



دوره ۹، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۵، صفحات ۱-۱۱

برآورد شیوع مولکولی *Coxiella burnetii* در شیر خام گاو و بز منطقه سیستان با استفاده از Nested PCR

ستیا علی ملائی^۱، مهدی راسخ^{۲*}، علی سارانی^۳، حسن احمدی^۴

۱- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل- ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل- ایران.

۳- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل- ایران.

۴- کارشناس ارشد، آزمایشگاه مرکزی، دانشگاه زابل، زابل- ایران.

* نویسنده مسؤول: مهدی راسخ، بیماریهای داخلی دامهای بزرگ - آدرس: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، کیلومتر ۲ جاده

بنجار- تلفن تماس: ۰۵۴۳۱۲۳۲۲۸۸

ایمیل: mrasekh@ut.ac.ir

دریافت مقاله: ۲۹ فروردین ۱۴۰۵، بازنگری: ۲۹ اردیبهشت ۱۴۰۵، پذیرش نهایی: ۲۵ خرداد ۱۴۰۵



10.22034/NFVM.2026.587670.1318

چکیده

تب کیو یک بیماری مشترک مهم بین انسان و دام است که توسط کوکسیلا بورتی ایجاد می‌شود. نشخوارکنندگان اهلی مخازن اصلی هستند و دفع باکتری از شیر، خطر انتقال به انسان دارد. این مطالعه با هدف تعیین شیوع مولکولی کوکسیلا بورتی در شیر گاو و بز منطقه سیستان و بررسی عوامل خطر سن و گونه انجام شد. در این مطالعه مقطعی، ۱۰۰ نمونه شیر (۷۰ نمونه گاو، ۳۰ نمونه بز) به روش خوشه‌ای از گله‌های شهرستان‌های زابل، هامون، زهک، هیرمند و نیمروز در بهار ۱۴۰۴ جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، ژن *com1* با روش Nested PCR تکثیر شد. محصولات ۴۳۸ جفت‌بازی روی ژل آگارز الکتروفورز شدند. تحلیل آماری با SPSS نسخه ۲۷ و آزمون‌های کای مربع و دقیق فیشر انجام گرفت (سطح معنی‌داری ۰/۰۵). از ۱۰۰ نمونه، ۴ نمونه (۴٪) با فاصله اطمینان ۹۵٪ (۹/۹٪-۱/۱٪) مثبت بودند. شیوع در گاوها ۴/۳ درصد (۳ نمونه) و در بزها ۳/۳ درصد (۱ نمونه) بود. بین سن دام و شیوع عفونت ارتباط معنی‌دار وجود داشت ($P=0/031$) و همه موارد مثبت در سن بالای ۴ سال بودند. ارتباط بین گونه دامی و عفونت معنی‌دار نبود ($P=0/843$). هرچند شیوع ۴٪ در مقایسه با برخی مطالعات ایران پایین‌تر است، شناسایی DNA باکتری در شیر خام نشان‌دهنده حضور احتمالی عامل در منطقه است و لزوم پایش مستمر و رعایت اصول بهداشتی در مصرف شیر را خاطرنشان می‌سازد. با این حال، برای اثبات قطعی وجود باکتری و خطر انتقال، نیاز به تأیید توالی‌یابی و مطالعات تکمیلی است. مشاهده موارد مثبت فقط در دام‌های بالای ۴ سال می‌تواند نشان‌دهنده احتمال بیش‌تر مواجهه یا دفع در دام‌های مسن‌تر باشد.

واژگان کلیدی: کوکسیلا بورتی، تب کیو، سیستان، شیر خام، Nested PCR

مقدمه

تب کیو یک بیماری مشترک مهم بین انسان و دام است که اولین بار در سال ۱۹۳۵ توسط دریک در کارگران کشتارگاه کوئینزلند استرالیا گزارش شد (۱). عامل آن، باکتری گرم منفی درون سلولی اجباری *Coxiella burnetii* است که به دلیل مقاومت بالای محیطی و دُز عفونی بسیار پایین، به عنوان یک عامل بیوتروریسم دسته B نیز طبقه بندی می شود (۲). نشخوارکنندگان اهلی به ویژه گوسفند، بز و گاو، مخازن اصلی این بیماری هستند و باکتری به مقادیر زیاد از طریق جفت، مایعات جنینی، ترشحات واژینال و به مدت طولانی (تا ۳۲ ماه) از شیر دفع می شود (۳). در دام ها، عفونت اغلب تحت بالینی است اما می تواند باعث سقط های دیررس، مرده زایی، ناباروری و ورم پستان مزمن شود (۴). خسارت اقتصادی در همه گیری هلند (۲۰۱۰-۲۰۰۷) حدود ۳۵۰۰۰ یورو به ازای هر مزرعه در سال برآورد شده است (۵).

