

Cross-sectional Study of *Bartonella*, *Rickettsia* and *Wolbachia* by Molecular Method in Fleas *Ctenocephalides canis* and *Pulex irritans* from the West and Northwest of Iran

Seidi Sh, Tavassoli M*, Malekifard F

Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

* **Corresponding author.** Tel: +984432770508, Fax: +984432771926, E-mail: m.tavassoli@urmia.ac.ir

Received: Jun 5, 2021

Accepted: Aug 6, 2021

ABSTRACT

Background & objectives: Fleas are clinically important parasites for affecting human health. These insects are carriers of some pathogens such as *Yersinia pestis*, *Rickettsia typhi*, Q fever, *Tularemia* and *Bartonella henselae* which are infectious for humans and animals. The aim of this cross-sectional study was to detection of *Rickettsia*, *Bartonella* and *Wolbachia* pathogens in infected *Ctenocephalides canis* and *Pulex irritans* using a molecular method in the West and Northwest of Iran.

Methods: The present study is a descriptive, cross-sectional study (prevalence rate=10%, confidence level=95%, error rate=5%) performed on samples collected from five provinces including Kermanshah, Kurdistan, Azerbaijan Western, Lorestan and Hamedan for 13 months from May 2018 to June 2019. In this study, samples were collected by optical trap, human prey and direct isolation of the sample from the host and identified in the parasitology laboratory using valid diagnostic keys. The prevalence of *Rickettsia*, *Bartonella* and *Wolbachia* in the collected samples was detected using polymerase chain reaction (PCR). Amplification and sequencing of *gltA*, *pap31* and *16SrRNA* genes were used for molecular diagnosis of *Rickettsia*, *Bartonella*, and *Wolbachia* respectively.

Results: The collected samples included 918 (47.39%) fleas of *C.canis* and 1019 (52.60%) fleas of *P.irritant*. The PCR products of each gene were subject to sequencing. In this study, 12.9%, 5.21% and 5.21% of fleas were positive for *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Bartonella*, respectively .

Conclusion: *Bartonella*, *Rickettsia* and *Welbachia* are vector borne infectious agent. Due to their high pathogenicity and easily transmission among insect and human, monitoring of insects is essential for the controlling of the infection and preserving the public health in endemic area.

Keywords: Flea; *Rickettsia*; *Bartonella*; *Wolbachia*; *Ctenocephalides canis*; *Pulex irritans*

مطالعه مقطعی آلودگی به ریکتزیا، بارتونلا و ولباخیا به روش مولکولی در کک‌های کتنوسفالیدس کنیس و پولکس ایریتانس در غرب و شمال غرب ایران

شهبین صیدی، موسی توسلی*، فرناز ملکی فرد

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۰۵۰۸ فاکس: ۰۴۴ ۳۲۷۷۱۹۲۶ پست الکترونیک: m.tavassoli@urmia.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: کک‌ها از نظر بالینی انگل‌های مهمی برای تأثیر بر سلامتی انسان هستند. این حشرات علاوه بر خون‌خواری ناقل برخی عوامل بیماری‌زا مانند *یرسینیا پستیس*، *ریکتزیا تیفی*، تب *Q*، *تولارمی* و *بارتونلا هنسله* به انسان و حیوانات می‌باشند. هدف این بررسی مطالعه مقطعی آلودگی به عوامل بیماری‌زا شامل: ریکتزیا، بارتونلا و ولباخیا به روش PCR در کک‌های کتنوسفالیدس کنیس و پولکس ایریتانس در غرب و شمال غرب ایران است.

روش کار: بررسی حاضر یک نوع مطالعه توصیفی-مقطعی می‌باشد. که با در نظر گرفتن شیوع ۱۰٪ و سطح اطمینان ۹۵٪ و میزان خطای ۵٪، به مدت ۱۳ ماه از اردیبهشت ۱۳۹۷ تا خرداد ۱۳۹۸ در پنج استان کرمانشاه، کردستان، آذربایجان غربی، لرستان و همدان انجام شد. در این مطالعه نمونه‌ها به روش تله‌نوری، طعمه انسانی و جداسازی مستقیم نمونه از میزبان جمع‌آوری و در آزمایشگاه انگل‌شناسی با استفاده از کلیدهای تشخیص معتبر برای کک‌های ایران مورد تعیین هویت قرار گرفتند. شیوع ریکتزیا، بارتونلا و ولباخیا در نمونه‌های جمع‌آوری شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بررسی شد. و تعیین توالی با آغازگرهای مشتق شده از ژن کدکننده سنتز سیترات (gltA) برای ریکتزیا، ژن کدکننده پروتئین سطحی متصل به هم (pap31) برای بارتونلا و ژن کدکننده 16s rRNA برای ولباخیا انجام شد.

یافته‌ها: نمونه‌های جمع‌آوری شده شامل ۹۱۸ (۴۷/۳۹٪) کک کتنوسفالیدس کنیس و ۱۰۱۹ (۵۲/۶۰٪) کک پولکس ایریتانس بودند. نتایج واکنش‌های PCR جهت تشخیص موارد مثبت بارتونلا، ریکتزیا و ولباخیا با تعیین توالی تایید شد. در این مطالعه تست PCR در ۱۲/۹ درصد کک‌ها برای ولباخیا، ۵/۲۱ درصد برای ریکتزیا و ۵۱٪ درصد برای بارتونلا مثبت شد. **نتیجه گیری:** در مجموع وفور کک‌های خانواده پولیسیده در اماکن انسانی و بویژه اماکن حیوانی مناطق روستایی غرب و شمال غرب کشور بالا است. فروانی آلودگی به این حشرات و فرکانس بالا در انتقال اجرام بیماری‌زا از جمله، بارتونلا، ریکتزیا و ولباخیا مستلزم اعمال اقدامات کنترل این ناقلین و شناسایی کامل عوامل بیماری‌زا و پتانسیل آنها در ایجاد بیماری در انسان ضروری است.

واژه‌های کلیدی: کک، ریکتزیا، بارتونلا، ولباخیا، کتنوسفالیدس کنیس، پولکس ایریتانس

دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۳۰

مقدمه

کک‌ها حشراتی بسیار ریز، از پهلو فشرده و بدون بال هستند. این حشرات دارای سیر تکاملی کامل و متعلق به راسته سیفوناپترا هستند. همه گونه‌های کک در

مرحله بالغ انگل هستند. برخی از این گونه‌ها نقش متفاوتی در انتقال و همزیستی با عوامل بیماری‌زا دارند، بر این اساس شناسایی دقیق گونه‌های کک ضروری است. تاکنون ۲۵۷۴ گونه کک شناسایی شده،

که در ۱۶ خانواده و ۲۳۸ جنس قرار می‌گیرند [۱]. کک‌ها در سراسر جهان پراکندگی دارند و ناقل چندین عامل بیماری مشترک از جمله *یرسینیا پستیس* عامل طاعون هستند [۲]. هرچند شیوع بیماری طاعون در گذشته رخ داده اما چرخه انزوتیک این بیماری هنوز در جنوب شرق آسیا، آفریقا و آمریکای مرکزی و شمالی فعال است. گرم‌شدن کره زمین، تجارت بین‌المللی، حمل و نقل سریع و رشد جمعیت می‌تواند اپیدمیولوژی این بیماری را شبیه سایر بیماری‌های عفونی تغییر دهد [۳-۵].

