



## بررسی مورفولوژیکی و مولکولی کک‌های کتنوسفالیدس جدا شده از سگ‌های ولگرد شهر تهران

سارا آزادبه<sup>۱</sup>، عبدالحسین دلیمی<sup>۲</sup>، شهرام جمشیدی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۳</sup> گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۰ اسفند ماه ۱۳۹۹، تاریخ پذیرش: ۲۹ اردیبهشت ماه ۱۴۰۰

doi:10.22059/jvr.2020.227440.2586

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082525.1400.76.2.2.2>

### چکیده

**زمینه مطالعه:** تاکنون گونه‌های مختلفی از انگل‌های خارجی از سگ گزارش شده‌اند که در این میان کک‌ها از اهمیت قابل توجهی برخوردارند و شناسایی صحیح آن‌ها می‌تواند به لحاظ بهداشتی ما را در کنترل این انگل خارجی یاری کند.

**هدف:** با توجه به عدم شناسایی دقیق کک‌ها، در مطالعه حاضر سعی در شناسایی کک‌های کتنوسفالیدس به دو روش مورفولوژیکی و مولکولی شده است.

**روش کار:** در مطالعه حاضر ابتدا سگ‌های ارجاع شده به بیمارستان دامپزشکی دانشگاه تهران مورد بررسی قرار گرفتند، سپس نسبت به جمع‌آوری و شناسایی کک‌های جدا شده از سگ‌ها اقدام شد. شناسایی مورفولوژیک توسط میکروسکوپ و کلیدهای تشخیصی انجام شد و مطالعه مولکولی با استفاده از روش PCR و تکثیر ژن COX1 کک‌های کتنوسفالیدس انجام شد. در مرحله بعد شناسایی با استفاده از آزمایش RFLP و تعیین ترادف بازی صورت گرفت.

**نتایج:** در مطالعه حاضر از ۲۰ قلاده سگ آلوده به کک، ۶۰۵ عدد کک جداسازی شد. در مطالعات مورفولوژیک، سه گونه کتنوسفالیدس فلیس، کتنوسفالیدس کنیس و پولکس/ایریتانس شناسایی گردید. از لحاظ مولکولی نیز قطعه‌ای به طول ۵۵۲ جفت بازی از ژن COX1 کک‌های کتنوسفالیدس تکثیر و روی ژل ظاهر شد. پس از تعیین توالی، مشخص گردید که در توالی جایگاه ژنی COX1، دو گونه کتنوسفالیدس فلیس و کتنوسفالیدس کنیس ۹۹ درصد مشابهت وجود دارد. در آزمایش PCR-RFLP که از آنزیم TaqI برای تفکیک دو گونه استفاده شد، نتایج برای هر دو گونه مشابه بود.

**نتیجه‌گیری نهایی:** گرچه این دو گونه کک سگ از لحاظ مورفولوژی قابل تفکیک می‌باشند ولی تشخیص مولکولی آن‌ها با استفاده از ژن‌های COX1 موفقیت‌آمیز نبوده است.

**کلمات کلیدی:** کتنوسفالیدس کنیس، کتنوسفالیدس فلیس، سگ، ژن، COX1

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

**نویسنده مسئول:** عبدالحسین دلیمی، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
پست الکترونیکی: dalimi\_a@modares.ac.ir

### مقدمه

این بند پایان ایفا می‌کنند. لذا شناسایی این عوامل بر روی میزبانان مختلف و به خصوص سگ‌ها که در مجاورت انسان زندگی می‌کنند می‌تواند ما را در جهت آگاهی از احتمال وقوع و انتشار بیماری‌های منتقله از سگ‌ها و نیز کنترل آن‌ها مساعدت بیشتری نماید. در این راستا یکی از راسته‌های مهم

سگ‌ها می‌توانند میزبان اصلی و در برخی موارد میزبان اتفاقی انواع زئونوزها باشند. از بیماری‌های مهمی که می‌توانند از سگ‌ها به انسان انتقال یابند، انواع آلودگی‌ها و بیماری‌های انگلی را می‌توان نام برد. یک دسته مهم از آلودگی‌ها، انگل‌های خارجی هستند. سگ‌سانان نقش مهمی در نگهداری و انتقال

## مواد و روش کار

ابتدا با مراجعه به بیمارستان دام‌های کوچک دانشکده دامپزشکی تهران، دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۴ حدود ۵۰ سگ ولگرد ارجاع شده به بیمارستان دامپزشکی از لحاظ آلودگی به کک مورد بررسی قرار گرفتند، که در این میان تنها ۲۰ قلاده سگ به کک آلوده بودند. سپس نمونه‌ها در شیشه‌های حاوی الکل ۷۰ درصد منتقل شدند. آنگاه به منظور مطالعه مورفولوژیک، نمونه‌ها با استفاده از لاکتوفنول، شفاف و روی لام مونت موقت گردیدند. در مرحله بعد با استفاده از کلید تشخیصی معتبر شناسایی مورفولوژیک، نمونه‌ها با توجه به کاراکترهای مربوطه، تشخیص داده شدند.

