DOI: 10.22055/IVJ.2022.325115.2436
DOR: 20.1001.1.17356873.1402.19.2.11.8

شناسایی مولکولی گونه‌های *بارتونلا* در سگ‌های شهرستان‌های همدان و کرمانشاه و ناقلین بندپای آن‌ها

زهرا شمشیری[۱]، علی گودرزتله‌جردی[۲*]، سیدمسعود ذوالحواریه[۳]، محمد کمال‌پور[۴] و علیرضا سازمند[۲]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران
[۲] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران
[۳] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران
[۴] استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۸ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰

چکیده

*بارتونلا*ها باکتری‌های بیماری‌زای کم‌تر شناخته شده‌ای هستند که طیف وسیعی از حیوانات اهلی، وحشی و همچنین انسان‌ها را آلوده می‌کنند. در حالی که این باکتری‌ها یک عامل بیماری‌زای مهم مشترک بین انسان و دام محسوب می‌شوند، اطلاعات محدودی در مورد میزان فراوانی و انواع گونه‌های آلوده کننده سگ‌ها در ایران وجود دارد. این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی گونه‌های مختلف *بارتونلا* در سگ‌ها و ناقل‌های بندپای آن‌ها در شهرستان‌های همدان و کرمانشاه انجام گرفت. DNA ژنومیک خون ۱۰۰ قلاده سگ شامل سگ‌های خانگی، خیابانی و پناهگاهی شهرستان‌های همدان (n =۴۵) و کرمانشاه (n =۵۵) و همچنین DNA ژنومیک ۲۵ کک *کتنوسفالیدس کنیس*، شش کک *پولکس ایریتانس* و ۱۲ کنه *ریپیسفالوس سنگوبینئوس* که از ۹ سگ آلوده جمع‌آوری شده بود استخراج شد. نمونه‌ها با استفاده از دو روش PCR معمولی مجزا جهت شناسایی ژن‌های ITS و *rpoB* اختصاصی جنس *بارتونلا*، بررسی شدند. در نهایت توالی نوکلئوتیدی نمونه‌های مثبت مورد آنالیز فیلوژنتیکی قرار گرفتند. از ۱۰۰ قلاده سگ بررسی شده تعداد ۱۴ قلاده سگ (۱۰ قلاده از همدان برابر ۲۲/۲ درصد و ۴ قلاده از کرمانشاه برابر ۷/۲ درصد) آلودگی به گونه‌های *بارتونلا* را نشان دادند. نتایج توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که آلودگی *به بارتونلا وینسونیای* تحت گونه *برخوفیای* و *کاندیدیاتوس بارتونلا* مروکسیای در سگ‌های این دو منطقه وجود دارد. همه سگ‌های آلوده در پناهگاه‌ها نگهداری می‌شدند. DNA *بارتونلا* در هیچ یک از نمونه‌های کک جمع‌آوری شده از روی سگ‌ها جداسازی نشد، اما یک کنه *ریپیسفالوس سنگوبینئوس* از یک سگ که فاقد آلودگی در خون خود بود واجد DNA *بارتونلا* تشخیص داده شد. فراوانی قابل توجه آلودگی به گونه‌های مختلف زئونوتیک *بارتونلا* در سگ‌های شهرستان کرمانشاه اهمیت این بیماری منتقله از ناقلین و همچنین اهمیت سگ‌های آلوده در انتشار عامل این بیماری در منطقه و متعاقباً انتقال آلودگی به انسان را مشخص می‌کند.

کلمات کلیدی: *بارتونلا*، زئونوز، سگ، بندپا، کرمانشاه، همدان، PCR

مقدمه

جنس *بارتونلا* با ۴۰ گونه و زیرگونه از باکتری‌های کوچک، گرم منفی، چندشکلی، خون‌دوست و سخت رشد هستند که طیف وسیعی از حیوانات اهلی، وحشی و همچنین انسان‌ها را آلوده می‌کنند (Greco et al, 2021). این باکتری‌ها اکثراً به وسیله بندپایان نظیر شپش‌ها، ککک‌ها و کنه‌ها و نیز از طریق خراش و گازگرفتگی توسط حیوانات

*نویسنده مسئول : علی گودرزتله‌جردی، استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران
E-mail: a.goudarz@basu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

آلوده منتقل می‌شوند (Chomel et al, 2006; Kaewmongkol et al, 2011).

اگر چه *بارتونلا هنسله* عامل ایجاد بیماری مشترک خراش گربه در انسان شناخته شده‌ترین گونه این جنس می‌باشد اما حداقل ۱۷ گونه/زیرگونه به عنوان پاتوژن حیوانات و انسان تأیید شده‌اند. تا کنون ارتباط هفت گونه/زیرگونه از *بارتونلا* شامل *بارتونلا هنسله*، *بارتونلا وینسونیای* تحت‌گونه *برخوفیای*، *بارتونلا کلاریژیه*، *بارتونلا کوئینتانا*، *بارتونلا کلره*، *بارتونلا روکالیمه* و *بارتونلا واشوئنسیس* با بیماری در سگ‌ها نشان داده شده است که تمامی آن‌ها پتانسیل بیماری‌زایی در انسان را دارند و نشانه‌هایی از جمله اندوکاردیت، میوکاردیت، تب، نورورتینیت و التهاب چشم را ایجاد می‌کنند (Alvarez-Fernandez et al, 2018).

اولین جداسازی *بارتونلا* از سگ‌ها، در سال ۱۹۹۳ از سگی مبتلا به اندوکاردیت بود و از آن زمان، گونه زئونوتیک *بارتونلا وینسونیای* زیرگونه *برخوفیای* به عنوان عاملی مهم در اندوکاردیت سگ شناخته می‌شود (Breitschwerdt et al, 1995; Roux et al, 2000). البته *بارتونلا وینسونیای* تحت گونه *برخوفیای* از سگ‌های سالم که ممکن است ناقل طولانی مدت باکتری باشند نیز جدا شده است (Kordick and Breitschwerdt, 1998) بنابراین سگ‌ها به عنوان مخزن *بارتونلا وینسونیای* تحت گونه *برخوفیای* و احتمالاً *بارتونلا روکالیمه* و *کاندیداتوس بارتونلا* مریوکسیای شناخته شده‌اند (Samsami et al, 2020).

از میان پستانداران زیادی که به گونه‌های مختلف *بارتونلا* آلوده می‌شوند سگ‌ها و گربه‌ها از عمده‌ترین مخازن عفونت برای انسان مطرح می‌باشند. نقش گربه‌ها به عنوان مخزن آلودگی برای انسان به خوبی شناخته شده است (Oskoeizadeh et al, 2008; Oskouizadeh et al, 2010) ولی علی‌رغم آلودگی سگ‌ها با گونه‌های زئونوتیک *بارتونلا* اطلاعات زیادی درباره نقش سگ‌ها به عنوان مخزن گونه‌های *بارتونلا* در کشور وجود ندارد. لذا این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی گونه‌های مختلف *بارتونلا* در سگ‌ها و ناقل‌های بندپای آن‌ها در شهرستان‌های همدان و کرمانشاه انجام گرفت.

