

باسمه تعالی

فعالیت های انجام شده در سال ۱۴۰۰ در راستای پایش و تشخیص بیماری های نوپدید و بازپدید



اسفند ۱۴۰۰

فهرست

- ۳..... مطالعه تاکسونومیکی جمعیت جوندگان مریون پرسیکوس به یرسینیا پستیس در ایران
- ۱۹..... بررسی مولکولی عفونت به باکتری ریکتزیا و بارتونلا در کنه های شمال ایران
- ۳۶..... بررسی مولکولی آلودگی به کوکسیلا بورنتی و فرانسیسلا تولارنسیس در کنه های شمال، غرب و شمال غربی ایران
- ۴۶..... گزارشی از موارد مثبت سرولوژیکی عفونت یرسینیا پستیس در جوندگان و گوشتخواران شمال غرب ایران
- ۵۴..... بررسی آلودگی به بروسلوز در جوندگان غرب ایران
- ۶۵..... بررسی مولکولی و سرولوژی ریکتزیا کونوری در بیماران ارجاعی مشکوک به تب خونریزی دهنده کریمه-کنگو
- ۷۵..... بررسی شیوع تب کیوی حاد در افراد در معرض خطر با علائم تب و مشکلات تنفسی پنومونی در غرب ایران
- ۸۴..... بررسی شیوع باکتری تروفیما ویپلی در نمونه های اسهال کودکان
- ۹۲..... ردیابی مولکولی تروفیما ویپلی در موارد اسهال کودکان در ایران: یک مطالعه مقدماتی
- ۹۹..... ردیابی مولکولی فرانسیسلا تولارنسیس در نشخوارکنندگان کوچک و کنه های جمع آوری شده از آنها در غرب ایران
- ۱۰۹..... ردیابی مولکولی کوکسیلا بورنتی در نشخوارکنندگان کوچک و کنه های جمع آوری شده از آنها در غرب ایران
- ۱۱۶..... طرح های تحقیقاتی مصوب اجرا شده در سال ۱۴۰۰
- ۱۱۷..... پایان نامه های انجام شده در سال ۱۴۰۰
- ۱۲۲..... نمونه های بالینی ارجاع شده به آزمایشگاه مرجع کشوری طاعون، تولارمی و تب کیو
- ۱۲۳..... برگزاری دوره های آموزشی مدیریت طغیان بیماری های واگیر
- ۱۲۵..... جلسات ژورنال کلاب مرکز تحقیقات بیماری های نوپدید و بازپدید در سال ۱۴۰۰
- ۱۲۶..... تهیه کلیپ های آموزشی گفتمان علمی کووید ۱۹
- چاپ کتاب راهنمای استاندارد شناسایی، بررسی، مدیریت و کنترل طغیان بیماری های مشمول قوانین بهداشت بین المللی (IHR) با بهره گیری از نظام مراقبت سندرمیک
- ۱۲۹..... چاپ کتاب "انستیتو پاستور ایران در گذر تاریخ"
- ۱۳۰.....

مطالعه تاکسونومیکی جمعیت جوندگان مریون پرسیکوس به یرسینیا پستیسی در ایران

مقدمه

موارد انسانی طاعون از زمان های بسیار قدیم شناخته شده اند. اگرچه تکیه بر اطلاعات زمان های بسیار دور به منظور تمایز طاعون از سایر بیماری های قابل انتقال و عفونی بسیار مشکل است. آنچه مشخص است طاعون یک بیماری قدیمی است که در مهد تمدن انسانی در آسیای مرکزی منشا گرفته است. اولین اپیدمی ثبت شده طاعون مربوط میشود به شیوع بیماری در فلسطین در سال ۱۳۲۰ قبل از میلاد، که در کتاب مقدس (Bible: I Samuel, VI and V) به صورت "بواسیر در بخش های خصوصی بدن انسان ها" توصیف شده است. پاتوژن عامل طاعون "باکتری یرسینیا پستیسی" (*Yersinia pestis*) در حیوانات مخزن به ویژه جوندگان؛ در کانون های طبیعی عفونت که در تمام قاره ها به جز استرالیا یافت شده است گردش می کند. کانون های طبیعی طاعون در محدوده وسیعی از نواحی تروپیکال و ساب تروپیکال و بخش های گرم تری از عرض های جغرافیایی معتدل در دنیا بین ۵۵ درجه شمالی و ۴۰ درجه جنوبی قرار گرفته اند. با این وجود، داخل این محدوده، بسیاری از نواحی عاری از کانون های طبیعی طاعون هستند، مانند بیابان هایی که جوندگان کم یا عاری از جونده هستند و یا نواحی بزرگ جنگلی پیوسته، بویژه در منطقه گرمسیری و نواحی کوهستانی که با یخچال ها پوشیده شده اند. طاعون توسط کک های جوندگان وحشی، هم نوع خواری (کانیبالیسیم) یا خاک آلوده بین جوندگان و دیگر حیوانات منتقل می شود. طاعون وحشی در کانون های طبیعی خود مستقل از جمعیت های انسانی و فعالیت آن ها منتقل میشود (۲). طاعون در جوامع انسانی در ارتباط نزدیک با جوندگانی است که با انسان ها زندگی میکنند و می تواند اپیدمی هایی را هم در جمعیت های انسانی و هم در جمعیت های حیوانی ایجاد کند (۲).

طاعون در ایران: به گزارش سازمان جهانی بهداشت موارد طاعون انسانی گزارش شده از کشور ایران از سال ۱۹۵۴ تا ۱۹۹۷ در مجموع ۳۸ مورد بوده که ۱۲ مورد (۶ مرگ) مربوط به سال ۱۹۵۸ و ۲۶ مورد (۱۴ مورد مرگ) مربوط به سال ۱۹۶۳ می باشد. اما پیش از آن در زمان های قدیم اپیدمی های بسیار بزرگی در مناطق مختلف ایران رخ داده است که منجر به مرگ هزاران نفر در کشور شده است (۱). آخرین مورد انسانی در ناحیه غرب ایران بوده است و مخزن آن جردها بودند که پراکنش و تنوع بسیار بالایی در ایران دارند.

مانیتورینگ کانون ها: ظهور مجدد طاعون در کانون های طبیعی سراسر دنیا پس از سال های طولانی عدم بروز (به عنوان مثال در موزامبیک، هندوستان و مالاوی پس از یک دوره ۱۵ الی ۳۰ ساله مجددا ظهور کرده است)، نشان دهنده لزوم ادامه مطالعات پایشی در کانون های طبیعی است. دوره های اپیزوتیک در تمامی کانون های طبیعی طاعون که تا به امروز مطالعه شده اند مشاهده شده است و این دوره متغیر است. همانطور که عنوان شد دوره فقدان ممکن است ده سال یا بیشتر طول بکشد، که پس از آن طاعون جوندگان یا طاعون انسانی به یکباره طغیان می کند. درک دلیل این اتفاقات نیازمند مطالعات بیشتری است. اگرچه، بیماری در این دوره ها فعال است بویژه در کانون های طبیعی حیات وحش، تجربیات جدید نشان می دهد که احتمال شیوع پراکنده (sporadic)

outbreak) در انسان ها وجود دارد. این عوامل تاکید می کند که مطالعات پایشی اپیدمیولوژیک بویژه در مناطق اندمیک یا انزوتیک باید حفظ شوند. باید مطالعات مستمر باشد تا آگاهی مردم در مورد این بیماری بهبود پیدا کند و قادر باشیم موارد پراکنده را پیدا کنیم تا از اپیدمی های احتمالی جلوگیری کنیم. طاعون بدون تردید به شکل بیماری جوندگان وحشی حتی قبل از ظهور آن در بین انسان ها وجود دارد. همانند آن چیزی که تیم انستیتو پاستور ایران در مطالعات هندوستان در دهه ۴۰ شمسی مشاهده کردند و عنوان داشتند که "شواهد نشان میدهد که همه گیری حیوانی در بین جوندگان وحشی چندین ماه قبل در نواحی که طاعون انسانی بروز میکرد رواج داشته است".

باکتری عامل طاعون می تواند در خاک، در اجساد، در مدفوع کک ها، در یک ارتباط سیمبیوتیک با میکروارگانیسم های خاک، که در آن باکتری به طور موقت در یک فرم سیمبیوتیک حفظ می شود، و به این صورت امکان تغییرات مکرر رخ داده را توضیح می دهند. این فرضیات همگی نیاز به ارزیابی های دقیق دارند (۲).

میزبان های شناخته شده طاعون در جهان

بر اساس داده های جدید، بیش از ۳۰۰ گونه پستاندار و سه گونه پرنده به عنوان میزبان طاعون شناخته شده اند (۳). ۳۴۱ گونه پستاندار میزبان یرسینیا پستیس می توانند در هفت راسته تاکسونومیک گروهبندی شوند: از اینرو جوندگان (Rodentia) با ۲۷۳ گونه، گوشتخواران شکارچی (Carnivora) با ۳۰ گونه، خرگوش سانان (Lagomorpha) با ۱۶ گونه، حشره خواران (Insectivora) با ۱۰ گونه، زوج سمان (Artiodactyla) با ۶ گونه، نخستیان (Primates) با ۴ گونه و (Hyracoidea) hyrax با ۱ گونه. پرندهگان وحشی، غالباً چکچک ها (*Oenanthe* sp.) هم می توانند به طاعون آلوده شوند (سه گونه شناخته شده است).

گونه های مختلف جانوران میزبان در حفظ گردش یرسینیا پستیس در کانون های طبیعی با هم تفاوت دارند. محل سکونت میزبان اصلی باید در نواحی بزرگ نسبتاً مستمر یا، در صورت پراکنش های موزائیک، به هم پیوسته باشند. از جمله ویژگی های بیماری زا میزبان اصلی، مهم ترین آنها عبارتند از: وقوع باکترمی (bacteremia) عظیم و طولانی مدت، وجود اشکال ماندگار طاعون و تعمیم (generalization) عفونت، که در بعضی موارد، علیرغم ناپدید شدن اپیزوتیک باعث حفظ طولانی مدت میکروب طاعون می شود. دیگر ویژگی های مهم شامل حساسیت نسبتاً بالای افراد جوان برخی گونه های میزبان به فرم سپتیک بیماری، و هتروژنیته (ناهمگونی) یک جمعیت می باشد که به معنی وجود افراد حساس و مقاوم می باشد.

در کانون طبیعی موجود در غرب ایران که در واقع مهمترین کانون شناخته شده خاورمیانه می باشد چهار گونه از جوندگان متعلق به جنس مریونس (*Meriones* Illger 1811) اصلی ترین مخازن بیماری طاعون شناخته شده اند که دو گونه *Meriones persicus* و *M. libycus* مقاومت نسبی در مقابل عفونت دارا هستند، در حالیکه دو گونه *M. vinogradovi* و *M. tristrami* در مقابل عفونت بسیار حساس بوده و بلافاصله پس از آلوده شدن تلف می شوند (۴، ۵). مطالعات متعددی صورت گرفته است تا نقش احتمالاً متفاوت گونه های نزدیک و نهان جوندگان در چرخه اپیدمیولوژی بیماری طاعون را بررسی کنند.

علاوه بر تخمین اندک تنوع زیستی و نادیده گرفته شدن گونه های موثر احتمالی در مطالعات پیشین، با ظهور متدهای جدید مانند روش های مولکولی و توالی یابی حضور گونه های نهان یا تبارهای فیلوژغرافیایی متعدد درون گونه های ریختی اسمی به کرات اثبات شده است (۶-۸). لذا با توجه به اینکه تعامل و برهمکنش میزبان و وکتور و عامل عفونت در گونه های مختلف متفاوت می باشد، لزوم بازبینی و بررسی دقیق در جهت تمایز و تعیین حدود گونه های مهم در حفظ طاعون در کانون های طبیعی امری اجتناب ناپذیر به نظر می رسد. به عنوان مثال مطالعات تلفیقی (ریخت سنجی هندسی، مولکولی و نیچ اکولوژیکی) اخیر در فلات ایران بر روی گونه پرسیکوس نشان داده است که جرد ایرانی در فلات ایران دارای ۴ گروه ژنتیکی اصلی با اختلافات ژنتیکی قابل ملاحظه می باشد. این کلادها شامل گروه جغرافیایی در شرق (کلاد IIA)، کلاد فلات مرکزی ایران (کلاد IIB)، کلاد غرب ایران (کلاد IA)، و کلاد یزد (IB) می باشد.

بر اساس مطالعات پیشین، میزبان ها می توانند از کانونی به کانون دیگر متفاوت باشند. مطالعه آسمار و همکاران (۹) نشان داده است که دو جمعیت مریون پرسیکوس (به عنوان مهمترین مخزن بیماری در ایران) غرب (منطقه اطراف اکنلو) و تهران (منطقه تلو و اطراف آن) سطح حساسیت متفاوتی را به آلودگی با یرسینیا پستیس نشان می دهند و با بررسی های بیوشیمیایی، باکتریایی، انگلی، اکولوژیکی، و ریخت سنجی که بر روی جمعیت های مزبور انجام داده اند دلیل این اختلاف در سطح حساسیت را به تفاوت در فلور باکتریایی روده این دو جمعیت نسبت داده اند. مطالعات تاکسونومیک اخیر بر روی گونه *Meriones persicus* در ایران پیشنهاد می کند که احتمالاً جمعیت های غرب ایران و مرکز ایران (از جمله تهران) متعلق به زیر گونه های مختلف باشند (۷): ناحیه مرکزی فلات ایران تحت نام *Meriones persicus persicus* گروه بندی شده است، در حالیکه غرب ایران (کردستان، همدان و...) جزو زیر گونه *Meriones persicus rossicus* قرار گرفته اند. عدم وجود داده های سیتوژنتیکی و مولکولی از منطقه تهران، مانع از شناسایی تاکسونومیک جمعیت موجود در منطقه تهران شده است. با در نظر داشتن نقش متفاوت جمعیت های مختلف یک گونه (زیرگونه ها/جمعیت ها) در انتقال بیماری های عفونی، در این مطالعه قصد داریم میزان تفاوت احتمالی در محتوای ژنتیکی و سیتوژنتیکی جمعیت های همدان و تهران را که پیش تر مغفول مانده بود ارزیابی کنیم.

مواد و روش ها: اگر چه مطالعه پیشین توسط آسمار و همکاران تفاوتی بین دو جمعیت منطقه تلو (استان تهران) و اکنلو (استان همدان) نشان نداده است. با این حال تفاوت ژنتیکی احتمالی بین این دو جمعیت، بر اساس یک مطالعه تاکسونومیک دقیق، با استفاده از مارکرهای حساس مولکولی تاکنون بررسی نشده است و قرابت یا جدایی این دو جمعیت از منظر ژنتیکی به درستی ارزیابی نشده است.

نمونه برداری: در این مطالعه ۴۰ نمونه مریون پرسیکوس از هر کدام از ایستگاه ها (رویهم رفته ۸۰ نمونه) صید شدند. ایستگاه اول: منطقه تلو، نرسیده به لواسان در استان تهران و ایستگاه دوم: روستای اکنلو، در شهرستان کبودرآهنگ همدان. مختصات جغرافیایی ایستگاه ها در جدول شماره ۲ آورده شده است. نمونه برداری به مدت

دو هفته در هر ایستگاه (روی هم رفته ۲۸ روز کار میدانی) و با بررسی های میدانی و یافتن و و تله گذاری برای کلنی های فعال جوندگان انجام گرفت.

جوندگان با استفاده از تله های زنده گیر و از زیستگاه های متفاوت هر ایستگاه (شامل مراتع، کوهپایه و زمین های کشاورزی) جمع آوری شدند. نمونه های صید شده از منظر وجود اکتوپارازیت هایی چون کک و کنه بررسی شدند و اکتوپارازیت های جمع آوری شده داخل فالكون های ۲۵ سی سی حاوی سرم فیزیولوژیک به آزمایشگاه منتقل شدند. ویژگی های ظاهری جوندگان شامل اندازه طول سر و بدن، طول دم، طول کف پای عقب، طول لاله گوش، رنگ سطح پستی، شکمی و دم جانور یادداشت شد وزن، مرحله رشد و جنسیت جونده صید شده در برگه های مخصوص ثبت اطلاعات جونده ثبت گردیدند. علاوه بر این از مشخصات ریختی افتراقی نمونه ها عکس برداری شد. نهایتاً جوندگان بر اساس خصوصیات ریختی ظاهری و بر اساس کلیدهای شناسایی موجود (۱۰، ۱۱) شناسایی شدند.

مطالعات آلودگی به طاعون: جوندگان صید شده با استفاده از اتر بیهوش شدند. پس از بیهوشی کامل، با استفاده از سرنگ ۵ سی سی، جمع آوری خون از قلب جونده صورت گرفت. ۱ عدد گسترش از طحال بر روی لام تهیه شده و به کمک شعله فیکس گردید. رنگ آمیزی لام های فیکس شده با استفاده از رنگ آمیزی گرم انجام گرفت و زیر میکروسکوپ از منظور وجود تک یاخته های خونی بوویژه باکتری طاعون بررسی شدند. خون جمع آوری شده به مدت ۱۵ دقیقه در داخل لوله سانتریفوژ و در دمای اتاق قرار گرفت تا لخته شود و پس از آن سرم به کمک سانتریفوژ با ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شد و تست های سرولوژی برای طاعون و تولارمی انجام گرفت. قطعه ای از طحال با پنس و قیچی استریل بریده شده، در میکروتیوب ۱/۵ سی سی قرار داده شد و در آن محکم بسته و لیبل زده شد و در فریزر منهای ۲۰ نگه داری شدند. DNA نمونه ها با استفاده از کیت های کیاژن (طبق پروتکل پیشنهادی) استخراج شدند. تست های تشخیصی برای باکتری طاعون و تولارمی به روش RT-PCR انجام گرفت.

تمامی جوندگان صید شده برای تست های سرولوژی و ملکولی طاعون بررسی شدند.

مطالعات مولکولی جوندگان: تعداد ۲۰ نمونه مریون پرسیکوس بالغ از هر جمعیت برای مطالعات فیلوژنی مولکولی انتخاب شدند: بدین صورت که از هر جمعیت ۲۰ نمونه مریون پرسیکوس بالغ برای ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز b (Cytochrome oxidase b=cytb) و با استفاده از پرایمرهای L7-H6 و L14727-H15919 تکثیر شدند. کیفیت قطعات تکثیر شده با PCR با استفاده از ژل الکتروفورز ۱ درصد در دستگاه ژل داک ارزیابی شدند و نمونه های مناسب برای توالی یابی (داشتن باندهای شارپ و منفرد) به شرکت میکروسنس سوئیس ارسال شدند و با استفاده از پرایمرهای فوروارد و ریورس توالی یابی شدند. همین مراحل برای ژن هسته ای (Interphotoreceptor retinoid-binding protein= irbp) نیز (از هر جمعیت ۱۰ نمونه) با پرایمرهای فوروارد و ریورس IRBPF-IRBPR تکرار شد.

مطالعه سیتوزنتیکی: تعداد ده جونده از هر جمعیت شامل نرها و ماده ها برای مطالعات کروموزومی استفاده شد. برای این منظور پس از بیهوشی جانور به ازای هر گرم وزن جانور مقدار ۱ سی سی وین بلاستین به صورت

زیر جلدی تزریق شد. نمونه ها پس از ۴۵ الی ۵۰ دقیقه کشته شدند و از مغز استخوان جانور بر اساس پروتوکل تعریف شده توسط Ford & Hamerton ، گسترش های کروموزومی تهیه شدند پس از تهیه ۲۰ اسلاید از مرحله متافاز تقسیم سلولی از هر جونده، گسترش های تهیه شده بر اساس متد C-banding (۱۳) رنگ آمیزی شدند تا موقعیت سانترومرها به درستی مشخص شده و بتوان نوع کروموزوم ها را بدون اشتباه شناسایی کرد.

آنالیز ریخت شناسی: جمجمه جوندگان با استفاده از لارو سوسک های گوشتخوار (Dermestid Beetles) و در پایگاه تحقیقاتی اکنلو پاکسازی شدند. سپس تعداد ۸۰ نمونه مریون پرسیکوس (۴۰ عدد از هر جمعیت) با استفاده از دوربین متصل به پایه از سطح پشتی، شکمی و جمجمه تصویربرداری شدند. پس از تهیه تصاویر مجموعه عکس ها با استفاده از بسته نرم افزاری TPS نقاط همولوگ نشانه گذاری (لندمارک) شده و مقیاس بندی شدند. لندمارک های بر روی سطوح شکمی، پشتی و آرواره مشخص شدند. با استفاده از برنامه R مطالعات آماری بر روی جمعیت ها انجام گرفت تا میزان تفاوت های ریخت شناختی بین آنها بررسی شود.

بررسی میکروسکوپی: از نمونه های طحال هموزن شده هر جونده گسترش تهیه خواهد شد و بعد از فیکس نمودن با استفاده از رنگ آمیزی گرم جهت بررسی احتمالی حضور *یرسینیا پستیس* مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت.

استخراج ژنوم و انجام آزمون Real-Time PCR: برای تشخیص مولکولی طاعون از نمونه طحال هر جونده DNA به مقدار کافی استخراج شد. بعد از استخراج DNA تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه ذخیره شدند. آزمون Real-Time PCR با استفاده از دستگاه (Rotor-Gene (model 6600) (Corbett Life Science) و بر اساس پروتکل های موجود جهت شناسایی عامل پاتوژنیک *یرسینیا پستیس* انجام گرفت. برای کنترل مثبت *یرسینیا پستیس* از پلاسمید کلون شده که حاوی قطعاتی از ژن Chromosome (yihN) و pMT1 (caf1) می باشد استفاده شد. برای کنترل داخلی از ژن β -actin شرکت کیازن استفاده شد.

آزمایش الایزا برای تشخیص آنتی بادی IgG علیه آنتی ژن F1 کپسولی یرسینیا پستیس: تمام آنتی ژن ها، سرم های کنترل مثبت و منفی، آنتی سرم ها و محلول های لازم جهت انجام الایزا از انستیتو پاستور ماداگاسکار تهیه شد. کلیه مراحل و روش های انجام الایزا طبق دستور العمل انستیتو پاستور ماداگاسکار انجام گرفت (۱۴).

مطالعات فیلوژنتیکی جوندگان: از DNA های استخراج شده برای مطالعات فیلوژنتیک و تاریخ تکاملی جمعیت های جوندگان مورد مطالعه بر اساس ژن های میتوکندریایی (ژن سیتوکروم اکسیداز b) و هسته ای (ژن IRBP) استفاده شد. برای این هدف از پرایمرهای یونیورسال L7/H6 (۱۵) و L14727-SP/ H15915-SP (۱۶) برای ژن *cytb* (جدول ۲ ردیف ۱) و پرایمرهای IRBP-F/IRBP-R (۷) برای ژن IRBP استفاده شد (جدول ۲ ردیف ۲). ژن های تکثیر شده برای تعیین توالی به شرکت میکروسنس سوئیس فرستاده شده و با استفاده از دستگاه Sanger توالی بابی شدند. تحلیل های مولکولی توسط نرم افزارهای (CodonCode Aligner (CodonCode Corp.)، MEGA v7.0 (۱۷)، MrBayes v3.2 (۱۸)، jModeltest (۱۹)، DnaSP v5 (۲۰) و RaxML (۲۱) انجام گرفتند.

جدول شماره ۲: مشخصات توالی ها و پرایمرهای مورد استفاده در بررسی حاضر

No.	Sequence	Target gene	Ref.	Size
1	L7: 5' ACTAATGACATGAAAAATCATCGTT H6: 5' TCTTCATTTTGGTTTACAAGAC L14727-SP: 5' GACAGGAAAAATCATCGTTG H15915-SP: 5' TTCATTACTGGTTTACAAGAC	<i>Mitochondrial cytochrome b</i>	(15)	1140bp
2	IRBP-F: 5' GAATGCAAGCAGCCATTGAGC IRBP-R: 5' CACGGCTGAGTAGTCCATGC	<i>interphotoreceptor retinoid binding protein</i>	(7)	900bp



شکل ۱. نقشه پراکنش نقاط نمونه برداری جرد ایرانی در مطالعه حاضر (همدان و تهران).

جدول ۲. موقعیت جغرافیایی نمونه های صید شده در مطالعه حاضر همراه با مختصات جغرافیایی و تعداد نمونه های صید شده

گونه	مختصات جغرافیایی	مکان	تعداد نمونه صید شده
1. <i>Meriones persicus</i>	35°58'06.8"N 51°55'47.5"E	استان همدان (روستای اکنلو)	۴۰
2. <i>Meriones persicus</i>	36°15'42.5"N 59°07'13.5"E	تهران (منطقه تلو)	۴۰

آنالیزهای فیلوژنتیکی

توالی ها با استفاده از برنامه CodonCode Aligner (CodonCode Corp.) و به صورت دستی ویرایش شدند و وضعیت جایگاه های مبهم (جایگاه هایی که در مورد نوکلئوتید آن ابهام وجود داشت براساس قواعد آیوپاک (AUPAC) کد گذاری شدند. بهترین مدل جانیشینی نوکلئوتیدی با استفاده از برنامه jModeltest 01.1 (۱۹) و بر اساس معیار آکایکا (Akaike Information Criterion) انتخاب گردید. مدل تکاملی General-Time reversable (GTR+I+G) همراه با نسبت جایگاه های ثابت (۰/۵۶۱۹) و میزان توزیع گاما بین جایگاه ها

(۱/۱۲۲۹) به عنوان مدل تکاملی بهینه انتخاب شد. از نرم افزار Mega v7 (۱۷) فواصل ژنتیکی جفت به جفت توالی ها با استفاده از مدل کیمورا-۲ (Kimura-2 parameter model) محاسبه شد. برای بازسازی روابط فیلوژنتیکی بین جمعیت های تهران و همدان از نرم افزار MrBayes 3.2 (۱۸) برای ساختن درخت بیزین (Bayesian=BI) بر اساس مدل تکاملی انتخاب شده استفاده شد. به این منظور دو آنالیز همزمان با مدل Markov Chain Monte Carlo (MCMC) اجرا شد که در آن ران ها با درخت تصادفی شروع میشدند و برای چهار میلیون بار تکرار می شدند. درخت های حاصل پس از حذف کردن ۲۰٪ اولیه به عنوان Burn-in هر ۱۰۰۰ تکرار یکبار نمونه برداری میشد.

بازسازی درخت حداکثر درست نمایی (Maximum Likelihood=ML) با استفاده از نرم افزار RaxML (۲۱) با میزان تکرار ۱۰۰ و با استراتژی جستجوی heuristic انجام شد. برای ارزیابی میزان تایید گره ها در درخت فیلوژنتیکی از معیارهای Bayesian Posterior Probability (BPP) برای درخت بیزین و Bootstrap values (BP) برای درخت حداکثر درست نمایی استفاده شد.

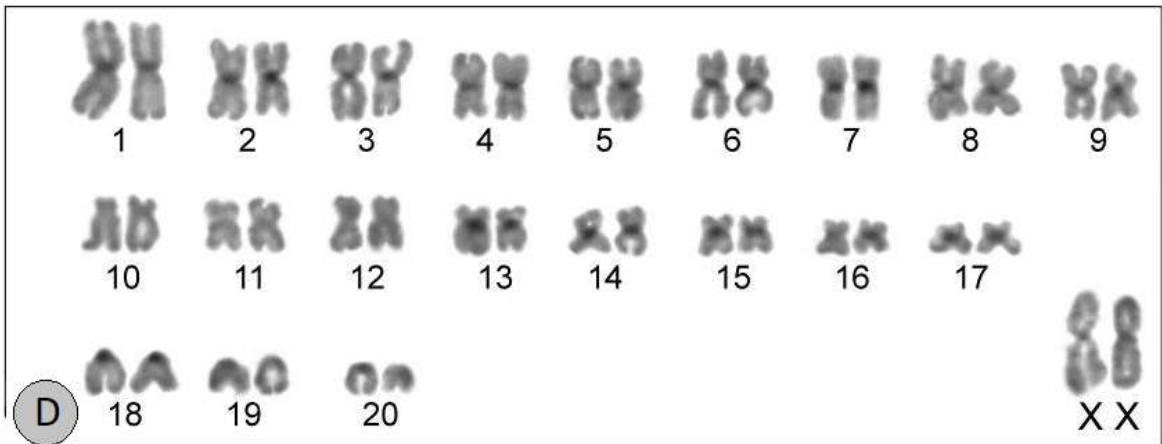
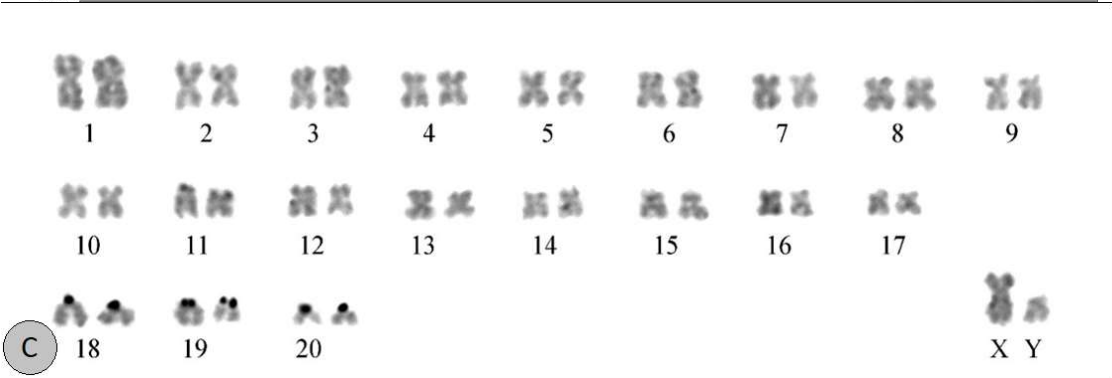
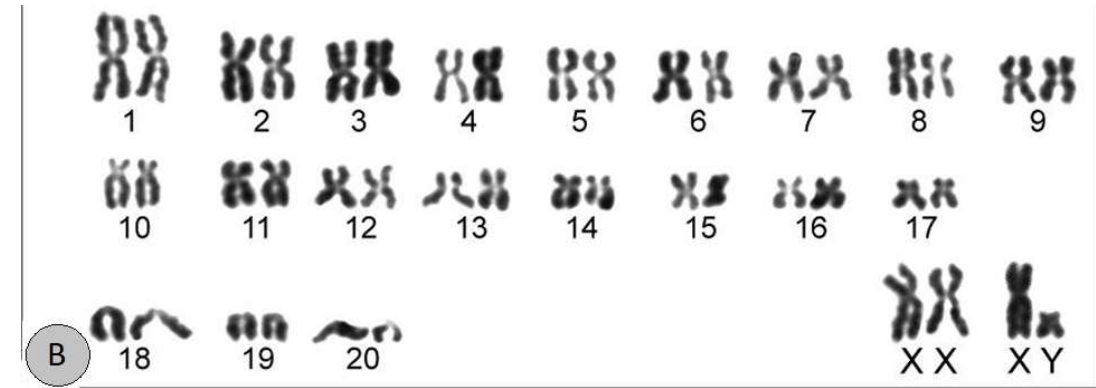
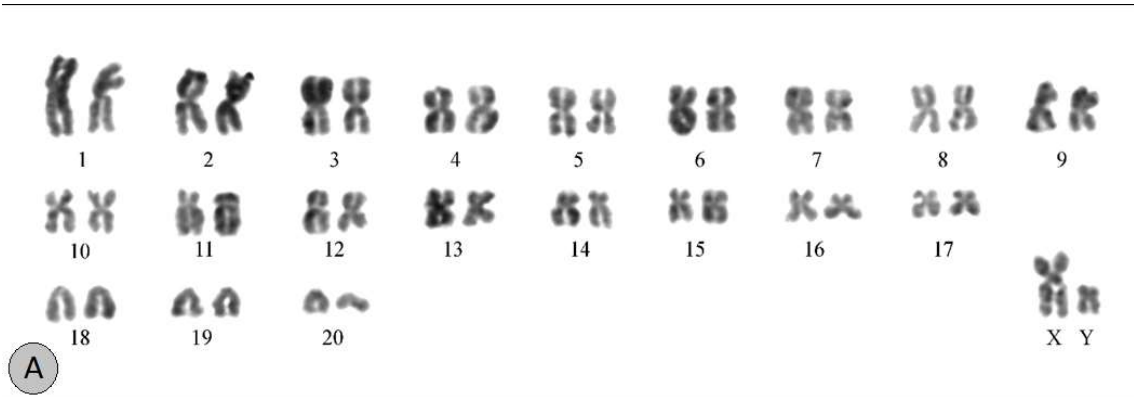
نتایج

تست الایزا و RT-PCR

تمام نمونه های صید شده از هر دو جمعیت همدان و تهران برای پاتوژن های طاعون و تولارمی تست شدند. نتایج تمام نمونه ها برای هر دو پاتوژن منفی بودند.

سیتوژنتیک

نتایج مطالعه سیتوژنتیکی جمعیت های همدان و تهران حاکی از عدم وجود اختلاف در تعداد کروموزوم، تعداد بازوها و نوع کروموزوم های جنسی است (شکل ۲). تعداد عدد کروموزومی در هر دو جمعیت برابر با ۴۲ ($2n=42$)، تعداد بازوهای کروموزومی ۷۸ ($FN=78$) و تعداد بازوهای اتوزومی برابر با ۶۸ ($FNa=68$) می باشد. کروموزوم جنسی X یک ساب متاسنتریک بزرگ و کروموزوم جنسی Y یک ساب متاسنتریک کوچک می باشد (شکل ۲). رنگ آمیزی گیمسا در جمعیت تهران (شکل A) و جمعیت همدان (شکل B) تفاوتی در مشخصات کروموزومی نشان ندادند. علاوه بر این رنگ آمیزی افتراقی با روش C-banding بر روی هر دو جمعیت (شکل C: جمعیت تهران، شکل D: جمعیت همدان) تاییدی بر شباهت و یکسان بودن الگوی کروموزومی نواحی سانترومر در هر دو جمعیت بود



شکل ۲. رنگ آمیزی استاندارد (A و B) و افتراقی (C و D) کروموزوم های به ترتیب جمعیت تهران و همدان در گونه جرد ایرانی *Meriones persicus* هر دو متد رنگ آمیزی تفاوتی در مشخصات کروموزومی جمعیت ها نشان نداد

ریخت شناسی

شناسایی نمونه ها با استفاده از کلید های شناسایی ریختی موجود شناسایی شدند (۲۲). تمام نمونه های شناسایی شده هر دو جمعیت تهران و همدان مربوط به گونه جرد ایرانی (*Meriones persicus*) شناسایی شده و برای مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. ویژگی کف پای لخت (بدون مو) و لاله گوش بلند جرد ایرانی را به راحتی از سایر گونه های جرد موجود در غرب ایران متمایز می کند. رنگ سطح شکمی جانور کاملا سفید خالص می باشد. با اینحال، رنگ آمیزی سطح پشتی بدن تغییرات اندکی در بین نمونه ها داشت و عمدتا قهوه ای روشن می باشد. منگوله دم به رنگ تیره و آبیخته با موهای سفید کم و بلند می باشد.

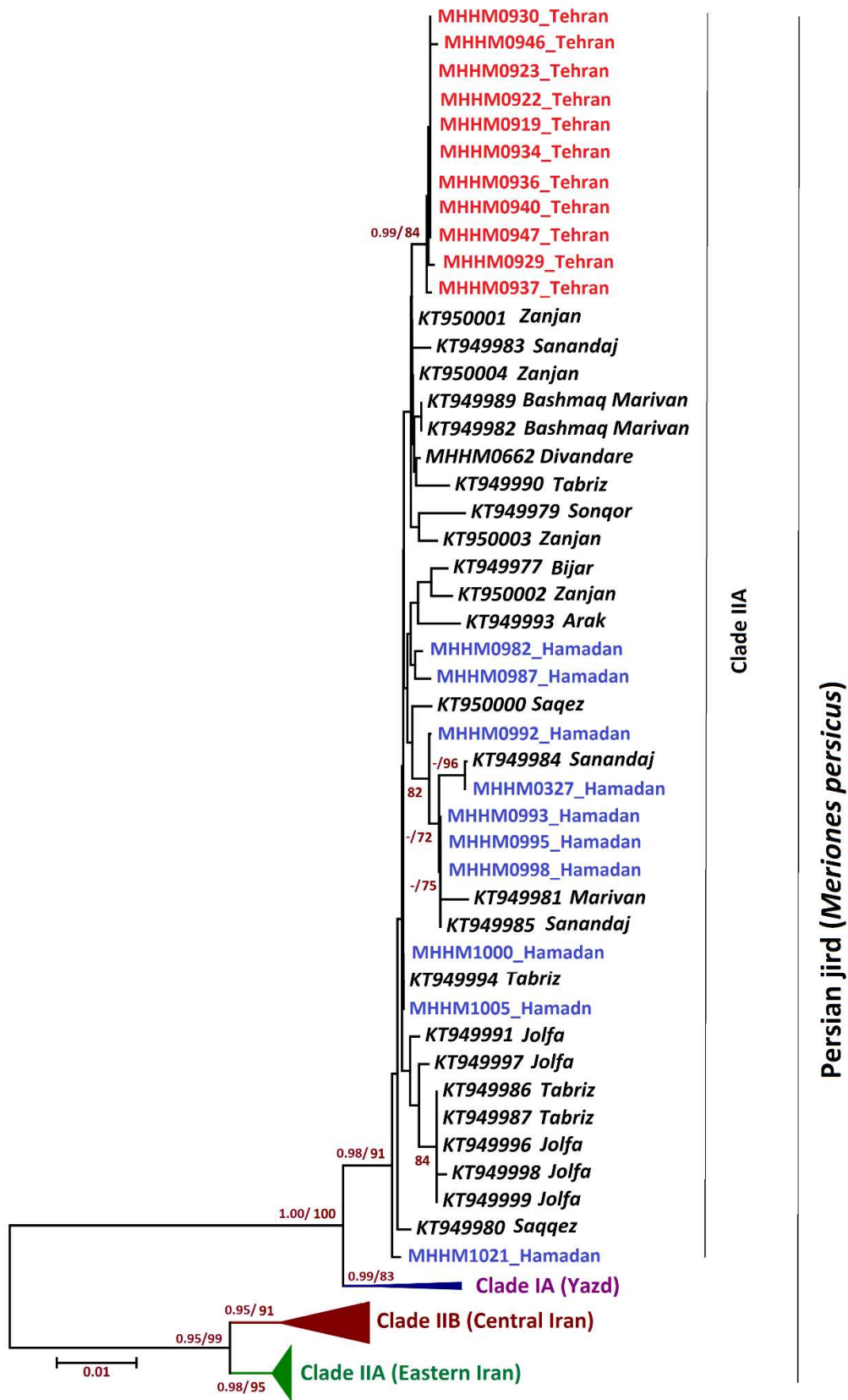
فیلوژنتیکی

در مطالعه حاضر، علاوه بر ژن واقعی *cytb*، چندین کپی هسته ای از این ژن که تحت عنوان سودوژن (ژن های کاذب) شناخته می شوند درون هر دو جمعیت پیدا شد. ژن های کاذب کپی هایی از ژن میتوکندریایی هستند که درون ژن هسته ای ادغام شده اند ولی عمدتا کارکرد خود را از دست داده اند. چنین توالی هایی با دارا بودن مناطق حذف و اضافه و کدون های پایانی (stop-codon) نابجا ثابا تمایز از توالی های هدف ما می باشند. وجود فریم های نادرست، استاپ کدون ها، و حذف و اضافه های غیرهمولوگ در سودوژن ها مانع از تولید پروتئین ساختاری و صحیح می شوند و در نتیجه این کپی ها عمدتا فاقد عملکرد هستند. گاهی اوقات (به ندرت) این ژن ها عملکرد خود را حفظ می کنند. با این حال، تاثیر وجود ژن های کاذب درون هر دو جمعیت که با یکدیگر متفاوت هم می باشند، در توان پاسخدهی آنها به عوامل محیطی یا عفونی هنوز بررسی نشده است.

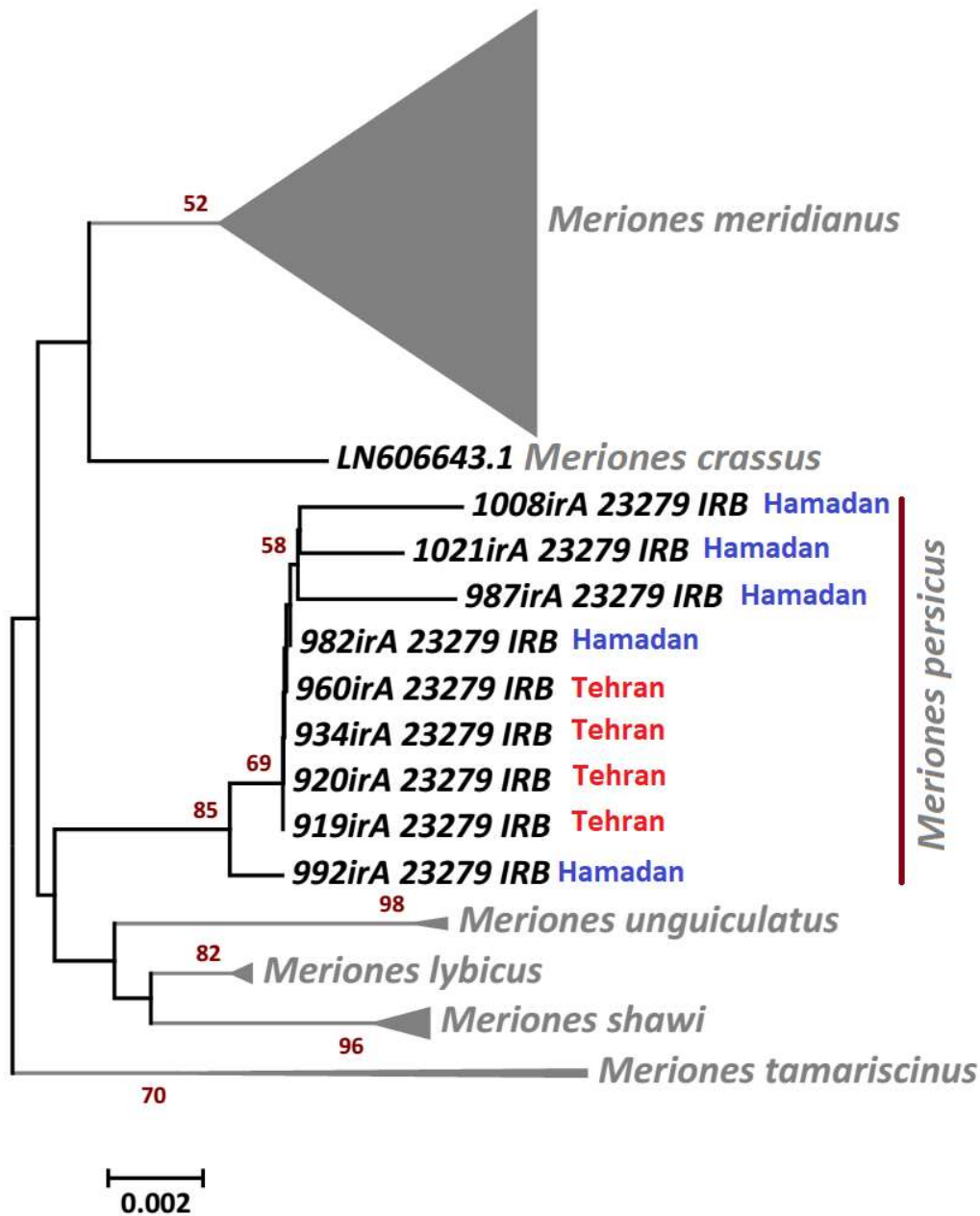
درخت فیلوژنتیکی حاصل از ژن اصلی *cytb* با الگوریتم های بیزین و حداکثر درست نمایی توپولوژی یکسانی داشتند، از این رو فقط درخت حاصل از استنباط بیزین در اینجا آورده شده است و مقادیر تاییدی حاصل از هر دو الگوریتم بیزین و حداکثر درست نمایی به ترتیب در پشت گره ها نشان داده شده است (شکل ۳). درخت حاصل نشان دهنده قرابت نزدیک بین دو جمعیت تهران و همدان می باشد. در مقایسه با اطلاعات ژنتیکی موجود هر دو جمعیت درون یک کلاد قرار می گیرند و تنوع ژنتیکی درون این کلاد در مقایسه با سایر گروه ها از سایر نقاط ایران دارای تنوع ژنتیکی بسیار بالایی می باشد. نتایج یکسانی برای آنالیز ژن هسته ای *irbp* به دست آمد (شکل ۴).

هاپلوتایپ های تهران اختلاف ژنتیکی بسیار اندکی با یکدیگر دارند که نشاندهنده تنوع پایین این جمعیت می باشد، با این حال جمعیت همدان تنوع ژنتیکی قابل توجهی دارد و هاپلوتایپ های آن با هاپلوتایپ های مناطق وسیعی از غرب ایران کلاستر شده اند.

اختلاف ژنتیکی ژن میتوکندریایی *cytb* بین دو جمعیت تهران و همدان 0.6 ± 0.2 می باشد. این میزان اختلاف ژنتیکی کاملاً منطبق بر اختلافات ژنتیکی درون گونه ها و زیرگونه های در پستانداران می باشد. اختلاف ژنتیکی بین چهار کلاد مختلف جرد ایرانی در محدوده 2.5-9.8% می باشد.



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی بیزین نشاندهنده روابط بین جمعیت های مختلف جرد ایرانی در ایران بر اساس ژن *cytb* است. هر دو جمعیت همدان و تهران در یک کلاد قرار گرفته اند. اعداد پشت گره ها به ترتیب نشاندهنده مقادیر تاییدی آنالیزهای بیزین و حداکثر درست نمایی می باشد.



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی بیزین نشاندهنده روابط بین دو جمعیت مطالعه شده جرد ایرانی بر اساس ژن *irbp* است. هر دو جمعیت همدان و تهران در یک کلاد قرار گرفته اند. اعداد پشت گره ها نشاندهنده مقادیر تاییدی می باشد.

بحث: لزوم شناخت دقیق جمعیت ها/گونه های میزبان و وکتور در چرخه های اپیدمیولوژیک بیماری های نوپدید و بازپدید توسط مطالعات متعددی ثابت شده است (۲۳). محققین نشان داده اند گونه هایی که دارای اهمیت

بهداشتی و پزشکی هستند ممکن است خود متشکل از چندین جمعیت مختلف باشند (۲۴). مطالعات متعددی صورت گرفته است تا نقش احتمالا متفاوت جمعیت ها، گونه های نزدیک و نهان (cryptic) جوندگان در چرخه اپیدمیولوژی بیماری طاعون را بررسی کنند. از این جمله میتوان به کانون طبیعی آفریقای جنوبی اشاره کرد که گونه *Mastomys natalensis* یکی از مخازن طبیعی شناخته شده طاعون در این کانون می باشد. مطالعات تاکسونومیک بر روی این گونه نشان داد که این گونه در واقع متشکل از دو گونه نهان *M. natalensis* و *M. coucha* می باشد. مطالعات بیشتر نشان داد که در واقع محدوده پراکنش طاعون انسانی منطبق با محدوده پراکنش *M. coucha* (گونه حساس) می باشد و در مقابل در محدوده پراکنش گونه *M. natalensis* (گونه مقاوم) هیچ مورد انسانی مشاهده نشده است (۲۵). این یافته ها نشان داد که گروه های مختلف جوندگان می توانند نقش های کاملا مختلفی در چرخه بیماری داشته باشند. لذا شناسایی دقیق میزبان ها مانع از هدر رفت منابع خواهد شد (۲۶). مورد دیگر که میتوان به آن اشاره کرد مربوط به مطالعات تاکسونومیک کمپلکس گونه ای *Anopheles gambiae*، ناقل اصلی مالاریا در آفریقا، باشد که مطالعات تاکسونومیک مشخص کرد، هفت گونه نهان درون این کمپلکس وجود دارند که دارای زیستگاه ها و میزبان های انتخابی متفاوتی هستند و برخی از این گونه های نهان فقط به میزبان های غیر انسانی حمله می کنند، لذا هیچ خطری برای سلامت جوامع انسانی ندارند (۲۷). از چندین گونه متعلق به این پشه، تنها یک گونه خاص عامل انتقال بیماری است و لذا شناسایی دقیق گونه هدف و محدوده پراکنش آن از تحمیل هزینه های هنگفت بر اقتصاد و بهداشت جهانی جلوگیری نمود (۲۴). پر واضح است که شناسایی میزبان های اختصاصی و تعیین حدود دامنه پراکنش آن ها برای بیماری ها منتقله از جوندگان از جمله طاعون، چه در سطح جهانی و چه در سطح منطقه ای، برای کشورهای مثل ایران که بعنوان کانون های طبیعی این بیماری شناخته شده اند می تواند از هدر رفت منابع انسانی، اقتصادی و بهداشتی جلوگیری کرده و همچنین گامی بسیار موثر در راستای پیش بینی ظهور احتمالی بیماری در مناطق جدید و ناشناخته باشد.

نتایج فیلوژنتیکی، سیتوژنتیکی و ریخت شناسیم مطالعه حاضر نشان می دهد که جمعیت تهران برخلاف فرض پیشین که پیشنهاد می کردند متعلق به زیر گونه *M. p. persicus* باشد در واقع متعلق به زیر گونه *M. p. russicus* می باشد. فاصله ژنتیکی محاسبه شده بین جمعیت همدان و تهران تفاوت معنی داری بین دو جمعیت نشان نمیدهد و تغییرات مشاهده شده در محدوده نرمال تغییرات درون گونه ای در جوندگان می باشد (محدوده تغییرات ۰-۴.۲٪ برای ژن میتوکندری *cytb* در جوندگان جزو تغییرات درون گونه ای محسوب می شود) (۲۸). و تنها مقداری تفاوت ژنتیکی و جدایی ناچیزی بین جمعیت همدان و تهران مشاهده می شود. با این حال، تنوع درون جمعیت تهران بسیار ناچیز می باشد و تمام هاپلوتایپ های آن با هم کلاستر می شوند. ولی هاپلوتایپ های جمعیت همدان تنوع ژنتیکی بالاتری دارند و با هاپلوتایپ های مناطق مختلفی از غرب ایران کلاستر می شود. بنابراین می توان انتظار داشت که اختلاف در میزان تنوع ژنتیکی جمعیت ها یکی از دلایل تفاوت مقاومت نسبی آنها در مقابل عفونت باشد. از نظر زیستی هر چه تنوع ژنتیکی یک جمعیت بالا باشد، یعنی تعداد sub-population های موضعی یا جغرافیایی یک جانور بیشتر باشد که در کنار هم یک جمعیت بسیار متنوع و گسترده - metapopulation را شکل بدهند (۲۹)، امکان بقای آن جمعیت و آستانه تحمل آن در مواجهه با عوامل عفونی

و مشکلات زیست بومی بالاتر می باشد، و در مقابل تنوع ژنتیکی پایین درون یک جمعیت باعث کاهش پایداری و افزایش حساسیت جمعیت در مقابل مخاطرات زیستی و آلودگی های عفونی و بیماری می شود. بنابراین به نظر می رسد که علاوه بر نقش متفاوت واحدهای ژنتیکی، زیرگونه و گونه های مختلف در چرخه اپیدمیولوژیک بیماری های عفونی زئونوز، جمعیت های جغرافیایی مختلف یک گونه، میزان تنوع ژنتیکی درون آنها و شرایط میکرواقليمی آنها نیز می توانند در توان پاسخدهی آنها در برابر عوامل عفونی، موثر باشند (۲۹).

از طرف دیگر، نتایج این مطالعه پیشنهاد می کند به دلیل وجود شارش ژن بین دو جمعیت ($F_{st}=0.006$) شود جدایی ژنتیکی بین این دو جمعیت وجود ندارد و ارتباط ژنتیکی بین آنها بر این نکته اشاره می کند که احتمال وقوع اپی زئوسی در جمعیت منطقه تهران نمی تواند دور از انتظار باشد. تفاوت فلور باکتریایی بین این دو جمعیت ممکن است متاثر از تفاوت های زیستگاهی و آب و هوایی دو منطقه باشد، ولی نبود جدایی ژنتیکی بیانگر اینست که این جمعیت ها هیچ مانعی برای تولید مثل و تبادل ژن، تبادل اکتو/اندوپارازیت و حتی فلور باکتریایی ندارند و این امر لزوم توجه دقیق تر به منطقه تهران به عنوان کانون احتمالی آینده در دوره های اپیزوتیک و انزوتیک را نشان می دهد. در واقع این مطالعه نشان داد که محدوده جغرافیایی مخزن طاعون در شمال غرب ایران شامل استان های همدان، کردستان، آذربایجان شرقی و غربی و به طرف مرکز تا استان تهران امتداد دارد. مقایسه جمعیت های مختلف مریون پرسیکوس در سراسر ناحیه پراکنش آن نشان می دهد که این منطقه در اشغال زیر گونه *M. p. rossicus* می باشد که مخزن اصلی بیماری در ایران است ولی سایر مناطق ایران، شامل شرق، مرکز فلات ایران، جنوب و جنوب شرق و جنوب غرب ایران در اشغال زیرگونه های دیگری است که تفاوت های ژنتیکی و ریختی قابل توجهی با این جمعیت دارند. محدود بودن کانون طبیعی طاعون در ایران و وجود گزارش های قدیمی از مریون های منطقه غرب ایران احتمالاً با پراکنش زیر گونه های مختلف در بخش های مختلف ایران ارتباط دارد. تاکنون موارد مثبتی از سایر نقاط ایران در مطالعات پیشین و کنونی در بین جوندگان مریون پرسیکوس گزارش نشده است و آنچه که گزارش شده است مربوط به استان های کردستان، همدان، کرمانشاه، زنجان، آذربایجان غربی و آذربایجان شرقی می باشد.

