بررسی آلودگی به باکتری کوکسیلا بورنتی در جمعیت شترهای شمال شرق ایران به روش qPCR

محمد حسین جنتی پیروز[۱]، غلامرضا محمدی[۲]، جلیل مهرزاد[۳]، محمد عزیززاده[۴]

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

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

۳. دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد

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

نویسنده مسئول: محمد حسین جنتی پیروز

Email: hoseinjannati57@gmail.com

چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی آلودگی به باکتری کوکسیلا بورنتی(عامل بیماری تب کیو) در جمعیت شترهای شمال شرق ایرن(استانهای خراسان رضوی، جنوبی و شمالی) با استفاده از روش qPCRمی باشد.تعداد ۱۶۷ نفر شتر از ۱۱ واحد اپیدمیولوژیکی استان های خراسان به روش نمونه گیری تصادفی خوشه ای انتخاب شدند نمونه خون کامل از شتران مذکور به همراه مشخصات آنها شامل بر جنس، سن و مکان نمونه گیری اخذ و برای ارزیابی آماری و تعیین معنی داری ارتباط با آلودگی ثبت گردید.در مجموع از ۱۶۷ نمونه خون کامل شترها که مورد آزمایشqPCR قرار گرفتند تعداد ۴ نمونه مثبت شد و شیوع مولکولی بیماری تب کیو (95% CI: 0.1-4.7%)2.4% تعیین گردید.ارتباط معناداری بین متغییرها (سن، جنس و مکان نمونه گیری) و عفونت در آزمون آماری یافت نشد.نتایج حاصل از این مطالعه حضور ژنوم باکتری کوکسیلا بورنتی و عفونت فعال را در جمعیت شترهای این منطقه اثبات می نماید.با توجه به پتانسیل عامل در ایجاد بیماری در انسان، توجه به این بیماری و انجام مطالعات بیشتر در دامها و افراد در معرض خطر ضروری به نظر می رسد.

کلمات کلیدی:تب کیو، کوکسیلا بورنتی، شتر، شمال شرق ایران.

مقدمه

افزایش روز افزون جمعیت جهان و کاهش ذخائر غذائی،بحران غذامهمترین و جدی ترین تهدید زنگی بشر را به وجود می آورد جهت فائق آمدن بر این مشکل استفاده بهینه از منابع غذائی موجود و توجه بیشتر به منابع غذائی که به دست فراموشی سپرده شده الزامی می باشد.

شتر به عنوان یکی ازمنابع مهم تولید گوشت ،شیر و دیگر محصولات باید نقش مهمتری از آنچه تا کنون داشته را ایفا نماید(۱).در گذشته اعتقاد بر این بود که شتر نسبت به بیماریهائی که دیگر دامها را مبتلا می نماید مقاوم است اما اکنون اثبات شده که شتر هم مانند دیگر دامها نسبت به بیماریها و پاتوژنها حساس می باشد(۹).

تب کیو[۱] یک بیماری مشترک بین انسان و تعداد زیادی از انواع حیوانات است که بوسیله ی باکتری کوکسیلا بورنتی[۲] (کوکوباسیل کوچک، گرم منفی، هوازی و انگل اجباری داخل سلول های یوکاریوت) ایجاد می شود(۲).مهمترین راه انتقال باکتری کوکسیلا بورنتی از نشخوارکنندگان اهلی به انسان، تنفس آئرسول های تولید مثلی می باشد(۲).شیوع بیماری تب کیو در ایران در مناطق و حیوانات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است به طور مثال در گله های گاو شیری در شمال شرق(عزیززاده و همکاران ۲۰۱۱)(۳)،در گوسفند و بزدر خراسان رضوی(کیوانی راد و همکاران ۲۰۱۲)(۵)، در گوسفند در کرمان(سخائی و همکاران۲۰۱۰)(۸). شیوع بیماری در جمعیت شتر کشور فقط در یک مطالعهتوسط دوستی و همکاران(۲۰۱۱)در استان اصفهان با آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز معمولی[۳]مورد بررسی قرار گرفته است(۴). بنابراین در جمعیت شتر کشور مطالعه خاص و وسیعی در ایران انجام نشده است. تعیین وضعیت شیوع و پراکنش بیماری تب کیو در جمعیت شترهای ایران نیاز به مطالعات پایه ای و گسترده دارد تا برای پیشگیری بهتر و مناسب تر این بیماری بتوانیم تصمیم گیریشود.

