چکیده

کوکسیلا بورنتی[1] انگل اجباری درون یاخته می‌باشد. بنابر این در محیط کشت غیر زنده رشد نمی‌کند. کشت آن در رویان جوجه و در زرده تخم مرغ و در حرارت ۳۵ درجه بهتر است. و حداکثر رشد و نمو هنگامی است که مرگ رویان نزدیک می‌شود. این باکتری ارگانیسم مقاومی است، به طوری که به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتی گراد در پشم گوسفندان و به مدت بیش از یک ماه در گوشت تازه و به مدت ۴۰ ماه در سر شیر، زنده می ماند.

احتمالا شایع ترین چهره بالینی تب Q را تشکیل می دهد. به طوری که در سرم ۱۲ـ۱۱ درصد ساکنین مناطق بومی بیماری، آنتی بادی ضد *کوکسیلا بورنتی* یافت شده است. در حالی که اغلب آنها سابقه واضحی از ابتلاء به این بیماری را ذکر نمی کنند. به نظر می رسد عواملی نظیر سن ابتلاء و تعداد میکروارگانیسمی که وارد بدن می شود در میزان بروز این چهره بیماری دخیل باشد. ضمنا ممکن است عفونت مزبور، کاملا بدون علامت باشد.

در این بررسی که به مدت یک سال در کشتارگاه های شهرکرد انجام شد، ۱۰۰ نمونه سرمی از کارکنان کشتارگاه های سطح شهرکرد جداسازی و اطلاعات هر یک طی پرسش نامه ای مجزا تهیه و تنظیم گردید.

کلیه مراحل جداسازی و تشخیص آنتی بادی IgM با استفاده از کیت Virion/Serion مورد تایید قرار گرفت. مراحل انجام آزمایش مطابق با دستورالعمل کیت مربوطه انجام شد. جهت تایید نهایی از حضور باکتری در نمونه های واجد آنتی بادی ضد *کوکسیلا بورنتی*, از آزمون Nested-PCR استفاده شد.

کلید واژه: تب کیو، *کوکسیلا بورنتی*، نمونه های جداسازی شده از سرم کارکنان

1- *Coxiella burnetii*

فصل اول

"مقدمه و طرح تحقیق"

۱-۱- مقدمه

کوکسیلا بورنتی انگل اجباری درون یاخته می‌باشد. بنابر این در محیط کشت غیر زنده رشد نمی‌کند. کشت آن در رویان جوجه و در زرده تخم مرغ و در حرارت ۳۵ درجه بهتر است. و حداکثر رشد و نمو هنگامی است که مرگ رویان نزدیک می‌شود. این باکتری ارگانیسم مقاومی است, به طوری که به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتی گراد در پشم گوسفندان و به مدت بیش از یک ماه در گوشت تازه و به مدت ۴۰ ماه در سر شیر، زنده می ماند (۱).

احتمالا شایع ترین چهره بالینی تب Q را تشکیل می دهد. به طوری که در سرم ۱۲ـ۱۱ درصد ساکنین مناطق بومی بیماری، آنتی بادی ضد کوکسیلا بورنتی یافت شده است. در حالی که اغلب آنها سابقه واضحی از ابتلاء به این بیماری را ذکر نمی کنند. ضمنا ممکن است عفونت مزبور، کاملا بدون علامت باشد (۲).

در این بیماری تعداد گلبول های سفید[1] خون محیطی معمولا طبیعی است ولی در یک سوم موارد ممکن است افزایش یابد. افزایش خفیف ترانس آمیناز ها تا ۳ـ۲ برابر طبیعی تقریبا در تمامی بیماران، حاصل می شود. ولی بیلی روبین سرم، معمولا طبیعی است. با این وجود گاهی ممکن است زردی واضح نیز رخ دهد. در این بیماران ترشح نا متناسب هورمون آنتی دیورتیک نیز ندرتا حادث می شود (۳).

زمان تقسیم این باکتری در رویان جوجه تقریباً ۱۲ ساعت می باشد. بعد از ۲ یا ۳ بار پاساژ از جنین مرغ کشت بهتر و محصول نیز بیشتر خواهد بود, که از این روش برای آزمایش‌های تهیه پادگن و آگلوتیناسیون[2] استفاده می شود. کشت بافتی با استفاده از یاخته های مختلف مثل یاخته های اندوتلیال و یا فیبروبلاست رویان جوجه و یا با یاخته‌های موش امکان پذیر است (۴).

1- wbc
2- Aglotination

۱-۲. بیان مساله

مطالعات در زمینه ی آزمایش های ایمنی‌شناسی نشان می دهد که *کوکسیلا بورنتی* تنها جرمی است در بین *ریکتزیا* ها که تغییرات فاز نشان می دهد. به عبارت دیگر از نظر ساختمانی دو فاز موجود است: فاز یک : که در حقیقت نخستین مرحله‌ای است که آن را در روی حیوان بیمار و یا در اثر گذراندن در روی حیوان آزمایشگاهی می یابند و شکل زهر اگین و خطرناک برای انسان نیز محسوب می‌شود و کپسول پلی ساکارید دارد. فاز دو : کمتر زهر اگین بوده و سویه هایی در این فاز هستند که در تخم مرغ کشت داده و از این رو پادگن پوششی را از دست داده‌اند. در آزمایشگاه کار کردن با این سویه‌ها برای کارکنان خطر کمتری دارد (۷-۵).

حساسیت به این بیماری عمومیت دارد. احتمالا مصونیتی که بعد از بهبودی حاصل می شود تا پایان عمر، ادامه خواهد یافت و در این حالت دوام ایمنی سلولی بیشتر از ایمنی هومورال است. به طوری که آنتی بادی های فیکساسیون کمپلمان به مدت ۵ـ۳ سال و آنتی بادی های قابل کشف با تست فلورسنت غیر مستقیم به مدت ۱۵ـ۱۰ سال دوام خواهد یافت. تست الیزا به عنوان یک روش مناسب برای اهداف سرواپیدمیولوژی است. که در این مطالعه با بهره گیری از این روش به مطالعه سرم های مشکوک از نظر حضور آنتی بادی های ضد *کوکسیلا بورنتی* پرداختیم (۸).

گر چه تشخیص با روش های سرولوژی راحت انجام می شود, حضور آنتی بادی های غالب بعد از دو یا سه هفته از شروع بیماری در انسان قابل پیگیری هستند. تست الیزا[1] نسبت به سایر تست های مورد بررسی مثل تثبیت کمپلمان و بررسی آنتی بادی های کمپلمان از دقت و سهولت بیشتری برخوردار است. از این جهت این مطالعه با هدف بررسی حضور آنتی بادی های تولید شده علیه *کوکسیلا بورنتی* با روش الیزا در سرم های مشکوک جداسازی شده از کارکنان کشتارگاه ها انجام شد (۹).

به علت اهمیت *کوکسیلا بورنتی* به عنوان عامل یک بیماری و باکتریایی مشترک بین انسان و دام با توجه به فقدان بررسی دقیق، معتبر، جامع و قابل استناد و در اختیار نداشتن آمار از درصد آلودگی به کوکسیلا

1- ELIZA

بورنتی در کشورمان از یک سو، و مقاومت بسیار زیاد این باکتری در محیط از سوی دیگر، درصدد برآمدیم تا با یافتن کانون های طبیعی آلوده به کوکسیلا و تعیین میزان آلودگی در انسان، میزبانان حیوانی و همچنین کارکنان آلوده به کوکسیلا در منطقه ای از ایران, سهمی در تأمین اطلاعات مستند بر اساس پژوهش های علمی, به منظور تدوین برنامه های خدمات بهداشتی، احراز نماییم (۱۰).

۱-۳- اهداف، فرضیات و سوالات تحقیق

۱-۳-۱ اهداف تحقیق

تعیین شیوع کوکسیلا بورنتی و فراوانی آنتی بادی های ضد کوکسیلا بورنتی در نمونه های سرم کارکنان کشتارگاه های شهرکرد.

تاکنون مطالعه جامعی در خصوص تعیین ارتباط بین حضور آنتی بادی های کوکسیلا بورنتی با شرایط کار, سن کارکنان و شرایط محل کار در شهرکرد انجام نشده است.

مطالعه حاضر طرح جامعی در خصوص بررسی میزان حضور آنتی بادی های ضد کوکسیلا بورنتی در نمونه های جداسازی شده از خون کارکنان کشتارگاه های شهرکرد *می باشد*.

۱-۳-۲ فرضیات تحقیق

درصد زیادی از کارکنان کشتارگاهها دارای آنتی بادی ضد *کوکسیلا بورنتی* هستند.

حضور آنتی بادی *کوکسیلا بورنتی* با شرایط کار،سن کارکنان و شرایط محل کارارتباط معنی داری دارد.

۱-۳-۳ سوالات تحقیق

تست سرمی چند درصد از کارکنان کشتارگاه های استان شهرکرد مورد مطالعه از نظر آلودگی به *کوکسیلا بورنتی* واجد آنتی بادی های سرمی هستند.

۱-۴ روش تحقیق و پژوهش

در این بررسی که به مدت یکسال در کشتارگاه های شهرکرد انجام شد، ۱۰۰ نمونه سرمی از کارکنان کشتارگاه های سطح شهرکرد جداسازی و اطلاعات هر یک طی پرسش نامه ای مجزا تهیه و تنظیم گردید. پرسشنامه شامل اطلاعات سن, جنس, سابقه ارتباط با احشام و همچنین رسیدگی های بهداشتی از جمله واکسیناسیون می باشد. از هر کدام از کارکنان ۵ سی سی نمونه خون وریدی اخذ و پس سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه, سرم بیمار جداسازی شد.

نمونه های جداسازی شده در فریزر ۲۰- درجه تا انجام مراحل بعدی نگهداری شد. جهت بررسی حضور آنتی بادی های ضد *کوکسیلا بورنتی*, نمونه های سرمی با استفاده از آزمایش الیزا مورد بررسی قرار گرفت (۹).

کلیه مراحل جداسازی و تشخیص آنتی بادی IgM با استفاده از کیت Virion/Serion مورد تایید قرار گرفت. مراحل انجام آزمایش مطابق با دستورالعمل کیت مربوه انجام شد (۱۰).

با توجه به این که آنتی بادی های IgM غیر اختصاصی (فاکتور روماتوئید)[1] در روال آزمایش مثبت کاذب ایجاد می کنند, باید قبل از تشخیص IgM، این فاکتور حذف شود. محلول جاذب روماتوئید به صورت ۱+۴ رقیق شدند. در مرحله بعد هر کدام از این نمونه ها به صورت ۱+۱۰۰ رقیق شدند. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک های میکروپلیت افزوده شد و پلیت ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. بعد از شستشو با محلول شستشوی داخل کیت, به مدت ۳۰ دقیقه محلول کنژوگه کیت اضافه شد. در مرحله بعد محلول سوبسترا اضافه گردید و در مرحله آخر محلول متوقف کننده اضافه گردید. جهت قرائت چاهک های میکروپلیت از دستگاه قرائت کننده الیزا در طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد (۱۱).

1- RF

در نهایت اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از آمار توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت تایید نهایی از حضور باکتری در نمونه های واجد آنتی بادی ضد *کوکسیلا بورنتی*, از آزمون Nested-PCR[1] استفاده شد. جهت استخراج DNA از کیت استخراج سیناژن[2] ساخت ایران استفاده شد و تمام مراحل کار مطابق با کیت مربوطه انجام گرفت. پرایمر های مورد استفاده جهت تشخیص نهایی *کوکسیلا بورنتی* در جدول زیر ارائه شده است (۱۲).

جدول (۱-۱): توالی پرایمرهای مورد استفاده

پرایمر ها	توالی پرایمرها	اندازه قطعه(bp)
مرحله اول **OMP1** **OMP2**	AGTAGAAGCATCCCAAGCATTG TGCCTGCTAGCTGTAACGATTG	۵۰۱
مرحله دوم **OMP3** **OMP4**	GAAGCGCAACAAGAAGAACAC TTGGAAGTTATCACGCAGTTG	۴۳۸

نتایج بررسی الکتروفورز محصولات مرحله ی دوم PCR در ژل آگاروز ارائه گردید. نتایج نهایی در نهایت با نرم افزار های آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

1- Polymerase Chain Reaction
2- Cinnagen

فصل دوم

"مروری بر ادبیات تحقیق"

۲-۱. تاریخچه تب کیو[1] در جهان

تب کیو یک بیماری مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی است که در نواحی جغرافیایی با آب و هوای متفاوت گزارش شده است. عامل بیماری یک میکروارگانیسم ریکتزیا مانند و دارای زندگی داخل سلولی اجباری به نام *کوکسیلا بورنتی* (*Coxiella burnetii*) می باشد که طیف وسیعی از حیوانات از قبیل گاو، گوسفند، بز، سگ، گربه، کوکسیلا بورنتی پریمات های غیر انسانی، خزندگان، دوزیستان، پرندگان (اهلی و وحشی)، ماهی و تعداد زیادی از کنه ها را می تواند آلوده کند (۱۳).

تب کیو (*Q Fever*) (که برخی به اشتباه آنرا آنفلوآنزای بزی می‌نامند) نام نوعی بیماری باکتریایی می‌باشد که در اواخر سال ۲۰۰۹ میلادی در برخی از کشورهای جهان نمونه‌هایی از این بیماری گزارش شده‌است. *کوکسیلا بورنتی* عامل این بیماری است (۱۲).

این بیماری از کشور هلند آغاز شده و در آنجا احتمال ابتلای ۲۳۰۰ نفر تا تاریخ ۱۶ دسامبر ۲۰۰۹ به این بیماری می‌رود. این بیماری باکتریایی است درحالی که آنفلوآنزا ویروسی است؛ فقط از آن جهت که برخی علائم و نشانه‌های بروز این بیماری شبیه آنفلوآنزا بوده و گفته شده که از بز به انسان سرایت نموده، متأسفانه برخی افراد نا آگاه به اشتباه آنرا آنفلوآنزای بزی خوانده و این اشتباه بزرگ را بوسیله رسانه‌های گوناگون در بین مردم ایران پراکنده ساخته‌اند. این بیماری که در سال ۲۰۰۹ در رسانه‌های ایران مورد توجه قرار گرفت بیماری جدیدی نبوده و متخصصان این اخبار را غلط می‌دانند که می‌تواند منجر به تشویش اذهان عمومی شود. پزشکان می گویند: حالت حاد "تب کیو"، موجب کشش مزمن عضلات می شود که می تواند تا دو سال نیز ادامه یابد، اما نشانه اولیه این بیماری "کوفتگی" است (۱۴).

اکثر حیوانات می توانند ناقل این بیماری باشند، اما ناقل اولیه این بیماری در هلند به انسان، بز بوده است. پایگاه اطلاع رسانی مرکز کنترل بیماری ایالات متحده پیشتر با انتشارگزارشی دراین زمینه اعلام کرد: تب کیو، اکنون در پوشش خبری رسانه های دنیا است، اما تعیین تعداد دقیق مبتلایان کاری بس دشوار است.

1- Q fever

این مرکز افزود: تاکنون، تعداد مبتلایان درایالات متحده مشاهده نشده است. این گزارش حاکی از آن است که احشام، گوسفندان و بزها، منبع اولیه "تب کیو" هستند، اما بیماری در میان دیگر چهارپایان و حیوانات اهلی نیز، مشاهده شده است. این بیماری معمولا دراین حیوانات، عامل بیماری های بالینی نیست، اما سقط جنین در گوسفند و بز می تواند نشانه ای از وجود این بیماری باشد (۱۵).

این پایگاه خبری می افزاید: ارگانیسم های باکتریایی در شیر و فضولات حیوانات آلوده در ابتدا خطرساز هستند، اما بیشترین تعداد ارگانیسم ها در فرآیند زایش حیوانات در آنفلوآنزای آمیبی و جنینی است. این گزارش می افزاید: در مراحل ابتدایی این بیماری، با آنتی بیوتیک و قابل درمان است (۱۵).

بر پایه این گزرش افرادی که در ارتباط نزدیک با حیوانات مبتلا هستند مانند کارگرانی که با احشامی مانند بز کار می کنند، کارگران فعال در فرآیند تولید گوشت، مزرعه داران دارای احشام، دامپزشکان و محققان روش های نوین خانه سازی گوسفندان واحشام درزمره افرادی هستند که بیشتر از دیگران احتمال ابتلا به این بیماری رادارند. تب کیو یا آنفلوآنزای بزی یکی از بیماریهای مشترک بین انسان و حیوان است که گسترش جهانی دارد و با رعایت ضوابط بهداشتی، سلامت انسان را تهدید نمی کند (۱۶).

تب کیو (Q Fever) یکی از بیماریهای مشترک بین انسان و حیوان محسوب می شود که گسترش جهانی دارد. عامل آن باکتری *کوکسیلا بورنتی* (*Coxiella burnetii*)، *ریکتزیا دیاپوریکا*[1]، *ریکتزیا بورنتی*[2] است و منشا اصلی آن گاو، گوسفند و بز است. این باکتری ارگانیسم مقاومی است؛ به‌طوری که به‌مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتی گراد در پشم گوسفندان و به‌مدت بیش از یک ماه در گوشت تازه و به‌مدت ۴۰ ماه در سر شیر، زنده می‌ماند.در حالی که عامل بیماری آنفلوانزای نوع A کاملا ویروسی است (۱۷). آلودگی در سایر حیوانات اهلی و حیوانات خانگی نیز دیده می شود. در حیوانات معمولا آلودگی باعث بیماری بالینی نمی شود اما در گوسفند و بز ممکن است سقط جنین اتفاق افتد. اهمیت این بیماری بیشتر به علت مشترک بودن آن است. این باکتری با شیر، ادرار و مدفوع حیوانات آلوده دفع می شود، به خصوص در زمان زایش، جفت و مایع جنینی دام های آلوده به شدت به عامل بیماری مذکور آلوده است. این باکتری

1- *Rickettsia Dyapvryka*
2- *Rickettsia Burnetii*

در مقابل گرما، خشکی و بیشتر مواد ضد عفونی مقاوم است. اغلب انسانها در مقابل بیماری بسیار حساس هستند و با ورود تعداد اندکی باکتری به بدنشان از راه تنفسی و استنشاق ذرات آلوده بیمار می شوند. در خلال سال های ۱۹۵۴ و ۱۹۴۵ ، اپیدمی دیگری از تب کیو در بین سربازان آمریکایی و بریتانیایی مستقر در ایتالیا، کورسیکا و یونان رخ داد. به علاوه، موارد طغیان بیماری در بین سربازانی که در جنوب ایتالیا بوده و بعد به ایالات متحده سفر کردند و متعاقبا در بین کادر آزمایشگاه های مورد بررسی در فورت براگ[1] و کمپ پاتریک[2] هنری اتفاق افتاد. از این رو یک کمیسیون ویژه پزشکان آمریکایی کمیسیون بیماریهای تنفسی حاد تشکیل گردید (۱۸).

این کمیسیون ماهیت بیماری را شناسایی نموده، سویه های کوکسیلا بورنتی را جدا کرده و بررسی های اپیدمیولوژی و سرولوژیک جالب توجهی را تعقیب نمود. این بررسیها، تصویر روشنی از ویژگی های بالینی بیماری و سیر همه گیری شناختی آن را فراهم ساخت. در جنوب اروپا، بیماری در بین هر دو گروه سربازان آلمانی و متفقین، منتشر شد و احتمالا برخی از شهروندان نیز مورد حمله قرار گرفتند. در حقیقت، روبینز و همکارانش وجود آنتی بادی کوکسیلابورنتی را در خون شهروندان ایتالیائی که بیماری به شکل اپیدمی در بین سربازان آمریکائی شایع گردیده بود مورد تایید قرار دادند (۱۹).

در سال ۱۹۴۵ ، موردی از تب کیو را در یک شهروند ایتالیایی که در تماس با آمریکایی ها بوده، گزارش نمودند و بار دیگر مواردی از بیماری در بین جمعیت شهری یونان گزارش شد. در بهار ۱۹۵۸ ، انفجار تازهای از بیماری بروز نمود. بسیاری از کانون های اپیدمی و بویژه در مرکز ایتالیا و خصوصا در همان نواحی اپیدمی در سال ۱۹۵۱ ۱۹۴۹ دو باره ظاهرگردید. جالب ترین مورد طغیان بیماری در سال های اخیر، ظهور تب کیو در قبرس است. تا اوایل ۱۹۵۵ گزارشاتی از سرولوژی مثبت وجود داشت. در آن زمان، ۶۸ درصد از گاوها، ۴۰ درصد از گوسفندان و ۳۵ درصد از بزها، مثبت برآورد شده بود. در سال ۱۹۷۶ در خلال جابجایی تعداد زیادی از افراد و ورود سربازان انگلیسی و سوئدی برای حفظ صلح، بیماری به شکل اپیدمی در بین سربازان ظاهر گردید (۱۸).

1- Fort Bragg
2- Camp Patrick

۲-۲. مشخصات کلی

۲-۲-۱. ساختمان

اجرامی میله‌ای معمولاً کوچکتر از *ریکتزیا*، ابعاد آن به طول ۰/۲ - ۰/۴ در ۰/۴ - ۰/۱ میکرومتر می‌باشد گاهی به شکل دیپلو باسیل به طول ۰/۱ - ۶/۱ و یا گرد به قطر ۳/ - ۴/ میکرومتر در می‌آیند . فاقد تاژک و کپسول و در درون سیتوپلاسم غالباً در وضع انبوهی بزرگ به قطر ۲۰- ۳۰ میکرومتر که به همدیگر قویاً چسبیده‌اند، نمایان هستند. گرم منفی، مثبت یا منفی و در درون یاخته زندگی کرده و مراحل مختلف سیر تکاملی خود را در همین حفره های مخصوص می پیماید. جدار یاخته‌ای از ۲ یا ۳ لایه تشکیل که لایه خارجی تیره رنگ به ضخامت nm۲۰، لایه روشن تری به ضخامت nm ۲۵ و باز لایه سوم تیره رنگ به ضخامت nm ۴۵ و نهایتا در مواردی لایه اضافی دیگری که ضخامت nm ۲۰۰ دارد تعیین کرده‌اند. وجود DNAشناخته شده و ممکن است به طور فیزیکی با ریبوزوم های محتوی RNA در سیتوپلاسم ارتباط داشته باشد. بیشتر گرام منفی است ولی آزمایشهای بیوشیمیایی می‌رساند که *کوکسیلا بورنتی* واجد بعضی خواص باکتری‌های گرم مثبت نیز می‌باشد. با گیمسا یا سایر روشهای رومانسکی به رنگ آبی، قرمز، یا ارغوانی و با تکنیک ماکیوولو به رنگ قرمز روشن در می‌آید. بهترین طریقه رنگ آمیزی با اورامین[1] و آزمایش گسترش زیر میکروسکوپ فلورسان[2] می‌باشد (۱۹).

