

بررسی شیوع کوکسیلا بورنتی در انسان، میزبانان حیوانی و کنه‌های سخت در غرب استان مازندران در سال‌های ۸۴-۱۳۸۳

دکتر حسن بشیری^۱، مهندس نورینا رهبریان^{۱*}، دکتر گیتا اسلامی^۲، دکتر بهرام کاظمی^۳، ابراهیم جنت‌شریف^۱،
دکتر مهناز محمودی‌راد^۲، منیژه ایرانفر^۴، سهاره بشیری^۵

^۱ گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۲ مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۳ گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۴ حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۵ دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: اهمیت بیماری‌های مشترک بین انسان و دام (زئونوزها) و تأثیر این بیماری‌ها بر سلامت و بهداشت افراد جامعه، بر کسی پوشیده نیست. از جمله این بیماری‌ها، آلودگی با کوکسیلا بورنتی و ابتلای انسان به تب کیو می‌باشد. بنا به اهمیت موضوع و نبود آمار مستند در جامعه ایرانی، این مطالعه انجام شد. **روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی، برای بررسی شیوع کوکسیلا بورنتی در انسان، میزبانان حیوانی و کنه‌های سخت، نسبت به جمع‌آوری نمونه‌ها از مناطق منتخب غرب استان مازندران اقدام گردید. نمونه‌های خون اخذ شده از انسان و میزبانان حیوانی به روش PCR، بررسی شدند. کنه‌های سخت پس از صید، مورد شناسایی قرار گرفتند و جنس، گونه و مرحله رشد آنها تعیین و با استفاده از تکنیک‌های رایج، DNA نمونه‌ها استخراج گردید. برای کوکسیلا بورنتی، ابتدا بر روی هر نمونه، تکنیک PCR و بلافاصله، تکنیک Nested-PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: جمعاً ۲۴۱۷ کنه سخت از روی بدن حیوانات (۱۶۴۴ کنه) و از طبیعت (۷۷۳ کنه) در مناطق روستایی منتخب غرب استان مازندران، صید و شناسایی شدند. گونه‌های کنه‌های سخت جمع‌آوری شده به ترتیب وفور عبارت بودند از: *Ixodes ricinus* (۷۲٪)، *Hyalomma anatolicum anatolicum* (۱۵٪)، *Boophilus annulatus* (۹٪)، *Haemaphysalis sulcata* (۳٪)، *Dermacentor marginatus* (۱٪). از مجموع ۱۰۵۲ نمونه مورد بررسی، یعنی ۴۴۷ نمونه خون (از ۱۲۰ انسان، ۱۳۵ رأس گوسفند، ۱۰۲ رأس گاو، ۶ رأس بز، ۲۰ قلاده سگ، ۱۰ عدد جوجه تیغی) و ۶۰۵ عدد کنه از ۵ گونه متفاوت از کنه‌های سخت (که بطور تصادفی از بین ۲۴۱۷ عدد کنه صید شده انتخاب شده بودند)، هیچ مورد مثبت نسبت به کوکسیلا بورنتی در غرب استان مازندران مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در شرایط کنونی، غرب استان مازندران از وجود کانون‌های اپیدمیک، اندمیک، اپی‌زوتیک و انزوتیک کوکسیلا بورنتی پاک است. ضمن اینکه باید توجه داشت که چرخه‌های انزوتیک پاتوژنی چون کوکسیلا بورنتی، در میزبانان مخزن در نواحی مختلف، متفاوت بوده، و بر این اساس، آمارها نشان‌دهنده تفاوت‌های فاحش در میزان شیوع کوکسیلا در مناطق جغرافیایی مختلف هستند.

واژگان کلیدی: کوکسیلا بورنتی؛ انسان؛ میزبان حیوانی؛ مخزن بیماری؛ کنه سخت؛ مازندران، ایران.

مقدمه^۱

نامیده می‌شود (۱). این بیماری در انسان، دارای نشانه‌های بالینی متنوع و عوارض خطرناک می‌باشد. ابتلای انسان به تب کیو، عمدتاً از طریق استنشاق محصولات حیوانی آلوده و یا تماس مستقیم با حیوانات آلوده، و در درجه بعد، بر اثر آشامیدن شیر پاستوریزه نشده و مصرف دیگر مواد لبنی آلوده به کوکسیلا بورنتی رخ می‌دهد (۱ و ۲). جابجایی کوکسیلا بر اثر وزش باد نیز صورت گرفته و بروز عفونت‌های انسانی، حتی کیلومترها دورتر از کانون‌های آلوده نیز امکان‌پذیر است (۳ و ۲).