به منظور استخراج DNA کک‌های جنس *Ctenocephalides*، روش استخراج Ish-horwitz به کار گرفته شد (۵). از هر گونه تعداد ۲۰ کک نر و ماده به نسبت مساوی انتخاب و نسبت به استخراج DNA آن‌ها اقدام شد. بدین نحو که هر کک جداگانه درون میکروتیوب استریل انتقال یافت و با استفاده از پستل استریل خرد شد. سپس DNA ژنومی استخراج گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

در مطالعه حاضر، از پرایمرهای به کار گرفته شده در مطالعه Lawrencea و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۸) برای تکثیر قطعه ۵۵۲ جفت بازی ناحیه COX1 استفاده شد. بدین صورت که برای PCR1 به ترتیب پرایمرهای بالا دست و پایین دست زیر استفاده شد.

5'- LCO1490:  
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG و

5'- HCO2198:  
TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

برای PCR2 به ترتیب پرایمرهای زیر مورد استفاده قرار گرفتند.

5'- AGAATTAGGTCAACCAGGA Cff-F [S0367]: و

Cff-R[S0368]: 5'-GAAGGGTCAAAGAATGATG

واکنش PCR Nested- با حجم کل ۱۵ میکرولیتر از Master mix (آمپلیکون دانمارک) برای هر دو مرحله انجام شد. در PCR1 ۵/۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده و در

حشرات که روی پوست زندگی انگلی دارند راسته Siphonapera یا کک‌ها می‌باشند. کک‌ها از متداول‌ترین انگل‌های خارجی هستند که سگ‌ها و گربه‌ها را در سرتاسر جهان آلوده می‌کنند و از لحاظ بیماری‌زایی بسیار مهم می‌باشند (۳). کک‌ها علاوه بر ایجاد آزار و اذیت در سگ‌ها و حتی انسان می‌توانند سبب انتقال انواع بیماری‌های باکتریایی، قارچی و ویروسی شوند. به علاوه می‌توانند میزبان واسط کرم‌های پهنی چون *Dipylidium caninum* و *Hymenolepis diminuta* شوند. خونخواری کک‌ها می‌تواند دامنه‌ای از اثرات وسیع مخرب مانند التهاب، کم خونی و خارش در حیوان میزبان داشته باشد (۱۳). از کک‌های غالبی که روی میزبان سگ یافت می‌شوند می‌توان به سه گونه *Ctenocephalides felis* و *Ctenocephalides canis* و *Pulex irritans* اشاره کرد (۲).

از آنجایی که دو گونه کک سگ و کک گربه متعلق به جنس *Ctenocephalides* هستند لذا دارای شباهت بسیاری با هم می‌باشند. برای شناسایی این دو گونه تاکنون از روش‌های متفاوتی از جمله مطالعه مورفولوژیک و مطالعه مولکولی استفاده شده است. در مطالعات مورفولوژیک ویژگی‌هایی همچون شیب سر، نحوه قرارگیری و اندازه خارهای شانه‌ای و تعداد خار روی ساق پا قابل بررسی می‌باشند. در مطالعه مولکولی نیز تا کنون در جهان از ژن‌های مختلفی همچون ITS2, ITS1 و COX2 استفاده شده است. به عنوان مثال Vobis و همکاران در سال ۲۰۰۴ اقدام به شناسایی ایزوله‌های *Ctenocephalides felis* و گونه‌های مرتبط با آن را براساس آنالیز توالی‌های ژن‌های 16S rDNA, ITS1, ITS2 شناسایی کردند (۱۲).

معمولاً مطالعات مولکولی اختلاف بین گونه‌ای را دقیق‌تر از مطالعات مورفولوژیک نشان می‌دهند. به همین جهت امروزه بیشتر مطالعات فیلوژنی بر مبنای روش مولکولی است. در تشخیص مولکولی این دو گونه کک، بین محققین اختلاف نظر وجود دارد بدین ترتیب که برخی محققین با استفاده از ژن‌های COX1 و ITS1 این دو گونه را از هم متمایز دانسته‌اند (۸،۱۰). ولی برخی دیگر تفاوتی مشاهده نکرده‌اند (۱). لذا هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی صحت و سقم این تفاوت با روش‌های مورفولوژیک و مولکولی بوده است.

