



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

ABSTRACT

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% CI: 9.75%-35.02%) and *Hyaloma* ticks with 6 (n=34; 25%; 95% CI: 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: 2024/25/01

Published Online:2024.21.01

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.



شناسایی مولکولی/شرشیا کلی در کنه های جدا شده 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: شرشیا کلی باکتری گرم منفی میله ای شکلی از خانواده انتروباکتریاسه است؛ به طور معمول بخش مهمی از دستگاه روده سالم انسان و حیوانات خون گرم را شامل می شود. می تواند در محیط های دارای هوا یا بدون هوا زندگی کند. باکتری/شرشیا کلی می تواند از طریق آب یا غذای آلوده یا تماس با حیوانات و افراد منتقل شده و گستره وسیعی از انواع عفونت ها را ایجاد کند و باعث اسهال شود. کنه های سخت، انگل های اجباری تغذیه کننده خون هستند که انواع بیشتری از میکروارگانیسم های بیماری زا را منتقل می کنند و باعث خسارات اقتصادی چشمگیری می شوند. هرگونه کنه سخت انسان گزنده ناقلی برای مجموعه متفاوتی از عوامل عفونی است. آن ها می توانند پاتوژن های مختلفی را حمل کنند و باعث بیماری های مهم انسانی و دامی شوند. برخی از انواع باکتری های/شرشیا کلی می توانند باعث عفونت مجاری ادراری، بیماری تنفسی و ذات الریه و سایر بیماری ها شوند. جنس/شرشیا، از نظر بیماری زایی متنوع است. سویه های بیماری زا باکتری/شرشیا کلی به پاتوتیپ های مختلف طبقه بندی می شوند. شش پاتوتیپ با اسهال مرتبطند و در مجموع به عنوان باکتری/شرشیا کلی اسهالی شناخته می شوند. هدف از این تحقیق بررسی ژن های *16SrRNA* و *papC* باکتری *E.coli* در کنه های جدا شده از حیوانات اهلی استان آذربایجان غربی است.

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

یافته ها: پاتوژن های منتقل شده به وسیله کنه ها با استفاده از PCR تشخیص داده شدند و نمونه ها از نظر وجود باکتری *E.coli* بررسی شدند. نتایج نشان داد که کنه های گونه ریپی سفالوس با (n=36; 19.44%; 95% CI: 9.75%-35.02%) و کنه های (n=34; 25%; 95% CI: 12%-44.90%) آلودگی به باکتری/شرشیا کلی را نشان داد.

نتیجه گیری: یافته ها نشان دهنده این است که این پاتوژن ها به وسیله گونه های مختلف کنه های سخت منتقل می شوند. کنه ها و بیماری های منتقل شده از طریق کنه نگرانی مهمی برای بهداشت عمومی در سراسر جهان هستند.

کلیدواژه ها: آذربایجان غربی، کنه، PCR، شرشیا کلی

انتشار آنلاین: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۵

دریافت: ۱۴۰۲/۵/۳۱

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 غیر تجاری با استناد مناسب می دهد.

