مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۶، شماره ٤، مهر و آبان ۱٤۰۰(شماره پی در پی ۱٤۷)

بررسی اختلاف مولکولی و فیلوژنی ککهای *کتنوسفالیدس کنیس* و *پولکس ایریتانس* در غرب و شمال غرب ایران بر اساس نشانگر مولکولی سیتوکروم اکسیدازI

شهین صیدی، موسی توسلی[*]، فرناز ملکی فرد

[۱]گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ وصول: ۱٤۰۰/۰۲/۲٦ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۰٦/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: ککهای خانواده پولیسیده یکی از مهمترین انگلهای خارجی انسان و دامهای اهلی در جهان هستند. این حشرات علاوه بر خونخواری ناقل برخی عوامل بیماریزا مانند *برسینیا پستیس*، *ریکتزیا تایفی* و *بارتونلا هنسله* به انسان و حیوانات میباشند. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی فون ککهای *کتنوسفالیدس کنیس* و *پولکس ایریتانس* در غرب و شمال غرب ایران بر اساس نشانگر میتوکندریایی سیتوکروم اکسیدازI بود.

روش بررسی: بررسی حاضر یک نوع مطالعه توصیفی ـ مقطعی و فونستیک میباشد، که با در نظر گرفتن شیوع ۱۰ درصد و سطح اطمینان ۹۵ درصد و میزان خطای ۵ درصد، به مدت ۱۳ ماه از اردیبهشت ۱۳۹۷ تا خرداد ۱۳۹۸ در پنج استان کرمانشاه، کردستان، آذربایجان غربی، لرستان و همدان انجام شد. در این مطالعه نمونهها به روش تلهنوری، طعمه انسانی و جداسازی مستقیم نمونه از میزبان جمعآوری شد. نمونهها داخل الکل ۷۰ درصد نگهداری شدند و در آزمایشگاه انگلشناسی با استفاده از کلیدهای تشخیص معتبر مورد شناسایی قرار گرفتند. پس از استخراج DNA و انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز(PCR) تعداد۲۰ نمونه برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال شد. توالیهای مورد نظر با استفاده از نرم افزار ایمباس نیدل و امگا همردیف سازی شده و مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافتهها: نمونههای جمعآوری شده شامل ۹۱۸ (٤۷/۳۹ درصد) کک *کتنوسفالیدس کنیس* و ۱۰۱۹ (۵۲/٦۰ درصد) کک *پولکس ایریتانس* بودند. نتایج بررسیهای مرفولوژیک نشان داد که اختلاف درون گونهایی بین گونههای ککها جدا شده از میزبانهای مختلف وجود ندارد($p<۰/۰۵$)، اما اختلاف درون گونهای براساس نشانگر مولکولی سیتوکروم اکسیدازI برای ده جمعیت مورد مطالعه در کک *پولکس ایریتانس* ۰/۱۵ درصد و در کک *کتنوسفالیدس کنیس* صفر بود. اختلاف بین دو جنس کک *کتنوسفالیدس کنیس* و *پولکس ایریتانس* براساس نشانگر مولکولی سیتوکروم اکسیدازI، ۱٤ درصد بود.

نتیجهگیری: مشخصات مرفولوژیک بین نمونههای جمعآوری شده از میزبانهای مختلف تفاوت معنیداری را نشان نداد، اما تفاوت جزئی بر اساس نشانگر میتوکندریایی در جمعیتهای مورد مطالعه وجود داشت. نتایج حاصل از ترسیم درخت فیلوژنی بر اساس نشانگر میتوکندریایی نشان داد علیرغم تفاوت جزئی در توالی میزبانها و شهرستانهای مختلف، همه نمونههای مناطق مختلف در یک شاخه قرار میگیرند. نتایج تجزیه و تحلیل ژنوم میتوکندریایی نشان داد که این قطعات برای نشان دادن شباهت درون گونهایی، تمایز در سطح گونه و جنس مفید هستند.

واژههای کلیدی: کک، *پولکس ایریتانس*، *کتنوسفالیدس کنیس*، سیتوکروم اکسیدازI

***نویسنده مسئول: موسی توسلی،** ارومیه، دانشگاه ارومیه، گروه پاتوبیولوژی

Email: m.tavassoli@urmia.ac.ir

مقدمه

ککها حشراتی بسیار ریز، از پهلو فشرده و بدون بال هستند، این حشرات دارای سیر تکاملی کامل و متعلق به راسته سیفوناپترا هستند. همه گونه‌های کک در مرحله بالغ انگل هستند و برخی از این گونه نقش متفاوتی در انتقال و همزیستی با عوامل بیماری‌زا دارند، بر این اساس شناسایی دقیق گونه‌های کک ضروری است. تاکنون ۲۵۷٤ گونه کک شناسایی شده، که در ١٦ خانواده و ۲۳۸ جنس قرار می‌گیرند(۱). ککهای بالغ از طریق نیش زدن، مدفوع و بزاق در انتقال برخی عوامل بیماری‌زا مانند؛ طاعون، تیفوس اندمیک، تیفوس موشی، تب*Q*، تولارمی و *بارتونلا هنسله* نقش دارند. علاوه بر این نیش این حشرات ممکن است باعث خارش و عفونت‌های پوستی شود. همچین ککها در مرحله لاروی که ضمایم دهانی جونده دارند می‌توانند میزبان واسط کرم‌های نواری(سستودها) باشند(٤-۲).

مهم‌ترین بیماری که به وسیله ککها انتقال پیدا می‌کند بیماری طاعون است. عامل این بیماری *یرسینیا پستیس* است که یک بیماری مشترک بین جوندگان و انسان است. اگر چه شیوع این بیماری در سراسر جهان کم اهمیت است و گزارش سالانه این بیماری ۲۰۰۰ مورد است(٥)، اما چرخه انزوتیک این بیماری در برخی مناطق مانند غرب آسیا، آفریقا و مرکز و شمال آمریکا وجود دارد. اپیدمی این بیماری مانند سایر عوامل بیماری‌زا تحت تأثیر افزایش گرمای کره زمین، مسافرت و افزایش جمعیت است(٨-٦). با توجه به این که ایران در گذشته تاریخچه اپیدمی بیماری طاعون در استان کردستان را دارد و ناقل این بیماری ککهای خانواده پولیسیده هستند(۹)، بنابراین شناسایی دقیق فون ککها در کشور ضروری است. در سال‌های اخیر جهت بررسی فون ککها در مناطق مختلف کشور پژوهش‌های مشابهی انجام شده که در این پژوهش‌ها نیز بیشترین گونه جدا از میزبان‌های مختلف مربوط به دو گونه *پولکس ایریتانس* و *کتنوسفالیدس کنیس* می‌باشد(۱۲-۹). بر اساس اطلاعات موجود و پژوهش‌های اخیر تاکنون ۱۱۷ گونه و زیر گونه کک در ایران شناسایی شده است(۱۳).