کوکسیلا بورنتی، عامل یک باکتریوزیس مشترک بین انسان و دام است. بیماری حاصل از آلودگی با آن، در انسان، تب کیو (Query Fever) و در حیوانات، کوکسیلوزیس (Coxiellosis)

*نویسنده مسئول مکاتبات: مهندس نورینا رهبریان؛ تهران، اوین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی؛ پست الکترونیکی:

n.rahbarnian@cmbrc.org

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۲/۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۴/۸

می‌تواند در تصمیم‌گیری‌های مدیران بهداشتی منطقه نیز مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

تعیین محل نمونه‌گیری: روستاهای شهرستان‌های کلاردشت، تنکابن و رامسر برای انجام این مطالعه انتخاب شدند. پس از محاسبه حجم نمونه با استفاده از فرمول زیر، نمونه‌ها به روش نمونه‌گیری تصادفی ساده انتخاب شدند:

$$n = \frac{p \cdot q \cdot (Z)^2}{d^2}$$

برای انجام این مطالعه، در دو بخش نمونه‌گیری انجام شد:

۱) نمونه‌گیری خون از افرادی که با دام سروکار داشتند (دامپزشک، دامدار، قصاب، چوپان، سلاخ، دباغ و ...) و لذا در معرض خطر آلودگی با کوکسیلا بورنتی بودند، انجام شد. افراد مورد بررسی، در هنگام مصاحبه، تاریخچه‌ای از علائم بیماری تب کیو یا علایمی همچون تب شدید، سردرد و پنومونی نامشخص در حال و گذشته را اظهار نمودند. از افراد مورد بررسی، پس از کسب رضایت آنان، خونگیری از خون ورید ساعد به عمل آمد.

۲) از کنه‌های موجود در مناطق حضور دام و حیوانات وحشی، نمونه‌گیری به عمل آمد. به این منظور، کنه‌ها، با استفاده از پنس نوک تیز، از روی پوست بدن حیوانات مستقر در مکان‌های حضور دام (دامداری‌ها و ...) برداشته شدند. همچنین با گسترانیدن پتوی سفید کنه‌گیری بر سطح پوشش گیاهی محل استقرار حیوانات، نسبت به صید و جمع‌آوری کنه‌ها اقدام شد. به این ترتیب، ۲۴۱۷ عدد کنه سخت از روی بدن حیوانات (۱۶۴۴ کنه) و از طبیعت (۷۷۳ کنه) جمع‌آوری گردید.

همچنین ۴۴۷ نمونه خون، از ۱۲۰ نفر انسان، ۱۳۵ رأس گوسفند، ۱۰۲ رأس گاو، ۶۰ رأس بز، ۲۰ قلاده سگ ولگرد، ۱۰ عدد جوجه تیغی، تهیه و مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی آلودگی نمونه‌ها: طبق جدول زمان‌بندی و منطقه‌بندی‌شده جهت نمونه‌های مربوط به کنه‌گیری و معلوم‌نمودن مراحل رشد کنه‌های سخت، و خون‌خورده و یا خون‌نخورده بودن آنان، کل پیکر کنه‌ها و نمونه‌های خون، تا اتمام مراحل نمونه‌گیری، در دمای ۲۵- درجه سانتی‌گراد فریز و نگهداری شدند. سپس، کنه‌ها را هم‌وزن کرده، با استفاده از تکنیک‌های رایج و روش جوشاندن و فنل کلروفرم، DNA و RNA نمونه‌های کنه‌ها و همچنین نمونه‌های خونی، استخراج

در حیوانات، سقط جنین، کاهش وزن بدن و کم‌شدن میزان شیردهی، از نشانه‌های بارز کوکسیلوزیس است (۳). موارد بیماری از تمام جهان، به جز قطب شمال و نیوزیلند، گزارش شده و دامنه انتشار آن، همچنان رو به گسترش است. مهمترین مخزن‌های طبیعی کوکسیلا بورنتی برای انسان عبارتند از: احشام (گوسفند، بز و گاو)، سگ، گربه و پستانداران وحشی کوچک و بزرگ (۴).

