Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 22:07 +0430 on Saturday March 24th 2018

مقاله مروری

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال یازدهم ● شماره ۴ ● صفحات ۳۸۳ تا ۳۸۸ ● زمستان ۱۳۹۲

مروری بر روش‌های تشخیص آزمایشگاهی بیماری تب کیو

راضیه ذبیحی[۱]، کیوان مجید زاده[۲]، امیرحسین محسنی[۳]، *محمد سلیمانی[۴]

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 کاملا 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، نمونه گیری و روشهای آزمایشگاهی است.

یافته‌ها: جهت تشخیص باکتری کوکسیلا بورنتی می‌توان از روش‌های کلاسیک (نمونه‌گیری، کشت میکروارگانیسم در رده‌های مناسب سلولی از جمله (P۳۸۸D۱، J۷۷۴ و یا 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

اصطلاح تب کیو در سال ۱۹۳۷ توسط ادوارد هالبروک دریک برای توصیف بیماری تب کارکنان کشتارگاهی در کوئینزلند استرالیا پیشنهاد شد (۱). در سال ۱۹۳۸، هرالد کوکس (Herald Rea Cox) و مک فارلن بورنت (Macfarlane Burnet) گونه جدیدی از ریکتسیا (Ricketsial) را در آزمایشگاهی در کوه‌های راکی (Rocky Mountain Laboratory) واقع در آمریکا، شناسایی کردند و آن را Coxiella burnetii نامیدند. تحقیقات فیلوژنتیکی روی توالی ژن S rRNA۱۶، نشان داد که جنس کوکسیلا مربوط به زیر شاخه گاماپروتئوباکتریا (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 درحیوانات، کوکسیلوزیس (Coxiellosis) نامیده میشود. این عامل، یک باکتری گرم منفی داخل سلولی اجباری است که

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

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 22:07 +0430 on Saturday March 24th 2018

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

کوکسیلا بورنتی میکروارگانیسم 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 میکرمتر قطر داردکه گاهی به شکل دیپلوباسیل نیز در می‌آید. فاقد تاژک و کپسول و در درون سیتوپلاسم سلول میزبان معمولا 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 QpH۱, 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 سر ببرد بطوری‌که 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 ارگانیسم در مدفوع کنه تا ۵۶۸ روز محفوظ می‌ماند.ارگانیسم 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، تقریبا 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 موثر است ولی به نظر می‌رسد ایمنی با واسطه سلول در نهایت، در، از بین بردن عامل نقش مهمتری داشته باشد (۴).

ارگانیسم 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 یاکه فرم عفونت‌زای باکتری است و در خارج سلول یافت می‌شود. واریانت سلولی کوچک در شرایط محیطی تشکیل شده و ارگانیسم را از عوامل نامساعد محیطی مصون داشته و فرم عفونت زا 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 ارگانیسم از ۳ راه تنفسی (آئروسل‌های تنفسی)، گوارشی (خوردن لبنیات آلوده) و پوستی (گزش کنه) است. حیوانات وحشی و چهارپایان (بز، گوسفند و گاو و غیره) مخزن اولیه و طبیعی باکتری هستند.و حیوانات خانگی (سگ و گربه و غیره) مخزن ثانویه می‌باشند. این بیماری توسط بندپایانی مانند کنه (گونه‌های متعدد کنه‌ها از هر دو خانواده ایکسودیده (Ixodidae) و آرگازیده (Argasidae) وجنس‌ها شاملایکسودس (Ixodes)، همافیزالیس (Haemaphysalis)، درماسنتور (Dermacentor)، رییپسفالوس (Rhipicephalus) و ساس، شپش، کک، مگس و پشه انتقال می‌یابد (۲، ۹).انتقال از حیوان به انسان معمولا با انتقال ذرات تنفسی از مایع آمنیوتیک 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 ومدفوع 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 ذات الریه است. علائم آن شامل: تب، خستگی، لرز، سردرد، درد عضلانی، عرق، سرفه، تهوع، استفراغ، درد قفسه سینه، اسهال، راش پوستی، میوکاردیت، پریکاردیت، مننگوانسفالیت و مرگ می‌باشد. از مشخصات تب کیو