[1]Q fever

[2]CoxiellaBurnetii

[3]Conventional Polymerase Chain Reaction

مواد و روش ها

نمونه‌گیری

نمونه گیری با استفاده از روش تصادفی خوشه ای چند مرحله ای[1] صورت گرفت به این شکل که از میان شهرستانهای استانهای خراسان تعدادی به صورت تصادفی انتخاب شدند. در این شهرستان ها، تعدادی گله شتر و در هر گله تعدادی شتر به شکل تصادفی انتخاب و عمل خونگیری از آنها به عمل آمد.مجموعاتعداد ۱۶۷ نمونه خون کامل از شترهای ۱۱شهرستان ۳ استان خراساناخذ گردید.

از هر دام ۱۰ سی سی خون اخذدر لوله آزمایش فاقد ماده ضد انعقادریخته شد.سپس خون کامل دردو میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری تخلیه شده و شماره نمونه با ماژیک روی میکروتیوپ درج شد. مایکروتیوپ ها در فریزر و در برودت ۲۰- درجه سانتی گراد منجمد و تا زمان انجام آزمایشهای مورد نظر در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

مراحل انجام آزمایش qPCR

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از کیت تجاری MBST(Molecular Biological System Transfer) ساخت موسسه گروه پژوهشی انتقال سامانه های زیست مولکولی، تهران استفاده شد که روشی سریع و ساده جهت استخراج DNA از سلولهای یوکاریوت در خون کامل، نمونه های بافتی و پلتهای سلولی را فراهم می کند.استخراج DNA بر اساس پروتوکل 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 PCRاستفاده گردید.

حجم نهائی واکنش PCR طبق توصیه شرکت سازنده برای هر نمونه 20 µl می باشد.

[1]Multi stage cluster sampling

تجزیه و تحلیل آماری

شیوع مولکولی بیماری با حدود اطمینان ٪۹۵ بطور کلی و برای سطوح هریک از متغیرهای مورد مطالعه به تفکیک محاسبه شد. رابطه ی سن، جنس و شهرستان محل نمونه گیری با میزان شیوع ملکولی توسط آزمون آماری کای مربع [1] مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. متغیر هایی که با $P<0.2$ با آلودگی ارتباط داشتند وارد مدل رگرسیون لوجستیک[2] شدند. روش گام به گام عقب گرد[3]برای انتخاب متغیر هایی که با$P<0.05$ با آلودگی ارتباط داشتند استفاده شدند.

نتایج و بحث

از میان ۱۶۷ نفرشتر که مورد آزمایشqPCR قرار گرفتند،۴ نفر شتر از نظر وجود باکتری کوکسیلا بورنتی مثبت شدند و شیوع مولکولی2.4%(95% CI: 0.1-4.7%)بدست آمد.