ریکتزیاها باکتری‌های گرم منفی و انگل اجباری درون سلولی هستند و توسط بندپایانی از جمله کنه، کک و شپش انتقال پیدا می‌کنند [۶]. تیغوس موشی به عنوان یک بیماری مشترک دارای گسترش جهانی است عامل ایجاد این بیماری *ریکتزیا تیفی* است. *ریکتزیا تیفی* عامل ایجاد بیماری تیغوس موشی در انسان است که از جوندگان مخزن توسط کک به انسان انتقال پیدا می‌کند. گزارشات اخیر حاکی از آن است که این بیماری به‌واسطه مسافرت به مناطق اندمیک در حال ظهور مجدد و گسترش است. *ریکتزیا تیفی* سلول‌های اندوتلیال در میزبان پستاندار و سلول‌های اپیتلیال روده میانی در کک را آلوده می‌کند. آلودگی از طریق مدفوع کک‌ها دفع و انسان از طریق تماس با مدفوع آلوده مبتلا می‌شود. دوره کمون بیماری ۶ تا چهارده روز است. بسیاری از علائم این بیماری با سایر بیماری‌ها مشترک است. مهم‌ترین تظاهرات بالینی بیماری تب شدید، لرز، سردرد، گرفتگی عضلات، ضعف و تهوع است [۷].

گونه *ریکتزیا فلیس* در دسته ریکتزیا‌های ایجاد کننده تب خالدار قرار می‌گیرد. انواع مختلفی از گونه‌های کک در انتقال بیماری نقش دارند. اگرچه موارد مثبت انسان آلوده به این بیماری کم می‌باشد اما دارای گسترش جهانی است. بیشترین موارد ابتلا به این بیماری در کشورهای گرمسیر اتفاق می‌افتد. در افراد آلوده ممکن است علائم بالینی شدیدی ایجاد شود که

این علائم شامل تب، سردرد و بثورات می‌باشد [۸]. تحقیقات در مورد عفونت کک با ریکتزیاها ناچیز بوده و محدود به ریکتزبوزیز در گربه و کک‌های گربه می‌باشد [۹-۱۱].

بارتونلا باکتری باسیلی شکل، گرم منفی، هوازی و سخت رشد هستند. تاکنون ۲۳ گونه بارتونلا شناسایی شده که ۱۱ گونه آن مسئول ایجاد بیماری در انسان هستند [۱۲]. این باکتری عامل بیماری مشترک و بسیار شایع خراش گربه است این بیماری دارای گسترش جهانی بوده و عمدتاً از طریق خراشی که گربه ایجاد می‌کند و یا از طریق گزش کک منتقل می‌شود. علائم بیماری شامل تب، بی حالی، خستگی، سردرد، بی اشتهایی، کاهش وزن و بی‌خوابی است. در افرادی که دچار نقص در سیستم ایمنی هستند ممکن است دچار *باسیلاری آنژیوماتوزیس* شوند. اندوکاردیت ناشی از *بارتونلا هنسله* در افرادی که مشکل دریچه قلب دارند و با گربه و کک در تماس هستند دیده می‌شود [۱۳].

بارتونلا کوئینتانا عامل بیماری غیر شایع و نسبتاً جدی تب خندق است اگرچه ناقل اصلی این بیماری شپش است اما این باکتری را از کک‌های *کتوسفالیدس فلیس* و *پولکس ایریتانس* جدا کرده‌اند. بیماری ممکن است به شکل بدون علامت تا حالت خیلی شدید رخ دهد. مهم‌ترین علامت بیماری در شکل حاد تب شدید است که این علامت همراه با سردرد و درد استخوان پا همراه است. تب خندق در مدت زمان طولانی باعث فلجی می‌شود ولی تاکنون موارد مرگ و میر از این بیماری گزارش نشده است. بیماری در شکل مزمن ممکن است با علائم عصبی، تب، کم خونی، کاهش وزن و *باسیلاری آنژیوماتوزیس* همراه باشد [۱۴].

باکتری‌های جنس ولباخیا دارای ارتباط نزدیکی با ریکتزیاها هستند. این باکتری‌ها انگل اجباری درون سلولی بوده و بیشتر در بافت‌های تولید مثلی بندپایان وجود دارند. باکتری‌های این جنس عامل تعدادی تغییرات تولیدمثلی، شامل ناسازگاری سیتوپلاسمی،

هدف از مطالعه حاضر، بررسی فراوانی آلودگی کک‌های پولکس ایریتانس و کتنوسفالیدس کنیس، به باکتری‌های بارتونلا، ریکتزیا و ولباخیا در مقطع زمانی مشخص به روش PCR بود.

روش کار

منطقه مورد مطالعه

طبق مطالعات هواشناسی ایران دارای چهار منطقه آب و هوایی شامل: حاشیه اطراف دریای خزر، مناطق کوهستانی، حاشیه اطراف خلیج فارس و نواحی کویر مرکزی است. این مطالعه در پنج استان کرمانشاه، کردستان، آذربایجان غربی، لرستان و همدان از منطقه کوهستانی در غرب و شمال غرب ایران انجام شد (شکل ۱). در شمال غربی کشور زمستان خیلی سرد همراه با بارش سنگین برف و دما زیر صفر است. پاییز و بهار نسبتاً معتدل در حالی که تابستان گرم و خشک دارد. در مناطق غربی کشور هوا سرد و مرطوب است. بنابراین زمستان سرد و تابستان گرم است. میزان بالای بارش سالانه و پوشش گیاهی مناسب در این نواحی شرایط را برای پرورش دام‌های اهلی مساعد کرده است. دام‌هایی که به طور معمول در این مناطق پرورش داده می‌شود، شامل گاو، گوسفند، بز و اسب است [۱۹].

تلقیح بکرزایی و مونث سازی ژنتیکی نرها در میزبان‌هایشان هستند [۱۵،۱۶]. بر اساس توالی ژن 16s rRNA در ژنوم ولباخیا این باکتری دارای هفت استرین می‌باشد که از A تا F نامگذاری شده‌اند. استرین A و B مخصوص بندپایان بوده و برای میزبان خود ضروری نیستند. استرین C و D مخصوص نماتودهای فیلری بود برای میزبان خود ضروری و اختصاصی هستند استرین E در پادمان‌ها و استرین F در موربانه‌ها یافت می‌شود [۱۷]. این باکتری‌ها مکانیسمی را فراهم می‌کنند که باعث از بین رفتن فیلرهای نر و افزایش تعداد فیلرهای ماده در میزبان آلوده به نماتودهای فیلری می‌شوند. طی این مکانسیم باکتری در ویژگی‌های بیولوژیک کرم مانند پوست اندازی، رشد و زنده ماندن کرم تاثیر دارد. این باکتری‌ها بر سیستم تولیدمثل فیلرها تاثیر گذاشته و باعث افزایش تکثیر، انتقال به میزبان و جنین زایی می‌شوند. همچنین زمان تبدیل لارو مرحله یک به لارو مرحله سه را کاهش می‌دهند [۱۸]. ولباخیا باعث پاسخ التهابی خفیف در پستاندارن می‌شود با توجه به گستردگی دامنه میزبانی این باکتری و همچنین قدرت سازگاری بالا در میزبان زمینه بیماری‌زایی این باکتری‌ها باید مطالعات بیشتری انجام شود [۱۸].



