الكشف عن الكوكسيلا بورنيتي في القراد المتطفل على الأغنام والماعز باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) في بعض المحافظات السورية

عبدالناصر العمر *[1] ومرشد كاسوحة[2] وأشرف الصالح[2]

(1) مركز بحوث حماة، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية

(2) قسم الأحياء الدقيقة ، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، حماة، سورية

(* للمراسلة: الدكتور عبد الناصر العمر، البريد الإلكتروني: **abdnaser64@gmail.com)**

تاريخ الاستلام:2022/10/17 تاريخ القبول:2022/10/27

الملخص:

أجريت هذه الدراسة خلال عامي 2021 و 2022 بهدف الكشف عن قدرة طفيليات القراد (اللبود) المنتشرة في القطر العربي السوري على حمل جرثومة الكوكسيلا بورنيتي المسببة للحمى المجهولة باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR). جُمعت عينات من القراد من 45 قطيعاً من الأغنام والماعز توزعت على محافظات حماة وحمص وريف دمشق، وتضمنت 36 قطيعاً من الأغنام و 9 قطعان من الماعز. حُددت أجناس القراد المجموعة وكانت تنتمي إلى جنسين فقط من الأجناس المعروفة عند هذا الطفيلي وهما جنس مروحي الرأس*G.Rhipicephalus* وجنس زجاجي العين *G.Hyalomma* وكانت نسب انتشارهم 60% و 40% على الترتيب. تم جمع 3 من طفيليات القراد في أنبوب واحد من كل قطيع وتم استخلاص الـDNA منها كعينة واحدة، ومن ثم أنجز اختبار PCR على المستخلص. أظهرت نتائج اختبار PCR الذي أنجز على عينات الـDNA المستخلص أن ستة منها كانت إيجابية لوجود الكوكسيلا بورنيتي في كل من القراد المجموع من الأغنام والماعز، حيث ظهرت النتيجة إيجابية في عينتين من قراد الماعز وأربع عينات من قراد الأغنام. وقد لوحظ أن عينتي قراد الماعز الإيجابية لوجود الكوكسيلا بورنيتي كانتا من قطيعين حدث فيهما حالات اجهاض مجهولة السبب، وبالمقابل فإن عينة واحدة كانت إيجابية في قراد الأغنام لقطيع حدث فيه حالات إجهاض. توزعت العينات الإيجابية الستة مناصفة بين جنسي القراد مروحي الرأس وزجاجي العين(50% لكل منهما) أي أن الجنسين قادرين على نقل الكوكسيلا بورنيتي . كما سجلت حالات إيجابية من المحافظات الثلاثة التي جمعت منها العينات. وتوصي هذه الدراسة بمتابعة العمل حول الكوكسيلا بورنيتي عند المجترات عموماً، وتوعية المربين حول هذا المسبب المرضي المشترك مع زيادة الاهتمام بمكافحة القراد كونه ناقل للكثير من الأمراض الجرثومية والطفيلية والفيروسية عند الإنسان والحيوان.

الكلمات المفتاحية: كوكسيلا بورنيتي, القراد, الأغنام، الماعز, سورية، تفاعل البوليميراز المتسلسل.

المقدمة:

الكوكسيلا بورنيتي هي جرثومة داخل خلوية مجبرة Obligate intracellular bacteria ويمكن أن تعيش خارج الخلية بفضل وجود شكلٍ مقاومٍ لها يشبه البوغ Spore (Frangoulidis *et al*., 2021; Maurin and Raoult, 1999) . صنفت هذه

الجرثومة ضمن عائله *Coxiellaceae* جنس *Coxiella* و الذي يضم نوعاً واحداً وهو *Burnetii* (Stein *et al*., 1993). تصيب الكوكسيلا بورنيتي أغلب الحيوانات الأهلية والبرية، والطيور، والأسماك وكذلك الإنسان مسببة مرض الحمى المجهولة Q Fever. وهو مرض وبائي ذو انتشار عالمي(Maurin and Raoult, 1999).

يكتسب مرض الحمى المجهولة (Q fever) أهمية بالغة عند المجترات الأهلية وخاصة الأبقار، والأغنام والماعز، وتعد الماعز أكثر المجترات حساسية للإصابة (Patra *et al*., 2020)، وبالتالي يمكن القول أن المجترات تشكل المصدر الرئيس لخمج (عدوى) باقي الكائنات من ثديات ومفصليات أرجل (Frangoulidis *et al*., 2021; Lang, 1990).

غالباً ما تظهر الإصابة بهذا المسبب من دون أعراض ظاهره مميزة غير أنها قد تكون مترافقة مع اضطرابات تناسلية تتمثل في حدوث اجهاضات في آخر الحمل قد تصل لنسبة 90% عند الماعز (Berri *et al*., 2007; Rodolakis, 2006) ، ونفوقٍ بالمواليد أو ولادة مواليد مشوهة, و يمكن ملاحظة اضطرابات أخرى كالتهاب الرئة والضرع ولكن بدرجة أقل أهمية من الاجهاضات والخسائر الحاصلة في المواليد. تطرح هذه الجرثومة بأعداد كبيرة عند الولادة الطبيعية أو عند الإجهاض في المشيمة، وفي الملحقات الجنينية والسوائل الولادية, و تطرح مع الحليب والبراز والبول والمفرزات المهبلية (Bouvery *et al*., 2003; Rousset *et al*., 2009) والسائل المنوي (Kruszewska and Tylewska-Wierzbanowska, 1997) ولفترات زمنية طويلة وبحمولات جرثومية متباينة. والأمر البالغ الأهمية هو أن الكوكسيلا بورنيتي تمتلك قدرة عالية على مقاومة الظروف البيئية القاسية (Alsaleh, 2014).

