوده می‌باشد، ولی ممکن است در اثر مصرف شیر خام یا محصولات لبنی آلوده هم اتفاق افتد. افراد در تماسِ نزدیک با حیوانات مانند کشاورزان، دامپزشکان و کارکنان کشتارگاه و آزمایشگاه در معرض خطر ابتلا به عفونت قرار دارند (۲۶ و ۴۴). تب کیو در انسان اغلب بدون علامت است، ولی در اشکال حاد، می‌تواند با تب طولانی، ذات‌الریه، هپاتیت و درگیری قلبی همراه باشد. شکل مزمن تب کیو ممکن است ماه‌ها تا سال‌ها پس از عفونت اولیه تداوم داشته و در ۷۵ درصد موارد باعث اندوکاردیت گردد؛ همچنین در زنان باردار *کوکسیلا بورنتی* می‌تواند با سقط‌جنین، مرده‌زایی یا زایمان زودرس همراه شود (۸، ۳۸ و ۴۰). مدیریت دفع *کوکسیلا بورنتی* یکی از نکات مهم برای کنترل انتشار آن در بین حیوانات و از حیوان به انسان است (۴۶)؛ *کوکسیلا بورنتی* دارای رشد کند و قابل‌کشت در تخم‌های جنین‌دار یا کشت سلول‌های یوکاریوتی است که زمان‌بر بوده و باید در آزمایشگاه‌های دارای ایمنی زیستی سطح ۳ انجام شود (۲۳).

آزمایش‌های سرولوژیکی جستجوی پادتن (تثبیت کمپلمان، ایمونوفلورسانس و الیزا) که به‌طور معمول در مطالعات اپیدمیولوژیکی در مقیاس وسیع برای بررسی وضعیت آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* استفاده می‌شوند، نشان‌دهندهٔ مواجههٔ قبلی با پاتوژن هستند و دفع فعلی پاتوژن را نشان نمی‌دهند (۴۶)، ولی روش‌های مولکولی از حساسیت، ویژگی و سرعت بالایی برخوردار هستند. طی سال‌های اخیر آزمایش‌های تشخیصی مختلفی بر اساس روش‌های مولکولی، برای تشخیص *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های مختلف معرفی شده است (۷ و ۲۳) که طیفی از ژن‌های متنوع از جمله ژن‌های کدکننده سوپر اکسید دیسموتاز (۴۵)، ایزو سیترات دهیدروژناز (۲۳) و پروتئین Com1 غشای خارجی (۴۷) را هدف قرار می‌دهند. توالی ترانسپوزونی *IS1111* تقریباً در ژنوم همه سویه‌های آزمایش‌شده *کوکسیلا بورنتی* وجود دارد. تکنیک‌هایی که این توالی را هدف قرار می‌دهند در مقایسه با روش‌هایی که یک ژن تک‌نسخه‌ای را شناسایی می‌کنند، حساسیت بالاتری دارند (۲۳).

مطالعهٔ حاضر باهدف بررسی وضعیت آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های شیر خام گاو، گوسفند و بز به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای (Nested-PCR) بر اساس ژن ترانسپوزونی *IS1111* در استان چهارمحال‌وبختیاری انجام شد.

مواد و روش کار

این مطالعه در استان چهارمحال‌وبختیاری در ۳ شهرستان شهرکرد، فارسان و کیار روی نمونه‌های شیر خام جمع‌آوری شده از گله‌های گاو، گوسفند و بز انجام شد. این استان از جمله مناطق کوهستانی جنوب غربی ایران می‌باشد (شکل ۱).

شکل ۱- محل جمع‌آوری نمونه‌های شیر (شهرستان‌های شهرکرد، کیار، فارسان)، استان چهارمحال‌وبختیاری، ایران (۴۹)

در این پژوهش در مجموع ۱۰۰ نمونه شیر خام گاوی از ۲۰ گاوداری نیمه‌صنعتی و ۱۵۰ نمونه شیر خام

گوسفند و بز مربوط به ۱۵ گله گوسفند و ۱۵ گله بز به‌صورت فصلی از مهرماه ۱۴۰۱ تا دی‌ماه ۱۴۰۲ در مناطق مورد مطالعه جمع‌آوری شد. به‌طور میانگین از هر گله ۵ نمونه اخذ و در ظروف سترون در مجاورت یخ خشک به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از سانتریفوژ کردن نمونه‌ها و جداسازی چربی، از رسوب حاصل برای استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (DNP™، سیناکلون، ایران) طبق دستورالعمل سازنده استفاده شد. DNA استخراج شده تا زمان انجام PCR در فریز ۲۰°C- نگهداری گردید. جهت بررسی مولکولی آلودگی نمونه‌ها به *کوکسیلا بورنتی* از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *IS1111* این باکتری به روش Parisia و همکاران به شرح جدول ۱ استفاده شد (۳۱).