تشخیص دقیق برای کنترل بیماری ضروری است. روش های سرولوژیک مانند الایزا، پاسخ آنتی بادی را سنجش می کنند و ممکن است دفع فعال باکتری را نشان ندهند (۶) در مقابل، روش های مولکولی تشخیص *Coxiella burnetii* مانند *Nested PCR* با هدف قرار دادن ژن های پایدار شده ای مانند *com1* یا *IS1111*، حساسیت و ویژگی بالاتری دارند (۷). عناصر تکراری مانند *IS1111* که به دلیل وجود چندین کپی در ژنوم، حساسیت بالاتری دارند، و ژن های تک کپی مانند *com1* که ویژگی (اختصاصیت) بالاتری دارند (۸). اگرچه ژن *IS1111* به دلیل کپی های متعدد (تا ۱۱۰ نسخه در هر ژنوم) حساسیت بالاتری ارائه می دهد (۹)، اما مطالعات متعدد نشان داده اند که هدف قرار دادن ژن *com1* با روش *Nested PCR* می تواند تا بیش از ۹۶ درصد نمونه های مثبت را شناسایی کند و به دلیل حفاظت شدگی بالای توالی این ژن، خطر نتایج منفی کاذب ناشی از جهش های نقطه ای یا حذف ژن، کاهش می یابد (۱۰). همچنین، مطالعات انجام شده در ایران نیز نشان داده اند که ژن *com1* به عنوان یک هدف

اختصاصی و قابل اعتماد برای تشخیص کوکسیلا بورنتی در شیر دام ها عمل کرده است (۱۱). با توجه به ماهیت اکتشافی این مطالعه و تأکید بر ویژگی تشخیصی، هدف قرار دادن ژن *com1* با روش *Nested PCR* به عنوان روش انتخابی در نظر گرفته شد.

در ایران، شیوع مولکولی *C. burnetii* در شیر گاو در استان های مختلف بین ۴/۲۲ درصد و ۲۵/۵۵ درصد گزارش شده است (۱۲ و ۱۳). نمونه های شیر به عنوان یک ماتریس غیرتهاجمی و در دسترس برای غربالگری گله های شیری انتخاب شدند. مطالعات قبلی نشان داده اند که دفع باکتری از طریق شیر می تواند تا ۳۲ ماه پس از عفونت ادامه یابد و بنابراین شیر به عنوان یک شاخص مناسب برای شناسایی گله های آلوده محسوب می شود (۴) با این حال، اطلاعاتی از منطقه سیستان که دارای شرایط اقلیمی گرم و خشک و تردد بالای دام مرزی است، وجود ندارد. همچنین به دلیل جابه جایی دام، دامداری سنتی، مصرف فرآورده های لبنی محلی و محدود بودن داده های منطقه ای، بررسی حضور مولکولی عامل در شیر خام دام های سیستان می تواند برای طراحی برنامه های پایش بهداشتی مفید باشد. بنابراین، این مطالعه با هدف تعیین شیوع مولکولی *C. burnetii* در شیر گاو ها و بز های منطقه سیستان و بررسی ارتباط آن با سن و گونه دامی انجام شد.

مواد و روش ها

زمان و مکان مطالعه: این مطالعه مقطعی در فصل بهار (فروردین تا خرداد) سال ۱۴۰۴ در منطقه سیستان شامل شهرستان های زابل، هامون، زهک، هیرمند و نیمروز انجام شد. مراحل استخراج DNA و PCR در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه زابل انجام گردید.

جامعه آماری و روش نمونه گیری: جامعه آماری شامل کلیه ی گاو ها و بز های شیری منطقه سیستان بود. این مطالعه به صورت مقطعی (cross-sectional) طراحی شد. حجم نمونه بر اساس فرمول کوکران با فرض شیوع ۱۰٪ (بر اساس مطالعات اخیر در ایران که شیوع مولکولی *Coxiella burnetii* را در شیر خام حدود ۹.۳٪ تا

گرفته شد، ۵ میکرولیتر پروتئاز اضافه و در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس ۴۰۰ میکرولیتر محلول لیز (۳۷ درجه، پیش گرم) اضافه و ۱۵ ثانیه ورتکس شد. پس از افزودن ۳۰۰ میکرولیتر محلول رسوب‌دهنده و سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه، $12000 \times g$)، رسوب با ۱ میلی‌لیتر بافر شستشو شسته و در ۶۵ درجه خشک شد. در نهایت، ۳۰ میکرولیتر بافر حل‌کننده اضافه و در ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. غلظت و خلوص DNA با اسپکتروفتومتر (Thermo Scientific, USA) در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر سنجیده شد (نسبت قابل قبول: ۱/۷ تا ۲).

طراحی پرایمرها و انجام Nested PCR: برای تشخیص ژنوم *C. burnetii*، ژن $com1$ با روش Nested PCR تکثیر شد. توالی پرایمرها بر اساس مطالعات Zhang و همکاران (۱۹۹۸) و Fretz و همکاران (۲۰۰۷) در جدول ۱ ارائه شده است (۱۶ و ۱۵).

٪ ۱۵.۱ گزارش کرده‌اند (۱۴ و ۱۲)، خطای قابل قبول ٪ ۵ و سطح اطمینان ٪ ۹۵ محاسبه گردید که حجم نمونه ۱۳۸ برآورد شد. با توجه به محدودیت‌های منطقه‌ای، ۱۰۰ نمونه جمع‌آوری شد که با شیوع مشاهده شده در مطالعه حاضر، بر ماهیت اکتشافی (exploratory) مطالعه تأکید دارد و نتایج باید با احتیاط تفسیر شوند.