۲-۲-۲. خواص کشت

کوکسیلا بورنتی انگل اجباری درون یاخته می‌باشد بنابراین در محیط کشت غیرزنده رشد نمی‌کند. کشت آن در رویان جوجه و در زرده تخم مرغ و در حرارت ۳۵ درجه بهتر و حداکثر رشد و نمو هنگامی است که مرگ رویان نزدیک می‌شود .برخلاف گونه‌های *ریکتزیا* تغییرات کوچک در درجه حرارت یا تاریخ برداشت نامساعد اثر نامطلوب از نظر مقدار محصول خواهد داشت، زمان تقسیم در رویان جوجه تقریباً ۱۲ ساعت

1- Auramine
2- Fluorescence Microscopy

می باشد. بعد از ۲ یا ۳ با پاساژ از جنین مرغ کشت بهتر و محصول نیز بیشتر خواهد بود که از این روش برای آزمایش‌های تهیه پادگن[1] و آگلوتیناسیون استفاده می‌شود. کشت بافتی با استفاده از یاخته‌های مختلف مثل سلول های اندوتلیال و یا فیبروبلاست رویان جوجه و یا با یاخته‌های موش امکان پذیر است ولی مقدار برداشت کمتر از محصول زرده رویان جوجه خواهد بود (۱۹).

۲-۲-۳. تاثیر عوامل فیزیکی وشیمیایی

کوگسیلا بورنتی از خیلی اجرام غیر هاگ دار در مقابل عوامل فیزیکی و شیمیایی مقاوم می باشد. مثلاً خشکی و پوسیدگی و حرارت اطاق به مدت طولانی اثر چندانی روی آن ندارد. این باکتری روزها و هفته‌ها روی شیر، خامه، کره و پنیر زنده و عفونت زا باقی می‌ماند. گرم کردن شیر خام در حرارت ۶۲ درجه به مدت ۳۰ دقیقه به منظور نابود سازی جرم کافی نیست. قدرت عفونی زایی جرم در مدفوع کنه تا ۵۶۸ روز محفوظ می ماند. ولی پاستوریزاسیون شیر به طریقه فلش[2] در ۷۳ درجه به مدت ۱۵ ثانیه کاملاً مؤثر است (۲۰).

۲-۲-۴. تغییرات فاز

در نتیجه آزمایشهای ایمنی‌شناسی دریافتند که *کوکسیلا بورنتی* تنها جرمی است در بین *ریکتزیا* ها[3] که تغییرات فاز نشان می‌دهد. به عبارت دیگر از نظر ساختمانی دو فاز موجود است: فاز یک : که در حقیقت نخستین مرحله‌ای است که آن را در روی حیوان بیمار و یا در اثر گذراندن در روی حیوان آزمایشگاهی می‌یابند و شکل زهراگین و خطرناک برای انسان نیز محسوب می‌شود و کپسول پلی ساکارید دارد. فاز دو : کمتر زهراگین بوده و سویه‌هایی در این فازند که کراراً در تخم مرغ کشت داده و از این رو پادگن پوششی را از دست داده‌اند در آزمایشگاه کار کردن با این سویه‌ها یرای کارکنان خطر کمتری دارد (۲۱).

1- Antigen
2- Flash
3- *Rickettsia*

۲-۲-۵. میزبان و حیوانات حساس

این عامل را در گونه‌های مختلف حیوانات اهلی و وحشی و در گونه‌های متعدد کنه‌ها، تعداد زیادی از جوندگان، خرگوش، موش بزرگ و کوچک، لاک پشت و حیوانات اهلی از قبیل گوسفند، گاو، بز، اسب، سگ، خوک، شتر، گاومیش و حیوانات وحشی و بعضی پرندگان اهلی (کبوتر و خفاش) گسترش یافته‌اند. انسان میزبان تصادفی است و گاهی بیماری خطرناک در انسان ایجاد می‌کند (۲۲).

۲-۲-۶. طبقه بندی

ریکتزیا یا به انگلیسی (Rickettsia): سرده ای از باکتریهای گرم منفی است. یکی از باکتریهای این سرده عامل بیماری تیفوس است. این گروه اصولاً باکتری داخل سلولی هستند.

اعضای جنس *ریکتزیا* و *کوکسیلا*، باکتری‌های داخل سلولی اجباری هستند که با *کلامیدیا*[۱] و *ارلیشیا*[۲] دارای تفاوت‌های زیر می‌باشند:

ریکتزیاها (۱) درون سیتوپلاسم سلول هدفش تکثیر می‌یابد نه درون واکوئل فاگوسیتیک میزبان.

(۲) چرخهٔ زندگی پیچیده ندارند.

(۳) توسط ناقلین بندپا قابل انتقال است. کوکسیلاها بیشتر شبیه کلامیدیا و ارلیشیا هستند زیرا چرخهٔ زندگی پیچیده‌ای دارند که غالباً درون واکوئل‌های میزبان کامل می‌شود. براساس معیارهای کلینیکی، ایمونولوژیکی و ژنتیکی ریکتزیاها را می‌توان به ۴ گروه تقسیم کرد: *ریکتزیای تیفوسی*[۳]، *ریکتزیای تب دانه‌دار*[۴]، *ریکتزیای تیفوس اسکرابی*[۵] و *کوکسیلا*. در جدول زیر اطلاعات مهم‌ترین اعضای این گروه‌ها ارائه شده است (۲۳).

1- *Chlamydia*
2- *Ehrlichia*
3- *Rickettsia typhus*
4- *Rickettsia fever BV*
5- *Scrub typhus Rickettsia*

جدول (۲-۱): طبقه‌بندی و خصوصیات اصلی‌ترین ریکتزیاهای بیماری زا

گروه‌های ریکتزیایی	بیماری	محل توزیع	ناقل	مخزن
تیفوس ریکتزیایی:				
ریکتزیا پرووازکی	تیفوس اپیدمیک	سراسر دنیا	شپش بدن	انسان و سنجاب‌های پرنده
ریکتزیا تیفی	تیفوس اندمیک (تیفوس موشی)	سراسر دنیا	کک	جوندگان
تب دانه‌دار ریکتزیایی:				
ریکتزیا آگاری	آبله ریکتزیایی	سراسر دنیا	مایت	موش
ریکتزیا استرالیس	تیفوس کنه‌ای استرالیایی (تیفوس کنه‌ای کوئلیزلند)	استرالیا	کنه	جوندگان و جانوران کیسه‌دار
ریکتزیا یا کونوری	تب تکمه‌ای	مدیترانه، هند، ایالات متحده آمریکا	کنه	جوندگان و سگ
ریکتزیا ریکتزیه	تب دانه‌دار کوه‌های راکی	ایالات متحده آمریکا	کنه	جوندگان
ریکتزیا سیبریکا	تیفوس کنه‌ای آمریکای شمالی (تیفوس کنه‌ای سیبری)	سیبری، مغولستان و چین	کنه	جوندگان
تیفوس اسکرابی(بوته زار) ریکتزیایی:				
ریکتزیا تسوسوگاموشی	تیفوس اسکرابی	آسیا و استرالیا	مایت	بیشتر حیوانات
کوکسیلا:				
کوکسیلا بورنتی	تب Q	سراسر دنیا	کوکسیلاهای آئروسل شده، گوشت، شیر و کنه	بیشتر حیوانات

گونه‌های *ریکتزیا* از خیلی جهات باکتری‌های گرم منفی هستند، ولی فقط درون سلول‌های یوکاریوتیک[1] تکثیر می‌یابند. این باکتریها، باسیلی با عرض ۰/۳ تا ۰/۶ میکرومتر در ۰/۸ تا ۲ میکرومتر طول می‌باشند و دارای چرخه استاندارد سایر باکتریها بوده و به واسطه تقسیم دوتایی تکثیر می‌یابند. مانند سایر باکتری‌های گرم منفی آنها دارای دیوارهٔ سلولی پپتیدوگلیکانی و غشائ خارجی که دارای لیپوپلی‌ساکارید می‌باشد، هستند (۲۴).

احتمالاً مهم‌ترین خصوصیات ریکتزیاها فعالیت همولیتیک آن‌هاست، که به دلیل فسفولیپاز A[2] است که سریعاً سلول میزبان را تخریب می‌کند. این فعالیت سبب ایجاد اسید آراشیدونیک و لیزوفسفاتیدها را

1- Eukaryotic
2- Phospholipase A

می‌نماید که می‌توانند توسط سلول میزبان به محصولات فعال فارماکولوژیکی نظیر پروستاگلاندین‌ها و لکوترین ها تبدیل شوند. به نظر می‌رسد فسفولیپاز A نقش مهمی در چرخهٔ عفونت ریکتزیاها و در پاتوژنز بیماری‌های ریکتزیایی بازی می‌کند. ریکتزیاها به روش تقسیم دوتایی تکثیر یافته و سیتوپلاسم سلول میزبان را پر می‌کنند. هم *تیفوس اسکرابی* و هم *ریکتزیای تب دانه‌دار* دنباله‌های اکتینی را تشکیل می‌دهند که عامل هل دادن آن‌ها از میان سیتوپلاسم سلول میزبان می‌شوند و مشابه *لیستریا* و *شیگلا* به کمک این رشته‌ها از بین سلول‌ها مستقیماً عبور می‌کنند (۲۵).

بیماری‌های ناشی از ریکتزیا به صورت واسکولیت، تب و راش بروز می‌کند. عفونی کردن اندوتلیوم با ایجاد ندول‌های عروقی که با سلول‌های التهابی نظیر PMN[1] و ماکروفاژ، پر شده همراه است. با انتشار عفونت اندوتلیوم، نفوذپذیری رگ‌های خونی افزایش می‌یابد که نشت مایعات به بافت سبب ایجاد ادم در ناحیه و کاهش حجم خون می‌شود. عفونت عروق کوچک پوست سبب ترکیدن راش‌ها می‌گردد که این راش‌ها را شبیه سرخک یا مننگوکوکسمیا[2] می‌کند (۲۵).

۲-۲-۷. تشخیص آزمایشگاهی

بیمارانی که در نواحی اندمیک تب Q زندگی می‌کنند، اگر علایم را نشان بدهند بدون انجام آزمایش درمان می‌شوند. به دلیل بسیار مسری بودن کوکسیلا بورنتی، فقط تحت شرایط ایمنی خاص قابل کشت است. بیشترین تستی که برای تشخیص استفاده می گردد، تست فیکساسیون کمپلمان است. البته الیزا و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای جستجوی آنتی‌بادی ضد کوکسیلا از فیکساسیون کمپلمان حساس‌ترند. تیتر آنتی بادی ضد فاز I و II اندازه‌گیری می‌شود و نسبت این دو به هم مرحله بیماری را مشخص می‌کند که در فاز حاد (که معمولاً پنومونی است)، نسبت فاز I به فاز II بزرگتر از ۱ است و در فاز مزمن (که معمولاً

1- Poly mononucleosis
2- Meningococcemia

اندوکاردیت[1] است)، این نسبت کوچک‌تر از ۱ است. درمبتلایان به فاز تحت حاد این نسبت بزرگتر یا مساوی ۱ است. از آنجاکه نشانه ها و علائم تب کیو اختصاصی نیستند، بدون تست های مناسب و معتبر آزمایشگاهی تشخیص دقیق بیماری مشکل است. با داشتن نتایج تعدادی آزمایشات روتین و یافته های کلینیکی و اپیدمیولوژیکی مناسب ممکنست بتوان در خصوص تشخیص تب کیو اظهار نظر کرد. برای مثال چون که مبتلایان به تب کیو یک تومبوسیتوپنی زود گذر را نشان می دهد، یک شمارش میکروبی می تواند پزشک را راهنمائی و کمک کند. تایید تشخیص تب کیو نیازمند یک آزمایش سرولوژی با تایید حضور آنتی بادی برعلیه کوکسیلا بورنتی است. در بیشتر آزمایشکاهها آزمایش ایمنوفلورسنس[2] غیر مستقیم بیشترین اطمینان و وسیعترین روش مورد استفاده می باشد. کوکسیلا برونتئی ممکنست در بافت های آلوده با استفاده از رنگ آمیزی ایمنی شیمیائی و روش شناسائی DNA تشخیص داده شود (۲۶).

درآلودگی *کوکسیلا برونتی* دو فاز متفاوت آنتی ژنیک به نامهای فاز ۱و۲ وجود دارد. این تفاوت آنتی ژنی در تشخیص مهم است. در موارد حاد تب کیو، میزان آنتی بادی در فاز ۲ معمولا بالاتر از فاز ۱ است، اغلب بوسیله چند صعود متفاوت و معمولا در طول هفته دوم بیماری قابل تشخیص است. در بیماری مزمن تب کیو وضعیت دقیقا عکس می شود. آنتی بادی در فاز ۱ آنتی ژنیک معمولا نیاز به زمان طولانی تری برای تشخیص نیاز دارد. آنتی بادی در فاز ۱و۲ طی ماهها و یا سالها پس از ابتلای اولیه تداوم می یابد. مطالعات اخیر نشان داده است که با جستجوی کلاس های مختلف آنتی بادی بغیر از IgG مانند IgA و IgM می توان به تشخیص دقیق تر تب کیو دست یافت. IgM مبین آلودگی جدید و طی روزهای اخیر می باشد. در فرم حاد تب کیو بیماران دارای IgM در فاز ۱ و IgG در فاز ۲ می باشند. میزان فزاینده IgG و IgA در فاز ۱ دلالت بر ضایعات اندوکاردیت ناشی از تب کیو می باشد (۲۶).

۲-۳. بیماری زایی

1- Endocarditis
2- Immunofluorescence

این باکتری ارگانیسم مقاومی است؛ به‌طوری که به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتی گراد در پشم گوسفندان و به‌مدت بیش از یک ماه در گوشت تازه و به مدت ۴۰ ماه در سر شیر، زنده می ماند (۲۷).

۲-۳-۱. میزبان و حیوانات حساس

عامل بیماری را در طیف وسیعی از جانداران از قبیل گونه های متعدد کنه‌ها، جوندگان، لاک پشت، خرگوش، برخی پرندگان اهلی و وحشی نظیر کبوتر و خفاش، گونه های مختلف حیوانات وحشی و اهلی از قبیل گاو، گوسفند، بز، اسب، خوک، شتر، گاومیش و همچنین سگ و گربه یافته‌اند. گونه‌های مختلف کنه‌های نرم و سخت عامل اصلی در نگهداری این باکتری و عملاً مخزن انگل محسوب می‌شوند (۲۸).

کوکسیلا بورنتی دو مرحله در چرخه زندگی خود دارد:

Large cell variant (LCV) که فرم رویان باکتری است و در مونوسیت ها و ماکروفاژ های آلوده دیده می‌شود.

Small cell variant (SCV) که فرم عفونت‌زای باکتری است، در خارج سلول یافت می‌شود و می تواند مدت های مدید در محیط به‌حالت بیماریزا باقی بماند و در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی مقاومت نماید (۲۹).

۲-۳-۲. بیماری در حیوانات

تب کیو یک بیماری قابل انتقال بین انسان و دام است که انتقال بیماری به انسان بویژه از گاو، گوسفند و بز اهمیت دارد. بیماری غالباً در حیوانات یک عفونت بدون علائم بالینی مشخص ایجاد می‌نماید، اگر چه گاهی منجر به سقط جنین‌های طوفانی در گله ها و گاهی بیماری توأم با پنومونی و تورم نای می شود (۳۰).

باکتری در بدن حیوانات تمایل زیادی به تمرکز در پستان و جفت دارد و بویژه در مایعات جنینی و جفت تمرکز می یابد، بطوری که غلظت باکتری ممکن است تا یک میلیارد برابر دوز ID_{50} نیز برسد. همچنین تمرکز باکتری در غدد پستانی منجر به دفع تعداد زیادی باکتری از راه شیر می‌شود. دفع تعداد زیاد باکتری از راه جفت، مایعات جنینی و سایر مواد دفعی و همچنین دوام و پایداری باکتری در محیط موجبات انتقال آلودگی به سایر حیوانات اهلی و انسان را فراهم می آورد. لذا علاوه بر این آلودگی انسان و حیوانات اهلی از راه استنشاقی و از طریق ذرات معلق دارای باکتری نیز امکان پذیر است، بطوریکه در برخی محیط‌ها انتقال تنفسی بیماری مهمترین راه انتقال بیماری محسوب می‌گردد (۳۱).

۲-۳-۳. انتقال به انسان

تب کیو یک بیماری شغلی است، بطوریکه عمده موارد بیماری در دامداران، کارگران کشتارگاهها، دامپزشکان و به‌طورکلی افرادی که با دام و فرآورده های دامی سروکار دارند رخ می‌دهد. در افرادی که مشکلات قلبی یا نارسایی‌های سیستم ایمنی دارند، بیماری شدیدتر بروز خواهد کرد. حیوانات اهلی به ویژه گاو، گوسفند و بز، حیوانات خانگی بالاخص گربه، حیوانات وحشی و حیوانات آزمایشگاهی از جمله منابع انتقال عفونت به انسان محسوب می‌شوند. کنه ها می‌توانند عامل بیماری را به حیوانات انتقال دهند ولی به ندرت در انتقال آلودگی به انسان نقش ایفا می‌کنند. جفت، مایعات جنینی، ترشحات زایمانی و شیر از منابع مهم عامل بیماری هستند بطوریکه یک گرم از جفت یک گوسفند آلوده می تواند حاوی بیش از $۱۰^{۱۰}$ *کوکسیلا* باشد و این امر آلودگی گسترده محیط دامداری را به‌دنبال خواهد داشت. علاوه بر اینکه عادت حیوانات به خوردن جفت و پرده های جنینی پس از زایمان با ماندگاری میکروب در دستگاه گوارش و

روده ها و در نهایت دفع از طریق مدفوع به پخش آلودگی در محیط کمک خواهد نمود. انتشار وسیع میکروب در محیط باعث می‌شود که انتقال از راه تنفسی و توسط ذرات ریز گرد و غبار آلوده به باکتری بویژه در اطراف دامداری ها، کشتارگاه ها، کارگاه (۳۲).

۲-۳-۴. علایم بیماری در انسان

لازم به ذکر است علائم تب کیو شبیه علائم آنفلوانزا است . گرچه علائم بیماری در دام با سقط جنین همراه است ولی در انسان علائمی شبیه آنفلوانزا ایجاد خواهد کرد؛ به‌طوری که بیماران همان تب بالای ۴۰ درجه، ضعف، گلودرد، سردرد، گرفتگی عضلات، سرفه‌های خشک و حتی در برخی از افراد اسهال و استفراغ، درد شکم و درد در ناحیه سینه را تجربه خواهند کرد. علاوه بر این همانطور که منشأ این بیماری باکتریایی است، آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل تتراسایکلین یا داکسی سایکلین در بهبودی آن مؤثر است. البته به عقیده کارشناسان در رفرنس‌ها و منابع پزشکی گزارش شده که این بیماری حتی یک تا ۲ درصد مرگ نیز به همراه دارد. همچنین دوره نهفتگی بیماری نیز بستگی به تعداد عامل عفونی که وارد بدن می‌شود دارد و معمولا بین ۲ تا ۳ هفته است. البته تنها نصفی از افرادی که آلوده می شوند، علایم بالینی نشان می دهند. در موارد حاد بیماری، یک یا چند نشانه اعم از تب بالا، سردرد شدید، بی حالی، درد ماهیچه ها، پریشان حالی، گلودرد، لرز، تعریق، سرفه خشک، حالت تهوع، اسهال، استفراغ، درد شکم و درد سینه دیده می شود (۳۳).

۲-۳-۵. مخازن اصلی، گوسفند و بز

«این بیماری، نوعی بیماری شغلی به حساب می‌آید و کسانی‌به‌آن‌مبتلا می‌شوند که تماس مستقیمی با حیوانات داشته‌باشند؛ نظیر کشاورزان، دامپزشکان و کارکنان کشتارگاه‌ها ولی با وجود این گاهی تماس غیر مستقیم با حیوانات آلوده هم باعث بروز بیماری شده مثلا در کسانی که از گرد و غبار ناشی از عبور

گله های آلوده استنشاق کرده‌اند.» مخزن بیماری تب Q، گاو، گوسفند و بز است و در همه حیوانات حتی حیوانات خانگی هم دیده می شود. البته مخازن اصلی همان گوسفند و بز هستند (۳۴).

۲-۳-۶. علایم بیماری در دام ها

اما در صورتی که بیماری در یک منطقه تازگی داشته باشد و دامها از قبل ایمنی نداشته باشند، ممکن است تعدادی از دامها سقط کنند (۳۵).

۲-۳-۷. پیشگیری از بیماری (Q Fever)

به طور کلی برای کنترل و پیشگیری از بیماری آموزش توده مردم در رابطه با منبع بیماری، دفن ترشحات، جفت و پرده های جنینی دامها، محدود کردن تردد به دامداریهای آلوده و آزمایشگاهها و استفاده از شیر پاستوریزه و فرآورده های پاستوریزه آن توصیه می شود (۳۶).