کلیات

اعضای خانواده انتروباکتریاسه، باکتری‌های گرم منفی هستند که در دستگاه گوارش انسان، حیوانات، گیاهان، حشرات، آب، خاک و مواد در حال فساد یافت می‌شوند. از آنجایی که زیستگاه طبیعی این خانواده روده 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 اولین بار پزشک آلمانی تئودور اشیریش در طی مطالعاتش بر روی فلور نرمال روده اطفال، شناسایی کرد. وی در سال ۱۸۸۵، ارگانیسم مشاهده‌شده را *باکتریوم کلی* نامید و آن را به‌عنوان عامل بیماری‌زای اصلی عفونت‌های روده‌ای و نیز برخی از عفونت‌های خارج روده‌ای معرفی کرد. نام *باکتریوم کلی* 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* به‌عنوان باکتری شاخص جهت انجام آزمایش‌های کنترلی، مؤثر بودن عوامل ضد میکروبی و مواد ضد عفونی‌کننده استفاده می‌شود و همچون ارگانیسم اندیکاتور برای تعیین آلودگی مدفوعی در مواد غذایی، آب و محیط مطرح است و نقش مهمی به‌عنوان فلور میکروبی روده انسان و حیوانات دارد. برای اولین بار 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 مورد نیاز برای مهاجرت و آلوده کردن میزبان و برای مبارزه با مکانیسم‌های دفاعی میزبان شامل تاژک‌ها، سموم، فیمبریه، پروتئین‌های اتصال به سلول‌های میزبان، کپسول پلی‌ساکارییدی و آنتی‌ژن و ترشح مکانیسم‌های مقاومت در برابر سیستم‌های کمپلمان میزبان یا سیستم جذب آهن است. عوامل حدت به وسیله باکتری‌ها به‌طور مداوم تولید نمی‌شود و فقط با سیگنال‌های خاص که از میزبان یا محیط زیست دریافت می‌شود، ژن‌ها فعال می‌شوند (۵). *اشریشیاکلی*

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)، اشاره کرد. سویه *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک سم شیکا را تولید می‌کند. سویه انتروتوکسیژنیک معمولاً دو انتروتوکسین، LT و ST تولید می‌کنند که در پاتوژنز *اشریشیاکلی* نقش چشمگیری ایفا می‌کند. *اشریشیاکلی* تولیدکننده CNF2 گاو شایع است. بسیاری از باکتری‌های این گونه همچنین تولید فیمبریه F17b و اروباکتین می‌کنند که در مقابل سیستم‌های دفاعی بدن میزبان مقاومت می‌کنند. گونه‌های CNFI مثبت به‌طور معمول از عفونت خارج روده‌ای جدا شده و به‌طور عمده برای فیمبریه‌ها از نوع P و خانواده fimbrial S مثبت‌اند (۸). پیلی P، پیلی مقاومت به مانوز یا پیلی مرتبط با پیلونفریت نیز نامیده می‌شود که توسط اپرون بسیار حفاظت شده *pap(papA-K)* کد می‌شود. پیلی P برای ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری فوقانی ضروری است و بیان ژن *pap* 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 خوندند که انواع بیشتری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را منتقل می‌کنند و باعث خسارات اقتصادی قابل توجهی می‌شوند (۹)، تنوع زیادی در گونه غالب کنه در مناطق مختلف ایالات متحده وجود دارد (۸، ۱۰). هرگونه کنه سخت انسان‌گزنده، ناقلی برای مجموعه متفاوتی از عوامل عفونی است. آن‌ها می‌توانند پاتوژن‌های گوناگونی را حمل کنند و باعث بیماری‌های مهم انسانی و دامی شوند (۲). چندین قطعه مهم از چرخه زندگی کنه سخت وجود دارد. اول، در هریک از زمان‌های تغذیه، دریافت یک وعده غذایی خون برای بقای کنه ضروری است. اگر کنه در هریک از این زمان‌های مهم رشد نتواند میزبانی پیدا کند، وارد مرحله بعدی رشد نمی‌شود و در نتیجه می‌میرد. و این پیامدهای جالبی برای کنترل بیماری دارد (۱۱). اگر یکی از جمعیت‌های میزبان از نظر تئوری از بین می‌رفت، کنه‌ها نمی‌توانستند خون دریافت کنند و از این رو می‌مردند. نکته دیگری که در مورد چرخه زندگی باید به آن توجه کرد، این است که هر کنه از حیوانات مختلفی تغذیه می‌کند، اما انسان می‌تواند در هریک از مراحل تغذیه 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).