مواد و روش کار

اخذ نمونه‌های خون مورد آزمایش با مصوبه کد IR.UMSHA.REC.1398.124 کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان صورت گرفته است.

در بازه زمانی مهر ماه سال ۱۳۹۷ تا بهمن ماه سال ۱۳۹۸ از ورید سافن یا سفالیک ۱۰۰ قلاده سگ حدود ۱ تا ۱/۵ میلی‌لیتر خون در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA اخذ و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از ۱۰۰ قلاده سگ مورد مطالعه، ۴۵ قلاده در شهرستان همدان و ۵۵ قلاده در شهرستان کرمانشاه نمونه‌برداری شدند. بنا بر عدم در دسترس بودن اطلاعات واثق از میزان شیوع آلودگی به گونه‌های *بارتونلا* در سگ‌های مناطق ذکر شده از روش نمونه‌گیری غیرتصادفی از نوع در دسترس استفاده شد. هر دو شهرستان دارای آب و هوای سرد و کوهستانی هستند. تعداد ۹۷ قلاده از این سگ‌ها در پناهگاه‌ها نگهداری می‌شدند، دو قلاده حیوان خانگی و یک قلاده حیوان شهری بودند. سن سگ‌های مورد مطالعه که از طریق فرمول دندانی و میزان فرسایش (سائیدگی) دندان‌ها تخمین زده شد، (Hermanson and de Lahunta, 2020) بین ۶ ماه تا سن ۶ سال بود و در معاینات بالینی نشانه‌های خاصی مشاهده نشد. سگ‌ها از نظر وجود انگل خارجی نیز مورد جستجوی دقیق قرار گرفتند و در صورت وجود در الکل ۷۰ درصد به آزمایشگاه منتقل می‌شدند. شناسایی انگل‌های خارجی با استفاده از کلیدهای تشخیصی معتبر صورت گرفت (Taylor et al, 2015).

DNA ژنومیک از ۲۰۰ میکرولیتر خون کامل سگ‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA از خون FavorPrep

Genomic DNA Extraction Mini Kit تولید شرکت Favorgen تایوان (Favorgen, Pingtung, Taiwan) و از کک‌ها و کنه‌های آلوده‌کننده سگ‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت WizPrep gDNA Mini Kit تولید شرکت Wizbiosolutions کره جنوبی (Wizbiosolutions, Seongnam, South Korea) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. کیفیت DNAهای استحصال شده با انجام تکنیک ژل الکتروفورز و همچنین با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) مورد تأیید قرار گرفته و تا زمان انجام آزمون PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پرایمرهای مورد استفاده

برای بررسی حضور DNAی *بارتونلا* در نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از سگ‌ها از دو جفت پرایمر 1400F/2300R و 325s /1100as که به ترتیب بخش‌هایی از ژن‌های *RNA پلی‌مراز* (*rpoB*) و ناحیه بین ژنی 16s و 23s (ITS) را مورد هدف قرار می‌دهند استفاده شد (Diniz et al, 2007; Renestot et al, 2001). پرایمرها از شرکت Bioneer (Daejeon, Republic of Korea) خریداری شدند. مشخصات و جزئیات کامل پرایمرها جهت انجام PCR در Table 1 آورده شده است.

Table 1: Oligonucleotide primers and PCR programs used in the PCR assay

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Target gene	Amplicon size (bp)	Cycling condition
1400F 2300R	CGCATTGGCTTACTTCGTATG GTAGACTGATTAGAACGCTG	RNA polymerase (*rpoB*)	825	94 °C–5 min ; (× 35) 94 °C–30 sec, 53 °C–30 sec, 72 °C–1 min; 72 °C–7 min
325s 1100as	CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTYTG GCG GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCA	16S-23S internal transcribed spacer (ITS)	604	95° C–2 min; (× 55) 94 °C–15 sec, 66 °C–15 sec, 72 °C–15 sec; 72 °C–7 min

واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر که شامل ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس تجاری حاوی آنزیم تک‌پلی‌مراز (Taq DNA Polymerase 2X Mastermix, Ampliqon, Denmark)، ۳ میکرولیتر از DNA الگو و ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱ پیکومول (برای *rpoB*) یا ۱۵ پیکومول (برای ITS) انجام شد. جزئیات برنامه دمایی و زمانی واکنش‌ها در Table 1 آمده است. تکثیر قطعات ژنی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر SimpliAmp™ ساخت شرکت Thermo Fisher Scientific, Waltham, (MA, USA) انجام گرفت. در هر آزمایش از DNA *بارتونلا هنسله* سویه هیوستون ۱ (اهدایی از طرف پروفسور برونو شومل، دانشگاه Davis کالیفرنیا) به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

برای آنالیز محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۱۱۰ ولت ، به مدت یک ساعت و در بافر TAE 1X (Tris-acetate-EDTA) انجام گرفت. پس از انجام الکتروفورز و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ژل در دستگاه ترانس‌لومیناتور (Transilluminator, Vilber Lourmat, France) مشاهده و تصویربرداری شد.

تعداد ۲ نمونه محصول PCR (یک نمونه جدا شده از سگ‌های شهرستان همدان و یک نمونه جدا شده از سگ‌های شهرستان کرمانشاه) از مواردی که با پرایمری که قطعه ژنی ITS را هدف قرار می‌دهند مثبت شدند و در ژل الکتروفورز بهترین باند را نشان می‌دادند برای توالی‌یابی دوطرفه به شرکت زیست فناوری پیشگام (پیشگام بیوتک، تهران) ارسال شد. توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR پس از اصلاح با نرم افزار SnapGene نسخه ۵,۳ (GSL

Biotech, LLC,USA) و استفاده از BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) مورد ارزیابی قرار گرفتند. توالی قطعه ژنی مورد نظر در GenBank® ثبت گردید. در نهایت درختچه تبارزایی مربوطه به روش Maximum Likelihood و با استفاده از نرم افزار MEGA نسخه ۶ (Tamura et al, 2013) ترسیم شد.

از Chi-square test و Fisher's exact test برای آنالیز آماری نتایج استفاده شد و $P.\ \text{value} \leq 0.05$ به عنوان رابطه آماری معنی‌دار مورد توجه قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ (Armonk, NY: IBM Corp, USA) انجام گرفت.