جدول ۱- پرایمرهای PCR آشیانه‌ای مورد استفاده برای جستجوی ژنومی *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های شیر خام

پرایمر	ردیف (′۳→′ ۵)	طول محصول (جفت باز)	منبع
Trans۱	TATGTATCCACCGTAGCCAGTC	۶۸۷	۳۱
Trans ۲	CCCAACAACACCTCCTTATTC		
۲۶۱F	GAGCGAACCATTGGTATCG	۲۰۳	
۴۶۳R	CTTTAACAGCGCTTGAACGT		

در مرحله اول واکنش Nested-PCR غلظت بهینه مواد به‌کاررفته در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بدین‌صورت بود:

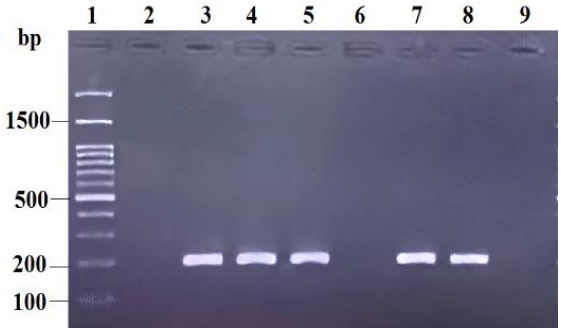
۱۲/۵میکرولیتر مسترمیکس آمپلیکون (Ampliqon، دانمارک)، ۵ میکرولیتر DNA نمونه مجهول (یا کنترل مثبت و منفی)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (Trans 2 / Trans 1) با غلظت ۱۰ پیکومول و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل در هر نوبت از آزمایش به‌عنوان کنترل مثبت، در یک میکروتیوب از DNA ژنومی سویه استاندارد *کوکسیلا بورنتی* (Nine Mile RSA493) و در یک میکروتیوب نیز به‌عنوان کنترل منفی به جای DNA الگو آب مقطر اضافه شد. برنامه دمایی به صورت ۹۵°C به‌مدت ۲ دقیقه، ۵ چرخه دمایی به ترتیب ۹۴°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۶۱°C-۶۶ (روش تاچ داون) ۱ دقیقه، ۷۲°C به‌مدت ۱ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه دمایی به ترتیب ۹۴°C به‌مدت۳۰ ثانیه، ۶۱°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در ادامه مرحله نهایی ۷۲°C به‌مدت ۱۰ دقیقه تنظیم و اجرا گردید.

برای PCR مرحله دوم مخلوط واکنش‌گرهای PCR مطابق مرحله اول تهیه شد با این تفاوت که DNA الگو در این مرحله، ۱ میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول بود و ۱ میکرولیتر از غلظت ۱۰ پیکومول هر یک از پرایمرهای463R و261F و نیز ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل مخصوص PCR استفاده شد. در این مرحله برنامه دمایی شامل ۹۴°C به‌مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه دمایی به ترتیب ۹۴°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۴°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه بود و در ادامه مرحله نهایی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه اجرا گردید. محصولات PCR هر دو مرحله در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی Safe stain (سیناژن، ایران) به همراه نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی (سیناژن، ایران) الکتروفورز گردید و با دستگاه ژل‌داک (UVitec، انگلستان) مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت. در صورت مشاهده نتایج قابل انتظار در نمونه‌های کنترل و باندهای با طول حدود ۶۸۷ جفت باز و یا ۲۰۳ جفت باز به ترتیب در محصولات مرحله اول و دوم نمونه مثبت در نظر گرفته شد.

داده‌های حاصل به کمک نرم‌افزار SPSS 24 به‌صورت توصیفی و آزمون مربع کای مورد بررسی آماری قرار گرفتند. مقدار P<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

از مجموع ۲۵۰ نمونه شیر مورد بررسی ۹ نمونه (۳/۶ درصد) و از ۵۰ گله دام نمونه‌برداری شده ۷ گله (۱۴ درصد) از نظر آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* مثبت بودند. الکتروفورز در ژل آگاروز محصولات PCR تعدادی از موارد مثبت و منفی در شکل ۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲- الکتروفورز در ژل آگاروز محصولات Nested-PCR تعدادی از نمونه‌های شیر خام جهت ردیابی ژنومی *کوکسیلا بورنتی* (ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ ستون۲: کنترل منفی، ستون ۳: کنترل مثبت، ستون‌های: ۵-۴ و ۸-۷ نمونه‌های مثبت و ستون‌های ۹ و ۶ نمونه‌های منفی

آزمون مربع کای اختلاف آماری معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بین میزان شیوع *کوکسیلا بورنتی* در فصول مختلف سال، منطقه مورد بررسی با تراکم گاوداری‌ها و سابقه ورم پستان در نمونه‌های شیر مورد بررسی نشان نداد و تنها تفاوت معنی‌دار در ارتباط با نوع دام بود (جدول ۲).

