

[10.30495/JFH.2019.668698](https://doi.org/10.30495/JFH.2019.668698)

«مقاله پژوهشی»

شیوع کوکسیلا بورتتی در مخازن جمع‌آوری شیر گاوهای بومی استان گیلان به روش Nested-PCR

اکرم نوروزحقی نوبیجاری^۱، ابراهیم رحیمی^{۲*}، امیر شاکریان^۲

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران؛ مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران؛ مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
- * نویسنده مسئول مکاتبات: ebrahimrahimi55@yahoo.com
- (دریافت مقاله: ۹۷/۲/۳۰ پذیرش نهایی: ۹۸/۴/۳۰)

چکیده

تب کیو با عامل ریکتزیا، بیماری مشترک انسان و دام با قدرت بیماری‌زایی بسیار بالا است که اخیراً تنها به‌عنوان بیماری شغلی در دامداران، دامپزشکان و کارگران کشتارگاه‌ها تلقی نمی‌شود. مصرف شیر نقش بسیار مهمی در اپیدمی و گسترش بیماری دارد و شیر گاو یکی از منابع بالقوه کوکسیلا بورتتی می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی شیوع کوکسیلا بورتتی در مخازن جمع‌آوری شیر گاوهای بومی استان گیلان انجام گرفت. در این مطالعه مقطعی-توصیفی از تابستان ۱۳۹۵ تا بهار ۱۳۹۶ در مجموع ۲۰۴ نمونه شیراز مخازن جمع‌آوری شیر در مراکز جمع‌آوری شیر شهرستان‌های استان گیلان تهیه و جهت بررسی شیوع کوکسیلا بورتتی، به روش Nested PCR مورد آزمایش قرار گرفت. از مجموع ۲۰۴ نمونه شیر خام، ۲۱ نمونه (۱۰/۲۹٪) از نظر حضور کوکسیلا بورتتی مثبت بود. بالاترین میزان آلودگی در شهرستان لاهیجان، ۳۳/۳۳٪ و به دنبال آن در شهرستان رودبار، ۲۹/۴٪ مشاهده شد. نمونه‌های اخذشده از شهرستان‌های رشت، تالش، آستانه و ماسال هیچ مورد مثبتی نداشتند. بررسی فصلی نمونه‌ها حاکی از عدم اختلاف آماری بین فصول مختلف بود. نتایج حاکی از آن است که شیر گاوهای سستی می‌تواند منبع و مخزن کوکسیلا بورتتی در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: شیر، گاو، کوکسیلا بورتتی، Nested PCR، گیلان

مقدمه

محصولات غذایی با منشأ حیوانی شیر خام به عنوان مهم ترین منبع آلوده به کوکسیلا بورتتی حائز اهمیت می باشد (Capuano *et al.*, 2012; Hilbert *et al.*, 2015). هرچند وجود سقط جنین، تولد نوزاد نارس و کم وزن، ناباروری مهم ترین علائم و عوارض در حیوانات اهلی است، ولی اصولاً بیماری در حیوان فاقد علائم و نموده های آشکار است که خود باعث انتقال پنهان و گسترش عفونت می شود (To *et al.*, 1998; Bildfell *et al.*, 2015). تب کیو به عنوان بیماری شغلی شیردوشان، پرورش دهندگان انواع دام، کارکنان واحدهای تولیدی شیر و فرآورده های شیری و دامپزشکان شناخته شده است (Cerf and Condron, 2006). تب کیو عفونت زئونوزی می باشد که در کل دنیا شایع است و تنها قطب شمال و نیوزیلند، به علت فاصله بسیار دور جغرافیایی و کنترل های شدید، فاقد این بیماری هستند. مصرف کنندگان شیر آلوده، اکثراً بیماری را با نمود هپاتیت بروز داده و استنشاق کنندگان آبروسل آلوده، تظاهرات پنومونی را بروز می دهند (David *et al.*, 2001). علائم بیماری در انسان بسیار متغیر است و حدود ۶۰ درصد افراد با تیترا سرمی مثبت علائم بالینی واضحی از خود بروز نمی دهند. نوع حاد بیماری تب کیو اغلب به صورت آنفلوانزا، پنومونی یا هپاتیت نامشخص بروز می نماید (Cutler *et al.*, 2007). درمان آنتی بیوتیکی دوره عفونت انسانی را بسیار محدود می کند ولی در صورت مزمن شدن باعث بروز میوکاردیت، پریکاردیت و به خصوص آندوکاردیت شده که در ۶۰-۳۰ درصد موارد، مرگ حتمی است (Hatami, 2003). در بسیاری از کشورها آلودگی به این پاتوژن مطرح است، از جمله شرق هلند که از سال ۲۰۰۷

