Veterinary Clinical Pathology, Vol.15, No. 57, Spring 2021

"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2021.1917167.1287**

Determination of infestation rate of Ixodidae ticks to *Theileria annulata* in Urmia region by polymerase chain reaction (PCR)

Nematollahi, A.[1*], Panahi, I.[2]

1- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2- M.S. Graduated of Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[*]Corresponding author's email: anemat@tabrizu.ac.ir
(Received: 2020/12/21 Accepted: 2021/4/6)

Abstract

Theileriosis is one of the most important protozoan parasitic diseases in Iran that causes economic losses and mortality in livestock. The disease is transmitted by Ixodid ticks and is characterized by fever, anemia, anoxia and eventually death. Diagnosis of the disease was previously based on staining of blood and lymph node samples by Giemsa method. The use of molecular methods is preferred over previous methods due to their high sensitivity and specificity. Due to the fact that Ixodid ticks that can carry the disease are found in many traditional Iranian farms, it is very important to identify and introduce these ticks. The aim of this study was molecular identification of *Theileria annulata* infection in ticks isolated from cows in Urmia region. A total of 100 ticks from herds with a history of *Theileria annulata* infection in the area were collected and transferred to the laboratory. Ticks were identified using diagnostic keys. Salivary glands of ticks were separated and analyzed by PCR after isolation using *Theileria annulata* specific primer (N516, N517). Out of 100 ticks, ten genera and species including *Hyalomma anatolicum anatolicum* (33%), *Hy. detritum* (16%), *Boophylus anulatus* (16%), *Dermacentor marginatum* (14%), *Rhipicephalus bursa* (9%), *Hy. anantolicum excavatum* (7%), *D. niveus* (4%) and *Haemaphysalis punctate* (1%) were identified. The predominant tick was identified as *Hyalomma anatolicum anatolicum*. PCR test showed the presence of 721 bp specific band on agarose gel in 62% of tick samples. The high rate of infection in vector mites in the area indicates their high potential for infection of cows with the agent of *Theileria annulata*.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Cattle, PCR, *Theileria annulata*, Tick, Urmia.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2021.1917167.1287

تعیین میزان آلودگی به *تیلریا آنولاتا* در کنه‌های ایکسودیده در منطقه ارومیه به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

احمد نعمت‌الهی[1*]، ایرج پناهی[2]

۱- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: anemat@tabrizu.ac.ir

(دریافت مقاله: //پذیرش نهایی: //)

چکیده

تیلریوز یکی از بیماری‌های مهم انگلی تک‌یاخته‌ای در ایران می‌باشد که باعث بروز ضررهای اقتصادی و مرگ‌ومیر در دام‌ها می‌شود. این بیماری توسط کنه‌های خانواده ایکسودیده منتقل می‌شود و با تب، کم‌خونی، آنوکسی و نهایتاً مرگ دام همراه است. تشخیص بیماری سابقاً بر اساس رنگ‌آمیزی نمونه‌های خونی و غدد لنفاوی با روش گیمسا انجام می‌پذیرفت. استفاده از روش‌های مولکولی به دلیل بالا بودن حساسیت و ویژگی نسبت به روش‌های قبلی ارجحیت دارد. به‌دلیل این‌که در دامداری‌های سنتی ایران کنه‌های ایکسودیده که می‌توانند ناقل بیماری باشند به‌فراوانی یافت می‌شوند، شناسایی این کنه‌ها اهمیت فراوان دارد. این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی آلودگی به تیلریا در کنه‌های جداشده از گاوهای منطقه ارومیه انجام پذیرفت. تعداد ۱۰۰ کنه از گله‌های با تاریخچه آلودگی به تیلریا در منطقه جمع‌آوری و با استفاده از کلیدهای تشخیص شناسایی شدند. از مجموع ۱۰۰ کنه مورد آزمایش، تک‌یاخته‌های انگلی هیالوما *آناتولیکوم آناتولیکوم* (۳۳ درصد)، *هیالوما دیتریتوم* (۱۶ درصد)، *بووفیلوس آنولاتوس* (۱۶ درصد)، *درماسنتور مارژیناتوم* (۱۴ درصد)، *ریپیسفالوس بورسا* (۹ درصد)، *هیالوما آناتولیکوم اکسکاواتوم* (۷ درصد)، *درماسنتور نیووس* (۴ درصد) و *همافیزالیس پونکتاتا* (۱ درصد) شناسایی شدند. کنه غالب *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* تشخیص داده شد. غدد بزاقی کنه‌ها پس از جداسازی با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی مربوط به گونه *تیلریا آنولاتا* (N516 و N517) مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. آزمایش PCR وجود باند اختصاصی با اندازه ۷۲۱ bp ناشی از وجود *تیلریا آنولاتا* را روی ژل آگارز در ۶۲ درصد کنه‌ها مشخص ساخت. میزان بالای آلودگی در کنه‌های ناقل موجود در منطقه پتانسیل بالای آن‌ها را در راه آلودگی گاوها به عامل *تیلریا آنولاتا* را می‌رساند.