PCR2 ۱ میکرولیتر از محصول PCR1 به عنوان Template DNA استفاده شد.

مراحل برنامه تکثیر ژن COX1 در دستگاه ترموسایکلر تنظیم و ثبت گردید. واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد، پس از آن ۳۵ چرخه شامل سه مرحله انکوباسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۱/۵ درجه سانتی‌گراد برای PCR1 و ۵۳/۵ درجه سانتی‌گراد برای PCR2 به مدت ۳۰ ثانیه و بسط (extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در نهایت مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. پس از طی سیکل‌های ذکر شده در دستگاه ترموسایکلر، ۵ میکرولیتر از هر نمونه تکثیر یافته، در ژل آگاروز ۱ درصد حاوی ۱ میکرولیتر Safestain در بافر TAE به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شدند. تعیین هویت باندهای حاصل، به کمک مقایسه با مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز انجام شد. تهیه عکس از ژل، با استفاده از دستگاه ترانس لامیناتور در مجاورت نور ماورای بنفش صورت گرفت. در انتها محصول PCR توسط کیت PCR Purification Kit (Bioneer, Korea) خالص و برای توالی‌یابی به شرکت پیشگام فرستاده شد.

با توجه به حصول باندهای مشابه ۵۵۲ جفت بازی برای هر دو گونه *Ct. felis* و *Ct. canis* در آزمایش فوق، تصمیم به انجام آزمایش PCR-RFLP گردید. در RFLP از آنزیم Taq1 به منظور شناسایی دو گونه *Ct. felis* و *Ct. canis* استفاده گردید.

برای RFLP طبق دستورالعمل شرکت سازنده آنزیم، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR، ۲ میکرولیتر از بافر X ۱۰ آنزیم، ۱ میکرولیتر آنزیم Taq1 و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد تا حجم نهایی واکنش به ۳۰ میکرولیتر برسد. در مرحله بعد ژل آگارز ۲ درصد حاوی رنگ Safestain تهیه شد. سپس محصول PCR نمونه‌ها، به صورت بدون آنزیم و دارای آنزیم در چاهک‌ها کنار هم در سمت کاتد لود و به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شدند. سپس از باندها عکس برداری شد و باندها مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

جهت تعیین ترادف بازی، تعداد دو محصول PCR از ایزوله‌ها به صورت تصادفی انتخاب و به شرکت پیشگام ارسال

گردید. برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در میان ایزوله‌های کک این مطالعه با ایزوله‌هایی که در بانک اطلاعات ژن (GenBank) قبلاً ثبت شده بود، Multiple alignment انجام شد و با نرم افزار MEGA6 با الگوریتم Maximum Likelihood درخت فیلوژنی ترسیم گردید.

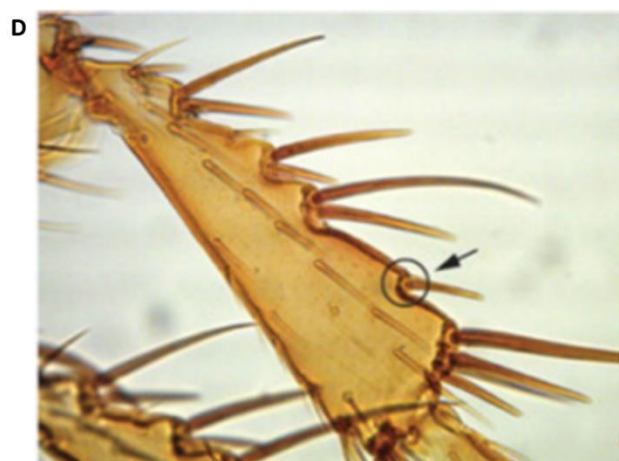
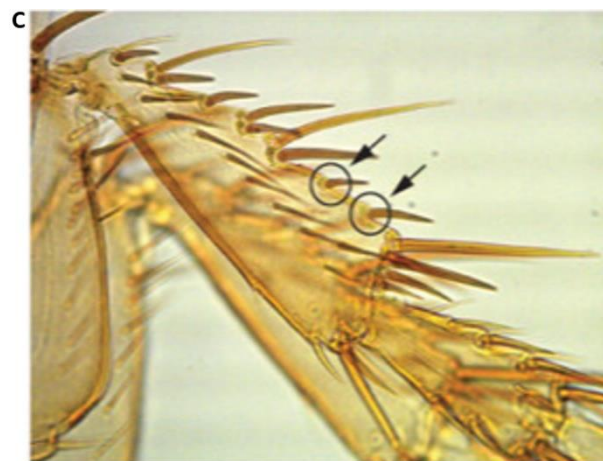
## نتایج

در مطالعه حاضر از ۲۰ قلابه سگ آلوده به کک، ۹ قلابه (۴۵ درصد) به جنس نر و ۱۱ قلابه دیگر (۵۵ درصد) به جنس ماده تعلق داشتند. مطالعات مورفولوژیک کک‌های جدا شده از سگ‌های ولگرد تهران بر اساس کلید تشخیص معتبر Pulicidae و Rothschild و Schlein در سال ۱۹۸۶ (۱۱) نشان داد که همه کک‌های صید شده در این مطالعه به خانواده تعلق دارند.