با روش نمونه‌گیری خوشه‌ای، ابتدا ۵ گله گاو و ۲ گله بز به‌طور تصادفی انتخاب و سپس ۷۰ نمونه شیر از گاوها و ۳۰ نمونه از بزها به‌طور تصادفی جمع‌آوری گردید. نمونه‌های شیر (۱۵ میلی‌لیتر) پس از ضدعفونی سرپستانک با الکل ٪ ۷۰، در فالكون‌های استریل در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج DNA و ارزیابی کمیت و کیفیت: استخراج DNA با کیت تجاری سیناکلون (سیناکلون، ایران) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. خلاصه مراحل: ۱ میلی‌لیتر شیر سانتریفیوژ (۷ دقیقه، $12000 \times g$)، رسوب

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن $com1$ در *Coxiella burnetii*

مرحله	نام پرایمر	توالی	اندازه محصول (جفت باز)	منبع
مرحله اول (PCR معمولی)	OMP _۱	AGTAGAAGCATCCCAAGCATTG	۵۰۱	Zhang et al., ۱۹۹۸
	OMP _۲	TGCCTGCTAGCTGTAACGATTG		
مرحله دوم (Nested PCR)	OMP _۳	GAAGCGCAACAAGAAGAACAC	۴۳۸	Fretz et al., ۲۰۰۷
	OMP _۴	TTGGAAGTTATCACGCAGTTG		

(Eppendorf Mastercycler, Germany) با برنامه دمایی خاصی انجام شد. برنامه حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۶ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود.

در مرحله دوم Nested PCR، ۱ میکرولیتر از محصول رقیق‌شده (۱:۱۰) مرحله اول به‌عنوان الگو استفاده شد و برنامه مشابه با ۳۵ چرخه و گسترش نهایی ۷ دقیقه بود.

مخلوط واکنش برای مرحله اول PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر آماده شد. غلظت نهایی هر یک از پرایمرهای OMP_۱ و OMP_۲ در واکنش ۱۲/۵ پیکومول بود. ترکیبات واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon, Denmark)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۶ میکرولیتر آب مقطر عاری از DNase بود. لوله‌های حاوی مخلوط واکنش به آرامی سانتریفیوژ مختصری شدند تا تمامی محتویات در کف لوله جمع‌آوری شوند.

واکنش‌های مرحله اول در دستگاه ترموسایکلر

محصولات مرحله دوم روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی رنگ Safe Stain (سیناکلون، ایران) در بافر TBE با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند و با دستگاه ژل داک (Rad-Bio, USA) مشاهده گردیدند. باند ۴۳۸ جفت باز مثبت تلقی شد. کنترل مثبت DNA استاندارد C. burnetii سویه Nine Mile (RSA۴۳۹) و کنترل منفی (آب مقطر) و کنترل استخراج در هر سری منظور شد. برای جلوگیری از آلودگی، تمام مراحل آماده سازی واکنش ها، افزودن DNA و الکتروفورز در سه فضای مجزا انجام شد. از نوک سمپلرهای فیلتردار استفاده گردید. کنترل منفی در هر دو مرحله PCR منظور شد و نمونه های مثبت برای تأیید نتایج، دو بار به صورت مجزا آزمایش شدند. همچنین استخراج مجدد از نمونه های مثبت انجام گردید. در کلیه مراحل، از دستگاه های مجزا برای آماده سازی و الکتروفورز استفاده شد. همچنین کنترل منفی پس از هر ۵ نمونه مثبت در چیدمان ژل قرار داده شد تا احتمال آلودگی در حین الکتروفورز نیز کنترل شود. برای اطمینان از عدم وجود مهارکننده های PCR در نمونه های شیر، از یک کنترل داخلی (Internal Amplification Control) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن بتا-اکتین گاو و بز استفاده شد. تمام نمونه هایی که باند داخلی را نشان ندادند، مجدداً استخراج و تحت آزمایش قرار گرفتند. از مجموع ۱۰۰ نمونه، ۳ نمونه (۳٪) به دلیل مهار واکنش، مجدداً استخراج شدند و پس از استخراج مجدد، باند داخلی در همه آنها مشاهده گردید. همچنین از روش اسپایک (Spike) با افزودن غلظت مشخصی از DNA کنترل مثبت به چند نمونه منفی تصادفی، برای تأیید عدم مهار استفاده شد.

اطلاعات اخلاق پژوهش و رضایت دامداران: این مطالعه با تأیید کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه زابل (کد اخلاق:

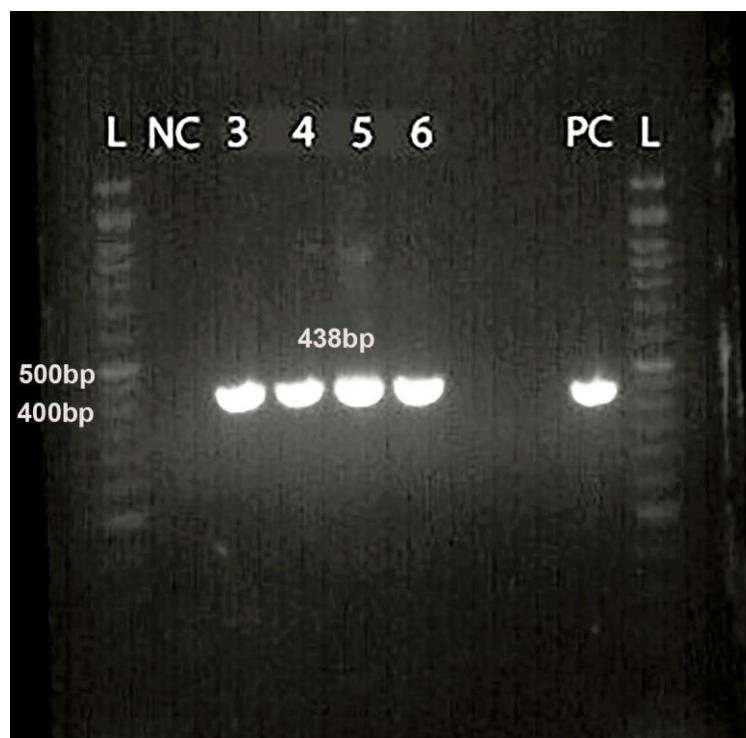
IR.UOZ.REC.1404.026) انجام شد. نمونه گیری پس از