کلیدواژه‌ها: *تیلریا آنولاتا*، کنه، ارومیه، گاو، PCR.

مقدمه

بیماری تیلریوزیس یکی از بیماری‌های خطرناک تک یاخته‌ای نشخوار کنندگان اهلی است. ابتلا به این انگل هرساله در صنعت دامداری ایران و جهان باعث بروز علائم بیماری، افت تولیدات دامی و مرگ‌ومیر و در نتیجه خسارات اقتصادی فراوان می شود. این بیماری توسط کنه‌های سخت از دام‌های آلوده به دام‌های حساس منتقل می‌گردد. انتقال در کنه‌ها به روش بیولوژیکی و مرحله به مرحله است و یا به عبارت دیگر گونه‌های کنه‌های ناقل در یک مرحله (مرحله نوزادی یا مرحله نوچه‌ای) به تیلریا آنولاتا آلوده شده و در مرحله دیگر (مرحله نوچه‌ای یا بالغ) بیماری را به حیوان سالم منتقل می‌نمایند. تک‌یاخته تیلریا باید در بدن کنه تغییراتی حاصل نموده و به فرم فعال و عفونی‌زا بنام اسپرزوئیت تبدیل شده و همراه با بزاق کنه به دام سالم تزریق گردد. تاکنون انتقال مکانیکی و انتقال بیماری توسط سایر بندپایان و حشرات گزارش نشده‌است (Mehlhorn *et al*., 1994). گونه‌های متنوعی از جنس تیلریا در حیوانات، موجد بیماری هستند که *تیلریا آنولاتا* مهم‌ترین گونه‌ای است که در گاوان ایران ایجاد بیماری می‌کند. این گونه توسط کنه‌های هیالوما (Hyalomma spp.) منتقل می‌شود. گونه‌های *هیالوما دتریتوم* (*Hyalomma detritum*)، *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* (*Hyalomma anatolicum anatolicum*)، *آناتولیکوم اکسکاواتوم* (*Hyalomma anatolicum excavatum*) و هیالوما مارژیناتوس (*Hyalomma marginatus*) مهم‌ترین گونه‌های ناقل این بیماری در گاوان ایران می‌باشند (Tavassoli *et al*., 2011). تشخیص بیماری تیلریوزیس در گاو با تکیه بر علائم بیماری، شامل تب، کم‌خونی، پتشی در مخاطات، بزرگی غدد لنفاوی، زردی، آنوکسی و نهایتاً مرگ انجام می‌پذیرد. امروزه با توجه به حساسیت بالای روش‌های مولکولی، تشخیص گونه‌های مختلف تیلریا در خون حیوان و یا در کنه‌های ناقل به این روش انجام می‌پذیرد. شناسایی ناقلین بیماری و تراکم آنان در مناطق آلوده در پیشگیری و تشخیص بیماری موثر می‌باشد (Smith and Sherman., 2009; Kundave *et al*., 2013).

از آنجا که کنه‌های سخت در اکثر دامداری‌های سنتی ایران بر روی حیوانات دیده می‌شوند، بنابراین تشخیص کنه‌های ناقل بیماری و شناسایی جنس و گونه‌های آنها در تشخیص نهایی بیماری تیلریوزیس اهمیت دارد. شهرستان ارومیه با آب و هوای سرد و مرطوب و با داشتن بیش از ۷ میلیون واحد دامی (سبک و سنگین) بیش از ۸/۳ درصد تولیدات دامی کشور را به خود اختصاص می دهد و طبق گزارشات بالینی دامپزشکان محلی ، تیلریوز گاوی هر ساله با شیوع نسبتا بالا در این شهرستان مشاهده می‌شود (Tavassoli *et al*., 2011). لذا هدف از مطالعه حاضر شناسایی مولکولی ناقلین تیلریا آنولاتا در گاوهای منطقه ارومیه به روش PCR بود.