عامل تب Q در ماه‌های فوریه تا می و یا بهمن تا اردیبهشت که فصل زایش گوسفند و بز است، بیشتر دیده می‌شود؛ به‌طوری که اگر دامی با این عامل بیماری روبه‌رو شود، در آن سقط جنین ناگهانی روی می‌دهد. اگر هم سقط اتفاق بیفتد، با توجه به اینکه مایع آمنیوتیک و جفت دفع شده از دام، عامل بیماری زیادی با خود دارد، سبب آلودگی محیط خواهد شد. همچنین با توجه به اینکه مهم ترین راه انتقال عامل این بیماری استنشاق است، اگر این اتفاق بیفتد، بیماری در حد وسیعی پراکنده خواهد شد. اگر این واگیری در حیوانات غیر از زمان آبستنی اتفاق بیفتد، دام ایمنی پیدا می‌کند؛ یعنی دامی که قبلا ایمن شده، حتی اگر در فصل زایش مبتلا به بیماری شود، دیگر سقط جنین را نخواهیم داشت (۳۴).

مهم‌ترین عامل انتشار بیماری را استنشاق است و عامل بیماری شدیدا به خشکی و گرما مقاوم است و این امر باعث می‌شود که همراه با ذرات گرد و غبار در هوا پراکنده شود و از طریق استنشاق فرد را بیمار کند. « در مناطق پرورش دام که شرایط غیر بهداشتی و یا غیرصنعتی دارند نباید تردد کرد. از مراکزی که دام را به‌صورت غیرمجاز نگه می‌دارند خرید دام صورت نگیرد و دامداران درصورت مشاهده سقط جنین در دام، ترشحات و جنین دفع شده را در شرایط بهداشتی و با دستکش دفن کنند » (۳۷).

۲-۳-۸. وضعیت بیماری (Q Fever) در جهان

کارشناسان معتقدند که تب Q در تمام دنیا فراگیری دارد و کانون مشخصی را برای آن نمی‌توان نام برد. آخرین موارد ابتلا به این بیماری در هلند گزارش شد که طی آن ۶ یا ۸ نفر انسان مبتلا جان خود را از دست دادند. البته در سال های اخیر ابتلا به تب کیو در هلند افزایش چشمگیری داشته است. در سال ۲۰۰۶ میلادی تعداد ۱۶۸ نفر، سال ۲۰۰۷ حدود یک هزار نفر و در سال ۲۰۰۹ حدود دو هزار و ۳۰۰ نفر در آن کشور مبتلا به تب کیو شدند که در سال ۲۰۰۹ تعداد مرگ و میر شش نفر بوده است. بیماری و یا آلودگی در بلژیک و تعداد دیگری از کشورهای اروپایی مانند سوئد، دانمارک، لهستان، سوئیس و همچنین عمان و... وجود دارد (۳۸).

تب Q در استرالیا که خیلی از بیماری‌ها وجود ندارد، دیده می‌شود. نخستین مورد بیماری هم در سال ۱۹۳۵ گزارش شد. در ایران هم پایان نامه ها و مطالعات زیادی در سال ۵۷ و ۵۸ در مورد تب Q ارائه شد. البته این مطالعات بیشتر در مناطق جنوبی صورت گرفت ولی این بدان معنا نیست که این بیماری فقط در مناطق جنوبی دیده می‌شود، چون هرجا که محل پرورش دام باشد، مکان مناسبی برای انتشار تب Q نیز هست (۳۹).

۲-۳-۹. اقدامات انجام گرفته در کشور ایران

برای پیشگیری از ابتلا به بیماری تب کیو اقداماتی نظیر کنترل و نظارت بر واردات و صادرات و ترانزیت دام و فرآورده های دامی توسط پستهای قرنطینه سازمان دامپزشکی کشور، قرنطینه کردن دامهای وارداتی به کشور به مدت ۱۵ تا ۲۱ روز، تجهیز و تکمیل آزمایشگاه های تشخیصی برای پیشگیری از بیماری، عقد توافق نامه بهداشتی با کشورهای همسایه و انجام بازدیدهای قبل از کشتار، حین کشتار و بعد از کشتار در کشتارگاههای داخل و خارج از کشور انجام گرفته است (۴۰).

با توجه به اقدامات انجام شده، در صورت رعایت دستورالعمل بهداشتی سازمان دامپزشکی کشور ایران جای نگرانی نخواهد بود ولی انتظار می رود هموطنان از کشتار غیر مجاز دام بدون رعایت شرایط بهداشتی پرهیز کرده و در صورت مشاهده هرگونه اقدام غیر بهداشتی مراتب را به ادارات دامپزشکی محل گزارش کنند (۴۱).

۲-۴. روش‌های تشخیص بیماری‌های حاصل از *ریکتزیا*

بیماری‌های حاصل از ریکتزیاهای تیفوسی و تیفوس اسکرابی و تب دانه دار،از دسته بیماری های اگزنتماتوس حاد منتقله توسط بندپایان هستند. از بیماران باید احتمال مواجهه با ناقلین ذکر شده در جدول ۱ و ظهور راش بر روی بدنشان پرسش شود. راش‌های مربوط به *ریکتزیای تیفوسی* از تنه شروع شده و به انتها ها ادامه می یابد، اما راش‌های مربوط به ریکتزیای تب دانه دار از انتها ها شروع شده و به تنه می رسد. سابقهٔ گزش یک کنه ممکن است عفونت تب دانه‌دار یک بیمار را تأیید کند. حتی اگر کنه زنده باشد می‌توان آن را به یک آزمایشگاه رفرانس فرستاد و آزمایش کرد که آیا به ریکتزیای پاتوژن آلوده است یا نه. تراشه‌های پوست، خون و سرم را نیز برای آزمایش، به آزمایشگاه اختصاصی و مناسب می‌فرستند. تراشه‌های پوست را برای واکنش با آنتی بادی ضد *ریکتزیا* کونژوگه با فلوئورسین آزمایش می‌کنند. چون ریکتزیا باکتری داخل سلولی اجباری است، بر روی محیط های میکروبی قابل کشت نیستند. در عوض، باید بر روی محیط‌های کشت سلولی (نظیر فیبروبلاست جنین جوجه، سلول‌های L929 و یا سلول‌های اندوتلیال) یا درون کیسه زرده تخم مرغ جنین‌دار کشت داده شود. اگر چه این باکتری‌ها گرم منفی هستند، اما *ریکتزیا* ها معمولاً با رنگ گرم رنگ نمی‌گیرند، زیرا این رنگ دیوارهٔ باکتری‌های درون سلولی را رنگ نمی‌کند. در عوض سلول‌های آلوده با *ریکتزیا* را با رنگ گیمسا[1] یا گیمنز[2] رنگ می‌نمایند. در رنگ آمیزی گیمنز سلول میزبان سبز آبی شده و *ریکتزیا* قرمز روشن می شود (۴۰).

1- Giemsa
2- Gimenez

در نمونه سرم دو نوع آنتی‌بادی جستجو می‌شـــــود. تست آگلوتیناسیون که ویل فلیکس (Weil-Felix test) نام دارد و آنتی‌بادی‌های ضد ریکتزیایی را تشخیص می‌دهد، سویه‌های پروتئوسی را که دارای آنتی ژن o خاصی می‌باشند، آگلوتینه می‌کنند. این آنتی‌بادی اغلب در طی دورهٔ نقاهت ایجاد می‌شود. پس هم سرم دورهٔ حاد بیماری و هم سرم در دورهٔ نقاهت باید بررسی شوند. واکنش ویل فلیکس مربوط به چند ریکتزیا در جدول ۲ آمده است (۴۲).

جدول (۲-۲): واکنش ویل فلیکس ریکتزیا.

گروه‌های ریکتزیا	واکنش ویل فلیکس نسبت به آنتی‌ژن‌های پروتئوس		
	OX-19	OX-2	OX-K
ریکتزیای تیفوسی			
تیفوس اپیدمیک	+++	+	٠
تیفوس اندمیک	+++	+	٠
بیماری بریل زینسر	٠ یا +	٠	.
ریکتزیاهای تب دانه‌دار			
تب کوه‌های راکی	+++	+++	٠
تیفوس کنه‌ای	+++	+++	٠
آبله ریکتزیایی	٠	٠	٠
ریکتزیاهای تیفوس اسکرابی			
تیفوس اسکرابی	٠	٠	+++
کوکسیلا			
تب Q	٠	٠	٠

در تست ویل‌فلیکس برای نشان دادن حضور آنتی‌بادی‌های ضد ریکتزیای تیفوسی آنتی‌بادی ضد OX-19 بالاترین تیتر را دارند. که البته آنتی بادی ضد OX19 و ضد OX-2 در مراحل انتهایی فاز حاد یا در دورهٔ نقاهت ظاهر می شوند. بنابراین با سرم منفی ابتلا به تیفوس رد نمی‌شود. بیماران مبتلا به تیفوس اندمیک نیز آنتی‌بادی ضد OX-19 و OX-2 را ندارند. یک تست آنتی‌بادی غیر مستقیم نیز برای نشان دادن آنتی‌بادی‌های اختصاصی گروه ضد آنتی‌ژن‌های ریکتزیا در دسترس است که معمولاً در طی دورهٔ حاد بیماری ظاهر می‌شوند. در تست آنتی‌بادی فلورسنت غیر مستقیم، آنتی‌بادی‌های اختصاصی گروه تیفوس در

طی فاز حاد قابل دسترسی است و هم در تیفوس اپیدمیک هم اندمیک در طی هفتهٔ دوم به اندازهٔ کافی بالا می‌باشد (۴۳).

نکتهٔ مهم: اگر براساس تاریخچه و علایم بالینی به بیماری تب دانه‌دار کوه‌های راکی (RMSF) مشکوک شدیم، قبل از جواب آزمایشگاه باید درمان را شروع کرد. تأیید معمولاً منوط به نتایج آزمایشات آنتی‌بادی است. سرم بیماران دوره نقاهت RMSF شدیداً با آنتی‌بادی OX-19 و OX-2 ویل‌فلیکس واکنش نشان می‌دهد (جدول۲). آنتی‌بادی اختصاصی گروه تب‌های دانه‌دار در تست آنتی‌بادی فلورسانت غیر مستقیم نشان داده می‌شود. می‌توان از ایمونوفلورسانس برای نمایش ریکتزیا در پوست استفاده شود، که البته در همه مبتلایان مثبت نیست. هم چنین می‌توان از روش‌های ایمنوهسیتوشیمیائی برای ارزیابی ریکتری‌ها در بافت‌ها مانند قلب استفاده کرد (۴۲).

نکتهٔ مهم: اگر براساس علایم بالینی مشکوک به تیفوس بوته‌زار شدیم، درمان بدون نتایج آزمایشگاهی شروع می‌شود. به‌دلیل اینکه سویه‌های سوسوگاموشی از نظر آنتی‌ژنیکی بسیار متغیرند و هنوز آزمایش آنتی‌بادی مناسبی برای آن شناسایی نشده و بنابراین تست سرولوژی معتبر نیست. البته جدیداً تست ELISA با استفاده از سه فرم آنتی‌ژنی اصلی ریکتزیا سوسوگاموشی اخیراً در دسترس است. سرم دورهٔ نقاهت معمولاً حاوی آنتی‌بادی ضد OX-K تست ویل فلیکس[1] می‌باشد (۴۲).

۲-۵. تفاوت *کلامیدیا*، *ریکتزیا* و *کوکسیلا*

در ۱۹۳۵، اولین اپیدمی بیماری در یک کارمند شرکت بسته‌بندی گوشت در بریسبان استرالیا دیده شد و چون عامل بیماری مشخص نبود، با اقتباس از کلمهٔ query به معنای ناشناخته، بیماری را تب Q نام نهادند. در ۱۹۷۳، بورنت و فری نشان دادند که عامل آغاز اپیدمی تب Q یک ریکتزیا به نام ریکتزیا بورنتی است. اگر

1- Will Felix

چه بعداً نام باکتری به کوکسیلا بورنتی تغییر یافت، اما طبق معمول به همراه سایر پاتوژن‌های اصلی ریکتزیا دسته بندی می‌شود (جدول ۱).

برخلاف سایر ریکتزیاها، کوکسیلا بورنتی:

(۱) چرخهٔ زندگی پیچیده با اشکال چندگانه مرفولوژیک دارد.

(۲) درون واکوئل‌های میزبان بیشتر از سیتوپلاسم تکثیر می‌یابد.

(۳) به شرایط سخت محیطی مقاوم است.

(۴) از راه‌هایی به غیر از انتقال توسط بندپایان ناقل به انسان منتقل می‌شود.

(۵) معمولاً عامل یک فرم خفیف پنومونایتیس[1] یا پنومونی بدون راش می‌گردد.

سه واریانت[2] مرفولوژیک *کوکسیلا بورنتی* درون سلول میزبان دیده شده است: واریانت سلول کوچک، واریانت سلول بزرگ و اندوسپور. که از میان آن‌ها واریانت سلول کوچک بیشترین عفونت‌زایی را در آزمایشات بر روی مدل حیوانی دارد. کلمهٔ « اندوسپور» کوکسیلا به خاطر موقعیت داخل سلولی باکتری و شکل آن در میکروسکوپ الکترونی نامیده شده است. البته این اندوسپور را نباید با اسپورهای واقعی در باکتری‌های گرم منفی نظیر *باسیلوس*[3] و *کلستریدیوم*[4] اشتباه گرفت. در حالی که معلوم نیست اندوسپور *کوکسیلا* نهفته است یا نوعی مقاومت غیرمعمول است، اندوسپورهای کلاسیک فرم نهفته یا شکل مقاوم شدید نسبت به خشکی، حرارت، تشعشع و مواد شیمیایی می باشند (۴۴).

کوکسیلا معمولاً گاوها، گوسفندها، بزها و گربه‌ها را آلوده می‌کند. عفونت در این حیوانات توسط گزش کنه، تماس با جفت آلوده، خوردن ادرار یا مدفوع آلوده، خوردن لاشه حیوان آلوده و نوشیدن شیر آلوده منتقل می‌شود. انسان وقتی به چرخهٔ انتقال وارد می‌شود که آئروسل حاوی *کوکسیلا* را تنفس کند و با جفت آلوده حیوان در تماس باشد یا گوشت و شیر آلوده بخورد. انتقال تب Q از طریق نیش کنه غیرمعمول

1- Pneumonitis
2- Variants
3- Bacillus
4- Clostridium

است. در ضمن ID_{50} *کوکسیلا* برای انسان‌ها بسیار پایین است و حتی ۱ ارگانیسم باعث بیماری می‌شود که همین سبب شده که کوکسیلا به عنوان آلوده کننده‌ترین عامل شناخته شود. سویه‌های حاد *کوکسیلا بورنتی* سبب پنومونی آتیپیک ملایم و سویه‌های مزمن سبب اندوکاردیت پایدار می‌شوند که با تحلیل کبد یا طحال همراه است (۴۵).

۲-۶. *کلامیدیاها*

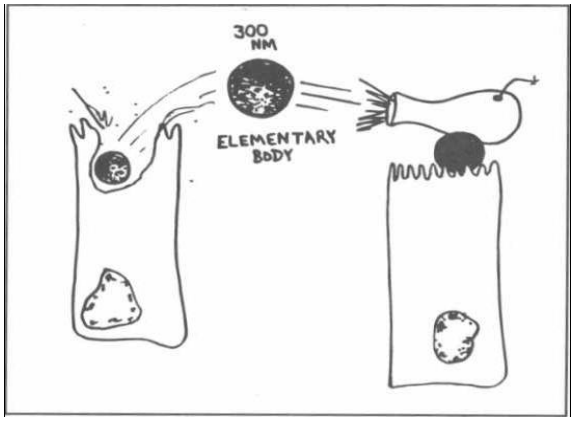
کلامیدیا ها بسیار کوچک می باشند و جزء باکتری های گرم منفی اند زیرا در تکنیک رنگ آمیزی گرم قرمز می شوند و غشای داخلی و خارجی دارند. برخلاف سایر باکتری های گرم منفی، *کلامیدیا* ها فاقد لایه ی پپتیدوگلیکان و اسید مورامیک[1] هستند. *کلامیدیا* به طور اختصاصی به سلول های اپیتلیال استوانه ای غشاء موکوسی را تشکیل می دهند علاقه دارند و این ویژگی به خوبی با انواع عفونت های *کلامیدیایی* مرتبط است که شامل التهاب ملتحمه چشم[2] و التهاب گردن رحم[3] و پنومونی[4] می باشد (۴۶).

۲-۶-۱. چرخه زندگی *کلامیدیا*

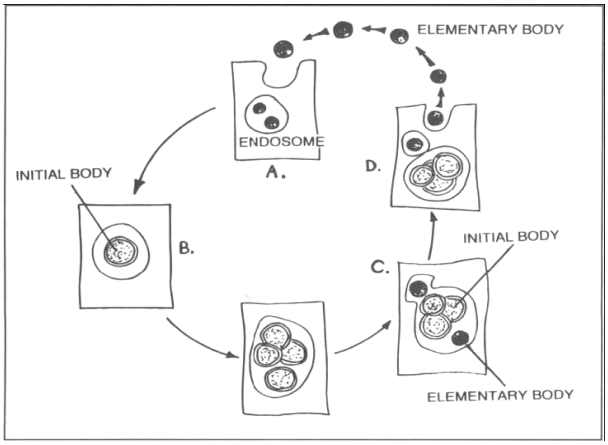
چرخه زندگی کلامیدیا پیچیده می باشد به طوری که باکتری به ۲ فرم دیده می شود :

اجسام ابتدایی : (Elementary body (EB این شکل باکتری از لحاظ متابولیکی بی جان (تقسیم نمی شود) ، متراکم، گرد کوچک (۳۰۰) nm و عامل عفونت می باشد. غشا خارجی این نوع باکتری اتصالات وسیع دی سولفیدی دارد که با هم ارتباط متقابل دارند و باعث پایداری در محیط خارج سلولی را می شوند. شکل اجسام ابتدایی را همانند یک سلاح ابتدایی[5] مثل توپ تصور کنید که از یک سلول میزبان به سلول دیگر شلیک شده و باعث انتشار عفونت می شود (۴۷).

1- Muramyk acid
2- Inflammation of the conjunctiva
3- Cervicitis
4- Pneumonia
5- Elementary wepon



اجسام Intial body یا اجسام رتیکولار مشبک : زمانی که اجسام ابتدایی در داخل سلول میزبان تولید فاگولیزوزوم را مهار نمودند و به اجسامی با اندازه ی ۱۰۰ nm تبدیل می شوند رشد می نمایند. محتوای RNA نشان افزایش یافته و تقسیم دوتایی (شکاف دو تایی) رخ می دهد و نهایتا اجسام مشبک IB یا RB را می سازند. با وجود اینکه IB ، DNA، RNA و پروتئین خود را می سازد از لحاظ انرژی، ATP خود را از میزبان بدست می آورد. بنابراین کلامیدیا به عنوان یک پارازیت داخل سلولی در نظر گرفته می شود. شکل چرخه زندگی کلامیدیا را نشان می دهد (۴۹).



۱. عامل عفونت اجسام بنیادین (EB) است. EB به سلول های اپتیلیال استوانه ای که غشا موکوزی را تشکیل می دهند متصل شده و از طریق اندوستیوز وارد آن ها می گردد.
۲. EB زمانی که وارد اندوزوم شد، از ایجاد فاگولیزوزوم[1] جلوگیری نموده و از بین نمی رود. حال به RB یا EB تبدیل می شود.

1- Fagulyzuzum

۳. زمانی که اجسام رتیکولار کافی بوجود آمدند بعضی از آن ها دوباره به اجسام ابتدایی (EB) تبدیل می شوند.
۴. چرخه زندگی زمانی کامل می شود که سلول میزبان اجسام بنیادین (EB) را آزاد کند که موجب آلوده سازی سلول های بیشتری می شود.

سه گونه *کلامیدیا* وجود دارد. *کلامیدیا تراکوماتیس* که در درجه اول چشم ها، اندام تناسلی و ریه ها را ر گیر می سازد. *کلامیدیا پسیتاسی*[1] و *کلامیدیا پنومونیه*[2] تنها ریه ها را در گیر می کنند. تمامی این گونه ها با تتراسایکلین یا اریترومایسین درمان می شوند (۴۹).

۲-۷. *ریکتزیاها*

ریکتزیا باکتری کوچک گرم منفی غیر متحرک استوانه ای تا کوکسی شکل می باشد و از این جهت که هم اندازه ی ویروس های بزرگ می باشد با کلامیدیا شباهت دارد. هر دو آن ها انگل های انرژی داخلی سلولی اجباری می باشند (ATP را از سلول میزبان می ربایند). با این حال *ریکتزیا* با *کلامیدیا* تفاوت دارد:

۱. *ریکتزیا* برای انتقال به وکتوری بندپا نیازمند است.
۲. *ریکتزیا* آزادانه درون سیتوپلاسم تکثیر می یابد. *ریکتزیا* آزادانه درون سیتوپلاسم تکثیر می شود.
۳. *ریکتزیا* به سلول های اندوتلیال تشکیل دهنده ی عروق خونی تمایل دارد. (در حالی که *کلامیدیا* به اپیتلیوم استوانه ای تمایل دارد.
۴. *ریکتزیا* مسبب بیماری های متفاوتی است. بیشتر آن ها سبب جوش (راش) ، تب های بالا، سردرد های شدید می شوند.

بعضی *ریکتزیا* ها خصوصیات آنتی ژنیک مشابه برخی گونه های باکتری *پروتئوس ولگاریس*[3] دارند. این که آن ها آنتی ژن های همانند دارند کاملا تصادفی است. *پروتئوس و لگاریس* ابدا در بیماری های ریکتزیایی دخالت نمی کند. گونه های *پروتئوس و لگاریس* که این آنتی ژن های مشترک را دارند عبارتند از OX-2 و OX-19 و OX-k (۴۷).

1- Chlamydi Psittaci
2- Chlamydia Pneumoniae
3- Proteus Vulgaris

۲-۷-۱. واکنش ویل فلیکس (weil - felix)

یک تست کلاسیک است که از واکنش متقابل آنتی ژن های *پروتئوس و لگاریس* برای کمک به تایید تشخیص عفونت های *ریکتزیایی* استفاده می شود. این تست بدین صورت انجام می گیرد که سرم بیمار مشکوک به عفونت های *ریکتزیایی* را با آنتی ژن های گونه های خاصی از *پروتئوس و لگاریس* مخلوط می کنیم. اگر سوم فرد آنتی بادی های ضد *ریکتزیایی* داشته باشد، دانه های لاتکس پوشیده شده با آنتی ژن های *پروتئوس* آگلوتینه می شوند که نشان دهنده ی تست ویل فلیکس مثبت است. برای مثال، زمانی که تست بر روی بیماری با علائم و نشانه های تیفوس خراشی [۱] انجام شود ، پاسخ OX-19 و OX-2 منفی به همراه OX-k مثبت تایید کننده ی عفونت می باشد (۴۸).