اخذ رضایت آگاهانه از دامداران صورت گرفت و با اصول نگهداری و رفاه حیوانات مطابقت داشت. کلیه اطلاعات دامداران به صورت محرمانه نگهداری شد و تنها داده های جمع آوری شده به صورت گروهی در مقاله ارائه گردید.

تحلیل آماری: داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۷ (IBM Corp., Armonk, NY, USA) تحلیل شدند. شیوع با فاصله اطمینان ۹۵٪ با توزیع دوجمله ای محاسبه گردید. برای بررسی ارتباط بین متغیرهای کیفی مثل گونه و گروه های سنی و آلودگی از آزمون کای دو و آزمون دقیق فیشر (Fisher's Exact Test) استفاده شد که برای داده های با تعداد کم مناسب تر است. برای بررسی روند ارتباط بین افزایش سن و آلودگی، از آزمون دقیق روند (Fisher's Exact Test for Trend) استفاده گردید. سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر، ۴ نمونه (۴٪) با فاصله اطمینان ۹۵٪: ۹/۹٪-۱/۱٪ از نظر *C. burnetii* مثبت بودند (شکل ۱). لازم به ذکر است که نمونه های مثبت متعلق به چهار گله مختلف بودند (یک نمونه مثبت از گاوداری در زابل، یک نمونه از گاوداری در هامون، یک نمونه از گاوداری در زهک و یک نمونه از بز در نیمروز). بنابراین هر چهار نمونه مثبت از گله های مجزا بودند و تجمع آلودگی در یک گله خاص مشاهده نشد. با این حال، به دلیل حجم محدود نمونه در سطح گله، تحلیل در سطح حیوان با احتیاط تفسیر شده است (جدول ۲). شیوع در گاوها ۴/۳٪ (۳ نمونه از ۷۰) و در بزها ۳/۳٪ (۱ نمونه از ۳۰) بود (جدول ۳). آزمون دقیق فیشر نشان داد ارتباط معنی داری بین گونه دامی و عفونت وجود ندارد ($P=0/843$).



شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصولات Nested PCR روی ژل آگارز و باندهای ۴۳۸ جفت باز ژن *com1* کوکسیلا بورتنی (L: لدر ۵۰ جفت باز، NC: کنترل منفی، ۳-۶: نمونه‌های مثبت، PC: کنترل مثبت)

ارتباط معنی‌داری بین افزایش سن و شیوع عفونت وجود دارد ($P=0/031$). توزیع عفونت بر اساس هر دو متغیر سن و گونه در جدول ۵ ارائه شده است.

از نظر گروه‌های سنی، ۲۱ دام (۲۱٪) زیر ۲ سال، ۳۶ دام (۳۶٪) ۲ تا ۴ سال و ۴۳ دام (۴۳٪) بالای ۴ سال سن داشتند. تمام ۴ نمونه مثبت در گروه سنی بالای ۴ سال بودند (جدول ۴). آزمون خط به خط مربع کای نشان داد

جدول ۲. اطلاعات مربوط به گله‌های مختلف برای نمونه‌های شیر خام گرفته شده

شهرستان	گونه دامی	تعداد گله	جمعیت گله	تعداد کل نمونه	تعداد مثبت	درصد مثبت
زابل	گاو	۲	۱۴۰	۲۸	۱	۳/۶٪
زابل	بز	۱	۶۰	۱۵	۰	۰٪
هامون	گاو	۱	۷۰	۱۴	۱	۷/۱٪
زهک	گاو	۱	۶۰	۱۴	۱	۷/۱٪
هیرمند	گاو	۱	۶۰	۱۴	۰	۰٪
نیمروز	بز	۱	۵۵	۱۵	۱	۶/۷٪

جدول ۳- توزیع فراوانی آلودگی به *Coxiella burnetii* بر اساس گونه دامی

گونه دامی	تعداد نمونه	تعداد مثبت	درصد مثبت	فاصله اطمینان ۹۵٪	P مقدار
گاو	۷۰	۳	۴/۳	۰/۹٪-۱۱/۹٪	۰/۸۴۳
بز	۳۰	۱	۳/۳	۰/۱٪-۱۷/۲٪	
کل	۱۰۰	۴	۴	۱/۱٪-۹/۹٪	

جدول ۴- توزیع فراوانی آلودگی به *Coxiella burnetii* بر اساس گروه سنی

گروه سنی	تعداد نمونه	تعداد مثبت	درصد مثبت	P مقدار
کمتر از ۲ سال	۲۱	۰	۰٪	۰/۰۳۱
۲ تا ۴ سال	۳۶	۰	۰٪	
بیشتر از ۴ سال	۴۳	۴	۹/۳٪	