مواد و روش‌ها

در طی بررسی حاضر که به صورت مقطعی در تابستان ۹۹ انجام پذیرفت نمونه‌های کنه به صورت تصادفی از گاوان روستاهای اطراف استان آذربایجان غربی اخذ گردید. بدین ترتیب که طی بررسی‌های روزانه گاوهای مناطق اوصالو، گزنق، آیبلو و طلا تپه در

اطراف ارومیه، قسمت‌های اطراف دم، داخل گوش، کشاله ران، اطراف پستان و زیر شکم گاوها بررسی شده و تعداد ۱۰۰ عدد کنه (عمدتاً خانواده ایکسودیده) جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در الکل اتانل ۷۰درصد (مرک، آلمان) نگه‌داری شد و مشخصات نمونه بر روی ظرف نگهداری نمونه ثبت گردید و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز ارسال گردید. در آزمایشگاه با استفاده از کلیدهای تشخیص واکر و همکاران و با بهره جستن از استریومیکروسکوپ (مدل BH-2، ژاپن)، جنس، گونه، جنسیت و مراحل تکامل کنه‌ها مورد شناسایی قرار گرفت و سپس اقدام به جداسازی غدد بزاقی کنه‌ها شد (Walker *et al.*, 2004).

-**جدا سازی غدد بزاقی کنه‌ها**: ابتدا مقداری پارافین را ذوب نموده، به کمک پی‌پت پاستور چند قطره از آن روی لام که از قبل روی صفحه گرم شده بود، ریخته شد. سپس به کمک پنس دندان‌موشی کنه مورد نظر را از سطح شکمی روی قطره پارافین قرار داده و سریعاً لام را از روی صفحه گرم برداشته تا پارافین جامد شود و کنه به طور کامل روی آن ثابت گردد. سپس به کمک قیچی مخصوص حشره‌شناسی (شرکت سامان تجهیز، ایران) در زیر استریومیکروسکوپ، پوشش کنه را از لبه‌های کناری زیر قاعده کاپیتلوم به‌طور کامل برش داده و با پنس دندان موشی، آن را از قاعده کاپیتلوم بلند کرده سپس قسمت قدامی قاعده کاپیتلوم قطع شد. در این حالت یک جفت غده بزاقی خوشه انگوری شکل در حاشیه کناری کاپیتلوم آشکار می‌گردید. برای جلوگیری از خشک شدن نمونه از محلول بافر فسفات استفاده شد. آنگاه به کمک پنس، غدد بزاقی از اتصالات اطراف جدا شده و وارد ظرف حاوی بافر فسفات (مرک، آلمان) شدند و بعد زیر استریومیکروسکوپ بررسی گردیدند تا ناخالصی همراه غدد بزاقی جدا شود. سپس غدد بزاقی به ویال حاوی اتانول ۷۰ درجه منتقل شده و تا هنگام استخراج DNA در یخچال نگه‌داری شد (Bartlett and Stiling.2003).

-**استخراج DNA**: در این مطالعه استخراج DNA به روش دستی و مطابق روش استفاده‌شده توسط بارتلت و استایلینگ با اندکی تغییر انجام شد (Bartlett and Stiling.2003). بدین منظور مقداری از بافت نمونه را در یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری ریخته به روی آن ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلولی اضافه کرده به‌طور کامل نمونه در بافر له شد و پس از انجام دو مرحله ورتکس (شرکت بهداد، ایران) به مدت ۳۰ تا ٦٠ ثانیه به میزان ۱۰ میکرو لیتر پروتئیناز K (مرک، آلمان) به لوله افزوده شد. سپس دو تا سه مرحله ورتکس (۳۰ تا ٦٠ ثانیه) و در هر مرحله یک‌بار انجماد سریع در دمای ۷۰- درجه سلسیوس توسط فریزر (Kaltis مدل AV039M، آلمان) انجام شد. پس از انجام این مراحل که به‌منظور شکست دیواره سلولی انجام می‌شود، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۲ساعت در دمای ٦٥ درجه سلسیوس قرار داده شدند. صد میکرولیتر بافر استات سدیم (مرک، آلمان) به میکروتیوب افزوده و به آرامی تکان داده شد. جهت رسوب بهتر بقایای سلولی و پروتئین‌ها نمونه ها به مدت یک دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ (شرکت یونیورسال، ایران) شدند. مایع رویی حاصل به میکروتیوب‌های جدید انتقال داده شدند و هم حجم آن ایزوپروپیل الکل سرد (مرک، آلمان) اضافه کرده به‌آرامی تکان داده شد. جهت رسوب دادن DNA به‌مدت دو

دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. قسمت رویی میکروتیوب را دور ریخته به رسوب باقی‌مانده جهت پاک‌سازی DNA استخراج‌شده از بقایای ایزوپروپیل الکل، ۲۰۰ میکرو لیتر الکل ۷۰ درجه (مرک، آلمان) به رسوب حاصل از مرحله قبل اضافه گردید و در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله میکروتیوب حاوی DNA در محیط قرار داده‌شد تا الکل آن خشک شود. سپس با ۵۰ تا۷۰ میکرولیتر آب مقطر استریل در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰-۵ دقیقه در آون (شرکت کیمیا تجهیز، ایران) قرار داده شد.

