

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

احمد نعمت‌الهی^{۱*}، ایرج پناهی^۲

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. به دلیل این‌که در دامداری‌های سنتی ایران کنه‌های ایکسودیده که می‌توانند ناقل بیماری باشند به فراوانی یافت می‌شوند، شناسایی این کنه‌ها اهمیت فراوان دارد. این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی آلودگی به تیلریا در کنه‌های جدا شده 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 دیتیریتوم (۱۶ درصد)، بووفیلوس آنولاتوس (۱۶ درصد)، درماستور مارژیناتوم (۱۴ درصد)، ریپیسفالوس بورس (۹ درصد)، هیالوما آناتولیکوم اکسکواتوم (۷ درصد)، درماستور نیوس (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، 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 می‌دهد و طبق گزارشات بالینی دامپزشکان محلی، تیلریوز گاو هر ساله با شیوع نسبتاً 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، گزندق، آیلو و طلا تپه در

بیماری تیلریوزیس یکی از بیماری‌های خطرناک تک یاخته‌ای نشخوار کنندگان اهلی است. ابتلا به این انگل هر ساله در صنعت دامداری ایران و جهان باعث بروز علائم بیماری، افت تولیدات دامی و مرگ‌ومیر و در نتیجه خسارات اقتصادی فراوان می‌شود. 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 اسپروزوئیت 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 (*Hyalomma anatolicum anatolicum*)، آناتولیکوم اکسکاوآتوم (*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

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 ۶۰ ثانیه به میزان ۱۰ میکرو لیتر پروتیناز K (مرک، آلمان) به لوله افزوده شد. سپس دو تا سه مرحله ورتکس (۳۰ تا ۶۰ 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 ۱۲ ساعت در دمای ۶۵ 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 نمونه‌ها به مدت یک دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ (شرکت یونیورسال، ایران) شدند. مایع رویی حاصل به میکرو تیوب‌های جدید انتقال داده شدند و هم‌حجم آن ایزوپروپیل الکل سرد (مرک، آلمان) اضافه کرده به آرامی تکان داده شد. جهت رسوب دادن DNA به‌مدت دو

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 اتانول ۷۰ درصد (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 به‌طور 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 دندان‌موشی، 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

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 پلیمرز (PCR): در این بررسی یک زوج پرایمر (تحت عنوان N516 و N517) 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.

دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتی‌فیوژ 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 سانتی‌فیوژ شد. در این مرحله میکروتیوب حاوی DNA در محیط قرار داده شد تا الکل آن خشک شود. سپس با ۵۰ تا ۷۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰-۵ دقیقه در آن (شرکت کیمیا تجهیز، ایران) قرار داده شد. -آنالیز DNA استخراج شده از غدد بزاقی با الکتروفورز: در این روش نمونه‌های DNA با غلظت‌های متفاوت

جدول ۱- مشخصات پرایمر استفاده شده و توالی الیگونوکلئوتیدها

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

اولیورا و همکاران تنظیم شد (D'Oliveira et al., 1995).

مطابق جدول ۲، برنامه زمانی استفاده‌شده در ترموسایکلر برای تکثیر ژن مورد نظر، براساس پیشنهاد

جدول ۲- برنامه زمانی استفاده‌شده در دستگاه ترموسایکلر

واکنش‌ها	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشتی اولیه	۹۵	۵	۱
واسرشتی ثانویه	۹۴	۴۵	۳۰
اتصال آغازگر	۵۸	۱	۳۰
گسترش آغازگر	۷۲	۱	۳۰
گسترش نهایی	۷۲	۱۰	۱

IX (مرک، آلمان) به آن اضافه شد و بعد محلول حاصله بر روی شعله قرار داده شد و بعد از جوش آمدن محلول از شعله برداشته شد و حین سرد شدن دو میکرو لیتر DNA Safe Stain (شرکت یکتا تجهیز آزما،

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 ۶۰ میلی لیتر محلول TBE

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 داگ (MWG AG BIOTECH, Korea)، کار عکس برداری و تعیین کیفیت و طول قطعه مورد نظر انجام پذیرفت. در طی این بررسی نمونه کنترل مثبت به صورت ویال آماده فریز شده از بخش انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید.

یافته‌ها

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

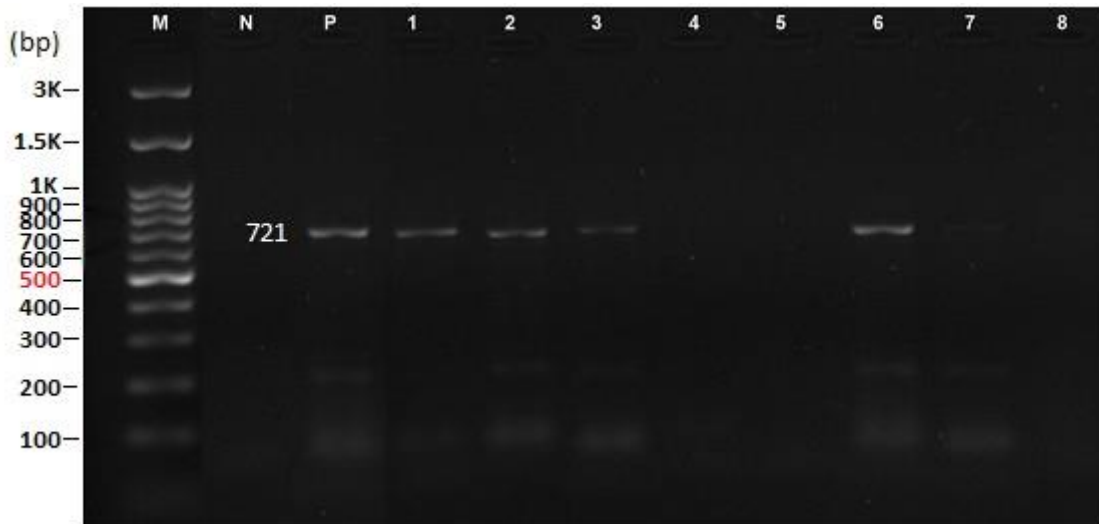
ایران) اضافه شد و بعد از سرد شدن به داخل سینی منتقل گردید. ارلن در دمای اتاق خنک شده و در دمای حدود ۴۵ درجه سلسیوس محلول به داخل سینی ژل که اطراف آن چسب زده شده و شانه درون آن گذاشته شده بود، ریخته شد. پس از نیم ساعت چسب اطراف سینی ژل کنده شده و شانه‌ها خارج شد، سپس سینی ژل درون تانک الکتروفورز قرار داده شد 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 داده شد 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