جدول ۲- میزان آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* در شیر خام گاو، گوسفند و بز بر اساس فصل، منطقه، نوع دام، سابقه ورم پستان و تراکم گاوداری‌ها در استان چهارمحال‌وبختیاری

متغیر		نوع دام تعداد مثبت (درصد آلودگی)			جمع کل
		گاو	گوسفند	بز	
فصل	بهار	۱ :۲۵ (۴)	۰ :۱۹ (۰)	۱ :۱۹ (۵/۲۶)	۲ :۶۳ (۳/۱۷)
	تابستان	۲ :۲۵ (۸)	۰ :۱۹ (۰)	۰ :۱۸ (۰)	۲ :۶۲ (۳/۲۲)
	پاییز	۲ :۲۵ (۸)	۰ :۱۹ (۰)	۱ :۱۹ (۵/۲۶)	۳ :۶۳ (۴/۷۶)
	زمستان	۲ :۲۵ (۸)	۰ :۱۸ (۰)	۰ :۱۹ (۰)	۲ :۶۲ (۳/۲۲)
منطقه	شهرکرد	۵ :۵۰ (۱۰)	۰/۲۵ (۰)	۱ :۲۵ (۴)	۶ :۱۰۰ (۶)
	فارسان	۱ :۲۵ (۴)	۰/۲۵ (۰)	۰ :۲۵ (۰)	۱ :۷۵ (۱/۳۳)
	کیار	۱ :۲۵ (۴)	۰/۲۵ (۰)	۱ :۲۵ (۴)	۲ :۷۵ (۲/۶۶)
تراکم گاوداری‌ها	متراکم	۵ :۵۰ (۱۰)	-	-	۵ :۵۰ (۱۰)
	پراکنده	۲ :۵۰ (۴)	۰ :۷۵ (۰)	۲ :۷۵ (۲/۶۶)	۴ :۲۰۰ (۲)
سابقه ورم پستان	دارد	۱ :۲۰ (۵)	۰ :۱۷ (۰)	۰ :۱۵ (۰)	۱ :۵۲ (۱/۹۲)
	ندارد	۶ :۸۰ (۷/۵)	۰ :۵۸ (۰)	۲ :۶۰ (۳/۳۳)	۸ :۱۹۸ (۴/۰۴)

بحث

این مطالعه باهدف بررسی وضعیت آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های شیر خام گاو، گوسفند و بز در گاوداری‌های نیمه‌صنعتی و گله‌های گوسفند و بز در استان چهارمحال‌وبختیاری به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای انجام گرفت. به‌طورکلی ۳/۶ درصد نمونه‌های شیر مورد بررسی در این مطالعه از نظر آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* مثبت بود. بر اساس نتایج این مطالعه

میزان شیوع آلودگی در نمونه‌های شیر گاوی ۷ درصد بود. مطالعات صورت‌گرفته بر روی شیر گاو در استان‌های اصفهان (۲۹)، تهران (۱)، خراسان رضوی (۳)، آذربایجان غربی (۱۸) و شهرستان جهرم (۱۴) به ترتیب دال بر آلودگی ۸/۶، ۱۲، ۵، ۱۴/۶ و ۱۱ درصدی به *کوکسیلا بورنتی* بوده است. در مطالعه‌ای در شهرستان شهرکرد، ۳۲ درصد نمونه‌های شیر گاوی مورد بررسی به *کوکسیلا بورنتی* آلوده بوده‌اند (۱۵)؛ علت این تفاوت فاحش می‌تواند به نوع نمونه‌گیری مربوط باشد که بررسی حاضر روی نمونه‌های شیر انفرادی انجام گرفت درحالی‌که پژوهش یاد شده روی نمونه‌های مخازن شیر بوده است و باتوجه‌به حساسیت بالای روش Nested PCR اگر در یک گله گاو یک رأس گاو به این باکتری آلوده باشد، دفع باکتری نتیجهٔ آزمایش مخزن شیر را مثبت خواهد کرد و بنابراین درصد آلودگی نیز به طور قابل انتظاری بالاتر خواهد بود. در کشورهای دیگر نیز شیوع *کوکسیلا بورنتی* در شیر گاو در محدوده ۴/۷ تا ۵۳/۷ درصد گزارش شده است که کم‌ترین و بالاترین شیوع به ترتیب مربوط به سوئیس و ژاپن بوده است (۱۸).