-آنالیز DNA استخراج شده از غدد بزاقی با الکتروفورز: در این روش نمونه‌های DNA با غلظت‌های متفاوت همراه با یک DNA معین و استاندارد (Laeder DNA، شرکت SMOBio) بر روی ژل آگارز (۰/۸ درصد) الکتروفورز گردید و باندهای حاصله با باند مربوط به DNA کنترل مثبت مقایسه شد.

-واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): در این بررسی یک زوج پرایمر (تحت عنوان N516 وN517) مربوط به ژن Tams-1 که آنتی‌ژن سطحی مروزوئیت *تیلریا آنولاتا* با وزن ۳۰ کیلو دالتون را کد می‌کند، استفاده گردید (D'Oliveira *et al*., 1995) که توالی نوکلئوتیدی آن به شرح جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۱- مشخصات پرایمر استفاده شده و توالی الیگونوکلئوتیدها

ژن هدف	نام پرایمر	توالی نوکلوتیدی پرایمرها	اندازه محصولPCR
Tams-1	(N516) (N517)	5'-GTAACCTTTAAAAACGT-3' 5'-GTTACGAACATGGGTTT-3'	721bp

مطابق جدول ۲، برنامه زمانی استفاده‌شده در ترموسایکلر برای تکثیر ژن مورد نظر، براساس پیشنهاد اولیورا و همکاران تنظیم شد (D'Oliveira *et al*., 1995).

جدول ۲- برنامه زمانی استفاده‌شده در دستگاه ترموسایکلر

واکنش‌ها	دما (درجه سلسیوس)	زمان(دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشتی اولیه	۹۵	۵	۱
واسرشتی ثانویه	۹٤	٤٥	۳۰
اتصال آغازگر	۵۸	۱	۳۰
گسترش آغازگر	۷۲	۱	۳۰
گسترش نهایی	۷۲	۱۰	۱

پس از انجام واکنش PCR برای اطمینان از عمل تکثیر و کیفیت DNA تکثیرشده، محصولات PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید. بدین منظور ۰/۹ گرم پودر آگارز (مرک، آلمان) در ٦۰ میلی‌لیتر محلول TBE 1X (مرک، آلمان) به آن اضافه شد و بعد محلول حاصله بر روی شعله قرار داده شد و بعد از جوش‌آمدن محلول از شعله برداشته شد و حین سرد شدن دو میکرولیتر DNA Safe Stain (شرکت یکتا تجهیزآزما،

ایران) اضافه شد و بعد از سرد شدن به داخل سینی منتقل گردید. ارلن در دمای اتاق خنک شده و در دمای حدود ٤٥ درجه سلسیوس محلول به داخل سینی ژل که اطراف آن چسب زده شده و شانه درون آن گذاشته شده بود، ریخته شد. پس از نیم ساعت چسب اطراف سینی ژل کنده شده و شانه‌ها خارج شد، سپس سینی ژل درون تانک الکتروفورز قرار داده‌شد و تا حدود پنج میلی‌متر بالای سطح ژل بافر TBE 1X ریخته شد تا بافر کاملاً ژل را در بر گیرد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه محصول PCR با دو میکرولیتر از بافر لودکننده (Loading Dye 6X) (شرکت سیناژن، ایران) مخلوط شده و در چاهک قرار داده شد. بر روی هر ژل یک چاهک مختص DNA Lader 100-3000bp قرار داده‌شد که حدود چهار میکرولیتر از نشانگر استاندارد روی چاهک لود شد. تانک الکتروفورز به منبع تامین برق متصل شد و با شدت جریان ۵۰ میلی‌آمپر به مدت یک‌ونیم ساعت الکتروفورز گردید. قطب منفی (کاتد) در بالای ژل و قطب مثبت (آند) در پایین است، زیرا بار DNA منفی است و جهت حرکت از منفی به مثبت می‌باشد و با استفاده از دستگاه ژل داک (MWG AG BIOTECH, Korea)، کار عکس‌برداری و تعیین کیفیت و طول قطعه مورد نظر انجام پذیرفت. در طی این بررسی نمونه کنترل مثبت به صورت ویال آماده فریزشده از بخش انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید.