شکل ۱. استان‌های مورد مطالعه در غرب و شمال غرب ایران

نمونه برداری

بررسی حاضر یک نوع مطالعه توصیفی-مقطعی و فونستیک می‌باشد که به مدت ۱۳ ماه از اردیبهشت ۱۳۹۷ تا خرداد ۱۳۹۸ در پنج استان در غرب و شمال غرب کشور انجام شد. با در نظر گرفتن شیوع ۱۰٪ و سطح اطمینان ۹۵٪ و میزان خطای ۵٪، تعداد ۱۹۳۷ نمونه کک بالغ به روش‌های تله نوری، طعمه انسانی و جداسازی مستقیم از بدن دام، انسان و حیوانات اهلی که به صورت سنتی پرورش داده می‌شود و با انسان در ارتباط هستند جمع‌آوری شد. نمونه‌ها داخل الکل ۷۰ درصد به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه ارسال شدند و با استفاده از کلیدهای تشخیص معتبر برای کک‌های ایران تعیین هویت شدند [۲۰].

استخراج DNA

ابتدا استخراج DNA به روش پروتئیناز k با استفاده از کیت MBST^۱ ایران و طبق دستور شرکت سازنده انجام شد. لازم به ذکر است که برای استخراج DNA از یک نمونه کک بالغ استفاده شد. بعد از استخراج DNA تا زمان انجام واکنش PCR، نمونه‌های DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای انجام واکنش PCR از توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن کد کننده سنتز سیترات (glfA) جهت تشخیص گونه‌های ریکتزیا، از توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن کد کننده پروتئین سطحی متصل به هم (pap31) جهت تشخیص گونه‌های بارتونلا و پرایمرهای طراحی شده از توالی ژن 16s rRNA برای تشخیص ولباخیا استفاده شد این پرایمرها توسط رولاین و همکاران طراحی شده بود [۱۴] (جدول ۱).

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی و مشخصات پرایمرهای طراحی شده

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی پرایمر	اندازه محصول (bp)	دمای اتصال (C°)	منبع
glfA	F: (5'-CCGCAGGGTTGGTAACTGC-3') R: (5'-CCTTTTAGATTACCGCCTAA-3')	۹۵۰ bp	۵۳	Rolain, et al. 2003
pap31	F: (5'-CTTCGTTTCTTTCTTCA-3') R: (5'-CTTCTTTCACAATTCAAT-3')	۳۵۰ bp	۵۳	Rolain, et al. 2003
16s rRNA	F: (5'-CTTCGTTTCTTTCTTCA-3') R: (5'-GAAACACCACCAGCAACATA-3')	۳۵۰ bp	۵۳	Rolain, et al. 2003

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل: ۵ میکرولیتر DNA، ۵ میکرولیتر 10x PCR Buffer، ۴ میکرولیتر MgCl₂ با غلظت 100mM، ۱ میکرولیتر dNTP با غلظت 100μM، یک میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت 20 μM و یک میکرولیتر Tag Polymerase انجام گرفت. برنامه مورد استفاده برای واکنش PCR شامل یک واسرشت ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و بعد از آن ۴۰ چرخه تکرار که هر چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (مرحله واسرشت اولیه)، دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت

۳۰ ثانیه (مرحله اتصال پرایمر) و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه (مرحله طویل شدن) و مرحله نهایی طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. پس از انجام واکنش PCR محصول واکنش روی ژل ۱/۵ درصد آگارز الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی زیر نور فرابنفش عکسبرداری شد. بعد از الکتروفورز محصول واکنش PCR باند ۹۵۰ bp برای گونه‌های بارتونلا، و باند ۳۵۰ bp برای گونه‌های ریکتزیا و ولباخیا مشاهده شد. محصول PCR با استفاده از کیت MBST ایران تخلیص شد و جهت

^۱ Molecular Biological System Transfer

نتایج واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن کدکننده سنتز سیترات (glfA) جهت تشخیص آلودگی با گونه‌های ریکتزیا در کک‌های جمع‌آوری شده نتیجه واکنش PCR در ۱۰۱ کک (۵/۲٪) مثبت شد که این کک‌ها شامل ۷۴ کک کتنوسفالیدس کنیس (۸/۰۶٪) و ۲۷ کک پولکس ایریتانس (۲/۶۴٪) بودند که نتیجه واکنش PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به شکل باند ۳۵۰ bp مشاهده شد. با پرایمرهای طراحی شده برای پروتئین سطحی متصل به هم (pap31) جهت غربالگری گونه‌های بارتونلا در کک‌های جمع‌آوری شده تست PCR برای ۱۰ کک (۰/۵۱٪) مثبت شد که این نمونه‌ها شامل ۷ کک کتنوسفالیدس کنیس (۰/۷٪) و ۳ کک پولکس ایریتانس (۰/۲۹٪) بودند. لازم به ذکر است که همه نمونه‌های مثبت بارتونلا مربوط به استان کرمانشاه بودند. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن 16s rRNA جهت تشخیص موارد مثبت ولباخیا نتیجه واکنش‌های PCR برای ۲۵۰ کک (۱۲/۹٪) مثبت شد که این نمونه‌ها شامل ۱۱۹ کک کتنوسفالیدس کنیس (۱۲/۹۶٪) و ۱۳۱ کک پولکس ایریتانس (۱۲/۸۵٪) بودند (جدول ۲). پس از الکتروفورز نتیجه واکنش PCR موارد مثبت نتیجه به شکل باند ۳۵۰ bp روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده شد (شکل ۲).

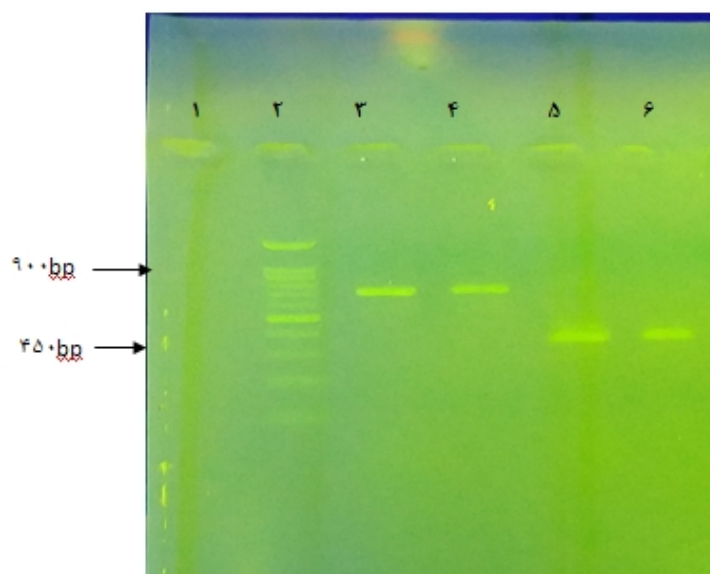
تایید تشخیص از هر نمونه مثبت در هر شهرستان یک مورد جهت تعیین توالی انتخاب شد و در مجموع ۲۴ نمونه برای تعیین توالی برای شرکت تکاپو زیست ارسال گردید.

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک

۲۴ نمونه محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال شد و نتیجه تعیین توالی با توجه به نوع ناقل، مناطق جغرافیایی و عامل بیماریزا در سایت NCBI به صورت آنلاین جهت دریافت شماره دسترسی ثبت گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها در نهایت با بلاست کردن توالی‌ها در سایت NCBI و ترسیم درخت فیلوژنتیک با نرم افزار Mega ورژن ۶ بر اساس روش حداکثر احتمال با بوت استرپ ۱۰۰۰ تکرار، ترسیم شد و در نهایت جهت بررسی درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی عوامل بیماریزا در استان‌ها و ناقلین مختلف توالی‌های مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار EMBOS Needle و Clustal Omega هم‌ردیف‌سازی شده و مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها

در مجموع ۱۹۳۷ نمونه کک بالغ جمع‌آوری شد و پس از بررسی‌های مرفولوژیک با استفاده از کلیدهای تشخیص معتبر برای کک‌های ایران از ۱۹۳۷ نمونه ۱۰۱۹ نمونه به عنوان پولکس ایریتانس (۵۲/۶۱٪) و ۹۱۸ نمونه به عنوان کتنوسفالیدس کنیس (۴۷/۳۹٪) تشخیص داده شد (جدول ۲).



