



مقاله پژوهشی

بیماری های قابل انتقال بین انسان و حیوان

تشخیص مولکولی و غربالگری عفونت های ولبکیا در ساس های گرمسیری جنس سیمکس همیپتروس (همیپترا: سیمیسیده) در شهر مشهد، ایران

مهدی باباگلزاده^۱، نادیا طایفی نصرآبادی^{۱*}، الهام مقدس^۲، علی مشاورنیا^۳

۱. دپارتمان انگل شناسی دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

۲. دپارتمان انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۳. دپارتمان پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.



*نویسنده مسئول: s.jstbiology@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹

چکیده

باکتری های ولبکیا که در بسیاری از حشرات از جمله ساس ها شناسایی شده اند، باکتری های درون سلولی هستند و به صورت عمودی قابل انتقال هستند. این باکتری ها نقش بسیار مهمی در پاتوژن بیماری های انگلی از جمله فیلاریازیس دارند. با وجود انجام چندین مطالعه بر روی حضور باکتری ولبکیا در ساس های سیمکس لکتولاریس، تاکنون مطالعه چاپ شده ای در این زمینه در میان جمعیت ساس های گرمسیری در ایران گزارش نشده است. هدف مطالعه حاضر تشخیص مولکولی و غربالگری عفونت های ولبکیا در ساس های گرمسیری جنس سیمکس همیپتروس (همیپترا: سیمیسیده) در شهر مشهد بود. تعداد ۱۰۰ عدد ساس مناطق گرمسیری از ۴ منطقه مختلف شهر مشهد شامل مناطق ۲، ۴، ۸ و ۱۱، جمع آوری شدند. محل های نمونه برداری شامل آپارتمان های قدیمی و خوابگاه های کارگران بود. روش مولکولی شناسایی باکتری ولبکیا بر اساس مارکر پروتین سطحی ولبکیا و مقایسه با سایر توالی های ثبت شده ولبکیا در بانک ژنی انجام شد. تعداد ۱۳ عدد ساس سیمکس همیپتروس (۱۳ درصد) از ۲ کلونی مختلف مناطق ۴ و ۸ از لحاظ آلودگی به ولبکیا مثبت گزارش شدند. نتایج تعیین توالی نشان داد که توالی ژن های تکثیر یافته در این مطالعه، به صورت ۱۰۰ درصد شبیه به هم و همچنین توالی های ثبت شده در بانک ژنی با شماره AB475131 از استرالیا و DQ842459 از آمریکا بودند. یک توالی به عنوان نماینده از طرف ۱۳ توالی بدست آمده در بانک ژنی با شماره ثبت ژنی PP501141 ثبت شد. مطالعه حاضر اولین مطالعه غربالگری از این نوع در خراسان رضوی بود. مطالعه حاضر به ما اجازه داد وضعیت آلودگی ساس های گرمسیری به باکتری ولبکیا را در مناطق مختلف شهر مشهد را بررسی کرده و با نتایج سایر مطالعات مشابه مقایسه کنیم.