بوسیله ی تست های سرولوژیک خاص که مستند بر افزایش سطح آنتی بادی های ضد *ریکتزیایی* با گذشت زمان باشد، نیز می توان عفونت ریکتزیایی را تشخیص داد. این تست های سرولوژیک عبارتند از :

تست ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFA)، تست فیکساسیون کمپلان (CF) و سنجش جذب ایمنی با واسطه ی انزیم (ELISA). این تست ها اختصاصا می توانند گونه ها و زیر گونه ها را شناسایی کنند. درمان برای تمام بیماری های *ریکتزیایی* شامل استفاده اولیه از داکسی سایکلین و کلرامفنیکل می باشد (۴۹).

۲-۷-۲. *ریکتزیا ریکتزیا*[۲]

تب مربوط به کوههای راکی، تب مربوط به کوه های راکی یک هفته بعد از نیش زدگی فرد توسط یک نوع کنه چوب با نام درماسنتور اندرسونی[۳] یا کنه سگ [۴] اتفاق می افتد. هر دو این کنه ها میکروارگانیسم مسبب یعنی *ریکتزیا ریکتزیا* را منتقل می کنند. این بیماری با تب، سرخی ملتحمه، سردرد شدید و جوش

1- Scrub Typhus
2- Richettsia Richettsia
3- Dermacentor Andersoni
4- Dermacenter Variabilis

که ابتدا روی مچ های دست، مچ های پا، پاشنه و کف دست ظاهر شده و سپس به تنه منتشر میشود، شناسایی می گردد. تب منقوط کوههای راکی بیشتر در کمربند کنه ای نواحی جنوب شرقی ایالات متحده دیده می شود تا در نواحی کوههای راکی. این بیماری باید نام تب منقوط آپالاچی ها (Appalachian spotted fever) را به خود بگیرد زیرا بیشترین موارد بیماری در حال حاضر در آتلانتیک جنوبی و ایالات جنوبی مرکزی نظیر کارولینای شمالی ، کارولینای جنوبی و تنسی رخ می دهد. اگر چه بیماری تقریبا در تمام ایالات گزارش شده اند (۴۵).

این میکروارگانیسم ها در پوشش اندوتلیال رگ های خونی و مویرگ ها تکثیر می یابند و موجب خونریزی و ترومبوز می شوند. التهاب و آسیب به عروق خونی کوچک مسبب سرخی ملتحمه و راش های پوستی می باشد. اگرچه این بیماری معمولا طی ۳ هفته بهبود می یابد اما می تواند حتی به سمت مرگ نیز پیشرفت کند (مخصوصا زمانی که درمان آنتی بیوتیکی به تاخیر بیافتد). از آن جایی که کنه این باکتری را طی زمان خون خواری (یا تغذیه) ۶ تا ۱۰ ساعته اش منتقل می کند، کشف و خارج نمودن سریع کنه ها از عفونت جلوگیری خواهد کرد (۵۰).

۲-۷-۳. *ریکتزیا آکاری*[1] (آبله ریکتزیایی)

آبله *ریکتزیایی* یک بیماری خفیف، محدود شونده و همراه با تب است که با یک برآمدگی پوستی قرمز موضعی ابتدایی (یک پاپول) در محل گزش مایت شروع می شود. سپس برآمدگی (پاپول) به یک تاول[2] تبدیل می شود. چند روز بعد تب و سردرد شروع شده و وزیکول ها روی بدن ظاهر می گردند (مشابه آبله مرغان). اگر چه این بیماری خود محدود شونده است، پاسخ چشمگیر ی نسبت به داکسی سایکلین نشان می دهد. حذف کردن جوندگانی که در آن نزدیکی ها زندگی می کنند (که می توانند به عنوان مخزن برای *ریکتزیا آکاری* عمل نمایند) مهم است و از بیمار ی جلوگیری می کند (۵۱).

1- Richettsia akari
2- vescicle

۲-۷-۴. *ریکتزیا پرووازکی*[1] (تیفوس اپیدمیک)

واژه ی اپیدمیک به شروع ناگهانی و گسترش یک عفونت که می تواند نسبت زیادی از جمعیت را تحت تاثیر قرار دهد اطلاق می شود و واژه ی اندمیک به معنای یک بیماری عفونی که به طور دائم در میان یک جمعیت وجود دارد است. دو گونه از *ریکتزیا* ها باعث تیفوس می شوند.

ریکتزیا پرووازکی نوع اپیدمیک آن را بوجود می آورد درحالی که *ریکتزیا تیفی* مسئول نوع اندمیک تیفوس است. اگر چه این دوگونه مخازن و وکتورهای مختلفی دارند اما باکتری های بسیار وابسته (مرتبط) با هم می باشند. که بیماری مشابه را بوجود می آورند و عفونت با یکی از این موجب ایمنی در برابر دیگری می گردد (۵۲).

از نظر بالینی، تیفوس اپیدمیک با شروع ناگهانی تب و سردرد بعد از دوره ی کمون ۲ هفته ای تشخیص داده می شود. ماکول های صورتی رنگ کوچک در حدود پنجمین روز بر تنه ظاهر شده که به سرعت در سراسر بدن پخش می گردند. برخلاف تب منقوط کوههای راکی این راش ها به کف دست و پا و صورت منتشر می شوند. بیمار ممکن است هذیان بگوید. از آن جایی که *ریکتزیا* به سلول های اندوتلیال عروق خونی تهاجم می یابد خطر تشکیل لخته در عروق و سپس قانقاریا در پاها و دست ها وجود دارد. بیماری معمولا طی ۳ هفته بهبود خواهد یافت اما گاها مرگ بار است (خصوصا در بیماران مسن تر) (۵۳).

ارتباط نزدیک با حامل (وکتور) سنجاب پرنده شک به وجود بیماری را بالا می برد. در کنار استفاده از تتراسایکلین و کلرامفنیکل جهت درمان، بهسازی محیط و رعایت اصول بهداشتی و ریشه کن سازی شپش انسان می تواند به کنترل اپیدمی ها کمک کند (۵۳).

1- Rickettsia Pruvazky

۲-۷-۵. بیماری بریل زینسر[1]

برای آن دسته از شما که به کتاب میکروبیولوژی زینسر مراجعه می کنید شاید جالب باشد که بدانید اعتبار هانس زینسر به خاطر فرضیه ی درست او بود مبنی بر اینکه بیمارانی که بدون درمان آنتی بیوتیکی از بیماری تیفوس شپش آلود اپیدمیک بهبود می یابند می توانند همچنان *ریکتزیا* پرووازکی پاتوژن را به صورت فاز نهفته در خود نگه دارند. گاهی اوقات این میکروارگانیسم از فاز نهفته (latent) خود بیرون آمده و بیماری بریل زینسر را ایجاد می کند. با این حال نشانه های بیماری معمولا خفیف ترند (راش پوستی وجود ندارد) و علت آن حضور آنتی بادی های از پیش تشکیل شده ناشی از عفونت قبلی می باشد. تشخیص بیماری بر مبنای افزایش سریع در مدت زمان کوتاه در تیتر IgG اختصاصی برای *ریکتزیا پرووازکی* است. این نکته بسیار مهم است که *ریکتزیا پرووازکی* را به طور کامل در بدن بیمارتان (بجای افزایش سریع در تیتر IgM که در عفونت اولیه اتفاق می افتد) توسط درمان آنتی بیوتیکی کافی ریشه کن کنید زیرا بیماران درمان نشده یه عنوان مخزن بیماری بین اپیدمی ها محسوب می شوند (۵۴).

۲-۷-۶. *ریکتزیا تیفی*[2] (تیفوس اندمیک یا تیفوس موش murine typhus)

تیفوس اندمیک مشابه تیفوس اپیدمیک است با این تفاوت که به وخامت نوع اپیدمیک نیست و در اپیدمی ها رخ نمی دهد. این بیماری توسط *ریکتزیا تیفی* ایجاد می شود. جوندگان به عنوان مخزن اولیه بیماری محسوب می شوند و بیماری توسط کک موش (Xenopdylla cheopis) به انسان منتقل می شود (این کک همچنین مسئول انتقال طاعون در گذشته بوده است). بعد از یک دوره ی کمون ۱۰ روزه تب، سردرد و راش های صاف و گاهی پر از برآمدگی ماکولوپاپولر به همان اندازه ی تیفوس اپیدمیک ایجاد می شوند. اگر چه این بیماری از نوعی که توسط تیفوس اپیدمیک ایجاد می شود خفیف تر است اما همچنان باید بسیار جدی گرفته شود (۵۴).

1- Brill – Zinsser Disease
2- Richettsia Typhi

درمان توسط داکسی سایکلین یا کلرامفنیکل صورت می گیرد ، کنترل لک ها و جمعیت موش ها نیز مفید است . هدف ما این نیست که موش ها را بکشیم زیرا کک های گرسنه حالا ممکن است به گزش انسان ها روی بیاورند (۵۴).

۲-۷-۷. *ریکتزیا تستزوگاموشی* [۱]

۲-۷-۸. (تیفوس اسکراب یا تب) [۲]

ریکتزیا تستوگاموشی در آسیا و اقیانوس جنوب غربی یافت می شود. این بیماری طی جنگ جهانی دوم و جنگ ویتنام سربازان را در اقیانوس جنوبی آلوده ساخت. *ریکتزیا تستوگاموشی* بوسیله ی گزش لارو مایت ها منتقل می شود. مایت ها روی جوندگان و لارو چیگرز[۳] در خاک زندگی می کنند. بعد از یک دوره کمون ۲ هفته ای تب بالا، سردرد و پوسته پوسته شدن پوست در محل گزش روی می دهد. سپس راش های صاف و گاهی برآمده (ماکولوپاپولر) بوجود می آیند (۵۵).

۲-۸. *کوکسیلا بورتنی* [۴]

۲-۸-۱. (تب Q)

کوکسیلا بورنتی از *ریکتزیا* ها تفاوت دارد زیرا همانند باکتری های گرم مثبت سازنده ی اسپور (*کلاستریدیوم* ها و *باسیلوس* ها) این باکتری نیز یک فرم اندوسپوری دارد. این اندوسپور خصوصیاتی به باکتری اعطا می کند که آن را با سایر *ریکتزیا* ها متفاوت می سازد:

۱. مقاومت نسبت به گرما و خشکی: اسپورها ممکن است محصولات لبنی را آلوده سازند.

1- *Richettsia Tsutsugamushi*
2- Tsutsugamushi
3- chiggers
4- Coxiella burnetii

۲. حیات خارج سلولی : مقاومت اندوسپور به باکتری اجازه می دهد تا در خارج سلول میزبان به مدت طولانی زنده بماند. با این حال رشد و تکثیرشان می بایست همانند *کلامیدیا* ها و *ریکتزیا* ها درون سلول و با استفاده از ATP میزبان رخ دهد.

۳. انتقال بدون حضور بند پا: *کوکسیلا بورتنی* در بدن کنه و احشام زندگی می کند. اسپور آن درون مدفوع خشک شده ی کک ها که روی چرم گاو باقی می ماند و نیز در جفت خشک شده ی گاو بعد از زایمان زنده می ماند. این اسپورها آئروسول – معلق در هوا هستند و زمانی که استنشاق گردند سبب بیماری در انسان می شوند. پس استنشاق اسپورها به جای گزش بندپایان موجب تب Q می شود.

۴. پنومونی: از آن جایی که اسپورها به داخل ریه استنشاق شده اند، یک پنومونی خفیف نظیر آنچه توسط *مایکوپلاسما پنومونیه* ایجاد می کند دیده می شود.

از نظر بالینی شروع ناگهانی تب و تعریق زیاد ۲ تا ۳ هفته بعد از عفونت به همراه پنومونی ایجاد می شود. این مورد تنها بیماری *ریکتزیایی* است که موجب پنومونی می شود و نیز در آن هیچ راشی وجود ندارد (۵۶).

۲-۹. *ارلیشیا کانیس و کافنیس*[1]

ارلیشیا کانیس بیماری سگ ها می باشد. از آنجایی که سگ ها لیس زدن را دوست دارند این بیماری مهم جلوه می کند. سگ ها باکتری را از کک دریافت می کنند. کک ها همچنین می توانند انسان ها را بگزند و یک گونه ی نزدیک به *ارلیشیا کانیس* را به او منتقل کنند. این باکتری اکنون *ارلیشیا کافینیس* نام دارد و موجب بیماری بسیار شبیه به تب منقوط کوههای راکی (به نام *ارلیشیوزیس* انسانی) می شود. بیماران مبتلا دچار تب بالا و سر درد شدید می شوند اما ظهور راش ها نادر است (در ۲۰ ٪ موارد) (۵۴).

1- Ehlichisis and Hwman Ehrlichiosis

۲-۱۰. آیا دام ها می توانند تب کیو را به انسان انتقال دهد؟

بله، بعضی از دامها می توانند تب کیو را به انسان انتقال دهند. گاو، گوسفند و بز به احتمال بسیار قوی انتقال دهنده *کوکسییلا برونتئی*[1] هستند ولی انواع دیگر حیوانات می توانند بیمار نیز بشوند. اغلب حیوانات آلوده علائم تب کیو را نشان نمی دهند، لیکن ارگانیسم می تواند در گرد و غبار بهار بندها که دارای کود، ادرار یا مایعات خشک شده ناشی از فرآیند تولد گوساله ها و یا بره ها است، وجود داشته باشد. مردم معمولا از طریق تنفس در گرد و غبار بهار بندهای آلوده به تب کیو مبتلا می شوند. هر از گاهی، آلودگی انسان از طریق نوشیدن شیر آلوده و یا گزش کنه نیز اتفاق می افتد (۵۵).

۲-۱۱. نشانه های درمانگاهی در انسان

نیمی از انسان های آلوده با *کوکسیلا برونتئی* علائم درمانگاهی را نشان می دهند در اغلب مبتلایان بیمار، علائم درمانگاهی ۳-۲ هفته بعد از آلودگی و یا زودتر نمایان می شود. این علائم شامل سر درد، درد معده و سینه، استفراغ و اسهال است. تب می تواند ۲-۱ هفته به درازا بکشد اما بسیاری از بیماران می تواند به عفونت شدید ریه و کبد مبتلا شوند. اکثر مبتلایان در عرض ۲-۱ ماه بعد از آلودگی بهبودی می یابند. بیماری بندرت ۱ سال و یا بیشتر تداوم می یابد. در این دسته از بیماران التهاب قلب و خصوصا التهاب دریچه های قلب می تواند مشکل جدی ایجاد کند (۵۶).

در بیشتر موارد حاد ابتلای به تب کیو با شروع ناگهانی یک و یا بیشتر علائم به شرح: تب بالا (۱۰۵-۱۰۴ درجه فارنهایت)، سر درد شدید، بیقراری، درد عضلات، گیجی، اسهال، درد شکمی و درد سینه شروع می شود. تب حدود ۲-۱هفته ادامه می یابد. کاهش وزن نیز می تواند وجود داشته باشد و برای مدتی ادامه یابد. ۵۰-۳۰ ٪ بیماران یک علائم عفونی آشکار که به پنومونی منجر می شود را نشان می دهند. علاوه یک بخش عمده از بیماران نتایج غیر طبیعی در تست های عملکرد کبد را نشان می دهند و در برخی هپاتیت بروز می کنند. در مجموع بیشتر بیماران در عرض چند ماه بدون درمان بهبود می یابند. فقط ۲-۱٪

[1]- Kuksyyla Bruntyy

مبتلایان به فرم حاد بیماری تلف می شوند. شکل مزمن تب کیو، با عفونت پایدار به مدت ۶ ماه شناخته می شود، این شکل از بیماری غیر معمول ولی بغایت جدی و مخاطره آمیز است. بیماران با فرم حاد بیماری می توانند به شکل مزمن بیماری گرفتار شوند. این فرم مزمن ۲۰-۱ سال بعد از ابتلای اولیه ادامه می یابد. عواقب جدی فرم مزمن تب کیو اندوکاردیت است، معمولا دریچه آئورت قلب، و در موارد کمتر دریچه میترال درگیر می شود. بیمارانی که به فرم حاد بیماری می رسند بیماری قبلی دریچه قلب و یا سابقه پیوند عروق دارند. گیرندگان اعضای پیوندی، بیماران سرطانی و همچنین مبتلایان به بیماری مزمن کلیوی در معرض ابتلای به فرم مزمن تب کیو هستند. بالغ بر ۶۵ ٪ مبتلایان به شکل مزمن بیماری ممکن است تلف شوند. دوره کمون تب کیو بستگی به تعداد اعضائی دارد که در ابتدا به عفونت درگیر می شوند. هرچه تعداد اندام های درگیر بیشتر باشد، دوره کمون کوتاه تر است. اغلب مبتلایان در عرض ۳-۲ هفته بعد از در معرض قرار گرفتن بیماری را نشان می دهند. آن دسته از بیماران که بطور کامل بهبود می یابند، می توانند تا پایان زندگی بر علیه عفونت مجدد ایمن باشند (۵۷).

۲-۱۲. درمان

در انسان آنتی بیوتیک ها نظیر تتراسایکلین ، کلرامفنیکل و ونکومایسین نتایج خوبی داشته و اگر روزهای اول بیماری تتراسایکلین تجویز شود نتیجه رضایت بخش خواهد بود. عود بیماری پس از درمان ذکر شده است. در دامپزشکی تجویز آنتی بیوتیک ها ، ارزش محدودی دارند و بمنظور عقیم ساختن آلودگی شیر ، تزریق درون رگ و یا درون پستان تتراسایکلین ناموفق بوده است. کورتیزون که به خوکچه بطور تجربی تزریق شده موجب تسریع در بهبود بیماری شده است. داکسی سیلین، داروی اختصاصی برای درمان تب کیو می باشد. موثرترین شیوه مصرف آنتی بیوتیک در ۳ روز اول بیماری می باشد. یک دز ۱۰۰ میلی گرمی دوکسی سیلین به صورت خوراکی و دو بار در روز به مدت ۲۱-۱۵ روز، بارها مورد استفاده قرار گرفته است. آنتی بیوتیک کوئینولون در شرایط آزمایشگاهی بر علیه *کوکسیلا برونتئی* موثر بوده است. در صورت عود بیماری باید دارو مورد استفاده قرار گیرد. ضایعات اندوکاردیت ناشی از تب کیو بسیار سخت به دارو جواب

می دهد و اغلب از درمان ترکیبی چند دارو استفاده می شود. دو روش درمانی متفاوت: ۱- ترکیب دوکسی سیلین با کوئینولون به مدت حداقل ۴ سال ۲- ترکیبی دوکسی سیلین با هیدروکسی کلروکوئین به مدت ۳-۱/۵سال مورد ارزیابی قرار گرفته اند. در روش درمانی دوم موارد کمتری از عود بیماری گزارش شده است، اما نیازمند آزمایش چشمی عادی برای مشخص کردن تجمع کلروکوئین دارد. درمان جراحی در موارد مواجهه با اندوکادیت نیاز می باشد (۵۷).

۲-۱۳. پیشگیری

در برخی کشورها رخداد تب کیو اساسا یک بیماری شغلی محسوب می شود و دامپزشکان، کارگران کارگاه های فرآوری گوشت، کارگران دامداری های شیری، دامداران و محققان در مراکز نگهداری دام در معرض آلودگی هستند. اقدامات کنترلی و پیشگیری به شرح زیر بایستی بر روی این افراد و اماکن به مورد اجرا درآید:

- تا آنجا که امکان دارد از تماس با جفت، مواد و مایعات خروجی بعد از زایمان، پرده های جنینی و جنین سقط شده گوسفند، گاو و بز اجتناب نمود.
- شیر و محصولات لبنی پاستوریزه مصرف نمود.
- در صورت کار با گوسفند و بز آبستن، واکسیناسیون بر علیه *کوکسیلا برونتئی* صورت گیرد.
- اعمال ضوابط قرنطینه ای در مورد دامهای وارداتی.
- در صورت وجود سابقه قبلی بیماری دریچه قلبی و یا تعویض دریچه قلب، لزوم مراقبت و حداکثر توجه در مناطقی که گاو، گوسفند و بز وجود دارد، ضرورت دارد.
- آموزش عمومی در مناطق آلوده.
- دفن بهداشتی مناسب جفت، فرآوردهای زایمان، غشاء های جنینی و جنین های سقط شده در مراکز نگهداری گوسفند و بز.

- محدود کردن دسترسی به مواد مصرف شده در اماکن دامی و آزمایشگاهها در مناطقی که دام های آلوده نگهداری می شوند.

- بکارگیری روش مناسب برای بسته بندی، اتوکلاو کردن و شستشوی لباس های آزمایشگاه.

- در صورت امکان واکسیناسیون افرادیکه در تماس با گوسفندان آبستن و یا *کوکسیلا برونتئی* زنده هستند.

- حصول اطمینان از نگهداری تسهیلات و امکانات مورد نیاز گوسفندان در مناطق دور از مناطق آلوده. دام ها بایستی بطور روتین برای بررسی وجود آنتی بادی بر علیه *کوکسیلا بروتئی* مورد آزمایش قرار گیرند و باید توجه لازم از سکونت در جهت جریان وزش باد و هوای وارده از این مناطق معمول نمود.

- مشاوره و راهنمائی افراد در معرض بیشتر خطر ابتلا به شکل مزمن تب کیو، بویژه افراد با سابقه قبلی بیماری دریچه قلبی و یا پیوند عروق.

