

## مروری بر روش‌های تشخیص آزمایشگاهی بیماری تب کیو

راضیه ذبیحی<sup>۱</sup>، کیوان مجید زاده<sup>۲</sup>، امیرحسین محسنی<sup>۳</sup>، \*محمد سلیمانی<sup>۴</sup>

تاریخ اعلام وصول: ۹۲/۵/۷

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۹۲/۸/۱۴

### چکیده

**مقدمه:** کوکسیلا بورنتی، عامل بیماری زئونوزی می‌باشد که در انسان تب کیو و در حیوانات، کوکسیلوزیس نامیده می‌شود. این باکتری قادر است به مدت طولانی در بیرون از بدن میزبان به سر ببرد و از طریق تنفس میزبان‌های جدید را آلوده نماید. همچنین این عامل باکتریایی از سوی CDC در دسته B عوامل بیوتروریستی قرار گرفته است. تشخیص سریع و دقیق این عامل باکتریایی در کنترل و مدیریت درمان بیماری ناشی از آن کاملاً ضروری است.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه حاصل مرور جامع کتب و مقالات معتبر انتشار یافته در مجلات و کنگره‌های داخلی و خارجی در زمینه تشخیص عامل تب کیو است؛ که شامل بر امنیت زیستی، نمونه‌گیری و روش‌های آزمایشگاهی است.

**یافته‌ها:** جهت تشخیص باکتری کوکسیلا بورنتی می‌توان از روش‌های کلاسیک (نمونه‌گیری، کشت میکروارگانسیم در رده‌های مناسب سلولی از جمله (J۷۷۴، P۳۸۸D۱ و L۹۲۹)، تست‌های سرولوژیک (ایمونوفلورسانس، میکرو ایمونوفلورسانس، تست تثبیت کمپلمان و یا الایزا) و یا از تکنیک‌های بیولوژی مولکولی (PCR، Nested PCR و یا Real Time PCR) استفاده نمود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به اهمیت باکتری کوکسیلا بورنتی، تشخیص سریع و دقیق آن بسیار حائز اهمیت است. علیرغم در دسترس بودن تکنیک‌های مختلف تشخیصی برای این عامل، این تکنیک‌ها دارای معایبی از جمله هزینه بر بودن، نیازمند بودن به شرایط خاص آزمایشگاهی و زمان بر بودن هستند. تکنیک‌های مولکولی به علت دقت بالا و سرعت زیاد در روند تشخیص می‌تواند بسیار موثر باشند. لذا بومی سازی تکنیک‌های مولکولی در کشور جهت تشخیصی عامل تب کیو توصیه می‌شود.

**کلمات کلیدی:** تب کیو، کوکسیلا بورنتی، روش‌های تشخیص آزمایشگاهی

### مقدمه

نامیدند. تحقیقات فیلوژنتیکی روی توالی ژن ۱۶S rRNA، نشان داد که جنس کوکسیلا مربوط به زیر شاخه گاماپروتئوباکتريا (Gamma proteobacteria) است (۲).

کوکسیلا بورنتی، عامل یک بیماری مشترک بین انسان و دام است. بیماری حاصل از آلودگی با آن در انسان، تب کیو (Query Fever) و در حیوانات، کوکسیلوزیس (Coxiellosis) نامیده می‌شود. این عامل، یک باکتری گرم منفی داخل سلولی اجباری است که

اصطلاح تب کیو در سال ۱۹۳۷ توسط ادوارد هالبروک در یک برای توصیف بیماری تب کارکنان کشتارگاهی در کوئینزلند استرالیا پیشنهاد شد (۱). در سال ۱۹۳۸، هرالده کوکس (Herald Rea Cox) و مک فارلن بورنت (Macfarlane Burnet) گونه جدیدی از ریکتسیا (Rickettsial) را در آزمایشگاهی در کوه‌های راکی (Rocky Mountain Laboratory) واقع در آمریکا، شناسایی کردند و آن را *Coxiella burnetii*

۱- پژوهشگر، ایران، قم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، گروه میکروبیولوژی  
۲- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات زیست فن آوری تسنیم (TBRC)  
۳- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات زیست فن آوری تسنیم (TBRC)  
۴- استادیار، ایران، قم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، گروه میکروبیولوژی (\*نویسنده مسئول)  
تلفن: ۰۹۱۲۵۴۴۹۳۳۴ آدرس الکترونیک: soleimanidr@yahoo.com

داخل مونوسیت‌ها و ماکروفاژها تکثیر و تزايد می‌یابد و در خانواده ریکتزیاسه قرار دارد (۳).