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 22:07 +0430 on Saturday March 24th 2018

مزمن 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 کشورهایی 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 نر از نظر حضور آنتی بادی ضد کوکسیلا بورنتی مثبت هستند. مطالعات جیراد و همکارنش 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 شماره‌ی ۱، خلاصه‌ای از تاریخچه یبیماری 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. هم اکنون مرکز تحقیقات زیست فن آوری 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 فن‌آوری تسنیم که در کتب علمی، مجلات معتبر داخلی و خارجی، کنگره‌های علمی داخلی و بین المللی، انتشار یافته است می‌باشد. این مطالعه مروری در ۴ بخش امنیت زیستی، نمونه گیری 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 تنهادر 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 ۵۰ ≤ ۱۰) و پایداری بالای ذرات عفونی (۷ تا ۱۰ روز در دمای ۱۵ تا ۲۰ درجه‌ی سانتی گراد 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 همه گیری‌های 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 بی اهمیت 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 I غیر فعال شده با فرمالین (Q-VAX)، که در استرالیا به کار می‌رود. ۲- واکسن زیر واحدی فاز I حاصل از تیمار با کلروفرم-متانول، که توسط محققین آمریکایی توصیه شده است. ۳- واکسن شیمیایی تب کیو (بدست آمده از سلولهای فاز I به وسیله‌ی تیمار با تری کلرواستیک اسید)، که در کشورهای رومانی و چک اسلواکی سابق توسعه یافته و به

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 22:07 +0430 on Saturday March 24th 2018

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

به علت خطر بالا در ایجاد عفونت بیمارستانی-آزمایشگاهی باید مواد بالقوه عفونی فورا با استفاده از هیپوکلریت ۰/۵ درصد و پراکسید۵ 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، آنوریسم 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 P۳۸۸D۱ و J۷۷۴ ماکروفاژ موش، سلول‌های جنین جوجه، سلول L۹۲۹ فیبروبلاست موش، طحال موش، کوپفرکبد، ماکروفاژ 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 سانتی گراد، 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. ارگانیسم با رنگ آمیزی گرم، گیمسا یا گیمنز به صورت یک میله کوتاه مشخص می‌شود. 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 (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 حاضر، استفاده از روش ایمونوفلورسانس (Immunefluorescence) 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 L۹۲۹ 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 ۵۰ :۱ 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. تقریبا 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 روشدارای 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. الایزا 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 (ID۵۰ ≤ ۱۰) و پایداری ذرات عفونی کننده بسیار زیاد است، بنابراین از سوی CDC

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 22:07 +0430 on Saturday March 24th 2018

در دسته B عوامل بیوتروریستی قرار گرفته است. از سویی، 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 پیش گویی مثبت مناسب و هزینه پایین هستند ولی دارای معایب قابل توجهی نیز می‌باشند. از جمله این که در تشخیص نوع حاد بیماری، کمک کننده نمی‌باشند زیرا آنتی بادی معمولا چند هفته پس از بیماری قابل اندازه گیری 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 بورنتی، تشخیص سریع و آسان آنبا 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 برونتی 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 آجااز مراکز تحقیقاتی پیشرو در کشور در این موضوع بوده است. در مطالعه‌ای که توسط سلیمانی و همکاران که در سال ۲۰۱۲جهت تشخیص باکتری کوکسیلا بورنتی انجام شد، یک تکنیک استاندارد PCRبر اساس ژن ۱۶SrRNA این باکتری راه اندازی شد (۱۸). در مطالعه دیگری که توسط سلیمانی و همکاران در سال ۲۰۱۳انجام 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 سال۲۰۱۳ انجام شد، برای ژن ۱۶SrRNA باکتری کوکسیلا بورنتی، تکنیک SYBR Green Real Time PCR استاندارد، طراحی و راه اندازی شد (در دست چاپ).