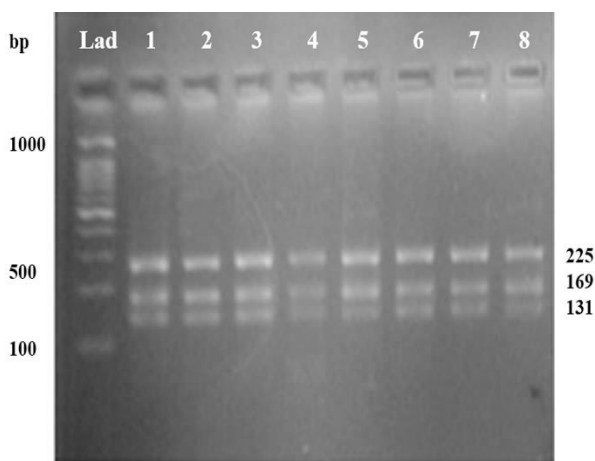
از ۶۰۵ کک جمع آوری شده ۳۷۴ نمونه به گونه *P. irritans* ۲۲۲ نمونه به گونه *Ct. canis* و ۹ نمونه به گونه *Ct. felis* تعلق داشتند. پس از انجام محاسبات آماری مشخص گردید که گونه *P. irritans* با فراوانی ۶۱/۸ درصد فراوان‌ترین گونه، گونه *Ct. canis* با فراوانی ۳۶/۶ درصد در مرتبه دوم و گونه *Ct. felis* با فراوانی ۱/۸۴ درصد در مرتبه سوم بود.

در مطالعه مورفولوژیکی دو گونه *Ct. felis* و *Ct. canis*، ابتدا از ویژگی‌های متعددی چون مقدار خمیدگی سر، تعداد خار بین Apical setae و Postmidian setae، تصویر کلاسر در گونه‌های نر و سایر ویژگی‌های دیگر استفاده شد. سر در کک *Ct. canis* در قسمت بالایی و قدامی خمیدگی تندتری دارد ولی در گونه *Ct. felis* این خمیدگی شیب کندتری دارد (تصویر ۱ الف و ب). خصوصیات مهم دیگری که می‌تواند این دو گونه را از هم جدا کند تعداد خارهای بین خارهای Apical setae و Postmidian setae روی ساق پای عقب است. در گونه کتنوسفالیدس کنیس بین جفت خار انتهایی ساق پای عقب دو خار کوچک‌تر مشاهده می‌شود ولی در گونه فلیس بین دو جفت خار ذکر شده تنها یک خار کوچک مشاهده می‌شود (تصویر ۱ ج و د).

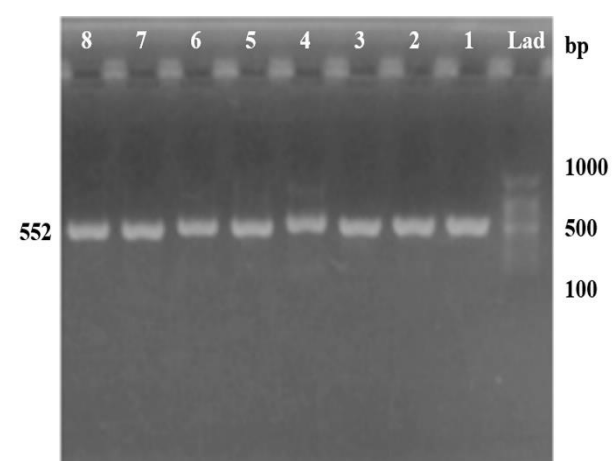
در خصوص مطالعه مولکولی، نتایج بدست آمده از الکتروفورز محصول PCR قطعه ژن COX1 تکثیر شده در هر دو گونه *Ct. felis* و *Ct. canis* نشان داد که دو گونه مذکور دارای باند مشابه ۵۵۲ جفت بازی بوده‌اند (تصویر ۲).



تصویر ۱. A: وضعیت سر و اندازه طول اولین خار از شانه گونه *Ct. canis*. B: وضعیت سر و اندازه طول اولین خار از شانه گونه *Ct. felis*. C: تعداد خار بین خارهای setae Apical و Postmidian setae روی ساق پای عقب در گونه *Ct. canis*. D: تعداد خار بین خارهای setae Apical و Postmidian setae روی ساق پای عقب در گونه *Ct. felis*.