کوکسیلا بورنتی میکروارگانیزم چند شکلی است که در شکل میله‌ای، کوچک و دارای ابعاد ۰/۲ تا ۰/۴ میکرومتر در ۰/۴ تا ۱ میکرومتر اندازه و در شکل کروی ۰/۳ تا ۰/۴ میکرومتر قطر دارد که گاهی به شکل دیپلوباسیل نیز در می‌آید. فاقد تاژک و کپسول و در درون سیتوپلاسم سلول میزبان معمولاً به صورت انبوه و به هم چسبیده دیده می‌شوند. این باکتریاز طریق فاگوسیتوز وارد سلول میزبان خود شده و در فاگولیزوزوم در طول چرخه زندگی خود باقی می‌ماند (۲، ۴).

سایز ژنوم کوکسیلا بورنتی بین ۱/۵ Mb تا ۲/۴ Mb تعیین شده است. اکثر باکتری‌های جدا شده دارای ۴ پلازمید با تکثیر خودکار به نامهای C. burnetii، QpH1، QpRS، QpDV، QpDG هستند (۲، ۵). توالی کروموزوم C. burnetii به طور جزئی و کلی در پایگاه GenBank در دسترس است. C. burnetii قادر است به مدت طولانی در بیرون از بدن میزبان به سربرد بطوری که مقاوم به سطح بالایی از اشعه ماورای بنفش، گرما، خشکی، فشار و استرس اسمزی و اکسیداتیو می‌باشد. کوکسیلا بورنتی در مقابل عوامل فیزیکی و شیمیایی نیز مقاوم می‌باشد، مثلاً خشکی و حرارت اطاق به مدت طولانی اثر چندانی روی آن ندارد. این باکتری روزها و هفته‌ها روی شیر، خامه، کره و پنیر، زنده و عفونت‌زا باقی می‌ماند (۵). گرم کردن شیر خام در حرارت ۶۲ درجه به مدت ۳۰ دقیقه به منظور نابود سازی میکروب کافی نیست. ولی پاستوریزاسیون شیر به روش سریع در ۷۳ درجه به مدت ۱۵ ثانیه کاملاً مؤثر است. قدرت عفونی زایی ارگانیزم در مدفوع کهنه تا ۵۶۸ روز محفوظ می‌ماند. ارگانیزم در محیط می‌تواند به مدت طولانی حضور داشته باشد بطوریکه در قطرات تنفسی به مدت ۲ هفته و در ذرات جامد به مدت ۵ هفته در طبیعت باقی می‌ماند (۶، ۷). عفونت C. burnetii ممکن است با تظاهرات بالینی حاد (Acute fever) یا مزمن (Chronic fever) تظاهر پیدا کند، با این حال، تقریباً ۶۰ درصد از موارد تب کیو بدون علامت هستند. در میان ۴۰ درصد از بیماران علامت دار، ۳۸ درصد از آن، یک بیماری خفیف و بدون نیاز به بستری شدن در بیمارستان را تجربه می‌کنند (۲).

ایمنی هومورال و سلولی در کنترل C. burnetii مؤثر است ولی به نظر می‌رسد ایمنی با واسطه سلول در نهایت، در، از بین بردن عامل

نقش مهمتری داشته باشد (۴).

ارگانیزم در چرخه زندگی خود دو نوع واریانت سلولی ایجاد می‌کند: ۱- واریانت سلولی کوچک (SCVs: Small cell variant) و یا که فرم رویان باکتری است و درمونوسیتها و ماکروفاژهای آلوده دیده می‌شود. ۲- واریانت سلولی بزرگ (LCVs: Large cell variant) و یا که فرم عفونت‌زای باکتری است و در خارج سلول یافت می‌شود. واریانت سلولی کوچک در شرایط محیطی تشکیل شده و ارگانیزم را از عوامل نامساعد محیطی مصون داشته و فرم عفونت‌زا محسوب می‌شود و پس از ورود به بدن میزبان به واریانت سلولی بزرگ که از نظر متابولیکی فعال است تکامل می‌یابد. عبور از واریانت سلولی کوچک به بزرگ با تغییرات آنتی ژنیک در بیان پروتئینی سطحی همراه است (۷، ۸).