کوکسیلا بورتتی عامل بیماری تب کیو یا تب کشتارگاه در انسان و عامل بیماری کوکسیلوزیس در انواع جمعیت دامی می باشد. کوکسیلا بورتتی میکروارگانیسمی ریکتزیا مانند با زندگی اجباری داخل سلولی است که بنا به شرایط سخت توان زیست و بقا در شرایط خارج سلولی را نیز دارد (Maurin, 1999; Parker, 2006). عامل بیماری از طریق ماندگاری در بدن کنه ها (پناهگاه محیطی) بیماری را به حیوانات اهلی منتقل می نماید (Zoghi, 1994; Rad, 2010). اگرچه کنه مهم ترین ناقل و مخزن بیماری اعلام شده و نگه دارنده کوکسیلا بورتتی در چرخه طبیعت و مسئول انتشار عفونت است، ولی عامل انتقال مستقیم انسانی نمی باشد، بلکه از طریق انتقال به حیوانات اهلی، در گسترش عفونت انسانی دخیل است (Lang, 1990; Zoghi, 2009; Rahimi *et al.*, 1994). ویژگی خاص این عامل، زندگی دومرحله ای یا دوفازی، قدرت مهاجمی و حدت بالا (یک سلول پاتوژن توان آلودگی یک فرد را دارد)، فرم شبه اسپور این پاتوژن منجر به مقاومت به خشکی، حرارت، شرایط سخت محیطی و مواد ضد عفونی در پاتوژن شده است (Guatteo *et al.*, 2006). به بیان بهتر افراد انسانی به تب کیو بسیار حساس می باشند و حتی تا ده سلول یا کمتر ممکن است باعث عفونت کوکسیلا در افراد شود (CDC, 2015). راه اصلی انتقال بیماری به انسان، انتقال از طریق ریز قطره ها، راه گوارشی و کنه ها می باشد. با این حال اهمیت آلودگی شیر به عنوان مهم ترین راه انتقال بیماری به انسان (گوارشی) مطرح و قابل بحث است (Raoult, 1995; Hiari *et al.*, 2005; Cerf and Condron, 2006; Cutler *et al.*, 2007). در بین

بومی استان گیلان به روش نمونه برداری خوشه‌ای-تصادفی طی تابستان ۱۳۹۵ تا بهار ۱۳۹۶ جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها طی چهار فصل (تابستان ۳۳ نمونه، پاییز ۶۸ نمونه، زمستان ۷۳ نمونه، بهار ۳۰ نمونه) از شهرستان‌های استان گیلان اخذ گردید و در شرایط بهداشتی و با حفظ زنجیره سرما به آزمایشگاه منتقل شدند.

- بررسی حضور کوکسیلا بورتی

برای ردیابی و بررسی حضور کوکسیلا بورتی در نمونه‌های شیر از روش Nested PCR و مطابق روش قبلی استفاده شد (Berri et al., 2003). پس از جداسازی چربی نمونه‌ها با کمک دستگاه سانتریفوژ، از رسوب باقی مانده در ته لوله‌ها، استخراج DNA با استفاده از کیت (سیناژن، ایران) انجام گردید. کیفیت و میزان DNA خالص به روش اسپکتوفتومتری (Biophotometer, Germany) به احتساب طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت (Marrie and Raoult, 1997). محصول به دست آمده تا انجام PCR در قسمت فریزر با دمای ۲۰- نگه‌داری شد. از روش Nested-PCR جهت ردیابی DNA ژنومی کوکسیلا بورتی استفاده شد. سکانس پرایمرهای مورد استفاده برای ازدیاد ژن Com1، کد کننده پروتئین غشای خارجی کوکسیلا بورتی (OMP) در نظر گرفته شد (Zhang et al., 1998; Frets et al., 2007). غلظت مطلوب مواد به کار رفته در مرحله اول PCR، ۲۵ میکرولیتر و شامل: ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرومول از هر پرایمر OMP1-OMP2، ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، ۰/۲ میکرومولار مخلوط dNTP بود. دو تا سه قطره روغن سترون جهت جلوگیری از آلودگی و