نتایج

نتایج بررسی حضور *بارتونلا* در خون سگ‌ها با استفاده از PCR

از ۱۰۰ قلاده سگ مورد بررسی تعداد ۱۴ قلاده سگ (۱۴ درصد) آلودگی با گونه‌های *بارتونلا* را در حداقل یکی از لوکوس‌های ژنی نشان دادند. در بین این‌ها تعداد ۱۰ قلاده (معادل ۲۲/۲ درصد) مربوط به سگ‌های شهرستان همدان و تعداد ۴ قلاده (معادل ۷/۲ درصد) مربوط به سگ‌های شهرستان کرمانشاه بودند. Table 2 مشخصات سگ‌های آلوده به گونه‌های *بارتونلا* در این مطالعه را نشان می‌دهد.

Table 2: Demographic information of dogs of Hamedan and Kermanshah (n=100) infected with *Bartonella* species

Gender	Breed	Age (year)				Sampling site		Dog housing			Ectoparasite infestation	
		<1	1-3	3-5	>5	Hamedan	Kermanshah	Pet	Stray	Shelter	Flea	Tick
Male	Mixed		*			*				*		
Male	Mixed			*		*				*		
Male	Mixed		*			*				*		
Female	Mixed		*			*				*		
Male	Mixed	*				*				*		
Male	Rottweiler		*			*				*		
Male	German Shepherd		*			*				*	*	
Male	Mixed		*			*				*		
Female	Siberian Husky	*				*				*		
Female	Mixed		*			*				*		*
Male	Undetermined		*				*			*		
Female	Doberman Pinscher		*				*			*		
Female	Mixed		*				*			*		
Female	Siberian Husky				*		*			*		

با استفاده از پرایمرهایی که قطعه ژنی ITS را مورد هدف قرار می‌دهند از ۱۰۰ نمونه خون سگ تعداد ۱۱ نمونه (۳ نمونه از سگ‌های کرمانشاه و ۸ نمونه از سگ‌های همدان) آلوده به گونه‌های *بارتونلا* تشخیص داده شده و این نمونه‌ها در الکتروفورز محصول PCR، باند ۶۰۴ جفت بازی را نشان دادند (Figure 1 و Table 2).

با استفاده از پرایمرهایی که جهت جستجوی ژن *rpoB* به کار می‌روند از ۱۰۰ نمونه خون سگ تعداد ۴ نمونه (۲ نمونه از سگ‌های کرمانشاه و ۲ نمونه از سگ‌های همدان) آلوده به گونه‌های *بارتونلا* تشخیص داده شد و این نمونه‌ها در الکتروفورز محصول PCR، باند ۸۲۵ جفت بازی را نشان دادند (Figure 2 و Table 2).

نتایج بررسی حضور *بارتونلا* در کک‌های جمع‌آوری شده از روی سگ‌ها

در زمان نمونه‌گیری ۵ قلاده سگ از همدان آلوده به کک بودند. مجموعاً ۳۱ کک از گونه‌های *کتنوسفالیدس کنیس* و *پولکس ایریتانس* جمع‌آوری شد که با استفاده از تکنیک PCR و با استفاده از هر سه جفت پرایمر ذکرشده در بالا، هیچ‌کدام آلودگی به گونه‌های *بارتونلا* را نشان ندادند (Table 3).

نتایج بررسی حضور *بارتونلا* در کنه‌های جمع‌آوری شده از روی سگ‌ها

از یک قلاده سگ در همدان و سه قلاده سگ از کرمانشاه، مجموعاً ۱۲ کنه *ریپیسفالوس سنگوییئوس* جمع‌آوری شد که کنه جمع‌آوری شده از روی یکی از سگ‌ها با استفاده از پرایمری که قطعه ژنی ITS را هدف قرار می‌دهد آلودگی به *بارتونلا* را نشان داد (Table 3).

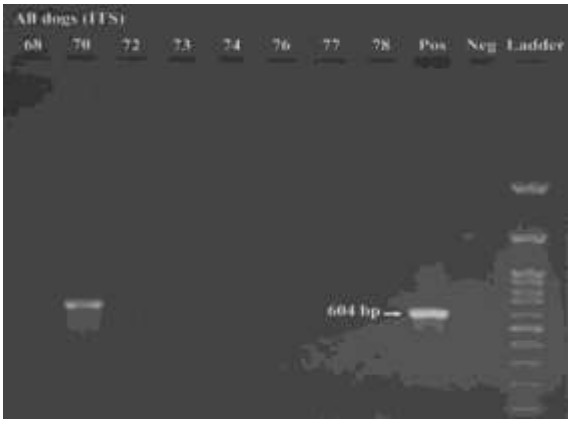

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products using 325s and 1100as primers. Lane Ladder: A 100 bp ladder, lane Neg: Negative control (Dw), lane Pos: Positive control (*B. henselae* Houston1), lane 68- 78: extracted DNA from dog blood.

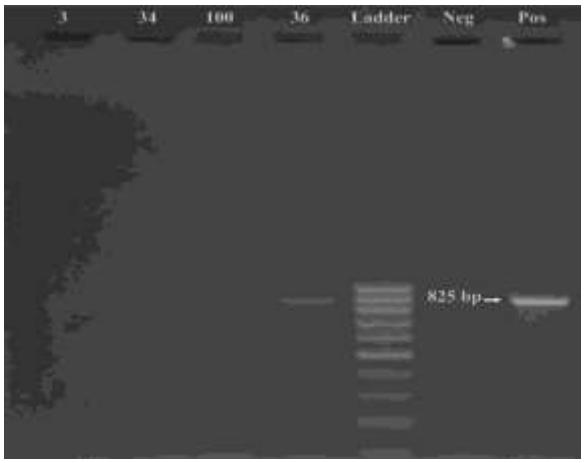

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products using 1400F and 2300R primers. Lane Pos: Positive control (*B. henselae* Houston1), lane Neg: Negative control (Dw), lane Ladder: A 100 bp ladder, lane 36, 100, 34 and 3: extracted DNA from dog blood

Table 3: Detail of fleas and ticks collected from dogs of Hamedan and Kermanshah (*n*=100) examined for the presence of *Bartonella* spp.

Arthropod vector		Tick/Flea	Gender	Number	PCR Results	
Flea	Tick				ITS	*rpoB*
+		*Ctenocephalides canis*	Female	9	−	−
+		*Ctenocephalides canis*	Male	4	−	−
+		*Pulex irritans*	Female	1	−	−
+		*Ctenocephalides canis*	Female	1	−	−
+		*Ctenocephalides canis*	Male	1	−	−
+		*Pulex irritans*	Female	3	−	−
+		*Ctenocephalides canis*	Female	1	−	−
	+	*Rhipicephalus sanguineus*	Male	6	−	−
	+	*Rhipicephalus sanguineus*	Female	3	−	−
+		*Ctenocephalides canis*	Female	1	−	−
+		*Ctenocephalides canis*	Male	5	−	−
+		*Ctenocephalides canis*	Male	3	−	−
+		*Pulex irritans*	Female	2	−	−
	+	*Rhipicephalus sanguineus*	Female	1	−	−
	+	*Rhipicephalus sanguineus*	Female	1	+	−
	+	*Rhipicephalus sanguineus*	Male	1	−	−

نتایج توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی

توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR قطعه ژنی ITS جدایه‌های *بارتونلا* از سگ‌های مطالعه حاضر با شماره دسترسی MZ502663 و MZ502217 در بانک ژن ثبت گردید. مقایسه توالی‌های مطالعه حاضر با گونه‌های دیگر *بارتونلا* در بلاست نشان داد که جدایه MZ502663 از سگ نر با سن بین ۱ تا ۳ سال نژاد جرمن شفرد از همدان بیش‌ترین شباهت را با *بارتونلا وینسونیای* تحت گونه *برخوفیای* و جدایه MZ502217 از سگ ماده ۵ ساله نژاد هاسکی از کرمانشاه بیش‌ترین شباهت را با *کاندیداتوس* بارتونلا مریوکسیای دارد. Figure 3 ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های مطالعه حاضر و دیگر جدایه‌های *بارتونلا* از ایران و دیگر مناطق جهان را نشان می‌دهد.