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

۴- به میزان ۳۰۰ میکرولیتر از بافر رسوب‌دهنده به میکروتیوپ اضافه کرده و به آرامی 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 به مدت دو دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و در ادامه در دور ۳۵۰۰ و به مدت 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 دور ۳۵۰۰ و به مدت 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 به مدت 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 به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول به دست آمده، 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 به صورت تصادفی، جذب نوری تعداد ۱۰ نمونه از نمونه‌های استخراج شده توسط (NanoDrop 2000c Thermo Scientific, USA) در طول موج ۲۶۰ قرائت شد و نسبت (DNA/protein) ۲۶۰/۲۸۰ نیز تعیین شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

برای شناسایی جنس جدایه‌های /شیرشیاکلی از ژن *16SrRNA* و *papC* استفاده شد، آغازگرها در این پژوهش به وسیله نرم‌افزار AmplifX (version 1.5.4) طراحی شدند. برنامه‌های دمایی براساس جدول شماره ۱ آورده شده است. برنامه دمایی ژن *16S rRNA* شامل؛ واسرش‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۳۸ سیکل، واسرش‌سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه اتصال پرایمرها ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، طولیل سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و طولیل 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'-

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، آناتلاسموز، بابریوز، ریکتتیا، 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 ۳۵۰ عدد 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 دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انتقال داده شدند. پس از تشخیص جنس و گونه کنه براساس کلیدهای تشخیصی در زیر لوپ، به بخش میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انتقال داده شدند (۲۶).

استخراج DNA

استخراج DNA و انجام مراحل PCR جهت شناسایی جنس /شیرشیاکلی در کنه‌ها انجام شد (۱۵). به منظور استخراج DNA از نمونه‌های کنه، بعد از فیکس و خشک کردن کنه با ازت مایع، نمونه‌ها با تیغ اسکالپر به طور کامل خرد 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 به شرح زیر است.

قبل از شروع به استخراج، کنه تکه تکه شده در مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر هموژنیزه‌کننده قرار داده شد و در نهایت 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 نمونه بافت به میکروتیوپ اضافه کرده و به شدت به مدت پنج ثانیه بر روی ورتکس مخلوط شد و در دمای اتاق به مدت پنج دقیقه انکوبه گردید.

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

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/شرشیاکی 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 FASTA و MEGA صادر شد. تمام توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده با شماره‌های الحاقی اختصاص داده شده در GenBank سپرده شدند. پس از آن، رابطه فیلوژنتیکی با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی ML با استفاده از تجزیه و تحلیل ژنتیک تکاملی مولکولی MEGA، نسخه ۱۱ بررسی و ساخته شد. آنالیزهای پلی‌مورفیسم توالی DNA برای تعیین تنوع نوکلئوتیدی با استفاده از MEGA نسخه ۱۱ و نرم‌افزار Blastn برآورد شد (۱۷).

یافته‌ها

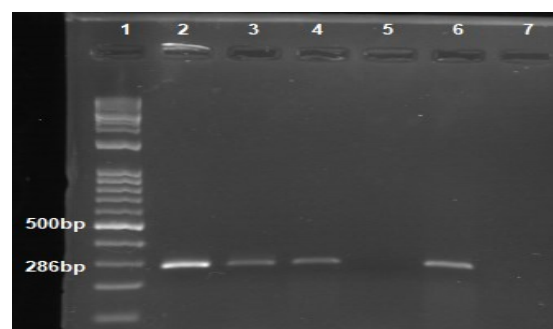
در مجموع ۳۵۰ کنه سخت (۱۷۳ گونه هیالوما (*Hyalomma*) و ۱۷۷ ریپی سفالوس (*Rhipicephalus*) از استان آذربایجان غربی، منابع مختلف مانند گوسفند و بز جمع‌آوری شد (جدول ۴). با استفاده از میکروسکوپ، دو جنس کنه‌های سخت با توجه به ویژگی‌های خارجی، بود یا نبود فستون، کانال دهانه رحم، محافظ مقعدی، محافظ جانبی و رنگ اسکوتوم شناسایی شد. نتایج نشان داد که از ۱۷۳ نمونه کنه هیالوما و ۱۷۷ کنه ریپی سفالوس 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 (ریپی سفالوس 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 کنه ریپی سفالوس و درحالی‌که در جنس کنه هیالوما چهار نمونه استخر نر و دو نمونه استخر ماده نسبت به وجود باکتری/شرشیاکی مثبت بودند که برحسب درصد و ضریب ۹۵ درصد در جدول شماره ۴ آورده شده است. برای هیچ‌یک از نمونه‌ها ژن *papC* مثبت نبود.