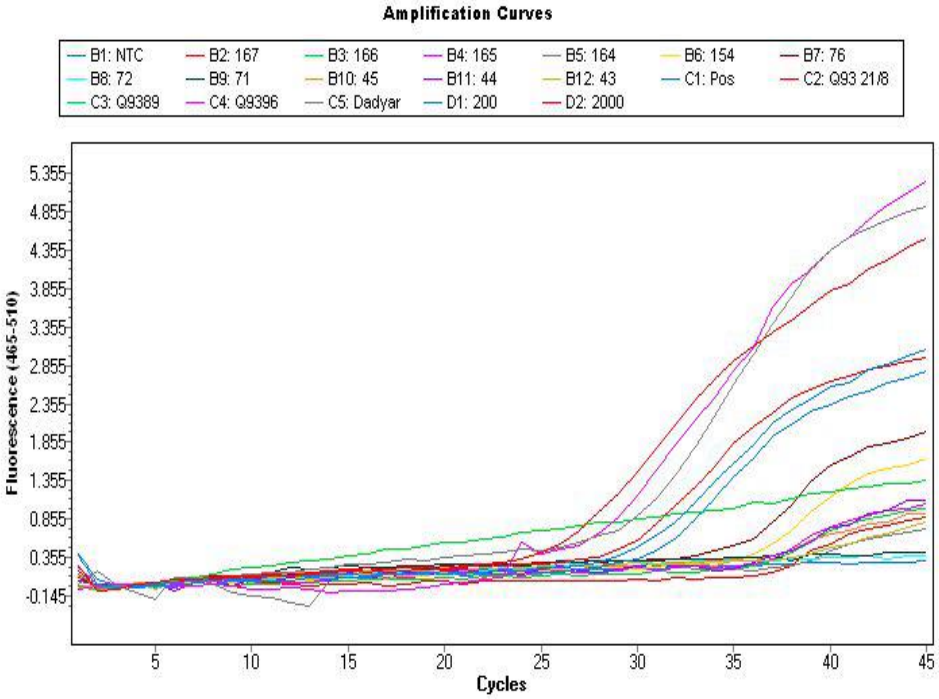
تمام نمونه ها یی که از نظر ملکولی مثبت بودند جنسیت آنها ماده بود. از ۴ نمونه ای که از نظر ملکولی مثبت بودند تمامی آنها سن بالای ۳ سال داشتند (۱ مورد ۳ تا ۷ سال و ۳ مورد بالای ۷ سال).رابطه ای بین سن، جنس و مکان با آلودگی مولکولی وجود نداشت.

شکل ۳-۱ نمودارهای تکثیر حاصل از آزمایش qPCR که نشان دهنده موارد مثبت می باشد.

[1]Chi-Square

[2]Logistic regression

[3]Backward stepwise



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 کشتارگاههای استان اصفهان با استفاده از روش آزمایشگاهی Conventional PCR مورد آزمایش قرار گرفت شیوع مولکولی ٪۱۰/۷۶ گزارش گردیده است(۴). در نتایج ۲ مطالعه اختلاف وجود دارد با توجه به این که در مطالعه حاضر نمونه گیری میدانی بوده و از گله های شتر حاضر در واحدهای اپیدمیولوژیک به صورت تصادفی تعدادی شتر انتخاب شده است و در نمونه گیری انجام شده توزیع مناسب سنی رعایت شده است اما در مطالعه دوستی و همکاران نمونه گیری کشتارگاهی بوده احتمال کشتار شترهای با سن بالا مطرح می باشد و بدیهی است با افزایش سن احتمال برخورد با باکتری افزایش می یابد از طرفی در مطالعه دوستی و همکاران از روش آزمایشگاهی Conventional PCR استفاده شده است که نسبت به روش qPCR استفاده شده در مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی کمتری دارد و نیز می تواند بر نتایج حاصله تاثیرگذار می باشد.

در مطالعه ای که توسط رحیمی و همکاران (۲۰۱۱) انجام گرفت، روش nested PCR روی ۷۰ نمونه شیر مخزن از ۲۲ گله شتر شیری در استان اصفهان جهت شناسائی ژنوم باکتری کوکسیلا بورنتی انجام شد، یک نمونه از ۷۰ نمونه مثبت شناسائی(۱/۴٪) نتیجه حاصل اثبات کننده حضور بیماری در جمعیت شترها و دفع باکتری در شیر شترها می باشد.(۷)

در مطالعه ای منصور حسین و همکاران (۲۰۱۵) در کشور عربستان ۸۲ نمونه خون کامل شترها مورد آزمایش Nested-PCR قرار دادند و ٪۱۵/۸۵ مثبت گزارش گردید(۶) که بالا تر از نتیجه مطالعه حاضر است تفاوت در شرایط ۲ مطالعه، تراکم شترها در ۲ کشور و شرایط نگهداری شتر در ۲ کشور می تواند علت اختلاف در نتایج هر دو مطالعه باشد.