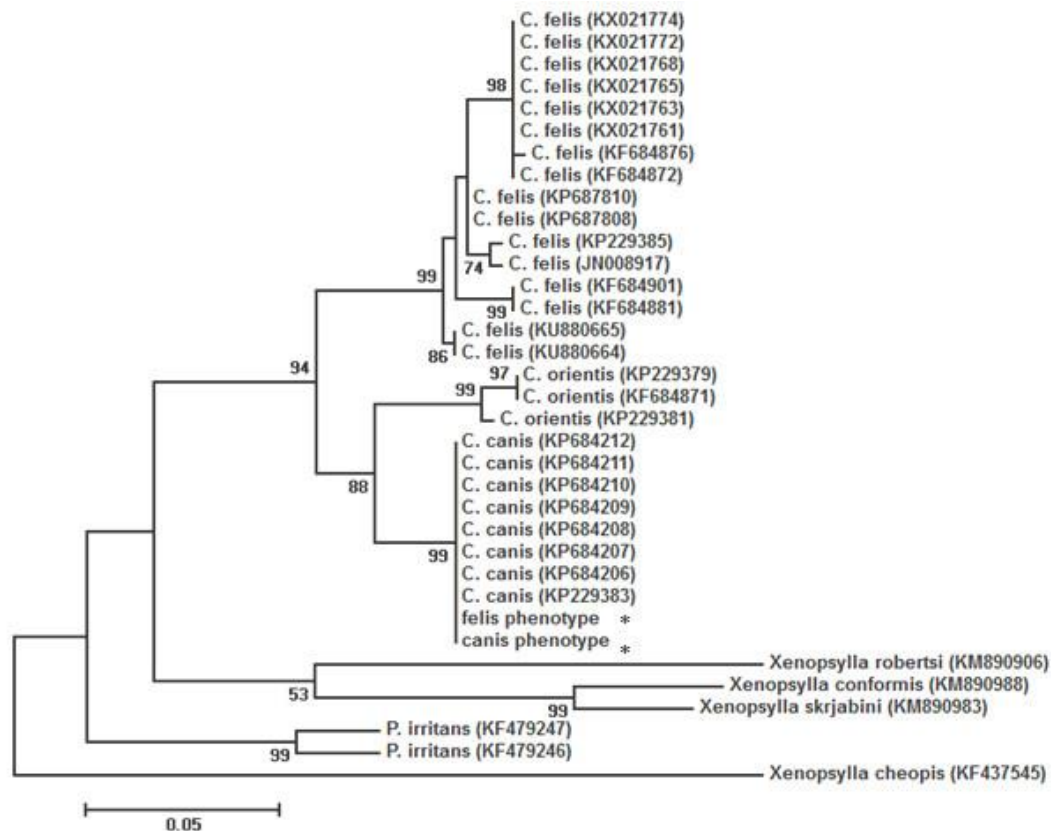


تصویر ۳. الکتروفورز محصول ژن COX1 که در آن قطعه ۵۵۲ جفت بازی با استفاده از آنزیم Taq1 برش داده شده است. نمونه‌های ۱ و ۲ گونه *Ct. felis*، نمونه‌های ۳ تا ۸ گونه *Ct. canis*.



تصویر ۲. الکتروفورز محصول PCR ژن COX1 که در آن قطعه ۵۵۲ جفت بازی تکثیر شده است. لاین شماره ۱ تا ۶ گونه *Ct. canis*، شماره ۷ و ۸ گونه *Ct. felis*.





تصویر ۴. درخت فیلوژنی حاصل از الگوریتم Maximum Likelihood ژن Cox1 کک‌های *Ct. felis* و *Ct. canis* که در این تصویر ژنوتیپ ایزوله‌های این مطالعه با \* مشخص شده است.

روی ۱۶۰ قلاده سگ انجام شد و طی آن دو گونه کک شامل *Pulex irritans*, *Ct. canis* و تعدادی مایت تشخیص داده شد (۶). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Jamshidi و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی انگل‌های خارجی سگ‌های شهر تهران انجام شد، کک‌های گونه *Ct. felis*، *Ct. canis* و کنه *Rhipicephalus bursa* شناسایی شدند (۷). در مطالعه حاضر، بر اساس نتایج مورفولوژیک کک‌های جمع‌آوری شده، ۳ گونه *Ct. felis*، *Ct. canis* و *P. irritans* تشخیص داده شدند، که گونه *P. irritans* با درصد فراوانی ۶۱/۸ درصد نسبت به دو گونه *Ct. felis* و *Ct. canis* فراوانی بیشتر و گونه *Ct. felis* دارای کمترین فراوانی بود.