يتم انتقال العدوى بشكل أساسي عند استنشاق الهواء الملوث بهذه الجراثيم، غير أنه توجد إمكانية لانتقال العدوى عن طريق الجهاز الهضمي عند المجترات عند تناول أجزاء من المشيمة. كما أثبت انتقال العدوى من الأم إلى الجنين عند المجترات حيث تم عزل الكوكسيلا بورنيتي من الأجنة المجهضة, وكذلك انتقال العدوى جنسياً محتمل وبدرجة كبيرة (Kruszewska and Tylewska-Wierzbanowska, 1997). تعد مفصليات الأجل وبخاصة القراد مهمة في نقل الكوكسيلا بورنيتي بين الحيوانات المصابة بالحمى المجهولة (Frangoulidis *et al*., 2021; Knap *et al*., 2019)، فقد تم كشف الجرثومة في أكثر من 40 نوعاً من أجناس القراد (Kazar, 2005; Psaroulaki *et al*., 2006). وأظهرت العديد من الدراسات أن الكوكسيلا بورنيتي تنتقل إلى القراد (اللبود) بأجناسه المختلفة عند أخذه لوجبة دم من الحيوانات المصابة بالحمى المجهولة في مرحلة تجرثم الدم، حيث تتكاثر الجرثومة في القراد وتزداد فوعتها، وينقلها القراد إلى الحيوانات السليمة عند تغيير الثوي عن طريق لدغه وامتصاص دمه، كما وتُطرَح مع براز القراد بتراكيز عالية مما يسهم في تلوث البيئة، ويمكن للكوكسيلا بورنيتي الانتقال إلى أجيال القراد اللاحقة كونها تتوضع في مبايضها وبالتالي تخرج مع اليرقات الفاقسة حديثاً والتي تنقلها بدورها إلى حيوانات مضيفة أخرى (Angelakis and Raoult, 2010).

يتم الكشف المباشر عن الكوكسيلا بورنيتي تقليدياً من خلال الزراعة في أجنة الدجاج أو المزارع الخلوية. غير أن هذه الطريقة بطيئة و لا يمكن تطبيقها إلا في مخابر خاصة وبدرجة حماية عالية وصارمة تمنع من انتشار هذا المسبب أثناء زراعته وإكثاره. ولذلك فإن العديد من الدراسات في السنوات الأخير أظهرت أهمية استخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل التقليدي و بالوقت الحقيقي (PCR and RT-PCR)، من حيث الحساسية و النوعية، في الكشف المباشر عن الكوكسيلا بورنيتي في نماذج مختلفة من العينات (Alsaleh *et al*., 2011; Klee *et al*., 2006).

يعد هذا البحث الأول على مستوى القطر العربي السوري والذي يستهدف طفيلي القراد كناقل لأحد المسببات المرضية الهامة والمهملة في سورية والمسببة للاجهاض عن المجترات، وبالتالي هدف هذا العمل إلى تقصي قدرة أجناس القراد الأكثر انتشاراً في سورية على حمل ونقل الكوكسيلا بورنيتي، وبالتالي الحصول على مؤشرات أولية عن دورها في بعض حالات الاجهاضات مجهولة السبب التي تعاني منها الأغنام والماعز ، كما يعد التوصل إلى برتوكول تشخيصي يعتمد على الطرائق الجزيئية (PCR) في تأكيد وجود المسبب المرضي أحد أهداف هذه الدراسة أيضاً. وليكون بداية للأبحاث التي سوف تستهدف الأمراض المنقولة بالقراد Tick-porn Diseases لما لها من أهمية كبيرة محلياً وفي المنطقة وعلى مستوى العالم.

مواد البحث و طرائقه:

- استهدفت هذه الدراسة 45 قطيعاً من الأغنام والماعز مصابة بالقراد (9 قطعان من الماعز و36 من الأغنام)، وتوزعت على ثلاث محافظات في سورية هي: حماة (23 أغنام و 5 ماعز) وحمص (7 أغنام و 2 ماعز) وريف دمشق (6 أغنام و 2 ماعز)، حيث جُمعت أعدادٌ من ذكور وإناث القراد من على جسم الحيوان خلال عامي 2021 و 2022 ووضعت في عبوات معقمة ونقلت إلى مختبر الطفيليات في جامعة حماة–كلية الطب البيطري مباشرة من دون إضافة إي مواد. وسجل على العبوة مكان الجمع والتاريخ ونوع الحيوان، بالإضافة إلى سؤال المربي عن وجود حالات إجهاض تكررت خلال الموسم الماضي ولم يحدد سببها وسجل ذلك أصولاً.
- عند وصول العينات إلى مختبر الطفيليات في كلية الطب البيطري (جامعة حماة) فصلت ذكور القراد عن الإناث من كل عينة وأضيف الكحول الإيتيلي تركيز 70% إلى الذكور فقط بهدف حفظها ليتم تصنيفها وتحديد جنسها فيما بعد وذلك بسبب صعوبة تصنيف الإناث بعد امتصاصها للدم وانتفاخها وزيادة حجمها، بينما تركت الإناث حية ليتم استخلاص الـDNA منها خلال ثلاثة أيام كحد أقصى من وصولها للمختبر.
- تم تحديد جنس القراد بعد فحصها باستخدام المجهر المجسم (Stereoscope) في المختبر، حيث تم رؤية أجزاء الطفيلي التي يعتمد عليها في التصنيف وهي: قاعدة الرؤيس– اللوامس القدمية– العيون– الدرع الكيتيني – الحرقفة الأولى والرابعة– الصفائح والثلمة الشرجية– الصفائح التنفسية وصفات أخرى. وتم التفريق بين أجناس القراد تبعاً للصفات الشكليائية وذلك اعتماداً على المراجع المعتمدة في هذا المجال وأهمها:(Coley, 2015; Hosseini-Chegeni *et al*., 2013; Nava *et al*., 2017; Walker, 2003).
- بهدف استخلاص الـDNA من إناث القراد المجموعة تم وضع ثلاث قرادات إناث حية من كل قطيع في عبوة بلاستيكية معقمة مع بعضها، وتم تقطيعها بمشرط معقم وهرسها ومجانستها (Knap *et al*., 2019; Patra *et al*., 2020)، ومن ثم أخذت كمية من المزيج تساوي 50 mg ونقلت إلى أنبوب إبندورف معقم جديد، وأكملت عليها خطوات استخلاص الـDNA بالاعتماد على التعليمات الخاصة بكيت (عتيدة) من شركة GeneDirex الصينية والمرفقة معه (Dual Genomic DNA Isolation Kit (Tissue))، ليتم في النهاية الحصول على مستخلص المادة الوراثية محلولاً في 100 µl من دارئة الشطف Elution Buffer وحفظت على الدرجة –20 حتى إجراء تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR .

- وبهدف الكشف عن وجود الكوكسيلا بورنيتي أنجز تفاعل PCR مختبر البيولوجيا الجزيئية في كلية الطب البيطري (جامعة حماة) بالاعتماد على مرئسات Primers من شركة Microsynth السويسرية تستهدف السلسلة المدخلة IS1111 الموجودة بتكرارية عالية في جينوم الجرثوم (Alsaleh *et al*., 2011) مما يسهل الكشف عنها (الجدول 1).

الجدول(1). تسلسلات المرئسات المستخدمة للكشف عن الكوكسيلا بورنيتي.

المرجع	طول الشدفة	درجة التشافع	التسلسلات	المورثة
- **(Alsaleh *et al*., 2011)**	- bp337	- 62º	- 5'-CAAGAATGATCGTAACGATGCGC-3' - 5'-CTCGTAATCACCAATCGCTTCG-3'	- IS1111

وتكون مزيج تفاعـــل PCR (50 µl) مما يلي:

5 µl من مستخلص الـ DNA ، 1 µl (10pmol/µl) لكل من تسلسلي المرئستين، µl25 من مزيج (One Master mix PCR)الخاص بشركة GeneDirex، وتم إكمال المزيج بماء مقطر معقم خالٍ من إنزيم الدناز حتى 50 µl .

وتم التضخيم في جهاز المدور الحراري Thermal Cycler (Techne TC-512) وفق البرنامج التالي:

مرحلة التمسخ الأولي Initial Denaturation 94˚ مئوية 5 دقيقة دورة واحدة // دورات التضخيم وعددها 35 على الشكل التالي: 94ْ مئوية 30 ثانية، 62 مئوية 30 ثانية، 72˚ مئوية 1 دقيقة// مرحلة الاستطالة النهائية Final extension 72˚ مئوية 7 دقائق دورة واحدة.

وحضرت هلامة الأغاروز بتركيز 1.5% وأضيف لها بروميد الإيثيديوم بهدف القيام بالرحلان الكهربائي للكشف عن نواتج تفاعلات الـPCR المنجزة على الـDNA المستخلص، حيث تم فحص الهلامات بعد الانتهاء من الرحلان بوساطة جهاز موثق الهلام Gel Documenter لرؤية انطقة الـDNA عند الطول المتوقع bp337 في حال كانت النتيجة إيجابية.

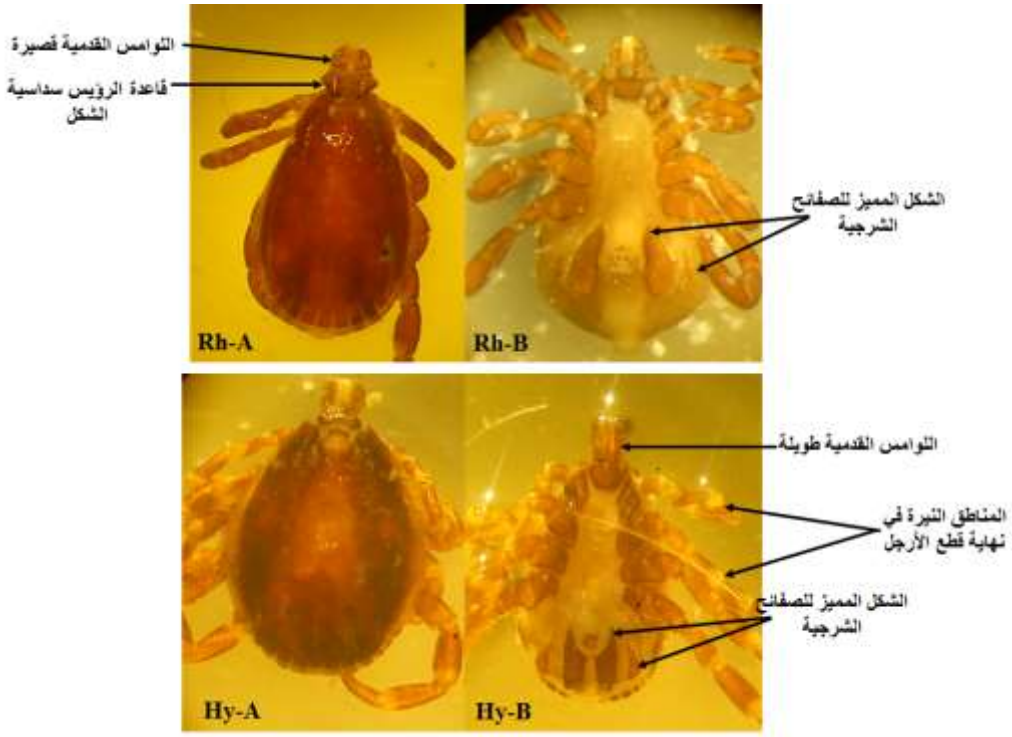
ولابد من التنويه أن كل عينة من مستخلص الـDNA خضعت لتفاعل الـ PCR ثلاث مرات منفصلة وأعتبرت العينة إيجابية في حال كانت إحدى التفاعلات الثلاثة إيجابية وذلك لزيادة دقة النتائج وحساسية الاختبار.

التحليل الاحصائي: تم الاعتماد على اختبار Mid-p exact المناسب لحجوم العينات الصغيرة (بعكس اختبار مربع كاي) عبر برنامج Open Epi المتوفر على شبكة الانترنت مجاناً www.openepi.com .

النتائج والمناقشة:

تحديد أجناس القراد في العينات ونسبها:

بعد إتمام فحص عينات ذكور القراد المجموعة بهدف دراسة صفاتها الشكلية، تبين أنها تعود إلى جنسين فقط من أجناس القراد المعروفة عالمياً هما جنس مروحي الرأس G.*Rhipicephalus* وجنس زجاجي العين G.*Hyalomma* ويبين الشكل (1) السطح الظهري والبطني لكل من الجنسين السابقين مع أهم الصفات الشكلية المميزة التي تساعد على التمييز بينهما.