انتقال ارگانیزم از ۳ راه تنفسی (آئروسول‌های تنفسی)، گوارشی (خوردن لبنیات آلوده) و پوستی (گزش کهنه) است. حیوانات وحشی و چهارپایان (بز، گوسفند و گاو و غیره) مخزن اولیه و طبیعی باکتری هستند. حیوانات خانگی (سگ و گربه و غیره) مخزن ثانویه می‌باشند. این بیماری توسط بندپایانی مانند کهنه (گونه‌های متعدد کهنه‌ها از هر دو خانواده ایکسودیده (Ixodidae) و آرگازیده (Argasidae) و جنس‌ها شامل ایکسودس (Ixodes)، همافیزلیس (Haemaphysalis)، درماستور (Dermacentor)، ریپیسفالوس (Rhipicephalus) و ساس، شپش، کک، مگس و پشه انتقال می‌یابد (۲، ۹). انتقال از حیوان به انسان معمولاً با انتقال ذرات تنفسی از مایع آمیوتیک یا جفت، همچنین پشم یا مو یا مواد منتقل شده با فضولات می‌باشد. تب کیوبه وسیله خوردن شیر پاستوریزه نشده یا محصولات وابسته به آن نیز رخ می‌دهد (۳، ۱۰).

این باکتری با شیر، ادرار و مدفوع حیوانات آلوده دفع می‌شود. به خصوص در زمان زایش جفت، مایع جنینی دامهای آلوده به شدت به عامل بیماری مذکور آلوده هستند (۳، ۱۰). اغلب انسانها در مقابل بیماری بسیار حساس هستند و با ورود تعداد اندکی باکتری به بدنشان از راه تنفسی و استنشاق ذرات آلوده بیمار میشوند. از مشخصات تب کیو حاد، شروع سردرد ناگهانی، تب و ذات‌الریه است. علائم آن شامل: تب، خستگی، لرز، سردرد، درد عضلانی، عرق، سرفه، تهوع، استفراغ، درد قفسه سینه، اسهال، راش پوستی، میوکاردیت، پریکاردیت، منگوانسفالیت و مرگ می‌باشد. از مشخصات تب کیو

فن‌آوری تسنیم که در کتب علمی، مجلات معتبر داخلی و خارجی، کنگره‌های علمی داخلی و بین‌المللی، انتشار یافته است می‌باشد. این مطالعه مروری در ۴ بخش امنیت زیستی، نمونه‌گیری و جدا سازی باکتری، روش‌های تشخیص سرولوژیک و روش‌های تشخیص مولکولی ارائه شده است.

## یافته‌ها

### امنیت زیستی در تشخیص

در حمل و نقل نمونه مشکوک به *C. burnetii* باید از ماسک، دستکش جراحی و لباس محافظ استفاده کرد. تلقیح و کشت تنها در آزمایشگاه دارای ایمنی زیستی سطح ۳ امکان پذیر است. *C. burnetii* به عنوان یک عامل بالقوه برای بیوتروریسم، در سراسر جهان در سال ۱۹۹۹ مطرح شد (۴). به دلیل قدرت سرایت بالای این باکتری که ناشی از دوز عفونی کننده پایین آن است ( $LD_{50} \leq 10$ ) و پایداری بالای ذرات عفونی (۷ تا ۱۰ روز در دمای ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد در پشم گوسفند و به مدت بیش از یک ماه در گوشت تازه و به مدت ۴۰ ماه در سر شیر)، این باکتری از سوی مرکز کنترل بیماری‌ها (CDC: Central for Disease Control) در دسته B عوامل بیوتروریستی قرار داده شده است (۱۳). بسیاری از همه‌گیری‌های این بیماری با استنشاق *C. burnetii* از راه گرد و غبار مرتبط شده‌اند و چندین شیوع از این بیماری در پرسنل نظامی پس از جنگ جهانی دوم، گزارش شده است. تب کیو گاهی اوقات، یک بیماری بی‌اهمیت شبیه آنفولانزا است، اما اگر به عنوان یک سلاح بیولوژیکی در یک جمعیت غیر نظامی استفاده شود می‌تواند در دراز مدت، با عوارض مزمن و ناتوانی شدید همراه باشد (۴).