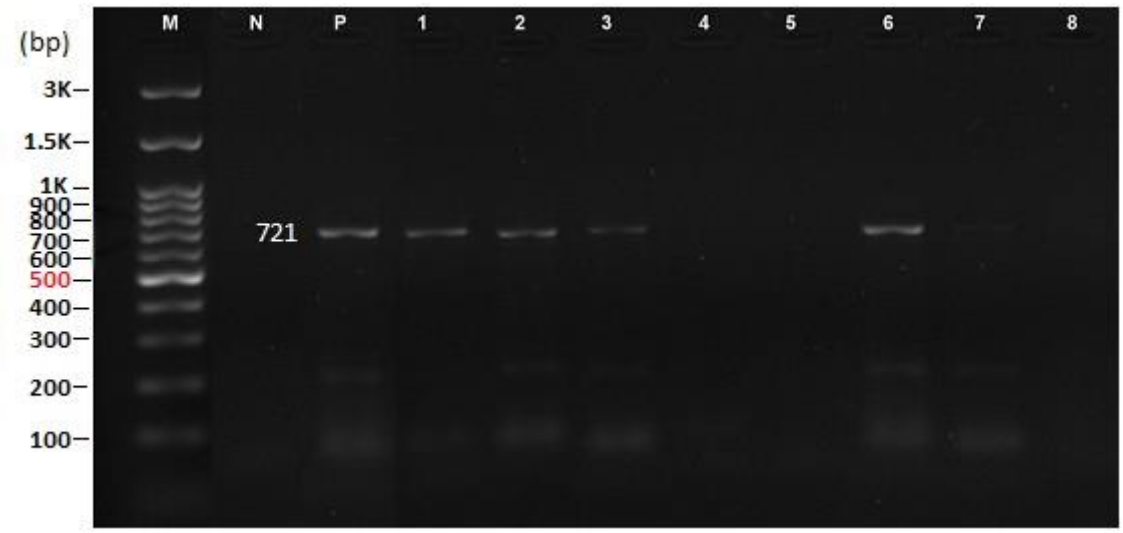
یافته‌ها

در طی این بررسی کنه‌های ایکسودیده جمع‌آوری‌شده تا مرحله جنس و گونه مورد شناسایی قرار گرفتند که شرح نتایج در جدول ۳ ارائه شده‌است.

جدول ۳- فراوانی کنه‌های جمع‌آوری شده از گاوان منطقه ارومیه

جنس و گونه کنه	نر	ماده	جمع	درصد فراونی
هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم	۱۱	۲۲	۳۳	۳۳ درصد
هیالوما دیتریتوم	۵	۱۱	۱٦	۱٦ درصد
بووفیلوس آنولاتوس	۱	۱۵	۱٦	۱٦ درصد
درماسنتور مارژیناتوم	۸	٦	۱٤	۱٤ درصد
ریپیسفالوس بورسا	۱	۸	۹	۹ درصد
هیالوما آناتولیکوم اکسکاواتوم	۳	٤	۷	۷ درصد
درماسنتور نیووس	۰	٤	٤	٤ درصد
همافیزالیس پونکتاتا	۰	۱	۱	۱ درصد
مجموع کنه‌های جمع آوری شده	۲۹	۷۱	۱۰۰	۱۰۰ درصد

-**یافته‌های PCR**: تکثیر DNA استخراج‌شده با استفاده از زوج پرایمر اختصاصی ژن (Tams-1) انجام شد. برای بررسی نتیجه PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید. بر اساس نتایج حاصله ٦٢ درصد نمونه‌ها دارای ژن (Tams-1) بودند که در شکل ۱ مشهود است.



شکل ۱- تصویر الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاصله از تکثیر ژن (Tams-1).
ستون M- مارکر مولکولی bp ۳۰۰۰ -۱۰۰ زوج باز (شرکت MSOBIO)
ستون N- کنترل منفی (آب مقطر)
ستون P- کنترل مثبت (*تیلریا آنولاتا*)
ستون‌های ۱ تا ۸- محصول PCR نمونه‌های استخراج شده

نتایج PCR انجام یافته در نمونه‌های DNA استخراج‌شده از غدد بزاقی کنه‌ها نشانگر ٦٢ مورد آلودگی به *تیلریا آنولاتا* در غدد بزاقی کنه‌ها بود که توزیع پراکندگی آن در کنه‌های مختلف در جدول ٤ ارائه شده است.