الشكل (1): بعض الصفات الشكلية لجنسي اللبود زجاجي العين ومروحي الرأس

Rh: جنس مروحي الرأس– Hy: جنس زجاجي العين– A: سطح ظهري– B: سطح بطني

ويعد وجود هذين الجنسين متوافقاً ومنسجماً مع ما وجده (العمر وكاسوحة، 2019،2020) في مقالتين استهدفتا تحديد أنواع القراد عند الأغنام والأبقار في محافظة حماة، إذ كان جنس زجاجي العين وجنس مروحي الرأس هما الجنسين السائدين وبشكل كبير في العينات التي تمت دراساتها.

سجل وجود جنس مروحي الرأس في 27 قطيعاً أي ما يعادل 60% من مجمل القطعان التي جمعت منها العينات، في حين وجد جنس زجاجي العين في 18 قطيعاً أي 40% من قطعان الدراسة، مع العلم أنه لم يسجل وجود أكثر من جنس واحد في القطيع الواحد.

وتفصيلاً حُدّد وجود جنس مروحي الرأس عند الأغنام في 22 قطيعاً أما القطعان الـ 14 المتبقية فقد كان جنس زجاجي العين هو المشخص فيها. ومن جهة أخرى وجد جنس مروحي الرأس في خمسة قطعان من قطعان الماعز التسعة التي جمعت منها العينات، وجنس زجاجي العين في أربعة قطعان كما هو موضح في (الجدول 2).

الجدول(2). عينات القراد المجموعة مقسمة تبعاً لنوع الحيوان والمحافظة وجنس القراد.

الثوي مصدر جمع العينات	جنس القراد	المحافظة			
		حماة	حمص	ريف دمشق	المجموع
الأغنام	*Rhipicephalus*	14	6	2	**(%61.1)22**
	Hyalomma	9	1	4	**(%38.9)14**
	المجموع	***23**	**7**	**6**	**36**
الماعز	جنس القراد	حماة	حمص	ريف دمشق	المجموع
	Rhipicephalus	3	2	-	**(%55.5)5**
	Hyalomma	2	-	2	**(%44.4)4**
	المجموع	**5**	**2**	**2**	**9**

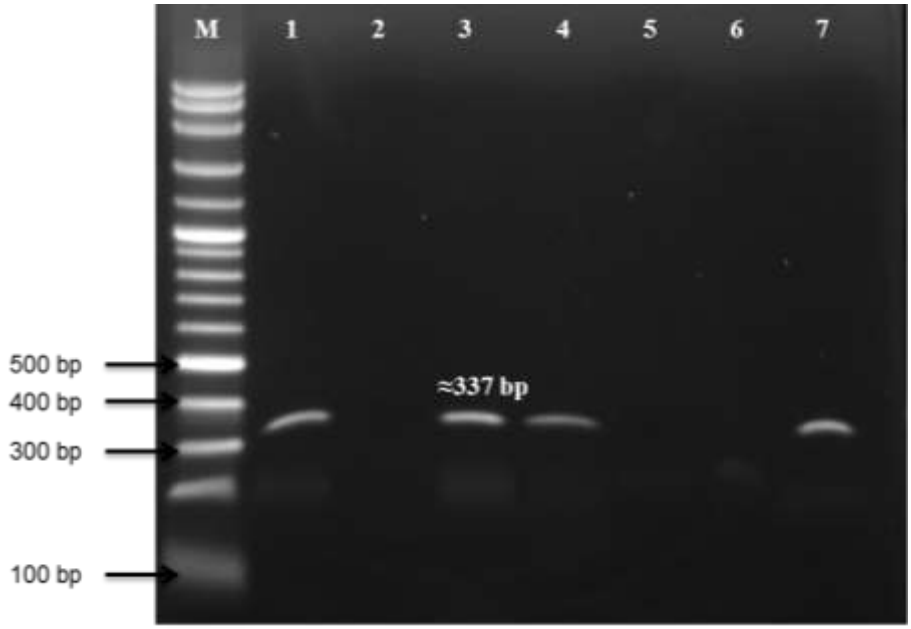
*عينات الأغنام من محافظة حماة توزعت كما يلي: 11 عينة جمعت من مدينة حماة ومحيطها، 6 من منطقة الغاب، 6 من منطقة سلمية.

وتجدر الإشارة هنا إلى تقارب النسب المسجلة في عينات هذه الدراسة لأجناس اللبود مع الدراسة السابقة عند الأبقار التي تمت في سورية (العمر وكاسوحة، 2019) والتي سجلت نسبة 50.74% لنوع مروحي الرأس و44.02% لجنس زجاجي العين و 5.22% لجنس بوفيلوس *Boophilus* ، في حين أن نتائج (العمر وكاسوحة،2020) عند الأغنام أظهرت اختلافاً وانقلاباً كبيراً في النسبة إذ سجلت وجود جنس زجاجي العين في 97.5% من العينات بينما سجل وجود جنس مروحي الرأس في 2.5% من العينات. إن الاختلاف السابق يعود وبوضوح إلى خواص بيولوجية طبيعية تجعل القراد زجاجي العين سائداً في البيئات الحارة والجافة وشبه الجافة على حساب الأجناس الأخرى، في حين يكثر وجود اللبود مروحي الرأس في المناخ المعتدل نوعاً ما والأكثر رطوبة. وأشار(العمر وكاسوحة،2020) إلى ذات الأمر إذ كانت معظم عيناتهم من منطقة ريف سلمية ووادي العزيب في محافظة حماة وكانت جميعها تتبع للجنس زجاجي العين في حين أن العينات القليلة من جنس مروحي الرأس كانت من محطة بحوث جدرين التي تقع في منطقة يعتبر مناخها رطباً.

وهذه النتائج تنطبق تماماً على ما أظهرته نتائج هذا العمل، فالعينات التي جمعت من الأغنام في محافظة حماة على سبيل المثال بلغت 23 عينة منها ست عينات من منطقة سلمية وريفها والتي تعد منطقة جافة كانت جميعها من جنس زجاجي العين، في حين العينات الستة التي جمعت من منطقة الغاب كانت خمسة منها من جنس مروحي الرأس وواحدة فقط من جنس زجاجي العين، وكذلك العينات الـ11 التي جمعت من مدينة حماة ومحيطها القريب كانت تسعة منها من جنس مروحي الرأس.