کلمات کلیدی: ولبکیا، ساس تختخواب، سیمکس همیپتروس، خراسان رضوی



مقدمه

ظهور ساس تخته‌خواب در ساختمان‌ها و مناطق مسکونی در سراسر جهان مشکلات فراوانی را به وجود آورده است. دو گونه رایج از این انگل های خون‌خوار عبارتند از ساس تخته‌خواب معمولی (سیمکس لکتولاریس) که به‌طور معمول در مناطق معتدل زندگی می‌کنند و ساس تخته‌خواب گرمسیری (سیمکس همیپتروس) که در مناطق گرمسیری یافت می‌شوند (۱). این حشرات اعضای خانواده همیپترا هستند و تنها از خون انسان، پرندگان و خفاش‌ها تغذیه می‌کنند (۲). گرچه نیش این موجودات بسیار ریز ممکن است تحریک پوستی را ایجاد کنند، اما تا کنون نقش آنها در انتقال پاتوژن‌ها اثبات نشده است (۳). بلو و همکاران گزارش کرده‌اند که احتمالاً این موجودات قادر به انتقال مکانیکی ویروس هپاتیت ب می‌باشند (۴). اخیراً سالازار و همکاران همچنین لولمی و همکاران نقش توانایی ناقل بودن سیمکس لکتولاریس برای تربیانوزوم کروزی و بارتونلا کوپینتانا در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کردند. همچنین در مطالعه ای دیگر توسط سائز و همکاران، عفونت ساس های تخته‌خواب به بورخولدریا مولتی و رانس گزارش شد (۵). انتشار ساس های تخته‌خواب معمولاً توسط مسافری بین المللی، مکان های عمومی و حتی مکان های مسکونی اتفاق می افتد. با وجود تمام واقعیت های گفته شده بالا، هیچگونه گزارش موردی مستدلی که نشان دهد ساس های تخته‌خواب قادر به انتقال پاتوژن‌ها به انسان باشند وجود ندارد. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که باکتری ولبکیا به تناوب از حشرات مختلف جدا شده اند (۶). این ارگانیزم یک باکتری همزیست درون سلولی است که میتواند به صورت عمودی شبیه به باکتری های ریکتزایی انتقال یابد. این باکتری ها به صورت گسترده باعث آلودگی نماتود ها و حشرات میشوند. ولبکیا قادر به تاثیرات مخرب بر روی سیستم تولید مثلی میزبان خود می باشند. با توجه به این توانایی ها، باکتری ولبکیا به عنوان کاندیدی جهت کنترل انتشار بیماری های ویروسی و انگل های پاتوژن قابل انتقال با حشرات از قبیل تب دانگ و مالاریا مطرح هستند (۷). جداسازی و شناسایی باکتری های ولبکیا از طیف گسترده ای از حشرات نشان می دهد که این میزبان ها با سویه های مختلفی از ولبکیا آلوده می شوند. به عنوان مثال در مطالعه گذشته که توسط چویی و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد، نشان داده شد که سه گونه مختلف سوسک با سویه های مختلف این باکتری آلوده شده اند (۸). جستجو و غربالگری ولبکیا به صورت عمده در ساس های سیمکس لکتولاریس انجام شده است (۹)، در حالیکه وجود این باکتری در ساس های سیمکس همیپتروس نیز امکان پذیر است. با وجود دانستن انتشار عفونت ولبکیا در میان میزبانان بندپای مختلف، حضور ولبکیا در جمعیت های ساس های تخته‌خواب جدا شده از فیلد به اندازه کافی در ایران مطالعه نشده است. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی آلودگی ساس های سیمکس همیپتروس های جدا شده از شهرستان مشهد به باکتری ولبکیا با کمک تکنیک های مولکولی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع آوری ساس ها

نمونه ساس های تخته‌خواب گرمسیری (سیمکس همیپتروس) به صورت تصادفی از مناطق مختلف شهر مشهد بین سال های ۱۳۹۶ تا ۱۴۰۲ جمع آوری شدند. محل های نمونه برداری شامل مناطق مختلف چهار گانه ۲، ۱۱، ۸ و ۴ بود که از چهار نقطه جغرافیایی شهر مشهد بود. نمونه گیری از آپارتمان های قدیمی و خوابگاه های کارگران انتخاب شد. نمونه ها نامگذاری شدند و در ادامه برای بررسی های مولکولی در اتانل ۹۶ درجه قرار داده شدند.



بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان

شناسایی مورفولوژیکی ساس‌های جمع‌آوری شده

به منظور شناسایی مورفولوژیکی ساس‌های جمع‌آوری شده، نمونه‌های ساس در زیر استریو میکروسکپ مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی ساس‌ها بر اساس شکل تخم مرغی و پهن شدن از سطح پشتی شکمی قابل تشخیص است. در مطالعه حاضر از کلیدهای تشخیصی معتبر برای تشخیص گونه‌های ساس‌ها استفاده شد (۱۰-۱۲).