جدول ٤- میزان آلودگی کنه‌های جدا شده از گاوان ارومیه به *تیلریا آنولاتا* به روش PCR

جنس و گونه کنه	تعداد و درصد کنه‌های جمع‌آوری شده	تعداد موارد مثبت در PCR	فراوانی آلودگی (درصد)
هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم	۳۳	۲۰	٦۰/٦
هیالوما دیتریتوم	١٦	۱۲	۷۵
بووفیلوس (ریپیسفالوس) آنولاتوس	١٦	۱۲	۷۵
درماسنتور مارژیناتوم	١٤	۸	۵۷/١٤
ریپیسفالوس بورسا	۹	۵	۵۵/۵۵
درماسنتور نیووس	٤	۱	۲۵
هیالوما آناتولیکوم اکسکاواتوم	۷	۲	۲۸/۵۷
همافیزالیس پونکتاتا	۱	۱	۱۰۰
جمع	۱۰۰	٦۲	-

بحث و نتیجه‌گیری

پرورش گاو و صنعت گاوداری در اقتصاد کشاورزی ایران و جهان اهمیت بسزایی دارند. یکی از بیماری‌های بسیار مهمی که گاوها را تهدید می‌کند، بیماری‌های ایجادشده و منتقله توسط کنه‌ها می‌باشد. کنه‌ها علاوه بر این‌که خود موجد بیماری‌هایی نظیر کنه زدگی و فلجی ناشی از کنه‌ها می‌شوند ممکنست در انتقال عوامل ویروسی (آربوویروس‌ها) و تک‌یاخته‌های انگلی به گاوان دخیل باشند. طبق گزارشات موجود، بیماری‌های منتقله از کنه‌ها عامل موثری در درگیری جمعیت گاوی جهان بوده و این میزان گاه تا ۸۰ درصد نیز می‌رسد (Jensen *et al*., 2008). یکی از بیماری‌های مهم در بین بیماری‌های منتقله از کنه‌ها بیماری تیلریوزیس ناشی از *تیلریا آنولاتا* می‌باشد که توسط کنه‌های ایکسودیده به گاوان منتقل می‌گردد. در این بررسی ۱۰۰ نمونه کنه‌ای به‌دست آمده از گاوهای مناطق مختلف ارومیه گرفته شده و بعد از شناسایی جنس و گونه کنه‌ها و تعیین میزان فراوانی آن‌ها در منطقه، غدد بزاقی کنه‌ها استخراج و سپس با بکار بردن پرایمرهای اختصاصی به روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند تا میزان حضور انگل تیلریا در غدد بزاقی کنه‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد. در طی این بررسی مجموعاً ۵ جنس و ۸ گونه کنه‌ای مشاهده گردید. کنه غالب *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* (۳۳ درصد) و کمترین آن مربوط به *همافیزالیس پونکتاتا* (۱ درصد) بود.

مطالعات مختلفی در ایران و جهان در مورد آلودگی به کنه‌های مختلف در گاوان انجام شده است. این مطالعات در گذشته صرفاً بر اساس شناسایی جنس و گونه‌های کنه‌ها بر اساس مورفولوژی آنان بود. در طی این مطالعات در گاوان مناطق شمالغرب و غرب کشور گونه‌های مختلف هیالوما ازقبیل *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم*، *هیالوما آناتولیکوم آسیاتیکوم*، *هیالوما دیتریتوم*، *هیالوما آناتولیکوم اکسکاواتوم* و گونه‌های مختلف جنس‌های ریپیسفالوس، همافیزالیس و درماسنتور مشاهده و گزارش شده است (Hashemi-

(Fesharaki 1997; Telmadarraiy *et al*., 2004). نتایج محققین مذکور با نتایج بررسی حاضر مشابه می‌باشد.

در مطالعه توسلی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در گاوان منطقه ارومیه *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم*، *هیالوما آناتولیکوم آسیاتیکوم*، *هیالوما دیتریتوم*، *هیالوما آناتولیکوم اکسکاواتوم*، *رییپسفالوس بورسا*، *رییپسفالوس آنولاتوس*، *درماسنتور مارژیناتوم* و *همافیزالیس پونکتاتا* و درماسنتور مشاهده شد که دقیقاً با یافته‌های این بررسی بجز *درماسنتور نیووس* که در بررسی حاضر مشاهده شده است، مطابقت دارد (Tavassoli *et al*., 2011). اما نتایج بررسی مذکور در یافته‌های مولکولی بررسی حاضر همخوانی ندارد. ایشان با استفاده از روش PCR-RFLP آلودگی به تیلریا را در *هیالوما دیتریتوم* مشاهده ننمودند، اما در بررسی حاضر در تمام موارد کنه‌های تشخیص داده شده با روش مولکولی نیز آلودگی یافت شد. شاید علت این تفاوت مربوط به تفاوت در روش مولکولی بکار رفته یا نوع پرایمرهای بکار رفته باشد.

