Bi-quarterly Journal of
Animal health and infectious diseases
Volume 1, Number 1
Journal homepage: https://jahid.lu.ac.ir/
DOI: 01.01.01/JAHID/2308-1000

Molecular identification of *Escherichia coli* in ticks isolated from domestic animals in West Azerbaijan province

Mohammad Masoudi [1], Abdolghaffar Ownagh [1], Ahmad Enferadi [1]

1. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Background and Aim: *E.coli* is a rod-shaped Gram-negative bacterium of the Enterobacteriaceae family; Normally, it is an important part of the healthy intestinal tract of humans and warm-blooded animals. It can live in airy or non-airy environments. *Escherichia coli* bacteria can be transmitted through contaminated water or food or contact with animals and people and cause a wide range of infections and cause diarrhea. Hard ticks are obligate blood-feeding parasites that transmit a wide variety of pathogenic microorganisms and cause significant economic losses. Any hard biting human tick is a vector for a different set of infectious agents. They can carry various pathogens and cause important human and animal diseases. Some types of *Escherichia coli* bacteria can cause urinary tract infection, respiratory disease and pneumonia and other diseases. *Escherichia coli* bacteria consists of a diverse group of bacteria. *Escherichia coli* pathogenic strains are classified by pathotype. Six pathotypes are associated with diarrhea and are collectively known as diarrheal *Escherichia coli* bacteria. The aim of this research is to investigate the *16SrRNA* and *papC* genes of *E.coli* bacteria in ticks isolated from domestic animals in West Azarbaijan province.

Materials and Methods: In this research, 350 hard ticks were classified and identified based on diagnostic keys to investigate *E.coli* bacteria in hard ticks. A total of 350 hard ticks including 173 species of *Hyalomma* and 177 species of *Rhipicephalus* were identified. The samples were divided into 70 mixtures based on the tick species and DNA was extracted from the ticks.

Results: Pathogens transmitted by ticks were detected using PCR and the samples were examined for the presence of *E.coli* bacteria. The results showed that *Ripicephalus* ticks with 7 (n=36; 19.44%; 95% Cl: 9.75%-35.02%) and *Hyaloma* ticks with 6 (n=34; 25%; 95% Cl: 12%-44.90%) infection showed *Escherichia coli* bacteria.

Conclusion: The findings show that these pathogens are transmitted by different species of hard ticks. Ticks and tick-borne diseases are a major public health concern worldwide.

Keywords: West Azerbaijan, tick, PCR, *E.coli*

Received:2023/22/08 **Accepted: 2024/21/01** **Published Online:2024.25.01**

Corresponding Information: *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*
Email: a.ownagh@urmia.ac.ir, ownagh@yahoo.com

Copyright © 2023, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usage with proper citation.

دو فصلنامه
بهداشت و بیماری های عفونی دام
سال ۱ ، شماره ۱
صفحه مجله: https://jahid.lu.ac.ir/

شناسایی مولکولی *اشرشیا کلی* در کنه‌های جداشده از حیوانات اهلی استان آذربایجان غربی

محمد مسعودی[۱]، عبدالغفار اونق[۱]، احمد انفرادی [۱]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: *اشریشیا کولی* باکتری گرم منفی میله‌ای‌شکلی از خانوادهٔ انتروباکتریاسه است؛ به‌طور معمول بخش مهمی از دستگاه رودهٔ سالم انسان و حیوانات خون گرم را شامل می‌شود. می‌تواند در محیط‌های دارای هوا یا بدون‌هوا زندگی کند. باکتری *اشریشیاکلی* می‌تواند ازطریق آب یا غذای آلوده یا تماس با حیوانات و افراد منتقل شده و گسترهٔ وسیعی از انواع عفونت‌ها را ایجاد کند و باعث اسهال شود. کنه‌های سخت، انگل‌های اجباری تغذیه‌کنندهٔ خون هستندکه انواع بیشتری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را منتقل می‌کنند و باعث خسارات اقتصادی چشمگیری می‌شوند. هرگونه کنهٔ سخت انسان گزندهٔ ناقلی برای مجموعهٔ متفاوتی از عوامل عفونی است. آن‌ها می‌توانند پاتوژن‌های مختلفی را حمل کنند و باعث بیماری‌های مهم انسانی و دامی شوند. برخی از انواع باکتری‌های *اشریشیاکلی* می‌توانند باعث عفونت مجاری ادراری، بیماری تنفسی و ذات‌الریه و سایر بیماری‌ها شوند. جنس *اشریشیا*، از نظر بیماریزایی متنوع است. سویه‌های بیماری‌زا باکتری *اشریشیاکلی* به پاتوتیپ های مختلف طبقه‌بندی می‌شوند. شش پاتوتیپ با اسهال مرتبطند و درمجموع به‌عنوان باکتری *اشریشیاکلی* اسهالی شناخته می‌شوند. هدف از این تحقیق بررسی ژن‌های *16SrRNA* و *papC* باکتری *E.coli* در کنه‌های جداشده از حیوانات اهلی استان آذربایجان غربی است.

مواد و روش ها: در این پژوهش برای بررسی باکتری *E.coli* در کنه‌های سخت، ۳۵۰ کنهٔ سخت بر اساس کلیدهای تشخیصی طبقه‌بندی و شناسایی شدند. در مجموع ۳۵۰ کنهٔ سخت شامل ۱۷۳ گونه *هیالوما* (*Hyalomma*) و ۱۷۷ گونه *ریپی سفالوس* (*Rhipicephalus*) شناسایی شد. نمونه‌ها بر اساس جنس کنه به ۷۰ مخلوط تبدیل شدند و DNA از کنه‌ها استخراج شد.