منابع

۱. Shahraki AH, Carniel E, Mostafavi E. Plague in Iran: its history and current status. *Epidemiology and Health*. 2016;38.
۲. Yang R, Anisimov A. *Yersinia pestis: retrospective and perspective*: Springer; 2016.
۳. Bramanti B, Stenseth NC, Walløe L, Lei X. Plague: A disease which changed the path of human civilization. *Yersinia pestis: retrospective and perspective*: Springer; 2016. p. 1-26.
۴. Baltazard M, Bahmanyar M, Mostachfi P, Eftekhari M, Mofidi C. Recherches sur la peste en Iran. *Bulletin of the World Health Organization*. 1960;23(2-3):141.
۵. Baltazard M, Bahmanyar M, Mofidi C, Seydian B. Le foyer de peste du Kurdistan. *Bulletin of the World Health Organization*. 1952;5(4):441.

- Mahmoudi A, Darvish J, Aliabadian M, Moghaddam FY, Kryštufek B. New insight into the cradle of the grey voles (subgenus *Microtus*) inferred from mitochondrial cytochrome b sequences. *Mammalia*. 2017;81(6):583-93.
- Dianat M, Darvish J, Cornette R, Aliabadian M, Nicolas V. Evolutionary history of the Persian Jird, *Meriones persicus*, based on genetics, species distribution modelling and morphometric data. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2017;55(1):29-45.
- Moshtaghi S, Darvish J, Mirshamsi O, Mahmoudi A. Cryptic species diversity in the genus *Allactaga* (Rodentia: Dipodidae) at the edge of its distribution range. *Journal of Vertebrate Biology*. 2016;65(2):142-7.
- Assmar M, Keypour M, Rohani M, Mostafavi E, Farhud DD. The Resistance to Plague Infection among *Meriones persicus* from Endemic and Non-endemic Regions in Iran: The Role of Gut Microbiota. *Iranian journal of public health*. 2018;47(1):86.
- Kryštufek B, Vohralík V, Janžekovič F. Mammals of Turkey and Cyprus: Rodentia II: Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae: Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Založba Annales; 2009.
- Darvish J, Mohammadi Z, Mahmoudi A, Siahsarvie R. Faunistic and taxonomic study of Rodents from northwestern Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics* 2019;2(1):1-6.
- Ford C, Hamerton J. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain technology*. 1956;31(6):247-51.
- Sumner A. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res*. 1970;3(4):197-200.
- Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, Foulon J, Ratsitorahina M, Ratsifasoamanana L, et al. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *The Lancet*. 2003;361(9353):211-6.
- Tirard C, Verneau O, Catzeflis FM, Montgelard C, Bentz S. Molecular systematics of Sciurognathi (Rodentia): the mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes support the Anomaluroidea (Pedetidae and Anomaluridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2002;22(2):220-33.
- Jaarola M, Searle JB. Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular ecology*. 2002;11(12):2613-21.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 1.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*. 2016;33(7):1870-4.
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*. 2012;61(3):539-42.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*. 2008;25(7):1253-6.
- Rozas J. DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP. *Bioinformatics for DNA sequence analysis*: Springer; 2009. p. 337-50.
- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic biology*. 2008;57(5):758-71.

- Darvish J, Mohammadi Z, Mahmoudi A, Siah sarvie R. Faunistic and taxonomic study of Rodents from northwestern Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*. 2014;10(2):119-36. .۲۲
- Bonvicino CR, Oliveira JA, Cordeiro-Estrela P, D'andrea PS, Almeida AM. A taxonomic update of small mammal plague reservoirs in South America. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2015;15(10):571-9. .۲۳
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PK, Meier R, Winker K, et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*. 2007;22(3):148-55. .۲۴
- Gratz N. Rodent reservoirs and flea vectors of natural foci of plague. *Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control*. 1999;6. .۲۵
- Rabiee MH, Mahmoudi A, Siah sarvie R, Kryštufek B, Mostafavi E. Rodent-borne diseases and their public health importance in Iran. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(4):e0006256. .۲۶
- Besansky N. Complexities in the analysis of cryptic taxa within the genus *Anopheles*. *Parassitologia*. 1999;41(1-3):97-100. .۲۷
- Baker RJ, Bradley RD. Speciation in mammals and the genetic species concept. *Journal of mammalogy*. 2006;87(4):643-62. .۲۸
- Zeppelini CG, de Almeida AMP, Cordeiro-Estrela P. Zoonoses as ecological entities: a case review of plague. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(10):e0004949. .۲۹

بررسی مولکولی عفونت به باکتری ریکتزیا و بارتونلا در کنه های شمال ایران

مقدمه

بیماری های مشترک بین انسان و حیوانات (زئونوز) به عنوان عامل اصلی عفونت های مرتبط با مرگ و میر در سراسر جهان شناخته می شوند و به عنوان بیماری های عفونی نوظهور در انسان از اهمیت بالایی برخوردار هستند (۱). بیماری های زئونوز به عنوان یک نگرانی بزرگ برای سلامت عمومی و یک خطر مستقیم برای سلامت انسان ها محسوب می شوند که حتی ممکن است منجر به مرگ شود. عواملی از قبیل تغییرات آب و هوایی، سفر و گردشگری، مهاجرت و تجارت حیوانات، عوامل انسانی و عوامل طبیعی بر توزیع عفونت های نوپدید و بازپدید تاثیر به سزایی دارند (۱).

کنه ها بیش از هر گروه دیگر از بندپایان تغذیه کننده خون گونه های بیماری زا را منتقل می کنند که انسان و دام ها را تحت تاثیر قرار می دهند. برای درک اپیدمیولوژی بیماری های زئونوز منتقله از طریق کنه ها، درک تعامل پیچیده بین کنه ها، و میزبان آنها، محیط و عوامل بیماری زایی که آنها منتقل می کنند ضروری است (۲). کنه ها ناقل بسیاری از بیماری های زئونوز از جمله بیماری لایم، ارلیشیوز و تب منقوط کوه های راکی می باشند (۳). بیماری های منتقله از طریق کنه هم در پزشکی و هم دامپزشکی بسیار شایع هستند. طیف بیماری های منتقله از طریق کنه ها که بر حیوانات اهلی و انسان اثر می گذارد در سالهای اخیر افزایش یافته است و نیازمند مطالعات جدیدی در زمینه اپیدمیولوژی، تشخیص و اکولوژی این بیماری های تازه شناخته شده است (۴).

بیماری های ریکتزیایی ناشی از کنه ها به عنوان بیماری های نوظهور و زئونوز شناخته می شوند که سلامت انسان و دام ها را تحت تاثیر قرار می دهند و توزیع این بیماری در سراسر جهان در ارتباط با ناقل آن می باشد (۵). ریکتزیا یک باکتری اجباری داخل سلولی و گرم منفی می باشد که سخت رشد بوده و از مهم ترین و قدیمی ترین بیماری های منتقله از طریق ناقلین می باشد. این باکتری توسط گزش بند پایان به حیوان و انسان منتقل می شود. ناقل اصلی این پاتوژن کنه ها می باشند اما طیف وسیعی از ناقلین برای این پاتوژن مطرح شده است شامل: کک، شپش، مایت و حتی در برخی از گونه های ریکتزیا پشه ها. تاکنون بیش از ۳۰ گونه از این باکتری شناسایی شده است. جنس ریکتزیا به چهار گروه اصلی تقسیم می شود، که شامل: گروه تب خالدار، گروه تب تیفوس، گروه *Rickettsia bellii* و *Rickettsia canadensis* می باشد. گونه های *Rickettsia prowazekii* و *Rickettsia typhi* گروه تیفوس را تشکیل می دهند و بیشتر گونه های شناسایی شده (بیش از ۲۰ گونه) گروه تب های خالدار را تشکیل می دهند (۶، ۷). گروه تب های خالدار به دو زیر گروه اصلی تقسیم می شود شامل: گروه تب منقوط کوه های راکی (RMSF) و تب منقوط مدیترانه ای (MSF) که تب منقوط مدیترانه ای در محدوده ی مدیترانه (آفریقا، جنوب اروپا و هند) یک بیماری اندمیک محسوب می شود که از علل آن می توان به گرم شدن جهانی کره زمین و افزایش حمله و گزش کنه ها اشاره کرد (۸). عفونت های ریکتزیایی از طریق گزش کنه به حیوانات

منتقل می شود و در این میان انسان به طور تصادفی مورد گزش کنه ها قرار می گیرد و نمی تواند بیماری را در طبیعت حفظ کند(۹).

علائم این بیماری در انسان اختصاصی نبوده و در بیشتر موارد به موقع تشخیص داده نمی شود و درمان های لازم صورت نمی گیرد. علائم بیماری شامل تب و لرز، سردرد و میالژی بوده و در مراحل بعدی علائمی همچون تهوع و استفراغ و اسهال نیز مشاهده می گردد. میزان مرگ و میر در بیماران درمان نشده بین ۵ الی ۲۵ درصد گزارش شده است(۵). در بین سالهای ۱۹۸۴ - ۲۰۰۴ هشت ریکتزایوز منتقله از طریق کنه ها با گونه های متفاوت در سراسر جهان گزارش کرده اند که شامل *Rickettsia rickettsii*، *Rickettsia sibirica*، *Rickettsia australis*، *Rickettsia japonica*، *Rickettsia africae*، *Rickettsia conorii*، *Rickettsia slovaca* می باشند. همچنین در سالهای اخیر عفونت های انسانی ناشی از *Rickettsia mongolotimonae* و *Rickettsia heilongjiangii* در مناطق مختلف جغرافیایی گزارش شده اند(۱۰). بارتونلا هم از باکتری های منتقله از طریق ناقلین هستند که با افزایش تعداد زیادی از عفونت های نوظهور زئونوز در انسان و حیوانات در ارتباط هستند و منجر به عفونت های تحت بالینی یا خود محدود شونده تا بیماری های شدید و تهدید کننده زندگی می شود. این باکتری به طور گسترده ای در بین پستانداران کوچک توزیع شده است و به طور بالقوه ای باعث نگرانی هایی مرتبط با سلامت انسان می شود(۱۱). بارتونلا یک باسیل پلئومورف گرم منفی، سخت رشد و اختیاری داخل سلولی است که حداقل ۳۵ گونه و ۳ تحت گونه از آن شناسایی شده است. طیف وسیعی از حیوانات به عنوان میزبان و مخزن این بیماری مطرح می باشند که به طور عمده از طریق مدفوع کک و شپش، نیش مگس ماسه و به طور بالقوه با نیش کنه ها منتقل می گردد(۱۲). این باکتری ها گلبول های قرمز را آلوده کرده و می توانند به سلول های اندوتلیال، سلول های پیش ساز CD34⁺ و سلول های دندریتیک میزبان حمله کرده و منجر به عفونت های مزمن شوند(۱۳). بارتونلا، انسان و بسیاری از گونه های جانوری را آلوده می کند. با توجه به نتایج مولکولی به دست آمده، DNA بارتونلا را در کنه ها ردیابی کرده اند و کنه ها به عنوان منبع احتمالی عفونت بارتونلا مرتبط با حیوانات در انسان پیشنهاد کرده اند. بارتونلا بیماری های مختلفی در انسان ایجاد می کند از جمله باعث بیماری خراش گربه (*B. henselae*)، بیماری کریون (*B. bacilliformis*)، بیماری تب سنگر (*B. quintana*)، اندوکاردیت (*B. quintana and B. henselae*)، آنژیوماتوز باسیلار (*B. quintana* and *B. henselae*) و پلیوز کبدی (*B. henselae*) می شود (۳، ۱۴). *B. quintana* در بی خانمان های با بهداشت ضعیف ظهور پیدا کرده است (۱۲). *B. henselae* که باعث بیماری خراش گربه می شود، احتمالاً شایع ترین بیماری مشترک بین انسان و حیوانات اهلی در کشورهای توسعه یافته و به طور قابل توجهی با سایر سندرم ها، به ویژه عفونت های چشمی و اندوکاردیت در ارتباط است و گربه ها به عنوان مخزن اصلی آن و کک گربه (*Ctenocephalides felis*) به عنوان ناقل آن مطرح می باشد اما انتقال توسط دیگر بندپایان، به ویژه کنه ها، پیشنهاد شده است(۱۴).

موارد انسانی مبتلا به این عفونت ها در ایران شناسایی شده اند، از جمله در سال ۲۰۱۷ پنج مورد انسانی مبتلا به تب منقوط مدیترانه ای در استان کرمان شناسایی گردیدند(۱۵). از دیگر موارد انسانی مبتلا به تب منقوط مدیترانه

ای می توان به موردی در استان کرمان اشاره کرد که به دلیل تشخیص دیر هنگام بیماری منجر به فوت بیمار گردید (۱۶). همچنین از جمله مطالعات صورت گرفته بر روی کنه ها به منظور شناسایی گونه ی ریکتزیا در ایران میتوان به مطالعه ای بر روی ۳۰۰ کنه ی *D. marginatus* در آذربایجان شرقی اشاره کرد که ۱۰ نمونه برای ریکتزیا در این کنه ها مثبت گزارش شد که متعلق به گونه ی ریکتزیا اسلوواکا بودند (۱۷). با توجه به گسترش بیماری های زئونوز منتقله از طریق کنه ها به عنوان عامل تهدید کننده سلامت عمومی، بررسی این بیماری ها از اهمیت بالایی برخوردار است. داده های محدودی از شیوع بارتونلا و ریکتزیا در ایران در دسترس است و اطلاعات مربوط به شیوع بارتونلا و ریکتزیا در آلودگی انسانی و ناقلین در ایران بسیار ناقص است. لذا هدف از این مطالعه شناسایی گونه های ریکتزیا و بارتونلا در کنه های شمال ایران و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی این باکتری ها می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها: در این مطالعه، کنه ها از بانک نمونه های موجود در مرکز تحقیقاتی بیماری های نوپدید و بازپدید که طی سالهای ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ از حیوانات اهلی (گوسفند، بز، گاو، شتر، اسب، سگ و الاغ) و جوندگان استان های گلستان، مازندران و گیلان جمع آوری شده بودند، وارد مطالعه گردیدند. استان های مازندران، گلستان و گیلان در شمال ایران واقع شده اند که از شمال از سمت شمال به دریای خزر و از جنوب به شمال رشته کوه البرز محدود شده اند. این استان های پوشیده از جنگل ها، کوه ها و سواحل دریا هستند و دارای آب و هوای معتدل و دارای سه ناحیه جغرافیایی متفاوت دشتی معتدل، کوهستانی و نیمه خشک هستند. نمونه های کنه پس از انتقال به آزمایشگاه بر اساس کلید های مورفولوژیک شناسایی شدند و گونه ی آنها تعیین گردید (۱۸). کنه های انتخاب شده پس از شناسایی توسط کلید های مورفولوژیک بر اساس یکسان بودن گونه، میزبان، محل صید، جنسیت و مرحله رشد در گروه های ۱ تا چند عددی قرار گرفتند و کد گذاری اختصاصی برای هر ویال انجام گردید.

استخراج DNA از کنه ها: نمونه های پوول شده با استفاده از نیتروژن مایع و PBS استریل به صورت هموزن در آمدند و DNA آنها با روش استات پتاسیم استخراج گردید. بر اساس روش ذکر شده به طور خلاصه، ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده (حاوی Tris-HCl ۰/۱ مولار، EDTA ۰/۰۵ مولار، ساکارز ۰/۲ مولار و SDS ۰/۵ درصد) و ۲۰ میکرولیتر پروتیناز K (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) به نمونه های هموزن شده اضافه شد و یک شبانه روز در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از گذشت یک شبانه روز، ۱۲۰ میکرولیتر استات سدیم ۵ مولار به نمونه ها اضافه شد و نمونه ها بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شدند. پس از آن، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند و مایع رویی (سوپرناتانت) برای استفاده برای مرحله بعدی جداسازی شد. برای رسوب DNA، ۳۵ میکرولیتر از استات سدیم ۴ مولار و ۱ میلی لیتر اتانول خالص به هر نمونه اضافه شد و نمونه ها به خوبی میکس شدند و ۱۰ دقیقه بر روی یخ نگهداری شدند. سپس نمونه ها در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی (سوپرناتانت) دور ریخته شد. رسوب ها با ۵۰۰

میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شدند و اجازه داد شد که الکل باقی مانده در دمای اتاق کاملاً خشک گردد. در نهایت، رسوب های کاملاً خشک شده در ۲۰۰ میکرولیتر الیوشن بافر (Tris-HCl ۱ مولار، EDTA ۱ مولار) حل شدند و تا زمان آزمایش در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۹).

شناسایی جنس ریکتزیا: DNA های استخراج شده از کنه ها جهت شناسایی *Rickettsia spp.* با روش Real-Time-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور حجم ۲۰ میکرولیتر متشکل از ۱۰ میکرولیتر مستر میکس تجاری (۲x RealQ Plus Master Mix Ampliqon, Denmark)، ۴ میکرولیتر DNA الگو، ۹۰۰ نانومول از پرایمر مستقیم، ۹۰۰ نانومول از پرایمر معکوس، ۲۰۰ نانومول پروب (نشان دار شده با رنگ فلورسنس ۶-کربوکسی فلوروسین (6-Fam) به عنوان رنگ رپورتر و TAMRA به عنوان خاموش کننده) بود که با آب مقطر استریل به حجم مورد نظر رسانده شد. در این تست DNA ریکتزیا کونوری (Amplirun, Vircell) به عنوان کنترل مثبت و همچنین آب مقطر تزریقی به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. این تست با استفاده از دستگاه Corbett 6000 Rotor-Gene system (Corbett, Victoria, Australia) انجام گرفت. پروتکل دمایی این تست شامل: فعال سازی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۵ سیکل با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتیگراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد ۶۰ ثانیه بوده و تجزیه و تحلیل کمی نتایج دستگاه با استفاده از نرم افزار Rotor-Gene Q Series Software انجام شد. خوانش در هر سیکل در انتهای دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و با رنگ سبز صورت گرفت (جدول شماره ۱).

نمونه های مثبت جنس ریکتزیا برای شناسایی گونه های ریکتزیا آزمایش شدند. بدین منظور نمونه هایی که CT آنها ۳۰ و کمتر از آن بود جهت تعیین گونه انتخاب گردیدند. بطوری که این نمونه ها برای ژن *gltA* مورد آزمایش قرار گرفتند و محصولات PCR برای هر ژن توالی یابی شد. بدین منظور حجم ۲۰ میکرولیتر متشکل از ۱۰ میکرولیتر مستر میکس تجاری (2x TEMPase Master Mix RED A Ampliqon, Denmark)، ۴ میکرولیتر DNA الگو، ۵۰۰ نانومول پرایمر (*gltA-F* (GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT)، ۵۰۰ نانومول پرایمر (*gltA-R* (CAGGGTCTTCRTGCATTCTT) که با آب مقطر تزریقی به حجم مورد نظر رسانده شده بود تهیه گردید (۲۰). پروتکل دمایی شامل: یک سیکل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و چرخه نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بود.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک: محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند و نمونه های دارای باند اختصاصی (834 bp) برای توالی یابی ارسال شدند (Genomin Co, Tehran, Iran). توالی ها با استفاده از نرم افزار Chromas 2.6.6 software مورد ارزیابی قرار گرفتند. توالی های ژن *gltA* در مورد گونه های مختلف *Rickettsia* در GenBank استخراج و همراه با توالی های بدست آمده از نمونه های این مطالعه با استفاده از نرم افزار MEGA نسخه (MEGA X 10.1) مورد تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک قرار گرفتند.

شناسایی بارتونلا: نمونه های DNA استخراج شده از کنه ها، با استفاده از روش SYBR Green Real-time PCR جهت ردیابی ژن 16S-23S rRNA بارتونلا مورد آزمایش قرار گرفت. در این روش حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر بود که حاوی ۱۰ میکرولیتر مستر میکس سایبر گرین Plus 2x Master Mix Green Low ROX™ (AmpliQon, Denmark)، ۷۰۰ نانومول پرایمر مستقیم، ۷۰۰ نانومول پرایمر معکوس، ۴ میکرولیتر از نمونه DNA الگو بوده و با آب مقطر تزریقی به حجم مورد نظر رسانده شد. برنامه دمایی با فعال سازی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، و ۴۰ سیکل به صورت سه مرحله ای (۹۵ درجه سانتیگراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۲۰ ثانیه) همراه با مرحله ی ملتینگ بود. در این تست DNA بارتونلا همنسله (Amplirun, Vircell) به عنوان کنترل مثبت و همچنین آب مقطر تزریقی به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. این تست با استفاده از دستگاه (Corbett Victoria, Corbett 6000 Rotor-Gene system (Australia) انجام شد. (جدول شماره ۱)

Table 1. Oligonucleotide sequences Primer and probe used for detection of *Rickettsia spp.* & *Bartonella spp.*(21)

Genus	Gene target	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>Rickettsia spp.</i>	Rsp	5'- CGCAACCCTYATTCTTATTTGC -3'	149
		5'- CCTCTGTAAACACCATTGTAGCA -3'	
		6- FAM- TAAGAAACTGCCGGTGATAAGCCGGAG- TAMRA	
<i>Bartonella spp.</i>	16S-23S rRNA	5'-GGGGAAGGTTTTCCGGTTTATC-3'	92
		5'-GAGGACTTGAACCTCCGACC-3'	

نتایج

در این مطالعه در مجموع ۳۹۹۹ عدد کنه از بانک نمونه های موجود در مرکز تحقیقاتی بیماری های نوپدید و بازپدید که از سه استان شمالی (گلستان، گیلان و مازندران) جمع آوری گردیده بودند وارد مطالعه شدند و پس از بررسی های مورفولوژیک کنه ها بر اساس یکسان بودن گونه، محل صید، جنسیت و مرحله رشد پوول شدند. ۱۴۱۵ عدد از کنه ها نر (۳۵/۳۸ درصد)، ۲۵۴۲ عدد ماده (۶۳/۵۶ درصد) و ۴۲ عدد نمف (۱/۰۵ درصد) بودند. ۱۹۲۶ عدد کنه از گاو (۴۸/۱۶ درصد)، ۱۴۵۸ کنه از گوسفند (۳۶/۴۵ درصد)، ۳۸۳ کنه از بز (۹/۵۷ درصد)، ۵۰ کنه از سگ (۱/۲۵ درصد)، ۱۲۸ کنه از شتر (۳/۲۰ درصد)، ۵ کنه از اسب (۰/۱۲ درصد)، ۲ کنه از الاغ (۰/۰۵ درصد) و ۴۷ (۱/۱۷ درصد) کنه از خار پشت صید شده بودند. از مجموع کنه ها تعداد ۶۳۸ عدد پوول تهیه گردید و بعد از انجام پروسه ی استخراج DNA مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند.

از بین ۶۳۸ عدد پوول تهیه شده، ۵۹/۲ درصد پوول ها از استان مازندران، ۳۱/۶ درصد پوول ها از استان گلستان و ۹/۰۹ درصد پوول ها از استان گلستان بودند (جدول شماره ۵). همچنین در این مطالعه تعداد ۱۱ گونه کنه بر اساس کلید های مورفولوژیک شناسایی شد که متعلق به چهار جنس *اکسودس*، *هموفیسالیس*، *هیالوما* و *رپیسفالوس* بودند که بیشترین درصد متعلق به گونه *اکسودس رسیوس* (۴۶/۴ درصد) و بعد از آن به ترتیب به *رپیسفالوس تورانیکوس* (۲۶/۳ درصد) و *رپیسفالوس سانگوئینوس* (۱۷/۱ درصد) تعلق داشت (جدول شماره ۳). در میان پوول های تهیه شده نیز بیشترین تعداد به ترتیب متعلق به گونه های *اکسودس رسیوس* (n:۲۵۹، ۴۰/۵۹ درصد)، *رپیسفالوس سانگوئینوس* (n:۱۴۵، ۲۲/۷۳ درصد) و *رپیسفالوس تورانیکوس* (n:۱۳۱، ۲۰/۵۳ درصد) بود (جدول شماره ۴).

نتایج ردیابی ریکتزیا: از مجموع ۶۳۸ پوول تست شده با روش Real-Time-PCR برای ردیابی DNA ریکتزیا در نمونه های استخراج شده از کنه ها، ۱۶۱ پوول (۲۵/۲ درصد) مثبت گزارش شد. بر اساس بررسی نتایج به دست آمده از تست های مولکولی بیشترین تعداد مثبت متعلق به جنس *رپیسفالوس* (۴۲/۳ درصد) بود و همچنین بیشترین تعداد پوول مثبت شده برای این پاتوژن به ترتیب متعلق به گونه *رپیسفالوس سانگوئینوس* (۴۸/۹ درصد)، *رپیسفالوس تورانیکوس* (۴۱/۹ درصد)، *هیالوما مارجیناتوم* (۲۹/۵ درصد) و *هموفیسالیس اینرمیس* (۲۵ درصد) بود (جدول شماره ۴). جنس *رپیسفالوس* بطور معنی داری بیشترین (۴۲/۳ درصد) آلودگی و جنس *یکسودس* کمترین (۵ درصد) آلودگی به ریکتزیا را داشت ($P < 0.001$).

همچنین بر اساس بررسی تعداد پوول های مثبت برای هر استان، به ترتیب ۲۹/۷ درصد از استان گلستان، ۲۵/۹ درصد از استان مازندران و ۵/۱۷ درصد از استان گیلان مثبت گزارش گردیدند (جدول شماره ۵). کنه های استان های مازندران و گلستان بطور معنی داری آلودگی ریکتزیایی بیشتری در مقایسه با کنه های استان گیلان داشتند ($P < 0.001$). اختلاف آلودگی به ریکتزیا در کنه های استان های مازندران و گلستان از نظر آماری معنی دار نبود ($P = 0.33$).

نتایج توالی یابی و فیلوژنتیکی ریکتزیا: از بین تمامی نمونه های مثبت برای ریکتزیا، در مجموع ۶۵ نمونه پوول مثبت برای مرحله تعیین گونه انتخاب شدند که انتخاب این نمونه ها بر اساس نوع گونه کنه، نوع میزبان و منطقه نمونه برداری شده بود. همچنین لوود DNA ریکتزیا در نمونه های مثبت (Ct کمتر از ۳۰) نیز در انتخاب نمونه مد نظر قرار گرفت.

از مجموع ۶۵ نمونه توالی یابی شده برای ژن *gltA* ریکتزیا، ۸ گونه مختلف شناسایی گردید که بیشترین آنها *ریکتزیا ماسلیه* (۳۲ تا) ۴۹/۲ درصد و *ریکتزیا سبیریکا* (۲۰ تا) ۳۰/۸ درصد بودند. سایر گونه های ریکتزیا شناسایی شده در این مطالعه شامل *ریکتزیا رپیسفالی* (۳ تا)، *ریکتزیا اشلیمانی* (*Rickettsia aeschlimannii*) (۵ تا)، *ریکتزیا هلواتیکا* (۵ تا)، *ریکتزیا آسیاتیکا* (۴ تا)، *ریکتزیا موناسنسیس* (۶ تا) و *ریکتزیا رائلوتی* (۱ تا) بودند (جدول شماره ۶).

جدول شماره ۶: توزیع گونه های مختلف ریکتزیا شناسایی شده بر اساس گونه کنه ها و استان در این مطالعه.

Tick specie	province	Host	No. of positive sample typed	Detected <i>Rickettsia</i> spp (N)
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	Golestan	Cattle	1	<i>R. massiliae</i> (1)
		Dog	3	<i>R. massiliae</i> (3)
		Goat	2	<i>R. massiliae</i> (2)
		Sheep	4	<i>R. massiliae</i> (4)
	Mazandaran	Cattle	1	<i>R. sibirica</i> (1)
		Dog	4	<i>R. sibirica</i> (2), <i>R. massiliae</i> (2)
		Goat	2	<i>R. sibirica</i> (1), <i>R. massiliae</i> (1)
		Sheep	7	(4), <i>R. massiliae</i> (3), <i>R. rhipicephali</i> (1) <i>R. sibirica</i>
<i>Rhipicephalus sanguineous</i>	Golestan	Goat	1	<i>R. massiliae</i> (1)
		Sheep	4	<i>R. massiliae</i> (4)
	Mazandaran	Cattle	2	<i>R. sibirica</i> (1), <i>R. massiliae</i> (1)
		Goat	8	<i>R. sibirica</i> (2), <i>R. massiliae</i> (4), <i>R. rhipicephali</i> (2)
		Sheep	13	<i>R. sibirica</i> (8), <i>R. massiliae</i> (6), <i>R. aeschlimannii</i> (1)
		ND	1	<i>R. sibirica</i> (1)
<i>Ixodes ricinus</i>	Guilan	Cattle	1	<i>R. monacensis</i> (1)
	Mazandaran	Cattle	6	<i>R. helvetica</i> (5), <i>R. asiatica</i> (4), <i>R. monacensis</i> (5)
<i>Hyalomma marginatum</i>	Guilan	Cattle	1	<i>R. aeschlimannii</i> (1)
	Mazandaran	Cattle	1	<i>R. aeschlimannii</i> (1)
		Goat	1	<i>R. aeschlimannii</i> (1)
		Sheep	2	<i>R. aeschlimannii</i> (1), <i>R. raoultii</i> (1)
Total			65	<i>R. sibirica</i> (20), <i>R. massiliae</i> (32), <i>R. rhipicephali</i> (3), <i>R. aeschlimannii</i> (5), <i>R. helvetica</i> (5), <i>R. asiatica</i> (4), <i>R. monacensis</i> (6), <i>R. raoultii</i> (1)

آلودگی به ریکتزیا ماسلیه در کنه های دو استان مازندران و گلستان از میزبانان مختلف (گاو، گوسفند، بز و سگ) مورد شناسایی قرار گرفت. تمام کنه های گونه ریپسفالوس تورانیکوس جمع آوری شده از استان گلستان آلودگی به ریکتزیا ماسلیه را داشتند. همچنین آلودگی با ریکتزیا ماسلیه در کنه ریپسفالوس سانگوینوس های جدا شده از سگ و گوسفند در استان گلستان و کنه های جدا شده سگ، گوسفند و بز در استان مازندران دیده شد. ۳۰ مورد (۹۹/۷۵ درصد) از ریکتزیا ماسلیه شناسایی شده در این مطالعه شباهت ۱۰۰ درصدی در توالی ژن gltA با سویه فرانس ریکتزیا ماسلیه MTU5 (CP000683.1) در هنگام بلاست در بانک ژن داشتند. همچنین دو نمونه (R22a و R33) نیز شباهت ۱۰۰ درصدی و ۹۹/۸۷ درصدی به ترتیب با سویه فرانس ریکتزیا ماسلیه AZT80 (CP003319.1) و سویه فرانس ریکتزیا ماسلیه MTU5 (CP000683.1) در بانک ژن داشت. هیچ مورد مثبتی از ریکتزیا ماسلیه در کنه های ریپسفالوس بورس، ایکسودس رسینوس و هیالوما مارجیناتوم مشاهده نگردید.

آلودگی کنه های *ریسفالوس سانگوینوس*، *ریسفالوس تورانیکوس* و *ریسفالوس بورسا* در استان مازندران به ریکتزیا سیبریکا مشاهده گردید. بر اساس بلاست ژن *gltA* در بانک ژن، اکثر ریکتزیا سیبریکا شناسایی شده (۸۰ درصد) در این مطالعه شباهت ۱۰۰ درصدی با یکی از سویه های ریکتزیا سیبریکا (MF098405.1) را داشتند و سه ریکتزیا سیبریکا شناسایی شده (۱۵ درصد) نیز شباهت ۹۹/۷۸ درصدی با سویه فرانس فوق الذکر داشتند. همچنین یک نمونه نیز شباهت ۱۰۰ درصدی با دیگر سویه فرانس ریکتزیا سیبریکا (MF098404.1) داشت. هیچ مورد مثبتی از ریکتزیا سیبریکا در کنه های ایکسودس رسینوس و هیالوما *مارجیناتوم* مشاهده نگردید. همچنین هیچ مورد مثبت ریکتزیا سیبریکا در کنه های استان های گیلان و گلستان یافت نشد.

آلودگی با ریکتزیا *اشلیمانی* فقط در کنه های هیالوما *مارجیناتوم* و *ریسفالوس سانگوینوس* در استان های مازندران و گیلان مشاهده گردید. ریکتزیا *اشلیمانی* غالبترین ریکتزیای مشاهده شد در کنه های هیالوما *مارجیناتوم* جدا شده از گاو (مازندران، گیلان)، گوسفند (مازندران) و بز (مازندران) بود. بر اساس بلاست ژن *gltA* در بانک ژن، دو ریکتزیا *اشلیمانی* شناسایی شده در این مطالعه (R6 و R21c) شباهت ۹۹/۸۸ درصدی با یکی از سویه های ریکتزیا *اشلیمانی* (KY411135.1) را داشتند که متعلق به کنه های هیالوما *مارجیناتوم* و *ریسفالوس سانگوینوس* استان مازندران بودند. همچنین سه نمونه R31 (مازندران)، R35 (مازندران) و R55 (گیلان) که همگی در هیالوما *مارجیناتوم* شناسایی شده بودند به ترتیب شباهت ۹۹/۷۸ درصدی با ریکتزیا *اشلیمانی* KU961540.1، شباهت ۹۹/۷۸ درصدی با ریکتزیا *اشلیمانی* HQ335513.1، و شباهت ۱۰۰ درصدی با ریکتزیا *اشلیمانی* MH932014.1، در بلاست توالی ژن *gltA* در بانک ژن داشتند.

ریکتزیا *هلواتیکا* فقط در کنه های *اکسودس رسینوس* جدا شده از گاو در استان مازندران مورد شناسایی قرار گرفتند. همچنین آلودگی به ریکتزیا *هلواتیکا* و ریکتزیا *آسیاتیکا* در سایر گونه های کنه جمع آوری شده در این مطالعه در سایر استان ها، که برای تعیین گونه ریکتزیا مورد بررسی قرار گرفتند، مشاهده نگردید. ۴ نمونه (R48a، R49a، R52a و R53a) ریکتزیا *هلواتیکا* در این مطالعه، شباهت ۱۰۰ درصدی را هنگام بلاست توالی ژن *gltA* در بانک ژن با توالی ثبت شده ریکتزیا *هلواتیکا* (KU310588.1) در بانک ژن را داشتند و یک نمونه (R50) نیز شباهت ۹۹/۸۸ درصدی با توالی ثبت شده را نشان داد. همچنین آلودگی به ریکتزیا *هلواتیکا* در سایر گونه های کنه جمع آوری شده در این مطالعه در سایر استان ها، که برای تعیین گونه ریکتزیا مورد بررسی قرار گرفتند، مشاهده نگردید.

آلودگی ۴ نمونه با ریکتزیا *آسیاتیکا* در *اکسودس رسینوس* جدا شده از گاو در استان مازندران مورد شناسایی قرار گرفت. تمامی این نمونه ها، شباهت ۹۹/۷۴ درصدی را هنگام بلاست توالی ژن *gltA* در بانک ژن با توالی ثبت شده ریکتزیا *آسیاتیکا* (AP019563.1) در بانک ژن را داشتند. همچنین آلودگی به ریکتزیا *آسیاتیکا* در سایر گونه های کنه جمع آوری شده در این مطالعه در سایر استان ها، که برای تعیین گونه ریکتزیا مورد بررسی قرار گرفتند، مشاهده نگردید.

از طرف دیگر، ریکتزیا موناسنسیس در کنه /یکسودس رسینوس جمع آوری شده از سطح بدن گاو در استان مازندران و گیلان مشاهده گردید. تمامی ۵ نمونه ریکتزیا موناسنسیس شناسایی شده در این مطالعه، شباهت ۱۰۰ درصدی با دیگر سویه فرانس ریکتزیا موناسنسیس (LN794217.1) داشتند.

آلودگی به ریکتزیا ریپیسفالی در کنه های ریپیسفالو سانگوینوس (جدا شده از بز) و ریپیسفالوس تورانیکوس (جدا شده از گوسفند) فقط در استان مازندران مشاهده گردید. نمونه های R24، R22b و R37 به ترتیب شباهت ۹۷/۸۷ درصد، ۹۹/۵ درصد و ۹۹/۴۸ درصد در هنگام مقایسه توالی ژن gltA با سویه فرانس ریکتزیا ریپیسفالی (CP001313.1) در بانک ژن داشتند.

همچنین ما یک مورد مثبت برای آلودگی به ریکتزیا رائلوتی در این مطالعه داشتیم که کنه هیالوما مارجیناتوم جدا شده از گوسفند در استان مازندران بود. این نمونه شباهت ۹۹/۸۳ درصدی در توالی ژن gltA با توالی ثبت شده ریکتزیا رائلوتی (MT178338.1) در بانک ژن را داشت.

در ۵ نمونه مورد بررسی سه گونه مختلف ریکتزیا شناسایی گردید که ۴ مورد مربوط به کنه /اکسودس رسینوس جمع آوری شده از گاو در استان مازندران بودند که آلودگی همزمان با ریکتزیا هلواتیکا، ریکتزیا آسیاتیکا و ریکتزیا موناسنسیس را داشتند. همچنین یک نمونه کنه ریپیسفالوس سانگوینوس جدا شده از گوسفند در استان مازندران دارای آلودگی با ریکتزیا سیبریکا، ریکتزیا ماسلیه و ریکتزیا اشلیمانی داشت. از طرف دیگر، یک نمونه کنه ریپیسفالوس تورانیکوس جمع آوری شده از گوسفند در استان مازندران آلودگی همزمان با ریکتزیا ماسلیه و ریکتزیا سیبریکا را داشت.

نتایج ردیابی باتور تونلا: از مجموع ۶۳۸ پوول تست شده در این مطالعه برای شناسایی بارتونلا به روش Real-Time-PCR در DNA کنه های سه استان شمالی هیچ یک از نمونه ها آلوده به این پاتوژن نبودند (جدول شماره ۳).

Table 3. Population of tick collected based on species in the studied provinces in 2017-18.

Genus	Species	Mazandaran N (%)	Golestan N (%)	Guilan N (%)	Total N (%)
<i>Ixodes</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	1805(76.6)	6(0.41)	140(74.8)	1951(46.4)
<i>Haemaphysalis</i>	<i>Ha. concinna</i>	6(0.25)	-	1(0.53)	7(0.16)
	<i>Ha. inermis</i>	3(0.12)	-	1(0.53)	4(0.09)
	<i>Ha. punctata</i>	-	-	1(0.53)	1(0.02)
<i>Hyalomma</i>	<i>Hy. anatolicum</i>	-	40(2.74)	-	40(1.0)

	<i>Hy. marginatum</i>	56(2/37)	65(4.46)	16(8.5)	137(3.42)
	<i>Hy. dromedarii</i>	-	18(1.23)	-	18(0.45)
<i>Rhipicephalus</i>	<i>Rh. bursa</i>	48(2.03)	1(0.06)	-	49(1.22)
	<i>Rh. sanguineus</i>	343(14.5)	343(23.5)	1(0.53)	687(17.1)
	<i>Rh. turanicus</i>	61(2.58)	983(67.5)	9(4.81)	1053(26.3)
	<i>Rh. annulatus</i>	34(1.4)	-	18(9.6)	52(1.3)
Total		2356(100)	1456(100)	187 (100)	3999(100)

Table 4. Prevalence of positive ticks pools for *Rickettsia* spp.

Genus	Species	Number of tested pools	Number of positive pools for <i>Rickettsia</i> spp. in species (%)	Number of positive pools for <i>Rickettsia</i> spp. per genus (%)	p-value
<i>Ixodes</i>	<i>Ix. ricinus</i>	259	13(5)	13(5)	<0.001
<i>Haemaphysalis</i>	<i>Ha. Concinna</i>	4	0(0)	1(11.1)	
	<i>Ha. Inermis</i>	4	1(25)		
	<i>Ha. Punctata</i>	1	0 (0)		
<i>Hyalomma</i>	<i>Hy. anatolicum</i>	10	1(10)	15(25.8)	
	<i>Hy. marginatum</i>	44	13(29.5)		
	<i>Hy. dromedarii</i>	4	1(25)		
<i>Rhipicephalus</i>	<i>Rh. bursa</i>	13	4(3.07)	132(42.3)	
	<i>Rh. sanguineus</i>	145	71(48.9)		
	<i>Rh. turanicus</i>	131	55(41.9)		
	<i>Rh. annulatus</i>	23	2(8.69)		
Total		638	161(25.2)		

Table 5. Prevalence of *Rickettsia* spp. in ticks based on counties and provinces.

Counties	provinces	Number of pools tested	Number of positive pools for <i>Rickettsia</i> spp. per genus
----------	-----------	------------------------	---

			N(%)
Golestan	Aq Qala	67	16(23.8)
	Bandar	56	11(19.6)
	Aliabad	8	3(37.5)
	Gorgan	39	19(48.7)
	Gomishan	8	1(12.5)
	Aliabad-e-Katul	23	10(43.4)
	Gonbad Kavus	1	0(0)
	Total	202	60(29.7)
Mazandaran	Nur	62	17(27.4)
	Amol	78	18(23)
	Babol	45	13(28.8)
	Sari	71	20(28.1)
	Qaemshahr	55	22(40)
	Mahmudabad	16	2(12.5)
	Savadkuh	31	3(9.67)
	Unknown	20	3(15)
	Total	378	98(25.9)
Guilan	Talesh	46	2(4.34)
	Masal	5	1(20)
	Rudsar	1	0(0)
	Lahijan	6	0(0)
	Total	58	3(5.17)

بحث

بیماری های زئونوز یک نگرانی بزرگ برای سلامت عمومی هستند. با توجه به گسترش عفونت های منتقله از طریق ناقلین بند پا، برای درک بهتر اپیدمیولوژی دو پاتوژن ریکتزیا و بارتونلا و احتمال انتقال آنها از طریق این ناقلین، مطالعه ای بر روی این دو پاتوژن در کهنه های سه استان شمالی ایران با روش Real-Time-PCR صورت گرفت. بر اساس نتایج این مطالعه ریکتزیا در ۱۶۱ پوول از مجموع ۶۳۸ پوول تهیه شده، مثبت گزارش شد (۲۵/۲ درصد). در بین سه استان مورد بررسی، شیوع این پاتوژن در کهنه ها به ترتیب ۲۹/۷ درصد برای استان گلستان، ۲۵/۹ درصد برای استان مازندران و ۵/۱۷ درصد برای استان گیلان گزارش شد. در بررسی مولکولی پاتوژن بارتونلا در این مطالعه هیچ گونه مورد مثبتی گزارش نشد.

اهمیت عوامل بیماری زای ریکتزایی در ۲۵ سال گذشته به طور چشم گیری افزایش یافته است، به طوری که برخی از گونه های منتقله از طریق کنه ها که برای چندین دهه غیر بیماری زا تلقی نمی شدند اکنون با عفونت های انسانی در ارتباط هستند (۲۲). مطالعات صورت گرفته جهت شناسایی پاتوژن ریکتزیا در کنه های ایران بسیار محدود می باشد. این در حالی است که مطالعات بسیاری در کشور های همسایه بر روی این پاتوژن به عنوان عاملی عفونی و پر خطر برای سلامت عمومی صورت گرفته است (۲۳). در این مطالعه در بین گونه های کنه بیشترین شیوع به ترتیب در گونه های *ریپیسفالوس سانگوئینوس* (۴۸/۹ درصد)، *ریپیسفالوس تورانیکوس* (۴۱/۹ درصد)، *هیالوما مارجیناتوم* (۲۹/۵ درصد) و *هموفیسالیس اینرمیس* (۲۵ درصد) مشاهده گردید. همچنین براساس نتایج توالی یابی بر روی ژن *gltA* بر روی ۶۵ نمونه از بین موارد مثبت، بیشترین گونه ی شناسایی شده متعلق به ریکتزیا *ماسلیه* (۴۹/۲ درصد) و ریکتزیا *سیبریکا* (۳۰/۸ درصد) بود. ریکتزیا *ماسلیه* برای اولین بار از کنه های *ریپیسفالوس* جدا شد و بیشتر گزارشات مربوط به گونه های *ریپیسفالوس تورانیکوس*، *ریپیسفالوس سانگوئینوس* در کشور های فرانسه، یونان و اسپانیا بوده است. اولین مورد انسانی مبتلا به این گونه در سال ۲۰۰۵ در ایتالیا شناسایی شد. ریکتزیا *ماسلیه* سبب بروز بیماری شبه MSF در انسان می شود (۲۴). در این مطالعه ریکتزیا *ماسلیه* در کنه های *ریپیسفالوس تورانیکوس* و *ریپیسفالوس سانگوئینوس* جدا شده از سطح بدن گاو، گوسفند، بز و سگ در هر سه استان گلستان، مازندران و گیلان شناسایی گردید. مطالعه ای در فلسطین بر روی ۸۶۷ کنه جمع آوری شده از میزبان های مختلف جهت شناسایی SFG ریکتزایی صورت گرفت. در این مطالعه ۱۴۸ نمونه برای این پاتوژن مثبت گزارش شد و جهت تعیین گونه توالی یابی شدند. ۶۳ نمونه بر اساس نتایج بررسی بر روی ژن *ompA* تعیین گونه شدند. شایع ترین گونه ریکتزیا که در این مطالعه شناسایی گردید متعلق به ریکتزیا *ماسلیه* بود. ۲۸ کنه آلوده به این گونه بوده این در حالی بود که موارد مثبت بیشتر متعلق به کنه های *ریپیسفالوس تورانیکوس* و *ریپیسفالوس سانگوئینوس* جمع آوری شده از سگ و گوسفند بودند و با نتایج این مطالعه هم خوانی داشت (۲۵).

ریکتزیا *سیبریکا* برای اولین بار از کنه های *هیالوما آسیاتیکوم* در سال ۱۹۹۱ در مغولستان جدا شد. در بررسی های بعدی این پاتوژن از کنه های جنس *هیالوما* به خصوص *هیالوما truncatum* و *هیالوما excavatum* در سراسر جهان جدا شد. اولین گزارش انسانی ریکتزیا *سیبریکا* در سال ۱۹۹۶ در فرانسه اعلام گردید و فرد دچار بیماری خفیف همراه با تب، اسکار و بثورات پوستی بود (۲۶). در این مطالعه ریکتزیا *سیبریکا* در کنه های *ریپیسفالوس سانگوئینوس*، *ریپیسفالوس تورانیکوس* و *ریپیسفالوس بورسا* شناسایی گردید و هیچ یک از کنه های جنس *هیالوما* به این گونه آلوده نبودند. ریکتزیا *aeschlimannii* اولین بار در سال ۱۹۹۷ از کنه های *هیالوما مارجیناتوم* در مجارستان از گاو جدا شد همچنین در کنه های *هیالوما مارجیناتوم* در نیجر، زیمباوه و مالی نیز شناسایی شده است. ریکتزیا *aeschlimannii* منجر به بروز بیماری های تب دار شبه MSF در انسان می گردد و اولین مورد انسانی مبتلا به ریکتزیا *aeschlimannii* نیز در فردی که در سال ۲۰۰۰ به مجارستان سفر کرده بود شناسایی شد (۲۷). در این مطالعه نیز مشابه اولین مطالعات، بیشترین موارد ریکتزیا *aeschlimannii* در کنه های *هیالوما مارجیناتوم* جدا شده از گاو، گوسفند و بز شناسایی گردید. علاوه بر آن در کنه های *ریپیسفالوس سانگوئینوس* جدا شده از گوسفندان در مازندران نیز شناسایی گردید. مطالعه ای در ترکیه بر روی ۳۲۲ کنه جمع آوری شده

از انسان جهت شناسایی پاتوژن های باکتریایی انجام گردید. ۱۰۰ نمونه کهنه آلوده به پاتوژن ریکتزیا بودند و موارد مثبت متعلق به گونه های ریکتزیا *aeschlimanii*، ریکتزیا *اسلوواکا*، ریکتزیا *رائولتی*، ریکتزیا *hoogstraalii*، ریکتزیا *سیبریگا* و ریکتزیا *موناسنسیس* بود و شایع ترین گونه ی شناسایی شده متعلق به ریکتزیا *aeschlimanii* (۱۹/۵ درصد) بود که در این میان ۲۹ مورد در کهنه های *هیالوما مارجیناتوم* شناسایی شده بود. در حالی که در این مطالعه بعد از ریکتزیا *ماسلیه* بیشترین موارد مثبت متعلق به ریکتزیا *سیبریگا* بود ولی در مطالعه ترکیه تنها ۰/۳۱ درصد از نمونه ها آلوده به ریکتزیا *سیبریگا* بودند (۲۸).

ریکتزیا *موناسنسیس* عضوی از گروه تب های خالدار بوده و برای نخستین بار از کهنه های *اکسودس رسینوس* در کشور آلمان با روش های مولکولی جدا شد. همچنین از کهنه های *اکسودس رسینوس* در مجارستان و پرتغال نیز جدا شده است. اطلاعات کاملی از پاتوژن ریکتزیا *موناسنسیس* در دسترس نمی باشد اما موارد انسانی مبتلا به این گونه در کشور های اسپانیا، ایتالیا و هلند گزارش شده است (۲۹). در این مطالعه نیز ریکتزیا *موناسنسیس* در کهنه های *اکسودس رسینوس* در مازندران شناسایی شد. همچنین در مطالعه ای در ترکیه نیز ۲۵ کهنه از بین ۱۰۱۹ کهنه جمع آوری شده از مناطق مختلف ترکیه برای پاتوژن ریکتزیا به روش مولکولی مثبت گزارش شدند. از بین ۲۵ نمونه، ۴ نمونه آلوده به گونه ی ریکتزیا *موناسنسیس* بودند که تنها در کهنه های *اکسودس رسینوس* مشاهده گردید و با نتایج این مطالعه هم خوانی داشت. همچنین در همین مطالعه در ترکیه یک مورد ریکتزیا *رائولتی* در کهنه ی *درمانستور مارجیناتوس* شناسایی گردید (۳۰) در حالی که در این مطالعه تنها مورد مثبت ریکتزیا *رائولتی* در کهنه ی *هیالوما مارجیناتوم* جدا شده از گوسفند در استان مازندران شناسایی شد. ریکتزیا *رائولتی* برای اولین بار از کهنه های *ریپسفالوس پومیلیو* و *درمانستور نوتالی* در سال ۱۹۹۹ در جماهیر شوروی سابق شناسایی و بعد ها در سال ۲۰۰۸ به نام ریکتزیا *رائولتی* و از عضوی از خانواده ریکتزیا نامگذاری گردید. همچنین این پاتوژن از کهنه *درمانستور مارجیناتوم* جدا شده از بیماری در فرانسه نیز شناسایی گردید که اثباتی بر بیماری زایی آن در انسان ها بود (۳۱).

ریکتزیا *هلواتیکا* عضوی از گروه تب های خالدار می باشد و برای اولین بار از کهنه های *اکسودس رسینوس* در بسیاری از کشور های اروپایی و آسیایی شناسایی شد. این گونه عمدتاً غیر بیماری زا در نظر گرفته می شود اما مواردی از بیماری های خفیف تا شدید نیز گزارش شده است (۳۲). گونه ی ریکتزیا *هلواتیکا* در این مطالعه از کهنه های *اکسودس رسینوس* جدا شده از سطح بدن گاو شناسایی گردید. در مطالعه دیگری در ترکیه از بین ۱۶۷ نمونه کهنه جدا شده از سطح بدن انسان از بیمارستان های مناطق مختلف ۶۹ نمونه برای ریکتزیا مثبت گزارش گردید. بر اساس نتایج این مطالعه ریکتزیا *موناسنسیس* (۷۰ درصد) شایع ترین گونه شناسایی شده در این مطالعه و در کهنه های *اکسودس رسینوس* بود. همچنین در این مطالعه ۲ (۳ درصد) کهنه برای ریکتزیا *هلواتیکا* در کهنه های *اکسودس رسینوس* مثبت بود و با نتایج ما در این مطالعه هم خوانی داشت (۳۳).

ریکتزیا *ریپسفالو* برای اولین بار از کهنه های *ریپسفالوس سانگوئینوس* در می سی سی پی جدا شد و تا کنون در عفونت های مرتبط با انسان گزارش نشده است (۳۴). در این مطالعه نیز ریکتزیا *ریپسفالو* در کهنه های *ریپسفالوس*

سانگوئینوس و ریپسفالوس تورانیکوس مشاهده گردید. ریکتزیا آسیاتیکا که در ابتدا به عنوان گونه ی ریکتزیا IO-IT شناخته شده بود برای اولین بار از کنه های اکسودس در سال ۱۹۹۳ در ژاپن جدا شد (۳۵).

بر اساس مطالعه ای در آذربایجان شرقی بر روی ۳۰۰ کنه از گونه درماسنتور مارجیناتوس جدا شده از سطح بدن گوسفندان، ۱۰ نمونه برای ریکتزیا مثبت گزارش گردیدند. همچنین بر اساس نتایج فیلوژنتیک گونه ریکتزیا شناسایی شده متعلق به ریکتزیا اسلووکا بود. این در حالی بود که در این مطالعه در هیچ یک از نمونه ها گونه ی ریکتزیا اسلوواکا شناسایی نگردید که احتمالاً مرتبط با گونه ی کنه ی جمع آوری شده می باشد (۱۷). همچنین در مطالعه ای دیگر در استان خرم آباد نیز ۶۴ نمونه کنه از گونه ی آرگاس پرسیکوس از سطح بدن پرندگان جمع آوری گردید. از بین این ۶۴ نمونه ۶ نمونه برای ریکتزیا به روش مولکولی مثبت گزارش گردیدند همچنین ۳ نمونه مورد بررسی فیلوژنتیک قرار گرفتند. گونه ی شناسایی شده متعلق به ریکتزیا *hoogstraalii* بود و برای اولین بار در ایران گزارش گردید در حالی که در این مطالعه هیچ مورد مثبتی برای این گونه گزارش نگردید که ممکن است مرتبط با گونه ی کنه جمع آوری شده و همچنین میزبان کنه ها باشد (۳۶).