جدول ۳- فراوانی کنه‌های جمع‌آوری شده از گاوان منطقه ارومیه

جنس و گونه کنه	نر	ماده	جمع	درصد فراوانی
هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم	۱۱	۲۲	۳۳	۳۳ درصد
هیالوما دیتیریتوم	۵	۱۱	۱۶	۱۶ درصد
بوروفیلوس آنولاتوس	۱	۱۵	۱۶	۱۶ درصد
درماستور مارژیناتوم	۸	۶	۱۴	۱۴ درصد
ریپیسفالوس بورس	۱	۸	۹	۹ درصد
هیالوما آناتولیکوم اسکاواتوم	۳	۴	۷	۷ درصد
درماستور نیوروس	۰	۴	۴	۴ درصد
همافیزالیس پونکتاتا	۰	۱	۱	۱ درصد
مجموع کنه‌های جمع‌آوری شده	۲۹	۷۱	۱۰۰	۱۰۰ درصد

درصد نمونه‌ها دارای ژن (Tams-1) بودند که در شکل ۱ مشهود است.

- یافته‌های PCR: تکثیر DNA استخراج شده 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 ۶۲



شکل ۱- تصویر الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حاصله از تکثیر ژن (Tams-1).

ستون M- مارکر مولکولی bp ۳۰۰۰-۱۰۰۰ 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

توزیع پراکندگی آن در کنه‌های مختلف در جدول ۴ ارائه شده است.

نتایج PCR انجام یافته در نمونه‌های DNA استخراج شده از غدد بزاقی کنه‌ها نشانگر ۶۲ مورد آلودگی به تیلریا آنولاتا در غدد بزاقی کنه‌ها بود که

جدول ۴- 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	۶۰/۶
هیالوما دیتریتوم	۱۶	۱۲	۷۵
بووفیلوس (ریپیسفالوس) آنولاتوس	۱۶	۱۲	۷۵
درماستور مارژیناتوم	۱۴	۸	۵۷/۱۴
ریپیسفالوس بورسا	۹	۵	۵۵/۵۵
درماستور نیروس	۴	۱	۲۵
هیالوما آناتولیکوم اکسکواتوم	۷	۲	۲۸/۵۷
همافیزالیس پونکتاتا	۱	۱	۱۰۰
جمع	۱۰۰	۶۲	-

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 این که 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 از قبیل هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم، هیالوما آناتولیکوم آسیاتیکوم، هیالوما دیتریتوم، هیالوما آناتولیکوم اکسکواتوم و گونه‌های مختلف جنس‌های ریپیسفالوس، همافیزالیس و درماستور مشاهده و گزارش شده است (Hashemi-

کنه‌های نر بود. با توجه به این که کنه‌های ماده نسبت به کنه‌های نر تمایل بیشتری برای خونخواری دارند که این موضوع در ارتباط با میزان پروتئین لازم برای تخم-گذاری 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 ۲۰۰۴ و رزمی و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش شده است (Sayin *et al.*, 2003;). اما سانگوان و همکاران در سال ۱۹۸۹ در بررسی خود اختلاف معنی‌داری در مورد آلودگی کنه‌های نر و ماده به تیلریوز مشاهده نمودند (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. به طوری که توکلی و همکاران در سال ۱۳۷۷ در مطالعه‌ای در استان لرستان از مجموع ۶۹۲۰ نمونه صید شده 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). به نظر می‌رسد اختلاف در تنوع گونه‌ای شایع کنه‌های سخت گزارش شده در ایران و سایر کشورها می‌تواند ناشی از سازگاری گونه‌های مختلف کنه‌های سخت با شرایط آب و هوایی مناطق مختلف، اختلافات جغرافیایی، شرایط اقلیمی و روش‌های نمونه‌برداری و مطالعه کنه‌ها باشد.

نتایج (Fesharaki 1997; Telmadarraiy *et al.*, 2004). 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 دیتیریتوم، هیالوما آناتولیکوم اکسکواتوم، ریپیسفالموس بورس، ریپیسفالموس آنولاتوس، درماستور مارژیناتوم و همافیزالیس پونکتاتا و درماستور مشاهده شد که دقیقاً با یافته‌های این بررسی بجز درماستور 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 دیتیریتوم مشاهده نمودند، 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 می‌کند (Aktas *et al.*, 2004).

در بررسی حاضر تعداد کنه‌های ماده یافت شده در روی گاوهای منطقه ارومیه بیش از سه برابر تعداد

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 منافی ندارند.

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 اکسکواتوم 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

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., Jacquet, 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., EsmailNejad, 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 Zaragoza, 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]