تاکنون سه اپیدمی بزرگ را پشت سر گذاشته است (Delsing and Kullberg, 2008). از آنجایی که در بررسی نمونه شیر گاو، گوسفند، بز و پوسته تخم مرغ به روش PCR، عامل کوکسیلا بورتی تنها در گله‌های گاو مزارع دیده شده است، تعیین اپیدمیولوژی سوش انسانی و حیوانی کوکسیلا بورتی در شیر گاو بسیار مورد اهمیت قرار گرفته است (Fretz et al., 2007). شیوع بیماری عامل پاتوژن کوکسیلا بورتی بین سربازان آمریکایی مقیم عراق منجر به بروز تب همراه با علائم گوارشی و تنفسی گردید (Ahmadizadeh et al., 2015). بیماری در نواحی که مخازن حیوانی وجود دارد به صورت بومی شایع است (Chin, 2000). معمولی‌ترین راه تشخیص تب کیو، تعیین آنتی‌بادی اختصاصی به وسیله آزمون‌های ایمنولوژی می‌باشد (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). روش PCR به عنوان یک روش مطمئن و سریع جهت تشخیص کوکسیلا بورتی از طرف بسیاری از محققین پیشنهاد شده است (Guatteo et al., 2006). بنابه اهمیت این بیماری و ذکر این مهم که اطلاعات پایه و اپیدمی پیرامون این بیماری، ناکافی و ناکارآمد است و در حال حاضر تقسیم‌بندی شدت بیماری بر اساس مناطق جغرافیایی هنوز مبهم است، مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان شیوع کوکسیلا بورتی در مخازن جمع‌آوری شیر گاو، دامداری‌های استان گیلان با Nested-PCR انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

- روش نمونه‌گیری

در این پژوهش میدانی به مدل مطالعه مقطعی-توصیفی، تعداد ۲۰۴ نمونه شیر از مخازن جمع‌آوری شیر گاوهای

سلسیوس، ۵ دقیقه؛ ۳۵ الی ۴۰ سیکل با دمای ۹۵ درجه سلسیوس ۳ دقیقه؛ دمای ۷۲ درجه سلسیوس، ۸ تا ۱۰ دقیقه و دمای ۴ تا ۱۰ درجه سلسیوس، ۱۰ دقیقه بود.

تبخیر اضافه شد و تیوپها به درون دستگاه ترموسایکر منتقل شد (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Germany). تنظیمات دمایی به صورت: دمای ۹۴ درجه

جدول (۱) - پرایمرهای مورد استفاده برای ردیابی کوکسیلا بورتی در شیر، به روش Nested-PCR

پرایمر	توالی	نام ژن	اندازه قطعه (bp)
Omp1	5'-AGT AGA AGC ATC CCA AGC ATT G-3'	Com1	۵۰۱
Omp2	5'-TGC CTG CTA GCT GTA ACG ATT G-3'		
Omp3	5'-GAA GCG CAA CAA GAA GAA CAC-3'		۴۳۸
Omp4	5'-TTG GAA GTT ATC ACG CAG TTG-3'		

یافته‌ها

از مجموع ۲۰۴ نمونه شیر مورد آزمایش ۲۱ نمونه (۱۰/۲۹٪) مثبت و آلوده به پاتوژن کوکسیلا بورتی بود. بالاترین میزان فراوانی در شهرستان‌های لاهیجان و رودبار مشاهده شد جدول (۲). هیچ مورد مثبتی در شهرستان‌های رشت، تالش، آستانه و ماسال گزارش نشد. شیوع آلودگی در شهرستان‌های مختلف استان، اختلاف آماری معنی‌دار را نشان داد. شیوع فصلی در مطالعه حاضر نشان داده شد که بیشترین درصد فراوانی آلودگی مربوط به فصل پاییز (۱۷/۶۵٪) است، هر چند، اختلاف آماری معنی‌داری بین میزان شیوع آلودگی کوکسیلا بورتی و فصل‌های سال وجود نداشت جدول (۳). نتایج نمونه‌های شیر آلوده به کوکسیلا بورتی، نمونه‌های مثبت، نمونه‌های منفی و همچنین ستون مارکر در تصویر (۱) و تصویر (۲) نشان داده شده است.

مرحله دوم PCR: پرایمرهای این مرحله شامل: OMP3, OMP4 بوده و تمام مراحل به روش مرحله اول می‌باشد، با این تفاوت که DNA مدل، ۲ میکرومول از محصول PCR مرحله اول می‌باشد که به نسبت ۱/۲۰۰ رقیق و به واکنش اضافه گردید. محصول مرحله دوم در ژل آگارز ۲ درصد دارای محلول اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و با امواج نور ماورای بنفش (اولتراویوله) مشاهده، مورد بررسی و تفسیر قرار گرفت. کنترل مثبت این مطالعه DNA ژنومی کوکسیلا بورتی (Biotechnology AG, Duisburg, Germany Serial Genekam Number: 3154) و کنترل منفی شامل کلیه واکنش‌گرهای PCR و مواد، بدون حضور DNA که به جای DNA، از آب مقطر سترون استفاده شد (Rodolakis et al., 2007).