در پژوهش حاضر ۲/۶۶ درصد نمونه‌های شیر بزی از نظر آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* مثبت بود. در سایر مطالعات آلودگی شیر بز در استان مازندران و تهران به ترتیب ۱۱/۱ و ۱۰ درصد (۲۸)، در استان اصفهان ۴/۵ درصد (۳۵)، در استان کرمان ۱۶/۱ درصد (۲۰) و در استان آذربایجان غربی ۱۶/۶ درصد (۱۸) بوده است. در دیگر کشورها آلودگی شیر بز به *کوکسیلا برونتی* ۲/۹ درصد در گامبیا (۲۲)، ۱۴/۳ درصد در ایالات متحده (۲۴)، ۴ درصد در ترکیه (۵۰)، و ۱۶/۶ درصد در فرانسه گزارش شده است (۳۹). در برخی مناطق روستایی، شیر بز به روش سنتی و بدون استفاده از روش‌های پاستوریزاسیون برای تولید محصولات لبنی استفاده می‌شود که می‌تواند تهدیدی برای سلامت انسان باشد؛ بنابراین باید به وجود *کوکسیلا برونتی* در شیر بز توجه جدی شود.

بر اساس نتایج این تحقیق در نمونه‌های شیر گوسفندی مورد بررسی هیچ نمونه مثبتی یافت نشد. در سایر مطالعات انجام شده در ایران میزان آلودگی در شیر گوسفند در استان‌های همدان (۲۸)، اصفهان (۳۵)، آذربایجان غربی (۱۸) و زنجان (۱۳) به ترتیب ۱۰/۵، ۵/۷، ۷/۶، و ۳/۳ درصد گزارش شده است. در سایر کشورها نیز بررسی شیوع *کوکسیلا بورنتی* سطوح مختلفی از آلودگی را در شیر گوسفند نشان داده است؛ به‌عنوان مثال در ترکیه (۵۰)، لبنان (۵) و مجارستان (۱۲) میزان آلودگی شیر گوسفند به *کوکسیلا بورنتی* به ترتیب ۴، ۱۰ و ۴ درصد بوده است. تفاوت‌های مشاهده شده در میزان شیوع کلی *کوکسیلا بورنتی* در مناطق مختلف جهان و در ایران از منطقه‌ای به منطقه‌ی دیگر ممکن است به علت گوناگونی موقعیت جغرافیایی، وضعیت مدیریت، زمان نمونه‌گیری، نوع نمونه‌گیری، روش‌های بررسی و غیره باشد (۱۰، ۲۱ و ۲۵).

در چندین مطالعه شیوع بیش‌تر *کوکسیلا بورنتی* در شیر گاو در مقایسه با شیر دیگر دام‌ها گزارش شده است (۳۹، ۳۵، ۲۴). در تحقیق حاضر نیز اختلاف آماری معنی‌داری در میزان شیوع *کوکسیلا بورنتی* در شیر گاو در مقایسه با شیر گوسفند و بز وجود داشت (P=۰/۰۴۲). شیوع بالای *کوکسیلا بورنتی* در شیر گاو در مقایسه با دیگر حیوانات مانند گوسفند به این دلیل است که در گاو دفع این باکتری در شیر به مدت طولانی‌تری ادامه می‌یابد و در گوسفند باکتری عمدتاً از طریق مدفوع و واژن دفع می‌شود (۲، ۱۹، ۳۳ و ۳۹).

در مطالعه‌ای در هلند (۴۸) یک الگوی فصلی از شروع تب کیو در انسان در بهار و اوایل تابستان گزارش شده است؛ همچنین برخی مطالعات در کشورهای اروپایی افزایش بروز موارد تب کیو را مرتبط با فصل زایش گوسفند و بز گزارش کرده‌اند (۴ و ۳۴). در بررسی پیش‌رو میزان شیوع آلودگی در بین نمونه‌های مربوط به فصل