برای کنترل کردن این بیماری واکسن‌هایی در چند کشور استفاده شده است.

در حال حاضر، ۳ نوع واکسن تب کیو برای کاربرد در انسان در دسترس است: ۱- واکسن کوکسیلا بورنتی فاز ۱ غیر فعال شده با فرمالین (Q-VAX)، که در استرالیا به کار می‌رود. ۲- واکسن زیر واحدی فاز ۱ حاصل از تیمار با کلروفورم-متانول، که توسط محققین آمریکایی توصیه شده است. ۳- واکسن شیمیایی تب کیو (بدست آمده از سلولهای فاز ۱ به وسیله تیمار با تری کلرواستیک اسید)، که در کشورهای رومانی و چک اسلواکی سابق توسعه یافته و به

مزمین اندوکاردیت، عفونت استخوان و مفصل، عفونت عروقی، عفونت ریه مزمن، سندروم خستگی مزمن می‌باشد (۲). این باکتری، نخست در گردش خون و سپس سایر اندامهای درونی را مورد حمله قرار می‌دهد (۱۱).

تب کیو بیماری زئونوزی است که انتشار گسترده و وسیعی در سرتاسر دنیا دارد. در سال‌های اخیر گزارش‌هایی از موارد عفونت با این باکتری در کشورهای از جمله بلژیک، هلند، آمریکا، کانادا، عربستان، بحرین، قطر، امارات، مصر، عمان و ژاپن داده شده است (۲، ۳).

اطلاعات دقیقی از شیوع این عفونت در ایران در دسترس نیست. خلیلی و همکارانش با انجام مطالعات سرولوژیکی اولیه در جنوب شرق ایران در نشخوارکنندگان و بیماران تب دار، شیوع این عفونت را نشان دادند (۱۲). با توجه به اینکه پرورش بز در مناطق کویری از جمله جنوب شرق ایران بسیار متداول است، خلیلی و سخایی در سال ۲۰۰۹ در کرمان نشان دادند که تمام گله‌های بز از نظر حضور آنتی بادی ضد کوکسیلا بورنتی مثبت هستند. مطالعات جیراد و همکارانش در سال ۱۹۵۲ و بشیری بد و همکارانش در سال ۱۹۷۶ موارد مثبت آلودگی احشام به کوکسیلا بورنتی را در استان کرمانشاه و نیز در ۷ درصد از گاوها، ۳/۲ درصد از گوسفندها و ۱/۷ درصد از بزها در استان لرستان را نشان دادند (۱۲). جدول شماره ۱، خلاصه‌ای از تاریخچه بیماری تب کیورا در ایران و جهان نشان می‌دهد.

با توجه به اینکه باکتری کوکسیلا بورنتی از دسته باکتری‌هایی است که تشخیص آن با روش‌های کلاسیک از جمله کشت، با محدودیت‌هایی مواجه است؛ لذا استفاده از روش‌های تشخیصی بر پایه تکنیک‌های بیولوژی مولکولی می‌تواند کمک به سزایی در روند تشخیص سریع و مدیریت درمان بیماری مذکور داشته باشد. هم‌اکنون مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری تسنیم دانشگاه علوم پزشکی آجا با توجه به تجربه‌های موفق خود در زمینه تشخیص مولکولی عوامل عفونی، به عنوان مرکز پشتیبان کشور در این خصوص مطرح است.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه حاصل بررسی و مرور منابع معتبر محققین داخلی و خارجی و پژوهش‌های انجام شده در مرکز تحقیقات زیست

حاضر، استفاده از روش ایمونوفلورسانس (Immunofluorescence) روش مرجع برای تشخیص سرولوژی تب کیو است. این یکی از ساده‌ترین و دقیق‌ترین روش‌های سرولوژیک است. برای تهیه آنتی ژن فاز II برای این آزمون، این باکتری در لایه‌های همولیز از فیبروبلاست‌های L929 موش رشد داده می‌شود. تهیه آنتی ژن فاز I با تلقیح به طحال موش انجام می‌شود (۱۵).