کنه‌های سخت (Ixodidae)، ناقلان اولیه کوکسیلا بورنتی در میان حیوانات هستند و گونه‌هایی از جنس‌های ایکسودس (Ixodes)، درماسنتور (Dermacentor)، هم‌افیزیس (Haemaphysalis)، ریپی‌سفالوس (Rhipicephalus)، هیالوما (Hyalomma) و ... پس از تغذیه از خون میزبانان آلوده، قادر به انتقال کوکسیلا از راه مدفوع خود می‌باشند (۳). کنه‌های سخت، در عین حال به عنوان مخزن (Reservoir) کوکسیلا بورنتی نیز به حساب آمده و استمرار حضور درازمدت این میکروارگانیسم را در طبیعت، به لحاظ انتقال از یک مرحله به مرحله دیگر رشد (Transstadial transmission) و از طریق تخم (Transovarian Transmission) به نسل بعد، تضمین می‌کنند. در واقع، پاتوژن‌هایی چون جمله کوکسیلا بورنتی، ممکن است باعث آلودگی مرحله‌های مختلف فرآیند رشد کنه‌های ناقل در پی خون‌خواری می‌شوند. همچنین، حضور هم‌زمان دو و یا حتی سه پاتوژن در بدن برخی کنه‌های سخت (Coinfection) و به دنبال آن، انتقال هم‌زمان پاتوژن‌های مختلف به انسان نیز امکان‌پذیر می‌باشد (۵). کنه‌ها موجب آلودگی حیواناتی چون نشخوارکنندگان، تک‌سم‌ها، گوشت‌خواران، پرندگان و خزندگان، به کوکسیلا می‌شوند (۳ و ۶).

به علت اهمیت کوکسیلا بورنتی به عنوان عامل یک بیماری باکتریایی و مشترک بین انسان و دام (Anthropozoonosis) و با توجه به فقدان بررسی دقیق، معتبر، جامع و قابل استناد و در اختیار نداشتن آمار از درصد آلودگی به کوکسیلا بورنتی در کشورمان از یک سو، و مقاومت بسیار زیاد این باکتری در محیط از سوی دیگر، درصد برآمدیم تا با یافتن کانون‌های طبیعی آلوده به کوکسیلا و تعیین میزان آلودگی در انسان، میزبانان حیوانی و کنه‌های سخت در منطقه‌ای از ایران که دارای آب و هوای مناسب جهت زندگی و رشد کنه‌ها است، سهمی در تأمین اطلاعات مستند بر اساس پژوهش‌های علمی به منظور تدوین برنامه‌های خدمات بهداشتی، احراز نماییم. از سوی دیگر، مشخص شدن کانون‌های طبیعی آلوده به کوکسیلا

بحث

نتایج منفی به دست آمده در این مطالعه، با گزارش علمی Literak (۸) شباهت دارد. Literak در طی ۵ سال منتهی به ۱۹۹۶ میلادی، هیچ مورد عفونت انسانی با کوکسیلا را در جمهوری‌های چک و اسلواکی مشاهده نکرده بود. لیکن Hirai (۹) در گزارش خود، از رشد مثبت موارد آلودگی انسانی به کوکسیلا بورنتی در ژاپن در طی سال‌های اخیر خبر می‌دهد. Kato و همکارانش (۱۰) در بررسی علمی خود در سال ۱۹۹۹ در ژاپن، به آلودگی ۳۳ درصدی افراد مورد آزمایش به این میکروارگانیزم اشاره می‌کنند. همچنین Guo و همکارانش (۱۱) توانسته‌اند در سال ۱۹۹۸، آلودگی به کوکسیلا را در ۳/۴٪ از دامپرووران که در داکوتای شمالی (ایالات متحده آمریکا) به پرورش گوسفند اشتغال داشته‌اند، تشخیص دهند. به این ترتیب، و با عنایت به متفاوت بودن درصد موارد آلودگی انسانی در جوامع مختلف، عدم مشاهده موارد مثبت انسانی در غرب استان مازندران در بررسی انجام یافته توسط ما نمی‌تواند مسئله‌ای به دور از ذهن و انتظار تلقی شود؛ ضمن اینکه مطالعه حاضر برای اولین بار در کشور بر روی انسان صورت پذیرفته است. عدم ابتلای افراد مورد بررسی در زمان مطالعه و همچنین در گذشته به تب کیو و یا عدم بروز نشانه‌های بالینی خاص و مرتبط با تب کیو در آنان در گذشته نیز با نتایج به دست آمده از این مطالعه، انطباق داشته و با آن همسو هستند. در این پژوهش، برای بررسی شیوع آلودگی به کوکسیلا بورنتی در میزبانان حیوانی، آن دسته از حیوانات اهلی برای خون‌گیری انتخاب شدند که همگی آلوده به کنه در شماری اندک و یا زیاد بودند؛ تا شاید بتوان آلودگی به کوکسیلا را در بدن میزبان و یا کنه‌های سخت مهاجم، ردیابی نمود. از سوی دیگر، همه حیوانات وحشی خون‌گیری شده در مطالعه حاضر و در چارچوب امکانات و مقدرات شامل سگ و جوجه تیغی، عاری از آلودگی به کنه‌های سخت بودند. در این بخش نیز کوکسیلا بورنتی در هیچ یک از نمونه‌های خون حیوانات تشخیص داده نشد. اما طبعاً کوکسیلا بورنتی در کانون‌های طبیعی اپیزوتیک (Epizootic) و یا انزوتیک (Enzootic) از طیف میزبانی گسترده و متنوعی برخوردار است. مقایسه دست‌آورد مطالعه ما با کارهای تحقیقاتی قبلی محققان در ایران و کشورهای دیگر نیز تفاوت‌های آشکار و یا تشابه‌های نسبی را بیان می‌کند.