پاییز و در مجموع در فصول سرد سال بالاتر بود، ولی تجزیه و تحلیل آماری نتایج با آزمون مربع کای اختلاف آماری معنی‌داری در دفع فصلی عامل تب کیو در شیر خام دام‌های مورد بررسی را نشان نداد. گزارش‌های متفاوتی از شیوع فصلی آلودگی در ایران نیز وجود دارد؛ نتایج مطالعهٔ Kargar و همکاران در سال ۲۰۱۲ در جنوب ایران نشان داده که تمام ۱۱ نمونه شیر خام آلوده به *کوکسیلا بورنتی* مربوط به فصل زمستان بوده است (۱۴). به‌طور مشابهی Rahimi و همکاران در سال ۲۰۱۰ در استان اصفهان نیز میزان شیوع آلودگی شیر گاو در فصل زمستان را به مراتب بیش‌تر از سایر فصول گزارش نموده‌اند (۳۶)؛ ولی نتایج مطالعهٔ Kazemeini و همکاران در سال ۲۰۲۱ در استان مازندران شیوع بالاتری از آلودگی شیر گاو به *کوکسیلا بورنتی* را در فصل بهار نشان داده است (۱۶). ممکن است شیوع متفاوت *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های اخذ شده در فصول مختلف، بدلیل دفع این میکروارگانیسم بیماری‌زا در مدفوع، ادرار، شیر و بخصوص ترشحات رحمی در زمان زایمان به محیط باشد و این‌که معمولاً در هر منطقه تعداد زایمان دام‌ها در بعضی فصول بیش‌تر است؛ بنابراین تشخیص آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* در نمونه‌های شیرخام تا حدی به زمان نمونه‌گیری وابسته است.

در این پژوهش تفاوت منطقه‌ای معنی‌داری در میزان آلودگی نمونه‌های شیر به باکتری *کوکسیلا بورنتی* در سه شهرستان مورد بررسی یافت نشد. بالاترین میزان آلودگی مربوط به شهرستان شهرکرد بود که نسبت به دو شهرستان دیگر دارای واحدهای پرورش گاوشیری بیش‌تری است. Khademi و همکاران در سال ۲۰۱۹ نیز در مطالعهٔ خود بروی نمونه‌های شیر خام گاو و گاومیش در استان آذربایجان غربی یک تنوع منطقه‌ای با آلودگی بیش‌تر در جنوب استان فوق را گزارش نموده‌اند که با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد (۱۹).

برخی مطالعات ارتباط بین عفونت *کوکسیلا بورنتی* و ورم پستان را در گاو و گوسفند و بز تأیید کرده‌اند؛ از جمله در مطالعهٔ Martinov و همکاران در سال ۲۰۰۷ در بلغارستان ارتباط بین حضور *کوکسیلا بورنتی* و ورم پستان بالینی در گله‌های گوسفند شیری توصیف شده است (۲۷). به همین ترتیب مطالعهٔ Dhaka و همکاران در سال ۲۰۲۰ در هند نشان داده که احتمال ابتلا به عفونت *کوکسیلا بورنتی* در گاوهای دارای سابقه ورم پستان بالینی ۲/۳۵ برابر بیش‌تر از دام‌های سالم است (۶). در مطالعهٔ حاضر ارتباط معنی‌داری بین حضور *کوکسیلا بورنتی* در شیر دام‌های دارای سابقه ورم پستان در مقایسه با دام‌های فاقد سابقه ورم پستان یافت نشد. این را می‌توان تا حدی به این مربوط دانست که دام‌های آلوده می‌توانند بدون علامت و یا دارای علائمی نظیر ورم پستان و متریت باشند (۴۱).

در مجتمع‌های گاوداری واحدهای پرورش دام به‌صورت متراکم و بدون فاصله از یکدیگر احداث می‌شوند؛ بنابراین در این پژوهش تأثیر تراکم دامداری‌ها بر میزان شیوع آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* نیز بررسی شد. میزان ۱۰ درصد از نمونه‌های شیر خام مربوط به گاوداری‌های متراکم موجود در مجتمع‌های گاوداری و ۴ درصد از نمونه‌های شیر خام گاوداری‌های پراکنده و خارج از مجتمع‌ها از نظر آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* مثبت بود. هر چند این اختلاف آلودگی از نظر آماری معنی‌دار نبود؛ ولی در مطالعات مختلف ارتباط بین اندازه گله و افزایش خطر آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* و همچنین تأثیر انتقال باکتری از طریق هوا و تجارت دام بر گسترش منطقه‌ای این باکتری بین گله‌های گاوشیری به‌خوبی اثبات شده است (۴۱ و ۳۰). این ارتباط تا حدودی با جمعیت بزرگ‌تر در معرض خطر و با انتقال باکتری عامل بیماری داخل و بین گله‌ها از طریق عرضه دام، خوراک دام و یا متخصصان بیش‌تری که در مزرعه کار می‌کنند یا از آن بازدید می‌کنند، قابل‌توجیه است (۴۲)؛ بنابراین متراکم و مجتمع بودن گاوداری‌ها در یک منطقه به دلیل فراهم‌شدن شرایط

انتقال باکتری می‌تواند با افزایش خطر ابتلا به عفونت *کوکسیلا بورنتی* در گله‌های گاوشیری همراه باشد و به‌عنوان یک عامل خطر در نظر گرفته شود.