با این حال در مطالعات مختلف، آمار متفاوتی از مقایسه درصد فراوانی سه گونه *Ct. felis*، *Ct. canis* و *P. irritans* جدا شده از سگ‌ها بدست آمده است. برای مثال در مطالعه‌ای که توسط Azarm و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی کک‌های جمع

نتایج حاصل از RFLP با استفاده از آنزیم TaqI نشان داد، که این دو گونه تفاوتی با هم ندارند. بدین ترتیب که آنزیم فوق جایگاه ۲۵۲ از قطعه ژن تکثیر شده COX1 را برش میزند و سبب ایجاد باندهای ۲۵۲، ۱۶۹، ۱۳۱ جفت بازی در *Ct. felis* و *Ct. canis* می‌شود (تصویر ۳).

درخت فیلوژنی حاصل از الگوریتم Maximum Likelihood ژن Cox1 کک‌های *Ct. felis* و *Ct. canis* در تصویر ۴ نشان داده شده است (تصویر ۴).

### بحث

مطالعه حاضر نشان داد که کک‌ها از متداول‌ترین انگل‌های خارجی سگ‌ها به شمار می‌روند. تقریباً در تمام مطالعات انجام شده روی انگل‌های خارجی سگ، کک‌ها گزارش شده‌اند. برای مثال Jafari و همکاران در سال ۲۰۰۸ در شیراز مطالعه‌ای جهت بررسی انگل‌های خارجی قلاده سگ انجام دادند. این مطالعه بر

مطالعه شامل *Ct. felis* و *Ct. canis* بودند که به روش RFLP با استفاده از ژن ITS1 و آنزیم HaeIII از همدیگر تفکیک شدند و سپس زیر گونه‌های آن‌ها مشخص گردید (۱۰). با این حال در مطالعه‌ای که توسط Azarm و همکاران در سال ۲۰۱۶ برای تفکیک دو گونه *Ct. felis* و *Ct. canis* با استفاده از ژن ITS1 و آنزیم HaeIII انجام شد. بر خلاف مطالعه Marrugal و همکاران در سال ۲۰۱۳ این دو گونه با استفاده از این ژن قابل تفکیک از هم نبودند، به علاوه نتایج حاصل از تعیین توالی در مطالعه Azarm و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند دو گونه *Ct. felis* و *Ct. canis* به لحاظ ژنتیکی ۹۹ درصد مشابه هم بودند (۱۰، ۱۰). بزرگ‌ترین و کامل‌ترین مطالعه مولکولی بر روی کک‌ها توسط Whiting و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام گرفت (۱۴). آن‌ها به بررسی ارتباطات فیلوژنتیکی در میان کک‌ها پرداختند و پس از جمع‌آوری ۱۲۸ گونه کک از سراسر جهان با استفاده از ژن‌های 28SrDNA و 18SrDNA آن‌ها را شناسایی مولکولی کرده و در ۱۶ خانواده قرار دادند.

**نتیجه‌گیری:** به طور کلی با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مطالعه Azarm و همکاران در سال ۲۰۱۶، گرچه این دو گونه کک از لحاظ مورفولوژی قابل تفکیک هستند ولی تشخیص مولکولی آن‌ها با استفاده از ژن‌های ITS1 و COX1 در ایران موفقیت آمیز نبوده است. شاید این دو ژن کارایی لازم برای تفکیک این دو گونه را نداشته باشند و لازم است که از ژن‌های دیگری در این خصوص استفاده شود.

### سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد حشره‌شناسی پزشکی است که کلیه اعتبار آن توسط دانشگاه تربیت مدرس پرداخت شده است. نویسندگان مقاله از زحمات آقای دکتر مجید پیرستانی و خانم باغخانی بخاطر کمک‌ها و محبت‌های بی‌شائبه آن‌ها نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

### References

Ctenocephalides spp isolated from dogs in north of Iran. J Entomol Zool Stud, 4(4), 713-717.

آوری شده از سگ‌های شهرستان مشکین شهر انجام شد، گونه‌های *Ct. felis*، *Ct. canis* و *P. irritans* به ترتیب با فراوانی ۹۵/۴۸ درصد، ۱/۲۳ درصد و ۳/۲۸ درصد گزارش شده‌اند (۱).