جدول ۵- توزیع آلودگی به *Coxiella burnetii* بر اساس گونه و سن دام

گونه	گروه سنی	تعداد کل	تعداد مثبت	درصد مثبت در گروه
گاو	کمتر از ۲ سال	۱۱	۰	۰٪
	۲ تا ۴ سال	۲۴	۰	۰٪
	بیشتر از ۴ سال	۳۵	۳	۸/۶٪
بز	کمتر از ۲ سال	۱۰	۰	۰٪
	۲ تا ۴ سال	۱۲	۰	۰٪
	بیشتر از ۴ سال	۸	۱	۱۲/۵٪

بحث و نتیجه گیری

مقایسه شیوع با مطالعات پیشین: تا جایی که نویسندگان با جستجوی جامع در پایگاه‌های داده داخلی و بین‌المللی بررسی کرده‌اند، این مطالعه نخستین گزارش مولکولی از حضور *Coxiella burnetii* در شیر خام گاو و بز در منطقه سیستان است. با این حال، با توجه به محدود بودن حجم نمونه و عدم تأیید توالی‌یابی، این یافته به عنوان یک گزارش منطقه‌ای اولیه ارائه می‌شود و تعمیم آن نیازمند مطالعات تکمیلی با تأیید مولکولی معتبرتر است. شیوع کلی ۴٪ (فاصله اطمینان ۹۵٪: ۹٪-۱۱٪) در این منطقه نسبت به مطالعات قبلی انجام شده در نقاط مختلف ایران پایین‌تر بود. به عنوان مثال، در مطالعه انفرادی و همکاران (۲۰۲۳) در منطقه ارومیه، شیوع *C. burnetii* در شیر گاوها ۱۲٪ و در گاومیش‌ها ۱۲/۶۶ درصد گزارش شده است (۱۷). همچنین مطالعه مروری اسماعیلی و همکاران (۲۰۱۹) شیوع ۱۵/۰۹ درصد را در شیر گاوها ایران اعلام کرده است (۱۲). اما در سطح جهانی میزان شیوع در کشورهای همسایه مانند پاکستان (۶/۳٪)، عراق (۱۴٪) و مصر (۱۰/۶۷٪) بالاتر از یافته مطالعه حاضر بوده است (۱۸-۲۰). این اختلاف می‌تواند ناشی از شرایط اقلیمی گرم و خشک سیستان (که برای بقای طولانی باکتری مساعد نیست)، تفاوت در حساسیت روش تشخیصی (هدف قرار دادن ژن com۱ با تک کپی در مقابل IS۱۱۱۱ با کپی بالا) و تفاوت در مدیریت گله‌ها باشد.

یکی از نکات قابل توجه در تفسیر نتایج این مطالعه، انتخاب ژن com۱ به عنوان هدف مولکولی است. همان‌طور که در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است، روش‌های مختلف PCR بر اساس ژن هدف، حساسیت متفاوتی دارند (۲۱ و ۱۰). **سیمونوف و همکاران (۲۰۲۵)** در یک مطالعه تطبیقی نشان دادند که Nested PCR با هدف قرار دادن ژن com۱ می‌تواند تا ۹۶/۳ درصد نمونه‌های مثبت را شناسایی کند، در حالی که روش معمولی PCR با هدف IS۱۱۱۱ تنها ۵۶/۷ درصد تشخیص مثبت داشت (۱۰). این

یافته نشان می‌دهد که علی‌رغم تک‌کپی بودن ژن com۱، به دلیل حفاظت‌شدگی بالای توالی و کاهش احتمال جهش در ناحیه اتصال پرایمر، این ژن می‌تواند هدفی با ویژگی و پایداری بالا باشد (۸). با این حال، باید اذعان داشت که استفاده از ژن تک‌کپی مانند com۱ ممکن است نسبت به عناصر تکراری مانند IS۱۱۱۱ از حساسیت کمتری برخوردار باشد. **اونق و همکاران (۲۰۲۵)** در مطالعه‌ای بر روی نمونه‌های شیر در خرم‌آباد ایران نشان دادند که با هدف قرار دادن ژن IS۱۱۱۱، شیوع کوکسیلا بورنتی در شیر گاوها ۱۴/۴ درصد گزارش شد، در حالی که با هدف ژن com۱، شیوع ۵/۸ درصد محاسبه گردید (۱۱). همچنین، **جونز و همکاران (۲۰۰۶)** در مطالعه‌ای بر روی نمونه‌های سقط جنین نخ‌خوارکنندگان در بریتانیا نشان دادند که روش IS۱۱۱۱ با شناسایی ۲۵ درصد نمونه‌ها، حساسیت بالاتری نسبت به روش com۱ با ۲۰ درصد داشت (۲۱). بنابراین، شیوع برآورد شده در مطالعه حاضر (۴٪) ممکن است کم‌تر از مقدار واقعی باشد و بخشی از این اختلاف با سایر مطالعات می‌تواند به تفاوت در حساسیت روش‌های تشخیصی مربوط باشد. با این حال، با توجه به تأکید این مطالعه بر ویژگی تشخیصی و کاهش نتایج مثبت کاذب، انتخاب ژن com۱ منطقی به نظر می‌رسید.