یافته ها: پاتوژن‌های منتقل‌شده به‌وسیلهٔ کنه‌ها با استفاده از PCR تشخیص داده شدند و نمونه‌ها ازنظر وجود باکتری *E.coli* بررسی شدند. نتایج نشان داد که کنه‌های گونهٔ *ریپی سفالوس* با (n=36; 19.44%; 95% CI: 9.75%-35.02%) ۷ و کنه‌های (n=34; 25%; 95% CI: 12%-44.90%) ۶ آلودگی به باکتری *اشریشیاکلی* را نشان داد.

نتیجه گیری: یافته‌ها نشان‌دهندهٔ این است که این پاتوژن‌ها به‌وسیلهٔ گونه‌های مختلف کنه‌های سخت منتقل می‌شوند. کنه‌ها و بیماری‌های منتقل‌شده از طریق کنه نگرانی مهمی برای بهداشت عمومی در سراسر جهان هستند.

کلیدواژه ها: آذربایجان غربی، کنه، PCR، *اشریشیاکلی*

دریافت: ۱۴۰۲/۵/۳۱ ***پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱*** ***انتشار انلاین: ۱۴۰۲/۱۱/۰۵***

اطلاعات نویسنده مسئول: **عبدالغفار اونق**، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

Email: a. ownagh@urmia.ac.ir , ownagh@yahoo.com

حق چاپ © ۲۰۲۳، این یک مقاله با دسترسی آزاد اصلی است که تحت شرایط Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License توزیع شده است که اجازه کپی و توزیع مجدد مطالب را فقط در استفاده غیرتجاری با استناد مناسب می دهد.

کلیات

اعضای خانوادهٔ انتروباکتریاسه، باکتری‌های گرم منفی هستند که در دستگاه گوارش انسان، حیوانات، گیاهان، حشرات، آب، خاک و مواد درحال فساد یافت می‌شوند. از آنجایی‌که زیستگاه طبیعی این خانواده رودهٔ انسان و حیوانات است به آن‌ها باسیل‌های روده‌ای یا انتریک نیز گفته می‌شود. بعضی از اعضای این خانواده نظیر *سالمونلا (salmonella)*، *یرسینیا (Yersinia)* و *شیگلا (Shigella)* پاتوژن واقعی هستند (۱). درحالی‌که برخی دیگر مانند بعضی از سویه‌های *اشریشیاکلی (Escherichia coli)*، *پروتئوس (Proteus)* و *کلبسیلا (Klebsiella)* جزو فلور طبیعی انسان و حیوانات بوده و فقط در شرایط خاصی باعث ایجاد بیماری می‌شوند (۲).

باکتری اشریشیاکلی را برای اولین‌بار پزشک آلمانی تئودور اشریش در طی مطالعاتش بر روی فلور نرمال رودهٔ اطفال، شناسایی کرد. وی در سال ۱۸۸۵، ارگانیسم مشاهده‌شده را *باکتریوم‌کلی* نامید و آن را به‌عنوان عامل بیماری‌زای اصلی عفونت‌های روده‌ای و نیز برخی از عفونت‌های خارج روده‌ای معرفی کرد. نام *باکتریوم‌کلی* به‌طور گسترده تا سال ۱۹۱۹ بکار می‌رفت؛ تا زمانی که کاستلانی و کالمرز جنس *اشریشیا* را تعریف کردند و نام *اشریشیاکلی* را برای آن انتخاب کردند (۳). *اشریشیاکلی* به عنوان باکتری شاخص جهت انجام آزمایش‌های کنترلی، مؤثر بودن عوامل ضدمیکروبی و مواد ضدعفونی‌کننده استفاده می‌شود و همچون ارگانیسم اندیکاتور برای تعیین آلودگی مدفوعی در مواد غذایی، آب و محیط مطرح است و نقش مهمی به‌عنوان فلور میکروبی رودهٔ انسان و حیوانات دارد. برای اولین‌بار طبقه‌بندی *اشریشیاکلی* براساس تیپ‌های متفاوتی از آنتی‌ژن سوماتیک O به‌دست کافمن در سال ۱۹۴۰ انجام شد (۴).