نتائج اختبار PCR للكشف عن الكوكسيلا بورنيتي:

بعد إتمام تفاعلات PCR على العينات وإجراء الرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز تبين وجود بعض العينات الإيجابية تشير إلى وجود جرثومة الكوكسيلا بورنيتي في القراد, ، حيث ظهرت أنطقة DNA في الهلامة عند طول يقارب b337 في العينات الإيجابية، وهو ما يمكن ملاحظته في الشكل (2), مما يوجب الاهتمام وتوعية المربين حول هذا المسبب المرضي المشترك بين الانسان والحيوان وضرورة مكافحة القراد كعامل ناقل رئيس للإصابة بالكوكسيلا بورنيتي وغيرها من الاصابات الطفيلية الدموية والأمراض الجرثومية والفيروسية الأخرى والتي أشارت أبحاث عديدة إلى انتقالها عن طريق القراد بطرق مختلفة.



الشكل (2). نتيجة الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 1.5% لبعض العينات بعد إنجاز تفاعل PCR
M: معلّم الأطوال الجزيئية للـDNA ، العينات1،3،4،7 : إيجابية، العينات 2،5،6 سلبية.

كما أظهرت النتائج وجود ست عينات إيجابية لوجود الكوكسيلا بورنيتي من مجموع العينات الـ 45 (أغنام +ماعز) أي بنسبة 13.33%، وكانت عينتان من العينات الستة الإيجابية ناتجة عن عينات الـDNA المستخلصة من القراد الذي جمع من الماعز، وبالتالي تكون عينات القراد الإيجابية لوجود الكوكسيلا المجموعة من الماعز عبارة عن عينتان من أصل تسع عينات أي بنسبة 22.22%, بينما وجدت أربع عينات إيجابية من أصل 36 عينة مجموعة من قراد الأغنام أي ما نسبته 11.1% (الجدول 3). ومن اللافت والواجب ذكره أن العينتين الإيجابيتين التي وجدتا في قراد الماعز كانتا من القطيعين اللذين سجلت فيهما حالات إجهاض في الموسم الماضي، بينما في العينات التي جمعت من الأغنام فقد كانت هناك حالة واحدة إيجابية للكوكسيلا سُجلت فيهما حالات إجهاض في الموسم السابق ، علماً أن قطعان الأغنام التي عانت من حالات اجهاض كانت سبعة قطعان، وبعد إتمام اختبار Mid-P exact الاحصائي وجد فرق معنوي بسيط عند $P<0.05$ يشير إلى قابلية الماعز للإجهاض اكثر من الأغنام عند اصابتها بالكوكسيلا بورنيتي حيث $P=0.041$ (الجدول 3).

أما فيما يتعلق بأجناس القراد التي حملت جرثومة الكوكسيلا بورنيتي فقد توزعت العينات الستة الإيجابية بالتساوي على الجنسين المسجلين في هذه الدراسة، حيث وجدت ثلاث عينات (50%) من العينات الستة الإيجابية في القراد من جنس مروحي الرأس *G. Rhipicephalus* وثلاث عينات في القراد من جنس زجاجي العين *G. Hyalomma*، وهذا يدل على قدرة الجنسين الأكثر انتشاراً في القطر العربي السوري على حمل هذا المسبب المرضي الخطير الذي يصيب الإنسان والحيوان. (الجدول 3).

أما بالنسبة لتوزع العينات الإيجابية على المحافظات التي جمعت منها العينات، فقد سجلت عينة واحدة إيجابية في محافظة ريف دمشق جمعت من قطيع ماعز، وعينتين من محافظة حمص إحداهما من قراد الماعز والأخرى من قراد الأغنام، وثلاث عينات من محافظة حماة كانت جميعها من قراد الأغنام، وهذا يشير إلى وجود هذا المسبب المرضي في جميع المحافظات الثلاث التي جمعت منها العينات, وبالتالي لابد من اتخاذ بعض الاجراءات الوقائية ضد الاصابة بالقراد لخفض نسبة انتقال جرثومة الكوكسيلا بورنيتي إلى الحيوانات والإنسان.

الجدول (3). توزع العينات الإيجابية تبعاً للثوي وجنس القراد ووجود اجهاضات في القطعان.

نتيجة اختبار PCR	الثوي مصدر جمع القراد		جنس القراد		القطعان التي عانت من الاجهاض	
	الأغنام	الماعز	*Rhipicephalus*	*Hyalomma*	الأغنام	الماعز
إيجابي	4	2	3	3	1	2
سلبي	32	7	24	15	6	0
المجموع	**36**	**9**	**27**	**18**	**7**	**2**

تعد الأمراض المنقولة عبر القراد من المسائل الصحية ذات الاهتمام العالمي عند الإنسان والحيوان، وتُولِي الكثير من الدول والمنظمات الدولية بالغ الأهمية لدراسة هذه الأمراض وتتبعها ورصد أنواع واجناس القراد المنتشرة لديها أو التي تدخل إليها عبر نقل الحيوانات أو بسبب التغيرات المناخية. وللأسف مازالت مثل هذه الدراسات العلمية في بلدنا والمنطقة محدودة جداً ولا تلبي الطموح بما يتناسب مع تطور الأحداث وانتشار الأمراض التي يحملها وينقلها القراد إلى الحيوانات والإنسان، ولعل آخر هذه الأحداث هو انتشار حمى القرم الكونغولية النزفية Crimean-Congo haemorrhagic fever في العراق (Ahmad *et al.*, 2022) وتسجيل حالات جديدة عام 2022 في هذا البلد المجاور للقطر العربي السوري, وهو ما أعاد إلى الواجهة في بلدنا الاهتمام بالقراد والأمراض التي ينقلها.