شناسایی گونه‌های کک بر اساس مشخصات مرفولوژیک انجام می‌شود. با توجه به متنوع و نزدیک بودن مشخصات مرفولوژیک شناسایی دقیق گونه‌ها و زیرگونه‌های کک براساس مشخصات مورفولوژیک مشکل است. محققین برای حل این مشکل از نشانگرهای مولکولی شامل ژن‌های میتوکندریایی و ژن‌هایی ریبوزومی هسته‌ای استفاده کرده‌اند(۱۷-۱٤).

منطقه غیرقابل کد شدنی که به طور گسترده در ککها مورد استفاده قرار گرفته است، اولین و دومین منطقه جداکننده رونویسی شده داخلی متعلق به خوشه ژنومی ریبوزم هسته‌ای می‌باشد. این خوشه شامل؛ سه ژن 18S rDNA, 5.8S rDNA, 28S rDNA است که به RNA رونویسی شده، اما به پروتئین ترجمه نمی‌شوند. این سه ژن rDNA به عنوان یک رونوشت منفرد RNA رونویسی می‌شوند که به وسیله دو منطقه از یکدیگر جدا شده(ITS1, ITS2)، از آنجایی که این

مناطق عملکردی ندارند، این توالی‌ها، تحت فشار انتخابی بسیار اندکی قرار داشته و می‌توانند جایگزینی‌ها را کسب کنند. این مسأله در تمایز میان گونه‌های مرتبط نزدیک به هم بسیار مفید است(۱۸).

ژن‌های میتوکندریایی به طور گسترده در بررسی‌های سیستماتیک مولکولی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. زیاد بودن تعداد نسخه‌های این ژن‌ها، کار کردن با آنها را در مقایسه با ژن‌های هسته‌ای تک نسخه‌ای ساده‌تر ساخته و وراثت مادری دقیق آنها به ویژه در سطح دورن گونه‌ای مفید بوده است. ژن‌های میتوکندریایی به دو گروه تقسیم‌بندی می‌شوند؛ ژن‌های ریبوزومی و ژن‌های کد کننده پروتئین‌ها نشانگر میتوکندریایی سیتوکروم اکسیدازI بزرگ‌ترین ژن کد کننده پروتئین در یوکاریوت‌ها است. محققین زیادی از این توالی برای نشان دادن اختلاف درون گونه‌ایی، تشخیص جنس و گونه کک‌ها استفاده کرده‌اند(۱۹).

در مناطق غرب و شمال غرب ایران دامپروری به شیوه سنتی است، با توجه به تماس نزدیک انسان و حیوانات اهلی، بررسی انگل‌های خارجی مخصوصاً کک‌ها که دارای میزبان کاملاً اختصاصی نیستند، از اهمیت بالایی برخوردار است. هدف از این مطالعه، تعیین و بررسی فون کک‌ها، نشان دادن اختلاف درون گونه‌ای و اختلاف فیلوژنی بین دو گونه کک *کتنوسفالیدس کنیس* و *پولکس ایریتانس* بر اساس نشان‌گر سیتوکروم اکسیدازI در پنج استان غرب و شمال غرب ایران است.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی و فونستیک می باشد که به مدت ۱۳ ماه از اردیبهشت ۱۳۹۷ تا خرداد ۱۳۹۸ در پنج استان در غرب و شمال غرب کشور انجام شد. تعداد ۱۹۳۷ نمونه کک بالغ به روش‌های تله نوری، طعمه انسانی و جدا سازی مستقیم از بدن دام و انسان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به همراه الکل ۷۰ درصد به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه ارسال شدند و با استفاده از کلیدهای تشخیص معتبر برای کک‌های ایران تعیین هویت شدند(۲۰) و از هر شهرستان یک نمونه و در مجموع تعداد ۲۰ نمونه جهت تأیید تشخیص و بررسی اختلاف مولکولی بر اساس ژن سیتوکروم اکسیدازI در میکروتیوپ استریل نگهداری شدند.

طبق پژوهش‌های هواشناسی ایران دارای چهار منطقه آب و هوایی شامل؛ حاشیه اطراف دریای خزر، مناطق کوهستانی، حاشیه اطراف خلیج فارس و نواحی کویر مرکزی است(۲۱). این مطالعه در پنج استان کرمانشاه، کردستان، آذربایجان غربی، لرستان و همدان از منطقه کوهستانی در غرب و شمال غرب ایران انجام شد(شکل ۱). در شمال غربی کشور زمستان خیلی سرد همراه با بارش سنگین برف و دما زیر صفر است. این منطقه دارای پاییز و بهار نسبتاً معتدل و تابستان گرم و خشک می‌باشد. درمناطق غربی کشور هوا سرد و مرطوب است. بنابراین زمستان سرد و تابستان گرم است. میزان بالای بارش

سالانه و پوشش گیاهی مناسب در این نواحی شرایط را برای پرورش دام‌های اهلی مساعد کرده است. دام‌هایی که به طور معمول در این مناطق پرورش داده می‌شود، شامل گاو، گوسفند، بز و اسب است.

ابتدا استخراج DNA به روش پروتئیناز k با استفاده از کیت انتقال سیتم بیولوژیکی مولکولی(MBST)[1] ایران و طبق دستور شرکت سازنده انجام شد. لازم به ذکر است که برای استخراج DNA از یک نمونه کک بالغ استفاده شد. بعد از استخراج DNA تا زمان انجام واکنش PCR، نمونه‌های DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. برای انجام واکنش PCR از پرایمرهای طراحی شده به وسیله فولمر و همکاران استفاده شد(۲۲)(جدول۱).

واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل؛ ۵ میکرولیتر DNA، ۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ٤ میکرولیتر MgCl2 با غلظت ۵۰ میلی مولار ، ۱ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۰ میکرومولار و ۱ میکرولیتر آنزیم تگ پلی مراز (Tag polymerase) انجام گرفت. برنامه مورد استفاده برای واکنش PCR شامل یک واسرشت ابتدایی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و بعد از آن ۳۵ چرخه تکرار که هر چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه(مرحله واشرست اولیه)، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه (مرحله اتصال پرایمر) و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه (مرحله طویل شدن) و مرحله نهایی طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. پس انجام واکنش PCR محصول واکنش روی ژل ۱/۵ درصد آگارز الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی زیر نورفرابنفش عکس‌برداری شد و محصول PCR با استفاده از کیت MBST ایران تخلیص و ۲۰ نمونه برای تعیین توالی برای شرکت تکاپو زیست ارسال گردید.[۱۰]

۲۰ نمونه محصول PCR برای تعین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد و نتیجه تعیین توالی با توجه به میزبان و مناطق جغرافیایی جمع‌آوری شده در NCBI به صورت آنلاین جهت دریافت شماره دست‌رسی ثبت شد. تجزیه و تحلیل داده ها در نهایت با بلاست کردن توالی‌ها در سایت NCBI و ترسیم درخت فیلوژنتیک با نرم افزار Mega ورژن ٦ بر اساس روش حداکثر احتمال با بوت استرپ ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد و خوشه بندی‌ها به روش زوریت و همکاران انجام شد(۱۷)، در نهایت جهت بررسی درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی ژنوم میتوکندریایی در دو گونه، در استان‌ها و میزبان‌های مختلف توالی‌های مورد نظر با استفاده از نرم افزار ایمباس نیدل و امگا هم‌ردیف سازی شده و مورد مقایسه قرارگرفتند.