نتایج این پژوهش نشان داد که شیر دام‌های به‌ظاهر سالم و بخصوص شیر خام گاو می‌تواند یکی از مخازن بالقوه *کوکسیلا بورنتی* در استان چهارمحال‌وبختیاری باشد؛ بنابراین انجام اقدامات بهداشتی برای ایمنی مواد غذایی و سلامت عمومی و همچنین رعایت اصول امنیت زیستی و کنترل بیماری در گله‌های دام باتوجه‌به تنوع فصلی و منطقه‌ای دفع باکتری از اهمیت بالایی برخوردار است.

منابع

1. Ahmadizadeh, C; Moosakhani, F. and Jamshidian, M; Detection and identification of *Coxiella burnetii* in milk cattle of Tehran Province. Adv Biores; 2015; 6(4): 48-52.
2. Berri, M; Laroucau, K. and Rodolakis, A; The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk, and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. J. Vet Microbiol; 2000; 72(3-4): 285-93.
3. Borji, S; Jamshidi, A; Khanzadi, S. and Razmyar, J; Detection of *Coxiella burnetii* and sequencing the IS1111 gene fragment in bulk tank milk of dairy herds in Iran. J. Vet Sci Technol; 2014; 6(2): 21–8.
4. Clark, N. and Soares, MR; Airborne geographical dispersal of Q fever from livestock holdings to human communities: a systematic review and critical appraisal of evidence. BMC Infect Dis.; 2018; 18: 218.
5. Dabaja, M; Greco, G; Villari, S; Vesco, G; Bayan, A. and El Bazzal B; Occurrence and risk factors of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in Lebanon. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2019; 64(4): 109-16.
6. Dhaka, P; Malik, VS; Yadav, JP; Kumar, M; Barbuddhe, SB. and Rawool, DB; Apparent prevalence and risk factors of coxiellosis (Q fever) among dairy herds in India. PLoS One. 2020; 15(9): e0239260.
7. Fretz, R; Schaeren, W. and Tanner, M; Baumgartner A. Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. Int J. Food Microbiol; 2007; 116(3): 414-8.
8. Gami, S; Antonios, S; Thompson, L; Chaliki, P. and Ammash, M; Q fever endocarditis in the United States. Mayo Clin Proc. 2004; 79(2): 253-7.
9. Guatteo, R; Beaudeau, F; Joly, A. and Seegers, H; Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. Vet Res; 2006; 37(6): 827-33.
10. Guatteo, R; Beaudeau, F; Joly, A. and Seegers, H; Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk-shedder cows using a real-time PCR applied to bulk tank milk. Zoonoses Public Health; 2007; 54(5): 191-4.
11. Guatto, R; Seegers, H; Taurel, AF; Joly, A. and Beaudeau F; Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. Vet Microbiol Varg. 2011; 149(1-2): 1-16.
12. Gyuranecz, M; Dénes, B; Hornok,