#### روش میکروایمونوفلورسانس (Microimmunofluorescence):

این روش را می‌توان برای تعیین آنتی بادی مرحله I و II در فراکسیونهای IgG و IgM و IgA استفاده کرد. یک جاذب فاکتور روماتوئید قبل از تعیین IgM و IgA برای حذف IgG استفاده می‌شود. انتخاب تیتر منفی بستگی به منبع و خلوص آنتی ژن و میزان تحریک پس زمینه‌ی آنتی ژن در جمعیت مورد مطالعه دارد. رقت ۱:۵۰ به عنوان اولین رقت مثبت در نظر گرفته می‌شود. مقادیر آنتی بادی بالارونده معمولاً ۷ تا ۱۵ روز پس از شروع علائم بالینی تشخیص داده می‌شود. تقریباً ۹۰ درصد از بیماران دارای آنتی بادی قابل تشخیص از هفته سوم هستند (۱۵).

**تست تثبیت کمپلمان (CFT: complement fixation test):** تست تثبیت کمپلمان بسیار اختصاصی است ولی اختصاصیت آن کمتر از روش ایمونوفلورسانس بوده و وقت گیر است. این روش حساسیت چندانی ندارد. این روش هر دو آنتی بادی ضد فاز I و II را تشخیص می‌دهد. علاوه بر این، واکنش متقابل با آنتی ژن‌های تخم مرغ ممکن است باعث نتایج مثبت کاذب شود. مقادیر آنتی بادی بالارونده، بین ۱۰ و ۲۰ روز پس از شروع علائم تشخیص داده شده است (۱۴).

**آزمون الیزا (ELISA: Enzyme-linked immune sorbent assay):** این روش دارای حساسیت و اختصاصیت بیشتری نسبت به تست تثبیت کمپلمان جهت تشخیص تب Q است و به عنوان یک روش خوب برای بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک معرفی شده است (۴، ۱۶). این روش حتی حساس‌تر از روش ایمونوفلورسانس بوده و می‌تواند دارای پتانسیل تشخیص سرولوژیکی تب Q باشد. الیزا توان جستجوی آنتی بادی ضد فاز I و II باکتری را دارد (۱۴، ۱۶).

#### تست‌های تشخیص اسید نوکلئیک

باکتری کوکسیلا بورنتی دارای قدرت سرایت بالا ( $ID_{50} \leq 10$ ) و پایداری ذرات عفونی کننده بسیار زیاد است، بنابراین از سوی CDC

کار رفته است. واکسیناسیون برای بیماران توصیه می‌شود که به طور اختصاصی در معرض قرار دارند.

به علت خطر بالا در ایجاد عفونت بیمارستانی-آزمایشگاهی باید مواد بالقوه عفونی فوراً با استفاده از هیپوکلریت ۰/۵ درصد و پراکسید ۵ درصد یا فنل ضد عفونی گردد (۴).

#### نمونه‌گیری و جداسازی باکتری

می‌توان از خون بیمار (در مرحله اوج تب)، ادرار و مایع مغزی-نخاعی (CSF) و در برخی موارد از کشت بافت‌ها برای جداسازی باکتری استفاده کرد. مغز استخوان، دریچه‌های قلبی، آنورسم عروقی یا گرافت، بیوپسی استخوان، بیوپسی کبد، شیر، جفت جنین پس از سقط نیز نمونه‌های مناسبی هستند (۲).

رده‌های مختلف سلولی جهت کشت باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرند. این رده‌ها عبارتند از: خطوط سلولی P338AD1 و J774 ماکروفاز موش، سلول‌های جنین جوجه، سلول L929 فیبروبلاست موش، طحال موش، کوپرفکد، ماکروفاز آلوئولار ریه جنین انسان (HEL) (۲). کیسه زرده جنین تخم مرغ ۵ روزه، محیط کشت بسیار مناسبی برای کشت باکتری کوکسیلا بورنتی است. پس از ۱۰ تا ۱۲ روز از انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، تعداد بسیار زیادی از ارگانسیم‌ها می‌توانند مشاهده شوند.