نتایج آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که بین سن، جنس و نژاد سگ‌ها، همچنین شهر محل نمونه‌گیری، آلودگی به انگل‌های خارجی و میزان شیوع *بارتونلا* در سگ‌ها رابطه آماری معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$).

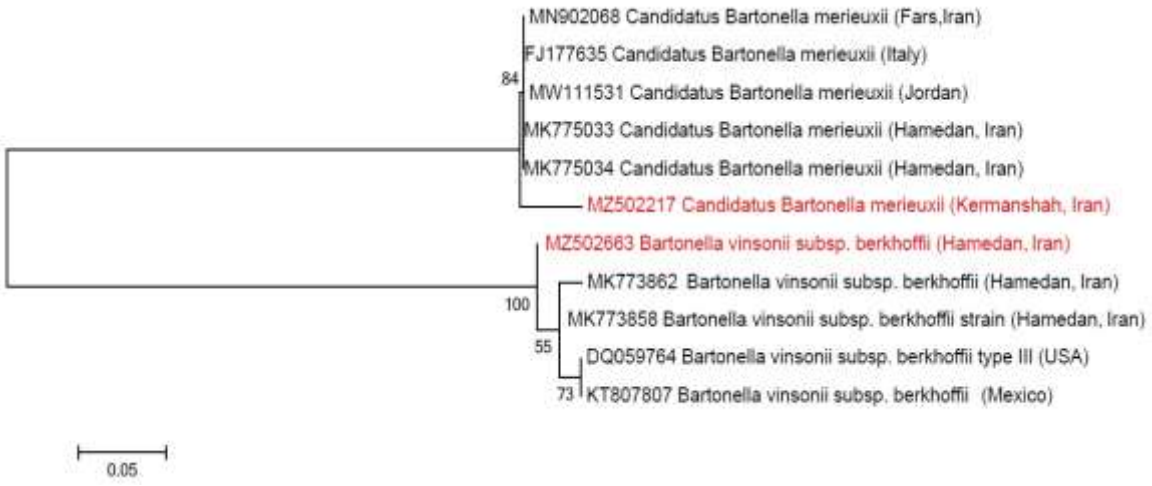

Figure 3: Phylogenetic relationship of *Bartonella* spp. isolated from Hamedan and kermanshah dogs in this study (in red) to other *Bartonella* species based on a partial sequence of the ITS gene. The analyses were performed by Maximum Likelihood method using MEGA software version 6.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی ۱۴ درصدی عفونت با گونه‌های *بارتونلا* در سگ‌های همدان و کرمانشاه وجود دارد که بیان‌گر نقش مهم این حیوان در اپیدمیولوژی بارتونلوزیس در کشور است. به علاوه مؤید این است که سگ‌های این مناطق در معرض گزش بندپایان آلوده‌ای قرار دارند که می‌توانند در گردش پاتوژن ایفای نقش کنند. این مطالعه اولین گزارش در مورد جداسازی و شناسایی *بارتونلا* در سگ‌های کرمانشاه می‌باشد. Oskouizadeh و همکاران در سال ۲۰۱۳ در یک مطالعه مقطعی در سگ‌های ارجاعی به بیمارستان آموزشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام دادند، میزان آلودگی به *بارتونلا هنسله* در خون، ناخن و بزاق سگ‌ها را به روش PCR بررسی کردند و نتایج این مطالعه میزان آلودگی به *بارتونلا هنسله* را در این جمعیت صفر درصد گزارش کرد. شایان ذکر است در مطالعه ذکر شده هدف فقط جداسازی و تشخیص *بارتونلا هنسله* بوده است و حضور سایر گونه‌های *بارتونلا* بررسی نشده است. در سال ۲۰۱۹، Greco و همکاران فراوانی آلودگی با گونه‌های *بارتونلا* را در سرم و خون۶۶ قلاده سگ ولگرد و پناهگاهی در اطراف همدان با استفاده از تست سرولوژی ایمونوفلورسنت آنتی‌بادی غیرمستقیم و آزمون‌های مولکولی را به ترتیب ۷۴/۲ درصد و ۲۴/۲۴ درصد گزارش کردند. همچنین در آن مطالعه با استفاده از نتایج توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی حضور گونه‌های *بارتونلا وینسونیای* تحت گونه *برخوفی*، *کاندیداتوس* بارتونلا مریکسویی و *بارتونلا روکالیما* مورد تأیید قرار گرفت. در مطالعه‌ای دیگر از ایران، Samsami و همکاران در اواخر سال ۲۰۲۰ تعداد ۹۸ نمونه خون جمع‌آوری شده از سگ‌های شیراز را با استفاده از دو روش PCR که به ترتیب ژن *rpoB* و توالی ITS را هدف قرار می‌دهند از نظر میزان شیوع *بارتونلا* مورد بررسی قرار دادند و میزان شیوع گونه‌های مختلف *بارتونلا* در جمعیت مورد بررسی را ۱۲/۲ درصد بیان کردند، همچنین در آن مطالعه نتایج توالی‌یابی حضور *کاندیداتوس* بارتونلا مریوکسیای را تأیید کرد. تفاوت در میزان فراوانی آلودگی در مطالعات مختلف می‌تواند با عواملی از جمله تفاوت در مناطق جغرافیایی مورد بررسی، عوامل محیطی و مسایل مدیریتی جمعیت مورد مطالعه مرتبط باشد.