تفسیر یافته‌های مربوط به سن و گونه: ارتباط معنی‌دار بین سن بالای ۴ سال و شیوع عفونت ($P=0/031$) نشان می‌دهد دام‌های مسن‌تر به دلیل مواجهه تجمعی طولانی‌تر با باکتری در محیط، احتمال آلودگی بیشتری دارند و همچنین طولانی‌تر بودن دوره شیردهی در دام‌های مسن، احتمال دفع باکتری از طریق شیر را افزایش می‌دهد. از سوی دیگر، با افزایش سن، کارایی سیستم ایمنی کاهش یافته و دام‌ها مستعدتر می‌شوند. این یافته از نظر مدیریت بهداشتی گله اهمیت دارد، زیرا دام‌های مسن‌تر را به عنوان گروه هدف اصلی برای اقدامات کنترلی و غربالگری معرفی می‌کند. با این حال با وجود مقدار P -value برابر ۰/۰۳۱ بدست آمده که نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار آماری بین سن بالای ۴ سال و آلودگی است، به دلیل تعداد کم موارد مثبت

و عدم تأیید توالی‌یابی، این یافته باید با احتیاط قابل توجهی تفسیر شود و صرفاً به‌عنوان یک یافته مقدماتی مطرح می‌گردد و نشان‌دهنده عدم قطعیت در برآورد است که نیازمند تأیید در مطالعات بزرگ‌تر با حجم نمونه کافی و تأیید مولکولی معتبر است. این نتایج با یافته‌های *Muema* و همکاران (۲۰۱۷) و *Klaasen* و همکاران (۲۰۱۴) همسو است (۲۳ و ۲۴). با این حال، برخلاف مطالعه *Milkesa* و همکاران (۲۰۲۴) که گونه را عامل خطر معرفی کرد، در مطالعه ما تفاوت معنی‌داری بین گاو و بز وجود نداشت ($P=0/843$). این موضوع احتمالاً به دلیل غلبه عوامل محیطی و مدیریتی مشترک بر تفاوت‌های ذاتی بین گونه‌ها در منطقه سیستان است. هرچند که در این مطالعه، تفاوت معناداری بین گاو و بز مشاهده نشد با این حال، فاصله اطمینان ۹۵٪ برای شیوع در بزها بسیار وسیع بود (۰/۱ تا ۱۷/۲٪) که نشان‌دهنده عدم قطعیت بالای این برآورد است. به دلیل تعداد کم نمونه‌های بز و تعداد محدود موارد مثبت، به‌ویژه با عدم تأیید توالی‌یابی، امکان رد تفاوت واقعی بین گونه‌ها وجود ندارد و این یافته صرفاً به‌عنوان یک مشاهده در نمونه مورد مطالعه مطرح می‌شود و نیازمند بررسی در مطالعات بزرگ‌تر با حجم نمونه کافی در هر گونه است.

اگرچه شیوع ۴٪ در این مطالعه نسبتاً پایین به نظر می‌رسد، اما وجود باکتری در شیر دام‌ها یک خطر بالقوه برای سلامت عمومی محسوب می‌شود. شناسایی DNA باکتری در شیر خام نشان‌دهنده مواجهه یا دفع احتمالی عامل در دام‌هاست و از نظر بهداشت عمومی اهمیت دارد. با این حال، PCR به تنهایی زنده بودن باکتری یا خطر عفونت‌زایی مستقیم از طریق مصرف شیر را اثبات نمی‌کند. با وجود این، مطالعات قبلی نشان داده‌اند که *Coxiella burnetii* می‌تواند در شیر خام تا چند هفته زنده بماند و مصرف شیر غیرپاستوریزه به‌عنوان یک راه انتقال احتمالی در برخی شیوع‌ها گزارش شده است (۲). بنابراین، یافته‌های مطالعه حاضر از نظر بهداشت عمومی و ضرورت پاستوریزاسیون شیر حائز اهمیت است، اما به دلیل

عدم تأیید توالی‌یابی و عدم بررسی زنده بودن باکتری، این نتایج باید به‌عنوان داده‌های مقدماتی تلقی شوند و برای اثبات انتقال از طریق شیر به مطالعات تکمیلی با کشت یا روش‌های تشخیص زنده بودن باکتری همراه با تأیید توالی‌یابی نیاز است. در مناطق روستایی سیستان، مصرف شیر خام و فرآورده‌های لبنی سنتی (مانند ماست، کشک و پنیر محلی) که اغلب بدون طی فرآیند پاستوریزاسیون تهیه می‌شوند، همچنان رایج است. *Coxiella burnetii* به دلیل مقاومت حرارتی نسبی، ممکن است در فرآورده‌های لبنی سنتی که حرارت کافی نمی‌بینند، زنده بماند. بنابراین، دامداران، کارگران دامپروری و اعضای خانواده آن‌ها که در معرض شیر خام قرار دارند، گروه‌های در معرض خطر محسوب می‌شوند.