شکل ۲. تصویر الکتروفورز ژل آگارز مربوط به نمونه مثبت ریکتزیا، بارتونلا و ولباخیا. ۱ کنترل منفی، ۲ ماکر ۱۰۰bp، ۳ نمونه‌های مثبت ژن کد کننده پرونتین سطحی هم (pap31) کک کتنوسفالیدس کنیس (بارتونلا) ۴ نمونه‌های مثبت ژن کد کننده پرونتین سطحی هم (pap31) کک پولکس ایریتانس (بارتونلا)، ۵ نمونه مثبت ژن کد کننده سنتز سیترات (glA) ریکتزیا در کک پولکس ایریتانس و ۶ مربوط به نمونه مثبت ژن 16S rRNA ولباخیا کک پولکس ایریتانس می باشد.

جدول ۲. تعداد کک های جمع آوری شده از استان های مختلف و نمونه های مثبت عفونت های ریکتزیا، بارتونلا و ولباخیا

استان	شهرستان	گونه کک	تعداد کک	طول و عرض جغرافیایی	تعداد نمونه‌های مثبت		
					ولباخیا	ریکتزیا	بارتونلا
کرمانشاه	گیلانغرب	پولکس ایریتانس	۹۴	34.1397° N, 45.9206° E	۱۵	۷	۳
	کرمانشاه		۷۶	34.3277° N, 47.0778° E	۱۰	۳	-
کردستان	سنندج	پولکس ایریتانس	۹۲	35.3219° N, 46.9862° E	۷	۴	-
	کامیاران		۸۱	34.7956° N, 46.9368° E	۱۶	۱۹	-
آذربایجان غربی	ارومیه	پولکس ایریتانس	۱۷۵	37.5498° N, 45.0786° E	۱۱	۱۱	-
	مهاباد		۹۵	36.7684° N, 45.7337° E	۱۴	-	-
همدان	همدان	پولکس ایریتانس	۷۹	34.7989° N, 48.5150° E	۳۴	-	-
	بهار		۱۰۱	34.9083° N, 48.4393° E	-	۱۷	-
لرستان	خرم آباد	پولکس ایریتانس	۹۸	33.4647° N, 48.3390° E	۲۴	-	-
	کوهدشت		۱۲۸	33.5275° N, 47.6111° E	-	۱۳	-
کرمانشاه	گیلانغرب	کتوسفالیدس کنیس	۱۳۱	34.1397° N, 45.9206° E	۱۶	۵	۷
	کرمانشاه		۱۱۲	34.3277° N, 47.0778° E	۱۴	-	-
کردستان	سنندج	کتوسفالیدس کنیس	۱۰۱	35.3219° N, 46.9862° E	۷	۵	-
	کامیاران		۶۶	34.7956° N, 46.9368° E	۱۴	-	-
آذربایجان غربی	ارومیه	کتوسفالیدس کنیس	۱۰۲	37.5498° N, 45.0786° E	۱۵	۳	-
	مهاباد		۵۹	36.7684° N, 45.7337° E	۹	۸	-
همدان	همدان	کتوسفالیدس کنیس	۱۴۱	34.7989° N, 48.5150° E	۲۰	-	-
	بهار		۸۳	34.9083° N, 48.4393° E	۲۴	۴	-
لرستان	خرم آباد	کتوسفالیدس کنیس	۷۹	33.4647° N, 48.3390° E	-	۲	-
	کوهدشت		۴۴	33.5275° N, 47.6111° E	-	-	-

نتیجه تعیین توالی ژن کدکننده سنتز سیترات (glfA)

مطالعه اخیر نشان داد که ۵/۲۱ درصد کک‌های آزمایش شده آلوده به ریکتازیا بودند. توالی نوکلئوتیدی ژن glfA در هشت ایزوله تعیین توالی شده نشان داد که این توالی‌ها (-MZ269707 ID: 269714) دارای تشابه ۱۰۰ درصدی با هم بودند. هم‌مردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی ژن glfA مطالعه اخیر با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن نشان داد که توالی‌های دارای شباهت ۱۰۰ درصدی با گونه

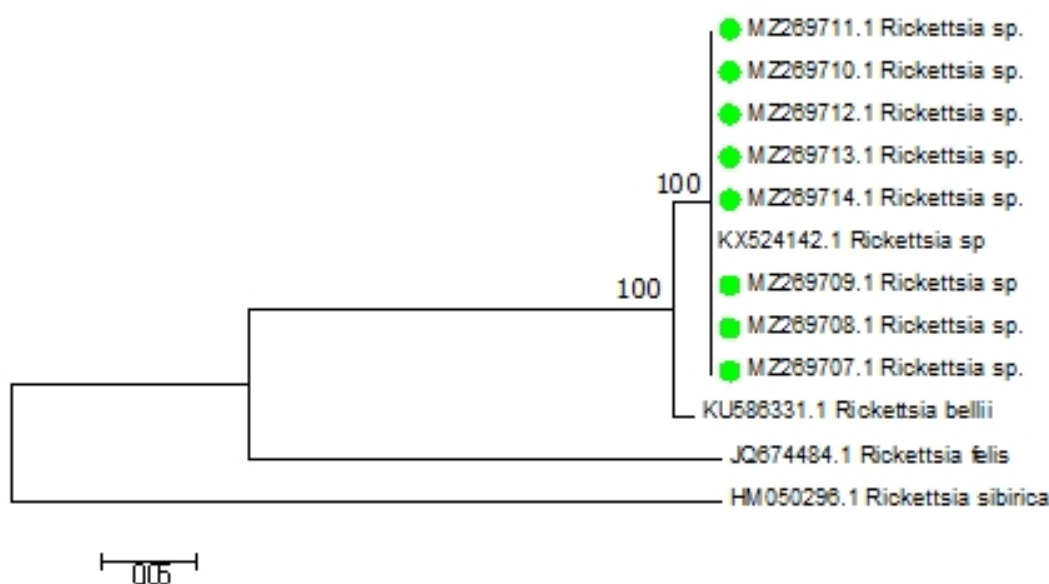
ریکتازیا جدا شده از کک پولکس ایریتانس ایران (ID: KX524142.) در مطالعات قبلی، شباهت ۹۷ درصدی با گونه ریکتازیا بیلی (ID: KU 856331) جدا شده از پشه آنوفل در کشور چین، شباهت ۹۵ درصدی با ریکتازیا بیلی (ID: JQ906786) کشور برزیل، شباهت ۸۸ درصدی با گونه‌های ریکتازیا ژاپونیکا و ریکتازیا سیبریکا هستند (شکل ۳).