إن هذا العمل هو الأول في القطر العربي السوري الذي أنجز داخل سورية وفي مختبرات الجامعات والهيئات البحثية السورية ويستهدف طفيلي القراد كناقل وخازن لأحد الأمراض الهامة والمشتركة بين الانسان والحيوان، إذ يوجد عمل وحيد نفذه كادر مشترك

من التشيك وسلوفاكيا, إذ قاموا بجمع عينات من القراد تتبع لجنس زجاجي العين من سلاحف خلال رحلاتهم في تركيا وسورية ولبنان وأثبتوا بدراستهم باستخدام التقانات الجزيئية وجود فيروس حمى القرم الكونغولية النزفية (Široký *et al.*, 2014).

وأيضاً تعد هذه الدراسة الأولى في سورية حول قدرة القراد على حمل الكوكسيلا بورنيتي، والثانية من نوعها حول هذه الجرثومة المسببة للحمى المجهولة. حيث قام (حوراني، 2014) بدراسة هذا المرض والعالم المسبب له في عينات مصلية جمعت من الأغنام والماعز من محافظتي حماة وحمص وذلك بالاعتماد على اختبار الإليزا لكشف الأضداد. وكذلك قام باللجوء إلى اختبار PCR لفحص عينات من دم الأغنام والماعز حيث قام باستخلاص الـ DNA من الكريات البيضاء ومن ثم الكشف عن الكوكسيلا بورنيتي, إذ أظهرت نتائج فحوصاته المصلية المعتمدة على كشف الأضداد نسبة إصابة مرتفعة بلغت 53.52% عند الأغنام، و61.66% عند الماعز. في حين أظهرت نتائج اختبار PCR أن نسبة الإصابة لدى الأغنام كانت 33.3% وعند الماعز 64.7%. ولاحظ (حوراني، 2014) وجود علاقة بعد انجاز اختبار PCR بين العينات الإيجابية والاجهاض عند الماعز في حين لم تشر نتائجه إلى أي علاقة لوجود المسبب مع الإجهاض عند الأغنام. إن نتائج دراسة (حوراني، 2014) ونسب وجود الكوكسيلا التي سجلها تعد أعلى بكثير من النتائج التي سجلت في هذه الدراسة، ومن الطبيعي أن تسجل الاختبارات المصلية التي تكشف عن الأضداد (كشف غير مباشر) نسباً أعلى من الاختبارات المباشرة التي تستهدف العامل المسبب كما هو في هذه الدراسة. أما تفسير النسب العالية التي سجلها بعد انجاز اختبار PCR فقد تعزى إلى مصدر العينات إذ تعد الحيوانات المجترة هي الأثوياء المناسبة جداً لتكاثر هذا العامل المسبب، في حين يعد القراد ثوي ناقل يساهم في نشر هذا المرض ونقله من حيوان إلى آخر مع معدل تكاثر يختلف بحسب عدة عوامل ومراحل تطور حياته وتعد الغدد اللعابية هي المكان المفضل لتكاثر الكوكسيلا في القراد (de la Fuente *et al.*, 2017). وبالتالي فإن تحري وجود الكوكسيلا في الكريات البيضاء المركزة والمعزولة من دم الحيوان المصاب من الطبيعي أن تحمل أعداداً أكبر من هذا المسبب وبالتالي يظهر الكشف عنها نسباً أعلى.

ولدى استعراض الأدبيات العلمية التي قامت بدراسات مشابهة وجِدَ عددٌ لا بأس به من الأعمال التي تناولت طفيلي القراد كناقل هام لمسبب الحمى المجهولة عند الحيوانات (الكوكسيلا بورنيتي)، ومن هذه الدراسات كانت دراسة (Fard and Khalili, 2011) في إيران الذي جمع 160 قرادة كانوا من أجناس مروحي الرأس وزجاجي العين فقط وقسمهم إلى 35 مجموعة احتوت المجموعة من 5 إلى 7 قرادات من أجل استخلاص الـDNA وأجرى اختبار PCR ليجد أن ثلاث مجموعات تتبع لجنس زجاجي العين ومجموعة واحدة من جنس مروحي الرأس كانت إيجابية لوجود الكوكسيلا، وتعد نتائج هذه الدراسة الإيرانية قريبة جداً مع نتائج هذا العمل من حيث أجناس القراد أو النسب الإيجابية لوجود الكوكسيلا . في تركيا قام (Capin *et al.*, 2013) بدراسة هدفت للكشف عن وجود الكوكسيلا بورنيتي في القراد المجموع من الأبقار والأغنام ومن محافظات مختلفة، حيث جمعت أعداد كبيرة من القراد ووأظهرت النتائج أن الجنسين مروحي الرأس وزجاجي العين هي السائدة لديهم على الرغم من وجود أجناس أخرى مثل إكسودس *Ixodes* وهيمافيزاليس *Haemaphysalis* وناخس الجلد *Dermacentor* وبوفيلوس *Boophilus* ، إلا أن الأنواع التي حملت الكوكسيلا كانت عبارة عن الجنسين مروحي الرأس وزجاجي العين فقط.

في الصومال أظهرت دراسة (Frangoulidis *et al.*, 2021) التي استهدفت التحري عن الكوكسيلا في القراد المجموع من الإبل وكان الجنس السائد هو القراد زجاجي العين (95.8%) تلاه جنس كليل العين *Amblyomma* وأخيراً جنس مروحي الرأس, وبإجراء اختبار PCR تبين أن 59.1% من عينات القراد كانت تحتوي على الكوكسيلا. أما في الهند فقد بينت دراسة (Patra *et al.*, 2020) أن الكوكسيلا كانت موجودة في 12 مجموعة من القراد استخلص الـDNA منها من أصل 30 مجموعة أي بنسبة