استخراج ماده ژنومیک

استخراج ماده ژنومیک باکتری از ساس‌های سیمکس همیپتروس با کمک کیت استخراج ژنومیک کیا امپ (کیاژن، هیلدن، آلمان) بر اساس پروتوکول کیت انجام شد. به صورت خلاصه، ساس‌های جمع‌آوری شده به قطعات ریزی با استفاده از اسکالپل تبدیل شدند و به یک اپندورف استریل انتقال داده شدند. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز اضافه شد که نمونه هموژن شوند. در ادامه میزان ۲۰ میکرولیتر پروتیناز کا به ترکیب اضافه شد و سریعاً مخلوط شد و تا زمان حل شدن کامل نمونه در انکوباتور قرار داده شد. بقیه مراحل مطابق پروتوکول کیت انجام شد. ماده ژنومیک استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه قرار داده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در مطالعه حاضر از مارکر مولکولی ولباکیا، ژن مرتبط با پروتئین سطحی ولباکیا (WSP) به منظور بررسی آلودگی به ولباکیا در ساس‌ها استفاده شد. به منظور تکثیر ژن‌های مورد بررسی با استفاده از تکنیک تکثیر پلیمراز (PCR)، ماده ژنومیک حاصل بافت از کل بدن ساس‌ها با دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، هامبورگ، آلمان) مورد غربالگری قرار گرفتند. برای این منظور پرایمر اختصاصی این ژن شامل پرایمرهای (۵'-TGG TCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3' (F: 81F و پرایمرهای (691R (R: 3'-AAAAATTAAACG CTACTCCA-5' به منظور تکثیر قطعه‌ای ۶۰۰ جفت بازی مورد استفاده قرار گرفت (۱۳). پروتوکول واکنش تکثیر زنجیره‌ای ژن پروتئین سطحی شامل آماده‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه؛ ۳۵ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه به منظور دناتوراسیون؛ ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه برای اتصال و دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه به منظور طویل شدن و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. همه پروتوکول‌های واکنش زنجیره‌ای در مخلوطی شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از ماستر میکس امپلیکن (پیشگام، ایران)، ۳ میکرولیتر از ماده ژنومیک استخراج شده و ۱ میکرولیتر از هر پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۵ میکرومولار به منظور غربالگری باکتری ولباکیا استفاده شد. از آب مقطر دو بار تقطیر به منظور رساندن مخلوط واکنش به حجم ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. واکنش تکثیر زنجیره‌ای کنترل مثبت و کنترل منفی نیز به صورت همزمان انجام شد. به منظور تهیه کنترل منفی از آب مقطر دوبار تقطیر استفاده شد. کنترل مثبت در مطالعه حاضر ماده ژنومیک استخراج شده از درزوفیلا ملانوغاستر آلوده به باکتری ولباکیا بود. قطعات تکثیر یافته در مطالعه حاضر بر روی ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد رنگ شده با گرین ویوور (پارس طوس، مشهد) انتقال و جدا سازی شدند و در ادامه تحت ترانسلومیناتور مشاهده شدند.

تعیین توالی کردن

ملاک اصلی در تعیین عفونت ولباکیا در ساس‌های سیمکس همیپتروس، بر اساس تکثیر موفقیت آمیز شاخصهای مولکولی بود. بعلاوه، نمونه‌هایی که توسط تکنیک مولکولی مثبت گزارش می‌شدند به صورت دوطرفه تعیین توالی شدند (تکاپوزیست، ایران). تمامی نمونه‌های مثبت از محصولات مولکولی از ژن WSP از روی ژل الکتروفورز با استفاده از کیت تخلیص از ژل تخلیص و