1- Molecular Biological System Transfer(MBST)

شکل ۱: استان‌های بررسی اخیر در غرب و شمال غرب ایران

جدول۱: توالی نوکلئوتیدی و مشخصات پرایمرهای طراحی شده

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی پرایمر	دمای اتصال (°C)	اندازه(bp)	منبع
سیتوکروم اکسیداز I	Sen: GGT CAA CAA ATC ATA AAGATA TTGG Rev: GAA GGG TCA AAG AAT GAT GT	C۵۵	bp۷۰۰	فولمر و همکاران ۱۹۹٤

یافته‌ها

در مجموع۱۹۳۷ نمونه کک بالغ جمع‌آوری شد. پس از بررسی‌های مرفولوژیک با استفاده از کلیدهای تشخیص معتبر برای کک‌های ایران از ۱۹۳۷ نمونه ۱۰۱۹ نمونه به عنوان *پولکس ایریتانس*(۵۲/٦۱ درصد) و ۹۱۸ نمونه به عنوان *کتنوسفالیدس کنیس*(٤۷/۳۹ درصد) تشخیص داده شد. نمونه‌ها به روش‌های تله نوری، طعمه انسانی و جداسازی مستقیم از میزبان، از انسان، امکان انسانی و حیوانات اهلی که به صورت سنتی پروش داده می‌شود و با انسان در ارتباط هستند، جمع‌آوری شد. تعداد کلی نمونه‌ها بر حسب استان و میزبان در جدول ۲ و ۳ مشخص شده است. در ارتباط با کک *پولکس ایریتانس* انسان و اماکن انسانی به ترتیب ۲۰/۵ و ۱۰ درصد آلودگی را به خود اختصاص دادند، اما در مورد کک *کتنوسفالیدس کنیس* ۱۱/۳ درصد نمونه‌ها مربوط به انسان و ۱۰/۲ درصد از امکان انسانی جدا شد(جداول ۳ و ۲).

استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن سیتوکروم اکسیدازI (Sen, Rev) در ۲۰ نمونه DNA استخراج شده، موجب تکثیر و تولید قطعه ۷۰۰bp شد، که نتیجه واکنش PCR به شکل باند ۷۰۰bp روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده شد(شکل ۳ و ۲).

پس از تعیین توالی نمونه‌های خالص شده محصول PCR مربوط به ژن سیتوکروم اکسیدازI برای دو جنس *پولکس ایریتانس* و *کتنوسفالیدس کنیس*، با هم‌ردیف‌سازی توالی رشته‌هایForward با مکمل و برعکس رشته‌های Revers با استفاده از نرم‌افزار Mega ورژن ٦ اندازه دقیق قطعات تکثیر شده به دست آمد. پس از حذف ٣٤ نوکلئوتید ابتدای قطعه توالیbp ٦٧٦ در بانک ژن ثبت(Gen Bank) گردید.

مقایسه نتایج تعیین توالی ژن سیتوکروم اکسیدازI برای کک *پولکس ایریتانس* در پنج استان (ID: MN173749-MN173770) مورد مطالعه نشان داد که تشابه درون گونه‌ای با توجه به این توالی، ۹۹/۸٦ درصد بوده و همه نمونه‌ها متعلق به گونه *پولکس ایریتانس* بودند. هم‌چنین پس از هم‌ردیف‌سازی توالی اسیدهای آمینه ژن سیتوکروم اکسیدازI این توالی‌ها ۹۹/۸٦ درصد تشابه نشان دادند و تنها یک تفاوت در

اسید آمینه شماره ٥٤ وجود داشت که در استان همدان این اسید آمینه ایزولوسین و در بقیه استان‌ها اسیدآمینه متیونین بود(شکل ٤).

مقایسه نتایج تعیین توالی ژن سیتوکروم اکسیدازI برای کک *کتنوسفالیدس کنیس* در پنج استان مورد مطالعه نشان داد که تشابه درون‌گونه‌ای با توجه به این توالی۱۰۰درصد بوده و همه نمونه‌ها متعلق به گونه *کتنوسفالیدس کنیس* بودند.

توالی‌های نوکلئوتیدی کک‌های مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار ایمباس نیدل هم‌ردیف‌سازی شده و مورد مقایسه قرار گرفتند. شباهت ترادف نوکلئوتیدی بین کک‌های *کتنوسفالیدس کنیس* و *پولکس ایریتانس* با این نرم افزار ۸۷/۲۸ درصد محاسبه شده است و این دو توالی در۸٦ نوکلئوتید با هم دیگر اختلاف داشتند(شکل ٥). هم‌چنین پس از هم‌ردیف‌سازی توالی اسیدهای آمینه ژن سیتوکروم اکسیدازI این توالی‌ها ۹٤/۲ درصد تشابه نشان دادند(شکل ٦). بر اساس نتایج، این همردیف‌سازی ژن سیتوکروم اکسیدازI برای تفکیک دو گونه کک *کتنوسفالیدس کنیس* و *پولکس ایریتانس* و نشان دادن تشابه درون گونه‌ایی سودمند است.

رسم درخت فیلوژنی براساس شباهت بین توالی‌های مطالعه اخیر و توالی ثبت شده در بانک ژن ۲ کلاد تشکیل می‌دهد. کک *کتنوسفالیدس کنیس* و *پولکس ایریتانس* مطالعه اخیر در کلاد A و کک‌های *چتوپسیلا* و *نزوپسیلوس* در کلاد B قرار می‌گیرند. کلاد A شامل ٤ شاخه است که در شاخه A1 کک *پولکس ایریتانس* مطالعه اخیر به همراه کک *پولکس ایریتانس* کشور در پژوهش‌های گذشته و ایزوله کشورهای ترکیه، اسپانیا، چین، کرواسی و سرزمین‌های جولان قرار گرفتند. شاخه A2 وA3 به

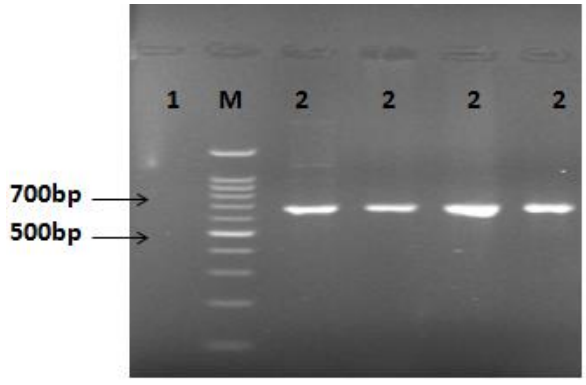
ترتیب شامل گونه *کتنوسفالیدس فلیس* و *کتنوسفالیدس اورینتالیس* می‌باشد. کک‌های *کتنوسفالیدس کنیس* مطالعه اخیر و کک *کتنوسفالیدس کنیس* کشور در پژوهش‌های گذشته شاخه A4 را به خود احتصاص دادند و توالی گونه *گزنوپسیلا* به عنوان توالی خارج گروهی در نظر گرفته شد(شکل ۷).