در این مطالعه ریکتزیا آسیاتیکا در کنه های اکسودس رسینوس جدا شده از سطح بدن گاو شناسایی گردید. به نظر می رسد دو گونه ی ریکتزیا ریپسفالی و ریکتزیا آسیاتیکا تا کنون در کشور های همسایه جداسازی نشده و در این مطالعه برای اولین بار گزارش شد.

همچنین در این مطالعه از پرایمر اختصاصی برای شناسایی بارتونلا های پاتوژن استفاده گردید که تمامی گونه های غیر بیماری زا را در بر نمی گرفت و این موضوع از محدودیت های این مطالعه بود. از طرفی این احتمال نیز وجود دارد که هیچ یک از نمونه ها به بارتونلا آلوده نبوده اند و حتی شرایط نگهداری نمونه ها نیز میتواند بر روی نتایج ردیابی گونه های بارتونلا موثر بوده باشد.

نتایج این مطالعه می تواند اطلاعات جامعی در مورد بیماری ریکتزیای منتقله از کنه ها در ایران ارائه می دهد و نقش این بندپایان را در نگهداری عامل عفونی ذکر شده بهتر روشن کند.

نتایج این مطالعه نشان داد که گونه های ریکتزیا در سه استان شمالی در گردش هستند این گونه ها می توانند موجب ایجاد علائم بالینی بیماری ریکتزیا در انسان شود. این یک هشدار برای سیستم بهداشتی هست. بنابراین پیشنهاد می گردد این بیماری ها در تشخیص افتراقی از بیماری های تب دار ایجاد شده از طریق گزش کنه ها، راش های پوستی یا CCHF مورد توجه قرار گیرد و در مورد اهمیت و علائم این بیماری برای نظام مراقبت آموزش لازم داده شود. همچنین بررسی نمونه های جوندگان و دام های اهلی که کنه ها از سطح بدن آنها جمع آوری گردیده اند می تواند به دانش ما نسبت به شیوع این عفونت ها در ایران بی افزاید.

منابع

1. Rahman M, Sobur M, Islam M, Ievy S, Hossain M, El Zowalaty ME, et al. Zoonotic diseases: etiology, impact, and control. *Microorganisms*. 2020;8(9):1405.
2. Pfäffle M, Littwin N, Muders SV, Petney TN. The ecology of tick-borne diseases. *International journal for parasitology*. 2013;43(12-13):1059-77.

3. Chang C, Chomel BB, Kasten R, Romano V, Tietze N. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(4):1221-6.
4. Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends in parasitology*. 2012;28(10):437-46.
5. Sosa-Gutiérrez CG, Vargas M, Torres J, Gordillo-Pérez G. Tick-borne rickettsial pathogens in rodents from Mexico. *Journal of Biomedical Science and Engineering*. 2014;7(11):884.
6. Blanda V, D'Agostino R, Giudice E, Randazzo K, La Russa F, Villari S, et al. New real-time PCRs to differentiate *Rickettsia* spp. and *Rickettsia conorii*. *Molecules*. 2020;25(19):4431.
7. Pacheco RC, Arzua M, Nieri-Bastos FA, Moraes-Filho J, Marcili A, Richtzenhain LJ, et al. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) collected on birds in southern Brazil. *Journal of medical entomology*. 2012;49(3):710-6.
8. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(4):719-56.
9. Kuo C-C, Shu P-Y, Mu J-J, Wang H-C. High prevalence of *Rickettsia* spp. infections in small mammals in Taiwan. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2015;15(1):13-20.
10. Parola P, Cornet J-P, Sanogo YO, Miller RS, Thien HV, Gonzalez J-P, et al. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(4):1600-8.
11. Gundi VA, Billeter SA, Rood MP, Kosoy MY. *Bartonella* spp. in rats and zoonoses, Los Angeles, California, USA. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(4):631.
12. Oteo JA, Maggi R, Portillo A, Bradley J, García-Álvarez L, San-Martín M, et al. Prevalence of *Bartonella* spp. by culture, PCR and serology, in veterinary personnel from Spain. *Parasites & vectors*. 2017;10(1):1-9.
13. Billeter S, Levy M, Chomel BB, Breitschwerdt E. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Medical and veterinary entomology*. 2008;22(1):1-15.
14. Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis H-J, et al. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(7):1074.
15. Farrokhnia M, Ghalejoogh ZY, Rohani M, Ghasemi A, Esmaeili S, Mostafavi E. Cases of Mediterranean spotted fever in southeast of Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 2020;12(3):256.
16. Esmaeili S, Latifian M, Khalili M, Farrokhnia M, Stenos J, Shafiei M, et al. Fatal Case of Mediterranean Spotted Fever Associated with Septic Shock, Iran. *Emerging Infectious Diseases*. 2022;28(2):485.
17. Nadim A, Khanjani M, Hosseini-Chegeni A, Telmadarraiy Z. Identity and microbial agents related to *Dermacentor marginatus* Sulzer (Acari: Ixodidae) with a new record of *Rickettsia slovacica* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in Iran. *Systematic and Applied Acarology*. 2021;26(2):367-78.
18. Walker AR. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species: Bioscience Reports Edinburgh; 2003.
19. Rodríguez I, Fraga J, Noda AA, Mayet M, Duarte Y, Echevarria E, et al. An alternative and rapid method for the extraction of nucleic acids from ixodid ticks by potassium acetate procedure. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2014;57(4):542-7.

20. Labruna MB, McBride JW, Bouyer DH, Camargo LMA, Camargo EP, Walker DH. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. *Journal of medical entomology*. 2004;41(3):533-7.
21. Giulieri S, Jatón K, Cometta A, Trelu LT, Greub G. Development of a duplex real time PCR for the detection of *Rickettsia* spp. and typhus group rickettsia in clinical samples. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2012;64(1):92-7.
22. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(4):657-702.
23. Khamesipour F, Dida GO, Anyona DN, Razavi SM, Rakhshandehroo E. Tick-borne zoonoses in the Order Rickettsiales and Legionellales in Iran: A systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(9):e0006722.
24. Vitale G, Mansueto S, Rolain J-M, Raoult D. *Rickettsia massiliae* human isolation. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(1):174.
25. Ereqat S, Nasereddin A, Al-Jawabreh A, Azmi K, Harrus S, Mumcuoglu K, et al. Molecular detection and identification of spotted fever group rickettsiae in ticks collected from the West Bank, Palestinian territories. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(1):e0004348.
26. De Sousa R, Barata C, Vitorino L, Santos-Silva M, Carrapato C, Torgal J, et al. *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(7):1103.
27. Raoult D, Fournier P-E, Abboud P, Caron F. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. *Emerging infectious diseases*. 2002;8(7):748.
28. Karasartova D, Gureser AS, Gokce T, Celebi B, Yapar D, Keskin A, et al. Bacterial and protozoal pathogens found in ticks collected from humans in Corum province of Turkey. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(4):e0006395.
29. Kim YS, Choi YJ, Lee KM, Ahn KJ, Kim HC, Klein T, et al. First isolation of *Rickettsia monacensis* from a patient in South Korea. *Microbiology and immunology*. 2017;61(7):258-63.
30. Orkun Ö, Çakmak A, Nalbantoğlu S, Karaer Z. Turkey tick news: A molecular investigation into the presence of tick-borne pathogens in host-seeking ticks in Anatolia; Initial evidence of putative vectors and pathogens, and footsteps of a secretly rising vector tick, *Haemaphysalis parva*. *Ticks and tick-borne diseases*. 2020;11(3):101373.
31. Jia N, Zheng Y-C, Ma L, Huo Q-B, Ni X-B, Jiang B-G, et al. Human infections with *Rickettsia raoultii*, China. *Emerging infectious diseases*. 2014;20(5):866.
32. Nilsson K, Elfving K, Pålsson C. *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(3):490.
33. Gargili A, Palomar AM, Midilli K, Portillo A, Kar S, Oteo JA. *Rickettsia* species in ticks removed from humans in Istanbul, Turkey. *Vector-Borne and zoonotic diseases*. 2012;12(11):938-41.
34. Labruna MB, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Szabo MP. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of São Paulo, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(3):869-73.
35. Thu MJ, Qiu Y, Yamagishi J, Kusakisako K, Ogata S, Moustafa MAM, et al. Complete Genome Sequence of *Rickettsia asiatica* Strain Maytaro1284, a Member of Spotted Fever Group *Rickettsiae* Isolated from an *Ixodes ovatus* Tick in Japan. *Microbiology resource announcements*. 2019;8(37):e00886-19.

36. Kooshki H, Goudarzi G, Faghihi F, Telmadarraiy Z, Edalat H, Hosseini-Chegeni A. The first record of *Rickettsia hoogstraalii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) from *Argas persicus* (Acari: Argasidae) in Iran. *Systematic and Applied Acarology*. 2020;25(9):1611-7.

بررسی مولکولی آلودگی به کوکسیلا بورنتی و فرانسیسلا تولارنسیس در کنه های شمال، غرب و شمال غربی ایران

مقدمه: بیماری تولارمی و تب کیو بعنوان بیماری های اندمیک در ایران مطرح هستند اما اطلاعات اندکی از وضعیت آلودگی کنه ها به این پاتوژن ها در ایران در دسترس می باشد. هدف از این مطالعه بررسی آلودگی کنه ها به کوکسیلا بورنتی و فرانسیسلا تولارنسیس در مناطق شمال، غرب و شمال غرب ایران بوده است.

روش کار: در این مطالعه، کنه ها از روی بدن دام های اهلی و سایر پستانداران در استان های گیلان، مازندران و گلستان (شمال ایران)، استان کردستان (غرب ایران)، استان آذربایجان غربی (شمال غرب ایران) جمع آوری شدند. DNA های استخراج شده از این نمونه ها برای ردیابی کوکسیلا بورنتی و فرانسیسلا تولارنسیس به روش Real-time PCR مورد آزمایش قرار گرفتند.

نتایج: مجموعاً ۴۱۹۷ عدد کنه مربوط به ۱۲ گونه مختلف جمع آوری شدند و شایعترین گونه های جمع آوری شده شامل *Ixodes ricinus* (۴۶/۴ درصد)، *Rh. turanicus* (۲۵ درصد) و *Rh. sanguineus sensu lato* (۱۹/۱ درصد) بودند. از مجموع ۷۰۸ پوول تهیه شده از این کنه ها، ۱۱/۲۹ درصد از نمونه ها برای کوکسیلا بورنتی و ۷/۲۰ درصد از نمونه ها برای فرانسیسلا تولارنسیس به روش مولکولی مثبت بودند. بطور معنی داری کنه های جنس *Rhipicephalus* بیشترین آلودگی (۱۸/۳ درصد) به کوکسیلا بورنتی را بین کنه های مطالعه نشان دادند. همچنین بطور معنی داری بیشترین موارد مثبت برای فرانسیسلا تولارنسیس متعلق به جنس *Haemaphysalis* (۴۴/۴ درصد) بود. همچنین بیشترین موارد مثبت کوکسیلا بورنتی در استان کردستان شناسایی گردید و ارتباط معناداری بین موارد مثبت برای این پاتوژن و استان ها مشاهده گردید.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده، حضور هر دو پاتوژن در مناطق مورد بررسی، مورد تایید قرار گرفت. لذا باید توجه ویژه ای هم از جنبه دامپزشکی و هم از لحاظ گزش توسط کنه در انسان ها توسط سیستم پزشکی داشت.

کلمات کلیدی: کوکسیلا بورنتی، فرانسیسلا تولارنسیس، تب کیو، تولارمی، کنه، ایران.

مقدمه

بیماری های زئونوز تأثیر منفی قابل توجهی بر سلامت عمومی جهانی دارند که این تأثیر در حال افزایش است. بیش از ۶۰ درصد بیماری های عفونی نوپدید در انسان زئونوز هستند و بیش از ۷۰ درصد این بیماری ها توسط مخازن حیوانی به انسان منتقل می شوند (۱). انتقال این عوامل عفونی به انسان می تواند از طریق تماس مستقیم، اسنتشاق آئروسول، گزش بندپایان، مصرف آب و مواد غذایی آلوده، و غیره انجام گیرد. تخمین زده شده است که حدود ۲۵ درصد از بیماری های عفونی زئونوز نوپدید، منتقله از طریق بندپایان هستند. انتقال پاتوژن های زئونوز منتقله از طریق ناقلین به انسان وابسته به یک شبکه پیچیده از درهم کنش (اینترکشن) عوامل مختلف است که تحت تأثیر وفور میزبان، ناقلین، و همچنین شیوع عفونت می باشد (۲، ۳).

در میان ناقلین بندپا بیماری های زئونوز، کنه ها یکی از مهمترین ناقلین بندپا در سطح دنیا هستند که قادر به انتقال طیف بسیار متنوعی از عوامل عفونی به انسان و حیوانات می باشند. فعل و انفعالات پویا در بین عناصر زنده و غیر زنده بر اپیدمیولوژی و اکولوژی بیماری های منتقله از طریق کنه ها تأثیر می گذارند. پراکنش و فراوانی کنه ها، و همچنین نوپدیدی و بازپدیدی عفونت های منتقله از کنه ها (tick-borne)، تحت تأثیر عوامل متعددی هستند؛ از جمله مشخصات بیولوژیکی کنه و پاتوژن منتقله از آنها، تغییرات اقلیمی، و یا تغییرات مرتبط با فعالیت های انسانی چون جهانی سازی، گسترش شهر نشینی، مسافرت، تغییر کاربری اراضی و اصلاح زیستگاه، اقتصاد، سیاست، و در نهایت تغییرات دموگرافیک کنه ها و عوامل پاتوژن می باشند. اهمیت و آگاهی از تأثیرات بیماری های منتقله از طریق کنه بطور پیوسته در حال افزایش است (۴، ۵). در میان بیماری های منتقله از کنه، عفونت های ناشی

از کوکسیلا بورتنتی و فرانسیسیلا تولارنسیس در سال های اخیر در اکثر مناطق دنیا مورد توجه قرار گرفته اند که از نظر بهداشت و سلامت عمومی حائز اهمیت هستند (۶, ۷).

کوکسیلا بورتنتی یک باکتری کوچک گرم منفی داخل سلولی اجباری است که عامل بسیار عفونی و عامل سببی تب کیو می باشد. قابلیت انتشار بسیار آسان و سریع توسط آئروسول، قابلیت بقا در شرایط سخت محیطی، دوز عفونی بسیار پایین و همچنین قدرت عفونت زایی بسیار بالای این باکتری باعث شده است که کوکسیلا بورتنتی بعنوان یک خطر بسیار جدی برای پرسنل نظامی و افراد غیر نظامی تلقی شود (۶, ۸). دام های اهلی بعنوان مخازن اصلی کوکسیلا بورتنتی محسوب می شوند و بیماری تب کیو در دام های اهلی (گاو، گوسفند و بز) با پنومونی و اختلالات تولیدمثلی از جمله سقط جنین، مرده زایی، عفونت جفت، عفونت رحم و نازایی همراه است. عمده ترین راه انتقال عفونت به انسان از طریق استنشاق آئروسول ها و ذرات گرد و غبار آلوده به کوکسیلا بورتنتی است (۹). همچنین این باکتری می تواند از طریق گزش کنه، تماس مستقیم، مصرف شیر خام و لبنیات آلوده، انتقال خون و از راه جنسی به افراد سالم منتقل شود (۱۰). فرم های بیماری تب کیو در انسان از بیماری بدون علامت، تب کیو حاد، تب کیو مزمن، و سندرم خستگی مزمن متغیر است. تداوم عفونت کوکسیلا بورتنتی در انسان (در موارد حاد و بدون علامت) می تواند منجر به فرم مزمن تب کیو (اندوکاردیت) شود که این فرم تنها در ۵-۶ درصد موارد آلودگی به انسان به کوکسیلا بورتنتی دیده می شود ولی بغایت جدی و مخاطره آمیز است (۶). آلودگی به کوکسیلا بورتنتی در تمام دنیا فراگیری دارد و سالانه تعداد موارد بالینی انسانی و موارد مثبت حیوانی و محیطی از اقصی نقاط جهان گزارش شده است. با توجه به مطالعات و گزارش های منتشر شده در سالیان اخیر در ایران، تب کیو بعنوان یک بیماری زئونوز اندمیک محسوب می شود (۱۱).

فرانسیسیلا تولارنسیس یک باکتری است که باعث ایجاد بیماری تولارمی می شود. فرانسیسیلا تولارنسیس یک ارگانسیم به شدت عفونی برای انسان و بسیاری از حیوانات می باشد (۷). فرانسیسیلا تولارنسیس دارای سه زیر گونه تحت گونه های تولارنسیس، هولارکتیکا و مدیاستیکا می باشد و زیر گونه های تولارنسیس و هولارکتیکا عامل اصلی بیماری تولارمی در سراسر دنیا هستند. فرانسیسیلا تولارنسیس دارای طیف وسیعی از مخازن حیوانی شامل مهره داران و بی مهرگان است (۱۲). تولارمی بعنوان یک بیماری منتقله از ناقلین در انسان مطرح باشد که می تواند توسط گزش حشرات، کنه ها و همچنین کک به انسان منتقل شود. بندپایان می توانند از طریق حیوانات و آب های محیطی به فرانسیسیلا تولارنسیس آلوده شوند. راه های اصلی انتقال عفونت تولارمی به انسان شامل استنشاق آئروسول های آلوده به باکتری، تماس مستقیم با مخزن حیوانی، گزش حشرات، انتقال از طریق آب و خاک آلوده است (۷). بیماری تولارمی در انسان می تواند از یک عفونت بدون علامت تا موارد بسیار شدید که منجر به مرگ می شود متغیر باشد. این بیماری بیشتر در نیمکره شمالی دیده می شود (۱۳). اولین مورد بالینی انسانی تولارمی در ایران در سال ۱۹۸۱ از غرب ایران (استان کردستان) گزارش شد (۱۴). در سالیان اخیر شواهد سرولوژیکی در جمعیت های انسانی، موارد مثبت سرولوژیکی و مولکولی در جوندگان و همچنین گزارشات موارد انسانی از نقاط مختلف ایران منتشر شده است که نشان دهنده اندمیک بودن این بیماری در ایران است (۱۵-۲۰).

با توجه به اینکه اطلاعات اندکی در مورد آلودگی کنه ها به هر دو پاتوژن کوکسیلا بورتنتی و فرانسیسیلا تولارنسیس در ایران در دسترس می باشد، لذا این مطالعه منظور بررسی وضعیت آلودگی کنه ها به کوکسیلا بورتنتی و فرانسیسیلا تولارنسیس در مناطق شمال، غرب و شمالغرب ایران انجام گردید.

مواد و روش

منطقه مورد مطالعه: این مطالعه در بین سال های ۲۰۱۷ تا ۲۰۱۸ در استان های گیلان، مازندران و گلستان (شمال ایران)، استان کردستان (غرب ایران)، استان آذربایجان غربی (شمال غرب ایران) انجام پذیرفت (شکل شماره ۱).

شکل شماره ۱. استان هایی که جمع آوری کنه از دام اهلی و سایر پستانداران انجام شده است: استان های گیلان (Gu)، مازندران

(Ma)، گلستان (Go)، کردستان (Ku) و آذربایجان غربی (WA).



جمع آوری نمونه ها: کنه ها از روی بدن حیوانات اهلی (گوسفند، بز، گاو، شتر، اسب، سگ و الاغ) و سایر پستانداران (جوندگان و خارپشت) برداشته شدند. علاوه بر آن از روش کشیدن پتو برای جمع آوری کنه هادر علفزارها استفاده شد. نمونه های کنه جمع آوری شده در داخل الکل ۷۰ درصد نگهداری و لیبل گذاری شدند. کنه های جمع آوری شده بر اساس کلید های مورفولوژیکی شناسایی شدند (۲۱) و تا زمان استخراج DNA در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

در هر ۵ استان مورد مطالعه اقدام به تله گذاری برای صید جوندگان گردید. کنه های موجود از سطح جوندگان صید شده جداسازی شدند. جوندگان بر اساس کلید های مورفولوژیکی تعیین گونه شدند (۲۲)، و پس از کالبدگشایی نمونه طحال از آنها اخذ شد. نمونه های طحال تا زمان استخراج DNA در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج DNA از کنه ها: کنه های جمع آوری شده ای که از یک جنس و گونه، و در مرحله رشد (لارو و بالغ) یکسانی بودند در گروه های ۱ تا ۲۲ عددی با توجه به نوع میزبان و محل جمع آوری ترکیب شدند. تمامی کنه ها در ۷۰۸ ویال پوول شده ابتدا با استفاده از نیتروژن مایع و PBS استریل نمونه ها بصورت هموژن در آمدند و سپس بوسیله روش استات پتاسیم توصیه شده توسط Rodríguez و همکاران، DNA نمونه ها استخراج گردید (۲۳). برای این منظور، ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده (حاوی Tris-HCl ۰/۱ مولار، EDTA ۰/۰۵ مولار، ساکارز ۰/۲ مولار و SDS ۰/۵ درصد) همراه با پروتیناز K (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) به نمونه های هموژن شده اضافه شد و به مدت یک شب در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از آن، ۱۲۰ میکرولیتر استات سدیم ۵ مولار به نمونه ها اضافه شد و نمونه ها بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شدند. سپس نمونه ها در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی (سوپرناتانت) برای استفاده برای مرحله بعدی جداسازی شد. برای رسوب DNA، ۳۵ میکرولیتر از استات سدیم ۴ مولار و ۱ میلی لیتر اتانول خالص به هر نمونه اضافه شد و نمونه ها به خوبی میکس شدند و ۱۰ دقیقه بر روی یخ نگهداری شدند. نمونه ها در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی (سوپرناتانت) دور ریخته شد. رسوب ها با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شدند و اجازه داد شد که الکل باقی مانده در دمای اتاق کاملاً خشک شوند. در نهایت، رسوب های کاملاً خشک شده در ۲۰۰ میکرولیتر از الیوشن بافر (Tris-HCl ۱ مولار، EDTA ۱ مولار) حل شدند و تا زمان آزمایش در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج DNA از از نمونه جوندگان: استخراج DNA از نمونه طحال جوندگان با استفاده از کیت High Pure PCR Template Preparation شرکت Roche انجام پذیرفت. بدین منظور به هر نمونه ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده و ۴۰ میکرولیتر پروتیناز K افزوده شد و نمونه ها برای یک شب در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد جهت هضم بافت انکوبه شدند و پس از طی این مرحله به هر نمونه ۲۰۰ میکرولیتر بافر بایندینگ افزوده و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و سپس ۱۰۰

میکرولیترایزوپروپانول افزوده و پس از انتقال به ستون های استخراج در ۱۲۰۰۰ دور به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیترا بافر inhibitor به هرستون افزوده شد و در ۱۲۰۰۰ دور به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شدند ، در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیترا بافر شست و شو به هرستون افزوده شده و در ۱۲۰۰۰ دور به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شدند و این مرحله مجدد تکرار شد . در انتها به هر نمونه ۱۲۰ میکرولیترا لیوشن بافر افزوده شده و DNA های استخراج شده تا زمان آزمایش PCR در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

شناسایی کوکسیلا بورنتی: نمونه های DNA استخراج شده از کنه ها و طحال جوندگان با روش Real time PCR جهت شناسایی کوکسیلا بورنتی مورد آزمایش قرار گرفتند. برای این منظور از پرایمر و پروب اختصاصی برای ژن IS1111 استفاده شد. پروب مورد استفاده با رنگ فلوروسنس ۶-کربوکسی فلوروسین (6-Fam) بعنوان رنگ رپورتر و TAMRA بعنوان خاموش کننده نشاندار شده بود. حجم واکنش جهت انجام آزمایش Real time PCR، ۲۰ میکرولیترا بوده و حاوی ۱۰ میکرولیترا از مسترمیکس تجاری 2x RealQ Plus Master Mix (Ampliqon، دانمارک)، ۹۰۰ نانومول از پرایمر مستقیم، ۹۰۰ نانومول پرایمر معکوس، ۲۰۰ نانومول پروب و ۴ میکرولیترا از DNA الگو بود که با آب مقطر تزریقی دیونایز به حجم مورد نظر رسانده شد. به عنوان کنترل مثبت در این تست از سویه Nine Mile RSA493 کوکسیلا بورنتی استفاده شد. همچنین به عنوان کنترل منفی از آب مقطر تزریقی استفاده شد. این تست با استفاده از دستگاه Corbett 6000 Rotor-Gene system (Corbett, Victoria, Australia) با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ سیکل با برنامه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. خوانش در هر سیکل در انتهای دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و با رنگ سبز صورت گرفت. جهت آنالیز نتایج واکنش PCR از نرم افزار Rotor-Gene Q Series Software استفاده شد.

شناسایی فرانسیسلا تولارنسیس: نمونه های DNA استخراج شده از کنه ها و طحال جوندگان با روش Real time PCR جهت شناسایی فرانسیسلا تولارنسیس مورد آزمایش قرار گرفتن. برای این منظور از پرایمر و پروب اختصاصی برای ژن ISftu2 استفاده شد. پروب مورد استفاده با رنگ فلوروسنس ۶-کربوکسی فلوروسین (6-Fam) بعنوان رنگ رپورتر و TAMRA بعنوان خاموش کننده نشاندار شده بود. حجم واکنش جهت انجام آزمایش Real time PCR، ۲۰ میکرولیترا بوده و حاوی ۱۰ میکرولیترا از مسترمیکس تجاری 2x RealQ Plus Master Mix (Ampliqon، دانمارک)، ۹۰۰ نانومول از پرایمر مستقیم، ۹۰۰ نانومول پرایمر معکوس، ۲۰۰ نانومول پروب و ۴ میکرولیترا از DNA الگو بود که با آب مقطر تزریقی دیونایز به حجم مورد نظر رسانده شد. به عنوان کنترل مثبت در این تست از سویه F. tularensis subsp holarctica NCTC 10857 فرانسیسلا تولارنسیس استفاده شد. همچنین به عنوان کنترل منفی از آب مقطر تزریقی استفاده شد. این تست با استفاده از دستگاه Corbett 6000 Rotor-Gene system (Corbett, Victoria, Australia) با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ سیکل با برنامه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. خوانش در هر سیکل در انتهای دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و با رنگ سبز صورت گرفت. جهت آنالیز نتایج واکنش PCR از نرم افزار Rotor-Gene Q Series Software استفاده شد.

Table 1. Oligonucleotide sequences Primer and probe used for detection of *F. tularensis* & *C. burnetii*(24, 25)

Gene target	Primer and probe	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
ISftu2	ISftu2-F	5'- TTGGTAGATCAGTTGGTAGGATAACC-3'	97
	ISftu2-R	5'- TGAGTTTTATCCTCTGACAACAATATTTTC-3'	
	ISftu2-probe	5'-6-FAM-AAAATCCATGCTATGACTGATGCTTTAGGTAATCCA-TAMRA-3'	

IS1111	IS1111-F	5'-AAAACGGATAAAAAGAGTCTGTGGTT-3'	70
	IS1111-R	5'-CCACACAAGCGCGATTCAT-3'	
	IS1111-probe	5'-6-FAM-AAAGCACTCATTGAGCGCCGCG-TAMRA-3'	

نتایج

در این مطالعه مجموعاً ۴۱۹۷ کنه جمع آوری گردید. در میان کنه های صید شده، ۵۶/۱ درصد (n:۲۳۵۶) از کنه ها مربوط به استان مازنداران، ۳۴/۷ درصد (n:۱۴۵۶) مربوط به استان گلستان، ۴/۴ درصد (n:۱۸۷) مربوط به استان گیلان، ۲/۷ درصد (n:۱۱۵) مربوط به استان کردستان و ۱/۹ درصد (n:۸۳) مربوط به استان آذربایجان غربی بود. از مجموع کنه ها، ۳۶/۴ درصد (n:۱۵۳۰) آنها نر، ۶۲/۵ درصد (n:۲۶۲۴) ماده و ۱ درصد (n:۴۳) نیمف بودند.

مجموعاً ۱۲ گونه کنه متعلق به ۴ جنس در این مطالعه شناسایی شدند بیشترین درصد به ترتیب به گونه های *Ixodes ricinus* (۴۶/۴ درصد)، *Rh. turanicus* (۲۵ درصد)، *Rh. sanguineus sensu lato* (۱۹/۱ درصد)، *Hy. marginatum* (۳/۴ درصد) و *Rh. bursa* (۲/۸۳ درصد) تعلق داشت (جدول ۲).

Table 2. Population of tick collected based on species in the studied provinces in 2017-8.

Genus	Species	Mazandaran N (%)	Golestan N (%)	Guilan N (%)	Kurdistan N (%)	West- Azerbaijan N (%)	Total N (%)
<i>Ixodes</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	1805(76.61)	6(0.41)	140(74.86)	-	-	1951(46.4)
<i>Haemaphysalis</i>	<i>Ha. concinna</i>	6(0.25)	-	1(0.53)	-	-	7(0.16)
	<i>Ha. inermis</i>	3(0.12)	-	1(0.53)	-	-	4(0.09)
	<i>Ha. punctata</i>	-	-	1(0.53)	-	-	1(0.02)
<i>Hyalomma</i>	<i>Hy.</i>	-	40(2.74)	-	-	4(4.81)	44(1.04)
	<i>Hy.</i>	56(2/37)	65(4.46)	16(8.55)	-	6(7.22)	143(3.40)
	<i>Hy.</i>	-	18(1.23)	-	-	-	18(0.42)
	<i>Hyalomma</i>	-	-	-	-	3(3.61)	3(0.08)
<i>Rhipicephalus</i>	<i>Rh. Bursa</i>	48(2.03)	1(0.06)	-	-	70(84.33)	119(2.83)
	<i>Rh.</i>	343(14.55)	343(23.55)	1(0.53)	115(100)	-	802(19.10)
	<i>Rh. turanicus</i>	61(2.58)	983(67.51)	9(4.81)	-	-	1053(25.08)
	<i>Rh. annulatus</i>	34(1.44)	-	18(9.62)	-	-	52(1.23)
Total		2356(100)	1456(100)	187 (100)	115(100)	83(100)	4197(100)

در این مطالعه، میزان ۴۵/۴۶ درصد (n:۱۹۰۸) از کنه ها از گاو، ۳۴/۷۳ درصد (n:۱۴۵۳) از گوسفند، ۹/۳۳ درصد (n:۳۸۴) از بز، ۰/۱۱ درصد (n:۵) از اسب، ۰/۰۴ درصد (n:۲) از الاغ، ۳/۰۴ درصد (n:۱۲۸) از شتر، ۱/۱۹ درصد (n:۵۰) از سگ و ۱/۱۴ درصد (n:۴۷) از خاریشت بودند. از مجموع ۴۱۹۷ کنه جمع آوری شده مجموعاً ۷۰۸ پوول تهیه و مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج ردیابی کوکسیلا بورنتی: از مجموع ۷۰۸ پوول بررسی شده برای کوکسیلا بورنتی مجموع ۸۰ پوول (۱۱/۲۹ درصد) مثبت گزارش شد. بیشترین موارد مثبت الودگی به کوکسیلا بورنتی برای جنس *Rhipicephalus* بوده و از مجموع ۳۷۱ پوول تست شده ۶۸ مورد مثبت گزارش شد. همچنین اختلاف آماری معنی داری بین مثبت شدن برای کوکسیلا بورنتی و جنس های مختلف کنه صید شده مشاهده شد به گونه ای که کنه های جنس *Rhipicephalus* بیشترین آلودگی (۱۸/۳ درصد) به کوکسیلا بورنتی را بین کنه های مطالعه نشان دادند ($P<0.001$). در بین گونه ی کنه ها بیشترین میزان شیوع به ترتیب مربوط به *Rh. sanguineus sensu.lato* (۲۶/۱ درصد) و *Rh. turanicus* (۱۵/۲ درصد) بود (جدول ۳). بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایشات مولکولی، تعداد پوول های مثبت برای هر استان به ترتیب، ۱۳/۸ درصد برای استان گلستان، ۵/۸۲ درصد برای استان مازندران، ۹۲/۵ درصد برای استان کردستان و ۱۱ درصد برای استان آذربایجان غربی گزارش شد. همچنین اختلاف آماری معنی داری بین مثبت شدن برای کوکسیلا بورنتی و استان های مطالعه مشاهده شد ($P<0.001$)، بطوری که بیشترین موارد مثبت در استان کردستان و در شهر سنندج گزارش شد که از مجموع ۱۴ پوول مورد بررسی کلیه موارد مثبت گزارش شدند. در استان گلستان در شهر بندر ترکمن شاهد بیشترین موارد مثبت بوده و از مجموع ۵۶ پوول مورد بررسی ۱۳ مورد مثبت بودند. در استان مازندران بیشترین موارد مثبت در شهر آمل گزارش شده و از مجموع ۷۸ پوول مورد بررسی ۱۰ مورد مثبت بودند. در استان گیلان هیچ موردی برای کوکسیلا بورنتی مثبت نبود. (جدول ۴).

Table 3. Investigation of *C. burnetii* and *F. tularensis* among ticks in Iran (2017-2018)

Genus	Species	Number of tested pools	Number of positive pools for <i>F. tularensis</i> in species (%)	Number of positive pools for <i>F. tularensis</i> per genus (%)	p-value	Number of positive pools for <i>C. burnetii</i> (%)	Number of positive pools for <i>C. burnetii</i> per genus (%)	p-value	
<i>Ixodes</i>	<i>ricinusIx</i>	259	7(2.70)	7(2.7)	<0.001	8(3.08)	8(3.08)	<0.001	
<i>Haemaphysalis</i>	<i>Ha. Concinna</i>	4	0 (0)	4(44.44)		0 (0)	0(0)		
	<i>Ha. Inermis</i>	4	4(100)			0 (0)			
	<i>Ha. Punctata</i>	1	0 (0)			0 (0)			
<i>Hyalomma</i>	<i>Hy. anatolicum</i>	13	1(7.69)	4(5.79)		1(7.69)	4(5.79)		
	<i>Hy. marginatum</i>	49	3(6.12)			3(6.12)			
	<i>Hy. dromedarii</i>	4	0 (0)			0 (0)			
	<i>Hyalomma sp.</i>	3	0 (0)			0 (0)			
<i>Rhipicephalus</i>	<i>Rh. bursa</i>	45	2(4.44)	36(9.70)		3(6.66)	68(18.32)		
	<i>Rh. sanguineus</i>	172	18(10.46)			45(26.16)			
	<i>Rh. turanicus</i>	131	15(11.45)			20(15.26)			
	<i>Rh. annulatus</i>	23	1(4.34)			0 (0)			
	Total	708	51(7.20)				80(11.29)		

نتایج ردیابی فرانسیسلا تولارنسیس: از مجموع ۷۰۸ پوول مورد بررسی برای شناسایی فرانسیسلا تولارنسیس مجموع ۵۱ پوول (۷/۲۰ درصد) مثبت گزارش شد. بر اساس تفسیر نتایج تست های انجام شده، بیشترین موارد مثبت متعلق به جنس *Haemaphysalis* بود و از مجموع ۹ پوول مورد بررسی ۴ مورد برای فرانسیسلا تولارنسیس مثبت گزارش شدند. همچنین اختلاف آماری معنی داری بین مثبت شدن برای فرانسیسلا تولارنسیس و جنس های مختلف کنه صید شده مشاهده شد ($P<0.001$) بطوری که بیشترین موارد مثبت فرانسیسلا تولارنسیس به ترتیب در جنس های *Haemaphysalis* (۴۴/۴ درصد) و *Rhipicephalus* (۹/۷ درصد) مشاهده گردید. در بین گونه های کنه ها بیشترین شیوع به ترتیب مربوط به *Ha. inermis* (۱۰۰)

درصد) ، *Rh. turanicus* (۱۱/۴۵ درصد) و *Rh. sanguineus sensu lato* (۱۰/۴۶ درصد) بود (جدول ۳). بر اساس نتایج به دست آمده تعداد پوول های مثبت برای هر استان به ترتیب، ۱۰/۸۹ درصد برای استان گلستان، ۶/۰۸ درصد برای استان مازندران، ۵/۱۷ درصد برای استان گلستان، ۳/۷ درصد برای استان کردستان و ۴/۶ درصد برای استان آذربایجان غربی گزارش شد. با این وجود اختلاف آماری معنی داری بین مثبت شدن برای فرانسسیلا تولارنسیس و استان های مختلف مشاهده نشد ($P=0.19$). بیشترین موارد مثبت فرانسسیلا تولارنسیس در گرگان واقع در استان گلستان گزارش شد و از مجموع ۳۹ پوول مورد بررسی ۵ مورد مثبت بود. در استان مازندران بیشترین موارد مثبت در آمل گزارش شد و از مجموع ۷۸ پوول مورد بررسی ۸ پوول مثبت بود. در استان گیلان تنها در تالش ۳ پوول از مجموع ۴۶ پوول مورد بررسی مثبت بود. در استان کردستان در شهر سنندج از مجموع ۱۴ پوول مورد بررسی ۱ پوول مثبت بوده و در استان آذربایجان غربی از ۴۳ پوول مورد بررسی ۲ پوول مثبت گزارش شد (جدول ۴).

Table 4. Prevalence of *C. burnetii* and *F. tularensis* in ticks based on counties and provinces.

counties	provinces	Number of pools tested	Number of positive pools for <i>C. burnetii</i> per genus N(%)	Number of positive pools for <i>F. tularensis</i> per genus N(%)
Golestan	Aq Qala	67	0(0)	7(10.44)
	Bandar Torkaman	56	13(23.2)	5(8.9)
	Aliabad	8	1(12.5)	2(25)
	Gorgan	39	5(12.8)	5(12.8)
	Gomishan	8	0(0)	1(12.5)
	Aliabad-e-Katul	23	9(39.1)	2(8.69)
	Gonbad Kavus	1	0(0)	0(0)
	Total	202	28(13.86)	22(10.89)
Mazandaran	Nur	62	4(6.45)	5(8)
	Amol	78	10(12.82)	8(10.28)
	Babol	55	0(0)	1(1.8)
	Sari	71	5(7.04)	3(4.22)
	Qaemshahr	55	2(3.6)	5(9)
	Mahmudabad	16	1(6.2)	0(0)
	Savadkuh	41	0(0)	1(2.43)
	Total	378	22(5.82)	23(6.08)
Guilan	Talesh	46	0(0)	3(6.52)
	Masal	5	0(0)	0(0)
	Rudsar	1	0(0)	0(0)
	Lahijan	6	0(0)	0(0)

	Total	58	0(0)	3(5.17)
Kurdistan	Sanandaj	14	14(100)	1(7.14)
	Divandarreh	9	8(88.8)	0(0)
	Mariwan	4	3(75)	0(0)
	Total	27	25(92.5)	1(3.7)
West-Azerbaijan	Showt	43	5(11.6)	2(4.6)
	Total	43	5(11.6)	2(4.6)

ردیابی کوکسیلا بورنتی و فرانسیسلا تولارنسیس در جوندگان و سایر پستانداران وحشی: در این مطالعه تعداد ۱۳۵ جونده و پستاندار کوچک جمع آوری شد (جدول شماره ۵). تمامی تست های انجام شده بر روی DNA استخراج شده از طحال جوندگان برای کوکسیلا بورنتی و فرانسیسلا تولارنسیس منفی بود.

Table 5. Data of collected rodents and small mammals in this study.

Species/ Province	Mazandaran N(%)	N (%) Guilan	Golestan N(%)	Kurdistan N(%)	N (%) West-Azerbaijan	Total
<i>Apodemus hyrcanicus</i>	2(11.1)	2(16.6)	-	-	-	4(2.96)
<i>Mus musculus</i>	2(11.1)	4(33.3)	1(7.14)	-	-	7(5.18)
<i>Rattus norvegicus</i>	13(72.2)	-	-	-	-	13(9.62)
<i>Rattus rattus</i>	1(5.5)	4(33.3)	-	-	-	5(3.70)
<i>Crocidura caspica</i>	-	1(8.3)	-	-	-	1(0.74)
<i>Microtus obscurus</i>	-	1(8.3)	-	-	-	1(0.74)
<i>Nesokia indica</i>	-	-	6(42.8)	-	-	6(4.44)
<i>Erinaceus concolor</i>	-	-	3(21.4)	-	-	3(2.22)
<i>Apodemus uralensis</i>	-	-	1(7.14)	-	-	1(0.74)
<i>Crocidura suaveolens</i>	-	-	1(7.14)	-	-	1(0.74)
<i>Microtus paradoxus</i>	-	-	2(14.2)	-	-	2(1.48)
<i>Apodemus witherbyi</i>	-	-	-	22(26.82)	-	22(16.29)
<i>Apodemus ponticus</i>	-	-	-	1(1.21)	-	1(0.74)
<i>Arvicola persicus</i>	-	-	-	8(9.75)	-	8(5.92)
<i>Nothocricetulus</i>	-	-	-	2(2.43)	-	2(1.48)
<i>Meriones persicus</i>	-	-	-	5(6.09)	1(11.1)	6(4.44)
<i>Meriones tristrami</i>	-	-	-	1(1.21)	-	1(0.74)
<i>Microtus karamani</i>	-	-	-	2(2.43)	-	2(1.48)
<i>Microtus qazvinensis</i>	-	-	-	4(4.87)	-	4(2.96)
<i>Mus macedonicus</i>	-	-	-	2(2.43)	-	2(2.96)
<i>Microtus qazvinensis</i>	-	-	-	35(42.68)	-	35(25.92)
<i>Meriones vinogradovi</i>	-	-	-	-	7(77.7)	7(5.18)
<i>Microtus socialis</i>	-	-	-	-	1(11.1)	1(0.74)
Total	18(100)	12(100)	14(100)	82 (100)	9(100)	135 (100)

بحث

با توجه به گسترش بیماری های منتقله از طریق کنه از جمله دو پاتوژن مورد بررسی در این مطالعه در منطقه خاورمیانه نیازمند انجام مطالعات بیشتری در رابطه با این بیماری ها می باشد. همچنین با توجه به احتمال گزش انسان توسط کنه ها به عنوان ناقلین این بیماری ها و همچنین شناسایی موارد انسانی آلوده شده به این دو پاتوژن در ایران (۲۶، ۲۷)، بنابراین رویکرد گسترده ای برای تعیین حضور این باکتری ها در نمونه های کنه و هم نمونه های حیوانی (پستانداران و جوندگان) در نظر گرفته شد. در این مطالعه بررسی گسترده ای بر روی کنه های سه استان شمالی (مازندران، گلستان، گیلان) و استان های شمالغرب و غرب ایران (کردستان، آذربایجان غربی) جهت شناسایی کوکسیلا بورنتی و فرانسیسلا تولارنسیس صورت گرفت و نشان داده شد ۱۱/۲۹ درصد از نمونه

های کنه برای کوکسیلا بورنتی و ۷/۲۰ درصد از نمونه های کنه برای فرانسیسلا تولارنسیس به روش مولکولی مثبت بودند. با توجه به یافته های این مطالعه، گردش هر دو پاتوژن از طریق کنه در مناطق مورد بررسی مورد تایید قرار گرفت.

در این مطالعه DNA کوکسیلا بورنتی در کنه های جمع آوری شده از استان های شمالی به جز استان گیلان و استان های کردستان و آذربایجان غربی شناسایی گردید و بیشترین موارد مثبت متعلق به استان کردستان بود. نقش کنه ها در چرخه انتقال این باکتری در مطالعات بسیاری مورد بحث قرار گرفته است و بدیهی است علاوه بر راه های انتقال ذکر شده برای این پاتوژن کنه ها نیز میتوانند از عوامل بالقوه انتقال بیماری بین دام ها و حیوانات وحشی در نظر گرفته شوند. تاکنون DNA کوکسیلا بورنتی در ۴۰ گونه کنه شناسایی شده است. علاوه بر این وجود DNA کوکسیلا بورنتی در کنه های *Hyalomma Ixodes* و *Rhipicephalus* در این مطالعه مطابق مطالعات قبلی بوده است (۲۸، ۲۹).

در این مطالعه شاهد ارتباط معناداری در شیوع کوکسیلا بورنتی در کنه های جنس *Rhipicephalus* بودیم. شایع ترین موارد مثبت متعلق به گونه ی *Rh. sanguineus sensu.lato* (۲۶/۱ درصد) بود که نتایج ما مشابه با مطالعه صورت گرفته بر روی کنه های جدا شده از سطح بدن سگ ها در استان کرمان بود و نتایج شیوع ۱۲/۵ درصدی کوکسیلا بورنتی در کنه های گونه ی *Rh. sanguineus sensu.lato* را نشان داد (۳۰). اولین مطالعه صورت گرفته در ایران به جهت بررسی کوکسیلا بورنتی در کنه ها در سال ۲۰۰۹ نیز حاکی از شیوع ۸/۵۷ درصدی کوکسیلا بورنتی در کنه های *Hy. anatolicum* و *Rh. sanguineus* بود و بیشتر موارد مثبت متعلق به گونه ی *Hy. anatolicum* بود (۳۱). همچنین در مطالعات صورت گرفته در خاورمیانه نیز میتوان به مطالعه ای در قبرس اشاره کرد که نتیجه تست ۶/۳۸ درصد از نمونه های کنه از گونه های *Rh. sanguineus* و *Hyaloma spp.* مثبت گزارش شد این در حالی است که بیشتر موارد مثبت متعلق به جنس *Rhipicephalus* بوده و با نتایج به دست آمده در این مطالعه هم خوانی داشت (۳۲).

در این مطالعه هیچ مورد مثبتی در کنه های جنس *Haemaphysalis* برای پاتوژن کوکسیلا بورنتی با روش مولکولی گزارش نگردید. در مطالعه ای در ترکیه DNA کوکسیلا بورنتی در کنه های جنس *Rhipicephalus* و *Hyalomma* شناسایی شد که بیشتر موارد به جنس *Rhipicephalus* تعلق داشت که با نتایج ما در این مطالعه هم خوانی داشت، این در حالی می باشد که در این مطالعه نیز هیچ مورد مثبتی در کنه های جنس *Haemaphysalis* شناسایی نگردید (۳۳). مشابه سایر مطالعات و نتایج این مطالعه، کنه های *Rhipicephalus* شایع ترین جنس آلوده به کوکسیلا بورنتی بودند. همچنین در این مطالعه DNA کوکسیلا بورنتی در کنه های *Ixodes* (۳/۰۸ درصد) نیز شناسایی گردید.

مطالعات بر روی فرانسیسلا تولارنسیس در ایران بسیار محدود می باشد و بیشتر مطالعات بر روی موارد آلودگی های انسانی صورت گرفته است. در کشور های همسایه نیز مطالعات اندکی بر روی کنه ها به عنوان ناقلین این بیماری صورت گرفته است (۱۴). در این مطالعه DNA فرانسیسلا تولارنسیس در کنه های جمع آوری شده از کلیه ی استان ها شناسایی گردید و بیشترین موارد مثبت متعلق به استان گلستان (۱۰/۸۹ درصد) بود. این در حالی است که ارتباط معناداری بین موارد مثبت برای فرانسیسلا تولارنسیس و استان های مورد بررسی مشاهده نگردید.

شایعترین گونه های کنه که DNA فرانسیسلا تولارنسیس در آنها ردیابی گردیده است متعلق به جنس های *Dermacentor* *Haemaphysalis* و *Amblyomma* می باشد (۳۴). در این مطالعه نیز بیشترین موارد مثبت در کنه های جنس *Haemaphysalis* و گونه ی *Ha. Inermis* (۱۰۰ درصد) شناسایی گردید. در مطالعه ای در امارات DNA فرانسیسلا تولارنسیس در ۵/۸۱ درصد از کنه های *Hy. dromedarii* جدا شده از سطح بدن شتر ها به روش مولکولی شناسایی گردید (۳۵). در مطالعه ای در مصر نیز موارد مثبت فرانسیسلا تولارنسیس در کنه های *Hy. dromedarii* جمع آوری شده از سطح بدن شتر ها با شیوع ۴/۷ درصدی گزارش شد (۳۶). این در حالی است که هیچ یک از کنه های گونه ی *Hy. dromedarii* در این مطالعه برای فرانسیسلا تولارنسیس مثبت گزارش نشدند. احتمال بر این می باشد میزبانی که کنه ها از سطح بدن آنها جمع آوری گردیده اند در نتایج حاصل از این مطالعه موثر بوده باشد.

در کشور های همسایه ایران از جمله ترکیه فرانسیسلا تولارنسیس اندمیک می باشد با این وجود بر اساس مطالعات صورت گرفته بر روی کنه ها در مناطق مختلف ترکیه هیچ مورد مثبتی برای فرانسیسلا تولارنسیس گزارش نگردید (37, 38). این در حالی می باشد که در این مطالعه DNA فرانسیسلا تولارنسیس در ۴ جنس کنه (*Rhipicephalus Haemaphysalis Ixodes* و *Hyalomma*) جمع آوری شده از سطح بدن حیوانات اهلی با روش مولکولی شناسایی گردید. از محدودیت های این مطالعه میتوان به محدود بودن تعداد جوندگان مورد بررسی اشاره کرد. همچنین هیچ گونه نمونه ای از دام هایی که کنه ها از سطح بدن آنها جمع آوری گردیده بود، دریافت نگردید. با توجه به نتایج به دست آمده از تست های مولکولی بر روی کنه ها و گزارش موارد مثبت احتمال آلودگی دام ها نیز وجود دارد و با توجه به عوارض این بیماری ها بر روی دام ها مانند سقط جنین و همچنین احتمال آلودگی انسان ها از طریق فراورده های دامی مانند مصرف شیر آلوده نیاز به بررسی بوده و از محدودیت های این مطالعه می باشد.

نتایج این مطالعه دانش ما را در رابطه با شیوع این پاتوژن ها در ایران افزایش می دهد. با توجه به نتایج بدست آمده کنه ها به عنوان یکی از مهم ترین مخازن اولیه پاتوژن های بیماری زا و مسئول انتقال عفونت به حیوانات اهلی و وحشی و حتی انسانها هستند. نتایج به دست آمده نشان از آلودگی کنه های سطح بدن دام های اهلی بود و نیاز است که در آینده بررسی های بیشتری صورت گیرد. با توجه به اینکه امکان آلودگی دام توسط کنه ها وجود دارد بررسی های نمونه های دامی نیز برای شناسایی شیوع پاتوژن های فوق متمر ثمر بوده زیرا که دام ها میتوانند واسطه انتقال بیماری به انسانها باشند. با توجه به این که کوکسیلا بورنتی و فرانسیسلا تولارنسیس تاثیر به سزایی بر سلامت انسانها و بهداشت عمومی دارند لذا شناسایی مخزن اصلی انتشار آنها و مدیریت شرایط امری بسیار ضروری است. در حال حاضر به دلیل ناشناخته بودن ناقلین اصلی این پاتوژن ها و عدم اختصاصیت علائم ابتلا بیماری های مورد نظر، پزشکان و مراکز درمانی برای تشخیص با چالش های فراوانی رو به رو هستند. لذا با توجه به اهمیت این امر لازم است نقش کنه در اپیدمیولوژی بیماری ها به طور کامل مورد بررسی قرار گرفته و با تهیه برنامه آموزشی مناسب جهت پیشگیری و کنترل جمعیت کنه ها اقدام کرد.

گزارشی از موارد مثبت سرولوژیکی عفونت یرسینیا پستیسی در جوندگان و گوشتخواران شمال غرب ایران

A Report on Serological Positive Cases of *Yersinia pestis* Infection in Rodents and Carnivores in Northwestern Iran

Abstract

Subject and Objective: Plague may recur after several decades in its endemic regions; hence, continuous monitoring of wildlife is essential, even when no human cases are reported in the old foci. The present study aimed to monitor rodents and their ectoparasites, as well as carnivores, to know the status of plague infection in an old focus of Iran.

Methods: The present study was conducted from 2019 to 2020 in Takestan county of Qazvin province in northwestern Iran. Rodents were caught using live traps, and their fleas were separated. Blood and spleen specimens were taken from captured rodents. Also, Serum samples were collected from sheepdogs and wild carnivores. The collected samples were tested by culture, serology (ELISA), and molecular methods to detect *Yersinia pestis* infection.

Results: A total of 410 small mammals were caught, of which 71.2% were *Meriones persicus*. Also, 2438 fleas were collected from rodents and 95.3% of them were *Xenopsylla buxtoni*. In total, 23 out of 410 rodents (5.6%, CI 95%: 3.6-8.3%) had IgG antibodies against the *F1* antigen of *Y. pestis* that all positive samples belonged to *M. persicus*. Furthermore, 10 (5.4%) out of 186 collected sera from sheepdogs serum, and 1 out of 3 sera from *Canis aureus* had specific IgG antibodies against the *F1* antigen of *Y. pestis*. There were no positive cases of *Y. pestis* in rodents and fleas using the culture method and real-time PCR.

Conclusion: In the present study, serological evidence of *Y. pestis* circulation was observed in rodents and carnivores (sheepdogs and *C. aureus*). The presence of plague potential vectors', as well as serological evidence of *Y. pestis* infection in surveyed animals could probably arise the risk of infection and clinical cases of plague in the region; thus, there is a need for health personnel training to cause greater attention to the detection of possible human cases of the disease.

Keywords: Plague, *Yersinia pestis*, Antibody, Rodents, Carnivores, Iran.

Introduction

Plague is a zoonotic disease caused by the gram-negative and rod-shaped *Yersinia pestis* bacterium. This disease has caused severe economic, social, and political crises throughout history. Rodents are known as the main plague reservoirs in nature and play a major role in the continued existence of enzootic cycles in natural foci (1, 2). Fleas are the most important vectors of *Y. pestis*, and mainly infected flea bites transmit the disease to new hosts and humans. Human-to-human transmission of plague also occurs through both direct contact and inhalation of contaminated droplets, in the case of pneumonic plague (3-5). In humans, plague appears in three forms: Bubonic plague, Septicemic plague, and Pneumonic plague, all of which can occur separately or rarely at the same time. Bubonic plague is the most common form of plague, which has an incubation period of 2-6 days (6, 7). The mortality rates of septicemic and pneumonic forms have been reported 30-100% (8). Another concern is the possibility of the illegal use of *Y. pestis* by bioterrorists, and attention has been attracted to the risk of bioterrorism use of the *Y. pestis* in biological weapons (9).