باکتری *اشریشیاکلی* که باعث ایجاد بیماری می‌شود اغلب بسته به نوع حیوان خاص و نوع بیماری اختصاصی است. این باکتری‌ها بسته به بیماری‌های خاص عوامل حدت ویژه‌ای تولید می‌کنند که برای ایجاد بیماری نیاز است. فاکتورهای بیماری‌زایی باکتری موردنیاز برای مهاجرت و آلوده کردن میزبان و برای مبارزه با مکانیسم های دفاعی میزبان شامل تاژک‌ها، سموم، فیمبریه، پروتئین‌های اتصالی به سلول‌های میزبان، کپسول پلی‌ساکاریدی و آنتی‌ژن و ترشح مکانیسم‌های مقاومت در برابر سیستم‌های کمپلمان میزبان یا سیستم جذب آهن است. عوامل حدت به وسیلهٔ باکتری‌ها به‌طور مداوم تولید نمی‌شود و فقط با سیگنال‌های خاص که از میزبان یا محیط زیست دریافت می‌شود، ژن‌ها فعال می‌شوند (۵). *اشریشیا کلی* بسته به سویه‌های خود می‌تواند انواع گوناگونی از سموم را با فعالیت‌های مختلف تولید کند که از آن‌ها می‌توان به انتروتوکسین‌های حساس به حرارت (LT) و مقاوم به حرارت (ST) ، سموم شیکا و نکروزان سیتوتوکسیک عوامل ۱ و ۲ (۶، ۷) اشاره کرد. سویه *اشرشیاکلی* انتروهموراژیک سم شیگا را تولید می‌کند. سویهٔ انتروتوکسیژنیک معمولاً دو انتروتوکسین، LT و ST تولید می‌کنند که در پاتوژنز *اشرشیاکلی* نقش چشمگیری ایفا می‌کند. *اشرشیاکلی* تولیدکننده CNF2 گاو شایع است. بسیاری از باکتری‌های این گونه همچنین تولید فیمبریه F17b و اروباکتین می‌کنند که در مقابل سیستم‌های دفاعی بدن میزبان مقاومند. گونه‌های CNFI مثبت به‌طور معمول از عفونت خارج روده‌ای جدا شده و به‌طور عمده برای فیمبریه‌ها از نوع P و خانواده fimbrial S و یا خانواده آلفا مثبت‌اند (۸). پیلی P، پیلی مقاومت به مانوز یا پیلی مرتبط با پیلونفریت نیز نامیده می‌شود که توسط اپرون بسیار حفاظت شده (*papA-K*)*pap* کد می‌شود. پیلی P برای ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری فوقانی ضروری است و بیان‌ژنpap را عوامل متعدد محیطی و تغذیه‌ای سخت تنظیم می‌کنند. ژن *papC* که ژنی کاملاً حفاظت‌شده است، یک پروتئین غشای خارجی را بیان می‌کند و منفذی را در طول غشا برای عبور پیلی تشکیل می‌دهد (۲۷).

کنه‌های سخت انگل‌های اجباری تغذیه‌کننده خونند که انواع بیشتری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را منتقل می‌کنند و باعث خسارات اقتصادی قابل‌توجهی می‌شوند (۹)، تنوع زیادی در گونهٔ غالب کنه در مناطق مختلف ایالات متحده وجود دارد (۸، ۱۰). هرگونه کنهٔ سخت انسان‌گزنده، ناقلی برای مجموعهٔ متفاوتی از عوامل عفونی است. آن‌ها می‌توانند پاتوژن‌های گوناگونی را حمل کنند و باعث بیماری‌های مهم انسانی و دامی شوند (۲). چندین قطعهٔ مهم از چرخهٔ زندگی کنهٔ سخت وجود دارد. اول، در هریک از زمان‌های تغذیه، دریافت یک وعدهٔ غذایی خون برای بقای کنه ضروری است. اگر کنه در هریک از این زمان‌های مهم رشد نتواند میزبانی پیدا کند، وارد مرحلهٔ بعدی رشد نمی‌شود و درنتیجه می‌میرد. و این پیامدهای جالبی برای کنترل بیماری دارد (۱۱). اگر یکی از جمعیت‌های میزبان ازنظر تئوری از بین می‌رفت، کنه‌ها نمی‌توانستند خون دریافت کنند و ازاین‌رو می‌مردند. نکتهٔ دیگری که درمورد چرخهٔ زندگی باید به آن توجه کرد، این است که هر کنه از حیوانات مختلفی تغذیه می‌کند، اما انسان می‌تواند در هریک از مراحل تغذیهٔ کنه آلوده شود. بنابراین اگرچه کنه‌ها معمولاً از حیوانات اهلی و وحشی تغذیه می‌کنند، اما می‌توانند از انسان تغذیه کنند و این امر گسترش بیماری را تسهیل می‌کند (۱۲).

کنه‌های سخت شامل ۷۰۲ گونه در ۱۴ جنس هستند (۱۳). جنس‌ها در آسیا، اروپا و آفریقا رایج است. کنه‌های سخت اهمیت پزشکی، دامپزشکی و اقتصادی دارند؛ زیرا ناقل بسیاری از این پاتوژن‌ها هستند. آن‌ها باعث بیماری‌های حیوانی و انسانی مانند تب ساحل شرقی، *آناپلاسموز*، *بابزیوز*، *ریکتزیا*، می‌شود. بیماری *لایم*، *تب کیو*، تب لکه‌دار کوه راکی، و تب خون‌ریزی‌دهنده کریمه-کنگو و چندین پاتوژن باکتریایی عوامل بیماری‌زا را منتقل می‌کنند (۱۴).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

کنه به تعداد ۳۵۰عدد از سطح دام (گوسفند و بز) در فصل‌های بهار و تابستان ۱۴۰۱ از محیط دامداری‌های گوناگون استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شد. نمونه‌های کنه در الکل ۹۶ درصد به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه ارومیه انتقال داده شدند. پس از تشخیص جنس و گونهٔ کنه براساس کلیدهای تشخیصی در زیر لوپ، به بخش میکروبیولوژی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه ارومیه انتقال داده شدند (۲۶).

استخراج DNA

استخراج DNA و انجام مراحل PCR جهت شناسایی جنس *اشریشیاکلی* در کنه‌ها انجام شد (۱۵). به‌منظور استخراج DNA از نمونه‌های کنه، بعد از فیکس و خشک کردن کنه با ازت مایع، نمونه‌ها با تیغ اسکالپر به‌طور کامل خُرد شد و به میکروتیوپ ۲ سی‌سی انتقال داده شد و سپس استخراج با کیت ستونی (DNA extraction kit from tissue and blood RXNS) شرکت بیوتکنولوژی ایران استفاده شد که روش کار به‌شرح زیر است.