همانند بررسی‌های مشابه در مناطق مختلف ایران *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* بیشترین فراوانی و میزان آلودگی به *تیلریا آنولاتا* را نشان داد (Yakhchali *et al*., 2004; Telmadarraiy *et al*., 2004). علاوه بر این اکدس و همکاران در بررسی خود در شرق ترکیه نیز این کنه را کنه غالب اعلام نموده‌اند که این موضوع قرابت جغرافیایی و تشابه فون آلودگی این دو منطقه را علیرغم مرزبندی دو کشور اعلام می کند (Aktas *et al*., 2004).

در بررسی حاضر تعداد کنه‌های ماده یافت‌شده در روی گاوهای منطقه ارومیه بیش از سه برابر تعداد کنه‌های نر بود. با توجه به این‌که کنه‌های ماده نسبت به کنه‌های نر تمایل بیشتری برای خونخواری دارند که این موضوع در ارتباط با میزان پروتئین لازم برای تخم‌گذاری و سایر اعمال فیزیولوژیک آن‌ها می‌باشد این موضوع طبیعی به نظر می‌رسد. مشابه این پدیده در گزارشات سایین و همکاران در سال ۲۰۰۳، یخچالی و همکاران در سال ۲۰۰٤ و رزمی و همکاران در سال ۲۰۰٦ گزارش شده است (Sayin *et al*.,2003; Yakhchali *et al*., 2004; Razmi *et al*., 2006). اما سانگوان و همکاران در سال ۱۹۸۹ در بررسی خود اختلاف معنی‌داری در مورد آلودگی کنه‌های نر و ماده به تیلریوز مشاهده ننمودند (Sangwan *et al*.,1989).

اما مطالعاتی نیز در سطح ایران و جهان وجود دارد که در طی آن کنه‌های گونه‌های دیگری را به عنوان کنه‌های غالب حیوانات مناطق مختلف ایران معرفی می‌نماید. به‌طوری که توکلی و همکاران در سال ۱۳۷۷ در مطالعه‌ای در استان لرستان از مجموع ٦۹۲۰ نمونه صیدشده ۷ گونه کنه از جنس هیالوما را گزارش و *هیالوما آناتولیکوما آسیاتیکوم* را به عنوان کنه غالب گزارش نمودند (Tavakoli *et al*.,1999). همچنین دهقانی و همکاران در سال ۱۳۸۳ نیز در کاشان *هیالوما آناتولیکوما آسیاتیکوم* را به عنوان کنه غالب گاوان معرفی نموده‌اند (Dehghani *et al*., 2004). به‌نظر می‌رسد اختلاف در تنوع گونه‌ای شایع کنه‌های سخت گزارش‌شده در ایران و سایر کشورها می‌تواند ناشی از سازگاری گونه‌های مختلف کنه‌های سخت باشرایط آب و هوایی مناطق مختلف، اختلافات جغرافیایی، شرایط اقلیمی و روش‌های نمونه‌برداری و مطالعه کنه‌ها باشد.

همچنین رزمی و همکاران در سال ۲۰۰۳ تعداد ۵۱۰ کنه از گاوهای مشکوک به تیلریا در بلوچستان را جمع‌آوری کردند که ۵۱ درصد کنه‌ها *هیالوما آناتولیکم اکسکاواتوم* تشخیص داده شدند و همچنین این کنه به‌عنوان ناقل اصلی *تیلریا آنولاتا* با رنگ‌آمیزی غدد بزاقی به روش متیل گرین-پیرونین تعیین گردید (Razmi *et al*., 2003). شاید علت این اختلاف این است که در روش رنگ‌آمیزی مذکور اجرام دیگری که در غدد بزاقی کنه ممکن است باشند از قبیل *تیلریا لستوکاردی* نیز با *تیلریا آنولاتا* اشتباه شوند.

نکته حائز اهمیت در این بررسی میزان آلودگی این کنه‌ها به انگل *تیلریا* می‌باشد. در مجموع ۶۲ درصد کنه‌های به‌دست آمده از گاوهای منطقه ارومیه آلوده به تک یاخته تیلریا بودند که این نکته پتانسیل بسیار بالای انتقال این بیماری توسط کنه‌ها را می‌رساند.

با توجه به بررسی حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که الگوی کلی آلودگی به کنه‌های ایکسودیده در منطقه ارومیه از الگوی بیان‌شده در مطالعات کنه‌ای ایران تبعیت می‌نماید و همسو با مطالعات قبلی انجام یافته در ایران *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* به‌عنوان ناقل اصلی بیماری تیلریوز گاوهای منطقه ارومیه معرفی می‌شود. نکته دیگر میزان بالای آلودگی در کنه‌های جداشده از گاوهای منطقه می‌باشد (۶۲ درصد) که این میزان پتانسیل بالای انتقال آلودگی به گاوهای منطقه را نشان داده و ضرورت کاربرد برنامه‌های ریشه‌کنی و مبارزه با انگل‌های خارجی از قبیل سمپاشی حیوانات و جایگاه دام‌ها و سایر برنامه‌های مبارزه با کنه‌ها را می‌طلبد.