40% علماً أنها جمعت جميعها من الماعز. في ماليزيا أيضاً (Nurkunasegran *et al.*, 2017) كانت نسبة طفيليات القراد التي سجل وجود الكوكسيلا فيها 5.8% علماً أن أجناس القراد المسجلة اختلفت بنسبة كبيرة عن المسجلة في سورية حيث كانت أجناس القراد عبارة عن كليل العين وناخس الجلد ومروحي الرأس وهيمافيزاليس. أما في كينيا فقد وجدوا (Koka *et al.*, 2018) أن 5.53% من عينات القراد كانت تحتوي على جرثومة الكوكسيلا وكانت معظم العينات الإيجابية تتبع لجنس مروحي الرأس, بينما وجدت دراسة (Knobel *et al.*, 2013) أن 50% من عينات القراد المجموعة من الكلاب ومن جنس هيمافيزاليس كانت إيجابية لوجود الكوكسيلا. ومن قارة أوروبا فقد أثبت في بولندا (Szymanska-Czerwinska *et al.*, 2013) أن اللبود الخروعي *Ixodes ricinus* كان يحمل الكوكسيلا بورنيتي بنسبة 15.9% من العينات. وفي سلوفينيا (Knap *et al.*, 2019) كانت نسبة وجود جرثومة الكوكسيلا بورنيتي في القراد المجموع من حيوانات أهلية وبرية 2.4% وكانت أجناس القراد المجموعة مختلفة تماماً عن تلك السائدة التي توجد في سورية, مما يشير إلى الأهمية الاقتصادية والطبية للقراد باختلاف أجناسه وأنواعه كعامل ناقل للمسببات المرضية المختلفة.

يستنتج من هذا العمل أن القراد السائد في سورية وبجنسيه زجاجي العين G.*Hyalomma* ومروحي الرأس G.*Rhipicephalus* يستطيعان حمل الكوكسيلا بورنيتي المسببة للحمى المجهولة Q Fever ونقلها للحيوان والإنسان، ومن الممكن أن تتسبب بحالات إجهاض مهمة عند الحيوانات المجترة, مما يوجب أن تؤخذ بالحسبان لكي تتضح الصورة وبشكل مكتمل حول أسباب حالات الإجهاض مجهولة السبب عند الحيوانات المجترة.

وتوصي هذه الدراسة بضرورة ما يلي:

1. إجراء المزيد من الدراسات البحثية حول الإصابة بطفيلي القراد عند كافة أنواع الحيوانات وفي مناطق مختلفة من سورية ودراسة المسببات المرضية التي يحملها وينقلها.
2. إجراء دراسة واسعة على مستوى القطر العربي السوري تهدف إلى تحديد الـ Microbiome في القراد لما له من أهمية في فهم الكثير عن بيولوجيا طفيليات القراد وحصر جميع الأمراض التي ينقلها.
3. التحري عن وجود الكوكسيلا بورنيتي في جميع حالات الاجهاض عند الحيوانات المجترة، وبخاصة لدى الماعز.
4. إجراء حملات توعية للمربين عن طريق الإرشاد وتعريفهم بأخطار الإصابة بالكوكسيلا بورنيتي والحمى المجهولة وأعراضها على الإنسان والحيوان.

المراجع:

العمر،عبد الناصر و كاسوحة، مرشد (2019): انتشار القراد وتحديد أجناسه وأنواعه عند الأبقار في محافظة حماه (سورية)- المجلة السورية للبحوث الزراعية، 6(3):115-104.

العمر،عبد الناصر و كاسوحة، مرشد (2020): انتشار الإصابة بالقراد (اللبود) عند الأغنام العواس في محافظة حماة (سورية)- المجلة السورية للبحوث الزراعية، 7(4):163-149.

حوراني، ماهر (2014): التقصّي عن حمّى كيو (الحمّى المجهولة) كمرض مشترك في المنطقة الوسطى، أطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة حماة.

Ahmad, S., Hashmi, N., Siddiqui, J.A., Siddiqui, A., Ahmad, S., Hashim, H.T., Essar, M.Y., (2022). The nosebleed fever outbreak in Iraq: Challenges, efforts and recommendations. Annals of Medicine and Surgery 79.

Alsaleh, A., (2014). Étude des risques de transmission de Coxiella burnetii, agent de la fièvre Q, lors du transfert embryonnaire chez les caprins et les bovins.

Alsaleh, A., Pellerin, J.-L., Rodolakis, A., Larrat, M., Cochonneau, D., Bruyas, J.-F., Fieni, F., (2011). Detection of Coxiella burnetii, the agent of Q fever, in oviducts and uterine flushing media and in genital tract tissues of the non pregnant goat. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 34, 355-360.

Angelakis, E., Raoult, D., (2010). Q fever. Veterinary microbiology 140, 297-309.

Berri, M., Rousset, E., Champion, J., Russo, P., Rodolakis, A., (2007). Goats may experience reproductive failures and shed Coxiella burnetii at two successive parturitions after a Q fever infection. Research in veterinary science 83.52-47 ,

Bouvery, N.A., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A., (2003). Experimental Coxiella burnetii infection in pregnant goats: excretion routes. Veterinary research 34, 423-433.

Capin, G.A., Emre, Z., Canpolat, S., Vatansever, Y., Duzgun, A., (2013 .(Detection of Coxiella burnetii from ticks by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.

Coley, K., (2015). Identification guide to larval stages of ticks of medical importance in the USA.

de la Fuente, J., Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-Cruz, A., Domingos, A.G., Estrada-Pena, A., Johnson, N., Kocan, K.M., Mansfield, K.L., Nijhof, A.M., Papa, A., Rudenko, N., Villar, M., Alberdi, P., Torina, A., Ayllon, N., Vancova, M., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Caracappa, S., Fooks ,A.R., Gortazar, C., Rego, R.O.M., (2017). Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. Frontiers in cellular and infection microbiology 7, 114.

Fard, S.N., Khalili, M., (2011). PCR-detection of Coxiella burnetii in ticks collected from sheep and goats in southeast Iran. Iranian journal of arthropod-borne diseases 5, 1.

Frangoulidis, D., Kahlhofer, C., Said, A.S., Osman, A.Y., Chitimia-Dobler, L., Shuaib, Y.A., (2021). High Prevalence and New Genotype of Coxiella burnetii in Ticks Infesting Camels in Somalia. Pathogens 10.

Hosseini-Chegeni, A., Hosseini, R., Tavakoli, M., Telmadarraiy, Z., Abdigoudarzi, M., (2013). The Iranian Hyalomma (Acari: Ixodidae) with a key to the identification of male species. Persian Journal of Acarology 2.

Kazar, J., (2005). Coxiella burnetii infection. Annals of the New York Academy of Sciences 1063, 105-114.