قبل از شروع به استخراج، کنهٔ تکه تکه شده در مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر هموژنیزه‌کننده قرار داده شد و درنهایت ۲۰۰ میکرولیتر از این محلول برای استخراج به میکروتیوپ جدید انتقال داده شد.

۱- به میزان ۲۵۰ میکرولیتر از بافر لیز A به همراه مقادیر مناسبی از نمونهٔ بافت به میکروتیوب اضافه کرده و به شدت به‌مدت پنج ثانیه بر روی ورتکس مخلوط شد و در دمای اتاق به‌مدت پنج دقیقه انکوبه گردید.

۲- به میزان ۲۵۰ میکرولیتر از بافر لیز B به همراه ۱۰ میکرولیتر از حامل به میکروتیوپ اضافه شد و به‌مدت پنج ثانیه بر روی ورتکس مخلوط شد و در دمای اتاق به‌مدت پنج دقیقه انکوبه شد.

۳- به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از بافر لیز C به میکروتیوپ اضافه کرده و به‌مدت پنج ثانیه بر روی ورتکس مخلوط شد و در دمای اتاق به‌مدت پنج دقیقه انکوبه شد.

۴- به میزان ۳۰۰ میکرولیتر از بافر رسوب‌دهنده به میکروتیوپ اضافه کرده و به‌آرامی با حرکت دست مخلوط شد و در دمای منفی ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انکوبه گردید.

۵- محتوای میکروتیوپ را به ستون‌های استخراج DNA اضافه کرده و به‌مدت دو دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و در ادامه در دور۳۵۰۰ و به‌مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد.

۶- ستون را به کالکشن تیوپ جدید منتقل کرده و به میزان ۵۰۰ میکرولیتر بافر شست‌وشو اضافه شد و در ادامه در دور۳۵۰۰ و به‌مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد.

۷- ستون را به کالکشن تیوپ جدید منتقل کرده و به میزان ۴۰ میکرولیتر آب مقطر DNase/RNase free اضافه شد و به‌مدت دو دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، دمای آب مقطر باید ۶۰ درجه سانتی‌گراد باشد تا جداسازی DNA بهتر انجام شود.

۸- در ادامه ستون‌ها در دور RPM 12000 و به‌مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول به‌دست‌آمده، حاوی DNA بود که تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت اطمینان از روش استخراج و ارزیابی میزان غلظت DNA به‌صورت تصادفی، جذب نوری تعداد ۱۰ نمونه از نمونه‌های استخراج‌شده توسط (NanoDrop 2000c Thermo Scientific, USA) در طول موج ۲۶۰ قرائت شد و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ (DNA/protein) نیز تعیین شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

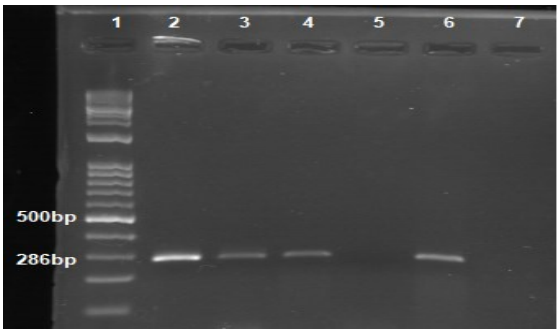
برای شناسایی جنس جدایه‌های *اشریشیاکلی* از ژن *16SrRNA* و *papC* استفاده شد، آغازگرها در این پژوهش به‌وسیلهٔ نرم‌افزار AmplifX(version 1.5.4) طراحی شدند. برنامه‌های دمایی براساس جدول شماره ۱ آورده شده است. برنامه دمایی ژن *16S rRNA* شامل؛ واسرشت‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه، ۳۸ سیکل، واسرشت‌سازی ۹۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه اتصال پرایمرها ۵۸ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، طویل سازی ۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه و طویل سازی نهایی ۷ دقیقه. توالی آغازگرهای *16S rRNA* به ترتیب شامل رفت و برگشت با طول قطعه ۲۸۶ جفت باز بودند 5′- GCAGTGGGGAATATTGCACA-3′، 3′-

TCAGATGCAGTTCCAGGTT-5′. همچنین توالی آغازگرهای ژن *papC* به ترتیب شامل آغازگر رفت و برگشت با طول قطعه ۹۸۳ جفت بازی بودند 5′-TTGTCAGGAGATAAGGCAG-3′، 3′-GCATTATAATCACCGGCAA-5′

جدول ۱. برنامه و سیکل‌های دمایی PCR جهت شناسایی ژن‌های *papC*.

تعداد چرخه	زمان	دما	مرحله		
۱	۶ دقیقه	۹۵	واسرشت سازی اولیه		
۳۵	۶ دقیقه	۹۵	واسرشت سازی	Normal PCR	*papC*
	۱ دقیقه	۵۳	چسبیدن پرایمر		
	۱ دقیقه	۷۲	توسعه		
۱	۱۰ دقیقه	۷۲	توسعه نهایی		

واکنش PCR در ۲۵ میکرولیتر شامل چهار میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با ۱۲/۵میکرولیتر مخلوط اصلی انجام شد و حجم کل با آب مقطر استریل تکمیل شد. PCR طبق جدول ۱ در ترمو سایکلر (Quanta Biotech، انگلستان) تعریف شد. و محصولات PCR برروی ژل آگارز ۲ درصد حاوی رنگ safe stain (Labnet، ENDURO، ایالات متحده آمریکا) الکتروفورز شدند و سپس با استفاده از Genius Gel Documentation، (Syngene Bio-Imaging) UK مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: تصویر الکتروفورز ژن *16srRNA* جنس *E.coli* در ژل آگاروز ، چاهک ۱ مارکر (bp ۱۰۰)، چاهک‌ها ۲، ۳، ٤ و ٦ مثبت و چاهک شماره ۵ نمونه منفی، چاهک ۷ کنترل منفی