جدول ۲: شماره دست رسی ژن سیتوکروم اکسیداز I کک *پولکس ایریتانس* و میزبان‌های مختلف در غرب و شمال غرب ایران

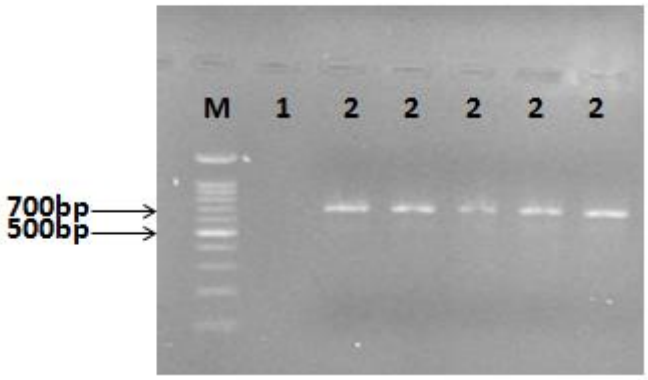
استان	شهرستان	طول و عرض جغرافیایی	گونه کک	تعداد کک	میزبان				شماره دست‌رسی
					گوسفند	بز	انسان	سگ	خانه	
کرمانشاه	کرمانشاه	34.1397° N, 45.9206° E	*پولکس ایریتانس*	۷۶(۳/۹)	۱۹(۲۵)	۳۱(۴۰/۷)	۶(۷/۸)	۱۶(۲۱)	٤(۵/۲)	MN173749.1
	گیلانغرب	34.3277° N, 47.0778° E	*پولکس ایریتانس*	۹٤(٤/۸)	۱٦(۱۷)	۳۰(۳/۱)	۲۰(۲/۱)	۹(۹/۵)	۱۹(۲۰)	MN173752.1
کرستان	سنندج	35.3219° N, 46.9862° E	*پولکس ایریتانس*	۹۲(٤/۷)	۱۵(۱٦/۳)	٤۰(٤/۳)	۱۵(۱٦/۳)	۱۵(۱٦/۳)	۷(۷/٦)	MN173760.1
	کامیاران	34.7956° N, 46.9368° E	*پولکس ایریتانس*	۸۱(٤/۱)	۱۳(۱٦)	۲۰(۲٤/٦)	۲۷(۳۳/۳)	۹(۱۱/۱)	۱۲(۱٤/۸)	MN173754.1
آذربایجان	ارومیه	37.5498° N, 45.0786° E	*پولکس ایریتانس*	۱۷۵(۹)	۳٤(۱۹/٤)	٤۰(۲۲/۸)	۳۲(۱۸/۲)	٦٤(۳٦/۵)	۵(۲/۸)	MN173761.1
غربی	مهاباد	36.7684° N, 45.7337° E	*پولکس ایریتانس*	۹۵(٤/۹)	۱۷(۱۷/۸)	۲۸(۲۹/٤)	۱۵(۱۵/۷)	۲٦(۲۷/۳)	۹(۹/٤)	MN173758.1
همدان	همدان	34.9083° N, 48.4393° E	*پولکس ایریتانس*	۷۹(٤)	۱۳(۱٦/٤)	۱۰(۱/٤)	۱۹(۲٤)	۲۲(۲۷/۸)	۱۵(۱۸/۹)	MN173753.1
	بهار	34.9083° N, 48.4393° E	*پولکس ایریتانس*	۱۰۱(۵/۲)	۳۰(۲۹/۷)	۱٦(۱۵/۸)	۲۷(۲٦/۷)	۱۳(۱۲/۸)	۱۵(۱٤/۸)	MN173751.1
لرستان	خرم آباد	33.4647° N, 48.3390° E	*پولکس ایریتانس*	۹۸(۵)	۱۹(۱۹/۳)	٤۷(٤۷/۹)	۱۸(۱۸/۳)	۱(۱)	۱۳(۱۳/۲)	MN173756.1
	کوهدشت	33.5275° N, 47.6111°E	*پولکس ایریتانس*	۱۲۸(٦)	۲۸(۲۱/۸)	۲۳(۱۷/۹)	۳۰(۲۳/٤)	٤٤(۳٤/۳)	۳(۲/۳)	MN173757.1

جدول ۳: شماره دست رسی ژن سیتوکروم اکسیداز I کک *کتنوسفالیدس کنیس* و میزبان های مختلف در غرب و شمال غرب ایران

استان	شهرستان	طول و عرض جغرافیایی	گونه کک	تعداد کک	میزبان				شماره دست‌رسی
					گوسفند	بز	انسان	سگ	خانه	
کرمانشاه	کرمانشاه	34.1397° N, 45.9206° E	کتنوسفالیدس کنیس	۱۱۲(۵/۸)	۱٤(۱۲/۵)	۵۳(٤۷/۳)	۸(۷/۱)	۳٤(۳۰/۳)	۳(۲/٦)	MN173767.1
	گیلانغرب	34.3277° N, 47.0778° E	*کتنوسفالیدس کنیس*	۱۳۱(٦/۷)	۱٦(۱۲/۲)	٤۰(۳۰/۵)	۸(٦/۱)	۵۷(٤۳/۵)	۱۰(۷/٦)	MN173764.1
کرستان	سنندج	35.3219° N, 46.9862° E	*کتنوسفالیدس کنیس*	۱۰۱(۵/۲)	۲۵(۲٤/۷)	۲۳(۲۲/۷)	۱۰(۹/۹)	۳۵(۳٤/٦)	۸(۷/۹)	MN173770.1
	کامیاران	34.7956° N, 46.9368° E	*کتنوسفالیدس کنیس*	٦٦(۳/٤)	۹(۱۳/٦)	۱۵(۲۲/۷)	۱۷(۲۵/۷)	۱٤(۲۲/۲)	۱۱(۱٦/٦)	MN173766.1
آذربایجان	ارومیه	37.5498° N, 45.0786° E	*کتنوسفالیدس کنیس*	۱۰۲(۵/۲)	۳٦(۳۵/۲)	۱٤(۱۳/۷)	۲۳(۲۲/۵)	۱٤(۱۳/۷)	۱۵(۱٤/۷)	MN173771.1
غربی	مهاباد	36.7684° N, 45.7337° E	*کتنوسفالیدس کنیس*	۵۹(۳)	۹(۱۵/۲)	۳۰(۵۰/۸)	٦(۱۰/۱)	۱٤(۲۳/۷)	۷(۱۱/۸)	MN173769.1
همدان	همدان	34.9083° N, 48.4393° E	*کتنوسفالیدس کنیس*	۱٤۱(۷/۲)	۱۵(۱۰/٦)	٤۳(۳۰/٤)	۱۰(۷)	۵۷(٤۰/٤)	۱٦(۱۱/۳)	MN173765.1
	بهار	34.9083° N, 48.4393° E	*کتنوسفالیدس کنیس*	۸۳(٤/۲)	۱۷(۲۰/٤)	۳٦(٤۳/۳)	۱۲(۱٤/٤)	۱۰(۱۲)	۱۵(۱۸)	MN173763.1
لرستان	خرم آباد	33.4647° N, 48.3390° E	*کتنوسفالیدس کنیس*	۷۹(٤)	۱۷(۲۱/۵)	۱۷(۲۱/۵)	۳(۳/۷)	۳۸(٤۸/۱)	۲(۲/۵)	MN173768.1
	کوهدشت	33.5275° N, 47.6111°E	*کتنوسفالیدس کنیس*	٤٤(۲/۲)	۹(۲۰/٤)	۸(۱۸/۱)	۷(۱۵/۹)	۱۳(۲۹/۵)	۷(۱۵/۹)	MN173762.1