MZ269709.1	TGGGGACCCGCTCATGCTGGGGGTAATGAAGCAGTGATAAATATGCTGAAGAAATAGGCAGTGTAGAGAAATACCTAAATATATCGCTAAAGCTAAAGATAAAGATGATAATTTTAGG	120
MZ269710.1	TGGGGACCCGCTCATGCTGGGGGTAATGAAGCAGTGATAAATATGCTGAAGAAATAGGCAGTGTAGAGAAATACCTAAATATATCGCTAAAGCTAAAGATAAAGATGATAATTTTAGG	120
KX524142.1T.....C..C..A..C.....	120
KU586331.1T.....C..C..A..C.....	120
HM050296.1T.....C..C..C.....G.....T.....C.....TCT...T...T.....A.....G.....CCA....A	120
AP017602.1T.....C.....G.....T.....C.....TCT...T...T.....A.....G.....CCA....A	120
JQ674484.1G..T.....C.....C.....G.....T.....C.....TCT...T.....A.....G.....CCA....A	120
MZ269709.1	CTAATGGGTTTTGGTCAATGCTATATAAGAACTATGACCCGCTGCTGAGTGTAAAGAAACCTGCAAGGAGGTGTTAAAAGAAATTAGGGCAGCTAGATAACCAACCCGTTACTACAA	240
MZ269710.1	CTAATGGGTTTTGGTCAATGCTATATAAGAACTATGACCCGCTGCTGAGTGTAAAGAAACCTGCAAGGAGGTGTTAAAAGAAATTAGGGCAGCTAGATAACCAACCCGTTACTACAA	240
KX524142.1G.....A.....	240
KU586331.1T.....A.....C.....A.....G.....A..A..A.....G...C..C.....C.....T...C..CT.....	240
HM050296.1T.....A.....C.....A.....G.....A..A..A.....G...C..C.....C.....T...C..CT.....	240
AP017602.1T.....A.....C.....A.....G.....A..A..A.....G...C..C.....C.....T...C..CT.....	240
JQ674484.1T.....C.....T.....A.....A.....C.....A.....T.....A..A..A.....G...C..C..A.....A.....T...C..TT..G...	240
MZ269709.1	ATAGCTATAGAGCTTGAAGCTATCGCTCTTAAGATGAGTATTTTATTGAGAGAAAATTA TATCCAAACGTTGATTTTATTAGGCTATTATTATAAAGCGATGGGTATACCTCCGCAA	360
MZ269710.1	ATAGCTATAGAGCTTGAAGCTATCGCTCTTAAGATGAGTATTTTATTGAGAGAAAATTA TATCCAAACGTTGATTTTATTAGGCTATTATTATAAAGCGATGGGTATACCTCCGCAA	360
KX524142.1G.....	360
KU586331.1A.....A.....A.....T.....C.....C.....T.....GT.....	360
HM050296.1A.....A.....A.....T.....C.....C.....G.....G.....T.....GT.....	360
AP017602.1A.....A.....A.....T.....C.....C.....G.....G.....T.....GT.....	360
JQ674484.1A.....A.....A.....T.....T.....C.....T.....GT.....	360
MZ269709.1	ATGTTTACAGTGTCTTTTTCGAATA	384
MZ269710.1	ATGTTTACAGTGTCTTTTTCGAATA	384
KX524142.1C..C.....	384
KU586331.1	384
HM050296.1T..A.....	384
AP017602.1G..A.....	384
JQ674484.1T..G..A.....	384

شکل ۳. نتایج هم‌مردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی ژن کدکننده سنتز سیترات (glfA) ریکتازیا در کک پولکس ایریتانس ایزوله‌کردستان (ID: MZ269709)، توالی نوکلئوتیدی ژن glfA ریکتازیا کک کتوسفالیدس کنیس ایزوله کرمانشاه (ID: MZ269710)، توالی نوکلئوتیدی ژن glfA ریکتازیا کک پولکس ایریتانس ایران (ID: KX524142.1)، ریکتازیا سیبریکا (ID: HM050296)، ریکتازیا جاپونیکا (ID: AP017602.1) و ریکتازیا فیلیس (ID: JQ674484.1).

ریکتزیا مطالعه اخیر به همراه ریکتزیا مطالعه قبلی (ID: KX524142) در ایران و ریکتزیا بیلی کشور چین (ID: KU 856331) در یک شاخه قرار می‌گیرند. ریکتزیا بیلی (ID: JQ906786)، ریکتزیا فیلیس (JQ74484.1) و ریکتزیا سیبریکا (ID: HM050296) در شاخه‌های جدا از هم قرار دارند (شکل ۴).

نتایج درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس ژن کدکننده سنتز سیترات (glTA) رسم درخت فیلوژنی بر اساس شباهت بین توالی‌های ژن کدکننده سنتز سیترات (glTA) مطالعه اخیر و توالی ثبت شده در بانک انجام شد. درخت فیلوژنی بر اساس شباهت بین توالی‌های مطالعه اخیر و توالی ثبت شده در بانک ژن ۳ شاخه تشکیل می‌دهد، گونه



شکل ۴. درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس توالی ژن کدکننده سنتز سیترات (glTA) در کک‌های کتوسفالیدس کنیس و پولکس ایریتانس در غرب و شمال غرب ایران. طول شاخه‌ها نشان دهنده مقدار تغییر فاصله ژنتیکی بین توالی‌های مختلف می‌باشد گونه‌های ریکتزیا مطالعه اخیر به همراه ریکتزیا مطالعه قبلی (ID: KX524142) در ایران در یک شاخه قرار می‌گیرند. ریکتزیا بیلی (ID: KU856331.1)، ریکتزیا فیلیس (ID: JQ74484.1) و ریکتزیا سیبریکا (ID: HM050296.1) در شاخه‌های جدا از هم قرار دارند.

ایزوله بارتونلا هنسله (ID: MZ269715-269716) جدا شده با یکدیگر نشان داد که دو گونه دارای تشابه ۱۰۰ درصدی با یکدیگر و همچنین تشابه ۶۰-۶۵٪ با بارتونلا هنسله فاژ ۶۰-۶۵٪ (ID: AF308170) و تشابه ۹۹/۷۲ درصدی با بارتونلا هنسله BM1374165 (ID: HG969191) هستند (شکل ۵).

نتیجه تعیین توالی ژن کدکننده پروتئین سطحی متصل به هم (pap31)