آنالیز فیلوژنی

توالی‌های نوکلئوتیدی هرگونه از قسمت‌های مختلف برای موقعیت‌های تنوع در یک راستا قرار گرفتند. توالی‌ها برای جست‌وجوی مشابه‌ترین توالی‌های مرجع در NCBI آپلود شدند و موقعیت COI با کمک BLAST، موجود در NCBI تعیین شد. از مجموع توالی‌های COI متعلق به باکتری *اشرشیاکلی* موجود در بانک ژن برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک استفاده شد (۱۶). تراز به‌صورت دستی ویرایش شد تا هرگونه خطای تراز را با استفاده از ابزار تراز Clustal W حذف کند و به‌عنوان فایل‌های فرمت MEGA و FASTA صادر شد. تمام توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده با شماره‌های الحاقی اختصاص داده شده در GenBank سپرده شدند. پس از آن، رابطهٔ فیلوژنتیکی با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی ML با استفاده از تجزیه و تحلیل ژنتیک تکاملی مولکولی MEGA، نسخهٔ۱۱ بررسی و ساخته شد. آنالیزهای پلی‌مورفیسم توالی DNA برای تعیین تنوع نوکلئوتیدی با استفاده از MEGA نسخهٔ ۱۱ و نرم‌افزار Blastn برآورد شد (۱۷).

یافته‌ها

درمجموع ۳۵۰ کنهٔ سخت (۱۷۳ گونه *هیالوما* (*Hyalomma*) و ۱۷۷ *رپیی سفالوس* (*Rhipicephalus*) از استان آذربایجان غربی، منابع مختلف مانند گوسفند و بز جمع‌آوری شد (جدول ۴). با استفاده از میکروسکوپ، دو جنس کنه‌های سخت با توجه به ویژگی‌های خارجی، بود یا نبود فستون، کانال دهانهٔ رحم، محافظ مقعدی، محافظ جانبی و رنگ اسکوتوم شناسایی شد. نتایج نشان داد که از ۱۷۳ نمونه کنهٔ *هیالوما* و ۱۷۷کنه *رپی‌سفالوس* که به‌صورت استخر پنج‌تایی با تفکیک جنس نر و ماده که جمعاً ۷۰ استخر از مجموع کنه‌ها که ۴۶ استخر نر و ۲۴ استخر ماده بودند (رپی‌سفالوس ۲۴ استخر نر و ۱۲ استخر ماده) و در (جنس هیالوما ۲۲ استخر نر و ۱۲ استخر ماده). بعد از انجام مراحل PCR نشان داد که تعداد پنج استخر از ۲۴ حوضچه و دو حوضچه از ۱۲ استخر به ترتیب در جنس کنه‌های نر و ماده در جنس کنهٔ رپی‌سفالوس و درحالی‌که در جنس کنهٔ هیالوما چهار نمونه استخر نر و دو نمونه استخر ماده نسبت به وجود باکتری *اشریشیاکلی* مثبت بودند که برحسب درصد و ضریب ۹۵ درصد در جدول شماره ۴ آورده شده است. برای هیچ‌یک از نمونه‌ها ژن *papC* مثبت نبود.

کنه‌ها					
16srRNA (95%Cl)	جنس	مخلوط شده	شماره	گونه کنه‌ها	تعداد کنه‌ها
4/18(22.22%) 4 (n=18; 22.22%; 95%Cl: 9%-45.21%)	نر	۱۸	۸۷	*ربی سفالوس سانگوئینس*	۱۴۱
1/8(12.50%) 1 (n=8; 12.50%; 95%Cl: 2.24%-47.09%)	ماده	۸	۴۰		
1/6(16.67%) 1 (n=6; 16.67%; 95%Cl: 3.01%-56.35%)	نر	٦	۳۰	*ربی‌سفالوس تورانیکوس*	٦۳
1/4(25%) 1 (n=4; 25%; 95%Cl: 4.56%-69.94%)	ماده	٤	۲۰		
1/6(16.67%) 1 (n=6; 16.67%; 95%Cl: 3.01%-56.35%)	نر	٦	۳۳	*هیالوما آسیاتیکوم*	٥٦
0/4(0.0%) 0 (n=4; 0%; 95%Cl: 0%-48.99%)	ماده	٤	۱۷		
2/9(33.33%) 2 (n=9; 22.22%; 95%Cl: 6.32%-54.74%)	نر	۹	۴۵	*هیالوما اجیتیوم*	۸۲
1/4(25 %) 1 (n=4; 25 %; 95%Cl: 4.56%-69.94%)	ماده	٤	۲۰		
1/7 (14.29%) 1 (n=7; 14.29%; 95%Cl: 2.57%-51.32%)	نر	۷	۳۷	*هیالوما آناتولیکوم*	۷۰
1/4(25 %) 1 (n=4; 25%; 95%Cl: 2.57%-69.94%)	ماده	٤	۲۱		
9/46(19.57%) 9 (n=46; 19.57%; 95%Cl: 10.65%-33.18%)	نر	۴۶	۲۳۲	جمع	
4/24(16.67%) 4 (n=24; 16.67%; 95%Cl: 6.68%-35.86%)	ماده	۲۴	۱۱۸		
13 (n=70; 18.57%; 95%Cl: 11.19%-29.22%)		۷۰	۳۵۰		