لیست برخی از کیت‌های تجاری جهت تشخیص مولکولی باکتری کوکسیلا بورنتی در جدول ۲ آورده شده است.

جهت تشخیص باکتری کوکسیلا بورنتی با استفاده از تکنیک‌های مولکولی، از ژنهای مختلفی از این باکتری از جمله IS۱۱۱۱a، com۱، QpH۱، QpRS، ۱۶S rRNA و سوپراکسید دیسموتاز (sod: superoxide 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 بورنتی 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 بورنتی نشان می‌دهد که در میان ژنهای هدف جهت تشخیص این باکتری، بیشتر از ژن ترانسپوزونی ISIIIIA و com۱ استفاده شده است. این بررسی‌ها نشان داد که که ژن IS از آنجائیکه یک ژن ترانسپوزونی است در برخی از سویه‌های کوکسیلا بورنتی وجود ندارد، مثلا کوکسیلا بورنتی که از UK جدا شده است فاقد توالی IS می‌باشند، در نتیجه، این نکته تشخیص کوکسیلا بورنتی را با محدودیت مواجه می‌کند (۱۷، ۱۹). 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 بورنتی می‌باشد ولی با توجه به مشخص نبودن تعدادکپی‌های آن در کوکسیلاهای مختلف، نمی‌توان از آندر PCR کمی استفاده نمود (۱۹، ۲۰).از سوی دیگر نشان داده شده است که ژن com۱ در مقایسه با ژن ISIIIIA ژن مناسبی جهت تشخیص باکتری کوکسیلا بورنتی می‌باشد (۱۹).

بحث و نتیجه گیری

از آنجایی که باکتری کوکسیلا بورنتی یک باکتری بیماری زای 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 ارگانیسم 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 وقت گیر، پر هزینه و پر خطر است (۲). از سویی 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

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

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 22:07 +0430 on Saturday March 24th 2018

References

1- 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.
2- Maurin M, Raoult D. Q fever. Clin Microbiol Rev 1999; 12 (4): 518-53. PubMed PMID: 10515901. Pubmed Central PMCID: 88923.
3- Angelakis E, Raoult D. Q Fever. Vet Microbiol 2010; 140 (3-4): 297-309. PubMed PMID: 19875249.
4- 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.
5- 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.
6- Woldehiwet Z. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. Res Vet Sci 2004; 77 (2): 93-100. PubMed PMID: 15196898.
7- Minnick MF, Raghavan R. Developmental biology of Coxiella burnetii. Adv Exp Med Biol 2012; 984: 231-48. PubMed PMID: 22711635.
8- 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.
9- 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].
10- Daiter AB. [Transovarial and transspermal transmission of Coxiella burneti by the tick Hyalomma asiaticum and its role in the ecology of Q-rickettsiosis]. Parazitologiia 1977; 11 (5): 403-11. PubMed PMID: 909725. Transovarial’naia i transspermal’naia peredachi Coxiella burneti kleshchom Hyalomma asiaticum i ikh rol’ v ekologii Ku-rikketsioza.
11- 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.
12- 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].
13- 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.
14- 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.
15- Scola BL. Current laboratory diagnosis of Q fever. Semin Pediatr Infect Dis 2002; 13 (4): 257-62. PubMed PMID: 12491231.
16- Rodolakis A. Q fever, state of art: Epidemiology, diagnosis and prophylaxis. Small ruminant research 2006; 62 (1): 121-4.
17- 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.
18- 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.
19- 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.
20- 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.

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 22:07 +0430 on Saturday March 24th 2018

Review on the Laboratory diagnosis of Q-Fever

Raziyeh Zabihi[1], Keyvan Majidzadeh[2], Amir Hossein Mohseni[3], *Mohammad Soleimani[4]

Received: 29 Jul 2013 Accepted: 5 Nov 2013

Abstract

Background: Coxiella burnetii is the etiologicagent 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 bacteriumadministratesthe 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 byclassical 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