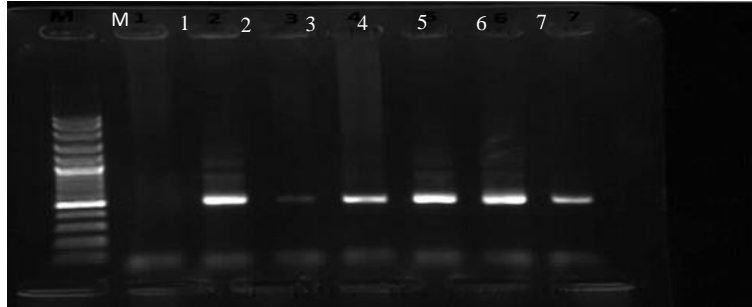
یافته‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL) نسخه ۲۰ و آزمون مربع کای مورد تحلیل و تفسیر آماری قرار گرفتند. سطح اطمینان در مطالعه حاضر ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

جدول (۲)- شیوع کوکسیلا بورتی در مخازن شیر گاوداری‌های سنتی شهرستان‌های استان گیلان

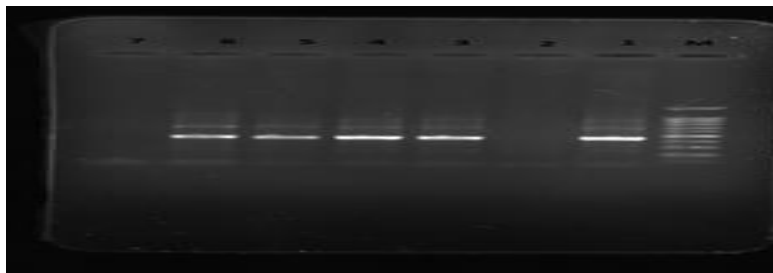
شهرستان‌های استان گیلان	تعداد نمونه مورد بررسی	فراوانی نمونه‌های آلوده به کوکسیلا بورتی	درصد نمونه‌های آلوده به کوکسیلا بورتی
رشت	۳۴	۰	۰
رودبار	۱۷	۵	۲۹/۴۱٪
منجیل	۲۲	۱	۴/۵۵٪
شفت	۳۷	۱	۲/۷۰٪
لنگرود	۸	۱	۱۲/۵۰٪
رودسر	۱۷	۴	۲۳/۵۳٪
فومن	۱۷	۱	۵/۸۸٪
لاهیجان	۶	۲	۳۳/۳۳٪
صومعه‌سرا	۲۲	۵	۲۲/۷۳٪
املش	۱۵	۱	۶/۶۷٪
تالش	۵	۰	۰
ماسال	۱۰	۰	۰
آستانه	۳	۰	۰
کل	۲۰۴	۲۱	۱۰/۲۹٪

جدول (۳)- شیوع فصلی کوکسیلا بورتی در شیر گاوداری‌های سنتی استان گیلان

فصل	تعداد نمونه	تعداد نمونه مثبت	درصد آلودگی
تابستان	۳۳	۳	۹/۱٪
پاییز	۶۸	۱۲	۱۷/۶۵٪
زمستان	۷۳	۲	۲/۷۴٪
بهار	۳۰	۴	۱۳/۳۳٪
کل	۲۰۴	۲۱	۱۰/۲۹٪



تصویر (۱) - نتایج Nested-PCR مرحله اول بر اساس باند ۵۰۱ نمونه‌ها در ژل آگارز ۲؛ ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱: کنترل منفی (آب مقطر استریل شده)، ستون ۲: کنترل مثبت (Genekam Biotechnology; 3154: serial No AG, Duisburg, Germany)، ستون‌های ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷: نمونه‌های مثبت و آلوده به کوکسیلا بورنتی



تصویر (۲) - نتایج Nested-PCR مرحله دوم بر اساس باند ۴۳۸ نمونه‌ها در ژل آگارز ۲؛ ستون M: مارکر، ستون ۱: کنترل مثبت، ستون ۲: کنترل منفی (آب مقطر استریل)، ستون‌های ۳، ۴، ۵ و ۶: نمونه‌های مثبت و آلوده به کوکسیلا بورنتی (عامل پاتوژن)، نمونه ۷: نمونه منفی.

بحث و نتیجه‌گیری

کوکسیلا بورنتی پاتوژنی با توان بیماری‌زایی و حدت بالا، مقاومت بسیار زیاد به سایر شرایط سخت محیطی (مواد ضد عفونی، خشکی، دما و از این قبیل) و فرم شبه اسپوری است. عامل تب کیو در دام و انسان، باعث ناتوانی، عوارض و هزینه‌های زیاد اقتصادی می‌شود. اگرچه تب کیو به‌عنوان بیماری شغلی مطرح است، ولی مصرف شیر و فرآورده‌های شیری آلوده به کوکسیلا بورنتی در اپیدمیولوژی بیماری نقش برجسته‌ای دارد (Berri *et al.*, 2003; Hirai *et al.*, 2005). در مطالعه