- واکسن مناسب برعلیه تب کیو تولید شده و در افراد در معرض با موفقیت در استرالیا، مورد مصرف قرار گرفته است. البته این واکسن به شکل تجاری در امریکا در دسترس نیست. افراد علاقمند به استفاده از واکسن باید مورد تست جلدی که مبین وضعیت تماس قبلی با ارگانیسم باشد را انجام دهند. افرادیکه در تماس قبلی با ارگانیسم بوده اند بدلیل واکنش شدید در مقابل واکسن، از واکسیناسیون منع شده اند. واکسیناسیون مورد استفاده در دامها نیز تولید شده است (۵۸).

۲-۱۴. وضعیت بیماری در ایران چگونه است؟

مطالعات کمی در این مورد در ایران انجام شده است، دو مطالعه توسط دکتر محمد خلیلی و همکاران(دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان) انجام گرفته است در یک مطالعه ۱۶۹ نمونه سرم (۷۶ نمونه از بز در ۹ گله و ۹۳ نمونه گاو از ۱۲ گله شیری) بطور تصادفی برداشت شد. این نمونه ها با الیزا مورد آزمایش واقع شدند و در مجموع ۳۵/۵ ٪ موارد یعنی ۶۰ نمونه مثبت اعلام گردید و بیشترین موارد سرم مثبت مربوط به نمونه های بز بود. البته مطالعه دیگری توسط همین محقق در روی ۷۵ بیمار انسانی

تب دار مشکوک به تب مالت انجام شد و با آزمایشات الیزا، آنتی بادی فاز ۱ و ۲ *کوکسیلا برونتئی* مورد آزمایش قرار گرفت و در مجموع و بترتیب ۲۴ ٪ و ۳۶ ٪ موارد سرم مثبت تشخیص داده شد. البته برای اعلام وضعیت نیازمند به انجام تحقیقات مطمئن و روش های آزمایشگاهی معتبر می باشد (۵۹).

۲-۱۵. واکسن

مایه کوبی حیوانات حساس در مواردی که مقدور باشد توصیه می شود و می توان برای این منظور واکسن کشته در گاوها به کاربرد این عمل در حین حال به میزان زیاد قابل استفاده نبوده و از طرفی اقتصادی نمی باشد در انسان واکسن زنده یا غیر فعال به کار می برند واکسن کشته و تخلیص شده که با سویه های فاز یک قبل از عادت دادن به رویان جوجه آن را تهیه کرده اند ، نتیجه خوب داده است (۵۶).

۲-۱۶. *ریکتزیا* در جنگ بیولوژیک

استفاده از عوامل میکروبی (باکتری ، ویروس ، قارچ و یا سموم تولید شده توسط آنها) به دوران بسیار قدیم باز میگردد و کسی نمی تواند ادعا کند که برای اولین بار چه کسی از عوامل بیولوژیکی استفاده کرده است، ولی طبق موارد ثبت شده یکی از کهن ترین حیله های استفاده از میکروب در جنگ ها، انداختن اجساد فاسد بیماران در آب بود، در قرن چهاردهم در شبه جزیره کریمه با انداختن اجساد در چاه های آب، تعداد زیادی از پا درآمدند، در سال ۱۲۴۸ میلادی بیماری مرگ سیاه یا طاعون سبب کشته شدن بیش از شش میلیون نفر از مردم اروپا شد، در قرن پانزدهم میلادی چند هزار نفر بر اثر بیماری تیفوس کشته شدند، ارتش ناپلئون بناپارت در عقب نشینی خود عمده افرادش را بر اثر بیماری اسهال ، تیفوس و ذات الریه از دست داد، در سال ۱۸۷۳ میلادی، انگلیسی ها در قاره آمریکا برای نابودی بومیان سرخ پوست استراتژی کثیف و غیر انسانی را به کار بردند، آنها اقدام به توضیع پتوهایی به صورت هدیه به سرخ پوستان کردند، این پتو ها قبلا توسط بیماران آلوده به بیماری آبله مورد استفاده قرار گرفته بود، سرخ پوستان با استفاده از این پتو ها دچار بیماری آبله شده و تعداد زیادی از آنها کشته شدند و مشابه این کار را نیز در ۲۰ سال بعد در

هند و چین انجام دادند. در جنگ جهانی اول آلمانی ها برای نابود کردن اسب های سواره نظام فرانسه از عوامل بیولوژیکی استفاده نمودند و در اواخر جنگ نیز علیه سربازان انگلیسی که در خندق ها موضع گرفته بودند. با شروع جنگ جهانی دوم هر چند که آلمانی ها پیشتاز توسعه عوامل شیمیایی بودند و زرادخانه آنها مملو از انواع بمب های شیمیایی بود، اما هرگز آدولف هیتلر اجازه استفاده از آنها بر علیه دشمنانش را نداد. برای مثال اگر در نورماندی از بمب های شیمیایی علیه متفقین استفاده کرده بود، حتما آنها را شکست داده و آنها را وادار به عقب نشینی می کرد. همچنین در نبردهایش با روسیه اگر از بمب های شیمیایی که در اختیار داشت، استفاده میکرد، کشور روسیه را به آسانی به زانو در می آورد!!! (بعد میگن آدولف هیتلر یک جنایتکار بزرگ بود). ژاپنی ها نیز در عوامل میکروبی از تمامی کشورهای جهان جلوتر بودند. در سال ۱۹۴۲ فرماندهان ارتش ژاپن پس از جلسات مختلف دست به احداث یک واحد تحقیقاتی بزرگ در زمینه عوامل میکروبی زدند، این واحد مخفی که جزو بزرگترین کارخانه های تولید میکروب بود، واحد نظامی ۷۳۱ نامگذاری شد و فرماندهی آن را به فرد بی رحمی به نام ژنرال (شیرو ایشی) سپردند. این واحد قویترین میکروب های دنیا را تولید می نمود که از جمله آنها می توان به (تیفوئید ، پاراتیفوئید ، آبله ، طاعون ، سیاه زخم و ...) اشاره کرد، ژنرال ایشی از هزاران اسیر جنگی با ملیت های چین ، روسی و آمریکایی به عنوان موش آزمایشگاهی استفاده نمود. ژاپن در خلال جنگ جهانی دوم با بالون هایی مخصوص که هر کدام یک بمب ۱۵ کیلویی را حمل می نمود، دست به بمباران شیمیایی خاک آمریکا زد. این بالون های ویژه، به وسیله جریان بادی که از بالای ژاپن عبور می کرد و به آمریکا منتهی می شد کار می کردند. البته از صدها بالونی که ساخته شد تنها کمتر از ۳۰ عدد توانستند بمبهای خود را برروی آمریکا بریزند و بقیه یا بر اثر تغییر دما و یا تغییر جریان باد نتوانستند خود را به آمریکا برسانند و یا در اقیانوس سقوط کردند. واحد ۷۳۱ با آزمایش بیماری های متفاوت نحوه، چگونگی و مدت اثر انواع عوامل را برروی بدن انسان های زنده بدست می آورد. پس از شکست ژاپن در جنگ جهانی دوم و پیروزی آمریکا بر آن، نیروهای آمریکایی اخبار و گزارش هایی از واحد ۷۳۱ دریافت کردند، دولت آمریکا پس از اطلاع از وجود چنین آزمایشگاهی، این مسئله را مخفی و هرگز ژنرال ایشی و سایر جنایتکاران واحد ۷۳۱ را محاکمه نکرد. دولت آمریکا دستور داد

تا ژنرال ایشی و همکارانش در واحد ۷۳۱، به پادگان "دتریک "مریلند، منتقل شوند و نتیجه تحقیقاتشان را به مرکز شیمیایی آمریکا ارائه دهند. بعد از اتمام جنگ جهانی دوم، طبق اسرار نظامی فاش شده، به این نکته می توان اشاره کرد که آمریکا و انگلیس در سال ۱۹۴۴ برای تسلیم کردن آلمان، تصمیم به استفاده گسترده از عامل میکروبی سیاه زخم (یکی از بدترین میکروب های موجود روی زمین) علیه شهرهای بزرگ آلمان از جمله (آخن، اشتوتگارت، فرانکفورت، ویلهلم، شاخن و برلین) را داشتند. در جنگ ۱۹۵۲ کره، کشور چین آمریکا را متهم به استفاده از عوامل میکروبی در کره شمالی کرد. این اتهام بر اساس مشاهدات محلی و اعترافات اسیران جنگی صورت گرفته بود. با تحقیقات به عمل آمده توسط گروهی از دانشمندان بی طرف، مشخص شد که آمریکایی ها با پخش موش های ناقل طاعون، پرنده های آلوده به سیاه زخم و همچنین استفاده از عوامل میکروبی در وسایلی مانند دستمال، جوهر خودنویس و ... مردم کره شمالی را آلوده و از پا در می آوردند، گزارش ۷۰۰ صفحه ای دانشمندان، خود گواهی بر این امر می باشد.

ارتش آمریکا بیش از ۳۱ عامل میکروبی را علیه مزارع گندم و برنج در خلال سالهای ۱۹۵۱ تا ۱۹۶۹ به صورت آزمایش بکار برد، در تاریخ ۲ ژانویه ۱۹۶۹ در خواستی از از دبیر کل سازمان ملل به مدیر کل سازمان بهداشت جهانی ارائه شد .این درخواست در خصوص تحقیقات برروی سلاح های بیولوژیک و تهیه گزارش همکاری لازم با سازمان ملل به عمل آید. این گزارش در تاریخ ۲۹ ژانویه ۱۹۶۹ در سطح عمومی مطرح شد که نتایج زیر را داشت:

_ عوامل شیمیایی و میکروبی به سرعت می توانند پخش شوند و جان مردم غیر نظامی را نیز به خطر بیندازند و همچنین این عوامل " دیر تشخیص " بوده و خطر بزرگی برای جوامع بشری به شمار می آیند.

_ در صورت استفاده شدید از عوامل شیمیایی و میکروبی، میزان ضایعات به حدی می شود که کلیه امکانات بهداشتی جوابگوی درمان افراد نخواهند بود (۵۹).

_ این سلاح ها باعث تغییر منفی در محیط زندگی انسان می شوند.

_ این عوامل تاثیر غیر قابل پیشبینی و ناشناخته ای برروی محیط کره زمین دارند.

_ این سلاح ها به صورت محدود و توسط تروریست ها هم می تواند خطرات عمده ای را متوجه جامعه بشری کند .در سال ۱۹۷۲ طبق کنوانسیون منع تولید سلاح های شیمیایی و بیولوژیکی که آمریکا و شوروی سابق نیز جزو امضا کنندگان آن بودند، قرار شد که دول امضا کننده طبق هیچ شرایطی عوامل میکروبی و شیمیایی را آزمایش، تولید و انبار نکنند، هرچند که این قرار داد و قرار دادهای بعدی به فراموشی سپرده شدند .در یکی از شب های آوریل ۱۹۷۹ در تاسیسات نظامی شماره ۱۹ شوروی سابق در شهر "سوردلاوک" انفجاری رخ داد، بلافاصله ابری از سیاه زخم بر فراز شهر ظاهر شد و عده زیادی از مردم را بیمار نمود، هزاران نفر از مردم شهر به دلیل بیماری کشته شدند (۶۰).

۲-۱۷. بررسی متون

لیتراک[1] و همکاران طی مطالعه گسترده ای در سال ۱۹۹۱ تا ۱۹۹۶ درجمهوری های چک و اسلواکی, هیچ گونه عفونت انسانی منتقله از *کوکسیلا بورنتی* را مشاهده نکرد. در حالی که مطالعات هیرای[2] و همکاران از رشد مثبت موارد آلودگی به کوکسیلا بورنتی در ژاپن و در طی سال های اخیر حکایت دارد (۶۱).

کاتو[3] و همکاران در بررسی های علمی خود در سال ۱۹۹۹ به آلودگی ۳/۳۳ درصدی افراد مورد آزمایش به این میکروارگانیسم اشاره می کند. این درحالی است که گوا[4] و همکارانش در سال ۱۹۹۸ آلودگی به *کوکسیلا* را در ۳/۴ ٪ از دامپرورانی که در ایالات متحده آمریکا در دامپروری اشتغال داشتند تشخیص دادند (۶۲-۶۶).

در سال ۱۹۹۷ در چین و در سال ۱۹۹۹در اندونزی با هیچ مورد آلودگی با *کوکسیلا* برخورد داشتند. در حالی که آلودگی به این پاتوژن در بررسی های توا[5] و همکاران در سال ۲۰۰۰، ۵/۱ ٪ گزارش گردید. ریهاک[6]

1- Literak
2- Hirai
3- Kato
4- Gua
5- Toa
6- Rehacek

و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مناطق جمهوری چک، آلودگی به کوکسیلا بورنتی را به میزان ۱۲/۲ ٪ در گوسفند، ۹/۷ ٪ در بز، ۴/۴ ٪ در گاو های این منطقه گزارش کردند (۶۹-۶۵).

در مطالعه ای مشابه که توسط مانیلا[1] و همکارانش در ۲۰۰۲ در شرق ایتالیا انجام گردید به حضور *کوکسیلا بورنتی* در حیوانات مورد بررسی اشاره دارد. در تشابه کامل با نتایج سایر مطالعات, باسلار[2] و همکاران در سال ۱۹۹۱ در کارهای تحقیقی خود و همچنین ریهاک[3] و همکاران در سال ۱۹۹۳ در آلمان، مطالعات کروزسکا[4] و همکاران در سال ۱۹۹۶ در پرتغال, به آلودگی حیوانات مورد بررسی به کوکسیلا بورنتی اشاره دارد (۷۲-۶۸).

عدم ابتلای افراد مورد بررسی در زمان مطالعه و همچنین عدم بروز نشانه های بالینی خاص و مرتبط با تب کیو در آنان در گذشته, با نتایج به دست آمده از این مطالعه، انطباق داشته و با آن همسو هستند. شایان ذکر آن که به طور کلی چرخه های مشترک بین انسان و دام در هر پاتوژن، از جمله کوکسیلا بورنتی، در میزبانان مخزن در نواحی مختلف، متفاوت بوده و بر این اساس، آمارها نشان دهندۀ تفاوت های فاحش در میزان شیوع کوکسیلا در مناطق جغرافیایی مختلف می باشند. بر این اساس هدف اصلی از این مطالعه را بررسی حضور *کوکسیلا بورنتی* در کارگران مرتبط با حیوانات در کشتارگاه های سطح شهرکرد قرار دادیم.

در سال ۱۹۵۲ میلادی مطالعات سطحی ای که به نظر می رسد نخستین نوع خود در ایران باشد انجام گرفت. بشیری بد[5] و همکاران در سال ۱۹۷۶مطالعات مشابهی انجام دادند. که این مطالعات به ترتیب حاکی حاکی از موارد مثبت آلودگی احشام به کوکسیلا در استان کرمانشاه، در ۷ ٪ از گاوها، ۳/۲ ٪ گوسفندان و ۱/۷ ٪ از بزها در استان لرستان بوده است (۷۳).

با توجه به مالعات گسترده ای که در کشورمان در حال انجام است و با توجه به مطالعات سرولوژیک انجام گرفته, حضور باکتری کوکسیلا بورنتی در مناطق مختلف مورد بررسی قرار گرفته است.

1- Manilla
2- Bacellar
3- Rehacek
4- Kruszewska
5- Bashiribod

مطالعه گسترده ای توسط اسدی و همکاران انجام گرفت که حاکی از شیوع ۱۰۰ ٪ از باکتری کوکسیلا بورنتی دارد. این در حالی است که مطالعات اسدی و همکاران از شیوع سرمی ۲۹/۴۲ ٪ از تب کیو در بین کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه حکایت دارد (۷۴).

از طرفی با وجود عدم اطلاعات کافی کارکنان کشتارگاه ها از تب کیو و همچنین نحوه انتقال آن، هیچ اقدام پیشگیرانه ای درباره پیشگیری کارکنان صورت نمی گیرد. شواهد و مطالعات سرولوژیکی جدی در شرق ایران انجام شده است که نشان از شیوع تب کیو در این مناطق است. به طوری که نمونه سرم این کارکنان در ین مناطق نشان از شیوع بالای آلودگی به بروسلوز و کوکسیلا بورنتی دارد (۷۵).

فصل سوم

"مواد و روش ها"

۳-۱. روش و مراحل نمونه گیری

۳-۱-۱. هدف از نمونه گیری

هدف از تحقیق حاضر جستجوی ژنومی *کوکسیلا بورنتی* عامل بیماری تب کیو به روش واکنش زنجیرهای پلیمراز در سرم کارکنان کشتارگاه های استان چهارمحال و بختیاری است.

۳-۱-۲. جداسازی نمونه

در این بررسی که به مدت یک سال طی سال ۱۳۹۴ در کشتارگاه های شهرستان شهرکرد انجام شد، ۱۰۰ نمونه سرمی از کارکنان کشتارگاه های سطح شهرکرد جداسازی و اطلاعات هر یک طی پرسش نامه ای مجزا تهیه و تنظیم گردید.

پرسش نامه شامل اطلاعات سن, جنس, سابقه ارتباط با احشام و همچنین رسیدگی های بهداشتی از جمله واکسیناسیون می باشد. از هر کدام از کارکنان ۵ سی سی نمونه خون وریدی اخذ و پس از سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، سرم بیمار جداسازی شد. نمونه های جداسازی شده در فریزر ۲۰- درجه تا انجام مراحل بعدی نگهداری شد. جهت بررسی حضور آنتی بادی های ضد *کوکسیلا بورنتی*, نمونه های سرمی با استفاده از آزمایش الیزا مورد بررسی قرار گرفت.

کلیه مراحل جداسازی و تشخیص آنتی بادی IgM با استفاده از کیت Virion/Serion مورد تایید قرار خواهد گرفت. مراحل انجام آزمایش مطابق با دستورالعمل کیت مربوطه انجام گرفت.

با توجه به این که آنتی بادی های IgM غیر اختصاصی (فاکتور روماتوئید) در روال آزمایش مثبت کاذب ایجاد می کنند، باید قبل از تشخیص IgM, این فاکتور حذف شود. محلول جاذب روماتوئید به صورت ۱+۴ رقیق شدند. در مرحله بعد هر کدام از این نمونه ها به صورت ۱+۱۰۰ رقیق شدند. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک های میکروپلیت افزوده شد و پلیت ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید (۷۶).

بعد از شستشو با محلول شستشوی داخل کیت، به مدت ۳۰ دقیقه محلول کنژوگه کیت اضافه گردید. در مرحله بعد محلول سوبسترا اضافه شد و در مرحله آخر محلول متوقف کننده اضافه گردید. جهت قرائت چاهک های میکرو پلیت از دستگاه قرائت کننده الیزا در طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد (۷۷).

در نهایت اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از آمار توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار خواهد گرفت. جهت تایید نهایی از حضور باکتری در نمونه های واجد آنتی بادی ضد *کوکسیلا بورنتی*, از آزمون PCR استفاده گردید. جهت استخراج DNA از کیت استخراج سیناژن ساخت ایران استفاده شد و تمام مراحل کار مطابق با کیت مربوطه انجام گرفت. پرایمر های مورد استفاده جهت تشخیص نهایی *کوکسیلا بورنتی* در جدول (۱-۳) ارائه شده است (۷۸).

جدول (۱-۳): توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت جهت ردیابی ژن های OMP

پرایمر ها	توالی پرایمرها	اندازه قطعه(bp)
مرحله اول OMP1 OMP2	AGTAGAAGCATCCCAAGCATTG TGCCTGCTAGCTGTAACGATTG	۵۰۱
مرحله دوم OMP3 OMP4	GAAGCGCAACAAGAAGAACAC TTGGAAGTTATCACGCAGTTG	۴۳۸

نتایج بررسی الکتروفورز محصولات مرحله ی دوم PCR در ژل آگاروز ارائه شد. نتایج نهایی در نهایت با نرم افزار های آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار خواهد گرفت.

۳-۱-۳. اصول جداسازی نمونه خون

سرم یا پلاسما باید در کوتاه ترین زمان به دنبال نمونه گیری از سلول های خونی جدا گردد. حداکثر زمان مجاز جهت جداسازی سرم یا پلاسما ۲ ساعت پس از نمونه گیری پیشنهاد می گردد. قابل ذکر است که درخصوص اندازه گیری ترکیباتی نظیر پتاسیم، هورمون های کورتیکواستروئیدی، کورتیزول، کاتکولامین ها،

اسید لاکتیک و هموسیستین این زمان باید کمتر از ۲ ساعت باشد. قابل ذکر است که درجه حرارت محیط نیز بر پایداری برخی مواد تاثیر می گذارد.

نکته: قرار دادن نمونه خون بیش از دو ساعت در سرما سبب افزایش کاذب پتاسیم می گردد. سرما سبب مهار گلیکولیز شده، لذا انرژی جهت پمپ پتاسیم به داخل سلول ایجاد نمی گردد و به دنبال آن پتاسیم از سلول ها به بیرون نشت می کند. نمونه جهت اندازه گیری الکترولیت ها نیز نباید تا قبل از سانتریفیوژ و انجام آزمایش در دمای ^{o}2-8 C قرار گیرد (۷۹).

۳-۱-۴. انتقال

انتقال نمونه های بیولوژیک نظیر خون، ادرار و سایر مایعات بدن از محل نمونه گیری به آزمایشگاه جزء مهمی از چرخه کاری در آزمایشگاه می باشد. در مورد نمونه های خون روند انتقال ۱/۳ زمان چرخه کاری را شامل می شود (۷۹).

۳-۱-۴. آشنایی با سیستم الیزا ریدر[1]

الایزا ریدر یا خوانشگر الایزا که به اسامی میکرو پلیت ریدر و خوانشگر میکروپلیت فتومتریک نیز معروف است، یک اسپکتروفتومتر تخصصی بوده که به منظور قرائت نتایج تست الیزا طراحی شده است. این وسیله به منظور تعیین حضور آنتی بادی ها یا آنتی‌ژن های اختصاصی در نمونه ها به کار می‌رود. این تکنیک بر اساس تشخیص یک آنتی‌ژن یا آنتی بادی ها روی یک سطح جامد به صورت مستقیم یا ثانویه به کمک آنتی بادی های نشاندار و ایجاد محصولاتی استوار است که می‌توانند توسط اسپکتروفتومتر خوانده شوند. واژه الایزا ELISA ، اختصاری از کلمات Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay است (۷۹).