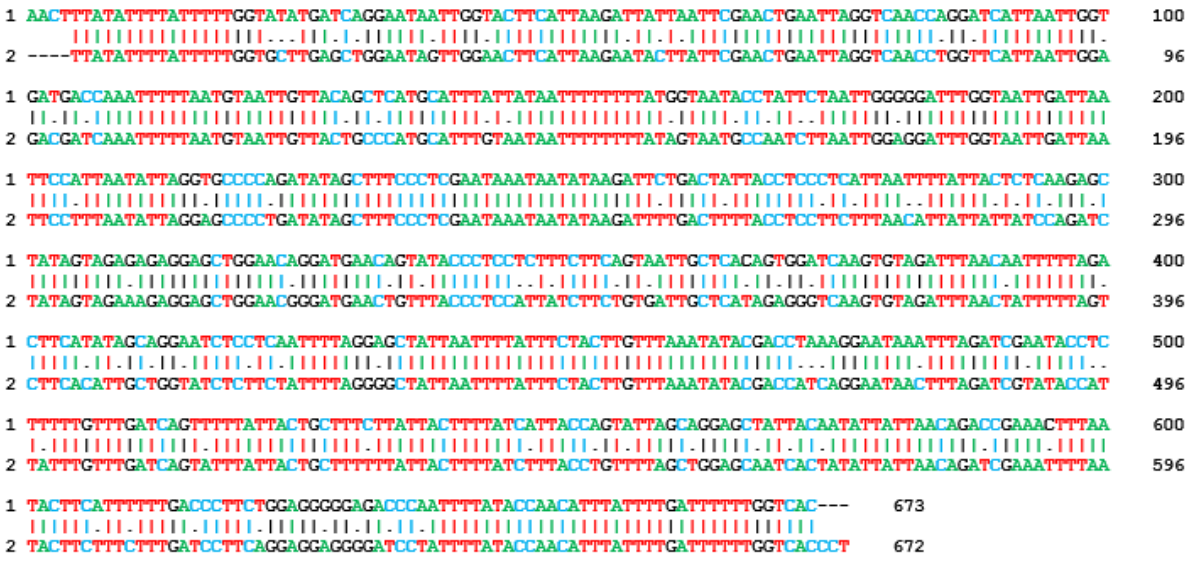
شکل۲: تصویر الکتروفورز ژل آگارز مربوط به تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز I در کک *کتنوسفالیدس کنیس* با پرایمر های اختصاصی که تولید قطعه ۷۰۰bp کردند. شماره ۱ مربوط به کنترل منفی، شماره ۲ مربوط به نمونه‌های مثبت ژن سیتوکروم اکسیداز I و M ماکر۱۰۰bpمی‌باشد.



شکل۳: تصویر الکتروفورز ژل آگارز مربوط به تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز I در کک *پولکس ایریتانس* با پرایمرهای اختصاصی که تولید قطعه ۷۰۰bp کردند. شماره ۱ مربوط به کنترل منفی، شماره ۲ مربوط به نمونه های مثبت ژن سیتوکروم اکسیداز I و M ماکر۱۰۰bpمی‌باشد.

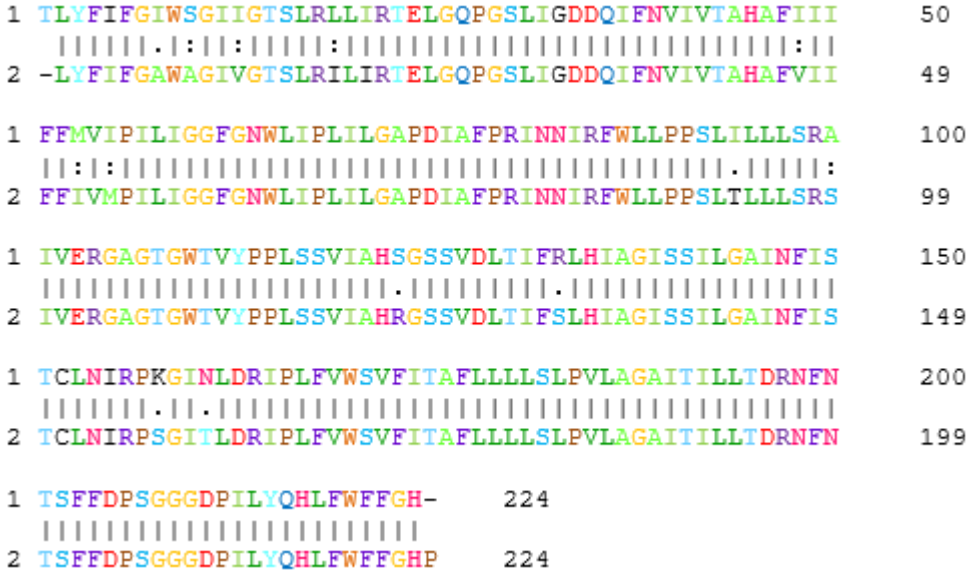
```
1 LYFIFGAWAGIVGTSLRILIRTELGQPGSLIGDDQIFNVIVTAHAFVIIF    50
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2 LYFIFGAWAGIVGTSLRILIRTELGQPGSLIGDDQIFNVIVTAHAFVIIF    50

1 FIVMPILIGGFGNWLIPLILGAPDIAFPRINNIRFWLLPPSLTLLLSRSI    100
  |||:||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2 FIVIPILIGGFGNWLIPLILGAPDIAFPRINNIRFWLLPPSLTLLLSRSI    100

1 VERGAGTGWTVYPPLSSVIAHRGSSVDLTIFSLHIAGISSILGAINFIST    150
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2 VERGAGTGWTVYPPLSSVIAHRGSSVDLTIFSLHIAGISSILGAINFIST    150

1 CLNIRPSGITLDRIPLFVWSVFITAFLLLLSLPVLAGAITILLTDRNFNT    200
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2 CLNIRPSGITLDRIPLFVWSVFITAFLLLLSLPVLAGAITILLTDRNFNT    200

1 SFFDPSGGGDPILYQHLFWFFGHP    224
  |||||||||||||||||||||||||
2 SFFDPSGGGDPILYQHLFWFFGHP    224
```

شکل ٤: نتایج همردیف سازی اسید آمینه ژن سیتوکروم اکسیداز I در کک *پولکس ایریتانس* در پنج استان در غرب و شمال غرب ایران با نرم افزار ایمباس نیدل (1=ID: MN173749, MN173752, MN173754, MN173746, MN173757, MN173758, MN173760, MN173761) و (2=ID: MN173751, MN173753).