پی‌جویی‌های Giroud و همکار (۱۲) در سال ۱۹۵۲ میلادی که به نظر می‌رسد نخستین از نوع خود در ایران باشد و

شد. سپس، با تکنیک Nested-PCR و با استفاده از ۲ پرایمر Qfev 2F و Qfev 2R برای مرحله اول، و ۲ پرایمر Qfev IF و Qfev IR برای مرحله دوم، توالی ژن مورد نظر در باکتری کوکسیلا بورنتی تکثیر گردید (۷).

یافته‌ها

از مجموع ۱۰۵۲ نمونه مورد بررسی، یعنی ۴۴۷ نمونه خون (از ۱۲۰ انسان، ۱۳۵ رأس گوسفند، ۱۰۲ رأس گاو، ۶ رأس بز، ۲۰ قلاذه سگ، ۱۰ عدد جوجه تیغی) و ۶۰۵ عدد کنه از ۵ گونه متفاوت از کنه‌های سخت (که بطور تصادفی از بین ۲۴۱۷ عدد کنه صید شده انتخاب شده بودند)، هیچ مورد مثبت نسبت به کوکسیلا بورنتی در مناطق منتخب غرب استان مازندران مشاهده نشد. جداول ۱ الی ۳، توزیع گونه و تعداد کنه‌های سخت صید و شناسایی شده، و شمار کنه‌ها را نشان می‌دهند.

جدول ۱) گونه و تعداد کنه‌های سخت صید و شناسایی شده در غرب استان مازندران

گونه کنه	مازندران					
	منطقه	کلاردشت	تنکابن	رامسر	جمع	درصد
<i>Ixodes ricinus</i>	۶۵۱	۴۵۹	۶۳۰	۱۷۴۰	۷۲	
<i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i>	۱۰۱	۱۸۴	۷۷	۳۶۲	۱۵	
<i>Boophilus annulatus</i>	۱۰	۱۲۲	۸۵	۲۱۷	۹	
<i>Haemaphysalis sulcata</i>	۵۹	۱۳	۰	۷۲	۳	
<i>Dermacentor marginatus</i>	۰	۰	۲۶	۲۶	۱	
جمع کل	۸۲۱	۷۷۸	۸۱۸	۲۴۱۷	۱۰۰	

جدول ۲) شمار کنه‌های سخت جمع‌آوری شده از بدن حیوانات اهلی (خون خورده) و از طبیعت (خون نخورده) در غرب مازندران

کنه	منطقه			
	کلاردشت	تنکابن	رامسر	جمع
کنه‌های جمع‌آوری شده از حیوان	۵۳۴	۵۴۹	۵۶۱	۱۶۴۴
کنه‌های جمع‌آوری شده از طبیعت	۲۵۸	۲۴۹	۲۶۶	۷۷۳
جمع کل	۷۹۲	۸۹۸	۸۲۷	۲۴۱۷

جدول ۳) شمار کنه‌های انتخابی جهت انجام آزمون PCR به تفکیک منطقه مورد بررسی

منطقه	منطقه مورد بررسی			
	برداشت کنه	حیوانات اهلی	طبیعت	جمع
کلاردشت	۹۹	۱۰۳	۲۰۲	
تنکابن	۹۹	۹۹	۱۹۸	
رامسر	۹۹	۱۰۶	۲۰۵	
جمع کل	۲۹۷	۳۰۸	۶۰۵	