مطالعات دیگری که تا کنون در ایران در مورد حضور گونه‌های *بارتونلا* انجام شده است به بررسی حضور این میکروارگانیسم در گربه‌ها و شترها پرداخته‌اند. Oskouizadeh و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی ۱۰۰ نمونه خون جمع‌آوری شده از گربه‌های اهلی (خانگی و غیر خانگی) تهران با استفاده از روش کشت و ایمونوفلورسنت آنتی‌بادی غیرمستقیم انجام دادند گزارش کردند که هیچ‌کدام از گربه‌ها با استفاده از کشت مثبت نشدند اما با استفاده از روش ایمونوفلورسنت آنتی‌بادی غیرمستقیم ۲۳ درصد از گربه‌ها حضور آنتی‌بادی علیه *بارتونلا هنسله* را نشان دادند. Oskouizadeh و همکاران در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۰ در تهران و شهرکرد انجام دادند تعداد ۱۴۰ نمونه خون، بزاق و ناخن جمع‌آوری شده از گربه‌ها را از نظر حضور *بارتونلا* با استفاده از PCR مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که ۱۰/۹ درصداز نمونه‌های بزاق آلوده به این میکروارگانیسم بودند. Mazaheri Nezhad Fard و همکاران در سال ۲۰۱۶ در تهران، ۱۴۰ نمونه ناخن و بزاق جمع‌آوری شده از ۷۰ گربه خانگی را با استفاده از PCR و تعیین توالی از نظر آلودگی به *بارتونلا هنسله* بررسی کردند. ارزیابی‌های مولکولی در این مطالعه نشان داد که پنج نمونه از ۷۰ نمونه ناخن (۷/۱۴ درصد) و یک نمونه از ۷۰ نمونه بزاق (۱/۴۲ درصد) آلوده به *بارتونلا هنسله* بودند. Ghaemi و همکاران در سال ۲۰۱۹ در مطالعه‌ای که در شیراز بر روی ۱۰۶ نمونه خون جمع‌آوری شده از شترهای استان فارس انجام دادند به بررسی حضور *بارتونلا* با استفاده از PCR و با هدف قرار دادن سه ناحیه ژنی شامل 16S rDNA، *rpoB* و ITS پرداختند که نتایج این مطالعه نشان داد که میزان آلودگی به *بارتونلا* در جمعیت مورد مطالعه ۱۷ درصد بود، اما در بررسی Sazmand و همکاران و نیز Bahari و همکاران بر روی نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از شترهای سیستان و بلوچستان، کرمان و قم با استفاده از روش PCR موردی از آلودگی در نمونه‌های مورد بررسی نیافتند (Bahari et al. 2021; Sazmand et al. 2019).

مطالعات دیگری که در سایر مناطق دنیا انجام شده است حضور گونه‌های مختلف *بارتونلا* در سگ‌ها را با درصد شیوع متفاوت گزارش کرده‌اند. Celebi و همکاران، روی۲۵۰ نمونه خون جمع‌آوری شده از سگ‌ها در استان آنکارا بین اکتبر ۲۰۰۶ و مارس ۲۰۰۷ کار کردند و تایپینگ ۲۳ جدایه را توسط PCR با استفاده از ژن *gltA* و توالی ITS انجام دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که از ۱۷۰ قلاده سگ پناهگاهی، ۲۱ مورد (۱۲/۴ درصد) آلوده به *بارتونلا وینسونیای* تحت گونه *برخوفیای* بودند، میزان آلودگی به این گونه در سگ‌های ولگرد ۲ از ۴۰ قلاده سگ بود (۵ درصد) و البته این گونه از سگ‌های خانگی جدا نشد (Celebi et al. 2010). Alanazi و همکاران در سال ۲۰۲۰ در عربستان، نمونه‌های خون از ۱۸۸ سگ و گربه آزاد را بررسی کردند که نتایج این مطالعه نشان داد که ۱/۴ درصد از سگ‌ها و ۹/۲ درصد از گربه‌ها، به *بارتونلا هنسله* آلوده بودند. Chomel و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای که به منظور بررسی گونه‌های مختلف *بارتونلا* در سگ‌سانان در عراق انجام دادند و میزان آلودگی به *بارتونلا* را در سگ‌ها با استفاده از روش ایمونوفلورسنت آنتی‌بادی غیرمستقیم و روش مولکولی به ترتیب ۴۷/۴ درصد و ۳۷/۱ درصد گزارش کردند. Belkhiria و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مطالعه‌ای که در تونس انجام دادند میزان آلودگی به گونه‌های *بارتونلا* در سگ‌ها را با استفاده از PCR و بر اساس ژن‌های *ftsZ* و *rpoB* به ترتیب ۱۴/۸ درصد و ۱۸/۸ درصد اعلام کردند. Chekli و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مراکش در بررسی ملکولی که بر روی ۱۵۸ قلاده سگ با استفاده از پرایمرهایی که ژن‌های *ftsZ* و ITS را هدف قرار می‌دهند انجام دادند گزارش کردند که هیچ کدام از سگ‌ها آلودگی به *بارتونلا* را نشان ندادند. نتایج مطالعه حاضر و مطالعات ذکر شده نشان دهنده حضور گونه‌های *بارتونلا* در سگ‌های ایران و سگ‌های کشورهای منطقه غرب آسیا و شمال آفریقا می‌باشد. علاوه بر این، یافته‌های مطالعه Chomel و همکاران در عراق مبنی بر آلودگی شغال‌ها به گونه‌های *بارتونلای* بیماری‌زا برای سگ‌ها (Chomel et al,

2012) توجه به نقش سگ‌سانان وحشی در چرخه انتقال پاتوژن به سگ‌ها و متعاقب آن جمعیت‌های انسانی را بیش از پیش تأکید می‌نماید.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بین جنس، سن، شهرستان نمونه‌گیری، نژاد سگ‌ها و میزان شیوع *بارتونلا* رابطه آماری معنی‌داری وجود ندارد که این نتایج با نتایج مطالعات گذشته همخوانی دارد (Foley et al, 2007; Greco et al, 2019). هر چند برخی از مطالعات افزایش سن را به عنوان یک فاکتور خطر برای افزایش میزان آنتی‌بادی علیه *بارتونلا* گزارش کرده‌اند (Henn et al, 2007) به علاوه در این مطالعه تمامی ۱۴ قلاده سگ آلوده به *بارتونلا* همگی سگ‌های پناهگاهی بودند که این نشان‌دهنده اهمیت نزاع احتمالی بین سگ‌ها در پناهگاه به عنوان فاکتور خطر مهم در گسترش عفونت در این محیط-های بسته می‌باشد. مطالعات پیشین نیز گزارش کردند که بین نحوه نگهداری سگ‌ها، نزاع احتمالی سگ‌ها و انتقال بیماری‌هایی با واسطه ناقل‌های بندپا ارتباط وجود دارد (Cannon et al, 2016; Celebi et al, 2010). Greco و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹ بیان کردند که گزش توسط بندپایان یک فاکتور خطر قابل توجه در انتقال *بارتونلا* در میان سگ‌ها می‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با استفاده از تکنیک‌های مولکولی (PCR و توالی‌یابی) مخصوصاً زمانی که از پرایمرهایی استفاده می‌شود که توالی ITS را هدف قرار می‌دهند می‌توان برای شناسایی *بارتونلا* به خوبی بهره برد. از آن جایی که *بارتونلا* یک میکروارگانیسم خون‌دوست و سخت رشد می‌باشد (Chomel et al, 2009) ،روش‌های مولکولی نظیر PCR، RFLP، MLST و MLVA که حساس‌تر از روش‌های کشت و سرولوژی هستند برای جداسازی و شناسایی *بارتونلا* در حد گونه و تحت‌گونه گسترش‌یافته و توصیه می‌شوند (Zouari et al, 2017).