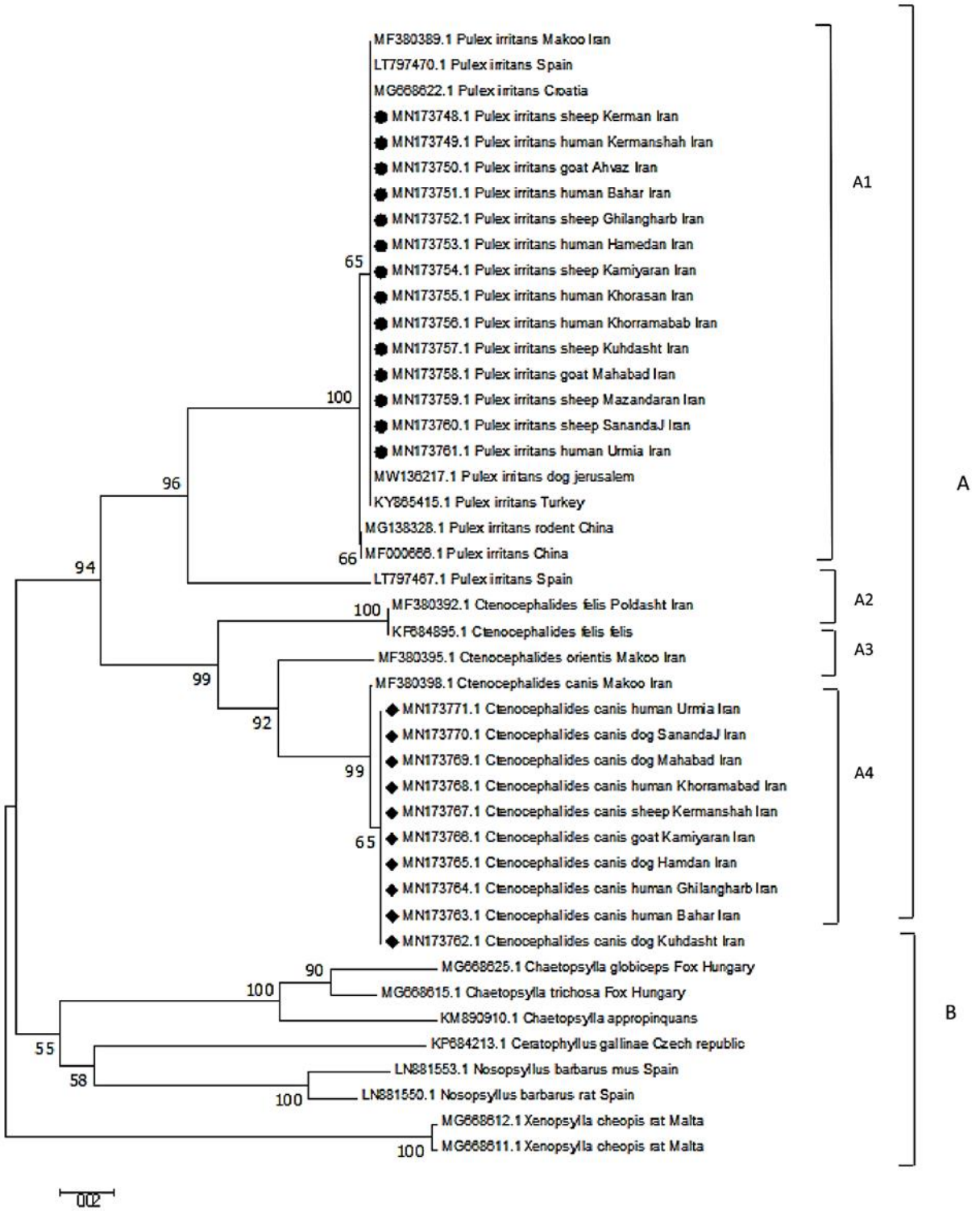
شکل ٥: نتایج همردیف سازی توالی نوکلئوتیدی ژن سیتوکروم اکسیداز I در کک *پولکس ایریتانس* با کک *کتنوسفالیدس کنیس* با نرم افزار ایمباس

نیدل(۱: توالی نوکلئوتیدی ژن سیتوکروم اکسیداز I در کک *پولکس ایریتانس*، ۲: توالی نوکلئوتیدی ژن سیتوکروم اکسیداز I در کک کتنو*سفالیدس کنیس*).



شکل ٦: نتایج هم‌ردیف سازی اسید آمینه ژن سیتوکروم اکسیداز I در کک *پولکس ایریتانس* با کک *کتنوسفالیدس کنیس* با نرم افزار ایمباس

نیدل(1=ID: MN173746, MN173749, MN173751, MN173752, MN173753, MN173754, MN173757, MN173758, MN173760, MN173761) و (2=ID: MN173762-MN173771).



شکل۷: درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس توالی ژن سیتوکروم اکسیداز I در ککهای *کتنوسفالیدس کنیس* و *پولکس ایریتانس* در غرب و شمال غرب ایران. طول شاخه‌ها نشان دهنده مقدار تغییر فاصله ژنتیکی بین توالی‌های مختلف می‌باشد. در شاخه اول کک *پولکس ایریتانس* مطالعه اخیر به همراه کک *پولکس ایریتانس* کشور در پژوهش‌های گذشته و ایزوله کشورهای ترکیه، اسپانیا، چین، کرواسی و سرزمین‌های جولان قرار دارد. شاخه ۲ و ۳ به ترتیب شامل گونه *کتنوسفالیدس فلیس* و *کتنوسفالیدس اورینتالیس* می‌باشد. شاخه ٤ مربوط به ککهای *کتنوسفالیدس کنیس* مطالعه اخیر به همراه کک *کتنوسفالیدس کنیس* کشور در پژوهش‌های گذشته می‌باشد.

بحث

شناسایی گونه کک‌ها بر اساس مشخصه‌های مرفولوژیک هر گونه و استفاده از کلیدهای تدوین شده صورت می‌گیرد و این ابزار تا امروز در این زمینه کارکرد قابل قبولی از خود نشان داده است، اما در ارتباط با روابط فیلوژنی و تعریف نشانگرهای مناسب مولکولی در این گروه مهم از حشرات با اهمیت پزشکی و دامپزشکی همچنان سوال‌ها و مسایل قابل توجهی باقی مانده‌اند که بایستی مورد بررسی قرار گیرند(۲۳). لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی فون کک‌های *کتنوسفالیدس کنیس* و *پولکس ایریتانس* در غرب و شمال غرب ایران بر اساس نشانگر میتوکندریایی سیتوکروم اکسیدازI بود.