Klee, S.R., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., Appel, B., (2006). Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of Coxiella burnetii. Bmc Microbiology 6, 1-8.

Knap, N., Zele, D., Glinsek Biskup, U., Avsic-Zupanc, T., Vengust, G., (2019). The prevalence of Coxiella burnetii in ticks and animals in Slovenia. BMC veterinary research 15, 368.

Knobel, D.L., Maina, A.N., Cutler, S.J., Ogola, E., Feikin, D.R., Junghae, M., Halliday, J.E., Richards, A.L., Breiman, R.F., Cleaveland, S., (2013). Coxiella burnetii in humans, domestic ruminants, and ticks in rural western Kenya. The American journal of tropical medicine and hygiene 88, 513.

Koka, H., Sang, R., Kutima, H.L., Musila, L., (2018). Coxiella burnetii Detected in Tick Samples from Pastoral Communities in Kenya. BioMed research international 2018, 8158102.

Kruszewska, D., Tylewska-Wierzbanowska, S., (1997). Isolation of Coxiella burnetii from bull semen. Research in veterinary science 62, 299-300.

Lang, G.H., (1990). Coxiellosis (Q fever) in animals. Q fever 1, 23-48.

Maurin, M., Raoult, D., (1999). Q fever .Clinical microbiology reviews 12, 518-553.

Nava, S., Venzal, J., González-Acuña, D., Martins, T., Guglielmone, A. (2017). Tick classification, external tick anatomy with a glossary, and biological cycles, In: Ticks of the Southern Cone of America. Academic Press, 1-23.

Nurkunasegran, M., Kho, K., Koh, F., Tan, P., Nizam, Q., Ong, B., Panchadcharam, C., Mat Amin, M., Abdul Majid, N., Ramli, R., (2017). Molecular Detection of Coxiella burnetii from Farm Animals and Ticks in Malaysia. Tropical Biomedicine 34, 675-680.

Patra, G., Ghosh, S., Priyanka, Efimova, M., Sahara, A., Al-Awsi, G.R.L., Polley, S., Debbarma, A., (2020). Molecular detection of Coxiella burnetii and Borrelia burgdorferi in ticks infesting goats in North-Eastern states of India. International Journal of Acarology 46, 431-438.

Psaroulaki, A., Ragiadakou, D., Kouris, G., Papadopoulos, B., Chaniotis, B., Tselentis, Y., (2006). Ticks, tick-borne Rickettsiae, and Coxiella burnetii in the Greek island of Cephalonia. Annals of the New York Academy of Sciences 1078, 389-399.

Rodolakis, A., (2006). Chlamydiose et Fièvre Q, similitudes et différences entre ces deux zoonoses. Renc Rech Ruminants 13, 395-402.

Rousset, E., Durand, B., Champion, J.-L., Prigent, M., Dufour, P., Forfait, C., Marois, M ,.Gasnier, T., Duquesne, V., Thiéry, R., (2009). Efficiency of a phase 1 vaccine for the reduction of vaginal Coxiella burnetii shedding in a clinically affected goat herd. Clinical Microbiology and Infection 15, 188-189.

Široký, P., Bělohlávek, T., Papoušek, I., Jandzik, D., Mikulíček, P., Kubelová, M., Zdražilová-Dubská, L., (2014). Hidden threat of tortoise ticks: high prevalence of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in ticks Hyalomma aegyptium in the Middle East. Parasites & vectors 7, 1-4.

Stein ,A., Saunders, N., Taylor, A., Raoult, D., (1993). Phylogenic homogeneity of Coxiella burnetii strains as determinated by 16S ribosomal RNA sequencing. FEMS Microbiology Letters 113, 339-344.

Szymanska-Czerwinska, M., Galinska, E.M., Niemczuk, K., Zasepa ,M., (2013). Prevalence of Coxiella burnetii infection in foresters and ticks in south-eastern Poland and comparison of diagnostic methods. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 20.

Walker, A.R., (2003). Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Bioscience Reports Edinburgh.

Detection of *Coxiella Burnetii* in Ticks Infesting Sheep and Goats By PCR in Some Syrian Governorate

Abdul Naser Al-Omar[(1)*], Morshed Kassouha[(2)], Ashraf Alsaleh[(2)]
(1) Hama Research Center, General Commission For Scientific Agricultural Research (GSCAR), Syria.
(2) Faculty of Veterinary Medicine, Hama University, Hama, Syria.
(*Corresponding author: Dr. Abdul Naser Al Omar E-mail: abdnaser64@gmail.com).

Received: 17/10/2022 Accepted:27/10/2022

Abstract:
This study was conducted during the years 2021 and 2022 with the aim of revealing the potency of ticks parasites in Syria to carry the Coxiella burnetti bacterium, which causes Q fever using the polymerase chain reaction (PCR). Tick samples were collected from 45 herds of sheep and goats distributed over the governorates of Hama, Homs and Rif-Damascus. The targeted herds included 36 herds of sheep and 9 herds of goats. The genera of collected ticks was identified and belonged to only two of the genera known to this parasite, genus G. Rhipicephalus and genus G. Hyalomma, with a prevalence rates of 60% and 40%, respectively. 3 Tick parasites were collected in one tube from each flock and DNA was extracted from them as a single sample, and then a PCR test was performed on the extract. The results of the PCR test which was performed on the extracted DNA samples showed that six of them were positive for the presence of Coxiella burnetti in each of the ticks collected from sheep and goats, where the result appeared positive in two samples from goat ticks and four samples from sheep ticks. It was noted that the two positive goat tick samples were from two flocks in which abortion of unknown cause occurred. On the other hand, only one sample was positive in sheep ticks was collected from herd sufferd from abortion. The six positive samples were distributed equally between the two genera Rhipicephalus and Hyalomma (50% each), meaning that the two genera are able to borne and transmit Coxiella burnetti. Also, positive cases were recorded from the three governorates from which samples were collected. This study recommends continuing work on Coxiella burnetti in ruminants in general, and educating the farmers about this common pathogen, with increased interest in controlling ticks, as they are a vector of many bacterial, parasitic and viral diseases in humans and animals.

Keywords: *Coxiella burnetii*, Ticks, Sheep, Goats, Syria, PCR.