جدول۲- نتایج آلودگی نمونه کنه‌های جمع آوری شده از سطح بز و گوسفند در استان آذربایجان غربی

یافته‌های آنالیز فیلوژنی

بر اساس یافته‌های این مطالعه تولی‌های بدست آمده مربوط به باکتری جنس *اشریشیاکلی* بوده و در مقاسیه با توالی‌های موجود در پایگاه داده GenBank®، هویت نکلئوتیدی و query cover (QC) ۱۰۰ درصد را نشان داد. و با شماره OR350847 در NCBI ثبت گردیده است. شناسایی‌های مولکولی با جداسازی متمایز کلادهای خاص گونه‌ای که از آنالیزهای فیلوژنتیک استنباط شده‌اند پشتیبانی می‌شوند (شکل ۲).

شکل۲: درخت فیلوژنتیکی توالی‌های ژن *16srRNA* جنس *E.coli* به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر و آن‌هایی که در GenBank از شماره‌های مختلف الحاقی سپرده شده‌اند. شماره‌های الحاقی بعد از نام‌های جدا شده نشان داده می‌شوند. توالی‌های ژن *16srRNA* به دست آمده در این مطالعه با فلش پررنگ نشان داده شده اند. درخت با استفاده از برنامه MEGA v.11 استنباط شد. مقادیر بوت استرپ در هر نقطه شاخه نشان داده شده است. اعداد بالای شاخه منعکس کننده پشتیبانی بوت استرپ از ۱۰۰۰ تکرار هستند. تمام سایت‌های تراز حاوی درجه حذف یا داده های از دست رفته از تجزیه و تحلیل حذف شدند.

بحث

باکتری *اشریشیاکلی* (*E.coli*) به‌طور معمول در رودۀ انسان و حیوانات زندگی می‌کند. بیشتر *اشریشیا کولی‌ها* بی‌ضررند و درواقع بخش مهمی از دستگاه رودۀ سالم انسان هستند. با

این‌حال، برخی از آن‌ها بیماری‌زایند؛ به این معنی که می‌توانند باعث بیماری، اسهال یا بیماری خارج از دستگاه روده شوند (۴).

شیوع بیماری‌های مشترک انسان و دام و سایر عفونت‌ها به‌دلیل گسترش مهاجرت‌های انسانی و تغییرات آب‌و هوایی جهانی درحال‌افزایش است. پاتوژن‌های منتقله از کنه، به‌ویژه در کشورهای دارای آب و هوای معتدل خطرناک‌اند و باید اقدامات پیشگیرانه جدی در برابر این عفونت‌ها انجام شود. نتایج این پژوهش با مطالعه‌ای که توسط Heaney در سال۲۰۱۲ انجام شد، مطابقت دارد؛ زیرا مطالعهٔ وی اهمیت کنه را در انتقال بیماری به انسان و حیوان نشان داده است و این اهمیت شامل سه مرحلهٔ مهم است. اول، آن‌ها می‌توانند از حیوان میزبانی که آلوده است تغذیه کنند و پاتوژن را در خون میزبان بخورند. دوم، کنه‌ها می‌توانند انتقال ازطریق تخمدان را در بیشتر بیماری‌ها انجام دهند. این بدان معنی است که کنهٔ ماده می‌تواند عامل بیماری زا را به فرزندان خود منتقل کند. سوم، تغذیهٔ هم‌زمان یا تغذیهٔ چند کنه به‌طور هم‌زمان از یک میزبان، می‌تواند باعث عفونت شود. بنابراین، کنه‌ها در هر مرحله از زندگی خود می‌توانند ناقل بیماری باشند و هر بار که کنه به یک وعدهٔ غذایی خون نیاز دارد، انسان در معرض خطر ابتلا به این بیماری است (۱۲).

گونه‌های کنهٔ *هیالوما* و *ریپی‌سفالوس* باعث گزش، استرس و از دست دادن خون در میزبان می‌شوند. معمولاً دام‌ها و حیوانات خانگی تعداد کمی از کنه‌ها را به‌خوبی تحمل می‌کنند، اما هجوم ده‌ها یا صدها کنه می‌تواند حیوانات مبتلا را بسیار ضعیف کند و باعث کاهش وزن، کاهش باروری و کاهش تولید شیر شود (۱۸). چندین ویژگی کنه می‌تواند به‌عنوان ناقل عوامل بیماری‌زا معرفی شود، دامنهٔ وسیع میزبان و تمایل آن‌ها به تغذیه از چندین میزبان در طول چرخهٔ زندگی آن‌ها فرصت کافی برای جذب و انتقال عوامل بیماری‌زا را تضمین می‌کند (۱۹).

گونهٔ *ریپی‌سفالوس* شایع‌ترین کنه در جهان است و به‌عنوان ناقل بسیاری از پاتوژن‌ها بز، گوسفند و انسان شناخته‌شده است. این کنه‌ها را نیز در حیواناتی می‌توان یافت که در مناطق شهری و روستایی زندگی می‌کنند، برای زندگی در خانه‌های انسانی بسیار سازگارند و در طول سال، نه‌تنها در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری، بلکه در برخی مناطق معتدل نیز فعالند (۲۰).