نتیجه واکنش PCR جهت تشخیص موارد مثبت بارتونلا در مطالعه اخیر نشان داد که ۵۱٪ درصد کک‌ها آلوده به بارتونلا بودند. هم‌ردیف‌سازی نتیجه تعیین توالی ژن pap31 مطالعه اخیر با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن نشان داد که دو ایزوله که تست PCR آنها مثبت است مربوط به گونه بارتونلا هنسله هستند. همچنین هم‌ردیف سازی نتیجه تعیین توالی دو

```

MZ269185.1 ATGCGTTTGATTTGAGCTTCGACGACCAAGCTGCTGATGTTATCGTTCTCATGAAGTAGCGCCAAACAGTTATTAGTGGCGCTGTTTTTTCTGGACAGGTTTCTATATTGGTGGTCAA 120
MZ269186.1 ATGCGTTTGATTTGAGCTTCGACGACCAAGCTGCTGATGTTATCGTTCTCATGAAGTAGCGCCAAACAGTTATTAGTGGCGCTGTTTTTTCTGGACAGGTTTCTATATTGGTGGTCAA 120
AF308170.1 ATGCGTTTGATTTGAGCTTCGACGACCAAGCTGCTGATGTTATCGTTCTCATGAAGTAGCGCCAAACAGTTATTAGTGGCGCTGTTTTTTCTGGACAGGTTTCTATATTGGTGGTCAA 120
*****

MZ269185.1 GTTGGGAATTTTTGAGTAAGGTTGAAATAACTGATCGGAATAAAAAAGATAAACTTTTCAGTAAAGATGATACACCTAAGCCTTCAGGCTTCATGGTGGTATTATTAGCAGGTTCCAAC 240
MZ269186.1 GTTGGGAATTTTTGAGTAAGGTTGAAATAACTGATCGGAATAAAAAAGATAAACTTTTCAGTAAAGATGATACACCTAAGCCTTCAGGCTTCATGGTGGTATTATTAGCAGGTTCCAAC 240
AF308170.1 GTTGGGAATTTTTGAGTAAGGTTGAAATAACTGATCGGAATAAAAAAGATAAACTTTTCAGTAAAGATGATACACCTAAGCCTTCAGGCTTCATGGTGGTATTATTAGCAGGTTCCAAC 240
*****

MZ269185.1 ATGAGTCTTGGAAATAATGATTCTAGGAGTTGAAACCGATGCGGTTGGGCTGACAGAGAAGACGCAAAAACCTCTTCTGCTAAAGTTATTAGAGAGGATGAACCTTGCAAACTTTAAG 360
MZ269186.1 ATGAGTCTTGGAAATAATGATTCTAGGAGTTGAAACCGATGCGGTTGGGCTGACAGAGAAGACGCAAAAACCTCTTCTGCTAAAGTTATTAGAGAGGATGAACCTTGCAAACTTTAAG 360
AF308170.1 ATGAGTCTTGGAAATAATGATTCTAGGAGTTGAAACCGATGCGGTTGGGCTGACAGAGAAGACGCAAAAACCTCTTCTGCTAAAGTTATTAGAGAGGATGAACCTTGCAAACTTTAAG 360
*****

MZ269185.1 GATTCCTTAAAAACGCTAATGCTGTTTTTGTAAAGATAAAAACAAGTATGATGTCAGG CAAGATGAAAAGCATAACAGATAGTTAGCTTTAAAGGAAAAATGGTCTGGTCTACTCGC 480
MZ269186.1 GATTCCTTAAAAACGCTAATGCTGTTTTTGTAAAGATAAAAACAAGTATGATGTCAGG CAAGATGAAAAGCATAACAGATAGTTAGCTTTAAAGGAAAAATGGTCTGGTCTACTCGC 480
AF308170.1 GATTCCTTAAAAACGCTAATGCTGTTTTTGTAAAGATAAAAACAAGTATGATGTCAGG CAAGATGAAAAGCATAACAGATAGTTAGCTTTAAAGGAAAAATGGTCTGGTCTACTCGC 480
*****

MZ269185.1 GTACGCATTGGTTTTACAGCCGCTGATCGCATTATGCTTATGTTGCTGGTGGTGTTCCTATGACAGGTACAAGCTGTCAAGTCTAAGGTAACACAAGCAGCAGATGATGCAGAA 600
MZ269186.1 GTACGCATTGGTTTTACAGCCGCTGATCGCATTATGCTTATGTTGCTGGTGGTGTTCCTATGACAGGTACAAGCTGTCAAGTCTAAGGTAACACAAGCAGCAGATGATGCAGAA 600
AF308170.1 GTACGCATTGGTTTTACAGCCGCTGATCGCATTATGCTTATGTTGCTGGTGGTGTTCCTATGACAGGTACAAGCTGTCAAGTCTAAGGTAACACAAGCAGCAGATGATGCAGAA 600
*****

MZ269185.1 ATCGCTTCTGCTCAATTGTTTGAATAAAACAAGCATTAGTTGGTTTCACTCTTGGCGGTGGTGTGATTTTGTATGACTGATAATGTTTTATTGCGTGCAGAAACCGTTACTCAGATT 721
MZ269186.1 ATCGCTTCTGCTCAATTGTTTGAATAAAACAAGCATTAGTTGGTTTCACTCTTGGCGGTGGTGTGATTTTGTATGACTGATAATGTTTTATTGCGTGCAGAAACCGTTACTCAGATT 721
AF308170.1 ATCGCTTCTGCTCAATTGTTTGAATAAAACAAGCATTAGTTGGTTTCACTCTTGGCGGTGGTGTGATTTTGTATGACTGATAATGTTTTATTGCGTGCAGAAACCGTTACTCAGATT 721
*****
    
```

شکل ۵. نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده پروتئین سطحی متصل به هم (pap31) بارتونلا هنسله در کک پولکس ایریتانس ایزوله کرمانشاه (ID: MZ269185.1) توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده پروتئین سطحی متصل به هم (pap31) بارتونلا هنسله در کک کتنوسفالیس کنیس ایزوله کرمانشاه (ID: MZ269176.1) با بارتونلا هنسله فاز ۵۷-۶۰ (ID: AF308170.1).

که توالی مطالعه اخیر (ID: MZ198826, MZ230730, MZ230567, MZ230566, MZ209180, MZ209179, MZ209169, MZ198826) تشابه ۱۰۰ درصدی با ولباخیا جدا شده از کنه ایکسودس کشور فرانسه (ID: KU559923)، تشابه ۹۹/۱ درصدی با ولباخیا همزیست پولکس ایریتانس کشور ترکیه (ID: MH521190.1) و تشابه ۹۹/۱ درصدی با ولباخیا همزیست دورسوفیلاریا ملانوکاستر (ID: CP046923.1) دارد (شکل ۶).

نتیجه تعیین توالی ژن 16s rRNA

نتیجه انجام واکنش PCR جهت تشخیص آلودگی با باکتری‌های پاتوژن در مطالعه اخیر نشان داد که بیشترین درصد آلودگی مربوط به باکتری ولباخیا بود. ۱۴/۹ درصد نمونه‌ها واکنش PCR آنها مثبت شد. پس از تعیین توالی ژن 16s rRNA در ایزوله‌ای که واکنش PCR آنها از نظر آلودگی با ولباخیا مثبت بود مشخص شد که ۸ ایزوله تعیین توالی شده دارای تشابه درون گونه‌ای ۱۰۰ درصد هستند. پس از هم‌ردیف‌سازی توالی ژن 16s rRNA مطالعه اخیر با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن مشخص شد

```

MZ230567.1 GGTACCTACAGAAGAAGTCTCTGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGAGGGCTAGCGTTATTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGATTAGTAAAGTTAAAA 120
MZ198778.1 GGTACCTACAGAAGAAGTCTCTGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGAGGGCTAGCGTTATTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGATTAGTAAAGTTAAAA 120
KU559923.1 GGTACCTACAGAAGAAGTCTCTGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGAGGGCTAGCGTTATTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGATTAGTAAAGTTAAAA 120
*****

MZ230567.1 GTGAAATCCCAAGGCTCAACCTTGGAAATGCTTTTAAAACTGCTAATCTAGAGATTGAAAGAGGATAGAGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAATATTAGGAGAACACCAGT 240
MZ198778.1 GTGAAATCCCAAGGCTCAACCTTGGAAATGCTTTTAAAACTGCTAATCTAGAGATTGAAAGAGGATAGAGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAATATTAGGAGAACACCAGT 240
KU559923.1 GTGAAATCCCAAGGCTCAACCTTGGAAATGCTTTTAAAACTGCTAATCTAGAGATTGAAAGAGGATAGAGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAATATTAGGAGAACACCAGT
*****

MZ230567.1 GGCGAAGGCGTCTATCTGGTTCAAACTGACGCTGAAGCGCGAAGGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGAGTGTCT 344
MZ198778.1 GGCGAAGGCGTCTATCTGGTTCAAACTGACGCTGAAGCGCGAAGGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGAGTGTCT 344
KU559923.1 GGCGAAGGCGTCTATCTGGTTCAAACTGACGCTGAAGCGCGAAGGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGAGTGTCT 344
*****
    
```

شکل ۶. نتایج هم‌مدیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی ژن 16s rRNA و بلایخیا پولکس ایریتانس ایزوله کردستان (ID: MZ230567.1) و توالی نوکلئوتیدی ژن 16s rRNA و بلایخیا پولکس ایریتانس ایزوله کرمانشاه (ID: MZ198778.1) با ژن 16s rRNA و بلایخیا جدا شده از کنه ایکسودس کشور فرانسه (ID: KU559923.1).