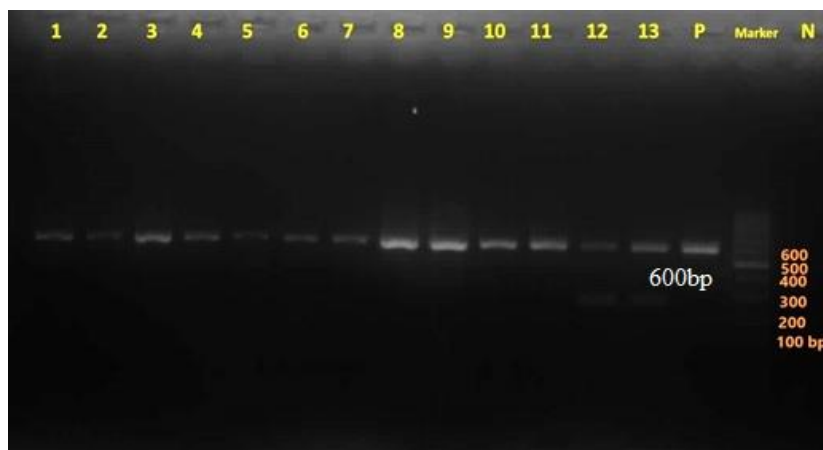
تعیین توالی شدند. تعیین توالی به کمک دستگاه تعیین توالی ABI 3730 انجام گردید. توالی های بدست آمده به منظور ارزیابی اشتباهات احتمالی در خوانش مورد ارزیابی قرار گرفتند. مشابهت یابی با توالی های ثبت شده موجود در بانک ژنی با استفاده از نرم افزار ارزیابی مشابهت یابی انجام گرفت (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

رسم درخت فیلوژنی

به منظور در رسم درخت فیلوژنی، توالی های بدست آمده از مطالعه حاضر با سایر توالی های ژن WSP باکتری ولباشیا که در حشرات مختلف شناسایی شده بودند، استفاده شد. آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس ژن WSP پس از هم ردیف سازی چندگانه توالیهای نوکلئوتیدی جدایه های ولباشیا با برخی از جدایه های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار MEGA X (14) و به روش Neighbor joining، با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap انجام شد.

نتایج

به طور کلی، تعداد ۱۰۰ عدد ساس تختخواب از کلون های مختلف جدا شده جدا شده از ۴ منطقه مختلف شهر مشهد شامل مناطق ۲، ۱۱، ۴ و ۸ جدا شد. ساس ها از لحاظ مورفولوژیکی بر اساس شکل ظاهری از قبیل تخت بودن از ناحیه پشتی-شکمی، رنگ قهوه ای، بدن تخم مرغی، اندازه ای در حدود ۴ تا ۵ میلی متر تشخیص داده شدند. گونه ساس نیز بر اساس ویژگی هایی از قبیل اندازه پروتوتوراکس تشخیص داده شدند. تمامی ساس های جدا شده، ساس سیمکس همیپتروس تشخیص داده شدند. ساس های مذکور به منظور شناسایی ژن مربوط به WSP باکتری ولباشیا مورد غربالگری قرار گرفتند (شکل ۱). بر اساس مطالعه حاضر، ۱۳ ساس سیمکس همیپتروس (۱۳ درصد) از ۲ کلونی مختلف مناطق ۴ و ۸ از لحاظ آلودگی به ولباشیا مثبت گزارش شدند (جدول ۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ برای ژن wsp ولباشیا در ساس های سیمکس همیپتروس
لاین ۱ تا ۱۳: نمونه های آلوده به ولباشیا؛ لاین P: کنترل مثبت؛ لاین Marker: مارکر ۱۰۰ bp؛ لاین N: کنترل منفی.



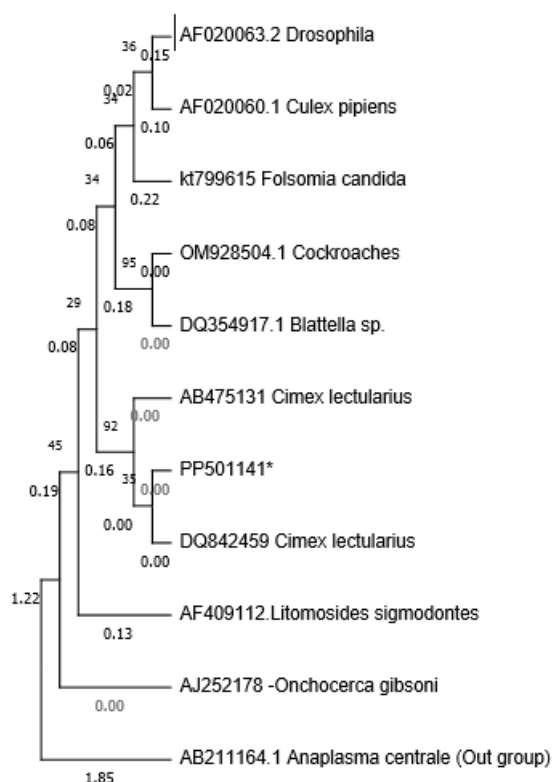
بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان

جدول ۱: جمعیت‌های مختلف ساس سیمکس همیپتروس مورد بررسی در مطالعه حاضر جهت آلودگی با ولبکیا

نمونه‌ها	۲	۱۱	۴	۸	مجموع
تعداد موارد مثبت ولبشیا	۰	۰	۸	۵	۱۳
تعداد نمونه‌ها	۱۴	۳۰	۲۵	۳۱	۱۰۰

نتایج تعیین توالی

قطعات تکثیر یافته با استفاده از پرایمرهای WSP تعیین توالی شدند و در ادامه با توالی ولبکیا ثبت شده در بانک ژنی مقایسه شدند (شکل ۲). نتایج تعیین توالی نشان داد که توالی ژن‌های تکثیر یافته در این مطالعه، به صورت ۱۰۰ درصد شبیه به هم و همچنین توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی با شماره AB475131 از استرالیا و DQ842459 از آمریکا بودند. یک توالی به عنوان نماینده از طرف ۱۳ توالی بدست آمده در بانک ژنی با شماره ثبت ژنی PP501141 ثبت شد.



شکل ۲: درخت فیلوژنی استخراج شده از توالی‌های ژن wsp باکتری ولبکیا جدا شده از ساس‌های سیمکس همیپتروس جدا شده از مطالعه حاضر (PP501141) و چند توالی نماینده از باکتری‌های ولبشیا از حشرات دیگر که از پایگاه داده Genbank به دست آمده‌اند. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از الگوریتم Neighbour Joining–Kimura ایجاد شده است. نوار مقیاس فاصله ژنتیکی را نشان می‌دهد.



نتایج فیلوژنی

درخت فیلوژنتیکی neighbour joining بین سویه های ولبکیا شناسایی شده در این مطالعه و سایر سویه های ولبکیا قابل دسترس نمایش داده شده اند در شکل ها ۲ نشان داده است. تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که سویه ولبکیای شناسایی شده از نمونه های ایرانی به طور نزدیک مرتبط با سویه های ولبکیا جدا شده از ساس از دیگر نقاط دنیا (DQ842459) و (AB475131) بود.