بورنتی در نرخ‌های متفاوت رسیده‌اند. در اینجا می‌توان به مطالعات McDiarmid و همکاران (۲۲) در سال ۲۰۰۰ در استرالیا که در ۳/۶٪ از جمعیت کنه سخت *Amblyomma trigguttatum* و همکاران (۲۳) در سال ۲۰۰۳ در قبرس که در ۱۰٪ از کنه‌های سخت و Lee و همکاران (۲۴) در سال ۲۰۰۴ در کره جنوبی که در ۲٪ از کنه‌های سخت، آلودگی به کوکسیلا بورنتی را تشخیص داده‌اند و از کنه‌های آلوده به عنوان یکی از عناصر مؤثر در چرخه عفونت و انتشار کوکسیلا یاد کرده‌اند، اشاره نمود.

به این ترتیب، با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در شرایط کنونی، غرب استان مازندران (محدوده کلاردشت، تنکابن و رامسر) از وجود کانون‌های اپیدمی، اندمیک، اپیزوتیک و انزوتیک کوکسیلا بورنتی پاک است. شایان ذکر آن که به طور کلی چرخه‌های انزوتیک (بومی- حیوانی) هر پاتوژن، از جمله کوکسیلا بورنتی، در میزبانان مخزن در نواحی مختلف، متفاوت و بر این اساس، آمارها نشان‌دهنده تفاوت‌های فاحش در میزان شیوع کوکسیلا در مناطق جغرافیایی مختلف می‌باشند.

لازم به یادآوری است که در نتیجه این مطالعه، برای اولین بار، گونه‌های کنه‌های سخت موجود در مناطق غرب استان مازندران نیز شناسایی و معرفی شدند (شامل *Ixodes ricinus*, *Boophilus anatolicum*, *Hyalomma anatolicum*, *Dermacentor sulcatus*, *Haemaphysalis marginatus*).

بشیری‌بُد و همکاران (۱۳) در سال ۱۹۷۶، به ترتیب حاکی از موارد مثبت آلودگی احشام به کوکسیلا در استان کرمانشاه و نیز در ۷ درصد گاو، ۳/۲ درصد گوسفند و ۱/۷ درصد بز در استان لرستان بوده است. Chen و همکاران (۱۴) در سال ۱۹۹۷ در منطقه‌ای واقع در کناره رودخانه Heilongjiang چین و Ibrahim و همکاران (۱۵) در سال ۱۹۹۹ در جزیره جاوه اندونزی با هیچ مورد آلودگی جوندگان به کوکسیلا برخورد نداشته‌اند. در حالی که آلودگی به این پاتوژن در بررسی‌های To و همکارانش (۱۶) در سال ۲۰۰۰، در ۵/۱٪ از گاوهای شیرده نگهداری شده در یک دامداری واقع در شهر Gifu ژاپن که دچار اختلال در باروری بوده‌اند، Rehacek و همکاران (۱۷) در سال ۲۰۰۱ در ۱۲/۲٪ گوسفند، ۹/۷٪ بز و ۴/۴٪ گاو در مناطق جنوبی جمهوری چک و سرانجام Manilla و همکاران (۱۸) در سال ۲۰۰۲ در ۲۴٪ جوجه‌تیغی، ۱۷/۲٪ رت (Rat)، ۱۱/۱٪ شغال، ۱۰٪ گراز، ۶/۱٪ سگ و ۱/۷٪ خفاش پراکنده در جنوب شرق ایتالیا به تشخیص رسیده است.

همانطور که گفته شد، نتیجه بررسی در مورد وجود کوکسیلا بورنتی در ۶۰۵ کنه سخت خون‌خورده و خون‌نخورده جمع‌آوری‌شده از مناطق روستایی غرب مازندران منفی بود. مقایسه این دست‌آورد، در تشابه کامل با نتایج منفی حاصل از کارهای تحقیقی Bacellar و همکاران (۱۹) در سال ۱۹۹۱ در پرتغال، Rehacek و همکاران (۲۰) در سال ۱۹۹۳ در آلمان، Kruszezwska و همکار (۲۱) در سال ۱۹۹۶ در لهستان بود که آلودگی به کوکسیلا بورنتی را در هیچ یک از کنه‌های سخت صیدشده، تشخیص نداده‌اند؛ لیکن در تفاوت با پژوهش‌هایی است که به تشخیص آلودگی کنه‌های سخت به کوکسیلا