1- ELIZA

۳-۱-۵. کاربرد میکروپلیت ریدر

میکروپلیت ریدر برای خواندن نتایج تست‌های الایزا مورد استفاده قرار می گیرد. این تکنیک کاربردی مستقیم در ایمونولوژی و سرولوژی دارد. از میان کاربردهای دیگر این وسیله به تایید حضور آنتی بادی ها یا آنتی‌ژن‌های یک عامل عفونی در یک ارگانیزم، آنتی بادی های یک واکسن یا اتوآنتی بادی ها برای مثال در آرتریت روماتوئید می توان اشاره کرد (۷۹).

۳-۱-۶. اصول کار

الایزا ریدر یک اسپکتروفتومتر اختصاصی است. بر خلاف اسپکتروفتومترهای معمولی که قرائت جذب نوری را در گستره وسیعی از طول موج ها تسهیل می کنند ، الایزا ریدر دارای فیلترها یا گریتینگ های انکساری بوده که گستره طول موج ها را محدود کرده و معمولا بین ۴۰۰ تا ۷۵۰ نانومتر عمل می کنند. برخی از الایزا ریدرها در گستره ماوراء بنفش عمل کرده و قرائت را در محدوده ۳۴۰ تا ۷۰۰ نانومتر انجام می دهند. سیستم نوری موجود در این دستگاه ها توسط تعدادی از کارخانه ها با استفاده از فیبرهای نوری به منظور تامین نور جهت چاهک های حاوی نمونه در میکرو پلیت طراحی می شود. ابتدا یک شعاع نوری از نمونه ای که دارای قطری بین ۱ تا ۳ میلی متر است عبور کرده و سپس یک سیستم آشکار کننده، نور عبوری از نمونه را آشکار و تقویت می کند. در مرحله بعد، سیگنال مربوط به جذب نوری نمونه‌ها ثبت شده و سیستم خوانشگر نیز آن را به اطلاعاتی تبدیل می کند که سبب تفسیر نتایج تست می شوند. برخی از الایزا ریدرها با استفاده از سیستم های شعاعی نوری دوتایی کار می کنند (۸۰).

نمونه های مورد آزمایش در پلیت هایی که به این منظور طراحی شده اند و دارای تعداد خاصی چاهک هستند، قرار می گیرند. پلیت های ۸ ستونی همراه با ۱۲ ردیف که در مجموع ۹۶ چاهک را تشکیل می دهند، رایج تر از بقیه هستند. برای کاربرد های اختصاصی تر، تعداد چاهک ها افزایش می یابد که در برخی موارد تا ÷لیت های ۳۸۴ چاهکی را نیز شامل می شود. افزایش تعداد چاهک ها به منظور کاهش مقدار

مصرف معرف ها و نمونه ها است. موقعیت سنسور نوری الایزا ریدر بر اساس نوع کارخانه سازنده متغییر است، به طوری که در برخی موارد ممکن است در بالای پلیت حاوی نمونه و گاهی نیز مستقیما در زیر پلیت قرار گیرد. امروزه میکرو پلیت ریدرها دارای کنترل هایی هستند که به وسیله میکروپروسسورها[1] تنظیم شده اند (۸۱).

۳-۱-۷. وسایل لازم جهت انجام تکنیک الایزا

جهت انجام آزمایش الایزا تجهیزات زیر مورد نیاز است:

۱- الایزا ریدر

۲- میکرو پلیت واشر (شستشو دهنده چاهک ها)

۳- سیستم توزیع کننده مایع (در این مورد ممکن است از پیپت ها چند کاناله استفاده شود)

۴- انکوباتور

۳-۱-۸. تجهیزات مورد نیاز در انجام تست های الایزا

مراحل مکانیکی انجام تکنیک الایزا

یک تست الیزا به طور رایج شامل مراحل زیر است:

۱- شستشوی اولیه پلیت که ممکن است با استفاده از میکرو پلیت واشر انجام شود.

۲- استفاده از یک توزیع کننده مایع یا پیپت چند کاناله.

۳- پلیت در انکوباتور قرار داده می شود که دارای دمای کنترل شده بوده و واکنش ها در آن محل انجام می شوند.

1- Microprocessor

بسته به نوع تست، مراحل ۱، ۲ و ۳ ممکن است چـنـدین بار تکرار شوند تا این که معرف های اضافه شده، واکنش ها را کامل کنند. سـرانـجـام وقـتـی تـمـام مـراحـل انـکوباسیون کامل شد، پلیت به الایزا ریدر منتقل شده و سپس بـا قـرائـت جـذب نـوری نمونه ها، نتیجه آن ها مشخص می شود (۸۰).

۳-۱-۹. مراحل بیوشیمیایی تکنیک الیزا

۱- چاهک های موجود در پلیت با آنتی بادی و انتی ژن ها پـوشـیـده[1] می‌شوند.

۲- نمونه ها ، کنترل ها و استاندارد ها به چاهک ها اضافه شده و در دمای اتاق یا ۳۷ درجه سـانتیگـراد بـرای یـک مـدت زمـانی معین ، طبق دستـورالعمـل تست انکوبه می شوند. در طول انکـوباسیون، بسته به حضور یا عدم حضور و مقدار آنتی ژن یا آنتی بادی موجود در نمونه، آنتی ژن نمونه به آنتی بادی کوت شده به پلیت یا آنتی بادی موجود در نمونه به آنتی ژن (Coat) شده در پلیت باند می شود (۸۱).

۳- پس از انکوباسیون، آنتی ژن ها یا آنتی بادی های آزاد، شستشـو داده شـده و بـا اسـتـفـاده از میکروپلیت واشر و یک بافر شستشوی مناسب، برداشته می شوند.

۴- در مرحله بعد ، یک آنتی بادی ثانویه به نام کونژوگه اضافه شده که حاوی آنزیمی است که به منظور ایجاد یک تغییر رنگی ، با یک سوبسترا واکنش خواهد داد.

۵- سپس یک دوره زمانی ثانویه از انکوباسیون شروع می شـود که در طی آن ، کونژوگه با کمپلکس آنتی ژن- آنتی بادی در چاهک ها پیوند برقرار خواهد کرد.

۶- پس از انکوباسیون ، یک دوره شستشوی جدید انجام می شود که سبب برداشت کونژوگه متصل نشده از چاهک ها خواهد شد.

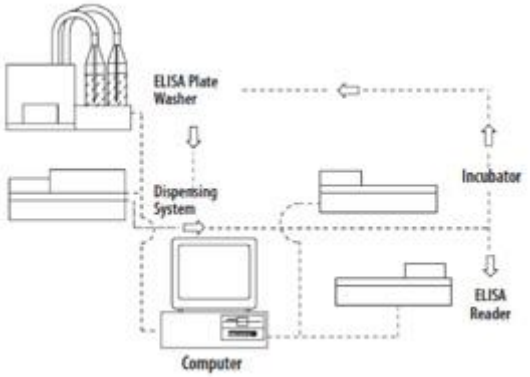
1- Coat

۷- در مرحله بعد ، سوبسترا اضافه می شود. آنـزیـم بـا سـوبستـرا واکنش خواهد داد و سبب تغییر رنگ محلول خواهد شد. این واکنش نشان خواهد داد که چه مقدار کمپلکس آنتی‌ژن- آنتی بادی در پایان تست وجود خواهد داشت.

۸- وقتی که زمان انکوباسیون کامل می شود، یک معرف برای توقف واکنش آنزیم- سوبسترا به آن اضافه شده که از تغییرات بیشتر در شدت رنگ ایجاد شده، جلوگیری می‌کند. این معرف عموما یک اسید رقیق است.

۹- در پایان، پلیت بوسیله الایزا ریدر خوانده می شود. نتایج حاصله برای تعیین مقادیر اختصاصی یا حضور آنتی ژن ها یا آنتی بادی ها در نمونه به کار برده می شوند.

تـوجـه: بـرخـی از چـاهـک هـا بـرای استـانـدارددهـا و کنتـرل هـا استفـاده مـی شـونـد. استانداردها برای تعریف نقاط cut-off به کار برده می شوند. استانداردها و کنترل ها مـقـادیر معینی هستند و برای اندازه گیری نتایج تست و ارزیابی اطلاعات در مقابل غلظت‌های مشخصی برای هر کنترل به کار برده می شوند. فرایند توصیف شده در بالا عمومی است؛ اگرچه بسیاری از تست های الایزا وجود دارند که همراه با مراحل یا متغیرهای اختصاصی هستند (۸۲).



۳-۱-۱۰. نکات لازم در استفاده از الیزا

به منظور عملکرد صحیح الایزا ریدر ، نکات زیر لازم است تا رعایت شود:

۱- یک محیط تمیز و عاری از گرد و غبار.

۲- یک میز کار ثابت و به دور از تجهیزاتی از قبیل سانتریفوژ، شیکر و ... که سبب لرزش آن می شوند. این میز باید دارای اندازه مناسبی باشد، به طوری که در کنار الایزا ریدر ، فضای کاری مناسبی وجود داشته باشد. تجهیزات تکمیلی مورد نیاز برای انجام تکنیک توصیفی بالا عبارتند از: واشر، انکوباتور، دیسپنسر و کامپیوتر همراه با وسایل جانبی آن.

۳- یک منبع تغذیه الکتریکی که سازگار با استانداردها و معیارهای کشور باشد. در کشورهای آمریکایی به طور مثال ، عموماً فرکانس های ۶۰ هرتز و ۱۱۰ ولت استفاده می‌شود، در حالی که در نواحی دیگر از جهان ۲۲۰ تا ۲۴۰ ولت و ۵۰ تا ۶۰ هرتز به کار برده می شود (۸۲).

۳-۱-۱۱. کالیبراسیون الایزا ریدر

کالیبراسیون الایزا ریدر یک مرحله اختصاصی است که باید توسط یک تکنسین یا مهندس آموزش دیده که به دستورالعمل های سازنده دستگاه آشنایی دارد، انجام شود. بـرای انجـام کالیبراسیون، داشتن یک مجموعه از فیلترها که از لحاظ اندازه، یکسان هستند، الزامی است. سازندگان این دستگاه ها، پلیت های کالیبراسیون را برای هر طول موجی که دستگاه به کار می برد فراهم می کنند.

پلیت های کالیبراسیون مجهز به حداقل سه مقدار جذب نوری از قبل تعیین شده (پایین، متوسط و مقدار بالا) در دامنه اندازه گیری هستند (۸۳).

برای انجام کالیبراسیون مراحل زیر را باید دنبال کرد:

۱- پلیت کالیبراسیون را روی دستگاه قرار دهید.

۲- یـک خـوانـش کـامـل را بـا پلیـت کـالیبراسیون انجام دهید. مشخص کنید که آیا تفاوت‌هایی در قرائت های به دست آمده از یک چاهک به چاهک دیگر وجود دارد یا خیر. چنانچه اختلافی مشاهده شد، پلیت را به اندازه ۱۸۰ درجه چرخانده و قرائت را مجددا تکرار کنید تا از اختلافاتی که به خود پلیت نسبت

داده می شوند، جلوگیری کنید. به طور کلی، اگر نتایج پلیت در دو طول موج به میزانی باشد که انتظار داریم، گفته می‌شود که دستگاه به کالیبراسیون دیگری احتیاج ندارد.

۳- تأیید کنید آیا خوانشگر به کالیبراسیون احتیاج دارد یا خیر. چنانچه به کالیبراسیون احتیاج دارد، راهنمایی های رایج کارخانه سازنده دستگاه را برای کالیبراسیون دنبال کنید. تأیید کنید که خطی بودن (linearity) خوانشگر تا حد امکان قابل قبول است.

۴- اگر دستگاه حاوی یک پلیت کالیبراسیون نیست، یک محلول رنگی را در چاهک های یک پلیت از آن ریخته و فوری نتایج را قرائت کنید. سپس پلیت را به اندازه ۱۸۰ درجه چرخانده و دوباره قرائت را انجام دهید. اگر هر دو خوانش ها و میانگین مقادیر در هر ردیف یکسان هستند، خوانشگر کالیبر است.

۵- تایید کنید که خوانشگر به صورت ستون به ستون نیز کالیبر است. یک پلیت تمیز و خالی را در محل مخصوص قرار دهید و قرائت را انجام دهید. اگر اختلافی بین هر یک از خوانش های میانگین از اولین تا آخرین ستون وجود ندارد، می توان فرض را بر این گذاشت که خوانشگر کالیبر است (۸۴).

۳-۱-۱۲. حفظ و نگهداری رایج

الف) نگهداری اساسی(تکرار به صورت روزانه)

۱- مروز اینکه سنسورهای نوری هر کانال تمیز هستند. چنانچه کثیف هستند، سطح پنجره های عبور دهنده نور و سنسورها را با یک برس کوچک تمیز کنید.

۲- تأیید کنید که سیستم نوری تمیز است.

۳- تأیید کنید که کالیبراسیون خوانشگر کافی است. وقتی کارهای روزانه شروع می شود، اجازه دهید تا خوانشگر برای مدت ۳۰ دقیقه گرم شود. در مرحله بعد ، قرائت Blank را انجام دهید و سپس یک

پـلیت کامل از سوبسترا را قـرائـت کـنـیـد. خـوانـش هـا مـی بـایـست یکسان بـاشند. اگر این طور نبود، پلیت را چرخانده و قرائت را به منظور تعیین این که آیا اختلاف در پلیت یا در خوانشگر است، تکرار کنید.

۴- سیستم کشنده اتوماتیک اسلایدها(Automatic drawer sliding system) را بـــررســی کنید که باید نرم و ثابت باشد (۸۵).

ب) نـــگـــهـــداری بـــازدارنـــده (تـــکـــرار هـــر سه ماه یکبار)

۱- پایداری لامپ را تایید کنید. پلیت کالیبراسیون را به کار برده، قرائت را با فاصله ۳۰ دقیقه مجدداً با همان پلیت انجام دهید. قرائت ها را مقایسه کنید که هیچ تفاوتی نباید میان آن ها مشاهده شود.

۲- سیستم نوری دتکتور و سیستم های نوری را تمیز کنید.

۳- کشنده پلیت (Plate drawer) را تمیز کنید.

۴- مکان قرار گیری هر چاهک را با استفاده از سـیـسـتـم هـای انتشار نور و آشکارکننده تأیید کنید (۸۶).

۳-۲. استخراج ژنوم DNA

استخراج DNA با استفاده از کیت سیناژن انجام گردید. از این کیت بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در آن ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه سرم را با ۴۰۰ میکرو لیتر از محلول لیز کننده مخلوط کرده و برای ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس شد. در این مرحله نمونه به طور کامل به صورت محلول یک دست در آمد. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرو لیتر از محلول رسوب دهنده را به مخلوط اضافه کرده و به وسیله حرکت دورانی به مدت ۳ تا ۵ ثانیه مخلوط شد و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد برای ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس در دور ۱۲۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و به آرامی با وارونه کردن لوله و قرار دادن آن بر روی کاغذ برای ۲ الی ۳ ثانیه آن را خالی کرده و یک میلی لیتر بافر شستشو به رسوب حاصل اضافه و برای ۳-۵ ثانیه

با چرخاندن مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد، سپس بافر شستشو را به طور کامل خالی کرده و برای ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا خشک شود (۸۷).

ماده ته نشین در ۳۰ میکرولیتر از بافر حل کننده به وسیله تکان دادن آرام و قرار دادن در ۶۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۵ دقیقه به طور کامل حل شد. مواد غیر محلول با سانتریفیوژ به مدت ۳۰ ثانیه در دور ۱۲۰۰۰ ته نشین شد. ماده شناور رویی حاوی DNA خالص است. غلظت DNA با اسپکتروفتومتری یا بعد از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱ درصد به صورت دیداری اندازه گیری شد (۸۸).

۳-۲-۱. روش استخراج با جوشاندن (جهت تایید)

۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و بخش رویی دور ریخته شد. ماده باقیمانده در آب مقطر قرار داده شده و در دور ۱۵۰۰۰ برای ده دقیقه دیگر سانتریفیوژ شد. دوباره مایع رویی دور ریخته شد و ماده باقیمانده در ۴۰ میکرولیتر از آب مقطر قرار داده شده در بن ماری در صد درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شده و روی یخ سرد شد و سپس در دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ شده و در دمای ۲۰ - درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۸۹).

۳-۳. واکنش زنجیره ای پلیمراز

یکی از مهم ترین پیشرفت ها در دو دههء اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی بویژه در کاربردهای تشخیصی، واکنش زنجیرهء پلیمراز Polymerase Chain Reaction (PCR) می باشد، که علاوه بر افزایش سرعت آزمون های وابسته به DNA، در اکثر موارد موجب افزایش حساسیت اینگونه آزمایش ها گردیده است.PCR به یک روش ازدیاد مقادیر جزیی DNA یا RNA تا حد مشاهده آنها توسط روش های ساده و رایج آزمایشگاهی اطلاق می گردد (۹۰).

هر چرخه PCR شامل سه مرحله می باشد:

۱- مرحله تقلیب یا تغییر ماهیت (Denaturation Step) :

در این مرحله مولکول های دو رشته ای DNA بوسیله حرارت بالا (حدود ۹۴ درجه سانتی گراد) از هم دیگر جدا گردیده و به مولکول های تک رشته ای تبدیل می شوند.

۲- مرحله پیوند زنی (Annealing or Hybridization Step) :

در این مرحله کاهش دمای واکنش صورت می گیرد تا اینکه پرایمرها بتوانند به مولکول های DNA تک رشته ای پیوند زده شوند. درجه حرارت مورد استفاده برای این مرحله می تواند از ۳۰ درجه سانتیگراد تا ۷۲ درجه سانتیگراد متغیر باشد.

۳- مرحله توسعه (Extension Step) :

در این مرحله آنزیم Taq پلیمراز (DNA پلیمراز) پرایمرها را در روی DNA تک رشته ای امتداد می دهد تا DNA دو رشته ای جدید بسازد. درجه حرارت لازم برای این مرحله ۷۲ درجه سانتی گراد می باشد.

پیشرفت های دو دههء اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی موجب ارتقاء کارآیی و تکامل هر چه بیشتر آزمایش های وابسته به DNA در علوم بالینی گردیده است. استفاده از مارکرهای غیر رادیواکتیو و اولیگونوکلئوتیدهای مکمل با ژن ها و یا مترادف های ویژه بازهای آلی در DNA از جمله پیشرفت های مؤثر در بهبود و بکارگیری روز افزون تست های وابسته به DNA در طیف تشخیص بالینی محسوب می شود. یکی از مهم ترین پیشرفت ها در زمینه بیولوژی مولکولی که در عین حال کاربرد تشخیصی نیز دارد (PCR Polymerase Chain Reaction) می باشد که علاوه بر سریع نمودن آزمایش های وابسته به DNA در موارد متعدد موجب افزایش حساسیت این گونه آزمایش ها گردیده است.

با توجه به پیشرفت روزافزون علوم پزشکی در جهان امروز و استفاده وسیع از PCR بعنوان یک روش حساس، سریع و دقیق تشخیصی در آزمایشگاه های بالینی، در این گفتار سعی شده است تا PCR و

مکانیسم آن به زبانی ساده و بطور اجمالی بیان شود تا پزشکان و متخصصینی که در عرصه های آزمایشگاهی از نزدیک با این تکنیک بسیار مفید کار نکرده اند با چگونگی عملکرد آن آشنایی پیدا کنند. ذکر این نکته ضروری است که راه اندازی این روش و یا روش های مشابه در زمینه بیولوژی مولکولی و بهره وری از آنها در مراکز آزمایشگاهی و تحقیقاتی، منجر به حصول نتایج چشمگیر و سودمند در زمینه تشخیص آزمایشگاهی و همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک خواهد شد (۹۱).

به طور کلی به روش ازدیاد مقادیر جزیی DNA یا RNA (ازدیاد RNA با روش RT-PCR امکان پذیر است) تا حد مشاهده ی آنها توسط روش های ساده و رایج آزمایشگاهی اطلاق می شود. قابلیت PCR در ازدیاد اسید های نوکلئیک موجود در نمونه مورد آزمایش موجب شناسایی سریع و اختصاصی نوع سلول یا میکروارگانیسم مورد نظر در نمونه مذکور می گردد که این ویژگی علاوه بر بکارگیری PCR در تشخیص آزمایشگاهی بیماری ها شناسایی انواع سلول ها، آنرا به عنوان ابزاری مطمئن و حساس در زمینه پژوهش های علمی مطرح می سازد (۹۲).

از زمان معرفی PCR در سال ۱۹۸۵، بکارگیری آن در تحقیقات بیولوژیکی پایه و کاربردی موجب ایجاد تغییرات اساسی گردیده است. PCR یکی از جدیدترین تکنولوژی های آزمایشگاهی است که در تشخیص بیماری های عفونی، پزشکی قانونی و ناهنجاری های ژنتیکی مورد استفاده و توجه قرار گرفته است. در خصوص کارآیی این روش در تشخیص به عنوان مثال می توان تقلیل مدت زمان تشخیص آزمایشگاهی اختصاصی باسیل سل در نمونه های کلینیکی را از ۷-۶ هفته به ۷-۶ ساعت حتی با وجود تعداد اندک باسیل در نمونهء آزمایشگاهی ذکر کرد. از نکات جالب توجه دیگر این که با استفاده از تکنیک حساس PCR ، DNA میکروارگانیسم هایی نظیر باسیل جذام و باسیل سل از نمونه های باستانی با قدمت بیش از ۱۰۰۰ سال شناسایی و جدا گردیده است که نتایج حاصله گامی مهم در راه شناخت و مطالعه بیش از پیش تاریخچه علم پزشکی بوده ضمن آنکه این موفقیت توانسته است راهگشای ایجاد شاخه های دیگری از علوم باشد (۹۳).

۳-۳-۱. انواع PCR

بمنظور نتیجه گیری بهتر، غیر از PCR معمولی روش های جدیدی از PCR ارائه شده است که به صورت اجمالی به برخی از آنها اشاره می شود.