Despite the dramatic decline in plague cases in recent decades, sporadic cases have been still reported in endemic regions such as Asia, Africa, and America (3). However, epidemics and outbreaks occur occasionally, so that 2417 confirmed cases with 209 deaths were reported in Madagascar in 2017 (10).

Historical records indicate that two plague pandemics alongside a number of small epidemics have affected Iran and plague has been active in Iran for centuries. Human plague cases were reported in past from different parts of the country, and the last official report of a human plague dates back to Kurdistan Province (western Iran) in 1966 (11). Therefore, different regions of Iran, especially the west and northwest of Iran should be considered old foci of plague.

Nowadays, the plague is a re-emerging disease and still a serious health problem. For instance, plague re-emerged after 30 years in India in 1994 (12), after 95 years in Saudi Arabia in 1994 (13), after 40 years in Jordan in 1997 (14), after 50 years in Algeria in 2003 (15), and after 25 years in Libya in 2009 (16). Iran is regarded as an old endemic country of plague, from which several cases of epidemics have been reported throughout history. On the other hand, recently, serological evidence of *Y. pestis* infection has been reported in rodents and dogs in western Iran (17).

Given the recent findings in Iran, as well as re-emerging of plague in countries around Iran, continuous surveillance of plague infection in wildlife seems necessary in different regions of Iran. For the last hundred years, the Pasteur Institute of Iran has been responsible for monitoring and diagnosing this disease in all regions of Iran. The present study was conducted in line with the constant monitoring program of the teams of the Research Center for Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of the Pasteur Institute of Iran to clarify the current status of the *Y. pestis* circulation in rodents and carnivores.

Methods

Study Area: Takestan County with an area of about 2536 Km² is located at the distance of 30 km from the capital city of Qazvin in Qazvin province. The county is between the longitude of 49° 10' to 49° 48' E of the Greenwich meridian and latitude of 35° 40' to 36° 21' N of the equator. This county is limited to Buin Zahra County from the east, Avaj County from the south, Qazvin county from the north, and Zanzan province from the west (Map 1). It consists of five cities and 133 villages. According to the latest official census of Iran, the population of this county is about 200,000 people.

Sampling of the present study was performed from 60 different sites during 2019-2020 (July 18th to July 26th, 2019 (9 days), 14th to 23rd October 2019 (10 days), and July 18th to 5th August 2020 (19 days)).



Figure 1. The map of Iran, Qazvin Province, Takestan County

Ethical considerations: All procedures of collection and sampling of animals were approved by the Committee of Medical Ethics and Animal Work Ethics of the Pasteur Institute of Iran (IR.PII.REC.1398.051).

Small mammals and fleas sampling: Rodents were captured using live wooden traps baited by dates or cucumbers. Rodent's ectoparasites were isolated in the field and kept in the physiological saline solution. The rodents were then sent to the laboratory with their isolated fleas. Rodents were identified based on morphological characteristics and using available identification keys (18, 19). Collected fleas were identified based on the available identification keys (20).

Blood samples were taken from each rodent in the laboratory, and serum samples were extracted. Sera samples were stored at -20 °C. After that, under aseptic conditions, rodent spleen tissue was removed and divided into two parts, and placed inside two separate sterile microtube (for culture and molecular examination). Spleen samples were stored at 4°C until culture.

Sheepdogs and wild carnivores sampling: According to the coordination with the Veterinary Organization, blood samples were taken from sheepdogs after obtaining the consent of their owners. 10 ml blood was collected from each dog, and blood samples were centrifuged at 1500 rpm for 15 min to isolate their sera samples. After obtaining the necessary hunting licenses, blood samples were taken from the hunted wild carnivores, and sera were extracted from them to be kept at -20 °C until analysis.

Culture of *Y. pestis*: Spleen and flea samples were homogenized in normal saline under sterile conditions, and the suspension was obtained from them. Then, 50 µl of the suspension was cultured in the MacConkey agar and incubated at 28 °C for 72 h. The microbial cultures were examined daily, and suspect colonies grown were examined using gram staining and biochemical tests, including oxidase, catalase, lactose fermentation, motility, and indole tests. Finally,, the suspect isolates for *Y. pestis* were examined by the Real-time PCR.

Plague Serology: Sera samples collected from rodents and dogs were tested to detection of IgG antibodies against the *FI* antigen of *Y. pestis* by ELISA test. The ELISA test was performed according to ELISA guidelines recommended by Pasteur Institute of Madagascar (World Health Organization Reference Laboratory). *FI Y. pestis* antigen, and positive and negative control samples for rodents and dogs were obtained from the Pasteur Institute of Madagascar (17, 21).

Molecular detection of *Y. pestis*: Genomic DNA was extracted from rodents' spleen specimens and collected fleas using a commercial kit (Viragene DNA Isolation Kit, Iran). Furthermore, DNA of suspect isolates for *Y. pestis* in bacterial culture were also extracted by boiling method. All extracted DNA samples were kept at -20 °C until analysis.

All samples were tested for detection of plasmid (pMT1 (*cafI*), pPCP1 (*pla*)), and chromosomal (*yihN*) genes of *Y. pestis* (Table 1) using the multiplex Real-time PCR (22).

Table 1. Primers and probes used to detect *y. pestis*

Target	Primer/Probe	Sequences (5' to 3')	Amplicon Size (bp)
<i>yihN</i> (chromosome)	Forward	CGCTTTACCTTCACCAAACCTGAAC	128
	Reverse	GGTTGCTGGGAACCAAAGAAGA	
	Probe	Cy5-TAAGTACATCAATCACACCGCGACCCGCTT-BHQ2	
<i>CafI</i> (pMT1)	Forward	CCGTTATCGCCATTGCATTATTTGG	194

	Reverse Probe	GCCAAGAGTAAGCGTACCAACAAG Hex-AAGCACCCTGCAACGGCAACTCTT-BHQ1	
pPCP1 (<i>pla</i>)	Forward Reverse Probe	ATTGGACTTGCAGGCCAGTATC ATAACGTGAGCCGGATGTCTTC FAM-AAATTCAGCGACTGGGTTCTGGGCACA-BHQ1	144

Results

Identification of rodents: During two years of field survey, a total of 410 small mammals were captured, of which 193 (47.1%) and 217 (52.9%) rodents were collected in 2019 and 2020, respectively. In this study, 71.2% of the rodents were belonging to Persian jird, *Meriones persicus*. Other prevalent collected species were *Microtus qazvinensis* (22.2%) and *Meriones vinogradovi* (2.4%) (Table 2).

Identification of fleas: In the present study, a total of 2438 fleas were collected from the captured rodents, which manifested a load of 5.9 fleas per rodent. In the first year of the study, fleas were not subjected to species identification (n=721, 29.6%), directly to detection of *Y. pestis* by culture and molecular methods. In the second year of the study, 95.3% out of the collected fleas (n=1717) were identified as *Xenopsylla buxtoni*, which were collected from four rodent species; *M. persicus* (86%), *M. qazvinensis* (13%), *M. vinogradovi* (0.67%) and *Apodemus witherbyi* (0.33%). Furthermore, 3.4% of the collected fleas were *Nosopsyllus mikulini*, which were collected from *M. persicus* (52.5%), and *M. qazvinensis* (47.5%). Besides, a few *Ctenophthalmus rettigi smiti* (1.2%) were identified only from *M. persicus*.

Sera Samples of Carnivores: A total of 186 blood samples were collected from sheepdogs in the studied area during the first year (2019). Moreover, three samples from golden jackal (*Canis aureus*), and two samples from red fox (*Vulpes vulpes*) were captured.

Table 2. Name and number of the small mammals surveyed in the present study from Takestan County and the results of serological tracing of *Yersinia pestis* in them

Species	No.			No. of Anti-F1 IgG Positive (%)
	2019	2020	Total	
<i>Meriones persicus</i>	146	146	292	23 (7.9%)
<i>Microtus qazvinensis</i>	31	60	91	0 (0.0)
<i>Mus musculus</i>	1	1	2	0 (0.0)
<i>Apodemus witherbyi</i>	1	2	3	0 (0.0)
<i>Meriones vinogradovi</i>	10	0	10	0 (0.0)
<i>Nothocricetulus</i>	2	0	2	0 (0.0)
<i>Arvicola persicus</i>	0	4	4	0 (0.0)
<i>Scarturus toussi</i>	0	1	1	0 (0.0)
<i>Scarturus williamsi</i>	2	2	4	0 (0.0)
<i>Crocidura suaveolens</i>	0	1	1	0 (0.0)
Total	193	217	410	23 (5.6)

***Y. pestis* culture:** None of the 410 spleen samples from rodents were infected by *Y. pestis* using culture method. Likely, fleas microbial culture was negative for *Y. pestis*.

***Y. pestis* serology:** 23 (5.6%, CI95%: 3.6-8.3) out of 410 rodents had IgG antibodies against the *F1* antigen of *Y. pestis* and that all positive samples were belonging to *M. persicus*.

Furthermore, 10 (5.4%) out of 186 sera obtained from sheepdogs had a specific IgG antibodies against the *F1* antigen of *Y. pestis*. In addition, one out of the three sera collected from golden jackals had specific IgG antibody against the *F1* antigen of *Y. pestis*. There were no positive serological cases in fox samples.

Molecular tracing of plague: *Y. pestis* was not detected in rodents as well as in their fleas using Real-time PCR.

Discussion

In present study, there was serological evidence of the *Y. pestis* circulation in rodents and carnivores in our study area. The *Y. pestis* can survive in natural foci in several ways such as into symbiotic form with soil protozoa, within the body of deceased fleas and rodents, as well as resistance reservoirs(23). During silent periods, no human clinical cases may be observed for several years, or even sporadic clinical cases may occur but they can be treated with antibiotics without clinical or laboratory diagnosis (24-26). In plague endemic areas like Iran, plague recurrence in humans can occur after many years or decades, so, constant monitoring is required even if no human cases are reported in the old foci.

M. persicus was the most dominant rodent (71.2%) caught in the present study. 7.9% of the studied *M. persicus* had IgG against the *F1* antigen of *Y. pestis*. Plague reservoirs vary from a region to another and four species of the genus *Meriones* have been assumed to be the main reservoirs in Iranian natural plague focus; *M. persicus*, *M. libycus*, *M. tristrami*, and *M. vinogradovi*. The *M. persicus* and *Meriones libycus* are considered as relatively resistant, but two later are known as susceptible species (27-29). In an earlier report in 2013 , after several years of serological study of plague in an old historical foci of Iran (about 140 km from the west of our study area), 4.2% of *M. persicus* had IgG against the *F1* antigen of *Y. pestis* (30), which is less than the results of the present study. Even though the molecular detection and culture of *Y. pestis* were not successful in the present study as well as in the recent monitoring studies in the old foci, the presence of positive serological cases in rodents indicates previous exposure to *Y. pestis*. Therefore, it is not unreasonable to see positive molecular cases as well as *Y. pestis* cultures in future studies in old foci.

Based on the results of the present study, there was a 5.4% positive serum prevalence of IgG against the *F1* antigen of *Y. pestis* in sheepdogs, which is higher than our previous study (3.4%) in an old foci (17). Dogs are considered important animals in epidemiological studies in plague monitoring. *Y. pestis* infection in dogs is usually asymptomatic, or causes only mild self-limiting fever, and they have acceptable levels of antibodies to the *F1* antigen which is more stable than rodents (31). Dogs can play a role in human infection by transmitting rodent fleas to human habitats (32, 33). There are very rare cases of direct transmission of plague from dogs to humans (without the intervention of arthropod vectors) (34).

In the present study, serum sample of a golden jackal contained IgG against the *F1* antigen of *Y. pestis*, which confirmed the circulation of plague in wildlife in the studied region. Although the symptomatic diseases are rare in wild and domestic carnivores such as jackals and dogs, the possibility of *Y. pestis* infection should be considered in infected dogs by their exposure to wildlife reservoirs in areas where the infection is endemic (35). Rodents are food sources of carnivores such as golden jackals and red foxes; hence, the constant contact between these mammals is the reason for the importance of investigating carnivores in monitoring studies in natural foci.

Therefore, the sampling of carnivores in native areas can be used as an early warning system to find a tough evidence of plague circulation, and it is very important when human plague cases occur normally (36). The results of the present study provide evidence that *Y. pestis* still exists in Iran and its circulation among its reservoirs is active. On the other hand, continuous monitoring is needed in these areas, even areas that are silent and lack human cases. Therefore, the timely detection of plague by the *F1* antigen test in dogs in the present study is valuable for effective clinical management and timely response to health interventions. Serological studies of plague in sheepdogs can help to elucidate the duration of F1 antibodies in dogs.

Fleas are the main vectors of the plague. *Xenopsylla* is known as the main vector of plague in Iran (37). *X. astia*, *X. baxtoni*, and *X. cheopis* are the main species of *Xenopsylla* that are involved in the transmission of *Y. pestis* (38). In the present study, about 95.3% of the fleas collected from rodents were from *X. buxtoni* species. Furthermore, In addition, *Y. pestis* infection was detected in our research using the serological method in rodents and dogs, which indicates the bacterial cycle in rodents, for this reason we should expect the risk of infection and clinical cases of plague in this old foci in which there are potential vectors for the transmission of plague as well as the serological trace of *Y. pestis*. To overcome possible outbreaks of plague, health personnel must be aware of this disease and receive the necessary training.

Managing the occurrence of plague epidemics in human societies is possible through the monitoring and controlling potential and major reservoirs and vectors such as rodents, carnivores, and fleas in endemic areas, as well as the rapid detection and treatment of cases. Therefore, constant monitoring in wildlife is crucial, otherwise, it may lead to widespread rodent proliferation and broad outbreaks of plague in human societies. In conclusion, epidemiological surveillance is very important not only in endemic countries but also in non-endemic areas due to the control of bioterrorism threats (39, 40). To elucidate the main roles of rodents, carnivores, and their fleas in the plague transmission cycle, more studies are needed focusing on old and known foci in a wide geographical area.

Reference

1. Jie T. The Host of Plague Natural Focus of Jianchuan, Yunnan [J]. ENDEMIC DISEASES BULLETIN (CHINA). 1998;2.
2. Quan S, Kartman L. Ecological studies of wild rodent plague in the San Francisco Bay area of California. VIII. Susceptibility of wild rodents to experimental plague infection. Zoonoses research. 1962;1(7):121-44.
3. Gage KL, Dennis DT, Orloski KA, Ettestad P, Brown TL, Reynolds PJ, et al. Cases of Cat-Associated Human Plague in the Western US, 1977–1998. Clinical Infectious Diseases. 2000;30(6):893-900.
4. Burroughs AL. Sylvatic plague studies. The vector efficiency of nine species of fleas compared with *Xenopsylla cheopis*. Epidemiology & Infection. 1947;45(3):371-96.
5. Wheeler C, Douglas J. Sylvatic plague studies: V. The determination of vector efficiency. The Journal of infectious diseases. 1945:1-12.
6. Hull HF, Montes JM, Mann JM. Septicemic plague in New Mexico. Journal of Infectious Diseases. 1987;155(1):113-8.
7. von Reyn CF, Weber NS, Tempest B, Barnes AM, Poland JD, Boyce JM, et al. Epidemiologic and clinical features of an outbreak of bubonic plague in New Mexico. Journal of Infectious Diseases. 1977;136(4):489-94.

8. Gasper PW, Barnes AM, Quan TJ, Benziger JP, Carter LG, Beard ML, et al. Plague (*Yersinia pestis*) in cats: description of experimentally induced disease. *Journal of Medical Entomology*. 1993;30(1):20-6.
9. Armstrong M. Rehearsing for the Plague: Citizens, Security, and Simulation. 2012;42(1):105-20.
10. Andrianaivoarimanana V, Piola P, Wagner DM, Rakotomanana F, Maheriniaina V, Andrianalimanana S, et al. Trends of human plague, Madagascar, 1998–2016. *Emerging infectious diseases*. 2019;25(2):220.
11. Shahraki AH, Carniel E, Mostafavi E. Plague in Iran: its history and current status. *Epidemiology and Health*. 2016;38:e2016033.
12. Dennis DT. Plague in India. 1994;309:893.
13. Bin Saeed AA, Al-Hamdan NA, Fontaine RE. Plague from eating raw camel liver. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(9):1456-7.
14. Arbaji A, Kharabsheh S, Al-Azab S, Al-Kayed M, Amr ZS, Abu Baker M, et al. A 12-case outbreak of pharyngeal plague following the consumption of camel meat, in north–eastern Jordan. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2005;99(8):789-93.
15. Bertherat E, Bekhoucha S, Chougrani S, Razik F, Duchemin JB, Houti L, et al. Plague reappearance in Algeria after 50 years, 2003. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(10):1459.
16. Cabanel N, Leclercq A, Chenal-Francois V, Annajar B, Rajerison M, Bekhoucha S, et al. Plague outbreak in Libya, 2009, unrelated to plague in Algeria. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(2):230-6.
17. Esamaeili S, Azadmanesh K, Naddaf SR, Rajerison M, Carniel E, Mostafavi E. Serologic survey of plague in animals, Western Iran. 2013;19(9):1549.
18. Kryštufek B, Vohralík V, Janžekovič F. *Mammals of Turkey and Cyprus: Rodentia I: Sciuridae, Dipodidae, Gliridae, Arvicolinae: Zgodovinsko društvo za južno Primorsko*; 2005.
19. Darvish J, Mohammadi Z, Mahmoudi A, Siahsarvie R. Faunistic and taxonomic study of Rodents from northwestern Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*. 2014;10(2):119-36.
20. Acosta R, Morrone JJJ. Clave ilustrada para la identificación de los taxones supraespecíficos de Siphonaptera de México. 2003(89):39-53.
21. Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, Foulon J, Ratsitorahina M, Ratsifasoamanana L, et al. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. 2003;361(9353):211-6.
22. Stewart A, Satterfield B, Cohen M, O'Neill K, Robison RJJ. A quadruplex real-time PCR assay for the detection of *Yersinia pestis* and its plasmids. 2008;57(3):324-31.
23. Reis Da Silva Fernandes DL, Filgueira Bezerra M, Sobreira Bezerra Da Silva M, Leal NC, De Souza Reis CR, DE ALMEIDA AMP. Rodent hosts and flea vectors in Brazilian plague foci: a review. *Integrative Zoology*. 2021;16(6):810-9.
24. Hinnebusch B, Erickson D. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. *Bacterial biofilms*: Springer; 2008. p. 229-48.
25. Shi L, Yang G, Zhang Z, Xia L, Liang Y, Tan H, et al. Reemergence of human plague in Yunnan, China in 2016. *PLoS One*. 2018;13(6):e0198067.
26. Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, Bertherat E, Carniel E, et al. Plague: past, present, and future. *PLoS medicine*. 2008;5(1):e3.
27. Baltazard M, Bahmanyar M, Mostachfi P, Eftekhari M, Mofidi C. Recherches sur la peste en Iran. *Bulletin of the World Health Organization*. 1960;23(2-3):141.

28. Eisen RJ, Gage KL. Adaptive strategies of *Yersinia pestis* to persist during inter-epizootic and epizootic periods. *Veterinary research*. 2009;40(2):1.
29. Ari TB, Neerinckx S, Gage KL, Kreppel K, Laudisoit A, Leirs H, et al. Plague and climate: scales matter. *PLoS Pathog*. 2011;7(9):e1002160.
30. Esmaeili S, Azadmanesh K, Naddaf SR, Rajerison M, Carniel E, Mostafavi E. Serologic survey of plague in animals, Western Iran. 2013;19(9):1549.
31. Brinkerhoff RJ, Collinge SK, Bai Y, Ray CJV-B, Diseases Z. Are carnivores universally good sentinels of plague? 2009;9(5):491-7.
32. Nichols MC, Ettestad PJ, VinHatton ES, Melman SD, Onischuk L, Pierce EA, et al. *Yersinia pestis* infection in dogs: 62 cases (2003–2011). 2014;244(10):1176-80.
33. Hannah Gould L, Pape J, Ettestad P, Griffith K, Mead PJZ, health p. Dog-associated risk factors for human plague. 2008;55(8-10):448-54.
34. Wang H, Cui Y, Wang Z, Wang X, Guo Z, Yan Y, et al. A dog-associated primary pneumonic plague in Qinghai Province, China. 2011;52(2):185-90.
35. Bowser NH, Anderson NEJVs. Dogs (*Canis familiaris*) as sentinels for human infectious disease and application to Canadian populations: a systematic review. 2018;5(4):83.
36. Lowell JL, Eisen RJ, Schotthoefer AM, Xiaocheng L, Montenieri JA, Tanda D, et al. Colorado animal-based plague surveillance systems: relationships between targeted animal species and prediction efficacy of areas at risk for humans. 2009;34(1):22-31.
37. Maleki-Ravasan N, Solhjoui-Fard S, Beaucournu J-C, Laudisoit A, Mostafavi E. The Fleas (*Siphonaptera*) in Iran: diversity, host range, and medical importance. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(1):e0005260.
38. Eisen RJ, Gage KL. Transmission of flea-borne zoonotic agents. *Annual review of entomology*. 2012;57:61-82.
39. Prentice MB, Rahalison L. Plague. *The Lancet*. 2007;369(9568):1196-207.
40. Bertherat E, Bekhoucha S, Chougrani S, Razik F, Duchemin JB, Houti L, et al. Plague reappearance in Algeria after 50 years, 2003. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(10):1459-62.

بررسی آلودگی به بروسلاز در جوندگان غرب ایران

مقدمه و هدف: بروسلاز از مهمترین بیماری های باکتریایی زئونوز در جهان و ایران است که عامل آن می تواند در میزبان های متعدد به عنوان مخزن یا عامل بروز بیماری عمل نماید. در این بین نقش جوندگان در نگهداری و یا انتقال گونه های بروسلا به حیوانات اهلی و انسان چندان شناخته شده نیست. در این مطالعه وضعیت آلودگی جوندگان غرب ایران (شهرستان کیودرآهنگ در استان همدان) از لحاظ آلودگی به بروسلا با استفاده از روش های سرولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: نمونه گیری از April 2014 تا September 2017 از مناطق مختلف شهرستان کیودرآهنگ در غرب ایران انجام شد. جوندگان صید شده با استفاده از کلید های ریخت شناسی مورد شناسایی قرار گرفتند. آزمایش سرولوژیکی بر اساس روش آگلوتیناسیون لوله ای استاندارد (Wright) و ردیابی مولکولی بر اساس روش Real-time PCR روی نمونه ها انجام شد. نمونه های مثبت مولکولی، جهت تعیین گونه با استفاده Conventional PCR و مشاهده باند اختصاصی در الکتروفورز مورد بررسی نهایی قرار گرفتند. ۱۰۰۱۹۳ تا ۱۰۶۹۶

نتایج: در طول ۴۱ ماه نمونه برداری، ۴۳۳ نمونه مورد بررسی مولکولی و ۴۰۰ نمونه مورد بررسی سرولوژیکی قرار گرفتند. ۱۰ گونه مختلف جوندگان شناسایی شدند که بیشترین تعداد مربوط به گونه *Meriones persicus* (۷۵.۵٪) بود. بر اساس آزمایش سرولوژیکی ۷ نمونه (۱.۷۵٪) مثبت شناسایی گردید که شامل *M. persicus* (۴ نمونه)، *Mus musculus domesticus*، *Meriones libycus* و *Spermophilus fulvus* بودند. در آزمایش مولکولی نیز ۳ نمونه ی مثبت بروسلا (۰.۶۹٪) در گونه های *M. musculus* (یک مورد) و *M. persicus* (دو مورد) شناسایی شد. در تعیین مولکولی گونه های بروسلا تنها *Brucella abortus* در گونه *M. musculus domesticus* شناسایی گردید.

نتیجه گیری: با توجه به اولین ردیابی گونه های بروسلا در گونه مریونس و شناسایی *B. abortus* در گونه *Mus musculus domesticus* می بایست جوندگان را بیش از پیش به عنوان یک مخزن بالقوه بروسلا مورد توجه قرار داد. همچنین چنانچه آزمون های اعتبار سنجی شده در دسترس نباشند می بایست از بیش از یک نوع آزمون برای ردیابی بروسلاز در حیات وحش استفاده نمود. **کلمات کلیدی:** بروسلاز، گونه های بروسلا، جوندگان، سرولوژی، PCR، ایران، همدان

مقدمه:

بروسلاز یکی از گسترده ترین بیماری های باکتریایی زئونوز در جهان است که عامل آن کوکو باسیل های گرم منفی، بی حرکت و بدون اسپور بروسلا می باشد [۱]. گونه های بروسلا از لحاظ ژنتیکی شباهت بسیاری به هم دارند و طبقه بندی عمدتاً بر اساس تفاوت در بیماری زایی و میزبان نسبتاً اختصاصی صورت گرفته است [۲]، هرچند آنها می توانند در میزبان های متعددی ایجاد بیماری نمایند [۳]. در حال حاضر ۱۲ گونه از جنس بروسلا و میزبان ترجیحی آنها مورد شناسایی قرار گرفته است:

Brucella abortus (cattle), *B. canis* (dogs), *B. melitensis* (goats, cows, and sheep), *B. suis* (swine), *B. ovis* (rams), *B. neotomae* (desert rats), *B. pinnipedialis* (seals), *B. ceti* (dolphins), *B. papionis* (baboons), *B. vulpis* (red foxes), *B. inopinata* (human) and *B. microti* (vole) [4]. [۵, ۱]

گونه های *Brucella abortus* و *B. melitensis* شایع ترین عوامل ایجاد کننده بروسلوز در ایران می باشند [۶]. شناسایی گونه های بروسلا در آزمایشگاه با روش های کشت، ردیابی DNA بر پایه polymerase chain reaction (PCR) و روش های سرولوژیکی انجام می گیرد [۳].

جوندگان بیش از 44٪ از کل پستانداران زمین را تشکیل می دهند [۷] و با توجه به قابلیت سازش با زیستگاه های متنوع، ممکن است نقش واسطه در انتقال پاتوژن ها بین زیستگاه های مختلف را ایفا کنند [۸]. گزارشات بیان کرده اند که جوندگان، مخزن گونه های بروسلا در حیات وحش [۹، ۱۰] هستند؟ و حداقل ۲۲ گونه از جوندگان؟ مستعد به عفونت بروسلائی هستند [۱۰]، از این جهت ممکن است نقش مهمی در نگهداری گونه های بروسلا و انتقال این بیماری زئونوز داشته باشند [۱۱]. گزارش هایی از آلودگی مزارع پرورش گوزن و دام های اهلی و حیوانات خانگی نظیر گربه از طریق جوندگان و خرگوش آلوده منتشر شده است [۱۲]. در خاورمیانه و ایران هیچ اطلاعاتی در مورد بروسلوز جوندگان وجود ندارد و در مناطق دیگر جهان نیز اطلاعات محدودی از آن موجود است که بسیاری از آنها هم به روز نیستند [۱۳].

در ایران به عنوان یک کشور در حال توسعه، ابتلای به تب مالت همواره به عنوان یک معضل بهداشتی مطرح بوده است و میزان بروز آن به حدود ۱۶ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر می رسد [۱۴]. با اینحال همانند بسیاری از مناطق جهان [۱۵] مبنای نظارتهای دامپزشکی بروسلوز در ایران عموماً بر دام ها متمرکز است و پایش سیستماتیکی در حیات وحش وجود ندارد و لذا نقش جوندگان، به عنوان گونه های مستعد به عفونت بروسلائی [۱۰، ۱۲] در انتقال مستقیم یا غیر مستقیم این پاتوژن به حیوانات اهلی و انسان مبهم است.

استان همدان جزو استان های با آلودگی بسیار بالا به بروسلوز در ایران محسوب می شوند. به طوری که میزان بروز تب مالت در این استان حدود ۳ برابر میانگین کشوری در سال ۲۰۱۲ بوده است [۱۶]. از ۹۳۱۸ مورد تب مالت شناسایی شده ی استان همدان در سالهای ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۵، ۸۱ درصد موارد ساکن روستا بوده اند [۶]. شهرستان کبودرآهنگ به عنوان بزرگترین شهرستان استان همدان در شمال غربی این استان قرار دارد (شکل شماره ۱) و با جمعیتی در حدود 160,000 نفر بالاترین میزان بروز بیماری تب مالت در استان همدان (۱۴۳.۲ در هر ۱۰۰ هزار نفر) را داراست [۶]. در مطالعه حاضر وضعیت آلودگی جوندگان شهرستان کبودرآهنگ در استان همدان به عنوان یک منطقه بالقوه از لحاظ آلودگی به بروسلا با استفاده از روش های سرولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است.



Figure 1- Location of Hamadan Province in Iran (Left) and location of Kabudarahang in Hamadan province (Right)

مواد و روش:

منطقه نمونه برداری: این مطالعه بر روی نمونه های بیو بانک آزمایشگاه مرجع طاعون، تولارمی و تب کیو متعلق به انستیتو پاستور ایران انجام گرفته که از April 2014 تا September 2017 از مناطق مختلف شهرستان کبودرآهنگ استان همدان صید شده است. این استان با جمعیتی بالغ بر 1,700,000 نفر در غرب ایران ($34^{\circ}56'$ [North latitude and 48^{\circ}56' East longitude](#)) واقع شده است [۱۶].

صید، شناسایی و نمونه گیری از جوندگان: صید جوندگان با طعمه گذاری (خرما، پفک پنیری و خیار) و با استفاده از تله های زنده گیر چوبی انجام شد. جوندگان صید شده پس از جداسازی اکتوپارازیت ها به پایگاه تحقیقاتی بیماری های نوپدید و بازپدید انستیتو پاستور ایران واقع در روستای اکنلو (شهرستان کبودرآهنگ- استان همدان) منتقل شدند. جوندگان صید شده با استفاده از کلید های ریخت شناسی موجود شناسایی شدند [۱۷].

کلیه مراحل تله گذاری و نمونه گیری از جوندگان مطابق با استانداردهای اخلاقی بین المللی (شناسه IR.PII.REC.1395.9) و کار بر روی جوندگان با پوشش تایید شده و با رعایت اصول ایمنی زیستی انجام گرفت. در آزمایشگاه، خون گیری از قلب جوندگان پس از بیهوش کردن آنها با ایزوفلوران انجام شد و سرم های بدست آمده در دمای -20° درجه سانتی گراد ذخیره شدند. همچنین طحال کلیه جوندگان جهت آزمون مولکولی در میکروتیوب های استریل جمع آوری شد.

ردیابی سرولوژیکی بروسلوز: آزمایش سرولوژیکی بر اساس روش آگلوتیناسیون لوله ای استاندارد standard (tube agglutination test [STAT-Wright]) و با استفاده از کیت رایت تولید شده توسط انستیتو پاستور ایران انجام شد. جهت انجام این تست ابتدا با استفاده از سرم فیزیولوژی رقت های سریالی از سرم های نمونه در لوله

های همولیز ۱۰ ml تهیه شد: در لوله اول مقدار ۹۰۰ میکرولیتر و در سایر لوله ها ۵۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد. سپس به لوله اول ۱۰۰ میکرولیتر سرم نمونه افزوده و پس از مخلوط کردن ۵۰۰ میکرولیتر از لوله اول برداشته به لوله دوم منتقل شد و این عمل را تا لوله هشتم ادامه یافت. از لوله هشتم ۵۰۰ میکرولیتر برداشته و اوت شد. مراحل فوق برای لوله های حاوی کنترل مثبت و منفی نیز انجام شد. برای کنترل مثبت از سرم مثبت درون کیت و برای کنترل منفی از سرم فیزیولوژی به جای سرم استفاده شد. سپس به تمام لوله ها ۵۰۰ میکرولیتر آنتی ژن رایت اضافه گردید. پس از مخلوط کردن، تمامی لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C قرار گرفت. نهایتاً رقت آخرین لوله ای که حاوی آگلوتیناسیون بود قرائت شد. جهت ردیابی واکنش های متقاطع، آزمایشات سرولوژیکی تولارمی [۱۸] و طاعون [۱۹] نیز بر روی نمونه های مثبت انجام شد.

ردیابی مولکولی بروسلا: از ۱۰ میلی گرم از نمونه طحال هر جونده برای استخراج DNA استفاده شد. برای این منظور، از کیت استخراج از بافت شرکت FavroGene (ساخت تایوان) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

جهت شناسایی بروسلا از روش Real-time PCR و تکثیر ژن IS711 جنس بروسلا استفاده شد (جدول شماره ۱). دستگاه Rotor-Gene 6600 (Corbett Life Science) انجام شد. DNA ی سویه *Brucella abortus* biovar1 (ATCC 23448) به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. نمونه های مثبت مولکولی برای جنس بروسلا در مرحله قبل، جهت تعیین گونه با استفاده Conventional PCR و مطابق با روش توصیه شده Hinić و همکاران مورد آزمایش قرار گرفتند (جدول شماره ۱) [۲۰].

Conventional PCR reactions were done in a DNA Fast Thermal Cycler 9800 (Applied Biosystems) in a 30 μl reaction mixture containing 2.5 mM Master mix (Ampliqon Taq DNA Polymerase Mix Red), 3 μl PCR reaction buffer, 2.5 DNA polymerase, 20 pmol of each primer, and 1 μl of the template DNA.

40 سیکل (denaturation اولیه در دمای 95 به مدت 3 دقیقه و سیکل های دمایی 95°C و 60°C به ترتیب به مدت 30 و 35 ثانیه) مورد بررسی مجدد قرار گرفتند. نهایتاً برای الکتروفورز محصول PCR و ساخت ژل، بافر TBE تهیه گردید. سپس ژل آگارز یک درصد پس از تهیه، در داخل قالبی به ابعاد ۲۰ در ۲۰ سانتی متر و حاوی شانه های ایجاد کننده چاهک، پخش گردید. پس از بسته شدن، ژل در تانک الکتروفورز قرار داده شد. سپس محصولات PCR هر کدام به میزان ۱۰ میکرولیتر با ۳ میکرولیتر فلوردا ی مخلوط گردید و در چاهک های ژل آگارز ریخته شد. در پایان نمونه ها تحت ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز گردید. جهت مشاهده ی الکتروفورز، ژل را با کمک دستگاه ژل داک بررسی کرده و از آن عکس برداری شد.

Table 1. Primers used for detection of *Brucella* spp

Gene target	Primer/probe	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)	Reference
IS711	F R Probe	GCTTGAAGCTTGC GGACAGT GGCCTACCGCTGCGAAT FAM-AAGCCAACACCCGGCCATTATGGT- TAMRA	63	
BruAb2_0168 (<i>B. abortus</i>)	F R	GCACACTCACCTTCCACAACAA CCCCGTTCTGCACCAGACT	81	[۲۰]
BMEII0466 (<i>B. melitensis</i>)	F R	TCGCATCGGCAGTTTCAA CCAGCTTTTGGCCTTTTCC	67	

نتایج:

جوندگان صید شده: در مدت ۴۱ ماه از ۳۳ منطقه مختلف در شهرستان کبودرآهنگ نمونه برداری شد که بر این اساس از مجموع ۳۹۰۲ مرتبه تله گذاری، ۴۳۳ جونده به دام افتاد که شامل ۱۰ گونه مختلف از جوندگان بودند. بیشترین فراوانی جوندگان صید شده مربوط به گونه *M. persicus* (۷۵.۵٪) و کمترین آن مربوط به *Mus m. domesticus* (۰.۵٪) بود (برای اطلاعات بیشتر به جدول شماره ۲ رجوع شود). در مجموع ۴۳۳ نمونه مورد بررسی مولکولی و ۴۰۰ نمونه مورد بررسی سرولوژیکی قرار گرفتند.

Table 2. Number and the species of studied rodents, seropositive and PCR positive species

Rodent species	Number of live rodents (%)	Total number (%)	Seropositive number	PCR positive number
<i>Meriones persicus</i>	304 (74.7)	327 (75.52)	4	2
<i>Meriones libycus</i>	42 (10.32)	44 (10.16)	1	0
<i>Meriones vinogradovi</i>	23 (5.65)	24 (5.54)	0	0
<i>Ellobius lutescens</i>	13 (3.19)	13 (3.0)	0	0
<i>Microtus qazvinensis</i>	8 (1.97)	8 (1.85)	0	0
<i>Spermophilus fulvus</i>	7 (1.72)	7 (1.62)	1	0
<i>Meriones tristrami</i>	5 (1.23)	5 (1.16)	0	0
<i>Arvicola persicus</i>	2 (0.49)	2 (0.46)	0	0
<i>Calomyscus elburzensis isatissus</i>	2 (0.49)	2 (0.46)	0	0
<i>Mus musculus domesticus</i>	1(0.24)	1(0.23)	1	1
	407(100)	433(100)	7 (1.75%)	3 (0.69%)

شناسایی سرولوژیکی بروسلوز: بر اساس آزمایش رایت که بر روی ۴۰۰ نمونه ی سرم جوندگان انجام گرفت ۷ نمونه (۱.۷۵٪ از کل نمونه ها) مثبت سرولوژی شناسایی گردید (جدول شماره ۲). از این تعداد، ۴ نمونه (۵۷.۱۴٪ از نمونه های مثبت و ۱٪ از تعداد کل نمونه ها) مربوط به *M. persicus*، یک نمونه (۱۴.۲۸٪ از تعداد نمونه های مثبت و ۰.۲۵٪ از تعداد کل نمونه ها) مربوط به *Mus musculus domesticus*، یک نمونه مربوط به *Meriones libycus* و یک نمونه (مربوط به *Spermophilus fulvus* بود (جدول شماره ۲). زمان تله گذاری و تیترا مشاهده شده برای نمونه های مثبت و شدت انباشتگی آن در جدول شماره ۳ گردآوری شده است. واکنش متقاطعی بین نمونه های مثبت با گونه های یرسینیا و فرانسسیلا تولارنسیس مشاهده نشد.

Table ۳. Time and agglutination titer of captured seropositive species*

No	Rodent species	Sampling time	agglutination titer (intensity)
1	<i>Meriones persicus</i>	Sep.2015	1/160 (+++)
2	<i>M. persicus</i>	Sep.2015	1/160 (+++)
3	<i>M. persicus</i>	Agu.2016	1/160 (+++)
4	<i>M. persicus</i>	Sep.2017	1/160 (+++)
5	<i>Mus musculus domesticus</i>	Agu.2017	1/160 (+++)
6	<i>M. libycus</i>	May.2016	1/160 (+++)
7	<i>Spermophilus fulvus</i>	May.2016	1/160 (+++)

* از تعداد کل نمونه ها ۳۹ جونده (۹٪) به علت مرگ در تله و همچنین مناسب نبودن مقدار سرم تهیه شده از مطالعه ی سرولوژیکی حذف شدند.

شناسایی مولکولی بروسلوز: در آزمایش مولکولی به روش Real Time PCR از ۴۳۳ نمونه DNA که از طحال جوندگان استخراج شده بود ۳ گونه ی مثبت بروسلا مورد شناسایی قرار گرفت (جدول شماره ۲) که یک مورد آن مربوط به گونه *M. musculus domesticus* بود که در تست سرولوژی نیز به عنوان گونه آلوده شناسایی شده بود و دو گونه مثبت دیگر شامل *M. persicus* بودند که در Jun.2014 و Nov.2016 به دام افتاده بودند. در بررسی نهایی تطابق نمونه های مثبت با پرایمرهای اختصاصی تنها گونه *M. musculus domesticus* دارای باند مشخص در الکتروفورز بود که به عنوان گونه *Brucella abortus* شناسایی گردید.

بحث

این مطالعه اولین بررسی شیوع بروسلوز جوندگان در ایران محسوب می گردد. نتایج مطالعه حاضر نشان از آلودگی سرمی ۷ جونده (شامل ۴ گونه مختلف) به بروسلاست، در حالی که در تست PCR تنها یکی از آنها به علاوه ۲ نمونه دیگر به عنوان نمونه ی مثبت ردیابی شد. و نهایتاً فقط گونه *M. musculus domesticus* دارای باند اختصاصی برای گونه *B. abortus* بود. در معدود گزارشات منتشر شده تاکنون، آلودگی گونه های *Spermophilus*

[۲۲، ۲۱] و *Mus musculus* [۲۳] به بروسلوز شناسایی شده است، ولی تابحال گزارشی از آلودگی *Meriones spp* به بروسلا در حیات وحش (به جز آلوده سازی تجربی) منتشر نشده است. بر اساس اطلاعات بسیار محدودی که در باره بروسلوز در جربیل ها وجود دارد تلقیح ۲۰ سلول باکتریایی بروسلا آبورتوس باعث ابتلای آنها به بروسلوز می گردد. با اینحال حساسیت از گونه ای به گونه ی دیگر متفاوت است [۲۴]. *Meriones spp* چونندگان ساکن مناطق خشک و نیمه خشک می باشند [۲۵، ۲۶] و با توجه به وضعیت جغرافیایی و اقلیمی ایران در مناطق وسیعی از کشور ایران از جمله منطقه مورد بررسی حضور دارند. با توجه به نتایج این مطالعه و گزارشات پیشین مبنی بر شناسایی گونه های جدید [۴، ۲۷] می بایست چونندگان را بیش از پیش به عنوان یک مخزن بالقوه بروسلا مورد توجه قرار داد.

در این مطالعه جهت شناسایی گونه های مثبت در آزمون PCR با توجه به کپی نامبر پایین قطعه 16srRNA و ct بالای نمونه ها از پرایمرهای اختصاصی گونه های غالب بروسلا در ایران [۲۸-۳۰]، *Brucella abortus* and *B. melitensis* استفاده گردید. از طرفی ما به دنبال ارتباطی بین بروسلاهای آلوده کننده چونندگان با بروسلاهای دامی و انسانی نیز بودیم که استفاده از پرایمرهای فوق می توانست ارتباط احتمالی را روشن نماید که در نهایت مشخص گردید که گونه آلوده کننده *Mus musculus* از نوع *Brucella abortus* می باشد.

در ایران، اهمیت چونندگان در اپیدمیوزی بروسلوز احتمالاً مرتبط به آلوده کردن منابع آبی، چراگاه ها و محل نگهداری حیوانات اهلی است. هرچند نقش غیر مستقیم آنها در انتقال گونه های بروسلا از طریق حیوانات اهلی و دیگر منابع به انسان هنوز کاملاً ناشناخته است. این نقش با شناسایی *B. abortus* در گونه *Mus musculus domesticus* به عنوان گونه ی موش خانگی ابعاد تازه ای می یابد که می تواند مسیر مطالعات بعدی در این زمینه را روشن تر نماید. نتایج یک مطالعه دیگر در سال ۲۰۱۰ نشان داده است که سویه آلوده کننده بروسلا در چونندگان ارتباط تنگاتنگی با سویه *B. suis* دارد [۱۰]. قبل تر واکنش سرمی مثبت در ۱۳ گونه از چونندگان مختلف در ایالت Utah ایالات متحده مشاهده شده بود. جالب این است گاوها و نشخوکنندگان کوچک در آن ایالت به ترتیب دارای آلودگی ۱۰-۵.۲ و ۳-۱۱.۲ درصد بودند [۲۱] و با توجه به میزبان ترجیحی بروسلا آبورتوس در حیوانات اهلی می توان چنین ارتباطی را در نتایج این تحقیق هم در نظر گرفت. باید در نظر داشت که گونه های بروسلا می توانند تا چند هفته در آب و خاک زنده بمانند [۵] و از آنجا که مردم نواحی روستایی با زمین های پیرامون این مناطق و دام ها ارتباط مستمری دارند بیشتر در معرض احتمال دریافت آلودگی قرار دارند. در حال حاضر پست کنترل در دامداری های صنعتی به جد دنبال می شود اما در مناطق کمتر توسعه یافته نظیر روستاها وجود چونندگان در محل نگهداری دام ها و انسان موضوع شایعی است. آنچنان که در حین نمونه گیری، ساکنین برخی روستاها درخواست تله گذاری در خانه ی خود و محل نگهداری دام ها را داشتند. اهمیت این موضوع وقتی روشن تر می شود که بدانیم دوزهای sublethal منجر به بقای ۱۰۰ درصدی برخی گونه های بروسلاها در چونندگان می شوند [۳۱] و تماس نزدیک دام ها و حیوانات اهلی با این گونه ها ممکن است منجر به ایجاد کانال هایی برای

انتقال بروسلا از حیوانات وحشی به حیوانات اهلی و از آنها به انسان (یا بالعکس) شوند. آنچنان که نتایج تحلیلی فیلوزنتیکی بر روی دو گونه غیرمعمول بروسلاهی انسانی نشان از نزدیکی این دو استرین به یک سویه ی جدا شده از جوندگان در استرالیا داشت [۱۰].

در ایران سیاست مبارزه با بروسلاز بر واکسیناسیون دام های اهلی، شناسایی و کشتار (Test-and-slaughter strategy) معطوف شده است. هرچند این استراتژی در کاهش موارد دام های آلوده تاثیر گذار است اما بدون توجه به جنبه های دیگر اپیدمیولوژی بیماری ممکن است روند کنترل بیماری بروسلاز در انسان و دام را کند نماید. در اروپا نیز با اینکه بروسلاز دامی مهار شده است اما خطر ورود مجدد آن از طریق مخازن طبیعی آن در حیات وحش همواره وجود داشته است [۳۲]؛ پس از شناسایی *B. microti* در اتریش در سال ۲۰۰۷ [۳۳] جوندگان دوباره به عنوان وکتور یا مخزن بروسلاها در محیط های روستایی و شهری مورد بحث قرار گرفتند.

به عنوان یک محدودیت برای تمامی روش های ردیابی بروسلا، اکثر تکنیک های مولکولی و سرولوژیکی روی نمونه های انسانی و یا دامی اعتبار سنجی شده است و در مورد نمونه های مربوط به حیات وحش به جز در موارد محدود [۳۴]، اطلاعاتی در مورد حساسیت و دقت این تکنیک ها در دسترس نیست. به عبارت دیگر حساسیت روش های فعلی برای گونه های مختلف متفاوت است [۳۴، ۱] که می تواند بر نتایج این مطالعه نیز تاثیرگذار بوده باشد، آنچنان که در تحقیقی در سال ۲۰۱۲ در کره جنوبی نیز، از مجموع ۶۸ جونده ۷ نمونه مثبت سرمی شناسایی شد در حالیکه نتایج آن در تست مولکولی منفی بود [۳۵]. همچنین در مطالعه Hinić و همکاران در سال ۲۰۰۸ در سوئیس، ۲۸ نمونه مثبت (۱۸٪) در ردیابی قطعه IS711 بر پایه real-time PCR شناسایی شد، هرچند هیچکدام در بررسی سرولوژیکی مثبت نبودند [۳۴].

از دیگر عوامل تاثیر گذار بر نتایج سرولوژیکی و مولکولی، حذف برخی از گونه های بروسلا در جوندگان پس از ۷ تا ۲۸ روز از جریان خون و اندام های هدف [۳۱]، واکنش های مثبت و منفی کاذب سرولوژیکی می باشد. واکنش متقاطع بین گونه های بروسلا با برخی باکتری های گرم منفی نظیر

Yersinia enterocolitica O:9, Francisella tularensis, Escherichia coli O:157, Salmonella urbana group N, Vibrio cholerae

به دلیل شباهت آنتی ژن زنجیره لیپوپلی ساکاریدی صاف (S-LPS) باکتری های فوق به گونه های بروسلا است [۳۴]. با اینحال حداقل در مورد مطالعه ی حاضر می توان با اطمینان گفت که هیچ واکنش متقاطعی بین نمونه های مثبت با گونه های یرسینیا پستیس (نتایج آن منتشر نشده) و فرانسیسلا تولارنسیس [۱۸] روی نداده است. با توجه به نتایج این مطالعات هر چند واکنش مثبت سرولوژیکی محتمل تر به نظر می رسد اما نباید نتایج منفی کاذب در این نوع بررسی ها را نیز از نظر دور داشت. ممکن است نتایج منفی کاذب در نتیجه عدم ردیابی آنتی بادی (تا ۱۶ روز بعد از مواجهه) [۳۶] و پایین آمدن سطوح قابل تشخیص آنتی بادی [۳۷] ایجاد شود. این بدان معنی است که شیوع واقعی تب مالت ممکن است بیشتر از آنی باشد که توسط غربالگری آنتی بادی نشان داده می شود [۳]. با توجه به نتایج این تحقیق و مطالعات ذکر شده به نظر می رسد

چنانچه آزمون های اعتبار سنجی شده قابل دسترس نباشند می بایست از بیش از یک آزمون برای ردیابی بروسلوز در حیات وحش استفاده نمود.

به عنوان یک قاعده کلی، پیشگیری از ابتلا به بروسلوز انسانی به طور عمده به کنترل بیماری در حیوانات بستگی دارد [۳۸, ۳۹]. از طرف دیگر بررسی های اپیدمیولوژیک نشان دهنده ی عدم تفاوت در بیماری زایی و انتقال گونه های بروسلا در حیات وحش و حیوانات اهلی بوده است [۹]. لذا اجرای یک نظام مراقبت بهداشتی کارآمد و گرداوری منظم داده های مرتبط با بروز بیماری بروسلوز هم در جمعیت های انسانی و هم در جمعیت های دامی و حیات وحش و تجزیه و تحلیل آنها می تواند در ریشه کنی هرچه بهتر و سریعتر آن بسیار تاثیرگذار باشد. در این بین نیاز به توسعه ی پروتکل های تشخیص بروسلوز در گونه های حیات وحش بر پایه روش های مولکولی و سرولوژیکی کاملاً محسوس است. نتایج این مطالعه را می توان به عنوان شروعی برای درک بهتر بروسلوز در جمعیت جوندگان ایران و پر کردن بخشی از گپ دانشی مربوط به آن برشمرد. در کنار همه این موارد باید در نظر داشت که نتایج این مطالعه قادر به برآورد خطر قطعی بروسلوز جوندگان برای انسان و دام های اهلی نیست و این اتفاق به عوامل دیگری همچون میزان حساسیت حیوانات، میزان تماس و دوز عفونی آنها دارد. ولی با توجه به اولین ردیابی گونه های بروسلا در گونه مریونس و شناسایی *B. abortus* در گونه *Mus musculus domesticus* اینکه چه گونه های دیگری از جوندگان، چگونه و کجا توسط گونه های بروسلا آلوده می شوند می تواند بر دانش ما در زمینه شناسایی بیماری های منتقله از جوندگان و کنترل مناسب تر آنها بیفزاید.

REFERENCES

- [1] Scholz H, Vergnaud G. Molecular characterisation of Brucella species. Rev Sci Tech. 2013;32:149-62.
- [2] Waldrop SG, Sriranganathan N. Intracellular invasion and survival of Brucella neotomae, another possible zoonotic Brucella species. PloS one. 2019;14:e0213601.
- [3] Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. Croatian medical journal. 2010;51:296-305.
- [4] Sánchez-Sarmiento AM, Carvalho VL, Díaz-Delgado J, Ressio RA, Fernandes NC, Guerra JM, et al. Molecular, serological, pathological, immunohistochemical and microbiological investigation of Brucella spp. in marine mammals of Brazil reveals new cetacean hosts. Transboundary and emerging diseases. 2019.
- [5] Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, Tomaso H, Vergnaud G, Le Flèche P, et al. Isolation of Brucella microti from soil. Emerging infectious diseases. 2008;14:1316.
- [6] Khazaei S, Karami M, Mohammadbeigi A, Ayubi E, Shojaeian M, Mansouri K, et al. Spatio-Temporal analysis of brucellosis in Hamadan Province, West of Iran: 2009–2015. Advances in Human Biology. 2018;8:145.
- [7] Wilson DE, Lacher TE, Mittermeier RA. Handbook of the Mammals of the World: Rodents II: Lynx Edicions; 2017.
- [8] Bordes F, Blasdell K, Morand S. Transmission ecology of rodent-borne diseases: New frontiers. Integrative zoology. 2015;10:424-35.