محدودیت‌های روش مولکولی و اهمیت آن: از محدودیت‌های مطالعه می‌توان به حجم نمونه نسبتاً کوچک، عدم انجام توالی‌یابی و آزمون سرولوژیک همزمان و انتخاب ژن تک کپی (com1) اشاره کرد. مهم‌ترین محدودیت مطالعه حاضر، عدم تأیید توالی‌یابی (sequencing) محصولات مثبت PCR است. با وجود کنترل‌های دقیق آزمایشگاهی (کنترل منفی در هر دو مرحله PCR، تکرار تست، استخراج مجدد و جداسازی فضاها)، احتمال خطاهای ناشی از تکثیر غیراختصاصی یا آلودگی را نمی‌توان به‌طور کامل رد کرد. از آنجا که تعداد نمونه‌های مثبت در این مطالعه بسیار محدود است (۴ نمونه)، عدم تأیید توالی‌یابی باعث کاهش قطعیت نتایج می‌شود. بنابراین، تمامی یافته‌های این مطالعه باید با احتیاط تفسیر شوند و به‌عنوان داده‌های مقدماتی در نظر گرفته شوند که نیازمند تأیید با توالی‌یابی در مطالعات آینده هستند. نویسندگان اکیداً توصیه می‌کنند که مطالعات بعدی حتماً شامل تأیید توالی‌یابی محصولات PCR باشند تا اعتبار نتایج افزایش یابد. همچنین پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده با حجم نمونه بزرگ‌تر، هدف قرار دادن عناصر تکراری IS۱۱۱۱ و بررسی همزمان نقش کنه‌های ناقل در منطقه انجام شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، DNA مربوط به *Coxiella burnetii* در ۴٪ از نمونه‌های شیر خام گاو و بز منطقه سیستان با استفاده از روش Nested PCR شناسایی شد. این یافته نشان‌دهنده حضور احتمالی عامل بیماری در بخشی از دام‌های شیری منطقه است. با این حال، به دلیل عدم تأیید توالی‌یابی محصولات PCR، این نتایج باید به عنوان داده‌های مقدماتی تلقی شوند و برای تأیید قطعی وجود باکتری و تعیین دقیق وضعیت اپیدمیولوژیک منطقه، انجام مطالعات تکمیلی با تأیید توالی‌یابی ضروری است. با توجه به حجم نمونه محدود و تعداد کم موارد مثبت، نتایج مربوط به سن و گونه نیز باید با احتیاط تفسیر شوند. با وجود این محدودیت‌ها، شناسایی DNA باکتری در شیر خام از نظر بهداشت عمومی اهمیت دارد و لزوم

پایش مستمر، پاستوریزاسیون شیر و آموزش دامداران را خاطرنشان می‌سازد. انجام مطالعات وسیع‌تر همراه با qPCR، سرولوژی، بررسی فصلی و به‌ویژه تأیید توالی‌یابی برای تعیین دقیق‌تر وضعیت اپیدمیولوژیک منطقه توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکتری عمومی دامپزشکی در دانشگاه زابل است. نگارندگان از مسئولین محترم آموزش دانشکده دامپزشکی و کارشناسان خبره آزمایشگاه مرکزی دانشگاه زابل که همکاری لازم را به عمل آوردند، کمال تشکر و قدردانی را دارند. همچنین از تمامی دامداران منطقه سیستان که در نمونه‌برداری همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Derrick EH. "Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. Med J Aust. 1937;2:281-99.
2. Angelakis E, Raoult D. Q fever. Vet Microbiol. 2010;140(3-4):297-309.
3. Mutisya WM, Akoko JM, Mwatondo A, Muturi M, Nthiwa D, Abkallo HM, et al. Sero-epidemiology of *Coxiella burnetii* in livestock and humans in Isiolo county Kenya. PLoS Negl Trop Dis. 2025;19(10):e0013557.
4. Toledo-Perona R, Contreras A, Gomis J, Quereda JJ, García-Galán A, Sánchez A, et al. Controlling *Coxiella burnetii* in naturally infected sheep, goats and cows, and public health implications: a scoping review. Front Vet Sci. 2024;11:1321553.
5. Van Asseldonk M, Prins J, Bergevoet R. Economic assessment of Q fever in the Netherlands. Prev Vet Med. 2013;112(1-2):27-34.
6. Fournier PE, Raoult D. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. J Clin Microbiol. 2003;41(11):5094-8.
7. Meletis E, Keshavamurthy R, Singh Dhaliwal BB, Aulakh RS, Dhand N, Kostoulas P. Evaluation of the sensitivity and specificity of three diagnostic tests for *Coxiella burnetii* infection in cattle and buffaloes in Punjab (India) using Bayesian latent class analysis. PLoS One. 2022;17(5):e0254303.
8. Zabihi R, Majidzadeh-A K, Morovvati A, Soileimni M. A Real-time Quantitative Loop Mediated Isothermal Amplification Assay Targeting