بحث

با ظهور PCR، استفاده از روش های مولکولی توانست روش های رایج باکتری شناسی سنتی را کنار بگذارد (۱۵). تاکنون مطالعات محدودی برای تشخیص عفونت های ولبکیا در نمونه های ساس تختخواب گرمسیری و همچنین سیمکس لکتولاریس با استفاده از تست های مولکولی انجام شده است (۱۹-۱۶). باکتری مذکور قادر به تاثیرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گوناگون بر روی میزبان خود می باشد. این باکتری قادر به ایجاد تغییرات در سیستم تولید مثلی میزبان خود است (۶ و ۲۰). این باکتری در میزبان های خود تغییراتی شامل ناسازگاری سیتوپلاسمی، القای بکرزایی، کشتن نرها و ماده سازی به وجود می آورند. مهمترین تغییر این باکتری در میزبان خود، ناسازگاری سیتوپلاسمی است (۲۰). این حالت زمانی اتفاق می افتد که یک حشره نر آلوده به این باکتری با یک حشره ماده غیر آلوده جفت گیری می کند. ناسازگاری سیتوپلاسمی ممکن است تک سویه (آلوده به یک استرین از ولبکیا)، دوسویه (آلوده به دو استرین از ولبکیا) و یا حتی با استرین های مختلفی از این باکتری آلوده باشد (۲۱). بنابراین دانستن میزان شیوع ولبکیا در حشرات بسیار ضروری است زیرا این باکتری دارای یک نقش مهم در کنترل جمعیت حشرات میزبان خود است (۲۲). بنابراین مطالعات گوناگونی به منظور بررسی شیوع ولبکیا در میزبانان بندپای مختلف از جمله ساس های تختخواب انجام شده است. در تحقیقات فعلی ما متوجه شدیم که تنها حدود سیزده درصد از نمونه های ساس سیمکس همپیتروس که از مناطق مختلف شهر مشهد جمع آوری شده بودند از نظر آلودگی به ولبکیا مثبت بودند. این یافته با نتایج مطالعات قبلی که میزان شیوع باکتری ولبکیا در ساس ها را در حدود ۴۰ درصد گزارش شده بود (۹)، به صورت معنی داری کمتر گزارش شد. مهد حسن و همکاران بر خلاف مطالعه حاضر هیچگونه آلودگی ولبکیا را در ساس های سیمکس جدا نکردند. تمامی ساس های جدا شده در مطالعه آنها ساس سیمکس لکتولاریس بود، در حالی که در مطالعه حاضر تنها ساس سیمکس همپیتروس جدا شد. شیوع آلودگی ولبکیا در اکثر حشرات از قبیل درزوفیلا ملانوغاستر (۲۳)، سوسک های بلاتلا و پیروپلاتا (۲۴) و حتی کولکس (۲۵) بررسی شده است. میزان آلودگی ولبکیا در این حشرات نیز از صفر درصد (۲۴) تا حدود ۹۰ درصد (۲۵) متغیر بود. به صورت کلی، دو گونه سیمکس همپیتروس و سیمکس لکتولاریس دو گونه انسان دوست با توانایی های مختلف در تحمل دمای اطراف هستند. از این رو ساس های گرمسیری تحمل بیشتری نسبت به دمای بالا دارند به خاطر اینکه معمولاً در کشورهای گرمسیری جدا می شوند (۲۶). از یک منظر مشابه، هاو و لی تحمل متفاوت ساس های سیمکس همپیتروس را به شرایط رطوبتی نسبت به ساس گرمسیری توضیح دادند (۲۷). این یافته ها نشان می دهد که شرایط محیطی اثر متفاوتی بر روی ساس ها دارد. به همین دلیل می توان نتیجه گرفت انتشار جغرافیایی ولبکیا در هر دو گونه متفاوت باشد. مطالعات مشابه دیگر در راستای تفاوت شیوع ولبکیا در گونه های یکسان حشرات در مناطق مختلف توسط احمد و همکاران بر روی پروانه ها انجام شد. آنها در مطالعه خود شیوع ولبکیا را در پروانه های جدا شده از ۳۶ کشور با عرض های مختلف



بیماری های قابل انتقال بین انسان و حیوان



بررسی کردند. آنها نتیجه گرفتند که آب و هوا و جغرافیا دو فاکتور مهم پیش بینی کننده شیوع ولبکیا در حشرات هستند (۲۸).

نتیجه گیری کلی و پیشنهادها

مطالعه حاضر اولین مطالعه اپیدمیولوژیک از این نوع در خراسان رضوی بود. مطالعه حاضر به ما اجازه داد حضور باکتری ولبکیا را در ساس های سیمکس همیپتروس را در جمعیت های مختلف از مناطق مختلف شهر مشهد را بررسی و با نتایج سایر مطالعات مشابه مقایسه کنیم. نتایج مطالعه نشان داد که در حدود ۱۳ درصد از ساس های همیپتروس جدا شده از شهر مشهد باکتری واباشیا حضور دارد. بر اساس نتایج حاصل از تعیین توالی از تکثیر قطعه ای از ژن WSP، همولوژی ۱۰۰ درصدی با سکانس این ژن در ولبکیای ثبت شده در ایران گزارش شد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج که هزینه این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه کرد پایان نامه های دانشجویان (پایان نامه دکتری) فراهم نموده اند، اعلام می دارند.

