مجلـــه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـــگاه علـــوم پزشـکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۳, شماره‌ی۱۰۰, آذر و دی ۱۳۹٤, صفحات ۱۰۵ تا ۱۱۵

آلودگی ریکتزیایی و بارتونلایی در کک انسان (*Pulex Irritans*)

حبیبه میرزاده[۱]، دکتر محمدباقر قوامی[۲]، دکتر حبیب ضیغمی[۳]، بهروز تقی‌لو[۴]، فهیمه پور راستگو[۱]

نویسنده‌ی مسوول: زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده‌ی پزشکی، گروه حشره شناسی پزشکی Ghavami@zums.ac.ir

دریافت: ۹۳/۱۲/۱۶ پذیرش: ۹۴/۴/۴

چکیده

زمینه و هدف: *کک انسان (Pulex irritans) یکی از مهم‌ترین انگل‌های خارجی انسان است که با گـزش وخونخـواری از انـسان و حیوانـات باعث بروز حساسیت جلدی و انتقال عوامل بیماری‌زای مختلف می‌شود. تدوین برنامه‌های کنترل این ناقل مستلزم درک نرخ آلـودگی بـه عوامـل بیماریزا در جمعیت‌های مختلف آن می‌باشد. بدین منظور آلودگی بارتونلایی و ریکتزیایی پولکس ایریتانس در مناطق مختلف استان زنجان مـورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *طی شهریور ۱۳۹۱ لغایت آبان ۱۳۹۳ نمونه‌های کک با استفاده از طعمه انسانی و آسپیراتور برقی از اماکن حیوانی شهرسـتان‌هـای خدابنده و ماهنشان جمع‌آوری شدند. پس از استخراج DNA پولکس ایریتانس، بخشی از ژن gltA (جهت شناسـایی ریکتزیاهـا) و ناحیـه ITS (برای شناساسایی بارتونلاها)، در حضور پرایمرهای اختصاصی به روش PCR تکثیر و تعدادی از محصولات پس از خالص‌سازی، تعیین تـوالی شدند.*

یافته‌ها: *در ایـن مطالعـه ۱۱۳۶ نمونـه کـک صـید شـد، کـه ۱۰۷۹ مـورد (۹۴/۹۸ درصـد) کـک انـسان، ۳۶ مـورد (۳/۱۶ درصـد) کـک سـگ (Ctenocephalides canis) و ۲۱ مورد (۱/۸۴ درصد) (Ctenocephalides felis) بود. از ۱۸۲ مورد کک انسان بررسی شده، ٤/٦ درصد نمونه‌ها آلودگی ریکتزیایی داشتند و باکتری باتونلا در آن‌ها دیده نشد.*

نتیجه‌گیری: *بالا بودن وفور نسبی پولکس ایریتانس و وجود آلودگی ریکتزیایی این کک در منـاطق موردبررسـی، ضـرورت تـدوین و بـازنگری برنامه‌های کنترل این ناقل را در منطقه می‌طلبد. هرچند که آلودگی بارتونلایی در نمونه‌های مورد مطالعه دیده نـشد، ولـی بررسـی‌هـای جـامع‌تـر می‌تواند این نکته را به طور دقیق مشخص کند.*

واژگان کلیدی: *کک انسان، ریکتزیا، بارتونلا، ژن gltA*

مقدمه

کک انـسان (*Pulex irritans*) یکـی از مهـم‌تـرین اکتـو پارازیت‌های انسان و سایر پستانداران است (۱). هر دو جنس نـر و مـاده‌ی ایـن گونـه بـا گـزش و خونخـواری از انـسان و حیوانات باعث بروز علایم آلرژیـک، حـساسیت جلـدی و درماتیـت مـی‌شـوند و بـا انتقـال عوامـل بیمـاری‌زای خطرناک همچـون عامـل بیمـاری طـاعون، *یرسـینیا* پـستیس

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد حشره شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۲- دکترای تخصصی حشره‌شناسی، دانشیار گروه حشره شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۳- دکترای تخصصی میکروب شناسی، استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
٤- کارشناسی ارشد حشره شناسی پزشکی، کارشناس مسوول مرکز بهداشت شهرستان زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