در استان‌های غرب و شمال غرب کشور به سبب درصد نسبتاً بالای جمعیت روستایی و رواج کشاورزی و دامپروری به شیوه سنتی شرایط را برای رشد و تکثیر انگل‌های خارجی از جمله کک‌ها فراهم نموده است. مجاورت امکان انسانی با محل نگهداری دام‌ها باعث آلودگی انسان به انگل‌های خارجی از جمله کک‌ها می‌شود. کک‌ها ناقل بیماری‌های مهمی نظیر؛ طاعون، تیفوس موشی، تولارمی و دیپیلیدیازیس می‌باشند. با توجه به تاریخچه اپیدمی بیماری طاعون در گذشته در غرب کشور شناسایی دقیق فون کک‌ها در این مناطق ضروری است(۹). هنوز هم شناسایی کک‌ها برا اساس مشخصات مرفولوژیک مهم‌ترین روش شناسایی گونه‌های کک می‌باشد، اما با توجه به متنوع بودن گونه‌های کک و نزدیک بودن مشخصات مرفولوژیک به همدیگر، استفاده از روش مولکولی در تکمیل این روش اهمیت دارد(۱۵). روش مولکولی امکان شناسایی انگل‌های خارجی با مشخصات مرفولوژیک نزدیک به هم را فراهم می‌کند.

در این مطالعه از روش‌های فیلوژنیک و مولکولی در تکمیل روش مرفولوژیک و برای مقایسه کک‌های جنس پولیسیده و کتنوسفالیده استفاده شد. مشخصات مرفولوژیک کک‌های خانواده پولیسیده در این مطالعه با پژوهش‌های قبلی مطابقت داشت(۲۴ و ۹، ۲).

ویژگی میزبان ممکن است بر سطح تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای تأثیر بگذارد، زیرا گونه‌های انگلی عمومی سطح بالاتری از تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای را نشان می‌دهند و آنها را قادر می‌سازد طیف گسترده‌تری از میزبان‌ها را آلوده کنند(۲۵). پژوهش‌های انجام شده نشان دادند که کک‌ها میزبانی اختصاصی ندارند، اگر چه ممکن است میزبان‌های مختلفی را ترجیح دهند، بنابراین تنوع ژنتیکی درون گونه‌ایی را نشان می‌دهند(۲۵). بر این اساس پژوهش‌های در بررسی ژن‌هایی میتوکندریایی و هسته‌ای در زمینه تاکسونمی کک‌ها انجام شده است(۱۷ و ۱۶، ۱۲).

هورنوک و همکاران پس از مطالعه توالی میتوکندریایی در راسته سیفوناتپرا در اروپا و مدیترانه که تنوع درون گونه‌ای در گونه‌های نزدیک به هم را مورد بررسی قرار دادند، توالی‌های

میتوکندریایی را برای نشان دادن تنوع درون گونه‌ای در مناطق آب و هوایی مختلف سودمند دانستند(۲۶).

در مطالعه اخیر مشخص شد که ویژگی‌های مروفولوژیک دو گونه کک در مناطق مختلف هیچ تفاوتی با هم دیگر نداشتند و نتیجه پژوهش‌های مرفولوژیک بر نتایج پژوهش‌های مولکولی منطبق بود. توالی‌های اسید نوکلئوتید در کک *پولکس ایریتانس* در این مطالعه با پژوهش‌های قبلی که در کشور انجام شده ۱۰۰درصد تشابه را نشان داد(۲۷). هم‌چین دارای تشاببه ۹۹/۸۵ درصدی با *پولکس ایریتانس* اسپانیا و ۹۹/۵۵ درصدی با *پولکس ایریتانس* چین بود.

توالی‌های اسید نوکلئوتید در کک *کتنوسفالیدس کنیس* در این مطالعه دارای شباهت ۱۰۰ درصدی با *کتنوسفالیدس کنیس* ترکیه، شباهت ۹۵/۵۹ درصدی با *کتنوسفالیدس اورینتالیس* هند، شباهت ۹۵/۳۲ درصدی با *کتنوسفالیدس اورینتالیس* ایران، شباهت ۹۳/٤۸ درصدی با *کتنوسفالیدس فلیس* ایران بود. در مطالعه‌ای که سید زاد و همکاران در آذربایجان غربی به منظور نشان دادن تنوع درون گونه‌ایی کک *کتنوسفالیدس کنیس* بر اساس ژن سیتوکروم اکسیداز I انجام دادند، نشان دادند که هیچ تفاوتی بین جدایه‌های کک *کتنوسفالیدس کنیس* آذربایجان غربی وجود ندارد(۲۷). زوریت و همکاران نشان دادند که از نظر ریخت‌شناسی تفاوت معنی‌داری بین کک‌های *پولکس ایریتانس* اسپانیا و آرژانتین وجود ندارد. هم‌چنین نتیجه بررسی ریخت‌شناسی بر بررسی مولکولی بر اساس ژن سیتوکروم اکسیدازI برای نشان دادن تشابه درون گونه‌ای منطبق بود(۱۷). کاران سو و همکاران نشان داند که گونه‌های کک جدا شده از میزبان‌های مختلف در مناطق مختلف جغرافیایی، دارای تفاوت‌های ریخت‌شناسی هستند که می‌تواند سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای را نشان دهد(۲۸).

نتایج این مطالعه نشان داد که ژن سیتوکروم اکسیدازI نشانگر مفیدی برای نشان دادن شباهت درون گونه در دو گونه کک *کتنوسفالیدس کنیس* و *پولکس ایریتانس* و مارکر تأیید تشخیص جنس در کک‌ها است. نتایج یافته‌های مرفولوژیک تأیید کننده نتایج یافته‌های مولکولی می‌باشد. هم‌چنین، توالی‌های ITS1 و ITS2 می‌توانند به عنوان نشانگرهای مفیدی برای تمایز سطح گونه‌ها و تنوع درون گونه‌ای استفاده شود. با این حال، ژن سیتوکروم اکسیدازI در تشخیص جنس، گونه و نشان دادن شباهت‌های درون گونه‌ای از ژن‌های ITS1 و ITS2 کارآمدتر است.

با توجه به این که استان‌های انتخاب شده برای این مطالعه در مناطق کوهستانی واقع شده بود، نمونه‌برداری در ٦ ماه دوم سال به دلیل بارندگی و سرمای شدید، در طول همه ماهها در برخی مناطق انجام نگرفت که می‌تواند از محدودیت‌های مطالعه تلقی شود. لذا پیشنهاد می‌شود در قسمت‌های مختلف کشور بر روی پراکندگی کک‌ها جهت تعیین فون کک‌ها و میزبان‌های مختلف مخصوصاً جوندگان به روش مولکولی پژوهش‌های بیشتری انجام شود.