۱- آر تی _ پی سی آر (RT-PCR)[1]

الگوی اولیه در RT-PCR، مولکول RNA تک زنجیره ای است. از آنجائیکه DNA پلیمراز قادر به استفاده از RNA بعنوان الگو نمی باشد، مرحله دیگری به PCR اضافه شده است. طی این مرحله، با استفاده از آنزیم رورس ترانس کریپتاز (Reverse Transcriptase (RT، از الگوی RNA، مکمل آن CDNA[2] سنتز می شود و بوسیله تکنیک PCR تکثیر می یابد. به منظور تعیین گونه و حساسیت دارویی در ویروس شناسی و مایکوباکتریولوژی، از این روش برای تکثیر RNA ریبوزومی استفاده می شود.

۲- نستد – پی سی آر (Nested-PCR)

در این روش به منظور افزایش حساسیت PCR از دو جفت پرایمر استفاده می شود. ابتدا با یک جفت پرایمر اول در طول ۳۰-۱۵ چرخه، قطعات مشخصی از DNA هدف تکثیر می یابند. سپس محصول PCR حاصل به لوله دیگری منتقل شده و بعنوان الگو استفاده می شود و بوسیله جفت پرایمرهای دوم مرحله دوم PCR انجام می شود (۹۴).

۳ - مالتیپلکس – پی سی آر (Multiplex-PCR)

در این روش از چند جفت پرایمر اختصاصی برای هدف های مختلف استفاده می شود. در میکروب شناسی بالینی، با استفاده از این روش امکان شناسایی چندین عامل بیماری در یک نمونه بطور همزمان وجود دارد و می توان عفونت های مخلوط را تشخیص داد (۹۴).

1- Reverse Transcriptase-PCR
2- complementary DNA

۴-آرمز – پی سی آر (ARMS-PCR)[1]

روش آرمز _ پی سی آر (ARMS-PCR) برای تشخیص موتاسیون های نقطه ای بکار می رود و از دو جفت پرایمر استفاده می شود. در این روش، واکنش در دو لوله جداگانه انجام می شود که یکی از آنها حاوی پرایمرهای نوع موتاسیون یافته و دیگری حاوی پرایمرهای نوع معمولی است. چنانچه تکثیر در لوله حاوی پرایمر موتاسیون یافته انجام شود، در DNA هدف، موتاسیون اتفاق افتاده است و تکثیر در لوله حاوی پرایمر معمولی، نشان دهنده آن است که موتاسیونی اتفاق نیفتاده است. از این متد می توان در تشخیص موتاسیون های مولد مقاومت دارویی در باکتری‌ها استفاده کرد (۹۴).

۳-۳-۱ مراحل انجام Nested PCR

پس از سانتریفوژ به منظور ردیابی کوکسیلا بورنتی در نمونه ها با استفاده از کیت استخراج DNA جهت جدا کردن نمونه ها و جداسازی چربی، استفاده می شود. تا زمان انجام آزمایش رسوب حاصل در فریز ۲۰ - درجه سانتی گراد نگهداری خواهد.

برای بررسی ژنومی ژنومی کوکسیلا بورنتی در نمونه ها، از واکنش زنجیر های پلی مراز Nested PCR استفاده می شود. مرحله اول، غلظت بهینه مواد به کار رفته درواکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت زیر استفاده می شود (۹۵).

۲/۵ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر از DNA الگو، ۱/۵ میلی مولار MgCl2، ا میکرو مول از هر پرایمر (OMP2 و OMP1).

برای رقیق سازی پرایمرهای ۱۰ میکرولیتر از هر پرایمر با ۹۰ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط کردیم. ۰/۳ واحد آنزیم از DNA پلی مراز Taq و ۱ میکرلیتر از dNTPs Mix همه مواد را به میکروتیوب منتقل و میکروتیوب ها را در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار دادیم و برنامه دمایی به صورت ۹۴ درجه سانتی گراد ۳ دقیقه، ۳۰چرخه دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت

1- Amplification Refractory Mutation System-PCR

۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در ادامه مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه تنظیم گردید.

برای PCR مرحله دوم از پرایمرهای PCR برای OMP3-OMP4 استفاده شد. در این مرحله همه شرایط از قبیل مخلوط واکنشگر های PCR و برنامه زمانی و دمایی مطابق مرحله اول اجرا شد. حاصل از واکنش مرحله دوم PCR در ژل آگارز ۱ ٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و با دستگاه ژل داک مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت.

در این بررسی، کنترل مثبت در DNA ژنومی کوکسیلا بورنتی استاندارد ۳۱۵۴

(Genekam Biotechnology AG, Duisburg, Germany Serial Number) در نظر گرفته شد. کنترل منفی شامل مخلوط کلیه واکنش گرهای مورد تجزیه بدون DNA در نظر گرفته شد. سپس داده های حاصل به کمک نرم افزار تحلیل آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۹۶).

۳-۴. الکتروفورز

یکی از پرکاربردترین تکنیک ها در بیولوژی مولکولی الکتروفورز نام دارد که اساس آن بسیار ساده است. لغت فورز به معنای حرکت و تحرک است و الکتروفورز در واقع حرکت ذرات تحت تأثیر میدان الکتریکی را گویند. در این تکنیک مولکول های DNA براساس بار و وزن مولکولی آنها جدا می شوند (۹۴).

۳-۴-۱. الکتروفورز DNA روز ژل آگارز

دستگاه الکتروفورز شامل یک محیط خلاء، یک الکترود منفی و یک الکترود مثبت در دو طرف ذره باردار می باشد. اسیدهای نوکلئیک دارای بار الکتریکی هستند. گروه های فسفات روی اسیدهای نوکلئیک دارای بار منفی هستند. بنابراین رشته DNA دارای بار الکتریکی منفی می باشد. وقتی کلید باز است یا به عبارتی جریان الکتریکی قطع می باشد ذره مورد نظر در میدان الکتریکی ثابت است و زمانی که کلید بسته است یا

به عبارتی جریان الکتریکی وصل باشد ذره مورد نظر به تنهایی و با سرعت شتابدار تا رسیدن به الکترود مثبت حرکت کرده و برقراری جریان الکتریکی در تانک الکتروفورز همواره از الکترود منفی به سمت الکترود مثبت است. البته این مطلب در مورد رشته DNA که دارای بارالکتریکی منفی است صادق است (۹۷).

تحرک الکتریکی معیار اصلی سنجش در جداسازی مولکول هاست. وجود ضریب اصطکاک f یک عامل مقاوم برای تحرک است. درحالی که وجود بار باعث زودتر رسیدن ذره به قطب است. هرچه ذره بزرگتر باشد و شکل آن از حالت کروی دور باشد ضریب اصطکاک f بیشتری داشته و تحرک الکتریکی کمتری داراست. در واقع تحرک الکتریکی هر ذره وابسته به شکل و اندازه ذره و بار ذره است و ضریب اصطکاک نیز کمیتی است که ارتباط مستقیم با اندازه و شکل ذرات دارد هرچه ذره به شکل کروی نزدیکتر باشد ضریب اصطکاک کمتری دارند (۹۸).

۳-۴-۲. وسایل موردنیاز در الکتروفورز

۱. دستکش
۲. کست (cast) و کمب (comb)
۳. ترازو (Balance)
۴. سمپلر
۵. ماکروویو
۶. تانک الکتروفورز
۷. Power supply (جهت برقراری جریان الکتریکی در تانک الکتروفورز)
۸. دستگاه عکسبرداری Gel Doc

مواد موردنیاز:

۱. پودر آگارز
۲. EtBr: اتیدیوم برماید (ماده ای بسیار سمی و موتاژن قوی است)
۳. TBE 1x
۴. Loading Buffer
۵. Marker
۶. آب مقطر

۳-۴-۳. ژل آگارز

یک ژل پایدار است و قطر روزنه های آن بسیار بزرگ است و برای جداسازی ماکرومولکول ها و سوپر مولکول ها استفاده می شود. از ژل آگارز در الکتروفورز هم به صورت عمودی و هم به صورت افقی استفاده میشود. این ژل را در درصدهای مختلف تهیه می کنند که این مطلب به اندازه قطعه موردنظر بستگی دارد. یعنی هر چه اندازهٔ قطعه مورد نظر بزرگ تر باشد غلظت ژل کاهش می یابد و برحسب اندازه قطعه ژل آگارز را در cast 60 cc, cast 30 cc تهیه می کنند. بطور مثال: برای قطعه ای با میزان ۱۰۰ bp از ژل آگارز ۲/۵ ٪ استفاده می کنیم. کمترین درصد ژل آگارز در حدود ۰/۶ ٪ می باشد (۹۸).

روش کار

۱. پودر آگارز را وزن کرده و درون بشر یا ارلن بریزید.

۲. TBE lox را که در دسترس است توسط آب مقطر به نسبت ۱۰:۱ رقیق کرده و بدین طریق lx TBE را بسازید.

۳. کمب (Comb) را بر روی کست (Cast) موردنظر قرار دهید و فاصله بین Cast , Comb را ۱mm درنظر گرفته وب راساس این فاصله جایگاه comb بر روی cast را تنظیم کنید.

۴. TBE lx را براساس حجم موردنظر توسط استوانه مدرج داخل ارلن یا بشر ریته و به آهستگی تکان دهید.

۵. محلول داخل ارلن را در داخل ماکروویو قرار داده یا بجوشانید بطوری که ذرات، آگار داخل آن کاملاً حل شده و ذره ای داخل آن نباشد و محلول یکنواخت گردد. و سپس محلول موردنظر را سرد کنید.

۶. به محلول درون بشر در حدود (۱-۲m) از اتیدیوم بروماید توسط سمپلر اضافه کنید.

۷. محلول را تکان دهید تا اتیدیوم بروماید کاملاً در آن حل شده و محلول یکنواخت گردد.

۸. محلول درون بشر را به آرامی درون cast ریخته و در حدود min20 صبر کنید تا ژل آگارز بسته شود.

۹. ژل را به همراه cast داخل تانک الکتروفورز قرار دهید و جای آن را ثابت کنید و سپس تانک را تا کمی بالاتر از ژل توسط TBE lx پر کنید (۹۸).

۳-۴-۴. طریقه ران کردن (Running Procedure)

۱. به تیوبهای حاوی نمونه به ازاء هر ۵ ml از نمونه موردنظر در حدود ۱ ml از Loading Buffer به آن اضافه کرده و خوب Pipeting کنید.

۲. بوسیله سمپلر محتویات درون هر tube را داخل چاهک از سمت چپ به راست از ژل run کنید و در آخرین چاهک نیز مارکر را ران کنید.

۳. جریان الکتریکی در حدود ۱۲۰ ولت به تانک وصل کنید تا محلول run شده از چاهک ها خارج شود و سپس ولتاژ را پائین آورید و در ولتاژ حدوداً بین ۸۰ تا ۹۰ ولت قرار دهید.

۴. پس از حدوداً ۴۵ دقیقه ژل را از تانک خارج کنید و سپس از کست (cast) تیر خارج کرده و در داخل دستگاه Gel Doc قرار دهید.

۵. پس از قراردادن ژل در داخل دستگاه عکس ژل را بگیرید.

فصل چهارم

"نتایج"

۴-۱. نتایج

در این بررسی که به مدت یک سال طی سال ۱۳۹۴ در کشتارگاه های شهرستان شهرکرد انجام شد، ۱۰۰ نمونه سرمی از کارکنان کشتارگاه های سطح شهرکرد جداسازی و اطلاعات هر یک طی پرسش نامه ای مجزا تهیه و تنظیم گردید. از هر کدام از کارکنان ۵ سی سی نمونه خون وریدی اخذ و پس از سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، سرم بیمار جداسازی شد.

در این مطالعه مقطعی-توصیفی همه شرکت کنندگان مورد مطالعه در کشتارگاه های شهرکرد و مرد بودند. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین کارکنان مورد مطالعه در بازه سنی ۳۰-۲۰ سال بودند. از این میزان بیشترین میزان آلودگی در کارکنان با همین میزان سن گزارش گردید. جدول (۱-۴) مربوط به فراوانی سن کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه ارائه شده است.

جدول (۱-۴) فراوانی عفونت کوکسیلا بر اساس سن کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه

سن (سال)	تعداد کل	تعداد موارد مثبت	درصد موارد مثبت
۳۰-۲۰	۵۰	۲۳	٪ ۲۳
۴۰-۳۱	۳۵	۱۰	٪ ۱۰
۵۰-۴۱	۱۵	۰	۰

پرسش نامه شامل اطلاعات سن, جنس, سابقه ارتباط با احشام و همچنین رسیدگی های بهداشتی از جمله واکسیناسیون می باشد.

بر ارسال پرسشنامه های مورد بررسی تنها ۲۳ ٪ از کارکنان مورد واکسیناسیون قرار گرفته بودند. براین اساس اقدامات لازم جهت پیشگیری از ابتلا کارکنان و همچنین در نظر گرفتن واکسیناسیون اقدامی اساسی به نظر می رسد.

طبق بررسی های انجام شده در این پژوهش، بیشترین ابتلا در کارکنان با میزان سابقه کار بین ۱۰-۶ سال سابقه کار بوده است. جدول مربوط به فراوانی عفونت *کوکسیلا بورنتی* در کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه بر اساس سابقه کار در زیر ارائه شده است.

جدول (۲-۴) فراوانی عفونت *کوکسیلا* بر اساس سابقه کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه

سابقه کار (سال)	تعداد کل	تعداد موارد مثبت	درصد موارد مثبت
۱-۵	۹	۲	٪ ۲
۶-۱۰	۴۵	۳۵	٪ ۲۵
۱۱-۲۰	۲۵	۶	٪ ۶
<۲۰	۲۱	۰	۰

از بین نمونه های سرم مورد مطالعه، تنها ۱۲ نمونه سرم (۱۲ ٪) از نظر حضور آنتی بادی Igm مثبت بودند. با توجه به این که آنتی بادی های IgM غیر اختصاصی (فاکتور روماتوئید) در روال آزمایش مثبت کاذب ایجاد می کنند، قبل از تشخیص IgM, این فاکتور حذف گردید.

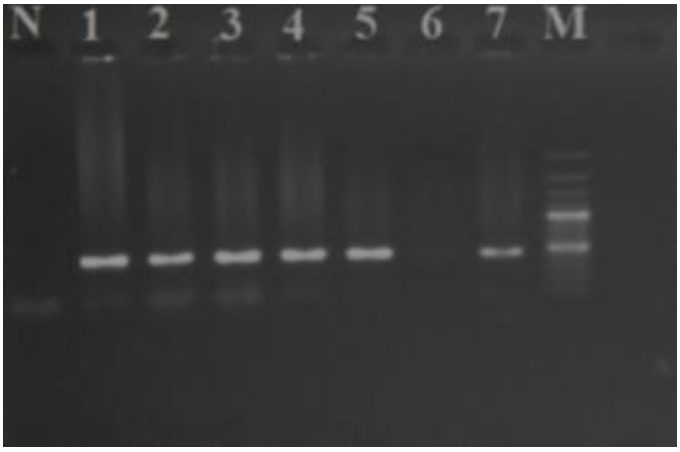
محلول جاذب روماتوئید به صورت ۱+۴ رقیق شد. در مرحله بعد هر کدام از این نمونه ها به صورت ۱+۱۰۰ رقیق شدند. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک های میکروپلیت افزوده شد و پلیت ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. بعد از شستشو با محلول شستشوی داخل کیت، به مدت ۳۰ دقیقه محلول کنژوگه کیت اضافه شد.

در مرحله بعد محلول سوبسترا اضافه گردید و در مرحله آخر محلول متوقف کننده اضافه شد. در این مطالعه جهت قرائت چاهک های میکروپلیت از دستگاه قرائت کننده الیزا در طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد. از ۱۰۰ نمونه جداسازی شده از کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه، ۳۳ ٪ از موارد بعنوان مثبت گزارش شدند. جهت تایید نهایی از حضور باکتری در این ۳۳ ٪ نمونه مورد مطالعه مثبت، از روش مولکولی استفاده گردید.

از بین موارد مثبت جداسازی شده، ۱۲ مورد کارکنان بخش دام های زنده، ۲۰ مورد کارکنان بخش کشتارگاه و ۱ مورد کارکنان بخش اداری بودند.

در روش مولکولی ژن های گروه OMP جداسازی گردیدند. در این میان ۱۰ مورد از نمونه های مورد بررسی واجد ژن COM1 بودند. تصویر حاصل از الکتروفورز در نمونه های واجد ژن OMP در زیر ارائه شده است.

تصویر (۴-۱): تصویر حاصل از الکتروفورز در نمونه های واجد ژن OMP



ستون ۱ تا ۵ مربوط به نمونه های مثبت واجد ژن OMP، ستون M مارکر، و ستون N کنترل منفی

فصل پنجم

"بحث و نتیجه گیری"

۵-۱. بحث

تب کیو به عنوان یک بیماری نو پدید و باز پدید در بسیاری از کشورها از جمله ایران مطرح است. تعیین میزان شیوع آلودگی و فاکتورهای خطر باعث می شود که اهمیت عفونت برای مسئولین بهداشتی نمایان گردد و امکانات و تجهیزات لازم جهت کنترل و پیش گیری و نیز، اولویت های پژوهشی مشخص شود (۹۷).

مطالعه حاضر نخستین مطالعه در شهرستان شهرکرد می باشد. تعیین میزان شیوع بیماری و فاکتورهای خطر باعث می شود که اهمیت این بیماری در جمعیت، برای مسئولین بهداشتی نمایان گردیده و امکانات و تجهیزات لازم کنترل و پیش گیری و نیز اولویت های پژوهشی مشخص شود. مطالعه حاضر، نشان داد که عفونت *کوکسیلوزیس* در سرم کارکنان شهرستان شهرکرد وجود دارد و شیوع آن در۱۰۰ نمونه جداسازی شده از کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه، ۳۳ ٪ گزارش مثبت است (۹۹).

در این مطالعه جهت تایید نهایی از از روش مولکولی استفاده گردید. در روش مولکولی ژن های گروه OMP جداسازی گردید. در این میان ۱۰ مورد از نمونه های مورد بررسی واجد ژن گروه OMP بودند.

نتایج مطالعات نشان می دهد که روش واکنش زنجیره ی پلی مراز تک مرحله ای جهت تشخیص *کوکسیلا بورنتی* دارای حساسیت کافی نمی باشد و پیشنهاد می شود که از روش واکنش زنجیره ی پلی مراز آشیانه ای استفاده گردد. این روش نسبت به روش های کلاسیک از سرعت، دقت، اختصاصیت و حساسیت بالایی برخوردار است (۹۹).

تب کیو یک بیماری شغلی در افرادی همچون دامپزشکان، کارگران کشتارگاه ها، دامداران و کارکنان آزمایشگاهی است. گسترش تب کیو بعلت تماس افراد مستعد با دام آلوده اتفاق می افتد. در مطالعه حاضر از بین ۱۰۰ نمونه جداسازی شده از کارکنان کشتارگاه های شهرکرد ۳۳ ایزوله *کوکسیلا بورنتی* جداسازی گردید (۹۳).

گرچه هیچ گونه ارتباط معنی داری بین سابقه کاری کارکنان و آنتی بادی جداسازی شده پیدا نشد، اما بیشترین میزان نمونه جداسازی شده در بین کارکنان کمتر از ۳۰ سال با سابقه کاری بالا مشاهده گردید. این مساله نشان دهنده فراوانی ایزوله در کارکنانی است که با عدم واکسیناسیون در معرض نمونه های دامی آلوده قرار گرفته اند.

از بین نمونه های سرم مورد مطالعه، تنها ۱۲ نمونه سرم (۱۲ ٪) از نظر حضور آنتی بادی های IgM مثبت بودند. با توجه به این که آنتی بادی های IgM غیر اختصاصی (فاکتور روماتوئید) در روال آزمایش مثبت کاذب ایجاد می کنند، قبل از تشخیص IgM، این فاکتور حذف گردید. با توجه به این که حضور آنتی بادی های IgM نشان دهنده ی فاز حاد بیماری است، می توان نتیجه گرفت که بیشتر کارکنان با سابقه کاری و سن بالای ۳۵ سال زمان لازم برای مقاومت در برابر محیط های آلوده به کوکسیلا داشته اند. از این جهت بیشترین میزان کوکسیلا بورنتی جداسازی شده از کارکنان کشتارگاه ها با سن کمتر می باشد (۹۵).

در سال ۲۰۱۱ ترینیداد و همکاران مطالعه ای در بین کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه خود انجام دادند که از ۴۵۵ مورد کارگر مورد مطالعه ۲۰ مورد (۴/۴ ٪) واجد IgM در سرم خون خود بودند. که با توجه به جامعه آماری مورد مطالعه ما نسبت متناسبی را نشان می دهد (۸۹).

از بین موارد مثبت جداسازی شده، ۱۳ مورد کارکنان بخش دام های زنده، ۴ مورد کارکنان بخش کشتارگاه و ۳ مورد کارکنان بخش اداری بودند که مشابه به نتایج مطالعه حاضر می باشد. در مطالعه حاضر از بین موارد مثبت جداسازی شده، ۱۲ مورد کارکنان بخش دام های زنده، ۲۰ مورد کارکنان بخش کشتارگاه و ۱ مورد کارکنان بخش اداری بودند.

در مطالعه ای که در سال ۱۹۸۸ در آدیس آبابا انجام شد، شیوع تب کیو در ۴۶۵ کارگر بررسی شد که از این میان ۶/۵ ٪ شیوع *کوکسیلا بورنتی* سرمی گزارش شد (۹۱).

در مطالعه ای مشابه در ترکیه در سال ۲۰۰۰ نشان دهنده ی شیوع ۱۲ ٪ *کوکسیلا بورنتی* از سرم کارکنان بخش کشتارگاه های مورد مطالعه بود (۹۲).

نتایج مطالعه حاضر با مطالعات انجام شده اخیر مطابقت دارد. و نشان دهنده شیوع *کوکسیلا بورنتی* در سرم کارکنان کشتارگاه ها می باشد. با توجه به این که ایران در مرزهای شرقی با کشور افغانستان و پاکستان قرار دارد، و کنترل ورود دام های آلوده از این مرزها با عدم رعایت موازین بهداشتی انجام می شود، کنترل شیوع *کوکسیلا بورنتی* مساله ای دشوار به نظر می رسد.