(*Yersinia pestis*) (۲)، عامل بیماری تب نقطه‌ای منتقله از کک، *ریکتزیا تیفی* (*Rickettsia typhi*) (۳)، عامل بیماری تیفوس موشی، *ریکتزیا فلیس* (*Rickettsia felis*) (٤) وگونه‌های مختلف *بارتونلا* (*Bartonella*) عوامل بیماری‌های اندوکاردیت باکتریمی (۵)، مشکلات بهداشتی زیادی را به وجود می‌آورد. ریکتزیاها مهم‌ترین پاتوژن‌های منتقله از کک‌ها پس از عامل بیماری طاعون هستند. همچنین امروزه بیماری‌های ریکتزیایی به‌صورت نوپدید و بازپدید در بسیاری از نقاط جهان گزارش می‌شوند(٦و ٤)، ریکتزیاها باکتری‌های هوازی، غیرمتحرک و دارای شکل‌های مختلف هستند (۷). این گروه جزء انگل‌های اجباری داخل سلولی پستانداران و بندپایان محسوب می‌شوند و در بین بندپایان خونخوار (کنه‌ها، کک‌ها، شپش‌ها و مایت‌ها) و پستانداران در چرخش هستند. ریکتزیاها در میزبان بندپا معمولا با روش آلوده‌سازی تخمدان‌های جنس ماده، از نسلی به نسل دیگر منتقل می‌شوند (Transovarial Transmission) (۸). دوازده گونه از ریکتزیاها برای انسان بیماری‌زا هستند و از میان آن‌ها فقط *ریکتزیا تیفی* و *ریکتزیا فلیس* توسط گونه‌های مختلف کک منتقل می‌شوند (۹).

بارتونلاها نیز عامل چندین بیماری مختلف در انسان می‌باشند که از طریق گزش کک‌ها، پشه خاکی‌ها، شپش‌ها، مایت‌ها و کنه‌ها به انسان و سایر پستانداران میزبان منتقل می‌شوند. این باکتری‌ها باسیل و یا کوکوباسیل‌هایی گرم منفی، هوازی و درون سلولی اجباری هستند که بیش از ۲۲ گونه از آن‌ها توصیف شده است (۱۰) تاکنون، *بارتونلا وینسونی برخوفی* (*B. vinsoni berkhofi*)، *بارتونلا روکالیما* (*B.rochalima*)، *بارتونلا کوئینتانا* (*B. Quintana*) و *بارتونلا کلاریدگیه* (*B. cladigieh*) در کک انسان شناسایی شده است (۱۱و ۵). *بارتونلا وینسونی* زیر گونه‌ی برخوفی عامل بیماری اندوکاردیت، *بارتونلا روکالیما* عامل باکتریمی و تب و *بارتونلا کوئینتانا* نیز عامل بیماری اندوکاردیت باسیلی فورمیس و تب خندق است (۱۲). کک انسان دارای میزبان‌های متعددی است و به خوبی قادر است در بستر دام‌ها تکثیر یابد (۱۳). این کک در مناطق روستایی، شهرستان‌های خدابنده و ماهنشان استان زنجان به دلیل اشتغال مردم به دامداری و نگهداری دام در جوار اماکن مسکونی، قادر است آلودگی زیادی را به‌وجود آورد. بنابراین شناخت اپیدمیولوژی بیماری‌های منتقله از کک انسان، برای تدوین برنامه‌های کنترل و ارتقای سطح بهداشت مردم در این مناطق ضروری است. بدین منظور آلودگی بارتونلایی و ریکتزیایی *پولکس ایریتانس* در مناطق مختلف استان زنجان مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

طی شهریور ۱۳۹۱ الی آبان ۹۳ نمونه‌های مورد نظر به‌وسیله‌ی آسپیراتور برقی از اماکن داخلی حیوانی روستاهای ارزخوران، پری و شیخلر شهرستان ماهنشان در موقعیت جغرافیایی (36° 44′ 39.44″ N) و (47° 40′ 19.28″ E) و روستاهای کردلو و صالح آباد و قره محمد شهرستان خدابنده در موقعیت جغرافیایی (36° 2′ 7.05″ N) و (48° 10′ 47.42″ E) صید شدند. جهت نمونه‌گیری، افراد با لباس‌های کاملا محافظت شده و سفید وارد اماکن حیوانی می‌شدند و پس از مدت کوتاهی از آن مکان خارج و فرد دیگری به‌وسیله‌ی آسپیراتور برقی کک‌های جذب شده به لباس را سریعا جمع‌آوری می‌نمود. نمونه‌های کک به ویال‌های حاوی اتانول ۷۰ درصد منتقل شدند و بر روی آن‌ها اطلاعات مکان و زمان صید قید شد. نمونه‌های صید شده به آزمایشگاه حشره‌شناسی پزشکی دانشکده‌ی پزشکی زنجان منتقل و با مشاهده در زیر استریو میکروسکوپ با بزرگنمایی ۳۰X بررسی و بر اساس کلید تشخیص استاندارد، نمونه‌های کک انسان از سایر کک‌ها تفکیک شدند (۱۴)، و تا بررسی مولکولی در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرارگرفتند. DNA نمونه‌های کک انسان طبق روش بهینه شده‌ی