northwest of Iran. Int J. Food Microbiol; 2020; 331: 108716.
19. Khademi, P; Ownagh, A; Mardani, K. and Khalili, M; Prevalence of *Coxiella burnetii* in milk collected from buffalo (water buffalo) and cattle dairy farms in Northwest Iran. Comp Immunol Microbiol Infect Dis.; 2019; 67: 101368.
20. Khalili, M; Diali, HG; Mirza, HN. and Mosavi, SM; Detection of *Coxiella burnetii* by PCR in bulk tank milk samples from dairy caprine herds in southeast Iran. Asian Pac J. Trop Dis. 2015; 5(2): 119-22.
21. Kim, S; Kim, E; Lafferty, C. and Dubovi, E; *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. Emerg Infect Dis.; 2005; 11(4): 619-21.
22. Klaasen, M; Roest, H; van der Hoek, W; Goossens, B; Secka, A. and Stegeman, A; *Coxiella burnetii* seroprevalence in small ruminants in The Gambia. PLoS One.; 2014; 9(1): e85424.
23. Klee, S; Tyczka, J; Ellerbrok, H; Franz, T; Linke, S. and Baljer, G; Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. BMC Microbiol. 2006; 6: 2.
24. Loftis, A; Priestley, R. and Massung, R; Detection of *Coxiella burnetii* in commercially available raw milk from the United States. Foodborne Pathog Dis.; 2010; 7(12): 1453-6.
25. Lyytikainen, O; Ziese, T; Schwartlander, B; Matzdorff, P; Kuhnhen, C. and Jager, C; An outbreak of sheep-associated Q fever S; Kovacs, P; Horvath, G. and Jurkovich, V; Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary: Screening of dairy cows, sheep, commercial milk samples, and ticks. Vector Borne Zoonotic Dis.; 2013; 13(8): 650-3.
13. Haghi, F; Zeighami, H. and Naderi, G; Detection of major food-borne pathogens in raw milk samples from dairy bovine and ovine herds in Iran. Small Rumin Res.; 2015; 131: 136-40.
14. Kargar, M; Rashidi, A; Doosti, A; Ghorbani-Dalini, S. and Najafi, A; Prevalence of *Coxiella burnetii* in bovine bulk milk samples in southern Iran. Comp Clin Path. 2012; 22(3): 665-70.
15. Karimian, A; Mahzounieh, MR. and Ebrahimi, KA; Genomic detection of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples by Nested-PCR method in Shahrekord, Iran. Pejouhandeh; 2016; 21(1): 52-7.
16. Kazemeini, H; Partovi, R; Nazaktabar, A. and Shokri, H; Detection of *Coxiella burnetii* in raw milk samples collected from dairy farms in Mazandaran province, north of Iran. J. Food Saf Hyg.; 2021; 7(3): 171-9.
17. Kersh, G; Fitzpatrick, K; Self, J; Priestley, R; Kelly, A. and Lash, R; Presence and persistence of *Coxiella burnetii* in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak. Appl Environ Microbiol; 2013; 79(5): 1697-703.
18. Khademi, P; Ownagh, A; Ataei, B; Kazemnia, A; Enferadi, A. and Khalili, M; Prevalence of *C. burnetii* DNA in sheep and goat milk in the

P; Morley, P; Van den Brom, R. and Van Metre, D; Management of *Coxiella burnetii* infection in livestock populations and the associated zoonotic risk: a consensus statement. J. Vet Intern Med.; 2018; 32(5): 1481-94.

35. Porten, K; Rissland, J; Tigges, A; Broll, S, Hopp, W. and Lunemann, M; A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. BMC Infect Dis.; 2006; 6: 147.
36. Rahimi, E; Ameri, M; Karim, G. and Doosti, A; Prevalence of *Coxiella burnetii* in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, caprine, and camel herds in Iran as determined by polymerase chain reaction. Foodborne Pathog Dis.; 2011; 8(2): 307-10.
37. Rahimi, E; Torki, Z. and Doosti, A; An assay to determine the seasonal prevalence of *Coxiella burnetii* in cow milk using nested PCR. J. Microbial World; 2010; 3(1): 56.
38. Raoult, D; Marrie, T. and Mege, J; Natural history and pathophysiology of Q fever. Lancet Infect Dis.; 2005; 5(4): 219-26.
39. Raoult, D; and Marrie, T; Q fever. *Clin Infect Dis*.; 1995; 20(3): 489-95.
40. Rodolakis, A; Berri, M; Hechard, C; Caudron, C; Souriau, A. and Bodier, C; Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. J. Dairy Sci.; 2007; 90(12): 5352-60.
41. Roest, H; Tilburg, J. Van der Hoek; W; Vellema, P; Van Zijderveld, F. and Klaassen, C; The Q fever epidemic in The Netherlands:

26. in a rural community in Germany. Eur J. Epidemiol; 1998; 14(2): 193-9.
27. Maurin, M. and Raoult, D; Q fever. Clin Microbiol Rev.; 1999; 12(4): 518-53.
28. Martinov, S; Studies on mastitis in sheep caused by *Coxiella burnetii*. Biotechnol Biotechnol Equip.; 2007; 21(4): 484-90.
29. Mohabati Mobarez, A; Mostafavi, E; Khalili, M. and Esmaeili, S; Identification of *Coxiella burnetii* in raw milk of livestock animals in Iran. Int J. Microbiol; 2021; doi:10.1155/2021/6632036.
30. Nokhodian, Z; Feizi, A; Moradi, A; Yaran, M; Hoseini, S. and Ataei, B; Detection and risk factors of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle based on bulk tank milk samples in central Iran. Prev Vet Med.; 2016; 134: 139-44.
31. Pandit, P; Hoch, T; Ezanno, P; Beaudeau, F. and Vergu, E; Spread of *Coxiella burnetii* between dairy cattle herds in an enzootic region: Modelling contributions of airborne transmission and trade. Vet Res.; 2016; doi:10.1186/s13567-016-0330-4.
32. Parisia, R; Fraccalvieri, M; Cafiero A; Miccolupo, I; Padalino, C. and Montagna, C; Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. Vet Microbiol; 2006; 118(1-2): 101-6.
33. Parker, N; Barralet, J. and Bell, A; Q fever. Lancet; 2006; 367(9511): 679-88.
34. Plummer, P; McClure, J; Menzies,

history, onset, response, and reflection. J. Epidemiol Infect.; 2011; 139(1): 1-12.