حاضر ۱۰/۲۹٪ از نمونه‌های شیر حامل کوکسیلا بورنتی بوده است که نتایج آن با دو تحقیقی که به روش PCR بر روی نمونه‌های شیر گاوداری‌های جهرم (Kargar *et al.*, 2012) و تهران (Ahmadizadeh *et al.*, 2015) انجام شده و ۱۱٪ می‌باشد، مطابقت دارد. در پژوهشی دیگر میزان آلودگی شیر به کوکسیلا بورنتی در گاوهای سنتی و صنعتی شمال غرب ایران ۲۹/۴٪ اعلام شده است (Sakhaee and Khalili, 2010). نتایج گزارشی در آمریکا شیوع کوکسیلا بورنتی را بیشتر و ۹۴٪ گزارش

در کارگران دارد (Contrevas *et al.*, 2015). نتایج پژوهش انجام شده در کارخانجات لبنیات سازی در ایتالیا تأکید بر گستردگی حضور کوکسیلا بورنتی در نمونه‌های شیر گاو و گوسفند دارد (Guidi *et al.*, 2017). در بررسی بر روی نمونه‌ی دام‌های مختلف استان اصفهان، اعلام گردید، احتمال آلودگی به کوکسیلا بورنتی رو به افزایش است (Rahimi *et al.*, 2011) و تحقیق استان چهارمحال و بختیاری، میزان آلودگی به کوکسیلا بورنتی در شیر گاو را ۶۲٪ برآورد نمود (Rahimi *et al.*, 2009). نتایج مطالعه‌ای در ایران (استان‌های چهارمحال و بختیاری، یزد و اصفهان) حاکی از آن است که کوکسیلا بورنتی در فراورده‌های شیری تولید شده در استان چهارمحال و بختیاری بالا است، و شیر خام می‌تواند از منابع مهم این میکروارگانیسم باشد (Kazemeini, 2018). ضمن ردیابی کوکسیلا بورنتی در گاوهای شیری کشور پرتغال میزان آلودگی ۳۰/۹٪ گزارش شده است و نقش برجسته شیر را به‌عنوان منبع عفونت در کارگران کارخانه‌های شیر غیرقابل چشم‌پوشی می‌باشد (Anastacio *et al.*, 2016).

در بررسی انجام شده روی نمونه‌های شیر آلوده به کوکسیلا بورنتی در استان گیلان می‌توان بین شهرستان‌ها و میزان شیوع ارتباطی معنی‌داری در نظر گرفت. از دلایل اصلی اختلاف بین شیوع کوکسیلا در مناطق مختلف دنیا می‌توان به موقعیت‌های جغرافیایی و آب و هوایی متفاوت، روش‌های تشخیص آزمایشگاهی، نوع و حجم نمونه، روش نمونه‌گیری، فصل سال و نمونه‌گیری در گله‌های آلوده و سالم اشاره کرد (Banazis *et al.*, 2010). در مطالعه حاضر میزان آلودگی مخازن جمع‌آوری شیر گاوهای بومی استان گیلان در

نموده که مغایر با بررسی حاضر می‌باشد (Kim *et al.*, 2005).

اگرچه انتقال خوراکی یا دهانی تب کیو به انسان از طریق شیر آلوده هنوز بحث‌برانگیز است، با این حال به دلیل افزایش مصرف محصولات شیری غیرپاستوریزه خطر عفونت به کوکسیلا بورنتی نباید نادیده گرفته شود (Eldin *et al.*, 2017). نتیجه تحقیقات یونان شیوع پاتوژن فوق را بسیار متفاوت (محدوده ۰ تا ۹۵٪) دانسته و اعلام نمودند، خطر عفونت کوکسیلا بورنتی با مصرف شیر غیرپاستوریزه و محصولات شیری خام را نباید بی‌اهمیت و نادیده گرفت (Pexara *et al.*, 2018). در بررسی که در بناب بر روی شیر انجام شده ضمن اعلام شیوع ۲۱/۶۶٪، شیر گاو را مخزن بالقوه کوکسیلا بورنتی دانست و تشخیص سریع پاتوژن در نمونه‌ها را، در کنترل و تشخیص مؤثر دانسته و بومی‌سازی تکنیک‌های مولکولی را تأکید نمودند (Khademi *et al.*, 2015). در بررسی شیوع سرمی و فاکتور خطر کوکسیلا بورنتی، نواحی مرکزی ایران، شیوع سرمی عفونت کوکسیلا بورنتی در جمعیت در معرض خطر بالا اعلام شده است (Nokhodian *et al.*, 2017).