Hollely(۱۵) استخراج شد. و در آن‌ها نمونه‌ها با مقداری پودر شیشه در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفته و توسط هموژنایزر بافر لیز کننده‌ی محلول یکنواخت آن‌ها تهیه شد. جهت استخراج DNA باکتری‌ها نیز از کیت استخراج CinnaPure DNA (شرکت سیناژن) طبق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. از پرایمرهای پیشرو CS239F (TCTCATCCTATGGCTATTAT) و پیرو CS1069R (AGGGTCTTCGTGCATTTCT) برای تکثیر بخشی از ژن *gltA* در گونه‌های مختلف ریکتزیاها استفاده گردید که بر حسب گونه ی باکتری اندازه‌ی محصول PCR با این پرایمرها به ۸۳۴-۸۲۷ جفت باز می‌رسد. و پرایمرهای پیشرو Bart321s (AGATGATGATCCCAAGCCTTCTGG) و پیرو Bart983as (TGTTCTTACAACAATGATGATG) برای تکثیر بخشی از قطعه ITS که در بین ژن‌های RNA ریبوزومی 16S و ۲۳S قرار دارد استفاده شد که در آن اندازه‌ی محصول PCR بر حسب گونه بارتونلا متفاوت است (۱۶). مخلوط واکنش برای تکثیر ژن *gltA* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، از مخلوط کردن ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای پیشرو CS239F و پیرو CS1069R (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Mixred، 2mgcl1/5میلی مول ، آمپلیکون) و ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه شد. در کنترل منفی به جای DNA از آب مقطر استریل استفاده گردید. واکنش PCR، طبق برنامه‌ی دمایی دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه (یک سیکل)، دناتوراسیون ثانویه در دمای ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال در دمای ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ٦۰ ثانیه (چهل سیکل) و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه (یک سیکل) انجام شد. مخلوط واکنش برای تکثیر بخشی از قطعه ITS در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر نیز از ترکیب ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۳ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای پیشرو Bart321s و پیرو Bart983as (غلظت ۱۰پیکومول، پیشگام بیوتکنولوژی)، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Mixred، آمپلیکون) و ۱/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل. در کنترل منفی به جای DNA از آب مقطر استریل و کنترل مثبت از DNA سوش استاندارد (strain 87-66 ATCC 4973) *بارتونلا هنسله* که ازگروه میکروبیولوژی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شده بود استفاده گردید. واکنش PCR، طبق برنامه‌ی دمایی: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه (یک سیکل)، دناتوراسیون ثانویه در دمای ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، مرحله‌ی اتصال در دمای ٥٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ٦۰ ثانیه (چهل و پنج سیکل) و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه (یک سیکل) انجام یافت.

پس از انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مراز کیفیت و کمیت محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین شد. و محصولات به‌دست آمده ژن *gltA* و ناحیه‌ی بین ژنی *ITS* توسط شرکت سینا کلون خالص‌سازی و توالی نوکلئوتیدی آن‌ها توسط شرکت لایف ساینس کامبریج انگلستان (.lifesciences.sourcebioscience.comhttp://www) مشخص شد. توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد نظر، توسط نرم‌افزارهای Bioedit، Muscle و MEGA6 در گروه‌های مختلف مطالعاتی مرتب شد و میزان تفاوت گروه‌ها با مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی مشخص گردید. این توالی‌ها همچنین توسط نرم‌افزار Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) آنالیز شدند و میزان شباهت آن‌ها با توالی‌های ثبت شده در بانک‌های ژنی مشخص گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه ۱۱۳۶ نمونه کک صید شد، که ۱۰۷۹ عدد

(۹۴/۹۸ درصد) *پولکس ایریتانس*، ۳۶ عدد (۳/۱۶ درصد) *کتنوسفالیدس کنیس* و ۲۱ عدد (۱/۸۴ درصد) *کتنوسفالیدس فلیس* بود. تعداد ۱۸۲ نمونه کک انسان جهت ردیابی باکتری ریکتزیا بررسی شدند، که در ۹ نمونه، ژن *gltA* توسط پرایمرهای اختصاصی تکثیر یافت و محصول تقریبی ۸۵۰ جفت بازی دیده شد (شکل ۱).

شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن gltA در ژل آگارز ۱/۵ درصد، چاهک M: Ladder (۱۰۰ bp)، چاهک ۱۰: کنترل منفی (H_2O)، چاهک ۹ نمونه‌ی مثبت شده، سایر چاهک‌ها: نمونه‌های منفی

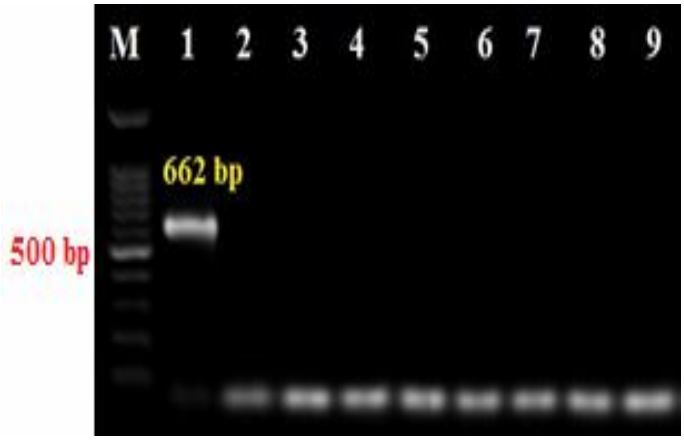
شکل ۲: مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن سیترات سنتز (gltA) ریکتزیا در نمونه‌های کک انسان آلوده در این مطالعه با ژن‌های ثبت شده در بانک‌های ژنی.

چهار نمونه از محصول‌های تکثیر یافته تعیین توالی شدند و در آن‌ها توالی ۷۱۱ جفت بازی مشخص شد (شکل ۲). مقایسه توالی قطعات تکثیر شده با توالی‌های ثبت شده ازاین ژن دربانک‌های ژنی نشان داد که توالی فوق ۹۶ درصد با *RDa420 Rickettsia sp.* (AF497584.1) و ۹۵ درصد با *Rickettsia sp. 60a3.* (EU430260.1) و ۸۵ درصد با *ریکتزیاسیبری* (KM288711.1) همخوانی دارد (شکل ۲). از ۹ مورد آلوده کک انسان به ریکتزیا، ٤ نمونه از شهرستان ماه نشان (روستای ارزخوران) و ۵ نمونه‌ی دیگر از شهرستان خدابنده (روستاهای کردلو و صالح آباد) جمع‌آوری شده بودند (جدول ۱).

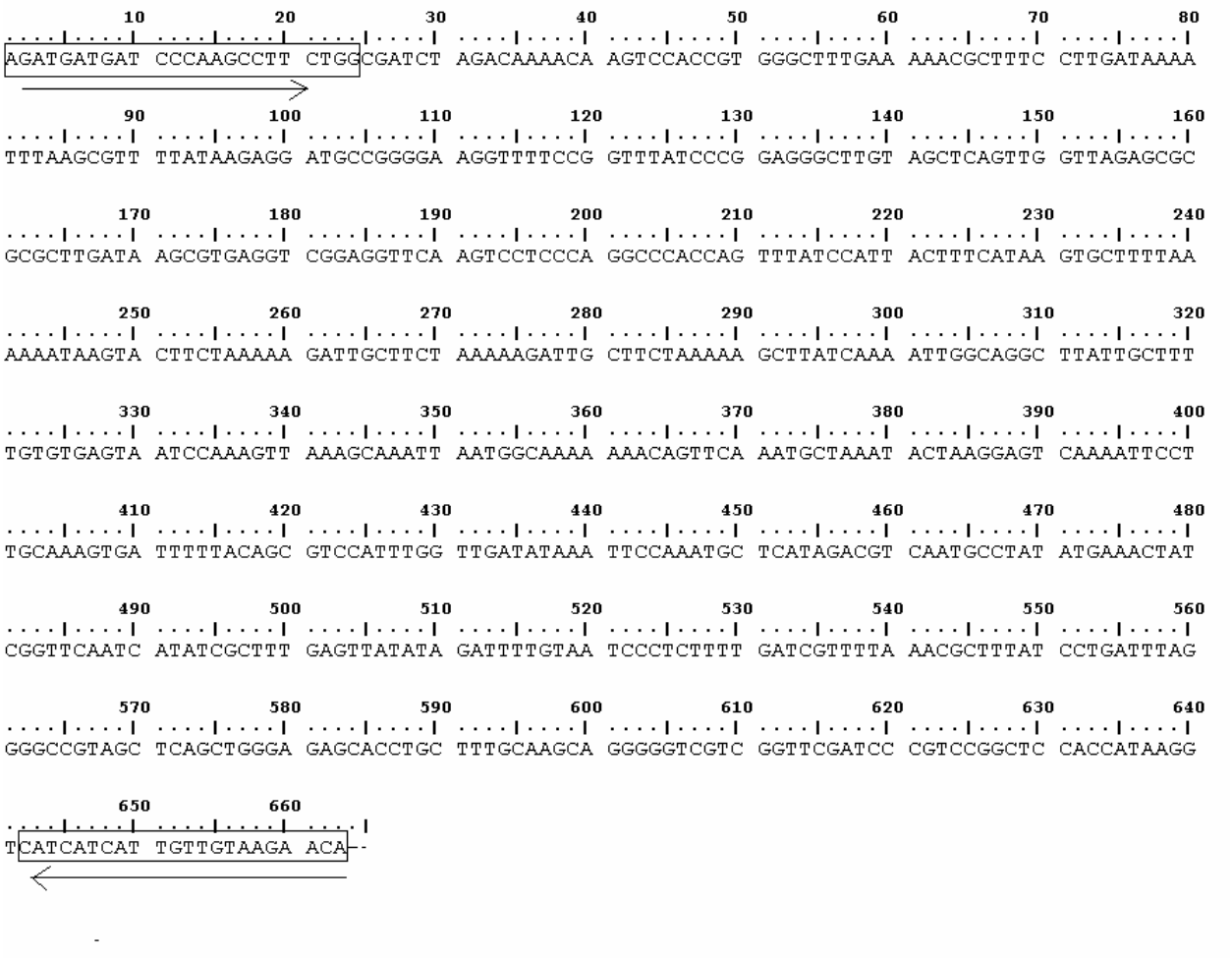
جدول ۱: فراوانی و درصد آلودگی به ریکتزیا در کک‌های انسان جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان زنجان