تعارض منافع

هیچ گونه تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آنها ارسال شده است.

فهرست منابع

- [1]. Tiotour, M., et al., Identification of Knockdown Resistance Mutations in the Cimex hemipterus (Hemiptera: Cimicidae) in Iran. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2022. 107(1): p. 204.
- [2]. Doggett, S.L. and C.-Y. Lee, Historical and Contemporary Control Options Against Bed Bugs, Cimex spp. Annual Review of Entomology, 2023. 68: p. 169-190.
- [3]. Zorrilla-Vaca, A., M.M. Silva-Medina, and K. Escandón-Vargas, Bedbugs, Cimex spp.: their current world resurgence and healthcare impact. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2015. 5(5): p. 342-352.
- [4]. Blow, J.A., et al., Stercorarial shedding and transtadial transmission of hepatitis B virus by common bed bugs (Hemiptera: Cimicidae). Journal of medical entomology, 2001. 38(5): p. 694-700.
- [5]. Saenz, V.L., et al., Survey of Bartonella spp. in US bed bugs detects Burkholderia multivorans but not Bartonella. PLoS One, 2013. 8(9): p. e73661.
- [6]. Landmann, F., The Wolbachia endosymbionts. Microbiology spectrum, 2019. 7(2): p. 7.2. 25.
- [7]. Manoj, R.R.S., et al., Wolbachia: endosymbiont of onchocercid nematodes and their vectors. Parasites & vectors, 2021. 14(1): p. 1-24.
- [8]. Hassan, N.H.M., et al., Molecular detection and screening of Wolbachia infections in tropical bed bugs Cimex hemipterus (Hemiptera: Cimicidae) from Peninsular Malaysia populations. Malaysian Journal of Microbiology, 2019. 15(2).
- [9]. Akhoundi, M., et al., Molecular characterization of Wolbachia infection in bed bugs (Cimex lectularius) collected from several localities in France. Parasite, 2016. 23.
- [10]. Akhoundi, M., et al., Bed bugs (Hemiptera, Cimicidae): overview of classification, evolution and dispersion. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020. 17(12): p. 4576.
- [11]. Akhoundi, M., et al., Morphological and molecular identification of Cimex hemipterus Fabricius, 1803 (Hemiptera: Cimicidae) and first report of C. Lectularius Linnaeus, 1758, in Madagascar. Journal of Medical Entomology, 2022. 59(3): p. 1081-1085.
- [12]. Walpole, D., External morphology of the legs of two species of bed bugs (Hemiptera: Cimicidae). 1987.