همچنین توالی 5'-TCAGATGCAGTTCCAGGTT- 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	واش‌ساز سازی اولیه
۳۵	۶ دقیقه	۹۵	واش‌ساز سازی
	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 ۱۲/۵ میکرولیتر 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 بر روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی رنگ ENDURO (Labnet)، 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 (۱۰۰ bp)، چاهک‌ها ۲، ۳، ۴ و ۶ مثبت و چاهک شماره ۵ نمونه منفی، چاهک ۷ کنترل منفی

آنالیز فیلوژنی



کنه‌ها					
تعداد	گونه کنه‌ها	شماره	مخلوط شده	جنس	<i>16srRNA</i> (95%CI)
۱۴۱	رپی سفالوس	۸۷	۱۸	نر	4/18(22.22%) 4 (n=18; 22.22%; 95%CI: 9%-45.21%)
	سانکونیس	۴۰	۸	ماده	1/8(12.50%) 1 (n=8; 12.50%; 95%CI: 2.24%-47.09%)
۶۳	رپی سفالوس	۳۰	۶	نر	1/6(16.67%) 1 (n=6; 16.67%; 95%CI: 3.01%-56.35%)
	تورانیکوس	۲۰	۴	ماده	1/4(25%) 1 (n=4; 25%; 95%CI: 4.56%-69.94%)
۵۶	هیالوما	۳۳	۶	نر	1/6(16.67%) 1 (n=6; 16.67%; 95%CI: 3.01%-56.35%)
	آسیانیکوم	۱۷	۴	ماده	0/4(0.0%) 0 (n=4; 0%; 95%CI: 0%-48.99%)
۸۲	هیالوما	۴۵	۹	نر	2/9(33.33%) 2 (n=9; 22.22%; 95%CI: 6.32%-54.74%)
	اجینیوم	۲۰	۴	ماده	1/4(25%) 1 (n=4; 25%; 95%CI: 4.56%-69.94%)
۷۰	هیالوما	۳۷	۷	نر	1/7 (14.29%) 1 (n=7; 14.29%; 95%CI: 2.57%-51.32%)
	آناتولیکوم	۲۱	۴	ماده	1/4(25%) 1 (n=4; 25%; 95%CI: 2.57%-69.94%)
جمع		۲۳۲	۴۶	نر	9/46(19.57%) 9 (n=46; 19.57%; 95%CI: 10.65%-33.18%)
		۱۱۸	۲۴	ماده	4/24(16.67%) 4 (n=24; 16.67%; 95%CI: 6.68%-35.86%)
		۳۵۰	۷۰		13 (n=70; 18.57%; 95%CI: 11.19%-29.22%)

جدول ۲- 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/شریشیاکی بوده و در مقاسیه با توالی‌های موجود در پایگاه داده GenBank®، هویت نکلوتیدی 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).

بحث

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

شکل ۲: 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.1.1 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.