شهرستان	نام روستا	تعداد نمونه‌های بررسی شده	تعداد نمونه‌های آلوده	درصد آلودگی
ماهنشان	ارزخوران	۲۰	٤	۲۰
	پری و شیخ لر	٤٦	۰	۰
خدابنده	صالح آباد و قره محمد	٥٦	۲	۳/۲۷
	کردلو	٦۰	۳	۵
جمع		**۱۸۲**	**۹**	**٤/۹**

آلودگی بارتونلایی در ۱۹۰ نمونه *پولکس ایریتانس* جمع‌آوری شده از مناطق روستایی شهرستان خدابنده (۷۹ عدد) و مناطق روستایی شهرستان ماهنشان (۱۱۱ عدد)، بررسی شد، ولی در آن‌ها قطعه مورد انتظار تکثیر نگردید و همه‌ی نمونه‌ها همانند کنترل منفی بودند. در کنترل مثبت (DNA *بارتونلا هنسله*) قطعه مورد نظر تکثیر و محصول ٦٦۳ جفت بازی تشکیل شد (شکل ۳). جهت تایید باند به‌دست آمده در کنترل مثبت، این محصول مورد توالی‌یابی قرار گرفت (شکل ٤) و مشخص شد که ۹۹ درصد با توالی *ITS* در *بارتونلا هنسله* استرین BM1374163 همخوانی دارد.



شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR ناحیه ITS در ژل آگارز ۱/۵ درصد، چاهک M: Ladder (۱۰۰bp)، چاهک ۱: کنترل مثبت (نمونه حاوی DNA بارتونلا هنسله).



شکل ٤: توالی بازهای آلی ناحیه بین ژنی ITS در سوش استاندارد (strain 87-66 ATCC 4973) بارتونلا هنسله.

بحث

یافته‌های پژوهش حاضر، برای اولین بار در ایران آلودگی نمونه‌های کک انسان به ریکتزیا را بیان می‌کند. توالی ژن *gltA* یافت شده در نمونه‌های کک‌های آلوده، ۹۶ درصد با ریکتزیا *RDa420*(AF497584.1)جداشده از کنه‌ی درماستور در تایلند (۱۷) و ۹۵ درصد با ریکتزیای جداشده از کنه‌ها در مناطق مختلف (۱۸)، همخوانی دارد. ساکال و همکاران در کنگو با استفاده از مارکر *gltA* موفق به شناسایی ریکتزیا *فلیس* در *پولکس ایریتانس* شدند (۱۱). هورنوک و همکاران در مجارستان نیز با به کارگیری همین مارکر، در ۱۰ درصد نمونه‌های *پولکس ایریتانس* بررسی شده، آلودگی به ریکتزیا *فلیس* را گزارش کردند (۱۹). در بین ریکتزیاهای همزیست با کک‌ها، ریکتزیا *تیفی* و ریکتزیا *فلیس* مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای ریکتزیایی هستند که در چند سال اخیر به‌صورت بیماری بازپدید و نوپدید در مناطق مختلف دنیا ظاهر شده‌اند (۲۱و ۲۰). هرناندز و همکاران در آمریکا با استفاده از سه مارکر مولکولی *ompB*،*gltA* و 17kD، میزان شیوع ریکتزیا *فلیس* در *پولکس ایریتانس* را ۱۰ درصد، درکتنوسفالیدس *فلیس* ۵/۳ درصد و در *کتنوسفالیدس کنیس* ۹/۲ درصد گزارش کرد (۲۲). با این

وجود در تعدادی از مطالعات که در کشورهای آلمان (۲۳)، فرانسه (۲٤)، اسپانیا (۲۵)، تانزانیا، کنگو (۲٦)، پرو (۲۷) و تایلند (۲۸)، برای شناسایی گونه‌های مختلف ریکتزیا در *پولکس ایریتانس* انجام شده بود آلودگی ریکتزیایی در این کک یافت نشد.