- [13]. Zhou, W., F. Rousset, and S. O'Neill, Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 1998. 265(1395): p. 509-515.
- [14]. Kumar, S., et al., MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular biology and evolution, 2018. 35(6): p. 1547.
- [15]. Wang, Z.-y., et al., Molecular detection and the phylogenetics of Wolbachia in Chinese spiders (Araneae). The Journal of Arachnology, 2010. 38(2): p. 237-241.
- [16]. Rasgon, J.L. and T.W. Scott, Phylogenetic characterization of Wolbachia symbionts infecting Cimex lectularius L. and Oeciacus vicarius Horvath (Hemiptera: Cimicidae). Journal of medical entomology, 2004. 41(6): p. 1175-1178.
- [17]. Sakamoto, J.M., J. Feinstein, and J.L. Rasgon, Wolbachia infections in the Cimicidae: museum specimens as an untapped resource for endosymbiont surveys. Applied and Environmental Microbiology, 2006. 72(5): p. 3161-3167.
- [18]. Fisher, M.L., et al., Growth kinetics of endosymbiont Wolbachia in the common bed bug, Cimex lectularius. Scientific reports, 2018. 8(1): p. 11444.
- [19]. Ndiaye, E.H.I., et al., Morphological, molecular and MALDI-TOF MS identification of bedbugs and associated Wolbachia species in rural Senegal. Journal of Medical Entomology, 2022. 59(3): p. 1019-1032.
- [20]. Fukatsu, T., et al., Microbial associates of blood-sucking arthropods and other animals: relevance to their physiology, ecology and evolution. Frontiers in Microbiology, 2023. 14.
- [21]. Turelli, M., A. Katznelson, and P.S. Ginsberg, Why Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility is so common. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2022. 119(47): p. e2211637119.
- [22]. Bourtzis, K., Wolbachia-based technologies for insect pest population control. Transgenesis and the management of vector-borne disease, 2008: p. 104-113.
- [23]. Pourali, P., et al., PCR screening of the Wolbachia in some arthropods and nematodes in Khuzestan province. Iranian Journal of Veterinary Research, 2009. 10(3): p. 216-222.
- [24]. Choubdar, N., et al., Wolbachia infection in native populations of Blattella germanica and Periplaneta americana. Plos one, 2023. 18(4): p. e0284704.
- [25]. Karami, M., et al., Wolbachia endobacteria in natural populations of Culex pipiens of Iran and its phylogenetic congruence. Journal of arthropod-borne diseases, 2016. 10(3): p. 347.
- [26]. Omori, N., Comparative studies on the ecology and physiology of common and tropical bed bugs, with special reference to the reactions to temperature and moisture. Taiwan Igakkai Zasshi= Journal of the Medical Association of Formosa, 1941. 40(3).
- [27]. How, Y.-F. and C.-Y. Lee, Effects of temperature and humidity on the survival and water loss of Cimex hemipterus (Hemiptera: Cimicidae). Journal of Medical Entomology, 2014. 47(6): p. 987-995.
- [28]. Ahmed, M.Z., et al., Wolbachia in butterflies and moths: geographic structure in infection frequency. Frontiers in Zoology, 2015. 12: p. 1-9





Research Article



Molecular characterization of *Wolbachia* infection in bedbugs (*Cimex hemipterus*) collected from Mashhad city, Iran

Mahdi Babagolzadeh¹, Nadia Taiefi Nasrabadi^{1*}, Elham Moghadas², Ali Moshaverinia³

1. Ph.D Department of Pathobiology, Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran.

2. Assistant Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

3. Ph.D Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.



*Corresponding author: s.jstbiology@yahoo.com

Received: 2024/03/9

Accepted: 2024/04/9

Abstract

Wolbachia bacteria, identified in many species of Arthropoda, are intracellular organisms transmitted vertically from one generation to the next. *Wolbachia* plays a significant role in the pathogenesis of filarial diseases. Despite numerous studies on the prevalence of *Wolbachia* in *Cimex lectularis* populations, there have been no published reports on its presence in tropical bed bug (*Cimex hemipterus*) populations in Iran. The present study aimed to investigate the molecular characterization of *Wolbachia* infection in *C. hemipterus* collected from Mashhad, Iran. Specimens were obtained from four different districts of Mashhad (regions 2, 4, 8, and 11), specifically from old apartment buildings and workers' dormitories. In total, 100 tropical bed bug specimens were collected. Molecular identification of *Wolbachia* was carried out by targeting the *Wolbachia* surface protein (wsp) gene and comparing the results with previously registered *Wolbachia* sequences in GenBank. According to the findings, 13 specimens (13%) from two distinct colonies in regions 4 and 8 tested positive for *Wolbachia* infection. Sequencing results revealed that the amplified genes were 100% identical to the sequences registered in GenBank under accession numbers AB475131 (Australia) and DQ842459 (USA). One representative sequence from the 13 positive samples was submitted to GenBank with accession number PP501141. This study represents the first epidemiological report on *Wolbachia* infection in *C. hemipterus* in Khorasan Razavi Province. It provides new insights into the molecular characteristics of *Wolbachia* in tropical bed bug populations in Mashhad and allows for comparison with similar studies conducted globally.

Keywords: *Wolbachia*, bedbugs, *Cimex hemipterus*

How to cite this article: Babagolzadeh M, Taiefi Nasrabadi N, Moghadas E, Moshaverinia A. Molecular characterization of *Wolbachia* infection in bedbugs (*Cimex hemipterus*) collected from Mashhad city, Iran. Journal of Zoonosis. 2023; 3 (3): 57-65.