مطالعه حاضر، باکتری /شریشیاکلی از کنه‌های جنس *ریبی‌سفالوس* و *هیالوما* جدا شد. که مطابق با نتایج Mohanad and Moaed, 2012 پژوهشی که در بصره 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 کنه *هیالوما مارجیناتوم* (*Hyalomma marginatum*)، ۲۸ کنه *ریبی‌سفالوس تورانیکوس* (*Rhipicephalus turanicus*)، ۲۵ کنه *درماستور مارجیناتوس* (*Dermacentor marginatus*)، ۱۷ کنه *هیالوما ایکس کاواتیوم* (*H. excavatum*)، ۱۶ کنه *هیالوما اجیپتیوم* (*H. aegyptium*)، ۶ کنه پوره *هیالوما*، ۳ کنه *پانکتاتا* (*Ha. Punctata*)، ۳ کنه *ریبی‌سفالوس بورس* (*Rh. Bursa*)، ۲ کنه *ریبی‌سفالوس سانگوئینوس* (*Rh. Sanguineus*)، ۲ کنه *ایکسودس ریسنیوس* (*Ixodes ricinus*)، و ۱ کنه از جنس *همافیسالیس* (*Haemaphysalis*) از انسان در مناطق مختلف آنکارا، در ترکیه جمع‌آوری شده، بیشترین نوع کنه جمع‌آوری شده مربوط به جنس کنه‌های *هیالوما* و *ریبی‌سفالوس* است (۲۲). در مطالعه حاضر، در مجموع ۳۵۰ کنه سخت، ۱۷۳ گونه *هیالوما* و ۱۷۷ گونه *ریبی‌سفالوس* از گوسفند و بز در استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شد و نشان داد که بیشترین آلودگی به باکتری /شریشیاکلی مربوط به جنس *ریبی‌سفالوس* است و همچنین نشان داده شد که در بین جنس نر و ماده، بیشتر آلودگی به /شریشیاکلی مربوط به کنه‌های نر است که این به دلیل دفعات بیشتر خون‌خواری و تنوع بیشتر در میزبان کنه‌های نر است (۲۳). در پژوهشی نظارتی که چهار سال در ایالات متحده به طول انجامید، ۶۶۰۰۰ نوع کنه و گونه‌های *ریکتسیا* (*Rickettsia*)، بعنوان یک گونه باکتریایی مهم بیماری‌زا، در این کنه‌ها شناسایی شدند (۱۰).

پژوهش حاضر نشان داد که کنه‌های جنس *هیالوما* و *ریبی‌سفالوس* می‌توانند پاتوژن /شریشیاکلی 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 شماره

این حال، 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 به دلیل گسترش مهاجرت‌های انسانی و تغییرات آب و هوایی جهانی در حال افزایش 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 سال ۲۰۱۲ انجام شد، مطابقت دارد؛ زیرا مطالعه وی اهمیت کنه را در انتقال بیماری به انسان و حیوان نشان داده است و این اهمیت شامل سه مرحله مهم است. اول، آن‌ها می‌توانند از حیوان میزبانی که آلوده است تغذیه کنند و پاتوژن را در خون میزبان بخورند. دوم، کنه‌ها می‌توانند انتقال از طریق تخمدان را در بیشتر بیماری‌ها انجام دهند. این بدان معنی است که کنه ماده می‌تواند عامل بیماری‌زا را به فرزندان خود منتقل کند. سوم، تغذیه هم‌زمان یا تغذیه 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 وعده غذایی خون نیاز دارد، انسان در معرض خطر ابتلا به این بیماری است (۱۲).

گونه‌های کنه *هیالوما* و *ریبی‌سفالوس* 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، دامنه وسیع میزبان و تمایل آن‌ها به تغذیه از چندین میزبان در طول چرخه زندگی آن‌ها فرصت کافی برای جذب و انتقال عوامل بیماری‌زا را تضمین می‌کند (۱۹).

گونه *ریبی‌سفالوس* شایع‌ترین کنه در جهان است و به‌عنوان ناقل بسیاری از پاتوژن‌ها بز، گوسفند و انسان شناخته شده 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، نه تنها 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 دامنه گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها و تک‌یاخته‌ها را منتقل می‌کنند (۲۱). در

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.
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 E, 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. 2007.۷۲-۴۵:(۱)۷۴;

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

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

کنه‌ها از جنس *هیالوما* به‌عنوان ناقل ویروس‌هایی مانند تب خون‌ریزی‌دهنده 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 به‌وسیله 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 منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع مالی

این تحقیق بخشی پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه ارومیه می‌باشد.

- 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* . : (7)1; 2000:e32.
 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