در تحقیقاتی بر روی نمونه مخازن تانک‌های شیری گاو و گوسفند در ترکیه طی روش الایزا به ترتیب میزان آلودگی به کوکسیلا بورنتی را ۱۰/۲۸٪ و ۱۶/۸٪ گزارش گردید (Gulmez Saglam and Shahin, 2016). یافته‌های مطالعه‌ای بر روی نمونه‌ی شیر گاوداری‌های روستاهای مونترای کلمبیا و نمونه خون کارگران مزارع پرورش دام ضمن ردیابی پاتوژن کوکسیلا بورنتی، با برآورد آلودگی ۴۵٪ نمونه شیر و ۶۱٪ نمونه‌ی خون بیان نمودند، آلودگی بالا در دام‌ها نشان از عیار بالای عفونت

آن است که شیر خام می‌تواند به‌عنوان یکی از منابع مهم آلودگی به کوکسیلا بورنتی در جوامع انسانی باشد. نتایج تحقیق میدانی انجام‌شده، بیانگر آن است که اختلاف معنی‌داری بین میزان شیوع کوکسیلا بورنتی در نمونه‌های شیر گاو و فصول سال وجود ندارد، با این حال، ارتباط معنی‌داری، بین شیوع آلودگی و شهرستان‌های استان مشاهده می‌شود. میزان $10/3\%$ آلودگی به کوکسیلا بورنتی نشان و تأکیدی بر آلوده بودن منطقه گیلان به این پاتوژن است و این‌که شیر گاو آلوده مخزن بالقوه این پاتوژن می‌باشد، و از آنجایی که نمونه‌های مثبت مربوط به گاوهای فاقد علامت بالینی بودند، شیر آلوده به عامل کوکسیلا بورنتی در دام‌ها می‌تواند، عامل انتشار و گسترش بیماری در جمعیت انسانی و دامی باشد.

سپاس و قدردانی

از کلیه پرسنل شرکت تعاونی دامداران مستقر در شهرستان‌های استان گیلان، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

شهرستان‌های لاهیجان، رودبار، رودسر و صومعه‌سرا بالای 20% بود. از طرفی میزان آلودگی در شهرستان‌های تالش، ماسال، آستانه و رشت منفی بود. همچنین در این مطالعه میزان شیوع آلودگی به کوکسیلا بورنتی در نمونه‌های شیر مورد مطالعه در فصل پاییز بیشتر از سایر فصول بود، اگرچه اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. به‌طور مشابهی در تحقیق در استان اصفهان، فصل سرد سال بالاترین موارد آلودگی دیده شده ($8/6\%$)، که دلیل آن را زایمان‌های بیشتر در فصل زمستان و علت احتمالی آن را دفع میکروب از ترشحات رحمی، مدفوع، ادرار و شیر دام‌ها در زمان زایمان که بیشتر فصول پاییز و زمستان است، دانسته‌اند (Rahimi et al., 2010). مطالعه حاضر اولین گزارش از وضعیت شیوع کوکسیلا بورنتی در شیر گاوهای بومی استان گیلان می‌باشد و جهت بررسی دقیق‌تر و اعلام نظر قطعی در خصوص تعمیم نتایج این تحقیق، به نظر مطالعات تکمیلی (رعایت تمام جوانب)، با حجم نمونه بالاتر نیاز است. در مجموع میزان شیوع کوکسیلا در مخازن جمع‌آوری شیر گاوهای بومی استان گیلان در مقایسه با مطالعه گذشته در ایران مشابه بوده است و این مطلب حاکی از

منابع

- Ahmadizadeh, C., Jamshidian, M. and Mosakhani, F. (2015). Phylogenetic analysis of *Coxiella burnetii* isolates from dairy cow Tehran province. Journal of Comparative Pathobiology, Scientific and Research Branch of Islamic Azad University, Science and Research, 3(50): 1669-1676. [In Persian]
- Anastacio, Sab., Pimenta, L.C., Simoes, J.D., Alegria, N.D., Rabico, A.C., SidiBoumedine, KE. et al., (2016). da Silva GJA. *Coxiella burnetii* is present in milk from dairy cattle herds in The Northwest Portugal. Experimental Pathology and Health Sciences, 8(1): 13-14.
- Arricau-Bouvery, N. and Rodolakis, A. (2005). Is Q fever an emerging or re-emerging zoonoses? Veterinary Research, 36(3): 327-349.