در بررسی کک‌ها به‌عوامل عوامل بیماری‌زای ریکتزیایی، بیشتر مطالعات بر روی کک گربه انجام یافته است و مطالعات صورت گرفته بر روی کک انسان محدود می‌باشد. این بررسی‌ها با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی چندین مارکر ژنی، میزان شیوع ریکتزیا فلیس در کک‌های گربه جمع‌آوری شده از کشور آمریکا را، ۵/۳ درصد (۲۲)، مجارستان ۷/۱ درصد (۱۹)، آلمان ۹ درصد (۲۳)، کانادا ۱۸ (۲۹)، استرالیا ۱۹/۸ درصد(۳۰)، پاناما ۳۵ درصد (۳۱) و اسپانیا ٥٤/۱۷ درصد (۲۵)گزارش کردند. همچنین با به‌کارگیری پرایمرهای چندین مارکر ژنی، آلودگی به *ریکتزیا تیفی* در گونه‌های مختلف کک ردیابی شده است و میزان آلودگی *ریکتزیا تیفی* در کک *گزنوپسیلا کئوپیس* در کشور بنین ۱ درصد، در *گزنوپسیلا برازیلنسیس* تانزانیا ۳٤/۷ درصد (۲٦) و در *لپتوپسیلا سگنیس* پرتقال ۲۳ درصد گزارش گردید (۳۲). یکی از محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم استفاده همزمان از پرایمرهای اختصاصی چندین مارکر مولکولی برای تعیین هویت ریکتزیا و بیان آلودگی آن‌ها به *ریکتزیا تیفی* و *ریکتزیا فلیس* است. انتظار می‌رود، محققین بعدی با به کارگیری این پرایمرها و تکنیک Real-time PCR، ماهیت و میزان شیوع هر کدام از ریکتزیاها را در کک‌های آلوده مشخص کنند.

در مطالعه‌ی حاضر همانند بررسی‌های انجام‌یافته در کشورهای تانزانیا، کنگو و تایلند آلودگی بارتونلایی در *پولکس ایریتانس* یافت نشد (۲۸و ۲٦). از آنجا که در منطقه مورد مطالعه آلودگی ریکتزیایی در نمونه‌های کک محرز گشته، ممکن است این باکتری با رقابت در انتخاب میزبان، مانع ایجاد آلودگی گونه‌های دیگر از جمله باکتری بارتونلا شود. از طرف دیگر در مطالعات گذشته، اکثر نمونه‌های آلوده به بارتونلا از میزبانان گوشتخوار جداشده‌اند (۳٦-۳۳). در حالی که در منطقه مورد مطالعه گوشتخواران (گربه و سگ) که میزبان مناسبی برای گونه‌های بیماری‌زای بارتونلا (*بارتونلا کلاریدگیه، بارتونلا روکالیما، بارتونلا وینسونی* و *بارتونلا کوئینتا*) محسوب می‌شوند (۳۷)، وفور نسبی کمی در مقایسه با نشخوارکنندگان (گاو وگوسفند) داشتند و میزبان غالب *پولکس ایریتانس* در این مناطق گاو و گوسفند می‌باشد. بدین‌ترتیب نبود آلودگی بارتونلایی در نمونه‌های *این گونه* ممکن است، ناشی از وفور بسیار کم مخازن طبیعی باکتری بارتونلا، شیوع بسیار ناچیز این باکتری در کک‌های مورد بررسی، دخالت گونه‌های همزیست ریکتزیا در آلوده شدن کک‌ها به بارتونلا و یا ناکافی بودن حجم نمونه در بررسی حاضر باشد. بنابراین آزمون فرضیات فوق در تحقیقات بعدی می‌تواند علت اصلی عدم وجود گونه‌های مختلف بارتونلا در کک انسان را مشخص نماید.