- com1 Gene of *Coxiella burnetii*. Journal of Advanced Biomedical Sciences. 2024;14(1):12-20.
9. **Denison AM, Thompson HA, Massung RF.** IS1111 Insertion Sequences of *Coxiella burnetii*: Characterization and Use for Diagnostic PCR. J Clin Microbiol. 2007;45(12):3901-3909.
 10. **Simeonov K, Genova-Kalou P, Todorova K.** Evaluation of the Efficiency of Detection of Bacterial DNA in Milk and Tissue Samples Through PCR Targeting the Com1, sod, and Transposase IS1111 Genes of *Coxiella burnetii*. Acta Microbiol Bulg. 2025;41(1):45-53.
 11. **Ownagh A, Mokarizadeh K, Khademi P.** Epidemiology of Q Fever in Milk by Using Nested-PCR Targeting the Repetitive Elements IS1111 and COM1 Genes in *Coxiella burnetii* in Iran. J Hell Vet Med Soc. 2025;75(4):8155-8162.
 12. **Esmacili S, Mohabati Mobarez A, Khalili M, Mostafavi E, Moradnejad P.** Molecular prevalence of *Coxiella burnetii* in milk in Iran: a systematic review and meta-analysis. Trop Anim Health Prod. 2019;51(6):1345-55.
 13. **Nokhodian Z, Feizi A, Ataei B, Hoseini SG, Mostafavi E.** Epidemiology of Q fever in Iran: A systematic review and meta-analysis for estimating serological and molecular prevalence. J Res Med Sci. 2017;22(1):121.
 14. **Esmacili S, Mohabati Mobarez A, Khalili M, Mostafavi E, Moradnejad P.** Molecular prevalence of *Coxiella burnetii* in milk in Iran: a systematic review and meta-analysis. Tropical animal health and production. 2019 Jul 1;51(6):1345-55.
 15. **Zhang G, Hotta A, Mizutani M, Ho T, Yamaguchi T, Fukushi H, et al.** Direct identification of *Coxiella burnetii* plasmids in human sera by nested PCR. J Clin Microbiol. 1998;36(8):2210-3.
 16. **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(3):414-8.
 17. **Enferadi A, Ownagh A, Mardani K.** Molecular detection of *Coxiella burnetii* by nested PCR method in cattle and buffalo raw milk, Urmia region, Iran. Jentashapir J Cell Mol Biol. 2023;14(4):1-7.
 18. **Shujat S, Shehzad W, Anjum AA, Hertl JA, Gröhn YT, Zahoor MY.** Molecular identification of *Coxiella burnetii* in raw milk samples collected from farm animals in districts Kasur and Lahore of Punjab, Pakistan. PLoS One. 2024;19(6):e0301611.
 19. **Muhye NA, Kadhim KS, Salih MA.** Molecular detection of *Coxiella burnetii* in raw milk of cattle in Karbala province. J Kerbala Agric Sci. 2024;11(3):164-9.
 20. **Adly M, Elshereif LM, Sayed M.** Risk of *Coxiella burnetii* infection in Dairy Farms. J Appl Vet Sci. 2024;9(2):45-52.
 21. **Jones RM, Twomey DF, Hannon S, Errington J, Pritchard GC, Sawyer J.** Detection of *Coxiella burnetii* in placenta and abortion samples from British ruminants using real-time PCR. Veterinary Record. 2010;167(25):965-7.
 22. **Muema J, Thumbi S, Obonyo M, Wanyoike S, Nanyingi M, Osoro E, et al.** Seroprevalence and factors associated with *Coxiella burnetii* infection in small ruminants in Baringo County, Kenya. Zoonoses Public Health. 2017;64(7):e31-43.
 23. **Klaasen M, Roest HJ, van der Hoek W, Goossens B, Secka A, Stegeman A.** *Coxiella burnetii* seroprevalence in small ruminants in The Gambia. PLoS One. 2014;9(1):e85424.
 24. **Milkesa A, Rufael T, Kinfe G, Belaineh R, Bulbula A, Cho D, et al.** A sero-epidemiological analysis of *Coxiella burnetii* infection and its risk factors in livestock from Addis Ababa, Adama, and Modjo abattoirs and pastoral areas of Oromia, Ethiopia. PLoS Negl Trop Dis. 2024;18(7):e0012287.



Estimation of Molecular Prevalence of *Coxiella burnetii* in Raw Milk of Cattle and Goats in Sistan Region Using Nested PCR

Setia Alimolaei ¹, Mehdi Rasekh ^{*2}, Ali Sarani ³, Hasan Ahmadi ⁴

1- DVM Student, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol - Iran.

2- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol – Iran.

3- Assistant professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol – Iran.

4- MSc, Biotechnology Research Institute, University of Zabol, Zabol - Iran.

* **Corresponding author:** specialized in Large animal internal medicine - Address :Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Zabol, Km 2 Bonjar Road [Tel:00985431232288](tel:00985431232288).

Email: mrasekh@ut.ac.ir

Receive: April 18, 2026; Revise: May 19, 2026; Accept: June 15, 2026

 10.22034/NFVM.2026.587670.1318

Abstract

Q fever is an important zoonotic disease caused by *Coxiella burnetii*. Domestic ruminants are the main reservoirs, and bacterial shedding through milk poses a risk of transmission to humans. This study aimed to determine the molecular prevalence of *Coxiella burnetii* in milk of cattle and goats in the Sistan region and to investigate the risk factors of age and species. In this cross-sectional study, 100 milk samples (70 cattle, 30 goats) were collected by cluster sampling from herds in Zabol, Hamoon, Zahak, Hirmand, and Nimroz cities during spring 2025. After DNA extraction, the *com1* gene was amplified by Nested PCR. The 438-bp products were electrophoresed on agarose gel. Statistical analysis was performed using SPSS version 27 with chi-square and Fisher's exact tests (significance level: 0.05). Out of 100 samples, 4 samples (4%; 95% CI: 1.1% to 9.9%) were positive. Prevalence was 4.3% (3 samples) in cattle and 3.3% (1 sample) in goats. There was a significant association between age and infection ($P=0.031$), with all positive cases observed in animals older than 4 years. No significant association was found between species and infection ($P=0.843$). Although the 4% prevalence is lower than some studies in Iran, detection of bacterial DNA in raw milk indicates the possible presence of the agent in the region and highlights the need for continuous monitoring and observance of hygienic principles in milk consumption. However, for definitive proof of bacterial presence and transmission risk, sequencing confirmation and further complementary studies are required. The observation of positive cases only in animals older than 4 years may suggest a higher probability of exposure or shedding in older animals.

Keywords: *Coxiella burnetii*, Nested PCR, Q fever, Raw milk, Sistan