- Banazis, M.J., Bestball, A.S., Reid, S.A. and Fenwick, S.G. (2010). A survey of Western Australian sheep, cattle and kangaroos to determine the prevalence of *Coxiella burnetii*. *Veterinary Microbiology*, 143: 337-345.
- Berri, M., Arricau-Bouvery, N and Rodolakis, A. (2003). PCR based detection of *Coxiella burnetii* from clinical samples in: sachse K, Frey J. (Eds.), *Methods in molecular biology*. Humana press Inc, Totowa, New Jersey (NJ), 153-161.
- Bildfell, R.J., Thomas, G.W., Haines, DM., McEwen, B.J. and Smart, N. (2000). *Coxiella burnetii* infection is associated with placentitis in cases of bovine abortion by Modified acid-fast (MAF) & Immunohistochemical testing (IHC) in cases of bovine abortion. *Journal Veterinary Diagnosis Investing*, 12(5): 419-425.
- Capuano, F., Mancusi, A., Casalnuovo, F., Perugini, A., Proroga, Y., Guarino, A. *et al.*, (2012). Real-time PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in cheeses. *European Food Research and Technology*, 235: 1181-1186.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2015). Q fever. <http://www.cdc.gov/qfever>
- Cerf, O. and Condron, R. (2006). *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiology Infect*, 134(5): 946- 951.
- Chin, J. (2000). *Control of Communicable Diseases Manual*. 17th edition, American Public Health Association, pp. 407- 410
- Contrevas, V., Mattar, S., Gonzalez, M., Alvarez, J. and Oteo, JA. (2015). *Coxiella burnetii* in bulk tank milk and antibodies in fram workers at Monteria, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 28(2): 181-187.
- Cutler, S.J., Bouzid, M. and Cutler, RR. (2007). Q fever. *Journal Infection in New Zealand*, 54(4): 313-318.
- David, W., Didier, R., Stephen, D. and Thomas, M. (2001). *Rickettsia Mycoplasma and Chlamydia*, Q fever, *Harrisons Principles of Internal Medicine*, pp. 1072-1073.
- Delsing, C.E. and Kullberg, B.J. (2008). Q fever in the Netherlands: a concise overview and implications of the largest ongoing outbreak. *Net Journal Medical*, 66(9): 365-367.
- Ebrahimi, L., Khalili, M. and Abiri, Z. (2015). Investigation on the presnrce of antibody *Coxiella burnetii* in bulk milk. The 2nd National Conference on milk health from production to consumption and nutritional importance. Tehran Food and Drug Administration. Iran University of Medical Sciences, [In Persian].
- Eldin, C., Melenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S. *et al.*, (2017). From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. *Clinical Microbiology Reverse*, 30: 15-190.
- Fretz, R., Schaeren, W., Tanner, M. and Baumgartner, A. (2007). Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii*. *Intrenational Journal food Microbiology*, 116(3): 414 -418.
- Guatteo, R., Beaudau, F., joly, A. and Seegers, H. (2006). Shedding routs of *Coxiella burnetii* in dairy cows implications for detection and control. *Veterinary Reserch*, 37(6): 827-833.
- Guidi, F., Petruzzelli, A., Ciarrocchi, F., Duranti, A., Valiani, A., Amagliani, G. *et al.*, (2017). Prevalence of *Coxiella burnetii* in cow's and ewe's bulk tank milk samples from selected dairy farms of Central Italy. *Italian Journal of Animal Sience*, 16(4): 673-676.
- Gulmez Saglam, A. and Sahin, M. (2016). *Coxiella burnetii* in samples from cattle hreds and sheep flocks. *Veterinarni Medicina*, 61: 17-22.
- Hatami, H. (2003). *Clinical Epidemiology and control of diseases related to: Bioterrorism*. (2th Edition), Ministry of Health and Maedical Education. Kerman University of Medical Science, Center for Diseases Management, pp. 277-293 [In Persian].
- Hilbert, A., Andres, T., Werner, R., Wehr, R., Frohlich, A., Conraths, F.J. *et al.*, (2015). Detection of *Coxiella burnetii* in dairy cattle bulk tank milk and single tank milk samples. *Berliner and*