در مطالعه حاضر هیچ یک از کک‌های جمع‌آوری شده و مورد آزمایش با آزمون‌های PCR آلوده تشخیص داده نشدند. Abdullah و همکاران در سال ۲۰۱۹ در انگلیس، کک‌های جمع‌آوری شده از ۸۱۲ قلاده گربه و ۶۶۲ قلاده سگ را برای آلودگی با گونه‌های *بارتونلا* مورد بررسی قراردادند. نتایج نشان داد ۲۸/۱ درصد از گربه‌ها و ۱۴/۴ درصد از سگ‌ها به کک آلوده بودند. بیش از ۹۰ درصد از کک‌های آلوده‌کننده هر دو حیوان گربه و سگ، کک *کتنوسفالیدس فلیس* بودند. ۴۷۰ نمونه کک جمع شده با استفاده از PCR معمولی آزمایش شد و ۵۳ نمونه (۳۵ کک از گربه‌ها و ۴ کک از سگ‌ها) از نظر گونه‌های *بارتونلا* مثبت بودند. از این میان ۱۷ مورد *بارتونلا هنسله*، ۲۷ مورد *بارتونلا کلاریژیه*، ۴ مورد *بارتونلا آلساتیکا* و یک مورد *بارتونلا گراهامی* بوده و ۴ نمونه قابل شناسایی نبودند (Abdullah et al, 2019).

در مطالعه حاضر DNA *بارتونلا* در یک کنه ماده خون خورده که از یک سگ در کرمانشاه جدا شده بود شناسایی شد. اما کنه آلوده از حیوانی جدا شده است که در خون خود DNA *بارتونلای* قابل شناسایی نداشته است. این یافته شاید به این دلیل باشد که سیستم ایمنی حیوان عفونت باکتریایی را از بدن زدوده باشد یا این که با لوکالیزه شدن عفونت در بافت بدن حیوان باکتری‌های در گردش خون محدود شده باشند. اما این سؤال را به جا می‌گذارد که شاید بتوان برای جستجوی پاتوژن‌های کنه‌زاد به جای خون حیوان از کنه‌های خون خورده استفاده کرد Laidoudi et al, 2020). تا کنون گونه‌های مختلف *بارتونلا* در کنه‌های سخت از جنس‌های *ایکسودس*، *ریپیسفالوس*، *آمبلیوما* و *درماسنتور* شناسایی شده است (Billeter et al, 2008). کنه قهوه‌ای سگ با نام علمی *ریپیسفالوس سنگوییئوس* شایع‌ترین کنه آلوده‌کننده سگ در سراسر جهان از جمله ایران است (Shoorijeh et al, 2008). اگر چه تا کنون مشخص نشده است که آیا این کنه ناقل کارآمد است یا ناقل بالقوه اما فراوانی آلودگی این کنه به *بارتونلا هنسله* در ایتالیا، کالیفرنیا آمریکا و تایوان به ترتیب ۰/۰۹، ۳/۲ و ۵/۳ درصد بوده است (Satta et al, 2011; Tsai et al, 2011; Wikswo et al, 2007). همچنین DNA *بارتونلا وینسونیای* تحت‌گونه *برخوفیای* در مدفوع این کنه، و *بارتونلا کلره* و

بارتونلا فوسئنسیس در DNA ژنومیک استخراج شده از همین گونه کنه شناسایی شده است (Billeter et al, 2012; Saengsawang et al, 2021). علاوه بر این تأثیر اپیدمیولوژیک این کنه هنوز مشخص نیست اما نشان‌گر تعدد بندپایان ناقل *بارتونلا* می‌باشد. بنابراین توصیه می‌گردد بارتونلوزیس در تشخیص تفریقی بیمارانی که مورد گزش کنه قرار گرفتند جا داده شود (Seo et al, 2020). همچنین پیشنهاد می‌شود جهت ارزیابی دقیق نقش کنه‌ها در اپیدمیولوژی بارتونلوزیس از جمله این که آیا یافتن *بارتونلا* در DNA کنه ناشی از خون‌خواری از میزبان است و یا این که هر گونه از کنه حقیقتاً در انتقال گونه‌های بارتونلا نقش عمده‌ای دارد جستجوی پاتوژن در غدد بزاقی کنه‌ها پس از تشریح و جداسازی صورت پذیرد.

نتایج این پژوهش نشان داد که میزان ۱۴ درصد از نمونه‌های خون اخذ شده از سگ‌های شهرستان‌های همدان و کرمانشاه از لحاظ حضور گونه‌های *بارتونلا* مثبت بودند با توجه به این که مطالعه حاضر نشان داد که آلودگی به گونه‌های *بارتونلا* در سگ‌های این مناطق وجود دارد، بنابراین پیشنهاد می‌شود جهت جلوگیری از بروز بیماری‌های ناشی از *بارتونلا* در سگ‌ها و متعاقباً در انسان مبارزه با ناقلین بندپا، رعایت بهداشت در مواجهه با سگ‌ها و در صورت تشخیص عامل بیماری در سگ‌ها درمان صحیح و به موقع صورت گیرد. نتیجه این مطالعه همچنین نشان داد روش PCR یک روش مولکولی سریع، حساس و دقیق برای شناسایی و تأیید هویت گونه‌های *بارتونلا* می‌باشد. اگر چه روش‌های مبتنی بر کشت هنوز مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی به دلیل سخت رشد بودن *بارتونلا* و همچنین نیاز این میکروارگانیسم به شرایط و تجهیزات خاص (حضور CO_2) برای رشد، این روش‌ها ویژگی‌های کامل یک روش مطلوب و سریع در شناسایی *بارتونلا* را ندارند و همچنین در مواردی که درمان آنتی‌بیوتیکی پیش از نمونه‌گیری انجام شود، نتیجه کشت منفی گزارش می‌گردد. بنابراین برای جداسازی، شناسایی و تعیین هویت قطعی *بارتونلا*، کاربرد روش‌های مولکولی همچون PCR می‌تواند بسیار کمک‌کننده باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را از جناب آقای پروفسور برونو شومل (Bruno Chomel) از دانشگاه Davis کالیفرنیا بابت اهدای کلونی *بارتونلا* و همچنین راهنمایی‌های ارزشمندی که در طول انجام پروژه داشتند، اعلام می‌دارند. این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی است و با حمایت مالی دانشگاه بوعلی سینا همدان انجام گرفته است.