شناسایی *C. burnetii* در درون سلول‌ها با روش ایمونوفلورسانس مستقیم با پلی کلونال و مونوکلونال آنتی بادی ضد *C. burnetii* صورت می‌گیرد. پس از ۶ روز دوره کمون، می‌توان *C. burnetii* را در درون سلول توسط میکروسکوپ ایمونوفلورسانس پس از رنگ آمیزی به دست آورد. ارگانسیم با رنگ آمیزی گرم، گیمسا یا گیمز به صورت یک میله کوتاه مشخص می‌شود. با گیمسا یا سایر روش‌های رومانسکی به رنگ آبی، قرمز یا ارغوانی و با تکنیک ماکیولو به رنگ قرمز روشن در می‌آید. بهترین طریقه رنگ آمیزی با اورامین (Auramine) و آزمایش گسترش زیر میکروسکوپ فلورسانس می‌باشد (۱۴). آزمایشات سرولوژیکی و رنگ آمیزی نمونه‌های بافتی، باید در آزمایشگاه دارای ایمنی زیستی سطح ۲ انجام شود.

#### تست‌های تشخیص باکتری

روش ایمونواسی (EI: Enzyme immune assay): در حال

(dismutase) استفاده شده است. لیست و مشخصات پرایمرهای تشخیصی این ژنها در جدول ۳ موجود می‌باشد. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که روش PCR تک مرحله‌ای جهت تشخیص کوکسیلا بورتنتی دارای حساسیت کافی نمی‌باشد و پیشنهاد می‌شود که از روش نستد PCR استفاده شود (۶). روش نستد PCR نسبت به روش‌های کلاسیک از سرعت، دقت، اختصاصیت و حساسیت بالایی برخوردار است (۱۸).

بررسی ژنهای تشخیصی باکتری کوکسیلا بورتنتی نشان می‌دهد که در میان ژنهای هدف جهت تشخیص این باکتری، بیشتر از ژن ترانسپوزونی ISIIIIA و com1 استفاده شده است. این بررسی‌ها نشان داد که ژن IS از آنجائیکه یک ژن ترانسپوزونی است در برخی از سویه‌های کوکسیلا بورتنتی وجود ندارد، مثلا کوکسیلا بورتنتی که از UK جدا شده است فاقد توالی IS می‌باشند، در نتیجه، این نکته تشخیص کوکسیلا بورتنتی را با محدودیت مواجه می‌کند (۱۷)، همچنین از آنجائیکه تعداد کپی‌های این ژن در کوکسیلاهای مختلف با هم متفاوت می‌باشد و علیرغم اینکه ژن ISIIIIA، هدف مناسبی با اختصاصیت و حساسیت بالا جهت تشخیص کوکسیلا بورتنتی می‌باشد ولی با توجه به مشخص نبودن تعداد کپی‌های آن در کوکسیلاهای مختلف، نمی‌توان از آن در PCR کمی استفاده نمود (۱۹، ۲۰). از سوی دیگر نشان داده شده است که ژن com1 در مقایسه با ژن ISIIIIA ژن مناسبی جهت تشخیص باکتری کوکسیلا بورتنتی می‌باشد (۱۹).

### بحث و نتیجه‌گیری

از آنجایی که باکتری کوکسیلا بورتنتی یک باکتری بیماری‌زای خطرناک است و دارای ویژگی‌های منحصر به فرد است، تنها آزمایشگاه‌های دارای ایمنی سطح ۳ و افراد با تجربه اجازه کار با نمونه‌های آلوده به این ارگانیزم و کشت و جداسازی آن را از نمونه‌های کلینیکی دارند. همچنین به این دلیل که این باکتری یک انگل درون سلولی اجباری است، کشت آن نیاز به یک میزبان زنده دارد که بسیار وقت‌گیر، پرهزینه و پرخطر است (۲). از سوی علیرغم مناسب بودن تست‌های سرولوژیک جهت تشخیص، با توجه به اینکه تولید آنتی بادی علیه این باکتری، چندین هفته طول می‌کشد، این موضوع، تشخیص نوع حاد عامل تب کیو را با استفاده

در دسته B عوامل بیوتروریستی قرار گرفته است. از سوی، علائم این بیماری مشابه با بیماری آنفلوانزا و تب مالت است. گزارشاتی وجود دارد که بیماری تب کیو با این بیماری‌ها اشتباه گرفته شده است (۱۲). همه این عوامل ضرورت تشخیص سریع و دقیق این باکتری را بیشتر می‌کند.