42. Sadiki, V; Gcebe, N; Mangenas, ML; Ngoshe, YB. and Adesiyun, AA; Prevalence and risk factors of Q fever (*Coxiella burnetii*) in cattle on farms of Limpopo province, South Africa. Front Vet Sci.; 2023; doi: 10.3389/fvets.2023.1101988.
43. Schimmer, B; Luttikholt, S; Hautvast, JL; Graat, EA; Vellema, P. and van Duynhoven, YT; Seroprevalence and risk factors of Q fever in goats on commercial dairy goat farms in the Netherlands, 2009-2010. BMC Vet Res.; 2011; 7: 1-14.
44. Scott, GH. and Williams, JC; Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. Ann N Y Acad Sci.; 1990; 590: 291-6.
45. Senay, S; Zulal, O; Ufuk, D. and Biray, O; The seroprevalence of Coxiellosis in farmers and cattle in Erzurum. Turk J. Vet Anim Sci.; 2006; 30(1): 71-5.
46. Stein, A. and Raoult, D; Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. J. Clin Microbiol; 1992; 30(9): 2462-6.
47. Svraka, S; Toman, R; Skultet, L; Slaba, K. and Homan, WL; Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol Lett.; 2006; 254: 268-74.
48. Turra, M; Chang, G; Whybrow, D; Higgins, G. and Qiao, M; Diagnosis of acute Q fever by PCR on sera during a recent outbreak in rural South Australia. Ann N Y Acad Sci.; 2006; 1078: 5669-79.
49. van der Hoek, W; Hunink, J; Vellema, P. and Droogers, P; Q fever in the Netherlands: the role of local environmental conditions. Int J. Environ Health Res.; 2011; 21(6): 441-51.
50. Wikipedia contributors. Chaharmahal and Bakhtiari province. Wikipedia, The Free Encyclopedia. Last modified January 9, 2025. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Chaharmahal and Bakhtiari province.
51. Yesim Can, H; Elmal, M. and Karag, A; Detection of Coxiella burnetii in cows', goats', and ewes' bulk milk samples using polymerase chain reaction (PCR). Mljekarstvo; 2015; 65(1): 26-31.

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2024; 18(2): 119-128.
http://doi.org/10.22034/IJVCS.2025.14898.1103

Survey on contamination rate of raw milk samples of ruminants in Chaharmahal and Bakhtiari province to *Coxiella burnetii*, using nested polymerase chain reaction method

Asghar karimian[1]; Masoud Ghorbanpoor[2]*; Zahra Hemati[2]; Leili Shokoohizadeh[3]

1. Ph.D. Student of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan-Iran.

Received: 13 August 2024 ***Accepted:*** 12 January 2025

Summary

Coxiella burnetii is a Gram-negative, obligate intracellular bacterium and the causative agent of the zoonotic disease Q fever. Cattle, sheep, and goats are the primary sources of human infection, excreting the pathogen through milk. This study aimed to determine the prevalence of *C. burnetii* contamination in raw milk samples collected from cattle, sheep, and goat herds in Chaharmahal and Bakhtiari Province, Iran. Between October 2022 and January 2024, a total of 250 individual milk samples were seasonally collected from 50 dairy herds (cattle, sheep, and goats) across various regions of the province. The samples were analyzed for *C. burnetii* contamination using nested polymerase chain reaction (PCR) targeting the transposon gene *IS1111*. Totally, 9 out of 250 raw milk samples (3.6%) were positive, including 7 out of 100 cattle milk samples (7%) and 2 out of 75 goat milk samples (2.66%). All 75 sheep milk samples were found to be negative. A significant association was observed between the level of *C. burnetii* contamination in the raw milk samples studied and the type of livestock (P = 0.042). However, no significant differences were found concerning the season, region, history of mastitis, or dairy farm density. The findings of this study indicated that raw cow and goat milk could serve as potential sources of *C. burnetii* infection in the investigated area.

Keywords: Q fever, *Coxiella burnetii*, Milk, Cow, Sheep, Goat, Nested-PCR.

* Corresponding Author: ghorbanpoor-m@sku.ac.ir