این کنه‌های سخت نشان‌دهنده مهم‌ترین گروه ناقلان بندپایان برای حیوانات وحشی و اهلی و همچنین برای انسان هستند. آن‌ها دامنهٔ گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها و تک‌یاخته‌ها را منتقل می‌کنند (۲۱). در مطالعه حاضر، باکتری *اشریشیاکلی* از کنه‌های جنس *ریپی‌سفالوس* و *هیالوما* جدا شد. که مطابق با نتایج Mohanad and Moaed, 2012 پژوهشی که در بصرهٔ عراق انجام شد، نشان داد کنه‌هایی که از گوسفند جدا کرده بودند به باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه آلودگی داشتند.

مطالعه‌ای که توسط Kirecci و همکاران در سال ۲۰۱۳، انجام شده بود نیز نشان داد که گونه‌های *باسیلوس* به‌عنوان شایع‌ترین پاتوژن جداشده از گونه‌های *هیالوما* جمع‌آوری شده از لاک‌پشت‌ها بوده است (۵).

پژوهش دیگری که Orkun و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام دادند، نشان داد که از مجموع ۱۶۹ کنه، ۳۵ کنه *همافیسالیس* (*Haemaphysalis parva*) ، ۳۰ کنهٔ *هیالوما مارجیناتوم* (*Hyalomma marginatum*) ، ۲۸ کنه *ریپی‌سفالوس تورانیکوس* (*Rhipicephalus turanicus*) ، کنه ۲۵ *درماسنتور مارجیناتوس* (*Dermacentormarginatus*) ، ۱۷ کنه هیالوما ایکس کاواتیوم (*H. excavatum*) ، ۱۶ کنه *هیالوما اجتیوم* (*H.aegyptium*) ، ۶ کنه پوره *هیالوما*، ۳ کنه *هیالوما پانکتاتا* (*Ha. Punctata*) ، ۳ کنه *ریپی‌سفالوس بورسا* (Rh. Bursa) ، ۲ کنه *ریپی سفالوس سانگوئینس* (*Rh. Sanguineus*) ، ۲ کنه *ایکسودس ریسینوس* (*Ixodes ricinus*) ، و ۱ کنه از جنس *همافیسالیس* (*Haemaphysalis*) از انسان در مناطق مختلف آنکارا، در ترکیه جمع‌آوری شده، بیشترین نوع کنه جمع‌آوری شدهٔ مربوط به جنس کنه‌های *هیالوما* و *ریپی‌سفالوس* است (۲۲). در مطالعه حاضر، درمجموع ۳۵۰ کنهٔ سخت، ۱۷۳ گونهٔ *هیالوما* و ۱۷۷ گونهٔ *ریپی‌سفالوس* از گوسفند و بز در استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شد و نشان داد که بیشترین آلودگی به باکتری *اشریشیاکلی* مربوط به جنس *ریپی‌سفالوس* است و همچنین نشان داده شد که در بین جنس نر و ماده ، بیشتر آلودگی به *اشریشیاکلی* مربوط به کنه‌های نر است که این به‌دلیل دفعات بیشتر خون‌خواری و تنوع بیشتر در میزبان کنه‌های نر است(۲۳). در پژوهشی نظارتی که چهار سال در ایالات متحده به طول انجامید، ۶۶.۰۰۰ نوع کنه و گونه‌های *ریکتسیا* (*Rickettsia*) ، بعنوان یک گونهٔ باکتریایی مهم بیماری‌زا، در این کنه‌ها شناسایی شدند (۱۰).

پژوهش حاضر نشان داد که کنه‌های جنس *هیالوما* و *ریپی‌سفالوس* می‌توانند پاتوژن *اشریشیاکلی* که باکتری مهم و بیماری‌زایی در انسان و دام است را انتقال دهند و بعد از شناسایی با روش مولکولی PCR و انجام مراحل تعیین توالی و پس از هم‌ترازی و ثبت آن در بانک ژنی NCBI با شمارهٔ

الحاقی (OR350847) با رسم درخت فیلوژنی بیشترین تشابه ژنی با جنس *اشریشیاکلی* را نشان داد.

کنه‌های سخت می‌توانند ناقل بیماری‌های انسانی مانند *CCHV*، فلج کنه و بیماری لایم باشند. در این مطالعه، ویروس‌ها و پاتوژن‌های غیرقابل‌کشت بررسی نشدند، بااین‌حال، باکتری *اشریشیاکلی*، پاتوژن بسیار مهمی برای انسان به‌شمار می‌رود. باکتری *اشریشیاکلی* می‌تواند باعث گاستروانتریت و مشکلات دستگاه ادراری در انسان شود (۲۴).

کنه‌ها ازجنس *هیالوما* به‌عنوان ناقل ویروس‌هایی مانند تب *خون‌ریزی‌دهندهٔ کنگو* (*CCHFV*) شناخته می‌شوند. اگرچه بسیاری از گونه‌ها در انتقال بیماری دخالت ندارند، اما تعداد قابل توجهی گونه‌های *هیالوما* وجود دارد. یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی که به‌وسیلهٔ این کنه منتقل می‌شود، *تب کریمه کنگو* است که در مناطق وسیعی از آفریقا، آسیا و اروپا رخ می‌دهد و می‌تواند باعث مرگ‌ومیر بالا شود (۲۵).

نتیجه‌گیری

کنه‌های سخت خطرناک‌ترین بندپایانی هستند که سلامت مهره‌داران را به خطر می‌اندازند و یا آن‌ها را تهدید می‌کنند و می‌توانند بیشترین تنوع پاتوژن‌ها را هم به انسان و هم حیوانات منتقل کنند. کنه‌های سخت می‌توانند بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا را به مهره‌داران انتقال دهند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه هستند. در این تحقیق آلودگی به *اشریشیاکلی*در کنه‌های سخت (جنس *هیالوما* و *رپی سفالوس*) با روش PCR شناسایی و توالی‌یابی شد.