تست‌های سرولوژیکی همگی دارای اختصاصیت، حساسیت، ارزش پیش‌گویی مثبت مناسب و هزینه پایین هستند ولی دارای معایب قابل توجهی نیز می‌باشند. از جمله این که در تشخیص نوع حاد بیماری، کمک‌کننده نمی‌باشند زیرا آنتی بادی معمولا چند هفته پس از بیماری قابل اندازه‌گیری است. بنابراین این آزمایش‌ها معمولا روش اطمینان بخشی برای تشخیص این باکتری نیستند (۱۷، ۱۸). در دسترس بودن پرایمرهای مشتق شده از ژن‌های اختصاصی باکتری کوکسیلا بورتنتی، تشخیص سریع و آسان آنها استفاده از تکنیک‌های مولکولی را موجب می‌شود. در طی سال‌های اخیر، آزمایشات تشخیصی مختلفی بر اساس تکنیک‌های مولکولی بر پایه PCR، برای تشخیص باکتری کوکسیلا بورتنتی در کشت سلولی و نمونه‌های کلینیکی توسعه یافته است (۱۷).

در ایران مطالعات پراکنده‌ای در مورد تشخیص مولکولی این باکتری صورت گرفته است. مرکز تحقیقات زیست فن آوری تسنیم دانشگاه علوم پزشکی آجاز مراکز تحقیقاتی پیشرو در کشور در این موضوع بوده است. در مطالعه‌ای که توسط سلیمانی و همکاران که در سال ۲۰۱۲ جهت تشخیص باکتری کوکسیلا بورتنتی انجام شد، یک تکنیک استاندارد PCR بر اساس ژن ۱۶SrRNA این باکتری راه‌اندازی شد (۱۸). در مطالعه دیگری که توسط سلیمانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد، برای تکنیک فوق، با استفاده از روشی جدید یک کنترل مثبت داخلی طراحی گردید (در دست چاپ). در مطالعه دیگری که توسط سلیمانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد، برای ژن ۱۶SrRNA باکتری کوکسیلا بورتنتی، تکنیک SYBR Green Real Time PCR استاندارد، طراحی و راه‌اندازی شد (در دست چاپ). لیست برخی از کیت‌های تجاری جهت تشخیص مولکولی باکتری کوکسیلا بورتنتی در جدول ۲ آورده شده است.

جهت تشخیص باکتری کوکسیلا بورتنتی با استفاده از تکنیک‌های مولکولی، از ژنهای مختلفی از این باکتری از جمله ISIIIIA، com1، ۱۶SrRNA، QpRS، QpH1 و سوپراکسید دیسموتاز (sod: superoxide)

می‌کند. لذا راه اندازی تکنیک‌های تشخیصی استاندارد بر پایه روش‌های مولکولی در کشور، توصیه می‌شود.

از این تست‌ها با محدودیت مواجه می‌کند. همه این عوامل دست به دست هم داده و ضرورت تشخیص سریع این عامل باکتریایی با استفاده از تکنیک‌های بیولوژی مولکولی استاندارد را با اهمیت‌تر