تعارض منافع

بین نویسندگان این مقاله تعارض در منافع گزارش نشده است.

منابع مالی

هزینه‌های پژوهش حاضر در قالب گرنت پژوهشی (شماره قرداد: ۹۸-۱۵۵)، از دانشگاه بوعلی سینا همدان تأمین شده است.

منابع

Abdullah, S., Helps, C., Tasker, S., Newbury, H., & Wall, R. (2019). Pathogens in fleas collected from cats and dogs: distribution and prevalence in the UK. *Parasites & Vectors*, *12*(1), 71.

Alanazi, A. D., Alouffi, A. S., Alyousif, M. S., Alshahrani, M. Y., Abdullah, H., Abdel-Shafy, S., Calvani, N.E.D., Ansari-Lari, M., Sazmand, A., & Otranto, D. (2020). Molecular survey of vector-borne pathogens of dogs and cats in two regions of Saudi Arabia. *Pathogens*, *10*(1).

Alvarez-Fernandez, A., Breitschwerdt, E. B., & Solano-Gallego, L. (2018). *Bartonella* infections in cats and dogs including zoonotic aspects. *Parasites & Vectors*, *11*(1), 624.

Bahari, A., Azami, S., Goudarztalejerdi, A., Karimi, S., Esmaeili, S., Chomel, B. B., & Sazmand, A. (2021). molecular detection of zoonotic pathogens in the blood and tissues of camels (*Camelus dromedarius*) in central desert of Iran. *Yale Journal of Biology and Medicine*, *94*(2), 249-258.

Belkhiria, J., Chomel, B. B., Ben Hamida, T., Kasten, R. W., Stuckey, M. J., Fleischman, D. A., Christopher, M.M., Boulouis, H.J., & Farver, T. B. (2017). Prevalence and potential risk factors for *Bartonella* infection in Tunisian stray dogs. *Vector Borne Zoonotic Disease*, *17*(6), 388-397.

Billeter, S. A., Kasten, R. W., Killmaster, L. F., Breitschwerdt, E. B., Levin, M. L., Levy, M. G., Kosoy, M.Y., & Chomel, B. B. (2012). Experimental infection by capillary tube feeding of *Rhipicephalus sanguineus* with *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii*. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, *35*(1), 9-15.

Billeter, S. A., Levy, M. G., Chomel, B. B., & Breitschwerdt, E. B. (2008). Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Medical and Veterinary Entomology*, *22*(1), 1-15.

Breitschwerdt, E. B., Kordick, D. L., Malarkey, D. E., Keene, B., Hadfield, T. L., & Wilson, K. (1995). Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*(1), 154-160.

Cannon, S. H., Levy, J. K., Kirk, S. K., Crawford, P. C., Leutenegger, C. M., Shuster, J. J., Liu, J., & Chandrashekar, R. (2016). Infectious diseases in dogs rescued during dogfighting investigations. *Veterinary journal*, *211*, 64-69.

Celebi, B., Carhan, A., Kilic, S., & Babur, C. (2010). Detection and genetic diversity of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* strains isolated from dogs in Ankara, Turkey. *Journal of Veterinary Medical Science*, *72*(8), 969-973.

Chekli, Z., Haddad, N., Mellouki, F., Rhallabi, N., & Boulouis, H. J. (2020). First molecular detection of *Bartonella* spp. in stray cats and dogs in Morocco. *International Journal of Infectious Diseases*, *101*, 543.

Chomel, B. B., Boulouis, H. J., Breitschwerdt, E. B., Kasten, R. W., Vayssier-Taussat, M., Birtles, R. J., Koehler, J.E., & Dehio, C. (2009). Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Veterinary Research*, *40*(2), 29.

Chomel, B. B., Boulouis, H. J., Maruyama, S., & Breitschwerdt, E. B. (2006). *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(3), 389-394.

Chomel, B. B., McMillan-Cole, A. C., Kasten, R. W., Stuckey, M. J., Sato, S., Maruyama, S., Diniz, P.P., & Breitschwerdt, E. B. (2012). *Candidatus Bartonella* merieuxii, a potential new zoonotic *Bartonella* species in canids from Iraq. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(9), e1843-e1843.

Diniz, P. P., Maggi, R. G., Schwartz, D. S., Cadenas, M. B., Bradley, J. M., Hegarty, B., & Breitschwerdt, E. B. (2007). Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Veterinary Research*, *38*(5), 697-710.

Foley, J. E., Brown, R. N., Gabriel, M. W., Henn, J., Drazenovich, N., Kasten, R., Green, S.L., & Chomel, B. B. (2007). Spatial analysis of the exposure of dogs in rural north-coastal California to vectorborne pathogens. *Veterinary Record*, *161*(19), 653-657.

Ghaemi, M., Sharifiyazdi, H., Heidari, F., Nazifi, S., & Ghane, M. (2019). *'Candidatus* Bartonella dromedarii' in the dromedary camels of Iran: Molecular investigation, phylogenetic analysis, hematological findings, and acute-phase proteins quantitation. *Veterinary Microbiology*, *237*, 108404.

Greco, G., Sazmand, A., Goudarztalejerdi, A., Zolhavarieh, S. M., Decaro, N., Lapsley, W. D., Otranto, D., & Chomel, B. B. (2019). High prevalence of *Bartonella* sp. in dogs from Hamadan, Iran. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *101*(4), 749-752.

Greco, G., Zarea, A. A. K., Sgroi, G., Tempesta, M., D'Alessio, N., Lanave, G., Bezerra-Santos, M.A., Iatta, R., Veneziano, V., Otranto, D. , & Chomel, B. (2021). Zoonotic *Bartonella* species in Eurasian wolves and other free-ranging wild mammals from Italy. *Zoonoses and Public Health*, *68*(4), 316-326.

Henn, J. B., Gabriel, M. W., Kasten, R. W., Brown, R. N., Theis, J. H., Foley, J. E., & Chomel, B. B. (2007). Gray foxes (Urocyon cinereoargenteus) as a potential reservoir of a *Bartonella clarridgeiae*-like bacterium and domestic dogs as part of a sentinel system for surveillance of zoonotic arthropod-borne pathogens in northern California. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(8), 2411-2418.

Hermanson, J., & de Lahunta, A. (2020). Miller and Evan's anatomy of the dog, p. 2119. Elsevier, St. Louis, Mo.

Kaewmongkol, G., Kaewmongkol, S., Burmej, H., Bennett, M. D., Fleming, P. A., Adams, P. J., Wayne, A.F., Ryan, U., Irwin, P.J., & Fenwick, S. G. (2011). Diversity of *Bartonella* species detected in arthropod vectors from animals in Australia. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, *34*(5), 411-417.

Kordick, D. L., & Breitschwerdt, E. B. (1998). Persistent infection of pets within a household with three *Bartonella* species. *Emerging Infectious Diseases*, *4*(2), 325-328.