در طی سال‌های گذشته مطالعات مورفولوژیک زیادی بر روی کک‌های سگ در مناطق مختلف ایران و همچنین کشورهای مختلف دنیا انجام گرفته است. برای مثال مطالعه‌ای توسط Linardi و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی تمایز مورفولوژیکی دو گونه کک سگ و گربه با استفاده از کاراکترهای مورفولوژیک انجام شد (۹). در این خصوص مطالعه Linardi و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد در برخی موارد بعضی خصوصیات مورفولوژیک همچون کتوتاکسی ساق پای عقب از کلید تشخیصی مربوط به گونه مورد نظر تبعیت نمی‌کند و در نهایت این نتیجه حاصل شد که در تشخیص مورفولوژیک با در نظر گرفتن تمام کاراکترهای تشخیصی (از جمله تصویر سر، اندازه خار اول و دوم شانه گونه‌ای، تعداد خار روی LMA، تعداد گره در ساق پا، کتوتاکسی پا، تعداد خار در ناحیه پشتی پای عقبی، تصویر قبضه کلاسر و...) می‌توان تصمیم‌گیری مطمئن و صحیح داشت (۹).

در مطالعه مولکولی با استفاده از ژن COX1، کک‌های جنس کتنوسفالیدس شناسایی شدند، با این حال علیرغم مطالعه‌ای که توسط Lawrencea و همکاران در سال ۲۰۱۵ مبنی بر تفکیک دو گونه *Ct. felis* و *Ct. canis* با استفاده از ژن مذکور انجام شد (۸)، در مطالعه حاضر بین گونه‌های این جنس تفکیکی حاصل نشد و توالی‌های به دست آمده نشان داد توالی گونه *Ct. felis* در این جایگاه ژنی به احتمال ۹۹ درصد مشابه گونه *Ct. canis* است.

در مطالعه Hornok و همکاران در سال ۲۰۱۸ که بر روی کک‌های گوشتخواران اهلی و وحشی، جوندگان، انسان و محیطی جمع‌آوری شده از پنج کشور جهان انجام شد، شباهت زیادی در ژن‌های مختلف در هر دو گونه بر اساس آزمایش‌های PCR و ترادف بازی مشاهده شد (۴). Marrugal و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطالعه‌ای برای بررسی و جدا سازی گونه‌ها و زیرگونه‌های کک‌های سگ و گربه با روش‌های مورفولوژیک و مولکولی انجام دادند. در این مطالعه کک‌های مورد ارزیابی از سه کشور ایران، آفریقای جنوبی و اسپانیا بود. گونه‌های تشخیص داده شده در این

1. Azarm, A., Dalimi, A., Mohebbi, M., Mohammadiha, A., Zarei, Z. (2016). Morphological and molecular characterization of

- central Europe. *Vet Parasitol*, 210, 215–223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.029>
9. Linardi, P., Lúcia, J., Santos, C. (2012). *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. *Rev. Bras. Parasitol. Vet Jaboticabal*, 21(4), 345-354. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612012000400002>
  10. Marrugal, A., Callejon, R., Rojas, M.De., Halajian, A., Cutillas, C. (2013). Morphological, biometrical, and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitol Res*, 112, 2289-2298. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3391-6>
  11. Rothschild, M., Schlein, S. (1986). *A Colour Atlas of Insect Tissues Via the Flea*. (1<sup>st</sup> ed.) Wolfe Pub Press, Weert, Netherlands.
  12. Vobis, M., D'Haese, J., Mehlhorn, H., Mencke, N., Blagborn, B.L., Bond, R., Denholm, I., Dryden, MW., Payne, P., Rust, M.K., Schroeder, I., Vaughn, MB., Bledsoe, D. (2004). Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. *Parasitol Res*, 94(3), 219-226. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1201-x>
  13. Wall, R., Shearer, D. (2001). *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control*. (2<sup>nd</sup> ed.) Blackwell Science Ltd, London, UK.
  14. Whiting, M.F., Whiting, A.S., Hastriter, M.W., Dittmar, K. (2008). A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. *Cladistics*, 24, 677–707. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00211.x>
  2. Chomel, B.B., Boulouis, H.J., Maruyama, S., Breitschwerdt, E.B. (2006). *Bartonella* spp in pets and effect on human health. *Emerg Infect Dis*, 12, 389–94. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1203.050931> PMID: [16704774](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16704774/)
  3. Grimaldi, D., Enged, M.S. (2005). *Evolution of the Insect*. (1<sup>st</sup> ed.) Cambridge University Press, New York, USA.
  4. Hornok, S., Beck, R., Farkas, R., Grima, A., Otranto, D., Kontschán, J., Takács, N., Horváth, G., Szőke, K., Szekeres, S., Majoros, G., Juhász, A., Salant, H., Hofmann-Lehmann, R., Stanko, M., Baneth G. (2018). High mitochondrial sequence divergence in synanthropic flea species (Insecta: Siphonaptera) from Europe and the Mediterranean. *Parasites & Vectors*, 11, 221. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-018-2798-4> PMID: [29609620](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29609620/)
  5. Ish-Horowicz, D., Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids, Res*, 9, 2989-2998.
  6. Jafari Shoorijeh, S., Rowshan, Gh.A., Tamadoni, A., Moghaddar, N., Behzadi, M. (2008). Seasonal frequency of ectoparasit infestation in dogs from Shiraz, southern Iran. *Turk J Vet Anim Sci*, 32(4), 309-313.
  7. Jamshidi, Sh., Maazi, N., Ranjbar-Bahadori, Sh., Rezaei, M. (2012). A survey of ectoparasite infestation in dogs in Tehran, Iran. *Rev Bras Parasitol Vet Jaboticabal*, 21(3), 326-329. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612012000300030> PMID: [23070452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23070452/)
  8. Lawrencea, A.L., Hii, S.F., Jirsova, D., Panakova, L., Ionica, A.M., Gilchrist, K., Modry, D., Mihalca, A.D., Webb, C.E., Traub, R.J., Slapeta, J. (2015). Integrated morphological and molecular identification of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and dog fleas (*Ctenocephalides canis*) vectoring *Rickettsia felis* in