## References

- Derrick EH. "Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Rev Infect Dis* 1983; 5 (4): 790-800. PubMed PMID: 6622891.
- Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12 (4): 518-53. PubMed PMID: 10515901. Pubmed Central PMCID: 88923.
- Angelakis E, Raoult D. Q Fever. *Vet Microbiol* 2010; 140 (3-4): 297-309. PubMed PMID: 19875249.
- Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, Weinstein RA. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis* 2003; 3 (11): 709-21. PubMed PMID: 14592601.
- Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson WC, et al. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 (9): 5455-60. PubMed PMID: 12704232. Pubmed Central PMCID: 154366.
- Woldehiwet Z. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. *Res Vet Sci* 2004; 77 (2): 93-100. PubMed PMID: 15196898.
- Minnick MF, Raghavan R. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Adv Exp Med Biol* 2012; 984: 231-48. PubMed PMID: 22711635.
- Amano K, Williams JC, McCaul TF, Peacock MG. Biochemical and immunological properties of *Coxiella burnetii* cell wall and peptidoglycan-protein complex fractions. *J Bacteriol* 1984; 160 (3): 982-8. PubMed PMID: 6501233. Pubmed Central PMCID: 215806.
- Bashiribod H, Rahbarian N, Eslami G, Kazemi B, Jannatsharif E, Mahmoudirad M, et al. [Prevalence of *Coxiella burnetii* in Human, Animal Hosts and Hard Ticks in West Mazandaran Province Iran, 2003-4]. *Pejouhesh* 2008; 32 (3): 253-7. [Persian].
- Daiter AB. [Transovarial and transpermal transmission of *Coxiella burnetii* by the tick *Hyalomma asiaticum* and its role in the ecology of Q-rickettsiosis]. *Parazitologija* 1977; 11 (5): 403-11. PubMed PMID: 909725. Transovarial'naia i transpermal'naia peredachi *Coxiella burnetii* kleshchom *Hyalomma asiaticum* i ikh rol' v ekologii Ku-rikketsioza.
- Howe D, Mallavia LP. *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. *Infect Immun* 2000; 68 (7): 3815-21. PubMed PMID: 10858189. Pubmed Central PMCID: 101653.
- Khalili M, Shahabi-nejad N, Aflatoonian M. [Q fever a forgotten disease in Iran]. *Journal of Kerman University of Medical Sciences* 2011; 18 (1): 93-7. [Persian].
- Howe GB, Loveless BM, Norwood D, Craw P, Waag D, England M, et al. Real-time PCR for the early detection and quantification of *Coxiella burnetii* as an alternative to the murine bioassay. *Mol Cell Probes* 2009; 23 (3-4): 127-31. PubMed PMID: 19284978.
- Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (7): 1823-34. PubMed PMID: 9650920. Pubmed Central PMCID: 104936.
- Scola BL. Current laboratory diagnosis of Q fever. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002; 13 (4): 257-62. PubMed PMID: 12491231.
- Rodolakis A. Q fever, state of art: Epidemiology, diagnosis and prophylaxis. *Small ruminant research* 2006; 62 (1): 121-4.
- Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, et al. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol* 2006; 6: 2. PubMed PMID: 16423303. Pubmed Central PMCID: 1360083.
- Soleimani M, Majidzadeh A, Mohseni A, Khalili M. Analytical specificity and sensitivity determination of 16SrRNA gene based diagnostic polymerase chain reaction (PCR) for molecular detection of *Coxiella burnetii*. *African Journal of Microbiology Research* 2012; 7 (36): 6532-6.
- Rolain JM, Raoult D. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in blood and sera during Q fever. *QJM* 2005; 98 (8): 615-7; author reply 7-20. PubMed PMID: 16027172.
- Aboudharam G, Lascola B, Raoult D, Drancourt M. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in dental pulp during experimental bacteremia. *Microbial pathogenesis* 2000; 28 (4): 249-54.

## Review on the Laboratory diagnosis of Q-Fever

Raziyeh Zabihi<sup>1</sup>, Keyvan Majidzadeh<sup>2</sup>, Amir Hossein Mohseni<sup>3</sup>, \*Mohammad Soleimani<sup>4</sup>

Received: 29 Jul 2013

Accepted: 5 Nov 2013

### Abstract

**Background:** *Coxiella burnetii* is the etiologic agent of a zoonotic disease which named Q-fever in humans and coxiellosis in animals. This bacterium can survive in the environment out of the specific host. Accordingly, it categorized by the CDC in bioterrorism agents 'category B. Consequently, rapid detection of the bacterium administrates the treatment of disease.

**Materials and Methods:** A review study on the different researches on laboratory diagnosis field in the world and Iran scientific databases was conducted. This paper includes biological safety, cultivation and detection assays.

**Results:** Detection of *Coxiella burnetii* can be done by classical methods (isolation, cultivation in the appropriate cell line such as P388D1, J774, and L929), serologic tests (immunofluorescence, micro immunofluorescence, complement fixation test and ELISA) and molecular biology methods (PCR, Nested PCR and Real Time PCR).

**Conclusions:** While have existed kinds of detection methods for this agent, costly, need to specific laboratory and time consuming are the limitation of the mentioned techniques. Molecular methods due to accuracy and high rapidity in detection can be effective.

**Keywords:** Q fever; *Coxiella burnetii*; Clinical Laboratory Techniques

1- Researcher, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

2- Assistant Professor, Tasnim Biotechnology of Research Center (TBRC), AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Researcher, Tasnim Biotechnology of Research Center (TBRC), AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- (\*Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Tel: +98 912 5449334

E-mail: soleimanidr@yahoo.com