با توجه به نتایج مطالعه ی حاضر پیرامون شیوع مولکولی که نشان دهنده حضور فعال باکتری کوکسیلا بورنتی در جمعیت شترهای شمال شرق ایران می باشد، می توان شمال شرق ایران را از جمله مناطق با عفونت کوکسیلا بورنتی در جمعیت شتر دانست. با توجه به نتایج مطالعات انجام شده در دیگر کشورها که در آنها شتر از جمله مهمترین دامهای مسبب آلودگی در انسان معرفی شده است، بایستی به این حیوان بعنوان خطری مهم در انتشار کوکسیلا بورنتی و بروز عفونت توجه بیشتری شود.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از آقای دکتر مهران قائمی و دیگر کارکنان آزمایشگاه مرکزی اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی که در انجام این‌پروژه مساعدت نموده اند تشکر نماییم.

References

1. Abbas B, Saint-Martin G, Planchenauct D. Constraints to camel production in eastern Sudan: a survey of pastoralists conception.Sudan Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry. 1993;32(1):31-41.

2. Angelakis E, Raoult D. Q fever. Veterinary Microbiology. 2010;140(3-4):297-309.

3. Azizzadeh M,G.R. Mohammadi, A.L. Haghparast, M. Heidarpour bami. Seroprevalence of Q-fever in commercial dairy herds in khorasan Razavi province,Iran. Iranian J Publ Health, Vol. 40, Supplementary Issue 1, 2011.

4. Doosti A , Arshi A, Sadeghi M. Investigation of Coxiella burnetii in Iranian camels. Comp Clin Pathol jul 2012 :1567-6.

5. Keyvani rad N, Azizzadeh M, Taghavi Razavizadeh A.R, Mehrzad J, Rashtibaf M. Seroepidemiology of coxiellosis (Q fever) in sheep and goat populations in the northeast of Iran. IJVR, 2014, Vol. 15:1-6.

6. Mansour H, Alshaikh M, Aljumaah R, Garelnabi A, Al-khalifa .The Arabian camel(Camelus dromedaries) as a major reservoir of Q fever in Saudi Arabia. Compendium Clinical Pathology 2015;24:887-892.

7. Rahimi E, Doosti A, Ameri M, Kabiri E, Sharifian B. Detection of Coxiella burnetii by Nested PCR in Bulk Milk Samples from Dairy Bovine, Ovine, and Caprine Herds in Iran. Zoonoses & Public Health. 2009;57(7/8):e38-e41.

8. Sakhaee E, Khalili M. The first serologic study of Q fever in sheep in Iran. Tropical Animal Health and Production. 2010;42(7):1561-4.

9. Wilson T, Araya A, Melaku A. The One-Humped Camel: An Analytical and Annotated Bibliography.Technical Paper Series No. 3. UNDP, UNSO.

Investigation of *Coxiella burnetii* infection in camel population of northeast of Iran with qPCR.

M.H.J.Pirouz[1], G.R. Mohammadi[2], J. Mehrzad[3], M. Aziz zadeh[4]

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

Corresponding author: Hosein Jannati
Email: hoseinjannati57@gmail.com

Abstract

This survey was conducted to identify of *C.burnetii*'s genome in camel population in northeast of Iran. In total 167 camels in 11 epidemiological units of study area were selected by random multi-stage cluster sampling. To identify *C.burnetii*'s genome, whole blood samples of camels were examined with qPCR technique. In total, 4 of 167 camels whole blood samples were positive2.4 % (95 % CI: 0.1-4.7%).This study showed detection of genom of *C.burnetii*in whole blood samples of camels. Consedering the economic, zoonoti 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 agroecologically and geopolitically important region of Iran.
Key words: Coxiellosis, Camel, Northeast Iran, Public health, Qfever, Seroepidemiology, zoonosis.