سپاسگزاری

این مطالعه از پایان‌نامه آقای ایرج پناهی دانشجوی کارشناسی ارشد انگل‌شناسی دامپزشکی استخراج شده است و نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به‌خاطر فراهم نمودن منابع مالی آن سپاسگزارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Aktas, M., Dumanli, N. and Angin, M. (2004). Cattle infestation by Hyalomma species in the east of Turkey. Veterinary Parasitology, 119(1):1-8.
- Bartelett, J.M.S. and Stiling, D. (2003). Methods in Molecular Biology: PCR Protocols: Chapter 7: DNA extraction from tissue. 2nd ed., USA: Human Press. pp: 33-34.
- Dehghani, R., Talari, S. and Piazak, N. (2004). Ticks fauna (Acari: Metastigmata) of Kashan-Iran. Pajouhesh and Sazandegi, 65(2): 19-23. [In Persian]

- D'Oliveira, C., Van der Weide, M., Habela, M.A., Jacquiet, P. and Jongejan, F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 33(10): 2665-2669.
- Jensen, K., Paxton E., Waddington D., Talbot, R., Darghouth, M.A. and Glass, E.J. (2008). Differences in the transcriptional responses induce by *Theileria annulata* infection in bovine monocytes derived from resistant and susceptible cattle breeds. International Journal for Parasitology, 38(3-4): 313-325.
- Hashemi-Fesharki, R. (1997). Tick-borne parasites of sheep and goats and their related vectors in Iran. Parasitology, 39(2): 115-117.
- Kundave, V.R., Patel, A.K., Hasnami, J. and Josh, C.G. (2013). Detection of Theileriosis in cattle and buffaloes by PCR. Journal of Parasitic Diseases, 18(2): 345-349.
- Mehlhorn, H., Schein, E. and Ahmed, J.S. (1994). Theileria. In: Parasitic Protozoa. Kreier, J.P. editor. 1st ed., USA: Academic Press, pp: 217–304.
- Razmi, G.R, Eshrati, H. and Rashtibaf, M. (2006). Prevalence of Theileria spp. infection in sheep in South Khorasan province, Iran. Veterinary Parasitology, 140(3-4): 239-243.
- Razmi, G.R., Ebrahimzadeh, E. and Aslani, M.R. (2003). A study about tick vectors of bovine theileriosis in an endemic region of Iran. Journal of Veterinary Medicine and Public Health, 50(6): 309-310.
- Sangwan, A.K., Chhabra, B.M. and Samantaray S. (1989). Relative role of male and female *Hyalomma anatolicum anatolicum* ticks in Theileria transmission. Veterinary Parasitology, 31(2): 83-87.
- Sayin, F., Karaer, Z., Dincer, S., Cakmak, A., Inci, A., Yukari, B.A., *et al*. (2003). A comparison of susceptibilities to infection of four species of Hyalomma ticks with *Theileria annulata*. Veterinary Parasitology, 113(1): 115-121.
- Smith, M.C. and Sherman, D.M. (2009). Goat Medicine, 2ed ed., USA: Wiley-Blackwell. Iowa, pp: 563-566.
- Tavakoli, M., Asmar, M. and Javadian, E. (1999). Geographical distribution of Argazidae and Ixodidae ticks in Lorestan province. Paper Presented at the First Iranian Congress of Medical Entomology. Tehran, Iran. [In Persian]
- Tavassoli, M., Tabatabaei, M., EsmaeilNejad, B., Hassani, M., Najafabadi, A. and Pourseyed, S.H. (2011). Detection of *Theileria annulata* by the PCR-RFLP in ticks (Acari, Ixodidae) collected from cattle in West and North-West Iran. Acta Parasitologica, 56(1): 8-13.
- Telmadarraiy, Z., Bahrami, A. and Vatandoost, H. (2004). A Survey on Fauna of Ticks in West Azerbaijan Province, Iran. Iranian Journal of Public Health, 33(4): 65-69.
- Walker, A., Camicas, J., Bouattour, A. and Estrada-pana, A. (2004). Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. 1st ed. Spain: University of Zaragosa, pp: 20-65.
- Yakhchali, M. and Hasanzadehzarza, S.H. (2004). Study on some ecological aspects and prevalence of different species of hard ticks) Acarina: Ixodidae) on cattle, buffalo, and sheep in Oshnavieh suburb. Pajouhesh and Sazandegi, 63(2): 30-35. [In Persian]