- [9] Godfroid J. Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique-Office international des épizooties*. 2002;21:277-86.
- [10] Tiller RV, Gee JE, Frace MA, Taylor TK, Setubal JC, Hoffmaster AR, et al. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76:5837-45.
- [11] Truong QL, Seo TW, Yoon B-I, Kim H-C, Han JH, Hahn T-W. Prevalence of swine viral and bacterial pathogens in rodents and stray cats captured around pig farms in Korea. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2013:12-0568.
- [12] Zheludkov M, Tsirelson L. Reservoirs of *Brucella* infection in nature. *Biology bulletin*. 2010;37:709-15.
- [13] Hammerl J, Ulrich R, Imholt C, Scholz H, Jacob J, Kratzmann N, et al. Molecular Survey on Brucellosis in Rodents and Shrews–Natural Reservoirs of Novel *Brucella* Species in Germany? *Transboundary and emerging diseases*. 2017;64:663-71.
- [14] نظام مراقبت تب مالت در جمهوری اسلامی ایران: رحمانی, خالد, زینعلی, مرادی, قباد, واحدی
تاریخچه، ساختارها و فرایندها. *مجله تخصصی اپیدمیولوژی ایران*. ۲۰۱۹;۱۵:۱۹۵-۲۰۳.
- [15] Al Dahouk S, Nöckler K, Tomaso H, Splettstoesser W, Jungersen G, Riber U, et al. Seroprevalence of brucellosis, tularemia, and yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from north-eastern Germany. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 2005;52:444-55.
- [16] Kassiri H, Amani H, Lotfi M. Epidemiological, laboratory, diagnostic and public health aspects of human brucellosis in western Iran. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2013;3:589-94.
- [17] Darvish J, Mohammadi Z, Mahmoudi A, Siahsarvie R. Faunistic and taxonomic study of Rodents from northwestern Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics (IJAB)*. 2014;10:119-36.
- [18] Hemati M, Khalili M, Rohani M, Sadeghi B, Esmaeili S, Ghasemi A, et al. A serological and molecular study on *Francisella tularensis* in rodents from Hamadan province, Western Iran. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2020;68:101379.
- [19] Esamaeili S, Azadmanesh K, Naddaf SR, Rajerison M, Carniel E, Mostafavi E. Serologic survey of plague in animals, Western Iran. *Emerging infectious diseases*. 2013;19:1549.
- [20] Hinić V, Brodard I, Thomann A, Cvetnić Ž, Makaya P, Frey J, et al. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *Journal of microbiological methods*. 2008;75:375-8.
- [21] Thorpe BD, Sidwell R, Bushman J, Smart K, Moyes R. BRUCELLOSIS IN WILDLIFE AND LIVESTOCK OF WEST CENTRAL UTAH. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1965;146:225-32.
- [22] Williams ES, Barker IK. *Infectious diseases of wild mammals*: John Wiley & Sons; 2008.
- [23] Corey RR, Paulissen LJ, Swartz D. Prevalence of brucellae in the wildlife of Arkansas: *Microcard*; 1964.
- [24] Nielsen K. *Animal brucellosis*: CRC press; 2018.
- [25] Khaghani R. The economic and health impact of rodent in urban zone and harbours and their control methods. 2007.
- [26] Salahi-Moghaddam A, Khoshdel A, Hanafi-Bojd A-A, Sedaghat M-M. Mapping and review of leishmaniasis, its vectors and main reservoirs in Iran. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*. 2015;22:83-104.

- [27] Eisenberg T, Hamann H-P, Kaim U, Schlez K, Seeger H, Schauerte N, et al. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:3753-5.
- [28] Etemadi A, Moniri R, Saffari M, Akbari H, Alamian S, Behrozikhah AM. Epidemiological, molecular characterization and risk factors of human brucellosis in Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 2020;13:169.
- [29] Gharekhani J, Barati E, Doulatshahi EA, Talaei M, Rasouli MR. *Brucella* Infection in Horses From Hamedan Province, Iran. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection.* 2020;7:60-2.
- [30] Zowghi E, Ebadi A. Typing of *Brucella* strains isolated in Iran. *Archives of Razi Institute.* 1982;33:109-14.
- [31] Jiménez de Bagüés MP, Ouahrani-Bettache S, Quintana JF, Mitjana O, Hanna N, Bessoles S, et al. The new species *Brucella microti* replicates in macrophages and causes death in murine models of infection. *The Journal of infectious diseases.* 2010;202:3-10.
- [32] Cvetnić Ž, Tončić J, Špičić S, Lojkić M, Terzić S, Jemeršić L, et al. Brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in the Republic of Croatia. *Veterinarni Medicina.* 2004;49:115-22.
- [33] Hubálek Z, Scholz H, Sedláček I, Melzer F, Sanogo Y, Nesvadbová J. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2007;7:679-88.
- [34] Hinić V, Brodard I, Thomann A, Holub M, Miserez R, Abril C. IS 711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. *BMC veterinary research.* 2009;5:22.
- [35] Truong LQ, Kim JT, YOON BI, Her M, Jung SC, Hahn T-W. Epidemiological survey for *Brucella* in wildlife and stray dogs, a cat and rodents captured on farms. *Journal of Veterinary Medical Science.* 2011;1108020592-.
- [36] Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, García-Cantú J, López-Merino A, Martínez-Soriano JP. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. *Veterinary Microbiology.* 2000;75:91-7.
- [37] Tittarelli M, Di MV, De FM, Petrini A, Giovannini A, Nannini D, et al. Kinetics of the antibody response in ewes experimentally infected with *Brucella melitensis* biovar 3. *Veterinaria italiana.* 2004;40:5-10.
- [38] Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *The Lancet infectious diseases.* 2006;6:91-9.
- [39] Godfroid J, Cloeckart A, Liautard J-P, Kohler S, Fretin D, Walravens K, et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary research.* 2005;36:313-26.

بررسی مولکولی و سرولوژی ریکتزیا کونوری در بیماران ارجاعی مشکوک به تب خونریزی دهنده کریمه-کنگو

خلاصه

باکتری *Rickettsia conorii* عامل یک بیماری منتقله از راه کنه به نام تب خالدار مدیترانه ای (MSF) است. از آنجایی که یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی MSF غیراختصاصی است، ممکن است منجر به تشخیص اشتباه با سندرم‌های همراه با تب، بثورات پوستی و ترومبوسیتوپنی مانند تب خونریزی‌دهنده کریمه کنگو (CCHF) شود. با پیشرفت روش‌های تشخیصی، موارد شناسایی شده MSF در دهه‌های اخیر افزایش سریعی داشته است. با این حال، مطالعات کمی در مورد بیماری‌های ریکتزیزوز در ایران مشاهده می‌شود. مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان بروز عفونت *R. conorii* در بیماران مشکوک به CCHF مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع ملی آربوویروس‌ها و تب خونریزی دهنده انستیتو پاستور ایران طی سال‌های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹ انجام شد. ۲۶۰ سرم مشکوک به CCHF که در نهایت منفی بودند، از نظر وجود آنتی بادی‌های Igm علیه *R. conorii* با استفاده از روش الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این، از روش TaqMan Real-Time-PCR برای تشخیص ژن *16S rRNA* در *Rickettsia spp* استفاده شد. در نهایت، برای تعیین گونه و زیرگونه در نمونه‌های مثبت مولکولی، از روش PCR با تکثیر ژن‌های *ompA*، *gltA* و *17KD* استفاده شد. در مطالعه حاضر، ۳۸ بیمار (۱۴.۶۲٪) با استفاده از تست سرولوژی اختصاصی *R. conorii* مثبت بودند و در ۴۸.۸۳٪ بیماران *R. conorii* مثبت، تبدیل سرمی (از حالت منفی به مثبت) با افزایش چهار برابری آنتی بادی مشاهده شد. اما، *Rickettsia spp* تنها در ۳ نمونه (۱.۱۵٪) با استفاده از آزمایش مولکولی تشخیص داده شد که با آنالیز سکانس ژن و روش‌های فیلوژنتیکی به عنوان *R. conorii* subsp. *israelensis*، *R. conorii* subsp. *conorii* و *R. helvetica* طبقه بندی شدند. در مطالعه حاضر، بین موارد مثبت *R. conorii* و برخی ویژگی‌ها از جمله ملیت، محل زندگی و تماس با حیوانات رابطه وجود داشت. به طوریکه *R. conorii* به طور معنی داری ($P \leq 0.05$) بیشتر در در افرادی که افغان (نسبت به ملیت ایرانی)، ساکن مناطق روستایی و دارای سابقه گزش بوسیله کنه بودند، شناسایی شد. در نتیجه، MSF می‌تواند یک بیماری شایع در ایران باشد و بیمارانی که CCHF فرض می‌شود ممکن است مشکوک به MSF نیز باشند. بنابراین، پزشکان باید از وجود MSF در ایران آگاه باشند و آن را در تشخیص افتراقی با سایر سندرم‌های تب دار مد نظر قرار دهند.

روشها و مواد به کار گرفته شده

در مطالعه حاضر، نمونه‌ها از میان ۱۵۶۵ بیمار مشکوک به CCHF که از اسفند ۱۳۹۷ تا شهریور ۱۳۹۹ از مناطق مختلف ایران به آزمایشگاه مرجع ملی آربوویروس‌ها و تب‌های خونریزی‌دهنده ویروسی در انستیتو پاستور ایران ارجاع داده شده بودند، انتخاب شدند. داده‌های دموگرافیک، بالینی و آزمایشگاهی این بیماران از داده‌های ثبت شده موجود در آزمایشگاه مرجع ملی آربوویروس‌ها و تب‌های هموراژیک ویروسی جمع‌آوری شد. بر اساس این داده‌ها، بیمارانی که در نهایت CCHF منفی گزارش شده بودند و دارای ویژگی‌های مشکوک به MSF بودند، برای مطالعه حاضر انتخاب شدند. ویژگی‌های زیر به عنوان ویژگی‌های مشکوک به MSF برای انتخاب بیمار در نظر گرفته شد. ۱. داشتن علائم بالینی تب، بثورات پوستی، اسکار در محل گزش. ۲. شواهد اپیدمیولوژیک شامل

توزیع جغرافیایی متفاوت، سابقه گزش با کنه و تماس با حیوانات. ۳. یافته های آزمایشگاهی مانند لکوپنی، ترومبوسیتوپنی، افزایش آنزیم های ترانس آمیناز. در نهایت بر اساس این داده ها، در مجموع ۲۶۰ نمونه سرم انتخاب شد.

کمیته اخلاق انسانی انستیتو پاستور ایران این پروژه را بر اساس استانداردهای ملی و بین المللی با شماره کد اخلاق IR.PII.REC.1399.058 تایید کرده است.

2- تست سرولوژی الایزا

برای بررسی وجود آنتی بادی های Igm علیه R. conorii، تمام ۲۶۰ نمونه سرم با روش الایزا با استفاده از کیت (RICKETTSIA CONORII ELISA IgG / Igm شرکت Vircell، اسپانیا) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، مورد آزمایش قرار گرفتند.

3- استخراج DNA و TaqMan Rael-Time-PCR

DNA ژنومی ۲۶۰ نمونه سرم با استفاده از کیت تجاری (شرکت ویراژن ایران) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. تمام نمونه های DNA استخراج شده با استفاده از روش TaqMan Rael-Time-PCR برای شناسایی گونه های Rickettsia مورد بررسی قرار گرفتند. ژن ۱۶ rRNA در Rickettsia spp توسط پرایمر فوروارد (۵'-CGCAACCCTYATTCTTATTG-3')، پرایمر ریورس (۵'-CCTCTGTAACACCATTGTAGCA-3')، پروب (۶-FAM-x Master RaelQ Plus (Ampliqon ۲ و TAAGAAACTGCCGGTGATAAGCCGGAG-TAMRA) (Co., Denmark) انجام شد. ژنومی R. Conorii شرکت Vircell، اسپانیا) و آب مقطر به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد. تجزیه و تحلیل کمی نتایج با استفاده از نرم افزار Qiagen Co., Rotor-Gene Q® Q 2.3.5 (Germany) انجام شد.

4- بررسی گونه و زیرگونه به روش PCR و آنالیز فیلوژنتیک

شناسایی زیرگونه Rickettsia و آنالیز فیلوژنتیکی نمونه های ۱۶ rRNA مثبت، با تکثیر ژن های gItA، ompA و ۱۷ KD با استفاده از روش PCR انجام شد. پرایمرهای توصیف شده قبلی (۱) در مخلوط های واکنش PCR استفاده شد. در نهایت محصولات PCR برای تعیین توالی به روش سنجر به شرکت ژنومیک ارسال شد. سپس آنالیز داده های سکانس با استفاده از نرم افزارهای (Sea view نسخه ۴) و (Mega نسخه X) انجام شد.

5- تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۳) استفاده شد. میانگین \pm انحراف معیار (SD) برای متغیرهای کمی و کیفی محاسبه شد. برای تحلیل تک متغیره از رگرسیون لجستیک استفاده شد. مقدار $P \leq 0.05$ به عنوان یک تفاوت آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج بدست آمده

1- مشخصات دموگرافیک، بالینی و آزمایشگاهی نمونه ها

در این مطالعه، ۲۶۰ نمونه سرم CCHF منفی (۷۵.۸٪ مرد و ۲۴.۲٪ زن) برای مطالعه حاضر انتخاب شدند (جدول ۱). میانگین سن افراد ۴۴/۰۲ سال بود. نزدیک به ۹۸ درصد (۲۵۴ نفر) ملیت ایرانی و بقیه بیماران (۶ نفر) افغان بودند.

نمونه ها از ۲۶ استان مختلف ایران جمع آوری شد (جدول ۲). بیشترین نمونه ها از استان های خراسان رضوی (۴۹ مورد)، کرمان (۴۹ مورد)، سیستان و بلوچستان (۳۰ مورد) و مازندران (۲۷ مورد) جمع آوری شد. کمترین نمونه مربوط به استان های قم، کهگیلویه و بویراحمد، خوزستان، خراسان شمالی، همدان و قزوین با یک مورد در هر استان بود. از ۲۶۰ بیمار، ۱۰۴ نفر ساکن مناطق روستایی بودند. سابقه تماس با حیوانات و گزش کنه به ترتیب در ۱۶۶ و ۷۳ بیمار مشاهده شد. علاوه بر نمونه سرم اول، نمونه سرم دوم برای ۹۷ بیمار (از ۲۶۰ بیمار) در دسترس بود. این نمونه ها نیز در این مطالعه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

2- تشخیص R. conorii با استفاده از روش سرولوژی

از ۲۶۰ بیمار، ۳۸ مورد (۱۴.۶۲٪) دارای آنتی بادی IgM R. conorii با استفاده از روش الیزا بودند. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، موارد مثبت در ملیت ایرانی بوطر معناداری (P = ۰/۰۴) کمتر از موارد مثبت در ملیت افغانی بود (OR: 0.16, 95% CI: 0.03-0.82). در افرادی که در روستا زندگی می کردند به طور معنی داری بیشتر از افرادی بود که ساکن مناطق شهری بودند (OR: 2.09, 95% CI: 1.004-4.35). علاوه بر این، بین سابقه گزش کنه و مثبت بودن R. conorii رابطه معنی داری (P > ۰/۰۰۱) وجود داشت (OR: 3.54, 95% CI: 1.75-7.19).

بین سایر ویژگی ها و موارد مثبت رابطه معنی داری وجود نداشت (جدول ۱).

از ۳۸ بیمار مثبت، نمونه سرم دوم (با حداقل فواصل ۳ روزه) برای ۲۴ بیمار در دسترس بود. شواهدی از تبدیل سرمی همراه با افزایش چهار برابری تیتراژ آنتی بادی IgM R. conorii در ۴۵/۸۳ درصد از این ۲۴ بیمار مشاهده شد (جدول ۳).

3- شناسایی مولکولی R. conorii

از ۲۶۰ نمونه، ۳ مورد (۱.۱۵٪) از نظر گونه های ریکتزیا مثبت بودند. پس از تعیین زیرگونه Rickettsia، نمونه ها به عنوان R. conorii subsp. conorii، R. conorii subsp. israelensis و R. Helvetica شناسایی شدند. آنالیز فیلوژنتیکی نمونه های مولکولی مثبت در این مطالعه در شکل ۲ نشان داده شده است.

هر دو نمونه مثبت R. conorii برای آنتی بادی IgM R. conorii نیز مثبت بودند. اما برای آنتی بادی IgM R. helvetica برای آنتی بادی R. conorii منفی بود. این نشان از عدم واکنش متقاطع تست الیزا در مطالعه حاضر دارد.

جدول ۱. مشخصات دموگرافیک، بالینی و آزمایشگاهی بیماران منتخب برای مطالعه حاضر.

Variables	Subgroup	Rickettsia test result	P value	OR (95% CI)
-----------	----------	------------------------	---------	-------------

		N of Neg (%)	N of Pos (%)		
Gender	Female	54 (85.7)	9 (14.3)	0.93	1.04 (0.46-2.32)
	Male	168 (85.3)	29 (14.7)		
Nation	Afghan	3 (50.0)	3 (50.0)	0.04	0.16 (0.03-0.82)
	Iranian	219 (86.2)	35 (13.8)		
Living place	Town	108 (89.3)	13 (10.7)	0.05	2.09 (1.004-4.35)
	Village	113 (81.3)	39 (18.7)		
Contact with animals	No	85 (90.4)	9 (9.6)	0.08	2.00 (0.90-4.23)
	Yes	137 (82.5)	29 (17.5)		
Tick bite/ Tick contact	No	169 (90.4)	18 (9.6)	<0.001	3.54 (1.75-7.19)
	Yes	53 (72.6)	20 (27.4)		
Travelling	No	213 (85.5)	36 (14.5)	0.67	1.32 (0.27-6.34)
	Yes	9 (81.8)	2 (18.2)		
Fever	No	22 (88.0)	3 (12.0)	0.99	1.33 (0.38-4.67)
	Yes	200 (85.1)	35 (14.9)		
Anorexia	No	184 (86.8)	28 (13.2)	0.18	1.73 (0.76-3.86)
	Yes	38 (79.2)	10 (20.8)		
Headache	No	134 (87.6)	19 (12.4)	0.23	1.52 (0.76-3.04)
	Yes	88 (82.2)	19 (17.8)		
Asthenia	No	163 (86.2)	26 (13.8)	0.52	1.28 (0.61-2.67)
	Yes	59 (83.1)	12 (16.9)		
Cough	No	220 (85.6)	37 (14.4)	0.38	2.97 (0.26-33.26)
	Yes	2 (66.7)	1 (33.3)		
Myalgia	No	134 (85.4)	23 (14.6)	0.99	0.99 (0.49-2.01)
	Yes	88 (85.4)	15 (14.6)		
Icterus	No	218(85.2)	38 (14.8)	0.99	-
	Yes	4 (100.0)	0 (0.0)		
Abdominal pain	No	191 (84.1)	36 (15.9)	0.19	0.34 (0.08-1.49)
	Yes	31 (93.9)	2 (6.1)		
Nausea	No	184 (85.6)	31 (14.4)	0.84	1.09 (0.45-2.7)
	Yes	38 (84.4)	7 (15.6)		
Hemorrhage	No	194 (86.2)	31 (13.8)	0.33	1.57 (0.63-3.89)
	Yes	28 (80.0)	7 (20.0)		
Epistaxis	No	216 (85.0)	38 (15.0)	0.60	-
	Yes	6 (100.0)	0 (0.0)		
Hematuria	No	199(86.5)	31 (13.5)	0.17	1.95 (0.77- 4.94)
	Yes	23 (76.7)	7 (23.3)		
petechiae	No	202 (86.7)	31 (13.3)	0.08	2.28 (0.89-5.84)
	Yes	20 (74.1)	7 (25.9)		
Melena	No	216 (85.4)	37 (14.6)	0.99	0.97 (0.11-8.32)
	Yes	6 (85.7)	1 (14.3)		
Diarrhea	No	211(85.4)	36 (14.6)	0.99	1.07 (0.23-5.01)
	Yes	11 (84.6)	2 (15.4)		
Chill	No	187 (85.4)	32 (14.6)	0.99	1.01(0.39-2.57)
	Yes	35 (85.4)	6 (14.6)		
Unconsciousness	No	200 (84.7)	36 (15.3)	0.55	0.51 (0.11-2.24)
	Yes	22 (91.7)	2 (8.3)		
Convulsion	No	214 (85.3)	37 (14.7)	0.99	0.72 (0.09-5.95)
	Yes	8 (88.9)	1 (11.1)		
Hemoglobin concentration	Decreased	29 (93.5)	2 (6.5)	0.28	2.71 (0.62-11.84)
	Normal	193(84.3)	36 (15.7)		
Thrombocytopenia	No	9 (90.0)	1 (10.0)	0.99	1.56 (0.19-12.72)
	Yes	196 (85.2)	34 (14.8)		
Leucopenia	No	76 (86.4)	12 (13.6)	0.96	0.97 (0.40-2.40)
	Yes	65 (86.7)	10 (13.3)		
Leukocytosis	No	107 (85.6)	18 (14.4)	0.54	0.70 (0.22-2.21)
	Yes	34 (89.5)	4 (10.5)		
Proteinuria	No	8 (88.9)	1 (11.1)	0.99	-
	Yea	7(100.0)	0 (0.0)		
PT	Increase	21 (95.5)	1 (4.5)	0.99	1.612 (0.16-16.51)
	Normal	39 (92.9)	3 (7.1)		
PTT	Increase	25 (89.3)	3 (10.7)	0.99	0.78 (0.15-4.21)
	Normal	32 (91.4)	3 (8.6)		
SGOT	Increase	43 (81.1)	10 (18.9)	0.59	-
	Normal	6 (100.0)	0 (0.0)		
SGPT	Increase	43 (81.1)	10 (18.9)	0.58	-
	Normal	6 (100.0)	0 (0.0)		

جدول ۲. توزیع جغرافیایی موارد مثبت MSF در مطالعه حاضر

Province	No. of patients	No. of positive MSF cases (%)
----------	-----------------	-------------------------------

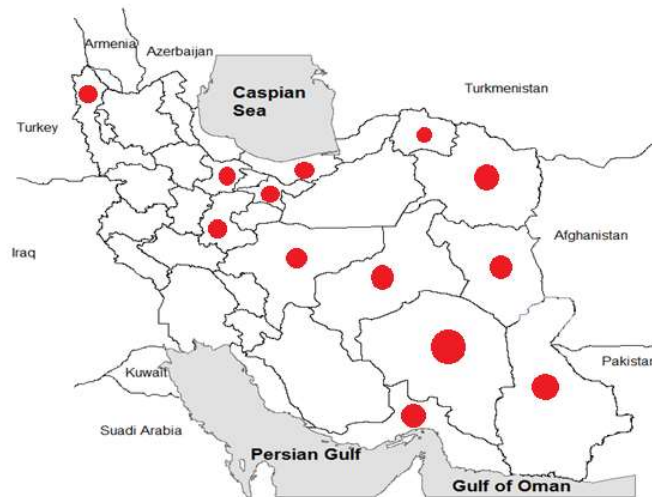
Razavi Khorasan	49	6 (12.24)
Kerman	49	17 (34.69)
Sistan and Baluchestan	30	3 (10)
Mazandaran	27	2 (7.41)
Yazd	16	1 (6.25)
Tehran	14	1 (7.14)
Golestan	12	0 (0)
Ardabil	11	0 (0)
Gilan	8	0 (0)
South Khorasan	6	1 (16.67)
Hormozgan	5	3 (60)
Kermanshah	5	0 (0)
Isfahan	4	1 (25)
Chaharmahal and Bakhtiari	4	0 (0)
Fars	4	0 (0)
Markazi	4	1 (25)
Alborz	2	0 (0)
Zanjan	2	0 (0)
West-Azerbaijan	2	1 (50)
North Khorasan	1	1 (100)
Qazvin	1	1* (100)
Qom	1	0 (0)
Khuzestan	1	0 (0)
Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad	1	0 (0)
Hamedan	1	0 (0)
Total	260	39 (15)**

**R. helvetica*

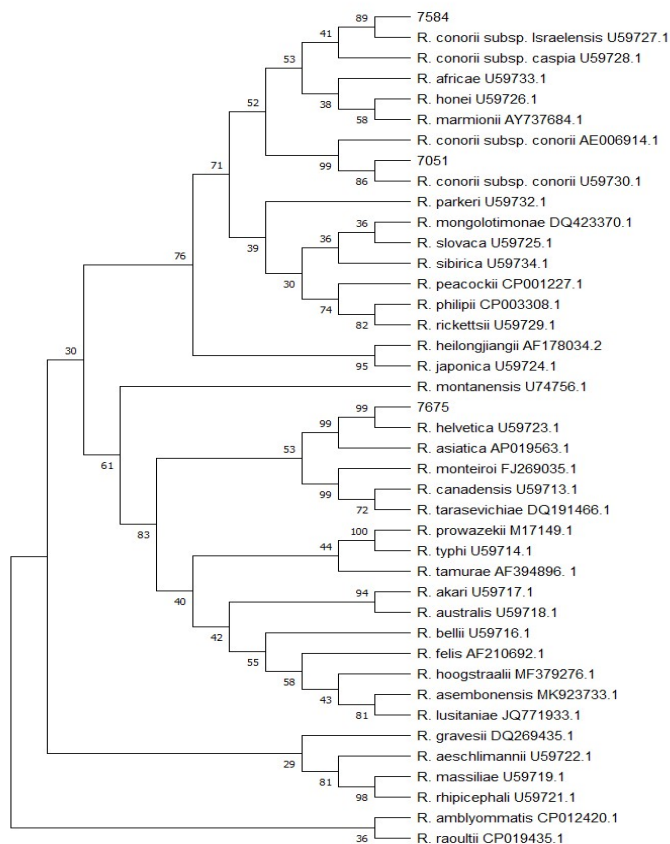
**One sample was *R. helvetica* that cause a tick-born and febrile disease similar to MSF.

جدول ۳. تغییرات سرولوژیکی در تیتراژ آنتی بادی *R. conorii* IgM در ۲ سرم (حداقل فواصل ۳ روز) از ۲۴ بیمار *R. conorii* مثبت به دست آمد.

Serological criteria	No. of patients with increased <i>R. conorii</i> IgM antibody titers (%)
Seroconversion with fourfold increase in 2 sera	11 (45.83)
Seroconversion	14 (58.33)
≥ 4-fold increased <i>R. conorii</i> IgM antibody titers	12 (50)
≥ 3-4-fold increased <i>R. conorii</i> IgM antibody titers	3 (12.5)
≥ 2-3-fold increased <i>R. conorii</i> IgM antibody titers	5 (20.83)
Intangible increase	4 (16.67)



شکل ۱. استان های دارای موارد مثبت در این مطالعه.



شکل ۱. آنالیز فیلوژنتیکی نمونه های مولکولی مثبت در این مطالعه بر اساس قسمتی از توالی ژن *gltA*. نمونه های ۷۵۸۴، ۷۰۵۱، و ۷۶۷۵ به ترتیب به عنوان *R. conorii* subsp. *israelensis*، *R. conorii* subsp. *conorii* و *R. helvetica* شناسایی شدند.

R. conorii برای اولین بار در سال ۱۹۳۲ شناسایی شد و به عنوان بومی مناطق مدیترانه شناسایی شد. با این حال، موارد پراکنده MSF در مکان های غیربومی در اروپا و آفریقا یافت شده است. علاوه بر این، مواردی توسط سفرهای بین المللی در ایالات متحده و شمال اروپا گزارش شده است (۲). بنابراین، *R. conorii* عامل MSF به احتمال زیاد در حال گسترش می باشد (۳). مطالعات محدودی در مورد شیوع ریکتزیا در ایران وجود دارد. به دلیل تشخیص نادرست MSF با CCHF، مطالعه حاضر ویژگی های اپیدمیولوژیک MSF را در میان بیماران مشکوک به CCHF توصیف کرد، بطوریکه ۱۴/۶۲٪ مورد مثبت سرمی برای *R. conorii* در بین این بیماران گزارش کرد. بیماری های MSF و CCHF معمولاً از طریق نیش کنه یا تماس با حیوانات آلوده منتقل می شوند و ممکن است علائم بالینی، یافته های آزمایشگاهی و ویژگی های اپیدمیولوژیک مشابهی داشته باشند MSF. توسط باکتری *R. conorii* ایجاد می شود، در حالی که CCHF یک بیماری ویروسی است. بنابراین، تشخیص افتراقی در درمان اولیه بیماری MSF مهم است. در یونان در سال ۲۰۰۸، یک مورد MSF به دلیل تشخیص اشتباه به عنوان CCHF و در نتیجه درمان نامناسب دچار مرگ شد (۴). بنابراین، این شباهت ها ممکن است منجر به تشخیص نادرست، به ویژه در بیماران مبتلا به تب، بثورات پوستی، ترومبوسیتوپنی و با یا بدون اسکار شود (۴، ۵). در مطالعه حاضر پتشی (یکی از علائم CCHF) نیز در بیماران (90/25%) MSF بیشتر از بیماران *R. conorii* منفی (۱۳/۳٪) بود. در یک بررسی در یک منطقه بومی برای CCHF در آلبانی، ۲/۹٪ ریکتزیز و ۲۹/۴٪ لپتوسپیروز در میان بیماران مشکوک به CCHF شناسایی شد (۶). علاوه بر این، وقوع همزمان MSF و CCHF توسط Gunes و همکارانش گزارش شده است. در یک منطقه بومی برای CCHF در ترکیه (۵)، نشان داده شد که شیوع سرمی *R. conorii* در بیماران (32/52%) CCHF بیشتر از CCHF منفی (۲۵/۸۲٪) بود. در اولین مطالعه در ایران در سال ۱۹۹۶، شیوع بالای سرمی ریکتزیاهاى گروه SFG توسط تست های ELISA (45%) و IFA (50/27%) گزارش شد (۷). اخیراً پنج بیمار MSF با استفاده از تست IFA در استان کرمان در ایران تایید شدند (۸). علاوه بر این، *Rickettsia spp* با آزمایش های مولکولی روی کنه ها و کک های انسانی در استان های آذربایجان شرقی، لرستان و زنجان (۹-۱۲) تایید شد. در آن مطالعات، *R. slovacica* و *R. hoogstraalii* در کنه *Dermacentor marfinatus* جمع آوری شده از گوسفند، و کنه های *Argas persicus*، شناسایی شدند. همچنین در یک بررسی بین پنج منطقه مختلف ایران، گونه های مختلف *Rickettsia* از جمله *R. slovacica*، *R. raoultii*، *R. heilongjiangensis*، *R. helvetica*، *monacensis* در ۲/۲٪ از نمونه های خون جدا شده از سگ با استفاده از PCR شناسایی شد. موارد مثبت مربوط به استان اهواز بود (۱۳).

در بین کشورهای اروپایی، ایتالیا (به ویژه در سیسیل)، اسپانیا، پرتغال و جنوب فرانسه دارای شیوع نسبتاً بالایی از *R. conorii* هستند (۱۴) MSF. (همچنین یک بیماری شایع در ترکیه است (۱۵). از آنجایی که این کشور در همسایگی ایران قرار دارد، *R. conorii* باید در ایران نیز مورد توجه بیشتری قرار گیرد. در یک مطالعه در ترکیه، ۷۷ درصد از بیماران در ۲ سرم جمع آوری شده با استفاده از تست IFA در یک بازه زمانی ۲ هفته ای، چهار برابر افزایش آنتی بادی *R. conorii* داشتند. آنها پیشنهاد کردند که تشخیص مولکولی ریکتزیا در بیوپسی پوست یک روش سریع و پیشرفته است. به طوری که ۷۳ درصد نمونه های بیوپسی پوست با استفاده از PCR برای ژن های ompA و gltA مثبت شدند (۱۵). در مطالعه حاضر، در ۳ نمونه سرم (۱/۱۵٪) با استفاده از روش مولکولی جنس ریکتزیا گزارش شد. با استفاده از روش PCR subtyping، 2 مورد به عنوان عامل *R. conorii subsp. MSF* (*R. conorii subsp. israelensis*) و یک مورد به عنوان *R. helvetica* شناسایی شد *R. helvetica*. نیز در گروه ریکتزیاهاى SFG یا تب های خالدار طبقه بندی می شود (۱۶). بنابراین پیشنهاد می شود علاوه بر MSF، نظام سلامت از

شیوع سایر SFG ها نیز در ایران آگاه باشد. در مطالعه حاضر، تفاوت بین نتایج سرولوژیکی و مولکولی به دلیل نوع نمونه (سرم) مورد استفاده در تشخیص مولکولی است. در مطالعات قبلی مشخص شد که نمونه‌های مناسب برای آزمایش‌های مولکولی بیوپسی پوست (از اسکار) و گاهی خون (۱۷) است. دلایل زیر تایید کرد که نمونه‌های سرم نمونه‌های مناسبی برای تشخیص مولکولی *R. conorii* نیستند: ۱. باکتری در بیماری ریکتزایی طولانی مدت و پایدار نیست. ۲. از آنجایی که نمونه خون برای جداسازی سرم سانتریفیوژ می‌شوند، باکتری می‌تواند در لخته گیر کند و در نتیجه در سرم جدا شده قابل تشخیص نیست.

برخی از عوامل مانند سن، جنسیت و شغل ممکن است با شیوع بالاتر عفونت ریکتزی مرتبط باشند (۳). در بررسی حاضر در ایران، MSF در مهاجران افغانستانی (۵۰٪) بیشتر از بیماران با ملیت ایرانی (۱۳/۸۰٪) بود. مطالعات سرواپیدمیولوژیک در اروپا و کشورهای مدیترانه ای نشان داده است که بروز *R. conorii* در افرادی که در مناطق روستایی زندگی می‌کنند (۶۰-۱۰ درصد) بیشتر از شهرها (۲-۳۰ درصد) است (۵). مشابه مطالعات قبلی، ساکنان روستا در مطالعه حاضر به طور قابل توجهی بیشتر از ساکنان مناطق شهری عفونی بودند (۱۸/۱۷٪ در مقابل ۱۰/۷٪). تماس بیشتر افراد با کنه ها و حیوانات حامل کنه در مناطق روستایی نسبت به شهرها می‌تواند دلیل این تفاوت ها باشد. همچنین در مطالعه حاضر، موارد MSF به طور معنی داری (۰/۰۰۱ > P) با سابقه گزش کنه مرتبط بود. سابقه تماس با حیوانات نیز در موارد MSF مثبت بیشتر مشاهده شد، اگرچه این تفاوت معنی دار نبود (۰/۰۸ = P).

در نتیجه، داده‌های ما تأیید می‌کند که MSF می‌تواند یک مشکل بهداشتی مهم در ایران باشد که از دید پزشکان و آزمایشگاه‌ها دور است. بنابراین عدم انجام مطالعات MSF در ایران نشان دهنده عدم وجود این بیماری در کشور نیست. این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که بیماران که به عنوان CCHF مشکوک در نظر گرفته می‌شوند، به دلیل مشابهت علائم احتمالاً می‌توانند به *R. conorii* نیز مشکوک باشند. در نهایت پیشنهاد می‌شود که پزشکان و آزمایشگاه‌ها از وجود MSF و احتمالاً سایر بیماری‌های ریکتزایی در ایران آگاه باشند. بنابراین، برای تعیین بهتر میزبان و مخزن، بیماری زایی و شیوع دقیق MSF در ایران، مطالعاتی بر روی میکروارگانیسم‌های عامل این بیماری باید در میان طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها انجام شود.

منابع

1. Labruna MB, McBride JW, Bouyer DH, Camargo LMA, Camargo EP, Walker DH. Molecular evidence for a spotted fever group Rickettsia species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. *Journal of medical entomology*. 2004;41(3):533-7
2. Jensenius M, Fournier P-E, Raoult D. Tick-borne rickettsioses in international travellers. *International journal of infectious diseases*. 2004;8(3):139-46
3. bdad MY, Abou Abdallah R, Fournier P-E, Stenos J, Vasoo S. A concise review of the epidemiology and diagnostics of rickettsioses: *Rickettsia* and *Orientia* spp. *Journal of clinical microbiology*. 2018;56(8):e01728-17
4. Papa A, Dalla V, Petala A, Maltezou H, Maltezos E. Fatal Mediterranean spotted fever in Greece. *Clinical microbiology and infection*. 2010;16(6):589-92

- Güneş T, Poyraz Ö, Ataş M, Turgut NH. The seroprevalence of *Rickettsia conorii* in humans living in villages of Tokat Province in Turkey, where Crimean-Congo hemorrhagic fever virus is endemic, and epidemiological similarities of both infectious agents. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2012;42(3):441-8
- Papa A, Bino S, Papadimitriou E, Velo E, Dhimolea M, Antoniadis A. Suspected Crimean Congo haemorrhagic fever cases in Albania. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2008;40(11-12):978-80
- Kováčová E, Sixl W, Stünzner D, Ürvögyi J, Kazár J. Serological examination of human and animal sera from six countries of three continents for the presence of rickettsial antibodies. *European journal of epidemiology*. 1996;12(1):85-9
- Farrokhnia M, Ghalejoogh ZY, Rohani M, Ghasemi A, Esmaeili S, Mostafavi E. Cases of Mediterranean spotted fever in southeast of Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 2020;12(3):256
- Hosseini-Chegeni A, Tavakoli M, Telmadarraiy Z, Faghihi F. Molecular Detection of Spotted Fever Group *Rickettsia* (*Rickettsiales: Rickettsiaceae*) in Ticks of Iran. *Archives of Razi Institute*. 2020;75(3):317
- Kooshki H, Goudarzi G, Faghihi F, Telmadarraiy Z, Edalat H, Hosseini-Chegeni A. The first record of *Rickettsia hoogstraalii* (*Rickettsiales: Rickettsiaceae*) from *Argas persicus* (*Acari: Argasidae*) in Iran. *Systematic and Applied Acarology*. 2020;25(9):1611-7
- Nadim A, Khanjani M, Hosseini-Chegeni A, Telmadarraiy Z. Identity and microbial agents related to *Dermacentor marginatus* Sulzer (*Acari: Ixodidae*) with a new record of *Rickettsia slovaca* (*Rickettsiales: Rickettsiaceae*) in Iran. *Systematic and Applied Acarology*. 2021;26(2):367-78
- Ghavami MB, Mirzadeh H, Mohammadi J, Fazaeli A. Molecular survey of ITS1 spacer and *Rickettsia* infection in human flea, *Pulex irritans*. *Parasitology research*. 2018;117(5):1433-42
- Iatta R, Sazmand A, Nguyen V-L, Nemati F, Ayaz MM, Bahiraei Z, et al. Vector-borne pathogens in dogs of different regions of Iran and Pakistan. *Parasitology Research*. 2021:1-10
- Parola P, Socolovschi C, Raoult D. Deciphering the relationships between *Rickettsia conorii conorii* and *Rhipicephalus sanguineus* in the ecology and epidemiology of Mediterranean spotted fever. *Ann NY Acad Sci*. 2009;1166(1):49-54

- Kuloglu F, Rolain JM, Akata F, Eroglu C, Celik AD, Parola P. Mediterranean spotted fever in the Trakya region of Turkey. *Ticks and tick-borne diseases*. 2012;3(5-6):298-304 .15
- Beati L, Péter O, Burgdorfer W, Aeschlimann A, Raoult D. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of rickettsiae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1993;43(3):521-6 .16
- Faccini-Martínez AA, García-Álvarez L, Hidalgo M, Oteo JA. Syndromic classification of rickettsioses: an approach for clinical practice. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014;28:126-39 .17

بررسی شیوع تب کیوی حاد در افراد در معرض خطر با علائم تب و مشکلات تنفسی پنومونی در غرب ایران

خلاصه

مقدمه: تب کیوی یک عفونت مشترک بین انسان و حیوان می باشد. آلودگی انسان به این بیماری بیشتر از طریق استنشاق آئروسول های آلوده ناشی از زایمان، مدفوع و ادرار حیوانات آلوده صورت میگیرد. با توجه به اینکه در غرب ایران دامداری و زندگی نزدیک با دام رایج می باشد هدف از این مطالعه بررسی شیوع تب کیوی حاد در افراد در معرض خطر دارای علائم تب و مشکلات تنفسی در این منطقه بوده است.

روش کار: در این مطالعه (سال ۲۰۱۸-۲۰۲۰)، ۹۶ بیمار دچار پنومونی که دارای علائم مشکوک به تب کیوی حاد داشتند و دارای شواهد اپیدمیولوژیک برای خطر ابتلا به تب کیوی بودند وارد مطالعه شدند. از هر کدام از بیماران دو نمونه سرم مرحله حاد و نقاهت اخذ گردید و آنتی بادی IgG فاز II کوکسیلا بورنتی به روش الایزا کمی مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین کوکسیلا بورنتی در نمونه خون اول بیماران به روش مولکولی Real-time PCR مورد ردیابی قرار گرفت.

نتایج: ۷ بیمار از ۹۶ بیمار (۷/۳ درصد) مبتلا به تب کیوی حاد تشخیص داده شدند که دارای سروکانورژن و افزایش تیتراژ آنتی بادی IgG فاز II بر علیه کوکسیلا بورنتی بودند. همچنین تمامی بیماران مورد بررسی از نظر آلودگی مولکولی به کوکسیلا بورنتی منفی بودند. از طرف دیگر، ۲۲ نفر (۲۴/۷ درصد) از ۸۹ بیمار با نتیجه منفی برای تب کیوی حاد دارای سابقه قبلی مواجهه با کوکسیلا بورنتی بودند. بین نگهداری گوسفند و سابقه مواجهه با کوکسیلا بورنتی ارتباط معنی داری وجود داشت ($P=0.04$).

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان از شیوع تب کیوی حاد در جمعیت انسانی در غرب ایران را دارد و نیازمند رعایت اصول بهداشتی افراد در هنگام تماس با حیوانات و محصولات آنها می باشد

کلمات کلیدی: تب کیوی حاد، کوکسیلا بورنتی، ایران

مقدمه

تب کیوی یک عفونت مشترک بین انسان و حیوان می باشد که توسط باکتری کوکسیلا بورنتی که داخل سلولی می باشد ایجاد می شود (۱، ۲). نشخوار کنندگان اهلی (گاو، بز، گوسفند) بعنوان مخازن اصلی کوکسیلا بورنتی در نظر گرفته می شوند که جز در موارد بسیار محدود که منجر به سقط جنین و ناباروری در این دام می شود، غالباً بدون علامت بالینی این باکتری را شیر، مدفوع، ادرار و محصولات زایمان به محیط دفع می کنند آلودگی انسان به این بیماری بیشتر از طریق استنشاق آئروسول های آلوده به این باکتری رخ می دهد. همچنین تماس مستقیم و مخاطی و همچنین مصرف شیر خام و محصولات لبنی آلوده از راه های کمتر مداول انتقال کوکسیلا بورنتی به انسان است (۳-۵). تب کیوی در بسیاری از کشورها از جمله همسایه های ایران به عنوان یک بیماری بومی مطرح است. تب کیوی یک بیماری شغلی می باشد که بیشتر در دامداران، کارگران کشتارگاه ها، دامپزشکان و در افرادی که با دام و فراورده های دامی سروکار دارند رخ می دهد (۶، ۷).

تب کیوی در انسان عمدتاً به دو فرم تب کیوی حاد و تب کیوی مزمن دیده می شود. تب کیوی حاد عمدتاً یک بیماری تب دار خود محدود شونده و شبه آنفولانزا می باشد که در ۶۰ درصد موارد بدون علامت می باشد اما در بقیه موارد با علائم: تب، لرز، سردرد شدید، سرفه، کاهش وزن، پنومونی آتیپیک، هیپاتیت، درد عضلانی، درد مفاصل، درگیری قلبی، راش های پوستی و علائم عصبی بروز می نماید. در مجموع بیشتر بیماران مبتلا به تب کیوی حاد در عرض چند ماه بدون درمان بهبود می یابند. فقط ۱٪ مبتلایان به فرم حاد بیماری در صورت عدم درمان مناسب فوت می کنند (۸، ۹).

تداوم عفونت کوکسیلا بورنتی در انسان (در موارد حاد و بدون علامت) می تواند منجر به فرم مزمن تب کیو شود. شکل مزمن تب کیو، با عفونت پایدار به مدت ۶ ماه شناخته می شود، این شکل از بیماری غیر معمول ولی بغایت جدی و مخاطره آمیز است. این فرم مزمن ۲۰-۱ سال بعد از ابتلای اولیه ادامه می یابد. عواقب جدی فرم مزمن تب کیو اندوکاردیت است، معمولا دریاچه آئورت قلب و در موارد کمتر دریاچه میترا درگیر می شود. بیمارانی که به فرم حاد بیماری می رسند بیماری قبلی دریاچه قلب و یا سابقه پیوند عروق دارند. در برخی از مطالعات، عفونت کوکسیلا بورنتی شایع ترین علت شناسایی شده در بیماران مبتلا به اندوکاردیت کشت منفی است (۱۰). عفونت عروق، اوستئومیلیت، عفونت پروتز و آنوریسم عروقی، مرده زایی، سقط جنین و هیپاتیت از سایر تظاهرات بالینی تب کیو مزمن در انسان می باشد (۱۱، ۱۲).

بعلت طیف وسیع علایم بالینی در بیماری تب کیو در انسان، تشخیص بالینی این بیماری از طریق نشانه های بالینی بسیار مشکل می باشد. بنابراین در این مورد نیاز ضروری به تایید تشخیص آزمایشگاهی می باشد (۳). تشخیص آزمایشگاهی تب کیو بیشتر بر پایه روش های سرولوژی استوار می باشد و کشت باکتری بدلیل ضروری بودن دسترسی به شرایط سطح سه ایمنی زیستی آزمایشگاهی در اغلب آزمایشگاه امکان پذیر نمی باشد. همچنین اخیرا روش های مولکولی نیز در تشخیص تب کیو ابداع شده اند اما استاندارد طلایی برای تشخیص آزمایشگاهی عفونت کوکسیلا بورنتی روش هاس سرولوژی مانند الایزا و ایمنوفلوروسانس غیر مستقیم می باشد (۱۳). روش الایزا به دلیل اقتصادی بودن و شناسایی آنتی بادی های فاز اول و دوم بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد (۱۴). با توجه به مطالعات اخیر در ایران، بنظر می رسد که تب کیو یک بیماری اندمیک و مهم از نظر بهداشت عمومی در ایران است {Mohabbati Mobarez, 2017 #23} {Esmaeili, 2016 #25} {Esmaeili, 2019 #20} {Esmaeili, 2019} #38. در سال های اخیر موارد تب کیو حاد و اندوکاردیت تب کیو از نقاط مختلف ایران گزارش شده است که نشان دهنده اهمیت بیماری در ایران است {Esmaeili, 2019 #39} {Metanat, 2014 #40} {Esmaeili, 2017 #28} {Yaghmaie, 2015} #41 {Khalili, 2016 #42} {Moradnejad, 2019 #43} {Heydari, 2021 #44}. با این وجود، هنوز هم در مورد اپیدمیولوژی تب کیو در برخی از مناطق ایران بخصوص استان های غربی ایران اطلاعات بسیار زیادی در دسترس نیست. استان کردستان یکی از استان های غربی ایران می باشد که هنوز اطلاعات اپیدمیولوژیکی تب کیو از جمله شیوع تب کیو حاد در این استان در دسترس نمی باشد. در یک مطالعه اخیر، ۴۶/۶ درصد از نشخوارکنندگان استان کردستان دارای آنتی بادی بر علیه کوکسیلا بورنتی بودند {Jamali, 2021 #45}. همچنین در یک مطالعه دیگر بر روی نمونه های شیر جمع آوری شده از این استان، ۶۳ درصد نمونه از نظر سرولوژیکی و ۶/۵ درصد از نظر مولکولی برای کوکسیلا بورنتی بودند {Ahmadi, 2020 #46}. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۱-۲۰۱۲ بر روی جمعیت های انسانی مختلف استان کردستان انجام شد، میزان مواجهه افراد با کوکسیلا بورنتی ۲۷/۸ درصد گزارش شد (۱۵). از سوی دیگر، موارد اندوکاردیت تب کیو نیز از این استان گزارش شده است {Moradnejad, 2019 #43}. با این حال، با توجه به اینکه شغل اکثر افراد استان کردستان دامپروری می باشد و یا با دام ارتباط نزدیک دارند، به دلیل نبود اطلاعات کافی در مورد میزان شیوع تب کیو حاد و میزان فراوانی تب کیو حاد در افراد پرخطر این منطقه این مطالعه جهت مشخص شدن بیشتر سیمای اپیدمیولوژی تب کیو حاد در استان کردستان انجام شد.

روش کار

منطقه مورد مطالعه: این مطالعه در غرب کشور ایران و در استان کردستان به مرکزیت شهر سنندج (سال ۲۰۱۸-۲۰۲۰) انجام گرفت. مساحت این استان ۲۹'۱۳۷ کیلومتر مربع معادل ۷/۱٪ مساحت کل کشور ایران است. این استان که در دامنه ها و دشت های پراکنده سلسله جبال زاگرس میانی قرار گرفته است. بر پایه سرشماری عمومی نفوس و مسکن سال ۱۳۹۵ استان کردستان ۱/۶۰۳/۰۱۱ نفر جمعیت دارد که ۶۶ درصد شهری و ۳۴ درصد را جمعیت روستایی تشکیل می دهد.

موازیین اخلاق پزشکی: کلیه پروتوکل ها و مراحل انجام این مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان مورد بررسی و پذیرش قرار گرفت (IR.MUK.REC.1397/69). از تمامی افراد شرکت کننده در این مطالعه، رضایت آگاهانه اخذ بصورت کتبی اخذ گردید.

نمونه گیری: این مطالعه بر روی ۹۶ بیمار از افرادی که در معرض خطر بودند انجام گرفت و ابزار تحقیق در این مطالعه پرسشنامه بود. افراد وارد مطالعه افرادی هستند که دو شرط الف و ب را داشتند:

الف: ۱- شغلی که به هر نحوی با حیوانات و یا محصولات دامی آنها در تماس باشند (دامپزشکان، دامداران، قصاب ها)، کار در آزمایشگاه ها و... ۲- یا زندگی در نواحی نزدیک به محل نگهداری حیوانات مثل دامداری ها.

ب: دارای عفونت حاد دستگاه تنفسی تحتانی باشند: وجود تب همراه با حداقل دو علامت دیگر (لرز، سردرد، پنومونی آتیپیک، تنفس مشکل دار یا درد قفسه سینه).

و در عین حال حاضر باشد یکماه بعد برای دادن نمونه خون مجدداً مراجعه نماید.

پس از رضایت کتبی از افراد شرکت کننده در مطالعه، یک پرسشنامه شامل مشخصات دموگرافیک، علایم بالینی و ریسک فاکتور ها برای هر بیمار تکمیل گردید. از هر بیمار که دارای شرایط ورود به مطالعه بود، دو نمونه سرم گرفته شد بطوری که نمونه اول (مرحله حاد) که بلافاصله هنگام مراجعه به درمانگاه از افراد گرفته شد و نمونه دوم (مرحله نقاهت) به فاصله ۴ هفته از نمونه اول گرفته شد. همچنین از تمامی بیماران یک نمونه خون کامل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA در مرحله حاد بیماری اخذ گردید تا برای بررسی های مولکولی مورد استفاده قرار گیرد. تمامی نمونه ها با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه فرانس کشوری طاعون، تولارمی و تب کیو انستیتو پاستور ایران منتقل شدند.

بررسی سرولوژیکی: سرم های جمع آوری شده بصورت جفت جهت شناسایی ایمونوگلوبولین G (IgG) فاز II توسط کیت الایزای تجاری کمی (ELISA; Serion ELISA classic, InstitutVirion/Serion GmbH, Würzburg, Germany) و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده مورد آزمایش قرار گرفتند. OD های بدست آمده بر طبق پروتکل Virion/Serion مورد بررسی قرار گرفته و IgG فاز II بصورت کمی گزارش می شود. تیتر آنتی بادی IgG فاز II با استفاده از یک محاسبه logistic-log-model بصورت U/ml محاسبه شد و تیتر بیش از ۳۰ U/ml بعنوان مثبت، تیتر ۲۰-۳۰ U/ml بعنوان بوردرلاین و تیتر کمتر از ۲۰ U/ml بعنوان منفی در نظر گرفته شد. افزایش چهار برابری تیتر نمونه دوم نسبت به نمونه اول هر بیمار و همچنین تغییر سرولوژیک (Seroconversion) از منفی به مثبت، بعنوان معیار آزمایشگاهی تشخیص تب کیو حاد مد نظر قرار گرفت. در صورتی که فردی دارای آنتی بادی IgG فاز II کوکسیلا بروننتی در سرم اول بود و تیتر این آنتی بادی در سرم دوم بیمار افزایش قابل ملاحظه ای نداشت، بعنوان سابقه مواجهه قبلی (عفونت گذشته) با تب کیو در نظر گرفته شد.

بررسی مولکولی: تمامی بیمارانی که با استفاده از روش سرولوژیکی مبتلا به تب کیو حاد تشخیص داده شدند به همراه افرادی که سابقه قبلی مواجه با کوکیلا بروننتی را داشتند جهت بررسی مولکولی کوکسیلا بروننتی در نمونه خون مرحله حاد انتخاب شدند. همچنین ۳۰ درصد از مواردی که هیچگونه آنتی بادی بر علیه کوکسیلا بروننتی را نداشتند نیز برای بررسی مولکولی انتخاب شدند. جهت استخراج DNA از ۲۰۰ میکرولیتر سرم از هر نمونه انتخاب شده جهت بررسی مولکولی با استفاده از کیت استخراج High Pure شرکت Roche و مطابق با پروتوکل توصیه شده توسط شرکت سازنده DNA استفاده شد. DNA استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

نمونه های DNA استخراج شده با استفاده از روش Real-time PCR جهت ردیابی کوکسیلا بروننتی مورد آزمایش قرار گرفتند. آزمایش Real-time PCR به روش TaqMan بود و برای این منظور از پرایمر و پروب اختصاصی برای ژن IS1111 استفاده شد (جدول شماره ۱). آزمایش Real-time PCR با حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر انجام شد که حاوی ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس تجاری 2x RealQ Plus Master Mix (Ampliqon، دانمارک)، ۹۰۰ نانومول از پرایمر مستقیم، ۹۰۰ نانومول پرایمر معکوس، ۲۰۰ نانومول پروب و ۴ میکرولیتر از DNA الگو بود که با آب مقطر تزریقی دیونایز به حجم ۲۰ میکرولیتر می رسید. همچنین

بعنوان کنترل مثبت از سویه Nine Mile RSA493 کوکسیلا بورنتی استفاده شد. از آب مقطر تزریقی نیز بعنوان کنترل منفی استفاده شد. این تست با استفاده از دستگاه Corbett 6000 Rotor-Gene system (Corbett, Victoria, Australia) با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ سیکل با برنامه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد (۱۶).

جدول شماره ۱. توالی پرایمرها جهت شناسایی ژن IS1111 کوکسیلا بورنتی به روش Real-time PCR

نام	توالی پرایمر	اندازه قطعه (جفت باز)
پرایمر مستقیم	5'-AAAACGGATAAAAAGAGTCTGTGGTT-3'	۷۰
پرایمر معکوس	5'-CCACACAAGCGCGATTCAT-3'	
پروپ	5'-6-FAM-AAAGCACTCATTGAGCGCCGCG-TAMRA-3'	

روش تجزیه و تحلیل داده ها: داده های جمع آوری شده در این مطالعه بوسیله نرم افزار (Version 16, SPSS Inc, Chicago, Ill) SPSS مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. جهت مقایسه میزان فراوانی پیامد (میزان شیوع تب کیو حاد و همچنین سابقه مواجهه قبلی) و فاکتورهای مورد بررسی، از آزمون کای دو استفاده شد.