بحث

مطالعه‌ای که رولاین و همکاران جهت جداسازی عوامل پاتوژن از کک کتوسفالیدس فلیس در کشور فرانسه انجام دادند درصد آلودگی با گونه‌های بارتونلا ۲۶/۲ درصد بود که بارتونلا هنسله با ۹/۸۱ درصد آلودگی گونه قالب بود [۱۴].

ریکتزیا تیفی و ریکتزیا فلیس به عنوان عامل ایجادکننده بیماری‌های مشترک دارای گسترش جهانی بوده و هم‌اکنون در حال ظهور مجدد و گسترش است [۷]. نتیجه این مطالعه نشان داد که کک‌های خانواده پولیسیده نقش مهمی به عنوان ناقل ریکتزیاها دارند، که این تاییدکننده نقش کک‌های پولکس ایریتانس و کتوسفالیدس کنیس در کنار گونه‌های دیگر کک و شپش به عنوان ناقل ریکتزیاها می‌باشد [۲۶]. در این بررسی نتیجه تست PCR برای ۵/۲۱ درصد کک‌های آزمایش شده مثبت بود. در مطالعه‌ای که قوامی و همکاران به منظور بررسی آلودگی با گونه‌های ریکتزیا در کک پولکس ایریتانس در شهرستان‌های استان زنجان انجام دادند درصد آلودگی با ریکتزیا را ۵ درصد اعلام کردند، که نتیجه این تعیین توالی (ID: KX524142) دارای تشابه ۱۰۰ درصدی با توالی‌های مطالعه اخیر بود [۲۷]. در مطالعه ساکال و همکاران در کنگو جهت تشخیص موارد مثبت ریکتزیا از نشانگر glA و به‌منظور

عفونت‌های باکتریی بارتونلا و ریکتزیا دارای گسترش جهانی هستند. باکتری بارتونلا هنسله، که به عنوان عامل اصلی بیماری خراش گربه و باسیلاری آنژیوماتوزیس در جهان شناخته شده است و طیف نشانه‌های بالینی آن، در حال گسترش است [۲۱]. در مطالعه حاضر میزان آلودگی با بارتونلا هنسله، در کک‌های پولکس ایریتانس و کتوسفالیدس کنیس در غرب و شمال غرب ایران ۵۱٪ درصد تعیین شد. آلودگی کک‌های پولکس ایریتانس و کتوسفالیدس کنیس به بارتونلا هنسله تاییدکننده نقش این کک‌ها به‌عنوان ناقل بارتونلا هنسله در کنار کک کتوسفالیدس فلیس می‌باشد [۲۲]. بارتونلا هنسله جداشده از کک‌های کتوسفالیدس کنیس و کتوسفالیدس فلیس در کشور آلمان نیز گونه قالب بوده است [۲۳]. در مطالعه کیم و همکاران که به منظور بررسی آلودگی سگ‌های خانگی به بارتونلا در کشور کره انجام شد بارتونلا هنسله گونه قالب جداشده از خون، بزاق و ناخن سگ‌های آلوده بود [۲۴]. در یک مطالعه مقطعی که در آمریکا جهت تشخیص گونه‌های مهم بارتونلا در سگ انجام شد گونه‌های بارتونلا هنسله، بارتونلا برخوفی، بارتونلا کلره، بارتونلا ولنس و بارتونلا بویس به ترتیب فراوانی گزارش شده است [۲۵]. در

دادند همه نمونه‌های مثبت از نظر فیلوژنی کاملاً مشابه و شبیه توالی‌های مثبت شده در بانک ژن بودند در این بررسی ۵۶/۲ درصد سگ‌های آلوده به دیروفیلاریا واکنش PCR آنها برای ولباخیا مثبت شد [۳۴].

نتیجه گیری

با بررسی یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که کک‌های خانواده پولیسیده در دسته مهم‌ترین انگل‌های خارجی آلوده‌کننده انسان و دام‌های اهلی در غرب و شمال غرب ایران هستند این بررسی اولین مطالعه جهت تشخیص آلودگی با عوامل پاتوژن به روش مولکولی در غرب و شمال غرب ایران بود. این مطالعه نشان داد که بیشترین آلودگی در کک مربوط به گونه‌های ولباخیا و کمترین میزان آلودگی مربوط به بارتونلا بود که این نشان‌دهنده پتانسیل بالای کک‌ها در حفظ و انتقال عوامل بیماریزا است؛ بنابراین کک‌های خانواده پولیسیده ممکن است نسبت به آنچه قبلاً گزارش شده است نقش مهم‌تری در انتقال عوامل بیماریزا به انسان داشته باشند. با توجه به افزایش جمعیت کک و افزایش مقاومت به سموم بررسی آلودگی به عوامل بیماریزا توسط کک‌ها در مناطق مختلف کشور توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه دکتری رشته انگل‌شناسی دانشگاه ارومیه با کد اخلاق ۳/دآ/۶۸۸-IR-UU-AEC می‌باشد که زیر نظر این دانشگاه انجام شد.

جداسازی بارتونلا از ژن (pap31) در گونه‌های مختلف کک استفاده شد در این بررسی درصد آلودگی با گونه‌های بارتونلا و ریکتیزیا به ترتیب ۰/۹ و ۳/۶ گزارش شد که به نتیجه این بررسی نزدیک است [۲۸].

ولباخیا اخیراً به دلیل پراکنش گسترده این باکتری و تاثیر آن بر میزبانان، به عنوان تغییردهندگان مراحل اولیه رشد، نمو و فرآیندهای میتوزی در میزبان‌هایشان و به عنوان یک عامل میکروبی در کنترل بیولوژیک علاقه زیادی در بین محققان به خود اختصاص داده است [۲۹]. درصد آلودگی با ولباخیا در بین رده‌های مختلف در حشرات از ۲۰ تا ۷۰ درصد گزارش شده است [۳۰]. به طور خلاصه، این باکتری در پروانه‌ها، مگس‌های میوه، پشه‌ها، کک‌ها، کنه‌ها، زنبورها و کرم‌های ابریشم یافت می‌شود [۳۱، ۳۲]. بیشترین درصد آلودگی در مطالعه اخیر مربوط به باکتری ولباخیا بود واکنش PCR برای ۱۲/۹ درصد نمونه‌ها مثبت بود. در مطالعه‌ای که رولاین و همکاران جهت جداسازی عوامل پاتوژن از کک *کتوسفالیئیدس فلیس* در کشور فرانسه انجام دادند بیشترین درصد آلودگی را برای ولباخیا اعلام کردند که در گسترده ۷/۱ تا ۱۷/۸ در مناطق مختلف متقیر است [۱۴]. در مطالعه‌ای که به منظور تعیین آلودگی به ولباخیا در سگ‌های آلوده به دیروفیلاریا در منطقه مدیترانه انجام شد ۳۰ درصد نمونه‌های خون از نظر آلودگی با ولباخیا مثبت بودند [۳۳]. در مطالعه‌ای که خان محمدی و همکاران در شمال کشور به منظور آنالیز فیلوژنی ولباخیا بیپینس همزیست دیروفیلاریا/یمیتیس بر اساس ژن سیتوکروم اکسیداز I انجام

References

- 1- Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. Fleas and flea-borne diseases. J Glob Infect Dis. 2010 Aug; 14(8):667-76.
- 2- Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis* etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev. 1997 Jan; 10(1): 35-66.