تقدیر و تشکر

از معاونت محترم پژوهشی و تولید که تصویب و پشتیبانی مالی این پروژه را عهده‌دار بوده‌اند تشکر می‌شود.

تضاد منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچگونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع مالی

این تحقیق بخشی پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه ارومیه می‌باشد.

منابع

1. Woodford N, Wareham DW, Guerra B, Teale C. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2014;69(2):287-9.۱
2. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clinical infectious diseases. 2001;32(6):897-928.
3. Pick K, Ju T, Willing BP, Raivio TL. Isolation and characterization of a novel temperate Escherichia coli bacteriophage, Kapi1, which modifies the O-antigen and contributes to the competitiveness of its host during colonization of the murine gastrointestinal tract. Mbio. 2022;13(1):e02085-21.
4. Mahon CR LD, Manuselis Jr G. Textbook of diagnostic Microbiology. 4 ed: W.B. Sanders Company; 2010.
5. Kirecci E, Wasan M, Metin T, Bawar A, Omer A, Rızgar M. Isolation and identification of tick-borne bacterial pathogens in Turkey and Iraq. Afr J Microbiol Res. 2015;9(24):1608-12.
6. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. Parasitology. 2004;129(S1):S3-S14.
7. Uilenberg G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. Veterinary parasitology. 1995;57(1-3):19-41.
8. StromdahlE, Hickling G. Beyond Lyme: Aetiology of tick-borne human diseases with emphasis on the South-Eastern United States. Zoonoses and public health. 2012;59:48-64.
9. Ostfeld RS, Price A, Hornbostel VL, Benjamin MA, Keesing F. Controlling ticks and tick-borne zoonoses with biological and chemical agents. Bioscience. 2006;56(5):383-94.
10. Merten HA, Durden LA. A state-by-state survey of ticks recorded from humans in the United States. Journal of Vector Ecology. 2000;25(1):102-13.
11. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerging infectious diseases. 2011;17(10):1791.
12.. Heaney M, Cannon CJ. Transforming the Bodleian: Walter de Gruyter; 2012.
13. Barker S, Murrell A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. Parasitology. 2004;129(S1):S15-S36.
14. Olwoch JM, Van Jaarsveld A, Scholtz CH, Horak IG. Climate change and the genus Rhipicephalus (Acari: Ixodidae) in Africa. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 2007.۷۲-٤٥:(۱)۷٤;

pathogens in ticks feeding on humans in Turkey. PLoS neglected tropical diseases. 2014;8(8):e3067.
23. Williams RC, Sumner SS, Golden DA. Inactivation of Escherichia coli O157: H7 and Salmonella in apple cider and orange juice treated with combinations of ozone, dimethyl dicarbonate, and hydrogen peroxide. Journal of Food Science. 2005;70(4):M197-M201.
24. Gargili A, Estrada-Peña A, Spengler JR, Lukashev A, Nuttall PA, Bente DA. The role of ticks in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A review of published field and laboratory studies. Antiviral research. 2017;144:93-119.
25. Sadek JR, Pergam SA, Harrington JA, Echevarria LA, Davis LE, Goade D, et al. Persistent neuropsychological impairment associated with West Nile virus infection. Journal of clinical and experimental neuropsychology. 2010;32(1):81-7.
26. Enferadi A, Ownagh A, Tavassoli M. Molecular Detection of Borrelia spp. in Ticks of Sheep and Goats by Nested PCR Method in West Azerbaijan Province, Iran. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2023 Sep 19.
27. Farzin, H. R., Ghaniei, A., Jamshidian Mojaver, M., & Amir, M. (2022). Investigation of the prevalence of virulence and antibiotic resistance genes in Escherichia coli isolated from ostriches and human urinary tract infections. *Veterinary Research & Biological Products*, *35*(1), 92-100.
15. Mohammed RR, Enferadi A, Sidiq KR, Sarani S, Khademi P, Jaydari A, et al. Molecular Detection of Francisella tularensis Isolated from Ticks of Livestock in Kurdistan Region, Iraq. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2023.
16. Al-Awaida W ,Al-Ameer HJ, Al-Turk H, Al Bawareed O, Khalil R, Al Deek A, et al. Psychological effects of quarantine on Syrian refugees, compared to the Jordanian populations. International Migration. 2022;60(1):219-27.
17.. Abdel-Rahman EH, Abdelgadir M, AlRashidi M.Ectoparasites burden of House mouse (Mus musculus linnaeus, 1758) from Hai'l region, Kingdom of Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences. 2020;27(9):2238-44.
18. Jia W, Chen S, Chi S, He Y, Ren L, Wang X. Recent progress on tick-borne animal diseases of veterinary and public health significance in China. Viruses. 2022;14(2):355.
19. Brown NF, Vallance BA, Coombes BK, Valdez Y, Coburn BA, Finlay BB. Salmonella pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. PLoS pathogens . :(٣)١;٢٠٠٥e32.
20. Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. Parasites & vectors. 2010;3(1):1-11.
21. Cabezas-Cruz A, Valdés JJ. Are ticks venomous animals? Frontiers in zoology. 2014;11(1):1-18.
22. Orkun Ö, Karaer Z, Çakmak A, Nalbantoğlu S. Identification of tick-borne