REFERENCES

- Schneeweiss U. Spezielle Mikrobiologie. Walter de Gruyter Verlag Berlin 2000; p:203-215.
- Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. Oxford University press New York 9th ed 1998; Vol 3, p:996-1006.
- Loeffler H. Q-Fieber. In: O Gsell, W Mohr (eds) Infektionskrankheiten. Springer Verlag Berlin 4th ed 1995; p:1012-43.
- Leggiardo RJ. The threat of biological terrorism: a public health and infection control reality. Infect Cont Hosp Epidemiol 2000;21(4):53-6.
- Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M. Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. J Parasitol 2003;89(1):194-6.
- Nauck EG. Lehrbuch der Tropenkrankheiten. Georg Thieme Verlag Stuttgart 8th ed 1998; p:264-93.
- Giroud PP, Yassemi H. A Propos De La Fievre Q Et De Sa Diffusion Danse Le Monde, Sa Constatation En Iran. Bulletin De La Societe De Pathologie Extique 1952:23-4.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science 1988 Jan 29;239(4839):487-91.

9. Literak I, Rehacek J. Q-fever-occurrence and significance of this disease in the Czech Republic and Slovak Republic. *Vet Med (Praha)* 1996;41(2):45-63.
10. Hirai K, To H. Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan. *J Vet Med Sci* 1998;60(7):781-90.
11. Kato K, Arashima Y, Asai S, Furuya Y, Yoshida Y, Murakami M, et al. Detection of *Coxiella burnetii* specific DNA in blood samples from Japanese patients with chronic nonspecific symptoms by nested polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;21(2):139-44.
12. Guo HR, Gilmore R, Waag DM, Shireley L, Freund E. Prevalence of *Coxiella burnetii* infections among North Dakota sheep producers. *J Occup Environ Med* 1998;40(11):999-1006.
13. Bashiribod H, Sixl W, Stuenzner D. Q-Fieber in Iran. Abstracts of II Internationales Arbeitskolloquium Ueber Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa. Graz-Austria, 25.02-28.02. 1976:323-6.
14. Chen M, Fan MY, X GM. Detection of north-Asia tick-borne spotted fever in ticks and rodents along the Heilongjiang river-side by restriction fragment length polymorphism of PCR products. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 1997;18(1):5-7.
15. Ibrahim IN. Serosurvey of wild rodents for Rickettsioses (spotted fever, murine typhus and Q fever) in Java Island, Indonesia. *Eur J Epidemiol* 1999;15(1):89-93.
16. To H, Htwe KK, Kako N, Kim HJ, Yamaguchi T, Fukushi H. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *J Vet Med Sci* 2000;60(7):859861.
17. Rehacek J, Literak I. Coxiellosis among domestic animals in the Czech Republic, *Vet Med Praha* 2001;46(4):54-9.
18. Manilla G, Frusteri L, Maroli M, Khoury C. A study on the prevalence of *Coxiella burnetii* among wild mammals in Italy. *Ann Ist Super Sanita* 2002;38(1):286-95.
19. Bacellar F, Nuncio MS, Rehacek J, Filipe AR. Rickettsiae and rickettsioses in Portugal. *Eur J Epidemiol* 1991;7(3):291-3.
20. Rehacek J, Krauss H, Kocianova E, Kovacova E, Hinterberger G, Hanak P, Tuma V. Studies of the prevalence of *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, in the foothills of the southern Bavarian Forest, Germany. *Zentralbl Bakteriol* 1993;278(1):132-8.
21. Kruszewska D, Tylewska –Wierzbanska S. Unknown species of *Rickettsia* isolated from *Ixodes ricinus* tick in Walcz. *Rocz Akad Med Bialmyst* 1996; 41(1):129-35.
22. McDiarmid L, Petney T, Dixon B, Andrews R. Range expansion of the tick *Amblyomma triguttatum triguttatum*, an australian vector of Q fever. *Int J Parasitol* 2000;30(7):791-3.
23. Spyridaki I, Psaroulaki A, Loukaides F, Antoniou M, Hadjichristodolou C, Tselentic Y. Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation Shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested PCR and by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J Trop Med Hyg* 2003;66(1):86-90.
24. Lee JH, Park HS, Jang WJ, Koh SE, Park TK, Kang SS, Kim BJ. Identification of *Coxiella* sp. detected from *Haemaphysalis longicornis* tick in Korea. *Microbiol Immunol* 2004;48(2):125-30.