- 3- Leulmi H, Socolovschi C, Laudisoit A, Houemenou G, Davoust B, Bitam I, et al. Detection of *Rickettsia typhi*, *Bartonella* sp. and *Yersinia pestis* in fleas (Siphonaptera) from Africa. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Oct; 8(10): 3152.
- 4- Ratovonjato J, Rajerison M, Rahelinirina S, Boyer S. *Yersinia pestis* in *Pulex irritans* fleas during plague outbreak, Madagascar [letter]. Emerg Infect Dis. 2014 Aug; 20(8): 1414-15.
- 5- Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, Bertherat E, Carniel E, et al. Plague: past, present, and future. PLoS Med. 2008 Jan; 5(1):3.
- 6- Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 1997; 10(4): 694-719.
- 7- McLeod MP, Qin X, Karpathy SE, Gioia J, Highlander SK, Fox GE, et al. Complete genome sequence of *Rickettsia typhi* and comparison with sequences of other rickettsiae. J Bacteriol Res. 2004 Oct; 186(17):5842-55.
- 8- Yazid Abdad M, Stenos J, Graves S. *Rickettsia felis*, an emerging flea-transmitted human pathogen. Emerg Health Threats J. 2011 Jan 1; 4(1):7168.
- 9- Barrs VR, Beatty JA, Wilson BJ, Evans N, Gowan R, Baral RM, et al. Prevalence of *Bartonella* species, *Rickettsia felis*, and *Ehrlichia* group in the blood of cat fleas in eastern Australia. Aust Vet J. 2010 May; 88(5):160-65.
- 10-Leulmi H, Aouadi A, Bitam I, Bessas A, Benakhla A, Raoult D, et al. Detection of *Bartonella tamiae*, *Coxiella burnetii* and rickettsiae in arthropods and tissues from wild and domestic animals in northeastern Algeria. Parasit & Vectors. 2016 Jan; 9(1):27-52.
- 11-Zhao SS, Li HY, Yin XP, Liu ZQ, Chen CF, Wang YZ. First detection of candidatus *Rickettsia barbariae* in the flea *Vermipsylla alakurt* from north-western China. Parasit & Vectors. 2016 Jun; 9(1): 32.
- 12-Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. Emerg Infect Dis. 2006 Mar; 12(3):389.
- 13-Fournier PE, Lellevre H, Eykyn SJ, Mainardi JL, Marrie TJ, Bruneel F, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. Medicine. 2001 Jul; 80(4):245-51.
- 14-Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. Emerg Infec Dis. 2003 Mar; 9(3):339.
- 15-Hoffman AA, Turelli M, Harshman LG. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. Genetics.1990 Dec; 126(4):933-48.
- 16-Presgraves DC. A genetic test of the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. G S A.1999 Jun; 154:71-76.
- 17-Yen JH, Barr AR. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. Nature.1971 Aug; 232(1513):657-58.
- 18-Hoffman AA, Turelli M. 1988. Unidirectional in compatibility in *Drosophila simulans*: inheritance, geographic variation and fitness effects. Genetics.1988 Jun; 119(2):435-44.
- 19-Skerman KD, Shahlapoor AA, Eslami AH, Eliazian M. Observations on the incidence, epidemiology, control and economic importance of gastro-intestinal parasites of sheep and goats in Iran. Archives of Razi Institute. 1970 Feb; 22(1):187-96.
- 20-Asmar M, Piazak N, Karimi Y. An illustrated Key for fleas of Iran. Pasteur Institute of Iran.1979; Research Notes. 2-15.
- 21-Dehio C. Recent progress in understanding *Bartonella*-induced vascular proliferation. Curr Opin Microbiol. 2003 Feb; 6(1):61-65.
- 22-Ives TJ, Marston EL, Regnery RL, Butts JD. In vitro susceptibilities of *Bartonella* and *Rickettsia* spp. to fluoroquinolone antibiotics as determined by immunofluorescent antibody analysis of infected vero cell monolayers. Int J Antimicrob Agents. 2001 Sep;18(3):217-22.
- 23-Just FT, Gilles J, Pradel I, Pfalzer S, Lengauer H, Hellmann K, et al. Molecular evidence for *Bartonella* spp. in cat and dog fleas from Germany and France. Zoonoses Public Health. 2008 Oct; 55(8-10):514-20.

- 24-Kim YS, Seo KW, Lee JH, Choi EW, Lee HW, Hwang CY, et al. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats and dogs in Korea. J Vet Sci. 2009 Mar; 10(1):85-87.
- 25-Pérez C, Maggi RG, Diniz PP, Breitschwerdt EB. Molecular and serological diagnosis of *Bartonella* infection in 61 dogs from the United States. J Vet Intern Med. 2011 Jul; 25(4):805-10.
- 26-Pérez-Osorio CE, Zavala-Velázquez JE, León JJ, Zavala-Castro JE. *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. Emerg Infec Dis. 2008 Jul; 14(7):1019.
- 27-Ghavami MB, Mirzadeh H, Mohammadi J, Fazaeli A. Molecular survey of ITS1 spacer and rickettsia infection in human flea, *Pulex irritans*. Parasitol Res. 2018 May; 117(5): 1433-42.
- 28-- Sackal C, Laudisoit A, Kosoy M, Massung R, Eremeeva ME, Karpathy SE, et al. Bartonella spp, and *Rickettsia felis* in fleas, democratic Republic of Congo. Emerg Infect Dis. 2008 Des; 14(12):1972-74.
- 29-Vavre F, Dedeine F, Quillon M, Fouillet P, Fleury F, Boulétreau M. Within-species diversity of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects. Evolution. 2001 Aug; 55(8):1710-14.
- 30-Bourtzis K. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. Transgenesis and the management of vector-borne disease. 2008:104-13.
- 31-de Pinho Mixao V, Mendes AM, Mauricio IL, Calado MM, Novo MT, Belo S, et al. Molecular detection of *Wolbachia pipientis* in natural populations of mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* from continental Portugal: first detection in *Culex theileri*. Med Vet Entomol. 2016 Sep; 30(3):301-9.
- 32-Berezcki J, Rác R, Varga Z, Tóth JP. Controversial patterns of *Wolbachia* infestation in the social parasitic *Maculinea butterflies* (Lepidoptera: Lycaenidae). Org Divers Evol. 2015 Sep; 15(3):591-607.
- 33-Tabar MD, Altet L, Martínez V, Roura X. *Wolbachia*, filariae and *Leishmania* coinfection in dogs from a Mediterranean area. J Small Anim Pract. 2013 Apr; 54(4):174-8.
- 34-Khanmohammadi M, Falak R, Meamar AR, Arshadi M, Akhlaghi L, Razmjou E. Molecular detection and phylogenetic analysis of endosymbiont *Wolbachia pipientis* (rickettsiales: anaplasmataceae) isolated from *Dirofilaria immitis* in northwest of Iran. J Arthropod-Borne Dis, 2019 Mar; 13(1):83-93.