نتیجه گیری

وفور بالای کک انسان در مناطق مورد مطالعه و یافتن آلودگی ریکتزیایی در آن‌ها، زنگ هشداری است به مسوولین بهداشتی و پژوهشی که توجه خاصی بر مدیریت کنترل این اکتوپارازیت، تدوین برنامه‌های پایش آلودگی ریکتزیایی و بارتونلایی در جمعیت جوندگان و سایر مخازن حیوانی و کک‌های آن‌ها داشته باشند همچنین پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات بعدی، با استفاده از چندین مارکر ژنی و تکنیک Real-time PCR ماهیت هر کدام از گونه‌های ریکتزیا و بارتونلا در کک‌ها و مخازن حیوانی آن‌ها مشخص شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پروژه پایان‌نامه دانشجویی

دوره‌ی کارشناسی ارشد می‌باشد. مولفین این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان در اجرای پژوهش و اعلام می‌نمایند. نویسندگان همچنین از همکاری و مشاوره بی‌دریغ آقای دکتر پیازک در جمع‌آوری و تشخیص نمونه‌ها و از اساتید دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران جناب آقای دکتر زهرایی صالحی، دکتر شایان و مهندس اشرافی که با که در اختیار گذاشتن سویه‌ی استاندارد *بارتونلا هنسله*، کمال همکاری را داشتند، تشکر می‌کنند.

References

1- McElroy KM, Blagburn BL, Breitschwerdt EB, Mead PS, McQuiston JH. Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. *Trends Parasitol*. 2010; 26: 197-204.

2- Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, et al. Plague: past, present, and future. *PLoS Medicine*. 2008; 5: 9-13

3- Raoult D, La Scola B, Enea M, et al. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerg Infect Dis*. 2001; 7: 73.

4- Reif KE, Macaluso KR. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *J Med Entomol*. 2009; 46: 723-36.

5- Tsai YL, Chang CC, Chuang ST, Chomel BB. Bartonella speciesand their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2011; 34: 299-314.

6- Perez-Osorio CE, Zavala-Velazquez JE, Leon JJA, Zavala-Castro JE. *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 1019.

7- Jawetz, Melnick, Adelberg. Medical Microbiology. 25th Edition. USA: Mx Graw Hill; 2010.

8- Yu X-J, Walker DH. The order rickettsiales. In: Dworkin M eds The Prokaryotes: Vol 5. Springer-Verlag . New York. 2006: 493-528.

9- Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4: 179.

10- Guptill L, Wu CC, HogenEsch H, et al. Prevalence, risk factors, and genetic diversity of *Bartonella henselae* infections in pet cats in four regions of the United States. *J Clin MicrobiolI*. 2004; 42: 652-9.

11- Sackal C, Laudisoit A, Kosoy M, et al. *Bartonella spp*. and *Rickettsia felis* in fleas, democratic republic of congo. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 1972.

12- Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. Fleas and flea-borne diseases .*Int J Infect Dis*. 2010; 14: 667-676.

13- Christodoulopoulos G, Theodoropoulos G, Kominakis A, Theis J. Biological, seasonal and environmental factors associated with *Pulex*

irritans infestation of dairy goats in Greece. *Vet Rec*. 2006; 137: 137-43.

14- Pratt H. Fleas: pictorial key to some common species in the United States. In CDC pictorial keys, arthropods, reptiles, birds and mammals of public health significance US Department of Health Education and Welfare. 1992: 38-40.

15- Holleley CE. Economical high-throughput DNA extraction procedure in 96-well format for *Drosophila* tissue. *Dros Inf Serv*. 2007; 90: 137-8.

16- Maggi RG, Breitschwerdt EB. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of Bartonella species. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 1171-6.

17- Parola P, Cornet JP, Sanogo YOe, et al. Detection of *Ehrlichia spp*., *Anaplasma spp*., *Rickettsia spp*., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 1600-8.

18- Cooper A, Stephens J, Ketheesan N, Govan B. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in wildlife and ticks in northern Queensland, Australia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2013; 13: 12-16.

19- Hornok Sn, Meli ML, Perreten A, et al. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. *Vet Microbiol*. 2010; 140: 98-104.

20- Boostrom A, Beier MS, Macaluso JA, et al. Geographic association of Rickettsia felis-infectedopossums with human murine typhus, Texas. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8: 549-54.

21- Hernandez-Cabrera M, Angel-Moreno A, Santana E, et al. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10: 740-3.

22- Ramirez-Hernandez A, Montoya V, Martinez A, et al. Molecular detection of *Rickettsia felis* indifferent flea species from Caldas, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2013; 89: 453-9.

23- Gilles J, Just FT, Silaghi C, et al. *Rickettsia* felis in fleas, France. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 684.

24- Gilles J, Just FT, Silaghi C, et al. *Rickettsia feli*s in fleas, Germany. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 1294.