- Munchener tierarztliche Wochenschrift, 128: 271-277.
- Hirai, A., Kaneko, S., Nakama, A., Ishizaki, N., Odagiri, M., Kai, A. *et al.*, (2005). Investigation and Detection of *Coxiella burnetii* contamination in commercial milk and egg. *Shokhin Eiseigaku Zasshi*, 46: 86-92.
 - Kargar, M., Rashidi, A., Doosti, A., Ghorbani Dalini, S. and Najafi, A. (2012). Prevalence of *Coxiella burnetii* in bovine bulk milk samples. Article in *Comparative Clinical pathology*, 22(3): 1406-1409 [In Persian].
 - Kazemeini, H.R. (2018). Evaluation of Prevalence of *Coxiella burnetii* in cow's milk produced in Iran by two method Nested PCR & Real- time PCR. First International Conference on New Technology in Science in Amol.
 - Khademi, P., Mahzonieh, M.R. and Esmaili Kotahmer, M. (2015). Genomic Detection of *Coxiella burnetii* in cattle milk samples. *Arak Medical University Journal*, 18(4): 49-57 [In Persian].
 - Kim, S.G., Kim, E.H., Lafferty, C.J. and Dubovi, E. (2005). *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples from driry cattle. *Emerging Infectious Diseases*, 11(4): 619-621.
 - Lang, G.H. (1990). *Coxiellosis* (Q fever) in animals, CRC press, Boca Raton, Florida, pp. 23-48.
 - Marrie, T and Raoult, D. (1997). Q fever a review and issues for the next centry. *International Journal Antimicrobial Agent*, 8(3): 145-161.
 - Maurin, M and Raoult, D. (1999). Q fever. *Clinical Microbiolgy Review*, 12: 518-553.
 - Nokhodian, Z., Ataei, B., Moradi, A., Yaran, M., Gaffari Hoseini, S., Feizi, A. *et al.*, (2017). Seroprevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* infection among high-risk population, a neglected health problem. *Acta Tropica*, 169: 107-111 [In Persian].
 - Parker, N.R., Barralet, JH. and Bell, AM. (2006). Q fever. *Lancet*, 367(9511): 679-688.
 - Pexara, A., Solomakos, N. and Govaris, A. (2018). Q fever and prevalence of *Coxiella burnetii* in milk. *Trends in Food Science & Technology*, 71: 65-72.
 - Rad, M.A. (2010). Common human and university diseases. *Jahad University Press*, (Tehran University Press Publishing House), pp. 71-75 [In Persian].
 - Rahimi, E., Amrei, M., Karim, G. and Doosti, A. (2011). Prevalence of *Coxiella burnetii* bulk in milk sample from dairy bovine, ovine, caprine, and camel herds. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8: 307-310 [In Persian].
 - Rahimi, E., Doosti, A., Ameri, M., Kabiri, E and Sharifian, B. (2009). Detection of *Coxiella burnetii* in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, and caprine herds. *Zoonoses Public Health*, 57: 38 - 41 [In Persian].
 - Rahimi, E., Torki Baghbadorani, Z. and Doosti, A. (2010). An assay to determine the seasonal prevalence of *Coxiella burnetii* in cow milk using. *Journal of Microbial World*, 3(1): 56-62 [In Persian].
 - Raoult, D. (1996). Q fever: still a query after all these years. *Journal Medical Microbiology*, 44: 77-78.
 - Rodolakis, A., Berri, M., Hechard, C., Caudron, C., Souriau, A., Bodier, C.C. *et al.*, (2007). Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *Journal of Dairy Science*, 90: 5352-5360.
 - Sakhaee, E. and Khalili, M. (2010). The first prevalence serologic of Q fever from sheep. *Tropical Animal Health Product*, 42: 1561-1564 [In Persian].
 - To, H., Htwe, K.K., kako, N., Kim, H.J., Yamaguchi, T., Fukushi, H. *et al.*, (1998). Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 60: 859-861.
 - Zoghi, A. (1994). Bacterial, Rickettsial and Mycotic Zoonoses. (Translation). Authors: Steele, H.J. 2nd edition, Tehran University Jihad Publications, pp. 511-532 [In Persian]
 - Zhang, G.Q., Nguyen, S.V., To, H., Ogawa, M., Hotta, A., Yamaguchi, T. *et al.*, (1998). Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum sample. *Journal Clinical Microbiology*, 36(1): 77-80.

Prevalence of *Coxiella burnetii* in bovine bulk milk by Nested-PCR in Gilan province

Nourozhaghi Nobijari, A.¹, Rahimi, E.^{2*}, Shakerian, A.²

1. M.Sc Graduate of School of Veterinary Medicine, Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2. Professor, Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

*Corresponding author: ebrahimrahimi55@yahoo.com

(Received: 2018/5/20 Accepted: 2019/7/21)

Abstract

Q fever with *Rickettsia* factor is a zoonotic disease having a high pathogenicity. In recent years, it is not just considered as the occupational disease of veterinarian and ranchers. Milk consumption plays an important role in epidemic condition and spread of the disease. This study aimed to examine the prevalence of *Coxiella burnetii* in bulk cow milk of Gilan province. In this cross-sectional-descriptive study (from summer 2016 to spring 2017), a total of 204 milk samples was collected from the milk collection bulk of Gilan province and tested for detection of the prevalence rate of *C. burnetii* using Nested-PCR. From 204 sample of raw milk, 21 samples (10.29%) were positive to *C. burnetii* presence. The highest rate of contamination was seen in Lahijan (33.3%) and Roodbar (29.4 %). The samples collected from Rasht, Talesh, Astaneh and Masal were not found positive for *C. burnetii*. Examination of the seasonal prevalence of the samples indicated no statistical difference between the different seasons. The results revealed that bulk cow milk could be a potential source of *C. burnetii* in Iran.

Conflict of interest: None declared.

Key words: Milk, Cow, *Coxiella burnetii*, Nested PCR, Gilan, Iran