Laidoudi, Y., Bedjaoui, S., Medkour, H., Latrofa, M. S., Mekroud, A., Bitam, I., Davoust, B., Otranto, D., & Mediannikov, O. (2020). Molecular approach for the diagnosis of blood and skin canine filarioids. *Microorganisms*, *8*(11).

Mazaheri Nezhad Fard, R., Vahedi, S. M., Ashrafi, I., Alipour, F., Sharafi, G., Akbarein, H., & Aldavood, S. J. (2016). Molecular identification and phylogenic analysis of *Bartonella henselae* isolated from Iranian cats based on *gltA* gene. *Veterinary Research Forum*, *7*(1), 69-72.

Oskoeizadeh, K., Salehi, T. Z., Aldavood, S. J., Majlesi, B., Ghaffari, H., Tamami, I. A., & Aliyari, A. (2008). Study in prevalence of *Bartonella henselae* infection in domestic cats from Tehran. *Journal of Veterinary Research*, *63*(3), 183-189.

Oskouizadeh, K., Mosallanejad, B., Shapouri, M. R. S. A., & Sanaei, K. (2013). A cross sectional study on *Bartonella henselae* infection in dogs in Ahvaz district by PCR. *Iranian Veterinary Journal*, *9*(3), 5-12.

Oskouizadeh, K., Zahraei-Salehi, T., & Aledavood, S. (2010). Detection of *Bartonella henselae* in domestic cats' saliva. *Iranian Journal of Microbiology*, *2*(2), 80-84.

Renesto, P., Gouvernet, J., Drancourt, M., Roux, V., & Raoult, D. (2001). Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(2), 430-437.

Roux, V., Eykyn, S. J., Wyllie, S., & Raoult, D. (2000). *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(4), 1698-1700.

Saengsawang, P., Kaewmongkol, G., Phoosangwalthong, P., Chimnoi, W., & Inpankaew, T. (2021). Detection of zoonotic *Bartonella* species in ticks and fleas parasitizing free-ranging cats and dogs residing in temples of Bangkok, Thailand. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *25*, 100612.

Samsami, S., Ghaemi, M., & Sharifiyazdi, H. (2020). Molecular detection and phylogenetic analysis of *'Candidatus* Bartonella merieuxii' in dogs and its effect on hematologic parameters. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, *72*, 101504.

Satta, G., Chisu, V., Cabras, P., Fois, F., & Masala, G. (2011). Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy. *Journal of Medical Microbiology*, *60*, 63-68.

Sazmand, A., Harl, J., Eigner, B., Hodžić, A., Beck, R., Hekmatimoghaddam, S., S., Mirzaei, M., Fuehrer, H.P., & Joachim, A. (2019). Vector-borne bacteria in blood of camels in Iran: New data and literature review. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, *65*, 48-53.

Seo, J.-W., Kim, C.-M., Yun, N. R., Kim, D.-M., Kim, S. S., Choi, S., & Chu, H. (2020). Scalp eschar and neck lymphadenopathy after tick bite (SENLAT) caused by *Bartonella* henselae in Korea: a case report. *BMC Infectious Diseases*, *20*(1), 216.

Shoorijeh, S. J., Ghasrodashti, A. R., Tamadon, A., Moghaddar, N., & Behzadi, M. A. (2008). Seasonal frequency of ectoparasite infestation in dogs from Shiraz, southern Iran. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, *32*, 309-313.

Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2015). Veterinary parasitology, 4th Edition, p. 259-312. Wiley Blackwell, Oxford; Ames, Iowa.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution, 30*(12), 2725-2729.

Tsai, Y. L., Lin, C. C., Chomel, B. B., Chuang, S. T., Tsai, K. H., Wu, W. J., Huang, C.G., Yu, J.C., Sung, M.H., Kass, P.H., & Chang, C. C. (2011). *Bartonella* infection in shelter cats and dogs and their ectoparasites. *Vector Borne Zoonotic Disease, 11*(8), 1023-1030.

Wikswo, M. E., Hu, R., Metzger, M. E., & Eremeeva, M. E. (2007). Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from California. *Journal of Medical Entomology, 44*(1), 158-162.

Zouari, S., Khrouf, F., M'ghirbi, Y., & Bouattour, A. (2017). First molecular detection and characterization of zoonotic *Bartonella* species in fleas infesting domestic animals in Tunisia. *Parasites & Vectors, 10*(1), 436.

Received: 18.01.2022
Accepted: 19.02.2022

Vol. 19, No. 2, Summer, 2023 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2022.325115.2436
DOR: 20.1001.1.17356873.1402.19.2.11.8

Molecular Identification of *Bartonella* Species in Dogs and Arthropod Vectors in Hamedan and Kermanshah, Iran

Zahra Shamshiri[1], Ali Goudarztalejerdi[2*], Seyed Massoud Zolhavarieh[3], Mohammad Kamalpour[4] and Alireza Sazmand[1]

[1] MSc of Bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Basic Science, School of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khoramabad, Iran

Received: 18.01.2022 Accepted: 19.02.2022

Abstract

Bartonella species are lesser-known pathogenic bacteria that infect a wide range of domestic and wild animals as well as humans. Currently, out of 40 *Bartonella* species/subspecies, at least 17 are associated with clinical signs in humans and animals. However, despite the zoonotic importance of bartonellosis, there is limited information about prevalence and species infecting dogs and cats in Iran. The aim of this study was molecular identification of *Bartonella* species in dogs and arthropods infesting them in Hamedan and Kermanshah cities in the west of Iran. Blood genomic DNA (gDNA) was extracted from 100 dogs (45 from Hamedan and 55 from Kermanshah) and, of 25 *Ctenocphalides canis* fleas, six *Pulex irritans* fleas and 12 *Rhipecephalus sanguineus* ticks collected from nine infested dogs were examined for the presence of *Bartonella* species. Conventional PCR targeting fragments of ITS and *rpoB* genes was performed, and PCR-positive samples were sequenced bidirectionally and analyzed phylogenetically. Out of 100 dogs, 14 dogs (14%, ten from Hamedan and four from Kermanshah) were found infected with *Bartonella* species. Nucleotide sequencing confirmed the presence of four Bartonella species in the examined population i.e. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and *Candidatus* B. merieuxii in dogs. None of the examined fleas scored positive but one *Rh. sanguineus* tick from a blood-negative dog was infected with *Bartonella* DNA. Results of the present study showed the presence of different zoonotic *Bartonella* species in dogs of Hamedan and Kermanshah cities highlighting the importance of this vector-borne infection. Effective ectoparasite control strategies, regular examination of pet and urban dogs and cats and successful chemoprophylaxis are suggested.

Key words: Arthropods, *Bartonella*, Dogs, Hamedan, Kermanshah, PCR, Zoonotic

* **Corresponding Author**: Ali Goudarztalejerdi**,** Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
E-mail: a.goudarz@basu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).