در مناطق مختلف ایران نیز مطالعات سرولوژیک انجام شده و نتایج مختلفی از شیوع *کوکسیلا بورنتی* گزارش می دهد. در مطالعه ای که توسط اسدی و همکاران انجام شد ۱۰۰ ٪ شیوع سرمی کوکسیلا بورنتی گزارش گردید (۹۳).

در این مطالعه ۱۱۳۷ نمونه سرمی از ۴۳ گله دامی جداسازی گردید. در شرق ایران خلیلی و سخایی شیوع *کوکسیلا بورنتی* را ۶۵/۷۸ ٪ و ۱۰/۷۵ ٪ گزارش کردند (۹۴).

همچنین در مطالعه دیگری که توسط خلیلی و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد، شیوع سرمی *کوکسیلا بورنتی* ۲۹/۴۲ ٪ برآورد شد. متاسفانه کشتارگاه ها اطلاعات کافی راجع به *کوکسیلا بورنتی* و راه های انتقال آن ندارند و هیچ گونه اقدام پیشگیری از طرف مسئولین انجام نشده است (۹۵).

تب کیو که به واسطه ی *کوکسیلا بورنتی* است، یک بیماری مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی است که در نواحی جغرافیایی با آب و هوای متفاوت گزارش شده است .عامل بیماری یک میکروارگانیسم ریکتزیا مانند و دارای زندگی داخل سلولی اجباری به نام می باشد که طیف وسیعی از حیوانات از قبیل گاو، گوسفند، بز، سگ، گربه، و ماهی ها را آلوده می کند. از بین حیوانات اهلی، گاو های شیری، گوسفند و بز بزرگ ترین مخازن این باکتری هستند. رحم و غدد پستانی حیوان اولین محل جایگزینی عامل بیماری در فاز مزمن آلودگی با *کوکسیلا بورنتی* هستند. حیوانات آلوده این میکروارگانیسم را از طریق ترشحات دفعی،

ترشحات رحمی و قطعاتی از جفت در طی زایمان، به میزان زیاد به محیط دفع می کنند. یکی دیگر از مهم ترین را ه های دفع *کوکسیلا بورنتی* به محیط شیر دام های آلوده می باشد.

شواهد سرولوژیکی در شرق ایران در مطالعه اسماعیلی و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دهنده ی آنتی بادی های فاز ۱ و ۲ در سرم کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه است. بیشترین میزان آنتی بادی گزارش شده در این کارکنان با مقادیر ۱۸/۱ ٪ گزارش شده است (۹۶).

در نهایت به نظر می رسد استفاده از روش های مولکولی همچون PCR از دقت بالاتری برای بررسی حضور کوکسیلا بورنتی برخوردار باشد.

۲-۵. نتیجه گیری

در نهایت به نظر می رسد استفاده از روش های مولکولی همچون PCR از دقت بالاتری برای بررسی حضور کوکسیلا بورنتی برخوردار باشد.

سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که اگر *کوکسیلا بورنتی* در یک شهر که دارای حدود ۵ میلیون نفر جمعیت است به صورت اسپری پخش کنند. ۱۲۵،۰۰۰ نفر بیمار و ۱۵۰ مورد مرگ و میر رخ می دهد. همچنین این سازمان تخمین زده است که عامل می تواند تا شعاع ۲۰ کیلومتر در مسیر باد منتقل شود. عوامل میکروبی این گروه پاتوژن هایی می باشند که بیماری های آشکار ایجاد کرده و با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک می توانند سرایت پذیری بسیار بالا و خطرناکی به علت در دسترس بودن، سهولیت در امر تولید و انتشار داشته باشند، این در حالی است که این میکروارگانیسم ها دارای آمار مرگ و میر بسیار بالا و همچنین تاثیرات چشمگیری بر روی سلامت هستند.

از این رو بررسی حضور *کوکسیلا* در سرم کارکنان و کنترل ورود و خروج دام های آلوده ضروری به نظر می رسد.

۵-۳. پیشنهادات

- بررسی در مناطق مختلف کشور به ویژه مناطق هم مرز با کشور افغانستان و پاکستان
- بررسی در سطح مولکولی

۵-۴. منابع

1. Akikko h, Naoto I, Megumi O, *et al*. (2006). Investigation of *Coxiella burnetii* contamination in Commercial milk and PCR method for the detection of *Coxiella burntii* in egg, Japan. *Journal of Clinical Microbial*. 44:790-795.

2. Angelakis E, Raoult D. (2010). Q fever. *Journal Veterinary Microbiology*. 140: 297-309.

3. Astobiza I, Ruiz F, Pinero A, *et al*. (2012). Estimation of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy Cattle in intensive systems by serological and molecular analyses of bulk-tank milk samples. *Journal of Dairy Science*. 95: 1632–1638.

4. Arricau N, Rodolakis A. (2005). Is Q fever an emerging or re-emerging Zoonoses? *Journal of Veterinary Research*. 36:327-350.

5. Bashiribod H, Rahbarian N, Eslami G, *et al*. (2008). Prevalence of Coxiella burnetii in Human, Animal Hosts and Hard Ticks in Mazandaran Province Iran. 32(3): 253-7.

6. Berri M, Arricau N, Rodolakis A, *et al*. (2003). PCR-based detection of *Coxiella burnetii* from clinical samples. *Methods in Molecular Biology*. 12: 153-161.

7. Bildfell R, Thomson G, Haines D, *et al*. (2000).*Coxiella burnetii* infection is associated with placentitis in cases of bovine abortion. *Journal of Veternary Diagnosis and Investigate*.12: 419-425.

8. Bruin A, Van J, Heer D, *et al*. (2012). Detection of *Coxiella burnetii* DNA on Small-Ruminant Farms during a Q Fever Outbreak in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiol*ogy. 78: 1652-1657**.**

9. Cerf O, Condron R. (2007). *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the Precautionary principle? *Journal of Epidemiology and Infectious*, 2006; 134: 946–951. 25. Cutler S, Bouzid M, Cutler R, Q fever. *Journal of Epidemiology and Infectious*. 54: 313-318.

10. Doosti A, Arshi A, Sadeghi M, *et al*. (2012). Investigation of *Coxiella burnetii* in Iranian Camels. *Journal of Medical Microbiol*ogy. 6: 56-62.

11. Dupuis G, Petite J, Peter O, *et al.* An important outbreak of human *Q fever* in a Swiss Alpine Valley. *International Journal of Epidemiology*, 1987; 16: 282-287.

12. Fretz R, Schaeren W, Tanner M, *et al*. Screening of various foodstuffs for occurrence of

Coxiella burnetii in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, 2007; 116: 414–418.

13. Guatteo R, Beaudeau F, Shedding routs of *Coxiella burnetii* in dairy Cows: implications for detection and control. *Journal of Veterinary Research*, 2006; 37: 827-833.

14. Gyuranecz M, Hornok S, Viktor J, *et al*. Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary: Screening of Dairy Cows, Sheep, Commercial Milk Samples, and Ticks. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 2012; 12: 650-653.

15. Hirai A, Nakama A, Chiba T, *et al*. Development of a method for detecting *Coxiella burnetii* in Cheese samples. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2011; 74: 175-180. Hendrik J R, Coxiella burnetii in pregnant goats. *GVO drukkers&vormgevers*. 2013; 1: 10-21.

16. Howe GB, Loveless BM, Nonwood D, Craw P, *et al*. Real-time PCR for the early detection and Quantification of Coxiella burnetii as an alternative to the murine bioassay. *Journals Molecular and Cellular probes* 2009; 23: 127-31.

17. James H. Steele (Edit.) CRC Handbook Series in Zoonoses, Bacterial, Rickettsial and Mycotic Diseases, 2nd edition, volume 2, pp. 507-528.

18. Khalili M, Sakhaee E. An update on a serologic survey of Q fever in domestic animals in Iran. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009; 80(6): 1031-2.

19. Khalili M, Sakhaee E, Golchin M, Q fever serology in febrile patients in Southeast Iran. *Transactions of the Royal society of Tropical Medicine & Hygiene*. 2010; 104(9): 623-4.

20. Kim S, Kim E, Lafferty C, *et al*. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 2005; 11: 619-621.

21. Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, et al. Q fever: a biological weapon in your backyard. 2003; 3(11): 709-21.

22. Maurin M, Q fever. *Clinical Microbiology Revoiution*, 1999; 12: 518-553.18-2/2.

23. Motohiko O, Agus S, Kozue S, *et al*. Evaluation of PCR and Nested PCR assays currently used for detection of *Coxiella burnetii* in Japan. *National Institute of Infectious Diseases*, 2004; 35: 852-855.

24. Niemczuk K, Szymańska M. Epidemiology, Zoonotic Aspect and Current Epidemiological Situation of Q fever in Poland. *National Veterinary Research Institute*, 2012; 51: 380-392.

25. Rodolakis A. Q fever, state of: Epidemiology, diagnosis and prophylaxis.*Journal Small ruminant Research*, 2006; 62(1): 121-4.

26. Rudolf R, Rebecca M, Description of a *Coxiella burnetii* abortion outbreak in a Dairy Goat herd, and associated serology, PCR and genotyping results. *Research in Veterinary Science*, 2012; 93:1217–1224.

27. Scheeberager, Q Fever Current state of knowledge and Perspectives of research of a neglected Zoonosis. *International Journal of Microbiology*, 2011; 10: 22-25.

28. Scola BL. Current Laboratory diagnosis of Qfever. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases***,** 2002; 13(4): 257-62.

29 .Steinmann P, Bonfoh B, Peter O, Schelling E, Traore M, Zinsstag J, Seroprevalance of *Q-Fever* in febrile individuals in Mali. *Journal Tropical Medicine International Health*, 2005; 10(6): 612-17.

30. Van den B, Vellema P, Moll L, *et al*. Detection of *Coxiella burnetii* in the bulk tank milk from a farm with vaccinated goats, by using a specific PCR technique. *Journal of Small Ruminant Research*, 2013; 110: 150–154.

31. Miller V, Health effects of project shad Biological agent Coxilla Burnetii [Q-fever]. 2004; 4: 1-15.

32. Zhang G, Nguyen S, Ogawa M, *et al*. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998; 36: 77-80.

33. Angelakis E. and Raoult D. (2010). Q fever. Veterinary Microbiology, 140: 297-309.

34. Banazis M.J., Bestall 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.

35. Cabassi C., Taddei S., Donofrio G. and Ghadini F. (2006). Association between *Coxiella burneti* seropositivity and abortion in dairy cattle of Northen Italy. New microbiology, 29: 211-214.

36. Cekani M., Papa A., Kota M., Velo E. and Berxholi K. (2008). Report of a serological study of *Coxiella burnetii* in domestic animals in Albania. The Veterinary Journal, 175: 276-278.

37. Gefenaite G., Munster Houdt R.v. and Hak E. (2011). Effectiveness of the Q fever vaccine: A meta-analysis. Vaccine, 29: 395-398.

38. Guatto R., Seegers H., Taurel A., Joly A. and Beaudeau F. (2011). Prevalence of *Coxiell Burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review, Veterinary Microbiology, 149: 1-16.

39. Kennerman E., Rousset E., Golcu E. and Dufour P. (2010). Seroprevalence of Q fever (coxiellosis) in sheep from the Southern Marmara Region, Turkey. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 33: 37-45.

40. Khalili M. and Sakhaee E. (2009). An update on a Serologic Survey of Q Fever in Domestic Animals in Iran. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 80: 1031-32.

41. Khalili M., Sakhaee E., Aflatoonian M.R. and Shahabi-Nejad N. (2011). Herd-prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in dairy cattle farms based on bulk tank milk analysis. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine: 4, 58-60.

42. Khalili M., Shahabi-Nejad N. and Golchin M. (2010). Q fever serology in febrile patients in southeast Iran. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 104: 623-624.

43. Masala G., Porcu R., Sanna G., Chessa G., Cillara G., Chisu V. and Tola S. (2004). Occurrence, distribution, and role in abortion of *Coxiella burnetii* in sheep and goats in Sardinia, Italy. Veterinary Microbiology, 99: 301-305.

44. Maurin M. and Raoult D. (1999). Q fever. Clinical Microbiology reviews: 12, 4, 518-553.

45. Nakoun´e E., Debaere O., Koumanda-Kotogne F., Selekon B., Samory F. and Talarmin A. (2004). Serological surveillance of brucellosis and Q fever in cattle in the Central African Republic. Acta Tropica, 92: 147-151.

46. Norlander L. (2000). Q fever, epidemiology and pathogenesis. Microbes and Infection, 2: 417-424.

47. Nourollahi Fard S.R. and Khalili M. (2011). PCR-Detection of *Coxiella burnetii* in Ticks Collected from Sheep and Goats in Southeast Iran, Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases, 5 (1):1–6.

48. Perugini A.G., Capuano F., Esposito A., Marianelli C., Martucciello A., Iovane G. and Galiero G. (2009). Detection of *Coxiella burnetii* in buffaloes aborted fetuses by IS111 DNA Amplification: A preliminary report. Research in Veterinary Science, 87: 189-191.

49. Ruiz-Fons F., Astobiza L., Barandika J.F., Hurtado A., Atxaerandio R., Juste R.A. and Garcia-perez A. (2010). Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems. BMC Veterinary Research, 20: 6-3.

50. Sakhaee E. and Khalili M. (2010). The first serologic study of Q fever in sheep in Iran.Trop Anim Health Production, 42: 1561-64.

51. Smith B.P. (2009). Large Animal Internal Medicine, Vol. 2,4th ed., Mosby, PP: 1466-67.

52. Van den Brom R. and Vellema P. (2009). Q fever outbreaks in small ruminants and people in the Netherlands. Small Ruminant Research, 86: 74-79.

53. Vaidya V.M., Malik S.V.S., Bhilegaonkar K.N., Rathore R.S., Kaur S. and Barbuddhe S.B. (2008). Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, in press.

54. Woldehiwet Z. (2004). Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. Research in Veterinary Science, 77: 93-100.

55. Abbasi, S., Farzan, R., Momtaz, H. (2011) Molecular detection of *Coxiella burnetii* in goat bulk milk samples in some provinces of Iran. Afr J Biotechnol. 10: 18513-18515.

56. Barlow, J., Rauch, B., Welcome, F., Kim, S.G., Dubovi, E., Schukken, Y. (2008) Association between
Coxiella burnetii shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. Vet Res. 39: 23-32.

57. Biberstein, E.L., Behymer, D.E., Bushnell, R., Crenshaw, G., Riemann, H.P., Franti, C.E. (1974) A survey of Q fever (*Coxiella burnetii*) in California dairy cows. Am J Vet Res. 35: 1577-15822.

58. Berri, M., Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A. (2003) PCR-based detection of *Coxiella burnetii* from clinical samples. Methods Mol Biol. 216: 153-161.

59. Berri, M., Laroucau, K., Rodolakis, A. (2000) the detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. Vet Microbiol.15: 285-293.

60. Berri, M., Rekiki, A., Sidi Boumedine, K., Rodolakis, A. (2009) Simultaneous differentialdetection of Chlamydophila abortus, Chlamydophila pecorum and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. BMC Microbiol. 9: 130-138.

61. Literak I, Rehacek J. (1996). Q-fever-occurrence and significance of this disease in the Czech Republic and Slovak Republic. Vet Med (Praha) 41(2):45-63.

62. Kato K, Arashima Y, Asai S, Furuya Y, Yoshida Y, Murakami M, et al.(1999). Detection of Coxiella burnetii specific DNA in blood samples from Japanese patients with chronic nonspecific symptoms by nested polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol 21(2):139-44.

63. Guo HR, Gilmore R, Waag DM, Shireley L, Freund E. (1998). Prevalence of Coxiella burnetii infections among North Dakota sheep producers. J Occup Environ Med 40(11):999-1006.

64. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al.(1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. Science 239(4839):487-91.

65. To H, Htwe KK, Kako N, Kim HJ, Yamaguchi T, Fukushi H.(2000). Prevalence of Coxiella burnetii infection in dairy cattle with reproductive disorders. J Vet Med Sci 60(7):859861.

66. Rehacek J, Literak I. (2001). Coxiellosis among domestic animals in the Czech Republic, Vet Med Praha 46(4):54-9.

67. Ibrahim IN. (1999). Serosurvey of wild rodents for Rickettsioses (spotted fever, murine typhus and Q fever) in Java Island, Indonesia. Eur J Epidermiol 15(1):89-93.

68. Manilla G, Frusteri L, Maroli M, Khoury C. (2002). A study on the prevalence of Coxiella burnetii among wild mammals in Italy. Ann Ist Super Sanita 38(1):286-95.

69. Bacellar F, Nuncio MS, Rehacek J, Filipe AR. (1991). Rickettsiae and rickettsioses in Portugal. Eur J Epidemiol 7(3):291-3.

70. Rehacek J, Krauss H, Kocianova E, Kovacova E, Hinterberger G, Hanak P.(1993). Studies of the prevalence of Coxiella burnetii, the agent of Q fever, in the foothills of the southern Bavarian Forest, Germany. Zentralbl Bakteriol 278(1):132-8.

71. Kruszewska D, Tylewska –Wierzbanowska S. (1996). Unknown species of Rickettsia isolated from Ixodes ricinus tick in Walcz. Rocz Akad Med Bialmyst 41(1):129-35.

72. McDiarmid L, Petney T, Dixon B, Andrews R. (2000). Range expansion of the tick Amblyomma triguttatum triguttatum, an australian vector of Q fever. Int J Parasitol 30(7):791-3.

73. Bashiribod H, Sixl W, Stuenzner D. Q-Fieber in Iran. Abstracts of II Internationales Arbeitskolloqium UeberNaturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa. Graz-Austria, 25.02-28.02. 1976:323-6.

74. Asadi RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al.(1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. Science 239(4839):487-91.

75. - Ongor H, Cetinkaya B, Karahan M, Acik MN, Bulut H, Muz A.(2004). Detection of Coxiella burnetii by immunomagnetic separation-PCR in the milk of sheep in Turkey. J Vet Record 154:570–2.

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

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

78. Kargar M, Rashidi A, Doosti A, Ghorbani-Dalini S, Najafi A.(2013). Prevalence of Coxiella burnetii in bovine bulk milk samples in southern Iran. J Comp Pathol 22:331–4.

79. Foumier PE, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q fever. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998; 36(7): 1823-34.

80. Herigon MW, Bell M.M, Pollard TR, Sayers AR, Richard GC. Q fever diagnosis in domestic ruminant: Comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *J VET Diagn Invest* 2011; 23(5): 924–31.

81. Maurin M, Raoult D.Q Fever. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4): 518–53.

82. De Valk H. Q fever: new insights, still many queries. *Euro Surveill* 2012; 17(3): 20062.

83. De Rooij M.M.T, Schimmer B, Versteeg B, Schneeberger P, Berends BR, Heederik D, et al. Risk Factors of Coxiella burnetii (Q Fever) Seropositivity in Veterinary Medicine Students. *PLoS One* 2012; 7(2): 108-15.

84. Levy PY, Carrieri P, Raoult D. *Coxiella burnetii* pericarditis: Report of 15 cases and review. *Clin Infec Dis* 1999; 29(2): 393–7.

85. Korman TM, Spelman DW, Perry GJ**,** Dowling JP. Acute glomerulonephritis associated with acute Q fever: case report and review of the renal complications of coxiellaburnetii infection. *J Clin Infec Dis* 1998; 26(2): 359–64.

86. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A.Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res* 2005; 36(3): 327–49.

87. Stein A, Raoult D. Detection of Coxiellaburnetii by DNA amplification using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30(9): 2462-6.

88. Berri M, Laroucau K, Rodolakis A. The detection of *Coxiellaburnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *J Vet Micobiol* 2000; 72(3-4): 285-93.

89. Trinidad A, Dookeran S, Stewart-Johnson A. Frequency of seropositivity for Coxiella burnetii immunoglobulins in livestock and abattoir workers in Trinidad. *J New Microbiol* 2011; 34(2): 219-24.

90. Adesiyun A, Dookeran S, Stewart-Johnson A, Rahaman S, Bissessar S. Frequency of seropositivity for Coxiella burnetii immunoglobulins in livestock and abattoir workers in Trinidad. *J New Microbiol* 1988; 34(2): 219-24.

91. Abebe A. Prevalence of Q fever infection in the Addis Ababa abattoir. *Ethiop Med J* 1990; 28(3): 119-22.

92. Cetinkaya B, Kalender H, Ertas HB, Muz A, Arslan N, Ongor H, Gurçay M. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. *Vet Rec* 2000; 146(5): 131-6.

93. Asadi J, Khalili M, Kafi M, Ansari-Lari M, Hosseini SM. Risk factors of Q fever in sheep and goat flocks with history of abortion. *Comp Clin Pathol* 2012; DOI 10.1007/s 00580-012-1661-9.

94. Khalili M, Sakhaee E. An update on a serologic survey of Q fever in domestic animals in Iran. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80(6): 1031–2.

95. Khalili M, Shahabi-Nejad N, Golchin M. Q fever serology in febrile patients in southeast Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; 104(9): 623-4.

96. Esmaieli S, Gooya MM, Shirzadi MR, Esfandiari B, Amini FB, Behzadi MY, et al. Seroepidemiological Survey of tularemia among different groups in wetern Iran. *Int J Infect Dis* 2014; 18: 27-31.

97. Khalili M, Shahabi nejad N, Aflatoonian MR, Q fever is a forgotten disease in Iran. *Kerman Univ Med Sci* 2010, 18(1): 93-7 [Perdian].

98. Kim SG, Kim EH, Lafferty CJ, Dubovi E. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *J Emerg Infect Dis* 2005; 11(4): 619-21.

99. Kirkan S, Kaya O, Tekbiyik S, Parin U. Detection of Coxiella burnetii in cattle by PCR. *Turk J Vet Anim Sci* 2008; 32(3): 215-20.

100. Gidding HF, Wallace C, Lawrence GL, McIntyre PB. Australia's national Q fever vaccination program. *Vaccine* 2009; 27(14): 2037-41.