نتایج

از مجموع ۹۶ بیمار شرکت کننده در مطالعه، تعداد ۶۰ نفر (۶۲.۵٪) از افراد مرد و تعداد ۳۶ نفر (۳۷.۵٪) دیگر زن بودند. میانگین سنی افراد شرکت کننده در این مطالعه ۴۵/۸ سال بود. ۹۴/۸ درصد از افراد شرکت کننده در این مطالعه ساکن روستا بودند. تب، پنومونی، سرفه، سردرد، خستگی و تنگی نفس شایعترین علامت کلینیکی افراد شرکت کننده در این مطالعه بودند (شکل ۱). بر اساس معیار آزمایشگاهی در این مطالعه، ۷ بیمار از ۹۶ بیمار (۷/۳ درصد) مورد بررسی مبتلا به تب کیو حاد تشخیص داده شدند. تمامی ۷ بیمار مبتلا به تب کیو حاد، افزایش چهار برابری در میزان تیترا آنتی بادی IgG فاز II کوکیلا بورنتی را نشان دادند. تمامی نمونه های بررسی شده (۵۰ بیمار) از نظر مولکولی برای کوکسیلا بورنتی منفی بودند. میزان شیوع تب کیو حاد در بین مردان ۶ نفر (۱۰ درصد) و در بین زنان ۱ نفر (۲/۸ درصد) بود. همچنین میزان شیوع تب کیو حاد در بین ساکنین روستا ۶/۷ درصد و ساکنین شهر ۲۰ درصد بود. ارتباط بسیار ضعیفی بین سابقه ابتلا به بروسلوز (P=0.07) و نگهداری گاو (P=0.07) با ابتلا به تب کیو حاد مشاهده گردید. سایر خصوصیات دموگرافیک و ریسک فاکتور ها ارتباط معنی داری با ابتلا به تب کیو حاد نداشتند (جدول ۱). سردرد (۸۵/۷ درصد)، خستگی (۸۵/۷ درصد)، تنگی نفس (۷۱/۴ درصد) و سرفه (۵۷/۱ درصد) شایعترین علامت های بالینی در بین ۷ بیمار مبتلا به تب کیو حاد در این مطالعه بودند. با این وجود، هیچکدام از علائم بالینی ثبت شده در این مطالعه از نظر آماری ارتباط معنی داری با ابتلا به تب کیو حاد نداشتند (جدول ۲)

همچنین ۲۲ نفر از ۸۹ (۲۴/۷ درصد) شرکت کننده که جواب نهایی آنها برای تب کیو حاد منفی بودند دارای سابقه قبلی مواجهه با کوکسیلا بورنتی بودند. میزان شیوع سرولوژیکی با کوکسیلا بورنتی (مواجهه قبلی) در بین مردان ۲۵/۹ درصد و در بین زنان ۲۲/۸ درصد بود که از نظر آماری این تفاوت معنی دار نبود. همچنین سه مورد (۳۰ درصد) از ۱۰ زن دارای سابقه قبلی سقط جنین، دارای آنتی بادی ضد کوکسیلا بورنتی بودند اما این ریسک فاکتور نیز از نظر آماری معنی دار نبود. ۳۵/۸ درصد افراد با سابقه نگهداری

گوسفند دارای مواجهه قبلی با کوکسیلا بورنتی بودند که این ریسک فاکتور از نظر آماری هم معنی دار بود ($P=0.03$). سایر خصوصیات دموگرافیک و ریسک فاکتور ها ارتباط معنی داری با مواجهه قبلی با کوکسیلا بورنتی نداشتند.

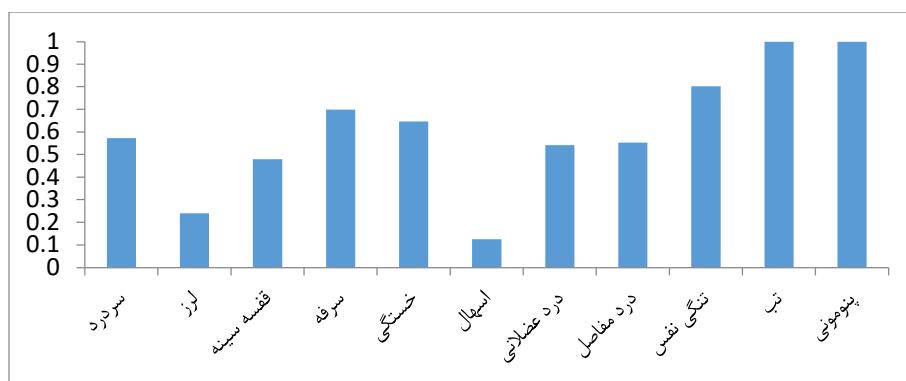
جدول ۱. آنالیز آماری ارتباط خصوصیات دموگرافیک و ریسک فاکتور ها افراد شرکت کننده در این مطالعه با تب کیو حاد و سابقه مواجهه قبلی.

متغیرها	وضعیت	تب کیو حاد		P-value	سابقه مواجهه قبلی با کوکسیلا بورنتی		P-value
		منفی (۸۹ نفر)	مثبت (۷ نفر)		منفی (67 نفر)	مثبت (22 نفر)	
میانگین سنی		۴۵.۸۷±۱۳.۶۶	۴۵±۱۶.۵۲	۰.۸۷	۴۶±۱۵	۴۵.۲۱±۹.۲۱	۰.۸۱
جنس	مرد	54(60.7%)	6(85.7%)	۰.۱۸	40(59.7%)	14(63.6%)	۰.۷۴
	زن	35(39.3%)	1(14.3%)		27(40.3%)	8(36.4%)	
محل زندگی	روستا	85(95.5%)	6(85.7%)	۰.۲۶	64(95.5%)	21(95.5%)	۰.۹۸
	شهر	4(4.5%)	1(14.3%)		3(4.5%)	1(4.5%)	
نگهداری گاو	دارد	66(74.2%)	3(42.9%)	۰.۰۷	50(74.6%)	16(72.7%)	۰.۸۶
	ندارد	23(25.8%)	4(57.1%)		17(25.4)	6(27.3%)	
نگهداری گوسفند	دارد	53(59.6%)	6(85.7%)	۰.۱۷	34(50.7%)	19(86.4%)	۰.۰۳
	ندارد	36(40.4%)	1(14.3%)		33(49.3%)	3(13.6%)	
سابقه نیش کنه	دارد	3(3.4%)	1(14.3%)	۰.۱۶	3(4.5%)	0(0%)	۰.۳۱
	ندارد	86(96.6%)	6(85.7%)		64(95.5%)	22(100%)	
سابقه سقط جنین	دارد	10(28.6%)	0(0%)	۰.۷۲	7(25%)	3(37.5%)	۰.۵۲
	ندارد	25(71.4%)	1(100%)		21(75%)	5(62.5%)	
مصرف شیر خام	دارد	83(93.3%)	6(85.7%)	۰.۴۶	62(92.5%)	21(95.5%)	۰.۶۳
	ندارد	6(6.7%)	1(14.3%)		5(7.5%)	1(4.5%)	
سابقه تب مالت	دارد	2(2.2%)	1(14.3%)	۰.۰۷	1(1.5%)	1(4.5%)	۰.۴۳
	ندارد	87(97.8%)	6(85.7%)		66(98.5%)	21(95.5%)	

جدول ۲: فراوانی علائم بالینی مورد بررسی در افراد داری تب کیو حاد

علائم بالینی	وضعیت	تب کیو حاد		سطح معنی داری
		منفی (۸۹ نفر)	مثبت (۷ نفر)	
سردرد	دارد	49(55.1%)	6(85.7%)	۰.۱۱
	ندارد	40(44.9%)	1(14.3%)	
لرز	دارد	22(24.7%)	1(14.3%)	۰.۵۳
	ندارد	67(75.3%)	6(85.7%)	
درد قفسه سینه	دارد	43(48.3%)	3(42.9%)	۰.۷۸
	ندارد	46(51.7%)	4(57.9%)	
سرفه	دارد	63(70.8%)	4(57.1%)	۰.۴۴
	ندارد	26(29.2%)	3(42.9%)	
خستگی	دارد	56(62.9%)	6(85.7%)	۰.۲۲
	ندارد	33(37.1%)	1(14.3%)	

اسهال	دارد	12(13.5%)	0(0%)	۰.۲۹
	ندارد	77(86.5%)	7(100%)	
درد عضلانی	دارد	49(55.1%)	3(42.9%)	۰.۵۳
	ندارد	40(44.9%)	4(57.1%)	
درد مفاصل	دارد	50(56.2%)	3(42.9%)	۰.۴۹
	ندارد	39(43.8%)	4(57.15)	
تنگی نفس	دارد	72(80.9%)	5(71.4%)	۰.۵۴
	ندارد	17(19.1%)	2(28.6%)	



شکل ۱: نمودار فراوانی علائم بالینی افراد شرکت کننده در مطالعه

بحث و نتیجه گیری

این مطالعه به منظور بررسی شیوع تب کیو حاد در بین بیماران تب دار و دچار پنومونی که مشکوک به تب کیو حاد در استان کردستان انجام شد و نشان داده شد که ۷/۳ درصد مبتلا به تب کیو حاد تشخیص داده بودند. بیماران مبتلا به تب کیو حاد در این مطالعه توسط روش سرولوژیکی (سروکانورژن و افزایش تیتراژ آنتی بادی) تشخیص داده شدند و نتیجه مولکولی برای تمامی بیماران منفی بود. با توجه به اینکه اخیراً باکتری کوکسیلا بورنتی در دام های این استان ردیابی شده بود { *Ahmadi, 2020* } و همچنین در مطالعه سرواپیدمیولوژی انجام شده در این استان موید مواجهه افراد با این باکتری بود (۱۵)، لذا در این مطالعه نیز نشان داده شد که موارد بالینی تب کیو حاد نیز در استان کردستان وجود دارد. بنابراین همه یافته نشان دهنده اهمیت تب کیو در غرب ایران و استان کردستان است و سیستم بهداشتی و پزشکان این استان در موارد پنومونی و تب با منشا ناشناخته که شواهد اپیدمیولوژیک نیز در مورد آنها در دسترس است، باید تب کیو حاد را بعنوان یک تشخیص افتراقی محتمل در نظر بگیرند. از طرف دیگر، اگرچه تب کیو حاد دارای میزان مرگ و میر بسیار پایین (زیر ۱ درصد) است اما شیوع تب کیو حاد در مقیاس بزرگ می تواند به نگرانی های بهداشت عمومی مانند انتقال مرتبط با انتقال خون یا عوارض زایمان در زنان باردار منجر شود. علاوه بر این، تداوم تب کیو حاد و البته عفونت های بدون علامت کوکسیلا بورنتی می تواند در ۵ درصد موارد به سمت تب کیو مرمن (اغلب اندوکاردیت) پیش برود که عوارض تب کیو مزمن در صورت تشخیص و درمان به موقع بسیار خطرناک می باشد (۱۷). بنابراین باید به درمان تب کیو حاد و فالوآپ مداوم سرولوژیکی موارد تب کیو حاد و عفونت های بدون علامت نیز توجه کافی نمود. این مورد هم توسط سیستم بهداشتی در ایران جدی گرفته نمی شود و باید آموزش های لازم را برای کارکنان سیستم بهداشتی تدوین و ارائه نمود.

با وجود اینکه در سال های اخیر مطالعات مولکولی و سرولوژی بسیار زیادی در مورد مخازن دامی کوکسیلا بورنتی در ایران انجام گرفته است اما هنوز موارد بالینی انسانی تب کیو توسط پزشکان و سیستم بهداشتی مورد غفلت قرار می گیرد. اکثر موارد بالینی شناسایی شده نیز در قالب طرح های پژوهشی بوده است که تعداد این مطالعات نیز بسیار محدود می باشد. بنابراین، اطلاعات کاملی در مورد شیوع تب کیو حاد در ایران در دسترس نمی باشد و باید مطالعات بیشتری در این زمینه انجام گیرد تا توجه سیستم بهداشتی به اهمیت این بیماری جلب گردد. در مطالعه حاضر، ۷/۳ درصد از بیماران بررسی شده مبتلا به تب کیو حاد تشخیص داده شدند. در یک مطالعه در جنوب شرقی ایران (سال ۲۰۱۲)، ۳۵/۵ درصد بیماران تب دار مبتلا به تب کیو حاد تشخیص داده شدند (۱۸). در یک مطالعه دیگر در شمال شرقی ایران (سال ۲۰۱۵)، ۷/۴ درصد بیماران مبتلا به تب با منشا ناشناخته برای عفونت کوکسیلا بورنتی مثبت گزارش شدند (۱۹). همچنین در یک مطالعه دیگر در شمال ایران (سال ۲۰۱۶)، ۵/۴ درصد بیماران بررسی شده مبتلا به تب کیو حاد تشخیص داده شدند {*Ghasemian, 2019 #47*}. در نهایت، در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۶ بر روی بیماران دارای علائم بالینی مشکوک به تب کیو در شمال غربی ایران انجام شد، ۱۳/۸ درصد از افراد از نظر عفونت تب کیو حاد مثبت بودند (۲۰). با مقایسه نتایج این مطالعه با نتایج محدود مطالعات مشابه انجام شده در ایران، بنظر می رسد که تب کیو حاد در مناطق مختلف ایران دارای میزان شیوع متفاوتی است. ویژگی های خاص جغرافیایی و شرایط آب و هوایی ممکن است بر شیوع تب کیو حاد در نواحی مختلف تأثیر بگذارد. بنابراین، مطالعات بیشتری در سایر مناطق ایران انجام شود تا سیمای اپیدمیولوژیک این بیماری بصورت کامل در ایران مشخص گردد. همچنین شاید مطالعات در سطح ملی و با حجم نمونه بسیار بالا نیز برای تعیین شیوع تب کیو حاد کمک کننده باشد.

با توجه به اینکه علائم بالینی تب کیو حاد کاملاً غیر اختصاصی می باشد، بنابراین نمی توان فقط بر اساس علائم بالینی این بیماری را تشخیص قطعی داد. در این مطالعه، تب، سردرد، خستگی، تنگی نفس و سرفه فراوان ترین علامت های بالینی در بین ۷ بیمار مبتلا به تب کیو حاد بودند اما هیچکدام از علائم بالینی مشاهده شده از نظر آماری معنی داری نبودند. یافته های سایر مطالعات مشابه در ایران نیز هم راستا با یافته های ما بودند (۲۰) {*Ghasemian, 2019 #47*}. از طرف دیگر، با وجود این که یک ارتباط بسیار ضعیف بین سابقه ابتلا به بروسوز و نگهداری گاو با ابتلا به تب کیو حاد مشاهده گردید اما تمامی ریسک فاکتور های مورد بررسی در این مطالعه معنی دار نبودند. شاید از دلایل اینکه در مطالعه ما ریسک فاکتور معنی داری در ارتباط با ابتلا به تب کیو یافت نشد می توان به حجم پایین نمونه مورد بررسی و همچنین تعداد کم موارد مثبت اشاره کرد. یک دلیل احتمالی دیگر، در مطالعه حاضر ۹۴/۷ درصد شرکت کننده در این مطالعه ساکن روستا بودند و به نوعی با تمامی ریسک فاکتور های احتمالی مواجهه داشتند که این مورد باعث سخت شدن یافتن ریسک فاکتور موثر برای ابتلا به تب کیو حاد بود. در صورتی که جمعیت کنترل نیز برای این مدل مطالعات در نظر گرفته شود شاید بتوان ریسک فاکتورهای احتمالی را راحت تر شناسایی کرد. پیشنهاد می شود که در مطالعات آتی، برای یافتن ریسک فاکتور ها محدودیت های مورد اشاره در نظر گرفته شوند.

در مطالعه حاضر، ۲۴/۷ درصد از افراد دارای آنتی بادی IgG فاز II کوکسیلا بورنتی بودند که بعنوان سابقه قبلی مواجهه (عفونت گذشته) با کوکسیلا بورنتی در نظر گرفته شد. میزان شیوع آنتی بادی IgG فاز II کوکسیلا بورنتی در مطالعه حاضر مقایسه با میزان شیوع در مطالعه سال ۲۰۱۱-۲۰۱۲ در استان کردستان (۱۴/۵ درصد) بسیار بیشتر می باشد (۱۵). علت شیوع افزایش سرواپیدمیولوژی در مقایسه با مطالعه فوق می تواند به دلیل گسترش بیشتر کوکسیلا بورنتی در دام های استان کردستان با گذشت زمان باشد که در نتیجه آن تماس افراد با این باکتری افزایش یافته باشد و بطوری نگهداری و تماس با دام بخصوص گوسفند در مطالعه ما یک ریسک فاکتور معنی دار برای داشتن مواجهه قبلی با کوکسیلا بورنتی شناخته شد. همچنین میزان مواجهه قبلی با کوکسیلا بورنتی در این مطالعه با مطالعات مشابه در سایر استان ها اندکی کمتر می باشد بطوری که میزان مواجهه قبلی در شهرستان تبریز (شمال غربی ایران) ۳۲ درصد (۲۰) و در استان ایلام (غرب ایران) ۲۶/۴ درصد {*Mostafavi, 2019 #22*} گزارش شده است. نوع منطقه جغرافیایی و همچنین تفاوت شیوع عفونت کوکسیلا بورنتی در بین مناطق مختلف شاید دلیل این تفاوت در شیوع سرواپیدمیولوژیک باشد.

در این مطالعه نشان داد شد که عفونت تب کیو حد در غرب ایران وجود دارد. یافته های این مطالعه در کنار یافته های قبلی در مورد کوکسیلا بورنتی در دام ها شامل شیوع سرولوژیکی در سرم دام ها و وجود باکتری کوکسیلا بورنتی در نمونه های شیر استان کردستان و همچنین شواهد سرواپیدمیولوژیک تب کیو در جمعیت های انسانی و همچنین گزارش اندوکاردیت تب کیو از این استان، تکمیل کننده چهره اپیدمیولوژیک بیماری تب کیو در استان کردستان می باشد. با توجه به این شواهد، سیستم بهداشتی در این استان باید حتما تب کیو را بعنوان یک مشکل بهداشتی در نظر بگیرد. آموزش مداوم پزشکان این استان برای آشنایی با بیماری تب کیو ضروری بنظر می رسد تا حساسیت پزشکان به این بیماری جلب شود. همچنین توصیه می شود که موارد عفونت مزمن تب کیو نیز با توجه میزان بالای مواجهه قبلی با کوکسیلا بورنتی در این استان، نیز مورد توجه سیستم بهداشتی قرار بگیرد.

منابع

۱. Horigan MW, Bell MM, Pollard TR, Sayers AR, Pritchard GC. Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 2011;23(5):924-31.
۲. Angelakis E, Raoult D. Q fever. *Veterinary microbiology*. 2010;140(3):297-309.
۳. Berri M, Laroucau K, Rodolakis A. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Veterinary microbiology*. 2000;72(3-4):285-93.
۴. Shannon JG, Heinzen RA. Adaptive immunity to the obligate intracellular pathogen *Coxiella burnetii*. *Immunologic research*. 2009;43(1-3):138-48.
۵. Massung RF, Dasch GA, Eremeeva ME. *Rickettsia and Coxiella*. *Microbial Forensics*: Elsevier; 2011. p. 277-95.
۶. Khalili M, Shahabi-Nejad N, Golchin M. Q fever serology in febrile patients in southeast Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;104(9):623-4.
۷. Fard SN, Khalili M. PCR-detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from sheep and goats in southeast Iran. *Iranian journal of arthropod-borne diseases*. 2011;5(1):1.
۸. Anderson A, Bijlmer H, Fournier P-E, Graves S, Hartzell J, Kersh GJ, et al. Diagnosis and management of Q fever—United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports*. 2013;62(3):1-29.
۹. Raoult D. Chronic Q fever: expert opinion versus literature analysis and consensus. *Journal of Infection*. 2012;65(2):102-8.
۱۰. Houpikian P, Raoult DJM. Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases. 2005;84(3):162-73.
۱۱. Kampschreur LM, Wegdam-Blans MC, Wever PC, Renders NH, Delsing CE, Sprong T, et al. Chronic Q fever diagnosis—consensus guideline versus expert opinion. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(7):1183.
۱۲. Wegdam-Blans MC, Kampschreur L, Delsing C, Bleeker-Rovers C, Sprong T, Van Kasteren M, et al. Chronic Q fever: review of the literature and a proposal of new diagnostic criteria. *Journal of Infection*. 2012;64(3):247-59.
۱۳. Hartzell JD, Wood-Morris RN, Martinez LJ, Trotta RF, editors. *Q fever: epidemiology, diagnosis, and treatment* 2008: Mayo Clinic.

- .۱۴ Angelakis E, Mediannikov O, Stein A, Bassene H, Sokhna C, Raoult D. Throat swab samples for diagnosis of Q fever. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014;90(1):147-8.
- .۱۵ Esmacili S, Pourhossein B, Gouya MM, Amiri FB, Mostafavi E. Seroepidemiological survey of Q fever and brucellosis in Kurdistan Province, western Iran. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2014;14(1):41-5.
- .۱۶ Esmacili S, Mobarez AM, Khalili M, Mostafavi E. High prevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* in milk of dairy animals with a history of abortion in Iran. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2019;63:127-30.
- .۱۷ Heo JY, Choi YW, Kim EJ, Lee SH, Lim SK, Do Hwang S, et al. Clinical characteristics of acute Q fever patients in South Korea and time from symptom onset to serologic diagnosis. 2019;19(1):1-7.
- .۱۸ Metanat M, RAD NS, Alavi-Naini R, Shahreki S, Sharifi-Mood B, Akhavan A, et al. Acute Q fever among febrile patients in Zahedan, southeastern Iran. *Turk J Med Sci*. 2014;44:99-103.
- .۱۹ Khalili M, Reza Naderi H, Salehnia N, Abiri Z. Detection of *Coxiella burnetii* in acute undifferentiated febrile illnesses (AUFIs) in Iran. *Tropical Doctor*. 2016;46(4):221-4.
- .۲۰ Esmacili S, Golzar F, Ayubi E, Naghili B, Mostafavi E. Acute Q fever in febrile patients in northwestern of Iran. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11(4):e0005535.

بررسی شیوع باکتری تروفیما ویپلی در نمونه های اسهال کودکان

زمینه: یکی از معضلات بهداشتی در دنیا، اسهال کودکان می باشد که میکروارگانیزم های مختلفی در ایجاد آن دخیل می باشند. تروفیما ویپلی یکی از عامل ایجاد اسهال کودکان در دنیا است ولی مطالعات محدودی روی آن صورت گرفته و در ایران نیز در ارتباط با شیوع آن در بین کودکان هیچ اطلاعاتی در دسترس نیست. لذا این مطالعه با هدف ارزیابی حضور این باکتری در کودکان مبتلا به اسهال می باشد.

روش کار: نمونه های مدفوع از ۱۳۰ کودک زیر ۱۰ سال مبتلا به اسهال از بیمارستان های کودکان تهران جمع آوری شدند. DNA ژنومیک از نمونه های جمع آوری شده استخراج گردید و با دو روش SYBR Green Real-time PCR و Taq-man Real-time PCR probe برای تشخیص تروفیما ویپلی آزمایش شدند.

نتایج: ۵۴/۶ درصد بیماران مذکر و میانگین سنی ۳۲/۵ ماه بود. در مجموع ۱۲ مورد از ۱۳۰ نمونه (۹/۲۳ درصد) آلوده به تروفیما ویپلی بودند که با هر دو روش SYBR Green Real-time PCR و Taq-man Real-time PCR مثبت بودند. ۶۶/۶۷ درصد موارد مثبت متعلق به جنس مذکر بود. افراد با نتیجه مثبت (۸۲/۳ درصد) نسبت به افراد با نتایج منفی (۴۵/۸ درصد) به طور معنی داری تعداد روزهای بیشتری اسهال داشتند (OR: 5.93, 95% CI: 1.24-28.22). هیچ ارتباطی میان مثبت بودن نتیجه و سایر فاکتور های زمینه ای و علائم بالینی مشاهده نشد.

نتیجه گیری: این به عنوان اولین مطالعه در ایران، شیوع باکتری تروفیما ویپلی در بین کودکان مبتلا به اسهال مورد بررسی قرار داد. نتایج مان نشان داد که این باکتری دارای شیوع قابل توجهی بوده و میتواند باعث گاستروانتریت در کودکان گردد.

مقدمه

تروفیما ویپلی (*Tropheryma whipplei*) یک باکتری گرم مثبت و باسیلی داخل سلولی است که ابتدا در سال ۱۹۰۷ توصیف شد. این باکتری عامل ایجاد بیماری ویپل است که منجر به عفونت های مزمن، حاد و سیستمیک می شود (۱). این باکتری در گروه اکتینومیست ها قرار دارد و جایگاه آن روده انسان می باشد و هنگام استقرار در مخاط روده، توسط سلولهای ماکروفاژ جمع آوری شده و درون این سلولهای ایمنی تکثیر می کند (۲-۴). مخزن اصلی این باکتری ناقلین بدون علامت هستند. علی رغم ایجاد پاسخ ایمنی در برخورد اول ناقلین با این باکتری، این افراد میتوانند مدت طولانی حامل این باکتری باشند که منجر به انتشار آن در سطح جامعه شوند (۲، ۳). در نمونه های مختلفی از جمله بزاق، ادرار، خون، دریچه قلبی، میوکارد، مایع سینوویال، عضله اسکلتی، مدفوع، پوست، غدد لنفاوی، ریه، مایع برونکو آلوئولار، معده، طحال، کبد، حنجره و روده کوچک، نمونه روده بزرگ، سینوس فک بالا، مایع مغزی نخاعی، مغز و مایع زلالیه این باکتری یافت شده است (۲، ۵، ۶). معمولاً انتقال بیماری از راه دهان به دهان و مدفوع به دهان صورت می گیرد (۲، ۴).

برخی مطالعات نشان می دهند که ۴۸ درصد از جمعیت عمومی در اروپا (۷)، و ۷۲ درصد از جمعیت سنگال دارای آنتی بادی علیه باکتری هستند (۸). نتایج فوق نشان می دهد که شیوع تروفیما ویپلی در نمونه های مدفوع افراد بدون علامت در جمعیت عمومی اروپا بین ۱/۵ تا ۴ درصد متغیر است. اما می تواند شیوع بیشتری (بین ۱۲ تا ۲۵ درصد) در بین جمعیت هایی نظیر کارگران فاضلاب، افراد آلوده به HIV و بی خانمان ها داشته باشد (۲). بار تروفیما ویپلی در مدفوع بالاتر از نمونه های بزاق است. میزان باکتری در

نمونه های مدفوع نیز در بیماران علامتدار نسبت به حامل ها به طور قابل توجهی بیشتر است که این نشان می دهد که بار زیاد باکتری با عفونت های علامت دار تروفیما ویپلی همراه است (۹). تظاهرات بالینی بیماری ویپیل به چهار صورت می باشد: (الف) بیماری کلاسیک ویپیل (ب) عفونت های مزمن موضعی (ج) عفونت های حاد و (د) عفونت های بدون علامت (۲، ۴). بیشتر بیماران مبتلا به ویپیل مرد (۷۳ تا ۸۷ درصد) هستند که در گروه سنی ۴۸ تا ۵۴ سال قرار دارند و علایم بالینی مختلفی نظیر ورم مفاصل متناوب اولیه (۷۳ تا ۸۰ درصد) یا مشکلات گوارشی مزمن همراه با اسهال (۷۲ تا ۸۱ درصد) و یا کاهش وزن (۷۹ تا ۹۳ درصد) در آنها بروز می کند. گاهی اوقات بیماران طی یک دوره طولانی (۷-۸ سال)، فقط تعداد کمی از علایم را دارند و پس از گذشت این دوره، سایر علایم ایجاد می شوند. از شایع ترین علائم بیماران مبتلا به بیماری کلاسیک ویپیل می توان به آرتریالژی، اسهال، اسهال چرب، کاهش وزن، لنفادنوپاتی، درد شکم، هیپوآلبومینمی و کم خونی اشاره کرد (۱، ۱۰). این باکتری گاهاً باعث مواردی از بیماری عصبی، تغییرات در چشم و اندوکاردیت کشت منفی می شود (۱۱).

تروفیما ویپیلی علاوه بر بیماری مزمن می تواند منجر به ایجاد بیماری حاد شود که در گاستروانتریت حاد، باکتری می و یا پنومونی بروز می کند. در ۱۵٪ مدفوع کودکان مبتلا به گاستروانتریت این باکتری شناسایی شده و آنتی بادی برویت گردیده است ولی در گروه کنترل آنتی بادی مشاهده نشده است. هم چنین بعد از بهبود اسهال در کودکان نیز، باکتری مشاهده نشده است که نشانگر نقش این باکتری در ایجاد اسهال حاد کودکان است (۱۲، ۱۳).

متداول ترین روش های معمول تشخیصی تروفیما ویپیلی، هیستوپاتولوژی و PCR می باشند، ولی کشت بسیار دشوار است و تنها در چند آزمایشگاه محدود در دنیا می تواند انجام شود (۲). تست PCR بر روی نمونه های مختلف غیر تهاجمی می تواند به عنوان یک نسخه آزمایش آسان، بسیار حساس و اختصاصی و مقرون به صرفه قبل از تشخیص مبتنی بر نمونه بیوپسی باشد. بررسی هیستوپاتولوژی نمونه های بیوپسی یک روش پرهزینه و تهاجمی است، بنابراین به طور متداول برای اهداف غربالگری مورد استفاده قرار نمی گیرد و معمولاً فقط برای تأیید تشخیص در صورت ظن جدی عفونت انجام می شود (۱۴-۱۷).

یکی از معضلات بهداشتی در ایران، اسهال کودکان می باشد که میکروارگانیزم های مختلفی در ایجاد آن در آن دخیل می باشند. در نتیجه برای شناخت عوامل اتیولوژیک و بررسی های دقیق اپیدمیولوژیک هر یک از عوامل ایجاد کننده اسهال، مطالعات اختصاصی ضروری است. به علاوه باکتری تروفیما ویپیلی، عامل ایجاد اسهال کودکان در دنیا است و مطالعات محدودی روی آن صورت گرفته و در کشور ایران نیز در ارتباط با شیوع آن در بین کودکان هیچ اطلاعاتی در دسترس نیست. در نتیجه جهت شناسایی این میکروارگانیزم و علایم بالینی مرتبط با آن، این مطالعه به عنوان یک مطالعه اولیه انجام شد.

مواد و روش

جمع آوری نمونه: نمونه های این مطالعه مقطعی از اردیبهشت ماه تا آبان سال ۱۳۹۷ از سه بیمارستان مختلف شهر تهران (بیمارستان بهرامی، بیمارستان مفید و مرکز طبی کودکان) جمع آوری شده بودند. نمونه مدفوع از بیماران مبتلا به اسهال از کودکان زیر ۱۰ سال جمع آوری گردیده و برای هر یک از این بیماران یک پرسشنامه شامل خصوصیات دموگرافیک، علایم بالینی و شواهد آزمایشگاهی تکمیل گردید. از هر کودک مبتلا به اسهال حدود ۱۰ گرم مدفوع اسهالی در ظروف استریل جمع آوری شد.

تخلیص DNA و تشخیص مولکولی: جهت استخراج DNA از نمونه های مدفوع به روش توصیف شده Yang و همکاران استفاده شد. بطور خلاصه، ۲۰ میلی گرم از هر نمونه مدفوع در ۱ میلی لیتر PBS حل شد و سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دور ۱۰۰g سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی (سوپرناتانت) برداشت شده و رسوب (پلیت) دور ریخته شدند. محلول رویی (supernatant) پس از انتقال به میکوبیوب استریل، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور 13000g سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت دور ریخته شد. پس از آن، جهت حذف مهار کننده های PCR، رسوب سه بار با ۳۰۰ میکرولیتر استون شستشو داده شدند (هر مرحله سانتریفیوژ دور 13000g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد). در هر مرحله بعد از اضافه کردن استون ورتکس و بعد سانتریفیوژ انجام گردید و در هر مرحله مایع رویی دور ریخته شد. pellet با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شده، جهت ترکیب کامل محلول، ورتکس مختصری انجام شدند. در نهایت نمونه ها جهت استخراج ژنوم، در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه توسط حمام آب گرم جوشاندنیده شدند و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس نمونه ها در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه در دور 10000g سانتریفیوژ شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی (سوپرناتانت) به میکروتیوب استریل جدید منتقل شد و در دمای ۲۰- سانتیگراد جهت انجام پروسه PCR ذخیره شدند.

تمامی نمونه های DNA استخراج شده با دو روش SYBR Green Real-time PCR و Taq-man Real-time PCR برای تشخیص تروفیما ویپلی آزمایش شدند. برای روش سایبر گرین، از پرایمر TWS1F (5'-AGCCTTTGCCAGACAGACAC-3') و پرایمر Tws1R (AGAGAGATGGGGTGCAGGAC-3') استفاده شد. در این روش حجم هر واکنش ۲۰ میکرولیتر بود که حاوی ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین RealQ Plus 2x (AmpliQon, Denmark) (Master Mix Green Low ROX™)، ۹۰۰ نانومول پرایمر فوروارد، ۹۰۰ نانومول پرایمر ریورس، ۴ میکرولیتر آب مقطر تزریقی و ۴ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده بود. برنامه دمایی با فعال سازی اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، و ۴۰ سیکل بصورت سه مرحله ای (۹۵ درجه سانتیگراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه) همراه با مرحله ملتینگ بود (۱۸). این تست با استفاده از دستگاه Corbett 6000 Rotor-Gene (Corbett, Victoria, Australia) انجام شد. نمونه هایی که دارای منحنی تکثیر بودند و دمای ملتینگ آنها در حدود ۸۱ درجه سانتیگراد بود بعنوان مثبت در نظر گرفته شدند. نمونه های مثبت توالی یابی (شرکت ژنومین، ایران) شدند.

همه نمونه ها مجدداً با استفاده از روش Taq-man Real-time PCR تست شدند. آزمایش Taq-man Real-time PCR با حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر انجام شد که حاوی ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس تجاری ۲ RealQ Plus Master Mix (AmpliQon)، دانمارک، ۹۰۰ نانومول از پرایمر T_whi3_F (TTGTGTATTTGGTATTAGATGAAACAG)، ۹۰۰ نانومول پرایمر T_whi3_R (CCCTACAATATGAAACAGCCTTTG)، ۲۰۰ نانومول پروب FAM_5'-۶) و ۳'BHQ-1 (GGGATAGAGCAGGAGGTGTCTGTCTGG-3') و ۴ میکرولیتر از DNA الگو بود که با آب مقطر تزریقی دیونایز به حجم ۲۰ میکرولیتر می رسید. این تست با استفاده از دستگاه Corbett 6000 Rotor-Gene system (Corbett, Victoria, Australia) با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ سیکل با برنامه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد (۱۹). در تمامی آزمایشات از DNA تروفیما ویپلی (تهیه شده بصورت لیوفریزه از IRCCS Sacro Cuore Don Calabria Hospital کشور ایتالیا) بعنوان کنترل مثبت و از آب مقطر تزریقی نیز بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

آنالیز آماری: اطلاعات به دست آمده از این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد. سطح معنادار مقدار p کمتر از ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

۱۳۰ کودک در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین و انحراف معیار سنی کودکان ۳۲/۵ و ۳۱/۶ ماه بود. که ۴۵/۳۸ درصد از آن مذکر و ۵۴/۶۲ درصد مونث بودند. میانه تعداد دفعات اسهال در روز ۴ بار بود و به طور متوسط تعداد روزهای داشتن اسهال ۱۴/۶۱ روز (انحراف معیار = ۴۲/۱۲) و میانه ۳ روز بود. ۴۲/۳۰ درصد کودکان دارای تب بودند. ۵/۳۸ درصد کودکان نیز دارای بیماری زمینه ای بودند (جدول ۱).

در مجموع ۱۲ مورد از ۱۳۰ نمونه (۹/۲۳ درصد) آلوده به تروفیما ویپلی بودند که با هر دو روش SYBR Green Real-time PCR و Taq-man Real-time PCR probe مثبت بودند. تمامی موارد مثبت توسط سکونسینگ محصول PCR مورد تایید نهایی قرار گرفتند. توالی های بدست آمده با استفاده از توالی های ثبت شده در بانک ژن مور آنالیز بیوانفورماتیک قرار گرفتند (شکل ۱ و ۲).

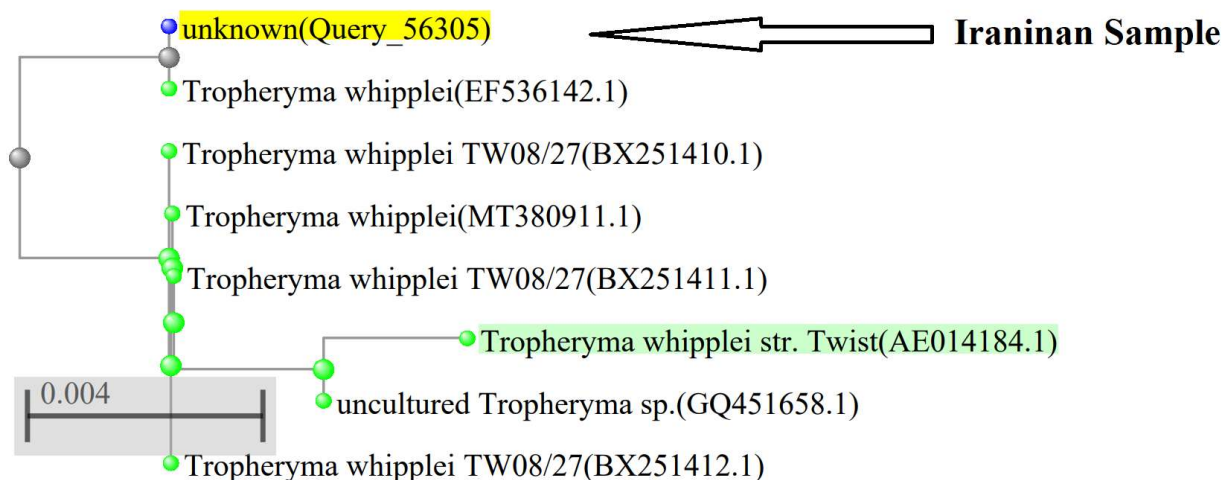
۶۶/۶۷ درصد موارد مثبت متعلق به جنس مذکر بود. ۵۸/۳ درصد بیماران مثبت سن زیر ۳۲ ماه داشتند. ۸۳/۳ درصد بیماران مثبت برای تروفیما ویپلی بیش از سه رو مبتلا به اسهال بودند. ۶۶/۷ درصد بیماران مثبت بیش از ۴ بار در روز دفعات اسهال داشتند.

افراد با نتیجه مثبت (۸۳/۳ درصد) نسبت به افراد با نتایج منفی (۴۵/۸ درصد) به طور معنی داری تعداد روزهای بیشتری اسهال داشتند (OR:5.93, 95% CI: 1.24-28.22). هیچ ارتباطی میان مثبت بودن نتیجه تست و سایر فاکتور های دموگرافیک و علائم بالینی مشاهده نشد (جدول ۱).

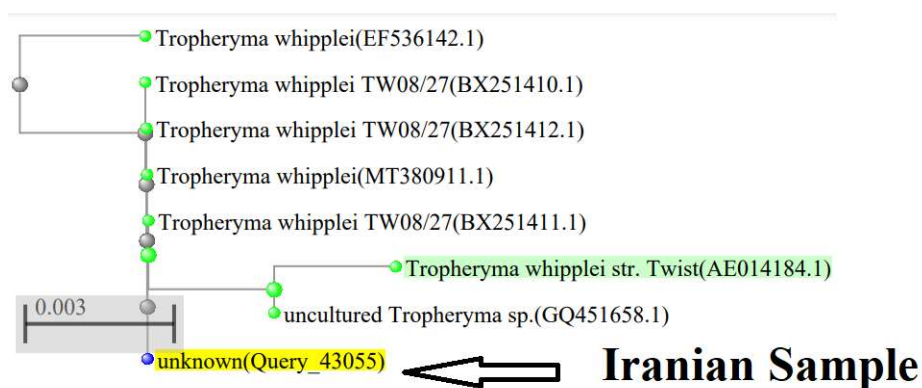
جدول ۱. آنالیز آماری مشخصات دموگرافیک و بالینی کودکان دچار اسهال و ارتباط آن با شیوع تروفیما ویپلی.

	Negative N=118	Positive N=12	P value	OR (95% CI)
Gender (male)	51 (43.2)	8 (66.7)	0.12	2.63 (0.75-9.21)
Age median≥32.9 month	41 (34.7)	5 (41.7)	0.75	1.34 (0.40-4.49)
Median times of diarrhea in day≥4 times	63 (53.4)	8 (66.7)	0.38	1.75 (0.50-6.11)
Median days of diarrhea≥3	54 (45.8)	10 (83.3)	0.01	5.93 (1.24-28.22)
Fever	51 (43.2)	4 (33.3)	0.51	0.66 (0.19-2.30)
Stomachache	29 (24.6)	5 (41.7)	0.20	2.19 (0.65-7.44)
Cramps	34 (28.8)	1 (8.3)	0.18	0.91 (0.83-1.00)
Headache	4 (3.4)	1 (8.3)	0.39	2.59 (0.27-25.26)

Vomiting	29 (24.6)	4 (33.3)	0.50	1.53 (0.43-5.47)
Contact with animal	3 (2.5)	0 (0.0)	0.99	-
Family history of same disease	10 (8.5)	0 (0.0)	0.60	-
Travel history	6 (5.1)	0 (0.0)	0.99	-
Underlying disease	5 (4.2)	2 (16.7)	0.13	4.52 (0.78-26.34)
Mucus in fecal	37 (31.4)	4 (33.3)	0.99	1.10 (0.31-3.87)
Blood in fecal	11 (9.3)	1 (8.3)	0.99	0.88 (0.10-7.51)
Pus in the stool	10 (8.5)	1 (8.3)	0.99	0.98 (0.12-8.41)
WBC in fecal	24 (20.3)	3 (25.0)	0.71	1.31 (0.33-5.20)



شکل شماره ۱. آنالیز فیلوژنتیک نمونه مثبت برای تروفیرما ویپلی (نمونه WB14).



شکل شماره ۲. آنالیز فیلوژنتیک نمونه مثبت برای تروفیرما ویپلی (نمونه WB70).

بحث

با توجه به اینکه اسهال کودکان در کشور هنوز بعنوان یک معضل بهداشتی محسوب می شود و عوامل مختلفی از میکروارگانیسم ها می تواند دخیل باشد، لذا انجام مطالعات مختلف بر روی عوامل ایجاد کننده آن باعث روشن تر شدن سیمای اپیدمیولوژیک عوامل اتیولوژیک آن خواهد شد. از طرف دیگر، با وجود اینکه تروفريما وپیلی بعنوان یکی از عوامل اسهال کودکان در تمامی کشور های توسعه یافته و در حال توسعه مطرح می باشد اما هیچگونه اطلاعاتی از وضعیت شیوع این باکتری در ایران وجود ندارد. این مطالعه به منظور شناسایی تروفريما وپیلی در مدفوع کودکان مبتلا به اسهال انجام شد و نشان داده شد که ۹/۲۳ درصد کودکان بررسی شده در این مطالعه دارای آلودگی به تروفريما وپیلی بودند. مطالعات اخیر در دنیا موید این مطلب می باشد که تروفريما وپیلی یکی از علل اسهال در کودکان می باشد. در یک مطالعه در فرانسه نشان داده شد که این باکتری بطور معنی داری در کودکان مبتلا به گاستروانتریت شیوع بالاتری دارد (۱۲).

بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، تروفريما وپیلی در ۹/۲۳ درصد از نمونه های اسهال کودکان شیوع داشت. مقدار شیوع بدست آمده در این مطالعه در مقایسه با مطالعات مشابه در سایر کشورها کمتر می باشد بطوری که شیوع تروفريما وپیلی در اسهال کودکان در غنا ۲۷/۵ درصد (۱۳)، در فرانسه ۱۵ درصد (۱۲)، در گابن ۴۰ درصد (۲۰)، در لائوس ۴۸ درصد (۲۱) و در سنگال ۳۱/۲ درصد (۸) گزارش شده است. به هر حال شیوع بیماری در جمعیت ها با بهداشت پایین و در میان بستگان بیماراران یا ناقلین مزمن بیشتر است (۱). به علاوه شیوع اسهال ناشی از این باکتری در کودکان در مناطق گرمسیر و بویژه کشورهایی که سطح بهداشتی پایین را دارا می باشند بطور قابل توجهی بیشتر است (۱۲). به هر حال، با توجه به این داده ها بنظر می رسد که این باکتری نقش قابل توجهی در اسهال کودکان در سراسر دنیا داشته و باید مطالعات گسترده تری در مورد عوامل ایجاد کننده اسهال کودکان در سراسر دنیا انجام گردد تا نقش و اپیدمیولوژی تروفريما وپیلی در اسهال کودکان مشخص شود.

در ایران نقش تروفريما وپیلی در اسهال کودکان مشخص نشده است و این مطالعه برای اولین بار وجود این باکتری در اسهال کودکان در ایران را نشان داد. با این وجود، باید در مناطق و استان های مختلف ایران به بررسی شیوع این باکتری در اسهال کودکان پرداخته شود تا علاوه بر مشخص شدن اپیدمیولوژی این بیماری، باعث آگاهی به پزشکان بالینی و متخصصان کودکان در مورد تروفريما وپیلی شود. علاوه بر این باید تشخیص این باکتری در آزمایشگاه های بالینی و راه های پیشگیری و کنترل از این باکتری مورد توجه سیستم های بهداشتی در ایران و حتی سایر کشورها قرار گیرد.

یکی از محدودیت های مطالعه حاضر تعداد کم نمونه ها می باشد که توصیه می گردد که در مطالعات بعدی حجم نمونه بیشتر بررسی شده تا بتوان ارتباط بین مشخصات دموگرافیک و بالینی با شیوع تروفريما وپیلی مشخص نمود. همچنین در مطالعات بعدی

گروه های مختلف وارد مطالعه شوند تا نقش بیماری زمینه ای نیز در مورد این بیماری مشخص شود. از طرف دیگر، یکی از محدودیت مطالعه ما عدم وجود گروه کنترل (کودکان بدون اسهال) بود که باعث سخت تر شدن تفسیر نتایج شد.

Reference

1. Fenollar F, Lagier J-C, Raoult D. Tropheryma whipplei and Whipple's disease. *Journal of Infection*. 2014;69(2):103-12.
2. Dolmans RA, Boel CE, Lacle MM, Kusters JG. Clinical manifestations, treatment, and diagnosis of Tropheryma whipplei infections. *Clinical microbiology reviews*. 2017;30(2):529-55.
3. Schneider T, Moos V, Loddenkemper C, Marth T, Fenollar F, Raoult D. Whipple's disease: new aspects of pathogenesis and treatment. *The Lancet infectious diseases*. 2008;8(3):179-90.
4. Fenollar F, Puéchal X, Raoult D. Whipple's disease. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(1):55-66.
5. Moos V, Kunkel D, Marth T, Feurle GE, LaScola B, Ignatius R, et al. Reduced peripheral and mucosal Tropheryma whipplei-specific Th1 response in patients with Whipple's disease. *The Journal of Immunology*. 2006;177(3):2015-22.
6. Bonhomme C, Renesto P, Nandi S, Lynn A, Raoult D. Serological microarray for a paradoxical diagnostic of Whipple's disease. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2008;27(10):959-68.
7. Fenollar F, Keita AK, Buffet S, Raoult D. Intrafamilial circulation of Tropheryma whipplei, France. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(6):949.
8. Keita AK, Bassene H, Tall A, Sokhna C, Ratmanov P, Trape J-F, et al. Tropheryma whipplei: a common bacterium in rural Senegal. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(12).
9. Fenollar F, Trani M, Davoust B, Salle B, Birg M-L, Rolain J-M, et al. Prevalence of asymptomatic Tropheryma whipplei carriage among humans and nonhuman primates. *The Journal of infectious diseases*. 2008;197(6):880-7.
10. Bai JC, Mazure RM, Vazquez H, Niveloni SI, Smecuol E, Pedreira S, et al. Whipple's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2004;2(10):849-60.
11. Freeman HJ. Tropheryma whipplei infection. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(17):2078.
12. Raoult D, Fenollar F, Rolain J-M, Minodier P, Bosdure E, Li W, et al. Tropheryma whipplei in children with gastroenteritis. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(5):776.
13. Vinnemeier C, Klupp E, Krumkamp R, Rolling T, Fischer N, Owusu-Dabo E, et al. Tropheryma whipplei in children with diarrhoea in rural Ghana. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016;22(1):65. e1- e3.
14. Fenollar F, Laouira S, Lepidi H, Rolain J-M, Raoult D. Value of Tropheryma whipplei quantitative polymerase chain reaction assay for the diagnosis of Whipple disease: usefulness of saliva and stool specimens for first-line screening. *Clinical infectious diseases*. 2008;47(5):659-67.
15. Edouard S, Fenollar F, Raoult D. The rise of Tropheryma whipplei: a 12-year retrospective study of PCR diagnoses in our reference center. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(12):3917-20.
16. Kono M, Yamamoto K, Nagamatsu M, Kutsuna S. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of Whipple's disease. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2015;21(12):885-8.
17. Müller S, Vogt P, Altwegg M, Seebach J. Deadly carousel or difficult interpretation of new diagnostic tools for Whipple's disease: case report and review of the literature. *Infection*. 2005;33(1):39-42.

18. Fenollar F, Fournier P-E, Robert C, Raoult D. Use of Genome Selected Repeated Sequences Increases the Sensitivity of PCR Detection of *Tropheryma whippelii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(1):401-3.
19. Bousbia S, Papazian L, Auffray J-P, Fenollar F, Martin C, Li W, et al. *Tropheryma whippelii* in patients with pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16(2):258-63.
20. Ramharter M, Harrison N, Bühler T, Herold B, Lagler H, Lötsch F, et al. Prevalence and risk factor assessment of *Tropheryma whippelii* in a rural community in Gabon: a community-based cross-sectional study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(11):1189-94.
21. Dubot-Pérès A, Phommasone K, Sibounheuang B, Vongsouvath M, Mayxay M, Raoult D, et al. High prevalence of *Tropheryma whippelii* in Lao kindergarten children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):e0003538.

ردیابی مولکولی تروفیما ویپلی در موارد اسهال کودکان در ایران: یک مطالعه

مقدماتی

زمینه: یکی از معضلات بهداشتی در دنیا، اسهال کودکان می باشد که میکروارگانیسم های مختلفی در ایجاد آن دخیل می باشند. تروفیما ویپلی یکی از عامل ایجاد اسهال کودکان در دنیا است ولی مطالعات محدودی روی آن صورت گرفته و در ایران نیز در ارتباط با شیوع آن در بین کودکان هیچ اطلاعاتی در دسترس نیست. لذا این مطالعه با هدف ارزیابی حضور این باکتری در کودکان مبتلا به سرطان و دارای اسهال می باشد.

روش کار: این مطالعه مقطعی از جولای سال ۲۰۱۸ تا فوریه ۲۰۱۹ در شهر قم (در مرکز ایران) انجام گردید. نمونه های مدفوع از ۱۳۰ کودک مبتلا به اسهال و با سابقه ابتلا به سرطان جمع آوری شده و با دو روش Taq-man Real-time PCR و SYBR Green Real-time PCR برای تشخیص تروفیما ویپلی آزمایش شدند.

نتایج: در مجموع ۱۳ مورد از ۱۳۰ نمونه (۱۰ درصد) آلوده به تروفیما ویپلی بودند که با هر دو روش SYBR Green Real-time PCR و Taq-man Real-time PCR مثبت بودند. نمونه های مثبت توالی یابی شده و موارد شناسایی شده تایید نهایی شدند. در این مطالعه بین کاهش وزن ($P_value=0.07$) و تعریق شبانه ($P_value=0.07$) با شیوع تروفیما ویپلی ارتباط بسیار ضعیفی مشاهده شد.

نتیجه گیری: این به عنوان اولین مطالعه در ایران، شیوع باکتری تروفیما ویپلی در بین کودکان مبتلا به سرطان و دارای اسهال مورد بررسی قرار داد. نتایج مان نشان داد که این باکتری دارای شیوع قابل توجهی بوده و میتواند باعث گاستروانتریت در کودکان به ویژه افراد داری بیماری های زمینه ای گردد.

کلمات کلیدی: تروفیما ویپلی، اسهال، کودکان، ایران.