## Morphological and Molecular Study on Ctenocephalides Fleas Isolated from Stray Dogs in Tehran

Sara Azadbeh<sup>1</sup>, Abdolhossein Dalimi<sup>2</sup>, Shahram Jamshidi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Graduated from the Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

doi 10.22059/jvr.2020.227440.2586

Received: 10 March 2021, Accepted: 19 May 2021

### Abstract

**BACKGROUND:** Various flea species have already been reported from dogs, among which the most important ones include *Ct. felis*, *Ct. canis*, and *P. irritans*. Fleas can cause annoyance in dogs and human and transmit a variety of bacterial, fungal, and viral agents to the host. In addition, they could function as an intermediate host of *Dipylidium caninum* and *Hymenolepis diminuta*.

**OBJECTIVES:** Due to the lack of molecular species-associated identification data, we conducted the current study to differentiate *Ct. felis* and *Ct. canis* with molecular assay.

**METHODS:** In the present study, 605 fleas were primarily collected from the dogs referred to Tehran Veterinary Faculty hospital. Subsequently, the flea species were identified under a microscope with morphological keys. Afterwards, COX1 genes of *Ct. felis* and *Ct. canis* were amplified via PCR and the locus was finally compared utilizing RFLP and sequencing.

**RESULTS:** Totally, 605 fleas were isolated from 20 dogs. In morphological studies, three species were identified: *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, *Pulex irritans*. *Pulex irritans* had the highest frequency (61.8 %). In molecular study, 552 bp fragment of COX1 gene in two species was amplified and seen on agarose gel. After sequencing, it was seen that two species sequences in COX1 locus had a similarity of 99 % and all of them depended on *Ct. canis*. In PCR-RFLP, in which Taq1 enzyme was used for differentiation of two species, the same result was obtained.

**CONCLUSIONS:** Even though these two species of dog flea are distinct morphologically, their molecular differentiation using COX1 genes was not successful.

**Keywords:** *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*, Dog, COX1, Gene

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: dalimi\_a@modares.ac.ir Tel/Fax: 021-82883838/021-82883568

### How to cite this article:

Azadbeh, S., Dalimi, A., Jamshidi, S. (2021). Morphological and Molecular Study on Ctenocephalides Fleas Isolated from Stray Dogs in Tehran. J Vet Res, 76(2), 154-161. <https://doi.org/10.22059/jvr.2020.227440.2586>

### Figure Legends and Table Captions

**Figure 1.** A: Position of head and length of the first spiny bristle from the comb in *Ct. canis*. B: Position of head and length of the first spiny bristle from the comb in *Ct. felis*. C: Number of spines between Apical Setae and Postmidian setae on the back leg in *Ct. canis*. D: Number of spines between Apical Setae and Postmidian setae on the back leg in *Ct. felis*.

**Figure 2.** PCR product electrophoresis of the COX1 gene of fleas, in which the 552 bp fragment was amplified. Lanes 1 to 6 of *Ct. canis*, 7 and 8 of *Ct. felis*.

**Figure 3.** Electrophoresis of the PCR product of the COX1 gene of fleas, in which a fragment of 552 bp was cut using the Taq1 enzyme. Lanes 1 and 2 of *Ct. felis*, 3 to 8 of *Ct. canis*.

**Figure 4.** The phylogeny tree derived from the Maximum Likelihood algorithm of the Cox1 gene for *Ct. canis* and *Ct. felis*, in which genotypes of isolates of this study is shown by \*.