25- Marquez F, Muniain M, Rodriguez-Liebana J, Del Toro M, Bernabeu-Wittel M, Pachon A. Incidence and distribution pattern of *Rickettsia felis* in peridomestic fleas from Andalusia, Southeast Spain. *Annals NYAcademy of Science.* 2006; 1078: 344-46.

26- Leulmi H, Socolovschi C, Laudisoit A, et al. Detection of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, *Bartonella*Species and *Yersinia pestis* in Fleas (Siphonaptera) from Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: 3152.

27- Blair PJ, Jiang J, Schoeler GB, et al. Characterization of spottedfever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 4961-7.

28- Assarasakorn S, Veir JK, Hawley JR, et al. Prevalence of Bartonella species, *hemoplasmas*, and *Rickettsia felis* DNA in blood and fleas of cats

in Bangkok, Thailand. Res Vet Sci. 2012; 93: 1213-6.

29- Kamrani A, Parreira VR, Greenwood J, Prescott JF. The prevalence of *Bartonella*, *hemoplasma*, and *Rickettsia felis* infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario. *Can J Vet Res*. 2008; 72: 411.

30- Barrs VR, Beatty JA, Wilson BJ, et al. Prevalence of Bartonella species, *Rickettsia felis*, *haemoplasmas* and the *Ehrlichia* group in the blood of cats and fleas in eastern Australia. *Aust Vet J*. 2010; 88: 160-165.

31- Bermudez CSE, Zaldivar AY, Spolidorio MG, et al. Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in ElValle de Anton, Cocle, Panama. *Vet Parasitol*. 2011; 177: 134-138.

32- De Sousa R, Edouard-Fournier P, Santos-Silva M, Amaro F, Bacellar F, Raoult D. Molecular detection of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi* and two genotypes closely related to *Bartonella elizabethae*. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75: 727-31.

33- Gabriel MW, Henn J, Foley JE, et al. Zoonotic Bartonella species in fleas collected on gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2009; 9: 597-602.

34- Perez-Martinez L, Venzal JM, Gonzalez-Acuna D, Portillo A, Blanco JR, Oteo JA. *Bartonella rochalimae* and other *Bartonella spp*. in fleas, Chile. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15: 1150.

35- Marquez FJ, Millan J, Rodriguez-Liebana JJ, Garcia-Egea I, Muniain MA. Detection and identification of Bartonella sp. in fleas from carnivorous mammals in Andalusia, Spain. *Med* Vet Entomol. 2009; 23: 393-8.

36- Sreter-Lancz Z, Tornyai K, Krisztian T, Szell Z, Sreter T, Marialigeti K. Bartonella infections in fleas (Siphonaptera: Pulicidae) and lack of bartonellae in ticks (Acari: Ixodidae) from Hungary. *Folia Parasitol*. 2006; 53: 313-6.

37- Chomel BB, Boulouis H-J, Maruyama S, Breitschwerdt EB. *Bartonella spp*. in pets and effect on human health. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 389-394.

Bartonella and Rickettsial Infections in Human Flea(*Pulex Irritans*)

Mirzadeh H[1], Ghavami MB[1], Zeyghami H[2], Taghiloo B[3], Pour Rastgoo F[1]

[1]Dept .of Medical Entomology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

[2]Dept. of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

[3]Zanjan Health Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Ghavami MB, Dept .of Medical Entomology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

***E-mail*:** Ghavami@zums.ac.ir

Received: 7 Mar 2015 **Accepted:** 25 Jun 2015

Background and Objective: Human flea *(Pulex irritans)* is one of the most important human ectoparasites that transmits various pathogens and causes skin irritation by biting humans and animals. Planning control measures against this vector in various regions requires the knowledge of the pathogens within the vector. Thus, this study was carried out to identify *Bartonella* and *Rickettsia* infection of *P. irritans* in Zanjan province.

Materials and Methods: Flea samples were collected via human baits from animal farms in Khodabande and Mahneshan districts from September 2013 to October 2014. DNA was extracted from human fleas, and a part of *gltA* gene for identification of *Rickettsia*, and ITS region for identification of *Bartonella* were amplified by specific primers. A number of PCR products were sequenced after purification.

Results: Out of 1136 collected flea samples 1079 (94.98%) were *P. irritas*, 36 (3.16%) *C. canis* and 21 (1.84%) were *C. felis*. 4.9 % of human flea samples had *Reckettsia* infection, while no *Bartonella* infection was observed.

Conclusion: High frequency and rickettsial infection of *P. irritans* in the studied areas need more attention of administrators and taking into account control measures against this vector. Although *Bartonella* infection was not observed in our samples, more comprehensive studies are required to verify this viewpoint.

Key words: Pulex irritans, Rickettsia,Bartonella, gltA gene