مقدمه

تروفیما ویپلی (*Tropheryma whipplei*) یک باکتری گرم مثبت و باسیلی داخل سلولی است که ابتدا در سال ۱۹۰۷ توصیف شد. این باکتری عامل ایجاد بیماری ویپل است که منجر به عفونت های مزمن، حاد و سیستمیک می شود (۱). این باکتری در گروه اکتینومیست ها قرار دارد و جایگاه آن روده انسان می باشد و هنگام استقرار در مخاط روده، توسط سلولهای ماکروفاژ جمع آوری شده و درون این سلولهای ایمنی تکثیر می کند (۲-۴). مخزن اصلی این باکتری ناقلین بدون علامت هستند. علی رغم ایجاد پاسخ ایمنی در برخورد اول ناقلین با این باکتری، این افراد میتوانند مدت طولانی حامل این باکتری باشند که منجر به انتشار آن در سطح جامعه شوند (۲، ۳). در نمونه های مختلفی از جمله بزاق، ادرار، خون، دریچه قلبی، میوکاردا، مایع سینوویال، عضله اسکلتی، مدفوع، پوست، غدد لنفاوی، ریه، مایع برونکو آلوئولار، معده، طحال، کبد، حنجره و روده کوچک، نمونه روده بزرگ، سینوس فک بالا، مایع مغزی نخاعی، مغز و مایع زلالیه این باکتری یافت شده است (۲، ۵، ۶). معمولاً انتقال بیماری از راه دهان به دهان و مدفوع به دهان صورت می گیرد (۲، ۴)

برخی مطالعات نشان می دهند که ۴۸ درصد از جمعیت عمومی در اروپا (۷)، و ۷۲ درصد از جمعیت سنگال دارای آنتی بادی علیه باکتری هستند (۸). نتایج فوق نشان می دهد که شیوع تروفیما ویپلی در نمونه های مدفوع افراد بدون علامت در جمعیت عمومی اروپا بین ۱/۵ تا ۴ درصد متغیر است. اما می تواند شیوع بیشتری (بین ۱۲ تا ۲۵ درصد) در بین جمعیت هایی نظیر کارگران فاضلاب، افراد آلوده به HIV و بی خانمان ها داشته باشد (۲). بار تروفیما ویپلی در مدفوع بالاتر از نمونه های بزاق است. میزان باکتری در نمونه های مدفوع نیز در بیماران علامتدار نسبت به حامل ها به طور قابل توجهی بیشتر است که این نشان می دهد که بار زیاد باکتری با عفونت های علامت دار تروفیما ویپلی همراه است (۹). تظاهرات بالینی بیماری ویپل به چهار صورت می باشد: (الف) بیماری کلاسیک ویپل (ب) عفونت های مزمن موضعی (ج) عفونت های حاد و (د) عفونت های بدون علامت (۲، ۴). بیشتر بیماران مبتلا به ویپل مرد (۷۳ تا ۸۷ درصد) هستند که در گروه سنی ۴۸ تا ۵۴ سال قرار دارند و علائم بالینی مختلفی نظیر ورم مفاصل متناوب اولیه (۷۳ تا ۸۰ درصد) یا مشکلات گوارشی مزمن همراه با اسهال (۷۲ تا ۸۱ درصد) و یا کاهش وزن (۷۹ تا ۹۳ درصد) در آنها بروز می کند. گاهی اوقات بیماران طی یک دوره طولانی (۷-۸ سال)، فقط تعداد کمی از علائم را دارند و پس از گذشت این دوره، سایر علائم ایجاد می شوند. از شایع ترین علائم بیماران مبتلا به بیماری کلاسیک ویپل می توان به آرتراالژی، اسهال، اسهال چرب، کاهش وزن، لنفادنوپاتی، درد شکم، هیپوآلبومینمی و کم خونی اشاره کرد (۱، ۱۰). این باکتری گاهاً باعث مواردی از بیماری عصبی، تغییرات در چشم و اندوکاردیت کشت منفی می شود (۱۱).

تروفیما ویپلی علاوه بر بیماری مزمن می تواند منجر به ایجاد بیماری حاد شود که در گاستروانتریت حاد، باکتری می و یا پنومونی بروز می کند. در ۱۵٪ مدفوع کودکان مبتلا به گاستروانتریت این باکتری شناسایی شده و آنتی بادی برویت گردیده است ولی در گروه کنترل آنتی بادی مشاهده نشده است. هم چنین بعد از بهبود اسهال در کودکان نیز، باکتری مشاهده نشده است که نشانگر نقش این باکتری در ایجاد اسهال حاد کودکان است (۱۲، ۱۳).

متداول ترین روش های معمول تشخیصی تروفیما ویپلی، هیستوپاتولوژی و PCR می باشند، ولی کشت بسیار دشوار است و تنها در چند آزمایشگاه محدود در دنیا می تواند انجام شود (۲). تست PCR بر روی نمونه های مختلف غیر تهاجمی می تواند به عنوان یک نسخه آزمایش آسان، بسیار حساس و اختصاصی و مقرون به صرفه قبل از تشخیص مبتنی بر نمونه بیوپسی باشد. بررسی هیستوپاتولوژی نمونه های بیوپسی یک روش پرهزینه و تهاجمی است، بنابراین به طور متداول برای اهداف غربالگری مورد استفاده قرار نمی گیرد و معمولاً فقط برای تأیید تشخیص در صورت ظن جدی عفونت انجام می شود (۱۴-۱۷).

یکی از معضلات بهداشتی در ایران، اسهال کودکان و بویژه در کودکان دارای نقص ایمنی، می باشد که میکروارگانیسم های مختلفی در ایجاد آن در آن دخیل می باشند. در نتیجه برای شناخت عوامل اتیولوژیک و بررسی های دقیق اپیدمیولوژیک هر یک از عوامل ایجاد کننده اسهال، مطالعات اختصاصی ضروری است. به علاوه باکتری تروفیما ویپلی، عامل ایجاد اسهال کودکان در دنیا است و مطالعات محدودی روی آن صورت گرفته و در کشور ایران نیز در ارتباط با شیوع آن در بین کودکان هیچ اطلاعاتی در دسترس نیست. در نتیجه جهت شناسایی این میکروارگانیسم و علائم بالینی مرتبط با آن، این مطالعه به عنوان یک مطالعه اولیه انجام شد.

مواد و روش

مجوز اخلاقی: این طرح در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قم با کد IR.MUQ.REC.1396.89 مصوب و برای انجام کار، فرم رضایت نامه کتبی از والدین کودکان دریافت شد

جمع آوری نمونه: این مطالعه مقطعی از آگوست سال ۲۰۱۸ تا مارچ ۲۰۱۹ در شهر قم (در مرکز ایران) انجام گردید. در این مطالعه کودکان مراجعه کننده به بیمارستان کودکان حضرت معصومه شهر قم که اسهال و سابقه ابتلا به نقص ایمنی، وارد مطالعه شدند. یک پرسشنامه شامل خصوصیات دموگرافیک، علایم بالینی و شواهد آزمایشگاهی برای هر نفر تکمیل گردید. از هر کودک مبتلا به اسهال حدود ۱۰ گرم مدفوع اسهالی در ظروف استریل جمع آوری شده و سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید.

تخلیص DNA و تشخیص مولکولی: جهت استخراج DNA از نمونه های مدفوع به روش توصیف شده Yang و همکاران استفاده شد. بطور خلاصه، ۲۰ میلی گرم از هر نمونه مدفوع در ۱ میلی لیتر PBS حل شد و سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دور ۱۰۰g سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی (سوپرناتانت) برداشت شده و رسوب (پلیت) دور ریخته شدند. محلول رویی (supernatant) پس از انتقال به میکوبیوب استریل، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور 13000g سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت دور ریخته شد. پس از آن، جهت حذف مهار کننده های PCR، رسوب سه بار با ۳۰۰ میکرولیتر استون شستشو داده شدند (هر مرحله سانتریفیوژ دور 13000g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد). در هر مرحله بعد از اضافه کردن استون ورتکس و بعد سانتریفیوژ انجام گردید و در هر مرحله مایع رویی دور ریخته شد. pellet با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شده، جهت ترکیب کامل محلول، ورتکس مختصری انجام شدند. در نهایت نمونه ها جهت استخراج ژنوم، در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه توسط حمام آب گرم جوشاندنیده شدند و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس نمونه ها در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی (سوپرناتانت) به میکروتیوب استریل جدید منتقل شد و در دمای ۲۰- سانتیگراد جهت انجام پروسه PCR ذخیره شدند.

تمامی نمونه های DNA استخراج شده با دو روش SYBR Green Real-time PCR و Taq-man Real-time PCR برای تشخیص تروفیما وپیلی آزمایش شدند. برای روش سایبر گرین، از پرایمر TWS1F (-5' (5'-AGCCTTTGCCAGACAGACAC-3') Tws1R و پرایمر (AGAGAGATGGGGTGCAGGAC-3' استفاده شد. در این روش حجم هر واکنش ۲۰ میکرولیتر بود که حاوی ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین RealQ Plus 2x (AmpliQon, Denmark) Master Mix Green Low ROX™، ۹۰۰ نانو مول پرایمر فوروارد، ۹۰۰ نانو مول پرایمر ریورس، ۴ میکرولیتر آب مقطر تزریقی و ۴ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده بود. برنامه دمایی با فعال سازی اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، و ۴۰ سیکل بصورت سه مرحله ای (۹۵ درجه سانتیگراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه) همراه با مرحله ملتینگ بود (۱۸). این تست با استفاده از دستگاه Corbett 6000 Rotor-Gene (Corbett, Victoria, Australia) system انجام شد. نمونه هایی که دارای منحنی تکثیر بودند و دمای ملتینگ آنها در حدود ۸۱ درجه سانتیگراد بود بعنوان مثبت در نظر گرفته شدند. نمونه های مثبت توالی یابی (شرکت ژنومین، ایران) شدند.

همه نمونه ها مجدداً با استفاده از روش Taq-man Real-time PCR تست شدند. آزمایش Taq-man Real-time PCR با حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر انجام شد که حاوی ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس تجاری ۲ RealQ Plus Master Mix (AmpliQon)، دانمارک، ۹۰۰ نانومول از پرایمر T_whi3_F (TTGTGTATTTGGTATTAGATGAAACAG)، ۹۰۰ نانومول پرایمر T_whi3_R (CCCTACAATATGAAACAGCCTTTG)، پروب FAM_5'-۶ (GGGATAGAGCAGGAGGTGTCTGTCTGG- 3'BHQ-1) و ۴ میکرولیتر از DNA الگو بود که با آب مقطر تزریقی دیونایز به حجم ۲۰ میکرولیتر می رسید. این تست با استفاده از دستگاه Corbett 6000 Rotor-Gene system

Corbett, Victoria, Australia)) با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ سیکل با برنامه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد (۱۹). در تمامی آزمایشات از DNA تروفیما ویپلی تهیه شده بصورت لیوفریزه از IRCCS Sacro Cuore Don Calabria Hospital کشور ایتالیا) بعنوان کنترل مثبت و از آب مقطر تزریقی نیز بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

آنالیز آماری: اطلاعات به دست آمده از این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد. سطح معنادار مقدار p کمتر از ۰.۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

۱۳۰ کودک در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی کودکان $۴۰/۴۹ \pm ۵۶/۷۲$ ماه بود که ۶۰/۸ درصد از آن مذکر و ۳۹/۲ درصد مذکر بودند. مدت زمان نقص ایمنی بیماران از ۱۸ روز تا ۷۲ ماه متغیر بود (میانگین \pm انحراف معیار: $۱۱/۵۱ \pm ۱۵/۲۷$ ماه). بیشترین بیماران وارد شده در مطالعه، افرادی بودند که دارای دو سال نقص ایمنی ($۲۵/۴$ ٪) بودند. ۱۲۱ بیمار (۹۳/۱ درصد) در حین مطالعه تحت شیمی درمانی بودند. مدت زمان شیمی درمانی بین ۱-۷۲ ماه متغیر بود (میانگین \pm انحراف معیار: $۱۱/۹ \pm ۱۵/۲۳$ ماه). بیماران با ۲۴ ماه که تحت شیمی درمانی قرار داشتند، بیشترین بیماران وارد شده در این مطالعه بودند. عمده بیماران (۷۷/۷٪) دارای نقص ایمنی لوسمی حاد لنفاوی (ALL) و ۱۹ مورد (۱۴/۶٪) دارای NHL (Non-Hodgkin Lymphoma) بودند. در بین افراد بی اشتها بی اشتها با ۸۹/۱٪ (۱۱۵ مورد) و کاهش وزن با ۶۱/۵ درصد (۸۰ مورد) بیشترین یافته ها مرتبط با بیماری نقص ایمنی بیماران بودند. تعریق شبانه نیز در ۴۷ بیمار (۳۶/۲٪) مشاهده شد.

۹۸/۵ درصد کودکان مبتلا به اسهال خونی و ۱/۵ درصد مبتلا به اسهال آبکی بودند. از نظر سایر علائم بالینی، تب با ۱۲۰ مورد (۹۳٪) بیشترین یافته بدست آمده بود. بعد از آن استفراغ با ۹۸ مورد (۷۵/۴٪)، کرامپ ۵۵ مورد (۴۲/۳٪) و درد شکم نیز ۴۵ مورد (۳۴/۶٪) مشخص شد.

در مجموع ۱۳ مورد از ۱۳۰ نمونه (۱۰ درصد) آلوده به تروفیما ویپلی بودند که با هر دو روش SYBR Green Real-time PCR و Taq-man Real-time PCR probe مثبت بودند. همه ۱۳ مورد از بیماران دارای اسهال خونی و بی اشتها، ۱۲ مورد دارای استفراغ و ۱۱ مورد دارای تب بودند. ۱۲ مورد (۹۲/۳ درصد) و ۱ مورد (۷/۷ درصد) از افراد آلوده به تروفیما ویپلی، مبتلا به سرطان های لوسمی حاد لنفاوی (ALL) و Non-Hodgkin Lymphoma به ترتیب بودند. بیشترین موارد ایزولاسیون باکتری در پائیز (۱۱ مورد- ۸۵٪) بود که ماه نوامبر (۴۶٪) را به خود اختصاص داد. هیچکدام از بیماران آلوده به تروفیما ویپلی، سابقه مسافرت، مصرف آب و غذای آلوده و سابقه بیماری مشابه در خانواده را نداشتند. در این مطالعه بین کاهش وزن ($P_value=0.07$) و تعریق شبانه ($P_value=0.07$) با شیوع تروفیما ویپلی ارتباط بسیار ضعیفی مشاهده شد. سایر مشخصات دموگرافیک و بالینی ارتباط معنی با شیوع تروفیما ویپلی نداشتند. اطلاعات بیشتر در جدول ۱ ارائه شده است. نمونه های مثبت توالی یابی شده و موارد شناسایی شده تایید نهایی شدند (Accession number در بانک ژن MT380911).

جدول ۱. آنالیز آماری مشخصات دموگرافیک و بالینی کودکان دچار اسهال و ارتباط آن با شیوع تروفیما ویپلی.

Total	Negative	Positive	P Value
-------	----------	----------	---------

		No. (%)	No. (%)	No. (%)	
Age (month)	more than 15.23	62 (47.7)	57 (91.9)	5 (8.1)	0.48
	less than 15.23	68 (52.3)	60(88.2)	8 (11.8)	
Sex	Male	79 (60.8)	72 (91.1)	7 (8.9)	0.59
	Female	51 (39.2)	45(88.2)	6 (11.8)	
Bloody Diarrhea	Yes	125 (96.2)	112 (89.6)	13 (10.4)	0.99
	No	5 (3.8)	5 (100)	0 (0.0)	
Watery Diarrhea	Yes	3 (2.3)	3 (100)	0 (0.0)	0.99
	No	127 (97.7)	114 (89.8)	13 (10.2)	
Fever	Yes	120 (93.0)	109 (90.8)	11 (9.2)	0.23
	No	10 (7.0)	8 (80.0)	2 (20.0)	
Pain	Yes	45 (34.6)	40 (88.9)	5 (10.1)	0.77
	No	85 (65.4)	77 (90.6)	8 (9.4)	
Cramp	Yes	55 (42.3)	48 (87.3)	7 (12.7)	0.38
	No	75 (57.7)	69 (92)	6 (8.0)	
Vomiting	Yes	98 (75.4)	86 (87.8)	12 (12.2)	0.17
	No	32 (24.6)	31 (96.9)	1 (3.1)	
Weight Lose	Yes	80 (61.5)	69 (86.2)	11 (13.8)	0.07
	No	50 (38.5)	48 (96.0)	2 (4.0)	
Night swelling	Yes	47 (36.2)	39 (83.0)	8 (17.0)	0.07
	No	83 (63.8)	78 (94.0)	5 (6.0)	
Anorexia	Yes	115 (89.1)	102 (88.7)	13 (11.3)	0.36
	No	15 (10.9)	15 (100)	0 (0.0)	
Antibiotic consume	Yes	75 (57.7)	67 (89.3)	8 (10.7)	0.77
	No	55 (42.3)	50 (90.9)	5 (9.1)	
Omeprazole consume	Yes	56 (43.1)	52 (92.9)	4 (7.1)	0.35
	No	74 (56.9)	65 (87.8)	9 (12.2)	

بحث

اسهال یکی از مشکلات عمده در بیماران دارای نقص ایمنی می باشد. عوامل ایجاد کننده اسهال در این بیماران متفاوت از بیماران با سیستم ایمنی نرمال می باشد. این باکتری می تواند باعث گاستروانتریت در افراد به ویژه کودکان با شرایط ایمنی خاص گردد. در این مطالعه برای اولین بار در ایران، شیوع باکتری تروفريما وپیلی در بین کودکان مبتلا به اسهال و نقص ایمنی مورد بررسی قرار گرفت. عمدتاً در بیماران دارای سرطان، بیماری های عفونی ناشی از باکتری ها و پروتوزواها افزایش می یابد. در این بیماران میکروبیوم روده در بیماران تحت شیمی درمانی می تواند تغییر کرده و با باکتری های پاتوژن جایگزین شود. مطالعات اخیر در دنیا موید این مطلب می باشد که تروفريما وپیلی یکی از علل اسهال در کودکان می باشد. در یک مطالعه در فرانسه نشان داده شد که این باکتری بطور معنی داری در کودکان مبتلا به گاستروانتریت شیوع بالاتری دارد (۱۲).

بر اساس نتایج بدست آماده در این مطالعه، تروفیرما ویپلی در ۱۰ درصد از نمونه های اسهال کودکان شیوع داشت. مقدار شیوع بدست آمده در این مطالعه در مقایسه با مطالعات مشابه در سایر کشورها کمتر می باشد بطوری که شیوع تروفیرما ویپلی در اسهال کودکان در غنا ۲۷/۵ درصد (۱۳)، در فرانسه ۱۵ درصد (۱۲)، در گابن ۴۰ درصد (۲۰)، در لائوس ۴۸ درصد (۲۱) و در سنگال ۳۱/۲ درصد (۸) گزارش شده است. به هر حال شیوع بیماری در جمعیت ها با بهداشت پایین و در میان بستگان بیماران یا ناقلین مزمن بیشتر است (۱). به علاوه شیوع اسهال ناشی از این باکتری در کودکان در مناطق گرمسیر و بویژه کشورهایی که سطح بهداشتی پایین را دارا می باشند بطور قابل توجهی بیشتر است (۱۲). به هر حال، با توجه به این داده ها بنظر می رسد که این باکتری نقش قابل توجهی در اسهال کودکان در سراسر دنیا داشته و باید مطالعات گسترده تری در مورد عوامل ایجاد کننده اسهال کودکان در سراسر دنیا انجام گردد تا نقش و اپیدمیولوژی تروفیرما ویپلی در اسهال کودکان مشخص شود.

با توجه به نتایج مان، شیوع این بیماری در فصل پاییز بیشتر بود. این یافته مطابق با نتایج Fenollar و همکاران بود کسانی که گزارش کردند که تروفیرما ویپلی در پاییز شیوع بالاتری داشت

در ایران نقش تروفیرما ویپلی در اسهال کودکان مشخص نشده است و این مطالعه برای اولین بار وجود این باکتری در اسهال کودکان در ایران را نشان داد. با این وجود، باید در مناطق و استان های مختلف ایران به بررسی شیوع این باکتری در اسهال کودکان پرداخته شود تا علاوه بر مشخص شدن اپیدمیولوژی این بیماری، باعث آگاهی به پزشکان بالینی و متخصصان کودکان در مورد تروفیرما ویپلی شود. علاوه بر این باید تشخیص این باکتری در آزمایشگاه های بالینی و راه های پیشگیری و کنترل از این باکتری مورد توجه سیستم های بهداشتی در ایران و حتی سایر کشورها قرار گیرد.

یکی از محدودیت های مطالعه حاضر تعداد کم نمونه ها می باشد که توصیه می گردد که در مطالعات بعدی حجم نمونه بیشتر بررسی شده تا بتوان ارتباط بین مشخصات دموگرافیک و بالینی با شیوع تروفیرما ویپلی مشخص نمود. همچنین در مطالعات بعدی گروه های مختلف وارد مطالعه شوند تا نقش بیماری زمینه ای نیز در مورد این بیماری مشخص شود. از طرف دیگر، یکی از محدودیت مطالعه ما عدم وجود گروه کنترل (کودکان بدون اسهال) بود که باعث سخت تر شدن تفسیر نتایج شد.

Reference

1. Fenollar F, Lagier J-C, Raoult D. Tropheryma whipplei and Whipple's disease. Journal of Infection. 2014;69(2):103-12.
2. Dolmans RA, Boel CE, Lacle MM, Kusters JG. Clinical manifestations, treatment, and diagnosis of Tropheryma whipplei infections. Clinical microbiology reviews. 2017;30(2):529-55.

3. Schneider T, Moos V, Loddenkemper C, Marth T, Fenollar F, Raoult D. Whipple's disease: new aspects of pathogenesis and treatment. *The Lancet infectious diseases*. 2008;8(3):179-90.
4. Fenollar F, Puéchal X, Raoult D. Whipple's disease. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(1):55-66.
5. Moos V, Kunkel D, Marth T, Feurle GE, LaScola B, Ignatius R, et al. Reduced peripheral and mucosal *Tropheryma whipplei*-specific Th1 response in patients with Whipple's disease. *The Journal of Immunology*. 2006;177(3):2015-22.
6. Bonhomme C, Renesto P, Nandi S, Lynn A, Raoult D. Serological microarray for a paradoxical diagnostic of Whipple's disease. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2008;27(10):959-68.
7. Fenollar F, Keita AK, Buffet S, Raoult D. Intrafamilial circulation of *Tropheryma whipplei*, France. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(6):949.
8. Keita AK, Bassene H, Tall A, Sokhna C, Ratmanov P, Trape J-F, et al. *Tropheryma whipplei*: a common bacterium in rural Senegal. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(12).
9. Fenollar F, Trani M, Davoust B, Salle B, Birg M-L, Rolain J-M, et al. Prevalence of asymptomatic *Tropheryma whipplei* carriage among humans and nonhuman primates. *The Journal of infectious diseases*. 2008;197(6):880-7.
10. Bai JC, Mazure RM, Vazquez H, Niveloni SI, Smecuol E, Pedreira S, et al. Whipple's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2004;2(10):849-60.
11. Freeman HJ. *Tropheryma whipplei* infection. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(17):2078.
12. Raoult D, Fenollar F, Rolain J-M, Minodier P, Bosdure E, Li W, et al. *Tropheryma whipplei* in children with gastroenteritis. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(5):776.
13. Vinnemeier C, Klupp E, Krumkamp R, Rolling T, Fischer N, Owusu-Dabo E, et al. *Tropheryma whipplei* in children with diarrhoea in rural Ghana. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016;22(1):65. e1- e3.
14. Fenollar F, Laouira S, Lepidi H, Rolain J-M, Raoult D. Value of *Tropheryma whipplei* quantitative polymerase chain reaction assay for the diagnosis of Whipple disease: usefulness of saliva and stool specimens for first-line screening. *Clinical infectious diseases*. 2008;47(5):659-67.
15. Edouard S, Fenollar F, Raoult D. The rise of *Tropheryma whipplei*: a 12-year retrospective study of PCR diagnoses in our reference center. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(12):3917-20.
16. Kono M, Yamamoto K, Nagamatsu M, Kutsuna S. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of Whipple's disease. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2015;21(12):885-8.
17. Müller S, Vogt P, Altwegg M, Seebach J. Deadly carousel or difficult interpretation of new diagnostic tools for Whipple's disease: case report and review of the literature. *Infection*. 2005;33(1):39-42.
18. Fenollar F, Fournier P-E, Robert C, Raoult D. Use of Genome Selected Repeated Sequences Increases the Sensitivity of PCR Detection of *Tropheryma whipplei*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(1):401-3.
19. Bousbia S, Papazian L, Auffray J-P, Fenollar F, Martin C, Li W, et al. *Tropheryma whipplei* in patients with pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16(2):258-63.
20. Ramharter M, Harrison N, Bühler T, Herold B, Lagler H, Lötsch F, et al. Prevalence and risk factor assessment of *Tropheryma whipplei* in a rural community in Gabon: a community-based cross-sectional study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(11):1189-94.
21. Dubot-Pérès A, Phommasone K, Sibounheuang B, Vongsouvath M, Mayxay M, Raoult D, et al. High prevalence of *Tropheryma whipplei* in Lao kindergarten children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):e0003538.

ردیابی مولکولی فرانسیسلا تولارنسیس در نشخوارکنندگان کوچک و کنه های جمع آوری شده از آنها در غرب ایران

Molecular detection of *Francisella tularensis* in small ruminants and their ticks in western Iran

Abstract

Francisella tularensis is the causative agent of tularemia an infectious zoonotic disease. We attempted the molecular detecting of *F. tularensis* in small ruminants and ticks attached to these animals in Kurdistan province (the west of Iran). In this study, 250 blood and 244 tick samples were collected from sheep and goats and were tested for *F. tularensis* ISFtu2 gene detection using the Real Time-TaqMan PCR method. The collected ticks were morphologically classified as *Dermacentor marginatus* (67.2%), *Rhipicephalus turanicus* (12.30%), *Rhipicephalus sanguineus* (10.66%), and *Haemaphysalis concinna* (9.83%). No positive *F. tularensis* were identified in animal blood samples. *F. tularensis* was detected in 2 (0.82%) ticks samples. Positive samples were identified as *F. tularensis* subsp. *holarctica* and collected from *D. marginatus* ticks and Divandareh county. In this study, the presence of *F. tularensis* in ticks of Kurdistan province was confirmed, the possible role of ticks in the transmission to livestock and human through tick bites in this region should be considered.

Keywords: Tularemia, Tick, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Livestock, Tick-borne disease

1. Introduction

Francisella tularensis is a zoonotic pathogen that can cause tularemia with different clinical manifestations in humans. The clinical forms of tularemia depend on how the bacteria enter the body. *F. tularensis* is transmitted to humans through the skin and mucosal contact, conjunctival route, and respiratory or gastrointestinal ways. Wild mammals, domestic animals, birds, fish, and arthropods can be the reservoirs of this organism. Arthropods, mainly ticks, can act as a biological vector of *F. tularensis* that may transmit the infection to humans and animals [1-4]. *F. tularensis* is classified into three subspecies (*tularensis*, *holarctica*, and *mediasiatica*) with different reservoirs, life cycles, and geographic distribution. Tularemia in humans is caused by *tularensis* and *holarctica* subspecies of *Francisella*. *F. tularensis* subsp. *tularensis* is the most virulent subspecies in humans and animals [1]. *Francisella novicida*, a separate species, is associated with the rare disease in immunocompromised humans [5].

F. tularensis is more common in the Northern Hemisphere, especially in North America and Eurasia. However, it has been also reported in Australia [1, 6]. Tularemia has been reported in

humans or animals in several neighbors of Iran, such as Turkey and Armenia [7, 8]. There is evidence of *F. tularensis* infection in humans, wild mammals, and livestock (including sheep, cows, hedgehogs, rodents, and hares) in some parts of Iran, including west, northwestern, southwestern, northern, northeastern, and southeastern regions. In 1972, a recent infection with *F. tularensis* was reported for the first time in Iran in 8 sheep, 3 cows, and 1 hedgehog [9]. Serological and molecular assays showed that tularemia is endemic in some provinces in Iran, such as Sistan and Baluchestan, and Kurdistan, and is becoming widespread in Iran [10]. Recently, human tularemia was reported following hare meat consumption and water contamination in Kurdistan and East Azerbaijan Provinces (the west and northwestern Iran, respectively [11, 12]. Using the Real Time-TaqMan Polymerase chain reaction (Real Time-TaqMan PCR) method, IS*Ftu2* and *fopA* genes of *Francisella* were detected in 17.09% and 5.13% of surface water samples collected from Kurdistan and Western Azerbaijan provinces [13].

Ticks are mainly associated with tularemia in humans and livestock and maintain *F. tularensis* lifecycle for a long time between the host and environment [1]. The prevalence of *F. tularensis* in ticks varies worldwide and has been reported in various ticks genera and species such as *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* [14-17]. These ticks have been isolated from livestock in different regions of Iran [18]. Although there is serological evidence of *F. tularensis* infection in humans and animals in the Kurdistan province, as an endemic region in Iran, no molecular data are available on *F. tularensis* infection in vectors and animals. Therefore, the aim of the present study was the molecular evaluation of *F. tularensis* in small ruminants and their ticks using the Real Time-TaqMan PCR method.

2. Material and methods

2.1 Sample collection

The samples were collected from 22 August 2020 to 21 September 2020 in Kurdistan province (western Iran). Overall, 250 blood samples were taken from different small ruminants (sheep and goats flocks) in Baneh, Divandareh, Marivan, and Sanandaj counties. All small ruminants were randomly selected. These animals were healthy, and no acaricide or antibiotic treatment was performed for any animals. The blood samples of small ruminants were added into tubes containing EDTA and then stored at 4-8 °C until transferred to the laboratory.

After blood collection from sheep and goats, the skin surface of animals was examined for tick infestation. One tick per infected animal with ticks was removed and collected in a separated tube. Six (2.4%) animals did not have any ticks on their skin surface. Overall, 244 ticks were collected from 244 animals. All collected ticks were investigated individually in this study. Collected ticks and blood samples were transferred to the Faculty of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University under the cooling condition.

The genus and species of collected ticks were identified by a parasitologist according to previously described taxonomic and morphological keys to identify ticks [11].

All blood samples and identified ticks were sent to the National Reference Laboratory for Plague, Tularemia, and Q Fever in the Pasteur Institute of Iran for DNA extraction and molecular test.

2.2. DNA extraction

Before DNA extraction from collected ticks, the salivary gland and sexual organ of each tick were dissected and transferred to a sterile 1.5 ml microtube. These samples were exposed to liquid nitrogen in a clean porcelain mortar for drying and finely chopped. Then, genomic DNA was extracted using G-spin™ total DNA Extraction Mini Kit (iNtRON, Korea) according to the manufacturer's instructions. Total DNA was individually extracted from each tick sample.

Moreover, genomic DNA from animal blood samples was extracted using a commercial kit (FavorPrep Blood/Cultured Cell Genomic DNA Extraction Mini Kit, Favorgen Biotech, Taiwan) and provided recommendations by the manufacturer.

All isolated DNA samples were verified to quality control by gel electrophoresis and then stored at -20°C for future experiments.

2.3. Real Time-PCR for detection of *F. tularensis*

The Real Time-TaqMan PCR method was performed to examine the presence of the IS*ftu2* gene of *F. tularensis* in DNA extracted from animal blood and their ticks samples. The following designed specific probe and primers were applied to amplifying a fragment of IS*ftu2* gene with a size of 97 bp: Forward primer: 5'-TTGGTAGATCAGTTGGTAGGATAACC-3'; Reverse primer: 5'-TGAGTTTTATCCTCTGACAACAATATTTTC-3'; Probe: 5'-FAM-AAAATCCATGCTATGACTGATGCTTTAGGTAATCCA-TAMRA-3'. Positive and negative controls were *F. tularensis* subsp *holarctica* NCTC 10857 and sterile distilled water, respectively. The Real Time-TaqMan PCR mixture was included 4 µl of the extracted DNA sample, 10 µl of RaelQ Plus Master Mix2x (Ampliqon, Denmark), 200 nM probe, 900 nM of forward and reverse primers. This mixture was volumed to 20 µl with sterile distilled water. Rotor-Gene system 6000 Corbett (Corbett, Victoria, Australia) was programmed to initial denaturation at 95°C for 10 min, and then 45 cycles of 94°C for 15 sec and 60°C for 60 sec. The Real Time-TaqMan PCR results were analyzed using Rotor-Gene® Q 2.3.5 software (QIAGEN).

2.4. Identification of *F. tularensis* subspecies

The presence of the *16S rRNA* gene was screened in positive samples using specific primers via PCR [19]. For *F. tularensis* subspecies identification, the presence of *RDI* and *pdpD-2* genes were also examined using PCR subtyping assays, according to WHO guidelines [20]. Primer sequences and sizes of amplified gene products for the subspecies identification are shown in Table 1 [20]. *F. tularensis* subsp *holarctica* NCTC 10857 was used as the positive control. The PCR mixture was included 5 µl of DNA sample, 10 µl of TEMpase Hot Star 2x Master Mix BLUE (Ampliqon, Denmark), 900 nM forward, and reverse primers that reached a final volume of 25 µl with deionized sterile distilled water. The amplifications were performed in the system under the following conditions: For *RDI* gene: initial denaturation at 95°C for 15 min, and then 36 cycles of 95°C, 57°C, and 72°C for 30 sec, 45, and 60 sec, respectively. Then, 72°C for 10 min. For *pdpD-*

2 gene: initial denaturation at 95°C for 15 min, and then 40 cycles of 95°C, 54°C, and 72°C for 30 sec, 30, and 45 sec, respectively; then, 72°C for 10 min.

To verify positive *F. tularensis*, sequencing of *RDI* and *16S rRNA* amplicons was performed using the Sanger sequencing method. Phylogenetic analyses were done by Mega (Version X) and Seaview (Version 4) software.

Table 1. Primers sequences and product size for identification of *F. tularensis* subsp using the PCR method.

Gene	Primer sequences (5'→3')	<i>F. tularensis</i> subspecies			
		based on product size (bp)			
		<i>tularensis</i>	<i>holarctica</i>	<i>mediasiatica</i>	<i>novicida</i>
<i>pdpD-2</i>	F: TGGGTTATTCAATGGCTCAG R: TCTTGCACAGCTCCAAGAGT	136	-	280	280
<i>RDI</i>	F: TTTATATAGGTAAATGTTTTACCTGTACCA R: GCCGAGTTTGATGCTGAAAA	1522	924 or 1150	1453	3322

2.5. Statistical analysis

The result of the present study was statistically analyzed in SPSS21 software. The Chi-square test was used to compare the variables during the analysis. A p-value ≤ 0.05 was considered as a significant difference.

3. Results

3.1. Sample characteristics

Among 250 small ruminants, 93.2% and 6.8% of them were female and male, respectively. Based on the livestock species, 232 (92.8%) of them were sheep, and 18 (7.2%) were goats. Blood samples were collected from different areas of Kurdistan province, including Divandareh (186 samples), Marivan (46 samples), Baneh (13 samples), and Sanandaj (5 samples).

Also, 185 (75.82%), 46 (18.85%), 11 (4.51%), and 2 (0.82%) of 244 collected ticks were obtained from livestock in Divandareh, Marivan, Baneh, and Sanandaj, respectively. However, six livestock were not infected with any ticks. All of the collected ticks were adults, and 51.2% were male.

A morphological study of ticks showed that the predominant species of ticks were *Dermacentor marginatus*, which accounted for 164 (67.21%), followed by 30 (12.30%) *Rhipicephalus turanicus*, 26 (10.66%) *Rhipicephalus sanguineus*, and 24 (9.83%) *Haemaphysalis concinna*.

3.2. The prevalence of *F. tularensis* in ticks and blood samples of small ruminants

No positive *F. tularensis* was observed in blood samples of small ruminants using the Real Time-TaqMan PCR method. However, *F. tularensis* were detected in 2 (0.8%) tick samples (T121 and T229). Both ticks were classified as male *D. marginatus* and were isolated from two female sheep in Divandareh city. The association of positive *F. tularensis* with ticks and livestock species, livestock gender, and the geographical location of the sample collection were presented in Table 2. None of these differences were statistically significant ($P > 0.05$).

Table 2. Prevalence of *F. tularensis* in ticks based on ticks species, livestock gender, livestock species, and geographical location of sample collection.

Category and subcategory	Number of Ticks (% from total)	No. Positive Sample	Positive cases of <i>F. tularensis</i> (%)	P-value
Ticks Species				
<i>Dermacentor marginatus</i>	164 (67.21)	2	1.22	0.81
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	30 (12.30)	0	0	
<i>Haemaphysalis concinna</i>	24 (9.83)	0	0	
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	26 (10.66)	0	0	
Total	244 (100)	2	0.82	
Ticks Gender				
Female	119 (48.77)	0	0	0.17
Male	125 (51.23)	2	1.6	
Total	244 (100)	2	0.82	
livestock Species				
Sheep	229 (93.85)	2	0.87	0.72
Goat	15 (6.15)	0	0	
Total	244 (100)	2	0.82	
Geographical location				
(cities in Kurdistan province)				
Baneh	11 (4.51)	0	0	0.89
Divandareh	185 (75.82)	2	1.08	
Marivan	46 (18.85)	0	0	
Sanandaj	2 (0.82)	0	0	
Total	244 (100)	2	0.82	

3.3. *Francisella tularensis* Subspecies

Sample T121 was diagnosed as *F. tularensis* subsp. *holarctica* after molecular subtyping. Indeed, *pdpD-2* was not detected, but the *RD1* gene was amplified with a product size of 1150 bp (see table 1). Phylogenetic analyzes of T121 using *RD1* and *16S rRNA* sequences are shown in Fig. 1. T229 was not detected using PCR due to the low quantification cycle (Cq) value in the Real Time-TaqMan PCR method.

Accession numbers OL413430.1 and OL856144 have been assigned to recorded nucleotide sequences (in the present study) in the GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

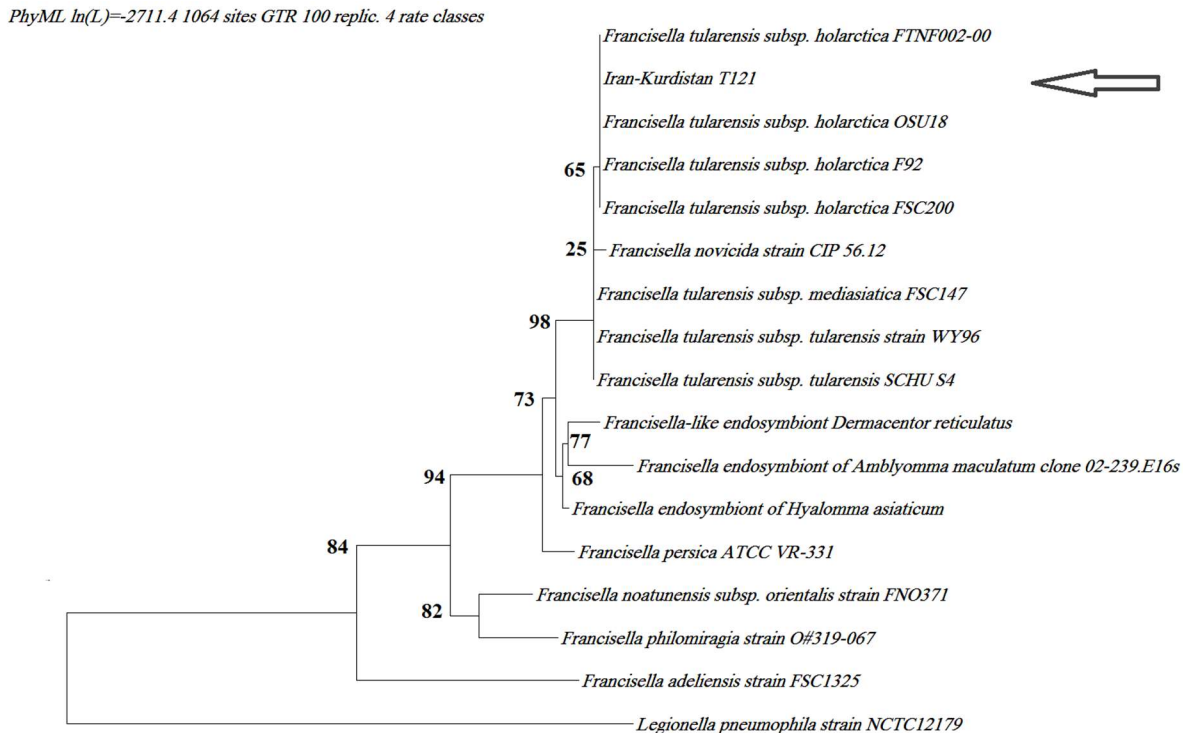


Fig 1. Generated phylogenetic trees of T121 via MEGA X software. The position of strain T121 is shown by arrows. (A) Phylogenetic tree based on sequences of *RD1* gene. (B) Phylogenetic tree based on sequences of *F. tularensis* 16S rRNA gene.

4. Discussion

In this study, *F. tularensis* was investigated in small ruminants and their ticks in western Iran using the Real Time-TaqMan PCR method. Using this method, *F. tularensis* DNA was detected in 0.82% of ticks samples in Kurdistan province but not in sheep and goats. In Iran, the study on *tularemia* is becoming under consideration by the Pasteur Institute of Iran since 2011. Most studies in Iran have been performed on rodents, the environment, and the at-risk human population. Those studies

warned about the possible outbreak of tularemia in Iran. Despite those predictions, there has been no research on *F. tularensis* in arthropod vectors in Iran. Therefore, understanding the roots of infection in the *Francisella* lifecycle in Iran is an important objective. In the present study, detected *F. tularensis* DNAs in tick samples were classified as *F. tularensis* subsp. *holarctica* by molecular subtyping assays. This subspecies is less virulent in humans and animals and is common in Asia, Europe, and Eurasia [1]. Studies in Turkey, a northwestern neighbor, indicated circulation of *F. tularensis* subsp. *holarctica* in this country [21, 22]. *F. tularensis* subsp. *holarctica* is often associated with contaminated water (e.g., lakes, rivers, and ponds). The previous study indicated that water-borne transmission is one of the possible ways for the tularemia outbreak in Iran [12]. This evidence and the results of the present study may indicate the probable circulation of subsp. *holarctica* in Iran.

Since *F. tularensis* bacteremia is rare [23], isolation of *F. tularensis* from the livestock blood samples is challenging. This lifecycle could be one of the reasons for the failure of *F. tularensis* identification in the livestock blood samples. Previously seroepidemiological studies in this province showed that 16% of the butchers were seropositive for tularemia [10]. The infectious trapped rodents (4.8%) and hunters (18%) have been reported in Kurdistan province [4]. Therefore, it suggests that studies on *F. tularensis* be performed among a wide range of ticks and other arthropods to establish their possible role the epidemiologic cycling of *F. tularensis* in Iran, especially in this endemic area of Iran. In a molecular study in Egypt, *Francisella* spp. was detected among 4.7% of ticks attached to camels. However, similar to our result, *Francisella* spp. was not detected in the camel blood and fecal samples. Remarkably, they showed that there was a high seroprevalence of *F. tularensis* among slaughterhouse workers who were more exposed to tick bites (20.7%) rather than infrequently exposed workers (2.2%) [15]. On the other hand, in support of inconsistent results, the negative findings of ticks and animal samples from livestock farms in one study in Malaysia suggested that *Francisella* spp. was restricted to *Dermacentor* questing ticks and have not spread to other ticks and livestock animals. They reported that 11.3% of questing ticks collected from forest reserves were positive for the 16S rRNA *Francisella* spp.; in contrast, none of the ticks attached to livestock (sheep, goats, and cattle) and livestock blood samples were positive for *Francisella* spp. [14].

Although *F. tularensis* is endemic among human populations in Turkey [24], it was not detected in different genera ticks and mosquitos in Turkey with the same method [22, 25]. Thus Duzlu et al. (2016) assumed that tularemia outbreaks in Turkey could have a water-borne transmission pattern, instead of vector-borne [22]. In a study in Japan, *F. tularensis* was predominant in *Ixodes monospinosus* (8.22%) ticks, while it was found in 0.66% of *Ixodes persulcatus* ticks [16]. In the present study, the majority and minority of the 244 removed ticks from sheep and goats were *D. marginatus* (66.4%) and *Rh. sanguineus* (10%), respectively. *F. tularensis* DNA was only detected among *D. marginatus* (1.22%) ticks. These results suggested that *De. marginatus* may likely have a role in the *F. tularensis* lifecycle in Kurdistan. In the United States, *Dermacentor variabilis* (*D. variabilis*) is a primary vector for *F. tularensis*, so it plays a role in the natural lifecycle of this bacterium [5, 26]. Whitten et al. have reported that 34% of *D. variabilis* were positive for tularemia using RT-PCR in a large-scale study [26]. Usually, other studies in the USA and Europe estimated *F. tularensis* prevalence in *Dermacentor* species from <1% to <10% [27-29], similar to our study. In a real-time TaqMan PCR analysis (*tul4* and *ISFtu2*) of ticks collected from the wild and domestic animals in the Iberian Peninsula, *F. tularensis* were detected in 0.6% of ticks, which

positive cases were classified as *Rh. sanguineus* (25.7%) and *D. marginatus* (2.4%) [17]. There have been reports of *Francisella* and *Francisella*-like endosymbionts (FLEs) in *Rh. sanguineus* ticks in Bulgaria [30], Romania [31], and Thailand [32]. Therefore, according to previous studies, our results suggested that the frequency of *F. tularensis* in ticks could vary depending on the tick species. To determine the dimensions of the disease, such as reservoirs and major carriers for infection transmission, in areas where positive cases have been identified, a study with larger sample size is recommended.

5. Conclusions

In the present study, the examined sheep and goats from different areas of Iran had no *F. tularensis* bacteremia at the testing time using the Real Time-TaqMan PCR method. However, 0.82% of ticks attached to these animals (1.22% of *D. marginatus* ticks) were infected with *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Therefore, it is suggested that the role of ticks in the epidemiologic cycling or maintenance of *F. tularensis* must be assessed in Iran. Furthermore, because studies asserted that *F. tularensis* could be endemic in Iran in particular among butchers and slaughterhouse workers, further screening of livestock and their ticks with a large number of samples collected from different geographical areas in Iran are necessary.

References

- [1] A. Sjöstedt, Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1105(1) (2007) 1-29.
- [2] T. Birkbeck, S. Feist, D. Verner–Jeffreys, *Francisella* infections in fish and shellfish, *Journal of fish diseases* 34(3) (2011) 173-187.
- [3] P. Padeshki, I. Ivanov, B. Popov, T. Kantardjiev, The role of birds in dissemination of *Francisella tularensis*: first direct molecular evidence for bird-to-human transmission, *Epidemiology & Infection* 138(3) (2010) 376-379.
- [4] E. Mostafavi, A.H. Shahraki, A. Japoni-Nejad, S. Esmaeili, J. Darvish, M.M. Sedaghat, A. Mohammadi, Z. Mohammadi, A. Mahmoudi, B. Pourhossein, A field study of plague and tularemia in rodents, Western Iran, *Vector-Borne and zoonotic diseases* 17(4) (2017) 247-253.
- [5] B. Zellner, J.F. Huntley, Ticks and tularemia: do we know what we don't know?, *Frontiers in cellular and infection microbiology* 9 (2019) 146.
- [6] J.-S. Eden, K. Rose, J. Ng, M. Shi, Q. Wang, V. Sintchenko, E.C. Holmes, *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in ringtail possums, Australia, *Emerging Infectious Diseases* 23(7) (2017) 1198.
- [7] S. Gurcan, O. Karabay, A. Karadenizli, C. Karagol, T. Kantardjiev, I.N. Ivanov, Characteristics of the Turkish isolates of *Francisella tularensis*, *Japanese journal of infectious diseases* 61(3) (2008) 223.
- [8] S. Melikjanyan, K. Palayan, A. Vanyan, L. Avetisyan, N. Bakunts, M. Kotanyan, M. Guerra, Human cases of tularemia in Armenia, 1996–2012, *The American journal of tropical medicine and hygiene* 97(3) (2017) 819.
- [9] A. Arata, M. Chamsa, A. Farhang-Azad, I. Meščerjakova, V. Neronov, S. Saidi, First detection of tularaemia in domestic and wild mammals in Iran, *Bulletin of the World Health Organization* 49(6) (1973) 597.

- [10] S. Esmaeili, B. Esfandiari, M. Maurin, M.M. Gouya, M.R. Shirzadi, F.B. Amiri, E. Mostafavi, Serological survey of tularemia among butchers and slaughterhouse workers in Iran, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 108(8) (2014) 516-518.
- [11] M. Rohani, B. Mohsenpour, A. Ghasemi, S. Esmaeili, M. Karimi, H. Neubauer, H. Tomaso, E. Mostafavi, A case report of human tularemia from Iran, *Iranian journal of microbiology* 10(4) (2018) 250.
- [12] S. Esmaeili, M. Rohani, A. Ghasemi, M.M. Gouya, S. Khayatzadeh, A. Mahmoudi, H.A. Cohan, A. Johansson, M. Maurin, E. Mostafavi, *Francisella tularensis* human infections in a village of northwest Iran, *BMC Infectious Diseases* 21(1) (2021) 1-8.
- [13] M. Rohani, A.H. Shahraki, A. Ghasemi, S. Esmaeili, A. Karadenizli, E. Mostafavi, The prevalence of *Francisella* spp. in different natural surface water samples collected from northwest of Iran, *Iranian journal of microbiology* 11(1) (2019) 19.
- [14] F.X. Koh, M.N. Nurhidayah, P.E. Tan, K.L. Kho, S.T. Tay, *Francisella* spp. detected in Dermacentor ticks in Malaysian forest reserve areas, *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 17 (2019) 100315.
- [15] N.H. Ghoneim, K.A. Abdel-Moein, H.M. Zaher, Molecular detection of *Francisella* spp. among ticks attached to camels in Egypt, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 17(6) (2017) 384-387.
- [16] J. Suzuki, M. Hashino, S. Matsumoto, A. Takano, H. Kawabata, N. Takada, M. Andoh, Y. Oikawa, H. Kajita, A. Uda, Detection of *Francisella tularensis* and analysis of bacterial growth in ticks in Japan, *Letters in applied microbiology* 63(4) (2016) 240-246.
- [17] I.L. de Carvalho, A. Toledo, C. Carvalho, J. Barandika, L. Respicio-Kingry, C. Garcia-Amil, A. García-Pérez, A. Olmeda, L. Zé-Zé, J. Petersen, *Francisella* species in ticks and animals, Iberian Peninsula, *Ticks and tick-borne diseases* 7(1) (2016) 159-165.
- [18] F. Fayazkhoo, A.H. Zahirnia, Z. Telmadarraiy, Distribution and seasonal activity of hard ticks (Acari: Ixododae) infesting domestic ruminants in Famenin county, Hamadan province, Iran, *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences* 24(3) (2017).
- [19] M. Forsman, G. SANDSTRÖM, A. SJÖSTEDT, Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44(1) (1994) 38-46.
- [20] W.H. Organization, WHO guidelines on tularaemia: epidemic and pandemic alert and response, World Health Organization 2007.
- [21] M. Yeşilyurt, S. Kılıç, B. Çelebi, M. Çelik, S. Gül, F. Erdoğan, G. Özel, Antimicrobial susceptibilities of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains isolated from humans in the Central Anatolia region of Turkey, *Journal of antimicrobial chemotherapy* 66(11) (2011) 2588-2592.
- [22] O. Duzlu, A. Yildirim, A. Inci, K.S. Gumussoy, A. Ciloglu, Z. Onder, Molecular investigation of *Francisella*-like endosymbiont in ticks and *Francisella tularensis* in ixodid ticks and mosquitoes in Turkey, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 16(1) (2016) 26-32.
- [23] X. Haristoy, A. Lozniewski, C. Tram, D. Simeon, L. Bevanger, C. Lion, *Francisella tularensis* bacteremia, *Journal of clinical microbiology* 41(6) (2003) 2774-2776.
- [24] H. Akalın, S. Helvacı, S. Gedikoğlu, Re-emergence of tularemia in Turkey, *International Journal of Infectious Diseases* 13(5) (2009) 547-551.
- [25] S. Demir, S. Erkunt Alak, A.E. Köseoğlu, C. Ün, M. Nalçacı, H. Can, Molecular investigation of *Rickettsia* spp. and *Francisella tularensis* in ticks from three provinces of Turkey, *Experimental & applied acarology* 81(2) (2020).
- [26] T. Whitten, C. Demontigny, J. Bjork, M. Foss, M. Peterson, J. Scheftel, D. Neitzel, M. Sullivan, K. Smith, Prevalence of *Francisella tularensis* in *Dermacentor variabilis* ticks, Minnesota, 2017, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 19(8) (2019) 596-603.

- [27] H.K. Goethert, I. Shani, S.R. Telford III, Genotypic diversity of *Francisella tularensis* infecting *Dermacentor variabilis* ticks on Martha's Vineyard, Massachusetts, *Journal of clinical microbiology* 42(11) (2004) 4968-4973.
- [28] A. Bielawska-Drozd, P. Cieřlik, D. Źakowska, P. Głowacka, B. Wlizło-Skowronek, P. Zięba, A. Zdun, Detection of *Coxiella burnetii* and *Francisella tularensis* in Tissues of Wild-living Animals and in Ticks of North-west Poland, *Polish journal of microbiology* 67(4) (2018) 529.
- [29] Z. Hubálek, I. Rudolf, *Francisella tularensis* prevalence and load in *Dermacentor reticulatus* ticks in an endemic area in Central Europe, *Medical and veterinary entomology* 31(2) (2017) 234-239.
- [30] I.N. Ivanov, N. Mitkova, A.L. Reye, J.M. Hübschen, R.S. Vatcheva-Dobrevska, E.G. Dobрева, T.V. Kantardjiev, C.P. Muller, Detection of new *Francisella*-like tick endosymbionts in *Hyalomma* spp. and *Rhipicephalus* spp.(Acari: Ixodidae) from Bulgaria, *Applied and environmental microbiology* 77(15) (2011) 5562-5565.
- [31] M.O. Andersson, C. Tolf, P. Tamba, M. Stefanache, G. Radbea, D. Frangoulidis, H. Tomaso, J. Waldenström, G. Dobler, L. Chitimia-Dobler, Molecular survey of neglected bacterial pathogens reveals an abundant diversity of species and genotypes in ticks collected from animal hosts across Romania, *Parasites & vectors* 11(1) (2018) 1-10.
- [32] P. Rakthong, T. Ruang-Areerate, V. Baimai, W. Trinachartvanit, A. Ahantarig, *Francisella*-like endosymbiont in a tick collected from a chicken in southern Thailand, *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 47(2) (2016) 245.

ردیابی مولکولی کوکسیلا بورنتی در نشخوارکنندگان کوچک و کنه های جمع آوری شده از آنها در غرب ایران

A molecular survey of *Coxiella burnetii* in small ruminants and their ticks in western Iran

Abstract

Background: Q fever is one of the most important zoonotic diseases caused by *Coxiella burnetii*. Although Q fever is an endemic disease in Iran, epidemiological data on *C. burnetii* infection are not yet complete in reservoirs and vectors in some parts of Iran. This survey was investigated *C. burnetii* infection in small ruminants (sheep and goat blood samples) and their ticks in western Iran (Kurdistan province) in 2020. The presence of *C. burnetii* DNA was investigated in these samples by targeting the *IS1111* gene using the Real-time PCR method.

Results: Out of 250 blood samples (232 sheep and 18 goats), *C. burnetii* was detected in two samples (0.8%). Both positive blood samples belonged to the sheep (0.9%). In addition, 34 of 244 collected ticks (13.9%) were positive for *C. burnetii* infection. The highest prevalence of infection was found in *Dermacentor marginatus* (18.3%) and *Haemaphysalis concinna* (12.5%), respectively.

Conclusions: The present study showed that ticks have a significant role in the epidemiology of Q fever in Iran.

Keywords: *Coxiella burnetii*, Q fever, Tick, Sheep, Goat, Iran.

Background

Q fever is one of the most important zoonotic diseases caused by an obligate intracellular bacterium called *Coxiella burnetii*. *C. burnetii* is a worldwide pathogenic agent which is endemic in all countries except for New Zealand [1]. The host range of *C. burnetii* is diverse, including mammals (wild and domestic), birds, reptiles, and arthropods. Livestock such as cattle, sheep, and goats are the main reservoirs of this bacterium. Although *C. burnetii* infection is usually asymptomatic or subclinical in animals, abortion, stillbirth, premature delivery, weak offspring, infertility, metritis, and mastitis were seen in some cases [2, 3]. Shedding of this bacterium into the environment occurs through milk, urine, feces, mucosal secretions and, birth fluids products by infected animals [1].

C. burnetii are mainly transmitted to humans by inhalation of infected aerosols. In humans, the clinical manifestations of Q fever are diverse, from asymptomatic infection to acute and chronic Q fever [4]. Asymptomatic infection can occur in more than 60% of patients. Acute Q fever is usually a self-limited illness characterized by non-specific symptoms such as fever, headache, myalgia, chills, fatigue, pneumonia, and hepatitis [5]. Chronic Q fever has different manifestations, including endocarditis, vasculitis, lymphadenitis, osteomyelitis, and spontaneous abortions. Q fever endocarditis without proper treatment can lead to severe or a life-threatening illness [1, 3]. Among arthropods, ticks are the main host and vector of *C. burnetii*. More than 40 species of ticks can be naturally infected by *C. burnetii* [6]. *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, and *Haemaphysalis* genera are the most prevalent hosts and vectors of this bacterium [7]. Ticks can

play a role in *C. burnetii* transmission to animals, but human infections by tick biting are rarely reported[1, 4].

In the recent decade, several seroepidemiological studies among human and domestic animals in different parts of Iran indicated that Q fever is an endemic disease in Iran. According to the results of a systematic review and meta-analysis study in Iran, estimated seroprevalence rates of the Q fever among humans, cows, sheep, and goats were 19.8%, 13.3%, 24.7%, and 32%, respectively[8]. Also, the overall prevalence rate of *C. burnetii* in milk samples of cows, sheep, goats, and camels was estimated at 15.1%, 3.8%, 7.85, and 1.4%, respectively[9]. On the other hand, acute Q fever cases and Q fever endocarditis have been reported from Iran in recent years [10-15].

The epidemiology of Q fever is poorly understood in some parts of Iran, especially in western provinces. Based on the only study in Kurdistan province, the seroprevalence rate of Q fever was very high (27.8%) among the different human populations [16]. No study has been done on livestock in this province, and no data is available in this regard. Without information on the status of *C. burnetii* infection in animals (especially domestic animals) and ticks, it is impossible to understand the Q fever situation in the area. Therefore, this survey aimed to investigate the *C. burnetii* infection in small ruminants and their ticks in Kurdistan province.

Results

In this study, 250 blood samples (232 sheep and 18 goats) were collected from 33 small ruminant flocks (Table 1). The prevalent gender was female in both sheep (93.1%) and goats (94.4%). The mean age (\pm SD) of sheep and goats were 3.31 (\pm 1.4) and 4.78 (\pm 1.8), respectively.

Two hundred and forty-four ticks were collected from sheep and goats (Table 2). Among ticks, 93.8% were collected from sheep, and 51.2% were male. *Dermacentor marginatus* was the most prevalent (67.2%) tick among collected samples. Other collected ticks included *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (10.7%), *Rhipicephalus turanicus* (12.3%), and *Haemaphysalis concinna* (9.8%).

C. burnetii was detected in two of 232 (0.9%) sheep blood samples. Both positive samples belonged to the same flock in Divandarreh County. No positive cases were found among goat blood samples.

In total, 34 of 244 collected ticks (13.9%) were positive for *C. burnetii* using real-time PCR (Table 2). The prevalence of *C. burnetii* among *D. marginatus*, *R. turanicus*, and *H. concinna* were 18.3%, 3.3%, and 12.5%, respectively. No positive samples were detected in *R. sanguineus sensu lato*. The prevalence of *C. burnetii* in collecting ticks based on hosts was 12.7% in sheep and 33.3% goats. In addition, 16.7% of collected ticks from Divandarreh County were positive for *C. burnetii*. No positive tick was found collected ticks from Marivan County.

Table 1 Detection of *C. burnetii* in blood samples of small ruminants in Kurdistan Province

	Sheep		Goat	
	N (%)	No positive for <i>C. burnetii</i> (%)	N (%)	No positive for <i>C. burnetii</i> (%)
Sanandaj	4 (1.7)	0 (0)	0 (0.0)	ND
Baneh	15 (6.5)	0 (0)	0 (0.0)	ND

Marivan	46 (19.8)	0 (0)	0 (0.0)	ND
Divandarreh	167 (72)	2 (1.2)	18 (100)	0 (0)
Total	232	2 (0.9)	18	0 (0)

ND: Not defined.

Table 2. Detection of *C. burnetii* among collected ticks from small ruminants in Kurdistan province

	No of tested ticks (no. positive, %)	No of positive ticks based on Host (%)		No of positive ticks based on county* (%)			
		Sheep	Goat	S	M	B	D
<i>Rhipicephalus sanguineus sensu lato</i>	26 (0, 0)	0 (0)	ND	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	30 (1, 3.3)	1 (3.33)	ND	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Haemaphysalis concinna</i>	24 (3, 12.5)	2 (12.5)	1 (12.5)	ND	ND	1 (33.3)	2(8.33)
<i>Dermacentor marginatus</i>	164 (30, 18.3)	26 (16.6)	4 (57.1)	ND	0 (0)	1 (33.3)	29 (18.5)
Total	244 (34, 13.9)	29 (12.7)	5 (33.3)	1 (50)	0 (0)	2(18.2)	31 (16.7)

*S; Sanandaj, B; Baneh, M; Marivan, D; Divandarreh. ND: Not defined.

Discussion

This study was carried out to molecular detection of *C. burnetii* in small ruminants and their ticks in western Iran. The presence of *C. burnetii* has been shown in the sheep blood samples (0.8%) and collected ticks (13.9%) from goats and sheep in Kurdistan province. It seems that Q fever is an endemic disease in Kurdistan province. In a study (2011-2012), the seroprevalence of Q fever was 27.8% among different human populations in Kurdistan province[16]. Also, cases of Q fever endocarditis have been recently reported from this province[17]. On the other hand, high seroprevalence rates of *C. burnetii* were reported in sheep (35.9%), goats (56.7%), and cows (32.2%) in the Kurdistan province[18]. Also, 6.5% of collected milk samples from Kurdistan province were positive for *C. burnetii* using the PCR method[18]. The findings of the current study in this province showed that the role of ticks in the epidemiology of Q fever is also very significant. Although there is very strong evidence of *C. burnetii* infections in humans and animals in all parts of Iran, Q fever is not considered important by the health care system and Veterinary Organization in Iran. There is no control program and surveillance system for Q fever in veterinary and medical levels in Iran. This limitation is a challenge and gap in public health based on available current data.

Domestic ruminants, the main reservoir of *C. burnetii*, are the most important source of Q fever infection in humans. In our study, *C. burnetii* bacteremia was detected in 0.9% of sheep blood samples using real-time PCR. In general, the periods of *C. burnetii* bacteremia in the reservoirs are very short and after a few days, this bacterium localized in the mammary glands, uterus, and

placenta. After localization, the *C. burnetii* is shed into the environment via milk, feces, and vaginal discharge for a long time[2]. Therefore, the low prevalence of *C. burnetii* in sheep blood in the current study indicates short-term bacteremia. No molecular positive sample was found in goat blood samples. Failure to find positive cases in goat blood samples in this study could be due to the very small number of samples tested in addition to short *C. burnetii* bacteriemia.

In this study, 13.9% of collected ticks from small ruminants were positive for *C. burnetii* using real-time PCR. Moreover, 12.7% and 33.3% of collected ticks from sheep and goats were infected by *C. burnetii*, respectively. The highest prevalence of infection was found in *D. marginatus* (18.3%) and *H. concinna* (12.5%), respectively. In a study in Sistan and Balouchestan province (southeast Iran), 7.4% of collected ticks from sheep and goats were positive for *C. burnetii*, and infected ticks belonged to the *Hyalomma anatolicum*, and *R. sanguineus sensu lato* [19]. Also, in another study in Sistan and Balouchestan province, 4.8% of collected ticks from cattle were infected by the causative agent of Q fever, and positive ticks belonged to *Hyalomma excavatum*, *H. anatolicum*, and *R. sanguineus sensu lato*[20]. In Kerman province (southeast Iran), 11.4% of collected ticks from sheep and goats were positive for *C. burnetii*, and positive ticks belonged to the *H. anatolicum* and *R. sanguineus sensu lato*[21]. In Ardabil province (northwest Iran), 12.5% of collected ticks from goats were infected by *C. burnetii*, and positive ticks belonged to the *H. excavatum*, *H. anatolicum*, and *R. sanguineus sensu lato*[22]. In the present study, the prevalence of *C. burnetii* in ticks was higher than in other studies in Iran. Furthermore, infected tick species (*D. marginatus*, *R. turanicus*, and *H. concinna*) by *C. burnetii* infection in this study was not reported in the previous study in Iran. Interestingly, in both sheep infected with *C. burnetii*, their ticks (*D. marginatus*) were also *C. burnetii* positive.

Conclusions

In conclusion, *C. burnetii* has been found in the sheep blood and body ticks of goats and sheep in western Iran. These findings showed the significant role of ticks in the epidemiology of Q fever in Iran. Although there is considerable evidence of *C. burnetii* infections in humans and animals in Iran, there is a complete lack of control programs and surveillance systems for Q fever in veterinary and medical levels in Iran. The present study suggests that the health care system and veterinary organizations in Iran should be aware of the presence of Q fever disease in the country.

Methods

Study area

This study was conducted in Kurdistan province during August- September 2020. Kurdistan province is located in the west of Iran with 28,817 Km² in the area and is bordered by Iraq (from the west). This province is a mountainous region with a cold and harsh climate in winter and autumn and warm and dry weather in the summer season. The human population of this province is estimated at 1.6 million people. In addition, the total number of livestock in Kurdistan province is about 1.417 million animals, including 115,000 cows, 1,077,000 sheep, and 224,000 goats. This study was conducted in four counties (Marivan, Baneh, Sanandaj, and Divandarreh) of Kurdistan province (Fig. 1).

Blood sampling and tick collection

Small ruminant flocks were randomly selected from each selected county. Sheep and goats were also randomly selected from each herd. The animals were carefully examined for tick infestation, and, if they were infested, they were included in the study. Five milliliters of whole blood were taken by venoject tubes containing anticoagulant (EDTA). Blood samples were transferred to the

laboratory of the Faculty of Veterinary, Islamic Azad University Sanandaj Branch under cold conditions and kept at 4°C until DNA extraction.

After blood sampling of selected animals, one tick per animal was randomly removed from selected animals with fine-pointed, stainless-steel tweezers. Each tick was placed in a separate encoded 2 ml tube, and 70% ethanol was added to each tube. Tick samples were transferred to the Parasitology Laboratory of Veterinary Faculty of the Islamic Azad University of Sanandaj. Collected ticks were morphologically identified using taxonomic keys[23, 24]. All blood samples and identified ticks were sent to the National Reference Laboratory for Plague, Tularemia, and Q Fever of Research Centre for Emerging and Reemerging Infectious Diseases in Pasteur Institute of Iran under cold conditions.

DNA extraction from blood samples

The genomic DNA was extracted from the blood samples by using a FavorPrep™ Blood/Cultured Cell Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan), following the manufacturer's instructions. Extracted DNA was stored at -20°C until molecular analysis.

DNA extraction from ticks

Before the beginning of the DNA extraction from salivary glands and midguts of ticks, the following orders were performed respectively: washing their body surface body with 70% ethanol for 5 min, 5% sodium hypochlorite for 5 min, and sterile distilled water for 15 min (three times with 5 min for each time). After passing the mentioned steps, the body was opened under a loop by a sterile scalpel to remove their salivary glands and midguts. After removal, the organs were placed individually into a ceramic mortar approximately liquid Nitrogen to tissue dryness. Dried tissues were transferred separately to sterile 1.5 ml Microtubes for DNA extractions. The genomic DNA extraction was performed from collecting tick tissues using a commercial kit (G-spin™ tissue DNA extraction kit, iNtRON Biotechnology, South Korea) protocol. Extracted DNA was kept at -20°C.

Real-time PCR for Detection of *C. burnetii*

IS1111 element of *C. burnetii* was targeted by Real-time PCR using specific primers and probe sequences[25]. The final volume of each Real-time PCR reaction was 20 µl, contained 10 µl of 2X Real Q Plus Master Mix for Probe (Ampliqon, Denmark), 900 nM forward primer (AAAACGGATAAAAAGAGTCTGTGGTT), 900 nM reverse primer (CCACACAAGCGCGATTCAT), 200 nM probe (6-FAM AAAGCACTCATTGAGCGCCGCG-TAMRA), 4 µl of extracted DNA and 5 µl of double-distilled water (DDV). Amplifications were performed on the Corbett 6000 Rotor-Gene system (Corbett, Victoria, Australia). The Real-time PCR program was 10 minutes at 95°C, followed by 45 cycles of 15 s at 94°C and 60 s at 60°C. DDV and purified DNA of the Nine Mile strain (RSA 493) were used as the negative and positive controls, respectively. Real-time PCR results were analyzed using a Rotor-Gene® Q 2.3.5 software (QIAGEN), and samples were considered positive when showing cycle threshold (Ct) values of 40 or lower.

References

1. Eldin C, Melenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, Mege J-L, Maurin M, Raoult D: **From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change.** *Clinical Microbiology Reviews* 2017, **30**(1):115-190.
2. Van den Brom R, Van Engelen E, Roest H, Van der Hoek W, Vellema P: ***Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review.** *Veterinary Microbiology* 2015, **181**(1-2):119-129.

3. Melenotte C, Protopopescu C, Million M, Edouard S, Carrieri MP, Eldin C, Angelakis E, Djossou F, Bardin N, Fournier P-E: **Clinical features and complications of Coxiella burnetii infections from the French National Reference Center for Q fever.** *JAMA network open* 2018, **1**(4):e181580-e181580.
4. Million M, Raoult D: **Recent advances in the study of Q fever epidemiology, diagnosis and management.** *Journal of infection* 2015, **71**:S2-S9.
5. Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, Mege J-L, Maurin M, Raoult D: **From Q fever to Coxiella burnetii infection: a paradigm change.** *Clinical microbiology reviews* 2017, **30**(1):115-190.
6. Porter SR, Czaplicki G, Mainil J, Guattéo R, Saegerman C: **Q fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis.** *International Journal of Microbiology* 2011, **2011**:248418.
7. Maurin M, Raoult D: **Q fever.** *Clinical Microbiology Reviews* 1999, **12**(4):518-553.
8. Mobarez AM, Amiri FB, Esmaeili S: **Seroprevalence of Q fever among human and animal in Iran; A systematic review and meta-analysis.** *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2017, **11**(4):e0005521.
9. Esmaeili S, Mobarez AM, Khalili M, Mostafavi E, Moradnejad P: **Molecular prevalence of Coxiella burnetii in milk in Iran: a systematic review and meta-analysis.** *Tropical animal health production* 2019, **51**(6):1345-1355.
10. Moradnejad P, Esmaeili S, Maleki M, Sadeghpour A, Kamali M, Rohani M, Ghasemi A, Amiri FB, Pasha HR, Boudagh S *et al*: **Q fever endocarditis in iran.** *Scientific Reports* 2019, **9**(1):1-7.
11. Yaghmaie F, Esmaeili S, Francis SA, Mostafavi E: **Q fever endocarditis in Iran: A case report.** *Journal of Infection Public Health* 2015, **8**(5):498-501.
12. Esmaeili S, Golzar F, Ayubi E, Naghili B, Mostafavi E: **Acute Q fever in febrile patients in northwestern of Iran.** *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2017, **11**(4):e0005535.
13. Ghasemian R, Mostafavi E, Esmaeili S, Arabsheybani S, Davoodi L: **Epidemiologic Investigation of Acute Q Fever in North of Iran.** *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2019, **29**(173):100-106.
14. Esmaeili S, Mobarez AM, Khalili M, Mostafavi E, Moradnejad P: **Genetic evidence of Coxiella burnetii infection in acute febrile illnesses in Iran.** *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2019, **13**(2):e0007181.
15. Khalili M, Reza Naderi H, Salehnia N, Abiri Z: **Detection of Coxiella burnetii in acute undifferentiated febrile illnesses (AUFIs) in Iran.** *Tropical Doctor* 2016, **46**(4):221-224.
16. Esmaeili S, Pourhossein B, Gouya MM, Amiri FB, Mostafavi E: **Seroepidemiological survey of Q fever and brucellosis in Kurdistan Province, western Iran.** *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2014, **14**(1):41-45.
17. Moradnejad P, Esmaeili S, Maleki M, Sadeghpour A, Kamali M, Rohani M, Ghasemi A, Amiri FB, Pasha HR, Boudagh S: **Q fever endocarditis in iran.** *Scientific reports* 2019, **9**(1):1-7.
18. Ahmadi E: **Potential public health risk due to consumption of contaminated bovine milk with aflatoxin M1 and Coxiella burnetii in the West of Iran.** *International Journal of Dairy Technology* 2020, **73**(3):479-485.
19. Fard SR N, Ghashghaei O, Khalili M, Sharifi H: **Tick diversity and detection of Coxiella burnetii in tick of small ruminants using nested Trans PCR in Southeast Iran.** *Tropical Biomedicine* 2016, **33**(3):506-511.

20. Ghashghaei O, FARD SRN, Khalili M, Sharifi H: **A survey of ixodid ticks feeding on cattle and molecular detection of Coxiella burnetii from ticks in Southeast Iran.** *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences* 2017, **41**(1):46-50.
21. Fard SN, Khalili M: **PCR-detection of Coxiella burnetii in ticks collected from sheep and goats in southeast Iran.** *Iranian journal of arthropod-borne diseases* 2011, **5**(1):1-6.
22. Esmailnejad B, Gharekhani J, Samiei A, Rezaei H: **Molecular detection of Coxiella burnetii in ticks isolated from goats of Meshkin-Shahr County, Ardabil Province, Iran.** *Nova Biologica Reperta* 2020, **7**(3):315-321.
23. Walker AR: **Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species:** Bioscience Reports Edinburgh; 2003.
24. Kiewra D, Czułowska A, Dyczko D, Zieliński R, Plewa-Tutaj K: **First record of Haemaphysalis concinna (Acari: Ixodidae) in Lower Silesia, SW Poland.** *Experimental Applied Acarology* 2019, **77**(3):449-454.
25. Schneeberger PM, Hermans MH, van Hannen EJ, Schellekens JJ, Leenders AC, Wever PC: **Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever.** *Clinical and Vaccine Immunology* 2010, **17**(2):286.

طرح های تحقیقاتی مصوب اجرا شده در سال ۱۴۰۰

- ✓ پایش بیماری های نوپدید و بازپدید در کشور، حمایت کننده مالی: انستیتو پاستور ایران و وزارت بهداشت.
- ✓ بررسی شیوع و ژنوتایپینگ کوکسیلا بورنتی و تعیین گونه های بارتونلا در دریچه های قلبی جراحی شده (تعویض شده) مشکوک به اندوکاردیت کشت منفی در بیمارستان مرکز قلب تهران در بین سال های ۱۳۹۵ الی ۱۳۹۸، حمایت کننده مالی: انستیتو پاستور ایران و مرکز قلب تهران.
- ✓ بررسی مولکولی و سرولوژی ریکتزیا کونوری در بیماران ارجاعی مشکوک به تب خونریزی دهنده کریمه-کنگو در طی سال های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹، حمایت کننده مالی: بنیاد ملی نخبگان.
- ✓ بررسی مولکولی عفونت به باکتری کوکسیلا بورنتی، بارتونلا، ریکتزیا و ارلیشیا در جوندگان ایران، حمایت کننده مالی: موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران (نیماد).
- ✓ بررسی مولکولی آلودگی به باکتری های ریکتزیا و بارتونلا در کنه های شمال ایران، حمایت کننده مالی: موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران (نیماد).
- ✓ بررسی شیوع بیماری تب کیو حاد در افراد در معرض خطر دارای علائم تب و علائم تنفسی در استان کردستان، حمایت کننده مالی: انستیتو پاستور ایران و دانشگاه علوم پزشکی کردستان.
- ✓ بررسی فیلوژنی مولکولی کک ها و آلودگی به باسیل طاعون و متاژنومیکس همزیستها و پاتوژنهای باکتریایی ککها در کانون های منتخب طاعون در ایران، حمایت کننده مالی: انستیتو پاستور ایران.
- ✓ بررسی مولکولی کوکسیلا بورنتی و بروسلا در نمونه های سقط جنین: یک مطالعه مقدماتی در ایران، حمایت کننده مالی: موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران (نیماد).
- ✓ ارزیابی ایمنی زایی و بی خطری دوز بوستر پاستوکوک پلاس (PastoCovac plus) به عنوان یادآور سوم در افراد ۱۸ تا ۸۰ سال واکسینه شده با واکسن- های سینوفارم و آسترانکا، حمایت کننده مالی: انستیتو پاستور ایران.
- ✓ بررسی پایداری ایمنی هومورال و سلولی در دریافت کنندگان واکسن سوبرانا در کارآزمایی بالینی فاز ۳ واکسن در ایران، حمایت کننده مالی: انستیتو پاستور ایران.
- ✓ بررسی عوارض بلند مدت کووید-۱۹ در مبتلایان به ویروس کرونا، حمایت کننده مالی: انستیتو پاستور ایران.
- ✓ بررسی شیوع سرمی کووید-۱۹ در بین پرسنل بهداشتی درمانی کشور، حمایت کننده مالی: سازمان بهداشت جهانی.
- ✓ بررسی فون و چرخه زندگی کنه های سخت (ایکسودیده) استان مازندران و آلودگی مراحل مختلف رشد کنه ها به ویروس تب خونریزی دهنده کریمه کنگو، ویروس تب کنه زاد و اسپیروکت بولیا، حمایت کننده مالی: انستیتو پاستور ایران.

پایان نامه های انجام شده در سال ۱۴۰۰

- ✓ تشخیص و شناسایی مولکولی گونه های ریکتزیا آلوده کننده کنه های صید شده در استان کرمان، کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، انستیتو پاستور ایران.
- ✓ ردیابی مولکولی آلودگی همزمان *FRANCISELLA TULARENSIS* و *RICKETTSIA SPP*. در نشخوارکنندگان کوچک با سابقه پیروپلاسموز و بروسلوز و کنه های آنها در استان کردستان، دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد سنندج و انستیتو پاستور ایران.
- ✓ ردیابی باکتری *Coxiella burnetii* در گله های بز و گوسفند دارای سوابق بالینی بیماری های پیروپلاسمی و بروسلوز و همچنین کنه های ناقل باکتری در استان کردستان با استفاده از روش PCR، دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد سنندج و انستیتو پاستور ایران.
- ✓ بررسی حضور باکتری کوکسیلا بورنتی در شیر خام گله های گوسفند و بز استان کرمانشاه، دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه رازی کرمانشاه و انستیتو پاستور ایران.
- ✓ شناسایی فرانسیسلا تولارنسیس، تروفریما ویپلی، بروسلا، لژیونلا، کلامیدیا پسی تاسی و کلامیدیا پنومونیه با استفاده از روش Real-time PCR در نمونه های دریچه های جراحی شده (تعویض شده) بیماران مبتلا به اندوکاردیت کشت منفی در مرکز قلب تهران، کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس و انستیتو پاستور ایران.
- ✓ شناسایی جنس بروسلا در موارد سقط جنین گله های گوسفند و بز در شهرستان زرنده به روش PCR، کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان و انستیتو پاستور ایران.
- ✓ بررسی کوکسیلا بورنتی در سقط جنین های گله های گوسفند و بز در شهرستان زرنده به کمک تست های مولکولی، کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان و انستیتو پاستور ایران.
- ✓ بررسی روند مکانی- زمانی کووید-۱۹ در ایران، دکترای تخصصی، انستیتو پاستور ایران.
- ✓ بررسی متاژنومیکس فلور میکروبی روده (قارچی-باکتریایی) کنه بالغ ایگزودس رسینوس جدا شده از دام های اهلی منطقه شمالی (مازندران، گیلان و گلستان) و شمال غرب کشور، دکترای تخصصی، انستیتو پاستور ایران.
- ✓ مطالعه ی فون کنه های ناقل ریکتزیا و بررسی سروپوزیویتهی دامداران، مرتبط با ریکتزیزیس در جنوب شرق ایران در سال ۱۳۹۹، دکترای تخصصی، دانشگاه شهید باهنر کرمان و انستیتو پاستور ایران.

مقالات منتشر شده در سال ۱۴۰۰

- ✓ Rickettsia conorii subsp. israelensis infection: a case report from southeast Iran, M Latifian, M Khalili, M Farrokhnia, E Mostafavi, S Esmaeili, BMC Infectious Diseases, 22 (1), 1-5.
- ✓ Tropheryma whipplei in the stool samples of children with acute diarrhea: a study from Tehran, Iran, Shirin Sayyahfar, Mina Latifian, Parisa Esmaeili, Neda Baseri, Fahimeh Bagheri Amiri, Bita Bakhshi, Abdoulreza Esteghamati, Saber Esmaeili, BMC infectious diseases 22 (1), 1-5.
- ✓ Molecular detection of Francisella tularensis in small ruminants and their ticks in western Iran, Maryam Rahravani, Meysam Moravedji, Ehsan Mostafavi, Neda Baseri, Hamid Seyfi, Mehrdad Mohammadi, Amir Hossein Ziaei, Mohammad Mahdi Mozoun, Mina Latifian, Saber Esmaeili, Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 83, 101779.
- ✓ Molecular Detection and Identification of Rickettsia spp. in Collected Ticks from domestic animals in Southeastern of Iran, F Abdoli, E Mostafavi, S Esmaeili, M Rohani, Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 101798.
- ✓ Fatal Case of Mediterranean Spotted Fever Associated with Septic Shock, Iran, Saber Esmaeili, Mina Latifian, Mohammad Khalili, Mehrdad Farrokhnia, John Stenos, Mehdi Shafiei, Ehsan Mostafavi Emerging Infectious Diseases 28 (2), 485.
- ✓ ‘How Iran responded to expanding need for laboratory services for COVID-19?’, Mostafa Salehi-Vaziri, Arash Arashkia, Ehsan Mostafavi, Tahmineh Jalali, Mohammad Hassan Pouriayevali, Mehdi Fazlalipour, Zabihollah Shoja, Mehdi Rohani, Saber Esmaeili, Fatemeh Fotouhi-Chahooki, Kazem Baesi, Ali Maleki, Seyed Dawood Mousavi Nasab, Zahra Ahmadi, Tahereh Mohammadi, Sanam Azad-nManjiri, Mohammad Sadegh Shams Nosrati, Mahsa Tavakoli, Zahra Fereydouni, Sahar Khakifrouz, Siamak Mirab Samiee, Alireza Biglari, Kayhan Azadmanesh, Health Policy and Technology, Volume 10, Issue 2, June 2021, 100506.

- ✓ Francisella tularensis human infections in a village of northwest Iran, S Esmaeili, M Rohani, A Ghasemi, MM Gouya, S Khayatzadeh, .,BMC infectious diseases 21 (1), 1-8.
- ✓ Tropheryma whipplei intestinal colonization in immunocompromised children in Iran: a preliminary study, S Shams, N Rezaie, A Beltrame, L Moro, C Piubelli, FB Amiri, S Esmaeili, Future Microbiology 16 (15), 1161-1166.
- ✓ Molecular Detection of Zoonotic Pathogens in the Blood and Tissues of Camels (Camelus dromedarius) in Central Desert of Iran, Aliasghar Bahari, Sakineh Azami, Ali Goudarزتalejerdi, Saeid Karimi, Saber Esmaeili, Bruno B Chomel, Alireza Sazmand, The Yale Journal of Biology and Medicine, 94(2): 249–258.
- ✓ Q Fever Endocarditis in Northeast Iran, AA Heydari, E Mostafavi, M Heidari, M Latifian, S Esmaeili, Case Reports in Infectious Diseases, Volume 2021:ID 5519164.
- ✓ Molecular detection of Coxiella burnetii infection in aborted samples of domestic ruminants in Iran, A Mohabati Mobarez, M Khalili, E Mostafavi, S Esmaeili, PLoS one 16 (4), e0250116.
- ✓ Bacillary angiomatosis by Bartonella quintana in HIV-infected patient: molecular confirmed case in Iran, Malihe Hassan Nezhad, Saber Esmaeili, Seyed Ahmad Seyed Alinaghi, Ladan Abbasian, Tahmine Biazar, Mohammad Ashouri, Ehsan Mostafavi, Nazanin Janfaza, HIV & AIDS Review. International Journal of HIV-Related Problems 20 (2), 147-150.
- ✓ Identification of Coxiella burnetii in Raw Milk of Livestock Animal in Iran, AM Mobarez, E Mostafavi, M Khalili, S Esmaeili, International Journal of Microbiology, Volume 2021, ID 6632036.
- ✓ A description of spatial-temporal patterns of the novel COVID-19 outbreak in the neighbourhoods' scale in Tehran, Iran, Azadeh Lak, Alireza Zali, Siamak Badr, Ehsan Mostafavi, Hamid R Baradaran, Khatereh Hanani, Ara Toomanian, Davood Khalili, Medical Journal of The Islamic Republic of Iran (MJIRI) 35 (1), 954-961 .

- ✓ Rodent-Related Zoonotic Pathogens at the Human–Animal–Environment Interface in Qatar: A Systematic Review and Meta-Analysis, Md Mazharul Islam, Elmoubashar Farag, Ahmad Mahmoudi, Mohammad Mahmudul Hassan, Ehsan Mostafavi, Khalid A Enan, Hamad Al-Romaihi, Muzzamil Atta, Abdel Rahim M El Hussein, Zilungile Mkhize-Kwitshana, *International journal of environmental research and public health* 18 (11), 5928.
- ✓ Vector-borne diseases in Iran: epidemiology and key challenge, N Parhizgari, N Piazak, E Mostafavi, *Future Microbiology* 16 (1), 51-69.
- ✓ Investigation of *Clostridium difficile* in elderly people: A preliminary study in Iran, A Ghasemi, A Mohabati Mobarez, E Mostafavi, *Tropical Doctor*, 0049475521999221.
- ✓ Prolonged Viral Shedding and Antibody Persistence in Patients with COVID-19 Fatemeh Fotouhi, Mostafa Salehi-Vaziri, Behrokh Farahmand, Ehsan Mostafavi, Mohammad Hassan Pouriayevali, Tahmineh Jalali, Vahideh Mazaheri, Mona Sadat Larijani, Mahsa Tavakoli, Neda Afzali, Afsaneh Zokaei, SeyedeAtefe Hosseini, Mohamad Mahdi Mortazavipour, Farideh Niknam Oskouei, Amitis Ramezani, *Microbes and Infection*, 104810.
- ✓ Transmission of COVID-19 between Animals and Humans: a Challenge for the Scientists, E Mostafavi, Z Eftekhari, N Jabbari, P Gheibi, *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases* 9 (1), 1-4.
- ✓ Emerging and Re-emerging Infectious Diseases in the WHO Eastern Mediterranean Region, 2001-2018, E Mostafavi, A Ghasemian, A Abdinasir, SA Nematollahi Mahani, S Rawaf, *International Journal of Health Policy and Management*.
- ✓ Antibiotic Susceptibility Profile of *Clostridium Difficile* Bacteria Isolated from Older Residents of a Nursing Home in Iran, A Ghasemi, A Mohabati Mobarez, E Mostafavi, *Iranian Journal of Ageing* 15 (4), 496-505.

- ✓ Investigation of Antimicrobial Susceptibility in *Clostridium Difficile* Isolated From Older Adult Residents of a Nursing Home in Tehran, A Ghasemi, A MobarezMohabati, E Mostafavi, *Iranian Journal of Ageing* 15 (4), 9.
- ✓ *Francisella tularensis* survey among ranchers and livestock in western Iran, HA Cohan, M Jamshidian, M Rohani, M Moravedji, E Mostafavi, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 74, 101598.
- ✓ Spatio-temporal Patterns of the COVID-19 Pandemic, and Place-based Influential Factors at the Neighborhood scale in Tehran, A Lak, A Sharifi, S Badr, A Zali, A Maher, E Mostafavi, D Khalili, *Sustainable Cities and Society*, 103034.
- ✓ In Honor of Dr. Mehdi Assmar, a Distinguished Researcher at the Pasteur Institute of Iran, S Maslehat, AR Esmacili Rastaghi, MR Siavashi, E Mostafavi, *Journal of Research on History of Medicine* 10 (2), 81-94.
- ✓ Morphometric Study of *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, and *Rattus rattus* in Qatar, MM Islam, E Farag, A Mahmoudi, MM Hassan, M Atta, E Mostafavi, *Animals* 11 (8), 2162.
- ✓ The monitoring of *Francisella tularensis* in surface water of East Azerbaijan province, Iran, S Aghamohammad, HA Cohan, A Ghasemi, E Mostafavi, M Rohani, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 101744.
- ✓ *Borrelia duttonii*-like spirochetes parasitize *Meriones persicus* in East Azerbaijan Province of Iran, Ahmad Ghasemi, Saied Reza Naddaf, Ahmad Mahmoudi, Mahdi Rohani, Sabah Naeimi, Alireza Mordadi, Sally Jane Cutler, Ehsan Mostafavi, *Ticks and Tick-borne Diseases* 12 (6), 101825.
- ✓ Plague reservoir species throughout the world, A Mahmoudi, B Kryštufek, Ahmad Mahmoudi, Boris Kryštufek, Alexander Sludsky, Boris V Schmid, Alzira MP De Almeida, Xu Lei, Beza Ramasindrazana, Eric Bertherat, Aidyn Yeszhanov, Nils Chr Stenseth, Ehsan Mostafavi, *Integrative Zoology* 16 (6), 820-833.

نمونه های بالینی ارجاع شده به آزمایشگاه مرجع کشوری طاعون، تولارمی و تب کیو

تعداد موارد مثبت سرولوژی	تعداد موارد مثبت مولکولی	تعداد تست سرولوژی	تعداد تست مولکولی	تعداد نمونه ارجاع	نام بیماری
-	۰	۰	۱	۱	طاعون
۷	۰	۱۸	۴۵	۵۲	تولارمی
۵	۰	۱۲	۱۷	۱۹	تب کیو
۱۲	۰	۳۰	۶۳	۷۲	جمع

نمونه های بالینی ارجاع شده به مرکز تحقیقات بیماری های نوپدید و بازپدید سال ۱۴۰۰

تعداد موارد مثبت سرولوژی	تعداد موارد مثبت مولکولی	تعداد تست سرولوژی	تعداد تست مولکولی	تعداد نمونه ارجاعی	نام بیماری
۰	۲	۳	۵	۵	ریکتزیا
۳	۱	۸	۲۰	۲۱	بارتونلا
۰	۰	-	۳	۳	لایم
۳	۳	۱۱	۲۸	۲۹	جمع

برگزاری دوره های آموزشی مدیریت طغیان بیماری های واگیر

سه دوره آموزشی "مدیریت طغیان بیماری های واگیر با نگاه نظام مراقبت سندرومیک" از تاریخ ۲۰ تا ۲۵ مهرماه و ۱۱ تا ۱۶ آبان ماه و ۱۰ تا ۱۶ آذرماه جهت کارشناسان و مدیران گروه بیماری های واگیر دانشگاه های علوم پزشکی کشور منتخب در پایگاه تحقیقاتی بیماری های نوپدید و بازپدید انستیتو پاستور ایران واقع در روستای اکنلوی شهرستان کبودرآهنگ برگزار شد. این دوره ها با تعداد محدود و با رعایت پروتکل های بهداشتی، با حمایت سازمان جهانی بهداشت و با همکاری مرکز مدیریت بیماری های واگیر و دانشگاه های علوم پزشکی شهید بهشتی، همدان، کردستان و تبریز توسط مرکز تحقیقات بیماری های نوپدید و بازپدید انستیتو پاستور ایران برگزار شد.

در دوره اول شرکت کنندگانی از دانشگاه های علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی هرمزگان، مشهد، ارومیه، اهواز، ایرانشهر، زابل، تبریز، کرمانشاه، زاهدان، شیراز، بیرجند و مرکز مدیریت بیماری های و در دوره دوم شرکت کنندگانی از دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان، گیلان، گلستان، یزد، اراک، کردستان، همدان، اردبیل، ایلام، و قم و مرکز مدیریت بیماری های واگیر شرکت داشتند.

سومین دوره جهت کارشناسان درگیر در برنامه مدیریت طغیان بیماری های واگیر وزارت بهداشت در پایگاه تحقیقاتی بیماری های نوپدید و بازپدید انستیتو پاستور ایران برگزار شد. این دوره با حمایت سازمان جهانی بهداشت و با همکاری دفتر منطقه مدیترانه شرقی سازمان جهانی بهداشت، انستیتو روبرت کخ آلمان، مرکز مدیریت بیماری های واگیر وزارت بهداشت و دانشگاه های علوم پزشکی شهید بهشتی، همدان، و کردستان برگزار شد. در این دوره سه مدرس از انستیتو روبرت کخ آلمان با نام های Regina Singer, Sebastian Haller, Basel Karo شرکت داشتند.

فراگیران شرکت کننده در این دوره ها، با مهارت هایی نظیر چارچوب کلی مدیریت طغیان، انواع نظامهای مراقبت و استفاده از آنها در طغیانها، نظام مراقبت سندرمیک در ایران و چارچوب ثبت و گزارش دهی سندرم ها، انواع مطالعات در طغیانها، بررسیها و سنجشهای محیطی، تفکر نقادانه در مراحل مختلف، آنالیز، گزارش دهی، و ارائه بازخورد، جمع آوری، برچسب زنی و انتقال نمونه ها، تهیه گزارش در طغیانها، ارتباطات هنگام بررسی طغیان و مستندسازی، حمایت طلبی و استفاده از اکسل در طغیانها آشنا شدند. دکتر محمد مهدی گویا رییس مرکز مدیریت بیماری های واگیر وزارت بهداشت نیز در این دوره، به تشریح درس آموخته های پاندمی کووید-۱۹ پرداخت و به لزوم کسب تجربه از این همه گیری و مطالب آموزش داده شده در این دوره تاکید نمودند.





جلسات ژورنال کلاب مرکز تحقیقات بیماری های نوپدید و بازپدید در سال ۱۴۰۰

در سال ۱۴۰۰، ۱۲ جلسه ژورنال کلاب به شرح زیر توسط مرکز تحقیقات بیماری های نوپدید و بازپدید برگزار گردید:

فرد ارائه دهنده	تاریخ برگزاری	عنوان ارائه	
خانم پریسا اسمعیلی	۱۴۰۰/۰۷/۰۳	<i>Francisella tularensis</i> , Tularemia and Serological Diagnosis	۱
خانم مینا لطیفیان	۱۴۰۰/۰۷/۱۸	relevant aspects Clinical microbiology of <i>Coxiella burnetii</i> and for the diagnosis and control of the zoonotic disease Q fever و Clinical Features and Complications of <i>Coxiella burnetii</i> Infections From the French National Reference Center for Q Fever	۲
خانم دکتر ندا باصری	۱۴۰۰/۰۸/۰۴	مروری بر کلیات بیماری های ریکتزایی و مروری بر مطالعات در ایران و مرور بر نتایج طرح بررسی ریکتزیا کونوری در نمونه های CCHF منفی	۳
خانم مینا لطیفیان	۱۴۰۰/۰۸/۲۵	Presence of <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> DNA in the Aquatic Environment in France و Long-Term Survival of Virulent Tularemia Pathogens outside a Host in Conditions That Mimic Natural Aquatic Environments	۴
آقای امیرحسین امیدی	۱۴۰۰/۰۹/۰۹	مرور سیستماتیک بر بیماری های ریکتزایی در کشورهای منطقه خاورمیانه با رویکرد موارد بالینی انسانی، مخازن و ناقلین گونه های مختلف ریکتزیا گزارش در این کشورها	۵
خانم پریسا اسمعیلی	۱۴۰۰/۰۹/۲۳	ANTIGEN-BASED ELISA RECOMBINANT DEVELOPMENT OF FOR THE DETECTION OF ANTI-TULAREMIA ANTIBODIES IN HUMAN SERA: A PILOT STUDY SWINE AND و Development of Immunoassays for Detection of <i>Francisella tularensis</i> Lipopolysaccharide in Tularemia Patient Samples	۶
خانم دکتر ندا باصری	۱۴۰۰/۱۰/۰۷	نقش کوکسیلا بورتنی و تب کیو در ایجاد هپاتیت در انسان	۷
خانم مینا لطیفیان	۱۴۰۰/۱۰/۲۱	مرور نتایج چند مطالعه اخیر جهت ردیابی کوکسیلا بورتنی، ریکتزیا و فرانسیلا تولارنسیس در نمونه های کهنه جمع آوری شده از استان های مازندران، گیلان، کردستان، گلستان و آذربایجان غربی در قالب چند پروژه پژوهشی	۸
آقای امیرحسین امیدی	۱۴۰۰/۱۱/۰۵	Transmission of Antimicrobial Resistant <i>Yersinia pestis</i> During a Pneumonic Plague Outbreak	۹
خانم دکتر فهیمه باقری امیری	۱۴۰۰/۱۱/۱۹	The 2017 plague outbreak in Madagascar: Data descriptions modeling and epidemic و Epidemiological characteristics of an urban plague epidemic in Madagascar, August–November, 2017: an outbreak report	۱۰
خانم لیلا مونسان	۱۴۰۰/۱۲/۰۸	The epidemic volatility index, a novel early warning tool for identifying new waves in an epidemic	۱۱
آقای امیرحسین امیدی	۱۴۰۰/۱۲/۲۲	Tularemia as a waterborne disease: a review	۱۲

تهیه کلیپ های آموزشی گفتمان علمی کووید ۱۹

در سال ۱۴۰۰ بر اساس تفاهمنامه ای با معاونت تحقیقات وزارت بهداشت، ۱۱ کلیپ آموزشی حدوداً ده دقیقه ای تهیه شد که در شبکه های مجازی و از جمله سایت وزارت بهداشت به آدرس به اشتراک گذاشته شده اند:

<https://research.behdasht.gov.ir/videos>

• قسمت اول: کرونا و بیماری های عفونی

میهمان برنامه: دکتر محمد مهدی گویا- رئیس مرکز مدیریت بیماری های واگیر وزارت بهداشت.
پاسخ علمی و مبتنی بر شواهد به چالش ها و ابهاماتی که مردم سوال میکنند در:
پاندمی کووید-۱۹، چه تاثیری بر سایر بیماری های عفونی دیگر گذاشت؟
رخداد مواردی از سرخک طی اپیدمی کووید-۱۹ چقدر نگران کننده است؟
چه توصیه ای به مردم و جامعه بهداشت و درمان میکنیم که گرفتار سایر بیماری های عفونی نشویم؟

• قسمت دوم: پیک های کووید-۱۹ را بشناسیم.

میهمان برنامه: دکتر علی اکبر حقدوست- استاد اپیدمیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان
علت تکرار پیک های اپیدمی کووید-۱۹ در ایران و جهان چیست؟
تا چه زمانی این پیک های اپیدمی قرار است تکرار شود؟
باید چکار کنیم تا مانع تکرار رخداد این پیک ها شویم؟

• قسمت سوم: آخرین اطلاعات ویروس های جهش یافته کووید-۱۹

میهمان برنامه: دکتر مصطفی صالحی وزیر- ویروس شناس و مسئول آزمایشگاه مرجع کووید-۱۹:
- جهش یافتن ویروس کووید-۱۹ به چه معناست؟
- ویروس های جهش یافته آیا از نظر بالینی مهم هستند؟
- آیا واکسن ها قادر به اثربخشی درمقابل ویروس های جهش یافته کووید-۱۹ هستند؟

• **قسمت چهارم: تشریح پلتفرم واکسن های کووید-۱۹**

میهمان برنامه: دکتر کیهان آزادمنش - متخصص زیست فناوری پزشکی انستیتو پاستور پاسخ می‌دهد

تشریح پلتفرم هایی که در آن بستر واکسن های کووید-۱۹ ساخته میشوند/ واکسن های ایرانی چه پلتفرمی دارند و آیا یک پلتفرم به دیگری برتری دارد؟

• **قسمت پنجم: علائم بالینی و بروس جهش یافته کرونا نوع دلتا**

میهمان برنامه: دکتر مجید مختاری - فوق تخصص ریه و مراقب ویژه

فرم جهش یافته کووید-۱۹ نوع دلتا چه تصویر و علائم بالینی دارد؟

مردم در چه شرایط و علایمی باید به پزشک مراجعه کنند؟

• **قسمت ششم: تهویه هوا و بهینه ترین پروتکل های بهداشتی در پیشگیری از کرونا**

میهمان برنامه: دکتر مسعود یونسیان، استاد اپیدمیولوژی و عضو هیات علمی گروه مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی تهران

برقراری تهویه هوا و بهداشت تنفسی در پیشگیری از ابتلا به کووید-۱۹ چه میزان موثر است؟

در شرایط فعلی، کارآمدترین رفتارها و پروتکل های بهداشتی در پیشگیری از ابتلا به کووید-۱۹ کدام است؟

• **قسمت هفتم: نقش طب ایرانی در درمان و پیشگیری از کووید-۱۹**

میهمان برنامه: دکتر نفیسه حسینی یکتا - متخصص طب ایران

آیا طب سنتی - ایرانی منافات و تضادی با واکسیناسیون علیه کرونا دارد؟

آیا در طب ایرانی، درمان قطعی کووید-۱۹ وجود دارد؟ چطور باید یک داروی طب ایرانی مسیر علمی اثبات اثربخشی اش را بگذراند؟

• **قسمت هشتم: شرح بالینی بعد از ابتلا به بیماری کووید-۱۹**

میهمان برنامه: دکتر آمیتیس رضانی؛ متخصص بیماری های عفونی

• **قسمت نهم: درگیری ریه در کووید-۱۹ و خودمراقبتی**

میهمان برنامه: دکتر آمیتیس رضانی؛ متخصص بیماری های عفونی
چه علائمی به شما میگوید که بعد ابتلا به کرونا ریه تان درگیر شده است؟
چه زمانی شما بعد ابتلا به کرونا نیازمند سی تی اسکن می شوید؟
نکات بسیار کلیدی که بیماران کرونایی در منزل باید رعایت کنند!

• **قسمت دهم: واکسن کرونا**

میهمان برنامه: دکتر امیرحسن زرنانی، متخصص ایمونولوژی بالینی
ایمنی حاصل از تزریق واکسن کرونا، چگونه و در چه بازه زمانی ایجاد میشود؟
با تزریق واکسن، چه زمان به حداکثر ایمنی میرسیم؟
با دریافت واکسن کووید-۱۹، بدنمان تا چه مدت زمانی ایمنی کافی دارد؟

قسمت یازدهم: تفاوت ایمنی حاصل از واکسن و ابتلای طبیعی

میهمان برنامه: دکتر امیرحسن زرنانی، متخصص ایمونولوژی بالینی
وقتی با وجود دریافت واکسن باز هم احتمال دارد به کرونا مبتلا شویم، پس چرا اصلا واکسن بزنیم؟
فردی که به کرونا مبتلا شده و آنتی بادی در بدن دارد، چرا باز هم باید واکسن بزند؟

چاپ کتاب راهنمای استاندارد شناسایی، بررسی، مدیریت و کنترل طغیان بیماری های مشمول قوانین بهداشت بین المللی (IHR) با بهره گیری از نظام مراقبت سندرمیک

همکاران دانشگاه های علوم پزشکی کشور از سال ۱۳۹۴ که نسخه اول سامانه هشدار سریع بیماری های واگیر کشور موسوم به نظام مراقبت سندرمیک (SSS) طراحی و تحویل دانشگاه ها گردید، ضمن استقبال از این سامانه، در خصوص اقدامات لازم در بررسی و تحقیق در خصوص هشدار صادر شده سوالاتی را مطرح می نمودند.

کتاب راهنمای استاندارد شناسایی، بررسی، مدیریت و کنترل طغیان بیماری های مشمول قوانین بهداشت بین المللی با بهره گیری از نظام مراقبت سندرمیک که با همکاری تنگاتنگ مرکز تحقیقات بیماری های نوپدید و بازپدید انستیتو پاستور ایران و مرکز مدیریت بیماری های واگیر تدوین شد، می تواند به عنوان راهنمایی برای بررسی و تحقیق بیشتر در خصوص طغیان بیماری های واگیر که هشدار اولیه آنها توسط نظام مراقبت سندرمیک صادر شده است مورد استفاده نیروهای فعال در حوزه سلامت کشور قرار گیرد. در این کتاب، اقدامات لازم برای کنترل و پیشگیری از طغیان بیماری ها براساس نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک و نتایج آزمایشگاهی شرح داده شده است، مراحل بررسی اپیدمیولوژیک یک طغیان بدقت تشریح شده است، به نحوه بهره گیری از سندرم های تعریف شده در نظام مراقبت سندرمیک برای تسهیل بررسی طغیان ها و نظام مراقبت بیماری های روتین و تفاوت های آن ها پرداخته شده است و به تشریح اقدامات لازم برای پاسخ مناسب و سریع در زمان بروز رویدادهایی که می توانند یک فوریت بهداشت عمومی با اهمیت بین المللی محسوب شوند پرداخته شده است.

در انتهای کتاب هم سعی شده است با یکسری مثال های کاربردی، ابعاد مختلف موضوع برای مخاطبین روشن گردد. این کتاب در ابتدای سال ۱۴۰۰ چاپ و در تمام شبکه بهداشتی و درمانی کشور توزیع شد.



چاپ کتاب "انستیتو پاستور ایران در گذر تاریخ"

کتاب "انستیتو پاستور ایران در گذر تاریخ" به مناسبت یکصدمین سال تأسیس انستیتو پاستور ایران منتشر گردید. افتخارات با شکوه و بزرگ تاریخ تمدن و فرهنگ ایران همواره بیانگر وجود مراکز دانش و تحقیق در انواع علوم بوده است. مراکز برجسته علمی همچون انستیتو پاستور ایران در طی تاریخ پر فراز و نشیب خود همواره تکیه گاهی امن و مطمئن برای التیام درد و رنج مردم شریف این سرزمین در مبارزه با بیماری های عفونی بوده است چه از تاریخ تأسیس در ۲۹ فروردین سال ۱۲۹۹ که انستیتو پاستور ایران فعالیت خود را به طور رسمی آغاز کرد تا امروز که با یک قرن "قدمت و خدمت" نقشی تعیین کننده در کنترل بیماری های عفونی داشته است. این مسیر طولانی به سرانجام نمی رسید مگر با تلاش و همت بزرگ مردان و زنان دانشمندی که از جان مایه گذاشتند.

کتاب "انستیتو پاستور ایران در گذر تاریخ" حکایت مستند و خواندنی این تاریخ پر تلاطم در جهت ارج گذاری از فعالیت های ماندگار این این موسسه و خدمات انسان های شریفی است که برای نسل جوان این سرزمین تدوین گردیده تا با مرور این تاریخ پر افتخار، به هم افزایی انگیزه های خدمتی علمی خود بپردازند و چون پشتیبانی بر استقلال علمی و رشد و بالندگی این کشور پهناور بیاندیشد و عملگرایانه مسیر توسعه انتخاب نماید.

در فصول مختلف این کتاب به مطالب متنوعی نظیر تاریخچه تأسیس و گسترش، مفاخر و چهره های ماندگار، عکس ها و اسناد تاریخی، و واکسن های تولیدی انستیتو پاستور ایران پرداخته شده است و اقدامات این موسسه در دوره کرونا و مخصوصا در حوزه های تشخیص و واکسن، مرور شده است.

این کتاب به خدمات و فعالیت های صد سال اخیر انستیتو پاستور ایران به نظام سلامت و نیز وضعیت فعلی علمی و فنی آن می پردازد که به همت دو تن از محققین این انستیتو دکتر احسان مصطفوی و دکتر علیرضا هادی زاده تثبیتی در ۳۰۲ صفحه در قطع وزیری به دو زبان فارسی و انگلیسی توسط انتشارات گپ چاپ شده است.