نتیجه‌گیری

به طور کلی وفور و تنوع کک‌ها در امکان انسانی و به ویژه اماکن حیوانی بالا است. با توجه به شرایط آب و هوایی کشور و اشتغال اکثر روستائیان به دامپروری به شکل سنتی، شرایط برای رشد و تکثیر انگل‌های خارجی از جمله کک‌ها فراهم می‌باشد. این حشرات علاوه بر گزش‌های دردناک ناقل بسیاری از عوامل بیماری‌زا به انسان هستند و احتمال اپیدمی شدن بسیاری از عوامل بیماری‌زا منقله به وسیله کک وجود دارد و به همین دلیل مطالعه در زمینه گزارش آلودگی و تعیین فون کک‌ها در مناطق مختلف می‌تواند در تدوین برنامه‌های استراتژیک کنترل مورد توجه قرار گیرد.

تقدیر وتشکر

این مقاله بخشی از پایان نامه دکتری رشته انگل‌شناسی دانشگاه ارومیه با کد اخلاق IR-UU-AEC-3/1701/ می‌باشد و با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

REFERENCES

1.Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. Fleas and flea-borne diseases. International Journal of Infectious Diseases 2010; 14(8): 667–76.
2.Azizi MH, Azizi F. A history of the human plague in Iran. Archives of Iranian Medicine 2010; 13(6): 563-9.
3.Esamaeili S, Azadmanesh K, Naddaf SR, Rajerison M, Carniel E, Mostafavi E. Serologic survey of plague in animals, Western Iran. Emerging Infectious Diseases 2013; 19(9): 1549-55.
4.Service MW. Medical entomology for students. 4th ed.UK: University Press; 2008; 110-16.
5.Gage KL, Kosoy MY. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. Annu Rev Entomol 2005; 50: 505–28.
6.Ratovonjato J, Rajerison M, Rahelinirina S, Boyer S. Yersinia pestis in pulex irritans fleas during plague outbreak, Madagascar. Emerg Infect Dis 2014; 20(8): 1414–5.
7.Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, Bertherat E, Carniel E, et al. Plague: past, present, and future. PLoS Med 2008; 5(1): e3.
8.Leulmi H, Socolovschi C, Laudisoit A, Houemenou G, Davoust B, Bitam I, et al. Detection of rickettsia typhi, bartonella sp. and yersinia pestis in fleas (siphonaptera) from africa. PLoS Negl Trop Dis 2014; 8(10): 3152.
9.Tavassoli M, Ahmadi A, Imani A, Ahmadiara E, Javadi S, Hadian M. Survey of flea infestation indogs in different geographical regions of Iran. Korean Journal of Parasitology 2015; 48(2): 145–9.
10.Azarm A, Dalimi A, Mohebali M, Mohammadiha A, Zarei Z. Morphological and molecular characterization of Ctenocephalides spp isolated from dogs in north of Iran. Journal of Entomology and Zoology Studies 2016; 4(4): 713-7.
11.Esamaeili S, Azadmanesh K, Naddaf SR, Rajerison M, Carniel E, Mostafavi E. Serologic survey of plague in animals, Western Iran. Emerging Infectious Diseases 2013; 19(9): 1549-51.
12.Ghavami MB, Mirzadeh H, Mohammadi J, Fazaeli A. Molecular survey of ITS1 spacer and Rickettsia infection in human flea, Pulex irritans. Parasitology Research 2018; 117(5): 1433–42.
13.Maleki Ravasan N, Solhjouy Fard S, Beaucournu JC, Laudisoit A, Mostafavi E. The fleas (Siphonaptera) in Iran: diversity, host range, and medical importance. PLoS Neglected Tropical Diseases 2017; 11(1): 5260.
14.Gamerschlag S, Mehlhorn H, Heukelbach J, Feldmeier H, D Haese J. Repetitive sequences in the ITS1 region of the ribosomal DNA of Tunga penetrans and other flea species (Insecta, Siphonaptera). Parasitology Research 2008; 102(2): 193–9.
15.Lv J, Wu S, Zhang Y, Chen Y, Feng C, Yuan X, et al. Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). Parasit & Vectors 2014; 7(1): 1-11.
16. Vobis M, DHaese J, Mehlhorn H, Mencke N, Blagburn BL, Bond R, et al. Blagbur 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. Parasitology Research 2004; 94: 219–26.
17.Zurita A, Callejon R, Garcia-sanchez AM, Urdapilleta M, Lareschi M, Cutillas C. Origin, evolution, phylogeny and taxonomy of Pulex irritans. Medical and Veterinary Entomology 2019; 33(2): 296-311.
18.Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Quarterly Review of Biology 1991; 66(4): 411-53.
19.Navajas M, Fournier D, Lagnel J, Gutlerrez J, Boursot P. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variations in base composition. Insect Molecular Biology 1996; 5(4): 281-5.
20.Asmar M, Piazak N, Karimi Y. An illustrated key for fleas of Iran. Pasteur Institute of Iran, Research Notes 1979; 2-15.
21.Skerman KO, Shahlapoor A, Eslami A, Eliazian M. Observations on the incidence, epidemiology, control and economic importance of gastrointestinal parasites of sheep and goat in Iran. Arch Inst Razi 1970; 22: 187-96.
22.Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoeket R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 1994; 3(5): 294–9.
23.Whiting MF, Whiting AS, Hastriter MW, Dittmar K. A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. Cladistics 2008; 24(5): 677-707.

24.Yakhchali M, Bahramnejad K, Hosseine A. Prevalence and ectoparasites fauna of sheep and goat flocks in Urmia suburb, Iran. Veterinarski Arhiv 2015; 76(5): 431-42.
25.Van der Mescht L, Matthee S, Matthee CA. Comparative phylogeography between two generalist flea species reveal a complex interaction between parasite life history and host vicariance: parasite-host association matters. BMC Evolutionary Biology 2015; 15(1): 1-15.
26.Hornok S, Beck R, Farkas R, Grima A, Otranto D, Kontschan J, et al. High mitochondrial sequence divergence in synanthropic flea species (Insecta: Siphonaptera) from Europe and the Mediterranean. Parasites & Vectors 2018; 11(1): 1-11.
27.Seyyedzadeh SJ, Bozorgomid F, Telmadarraiy Z, Terenius O, Chavshin AR. Evidence for the presence of Ctenocephalides orientis in livestock dwellings in northwest Iran. Medical and Veterinary Entomology 2018; 32: 383-7.
28.Krasnov BR, Shenbrot G, Khokhlova IS. Historical biogeography of fleas: the former BeringLand Bridge and phylogenetic dissimilarity between the Nearctic and Palearctic assemblages. Parasitology Research 2015; 114(5): 1677–86.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of Fleas *Ctenocephalides canis and Pulex irritans* in West and Northwest of Iran Based on Cytochrome Oxidase I

Seidi Sh, Tavassoli M* , Malekifard F

[1]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 16 May 2021 Accepted: 23 Aug 2021

Abstract:

Background & aim: The fleas of the Pulicidae family are one of the most important external parasites of humans and domestic animals in the world. In addition to eating blood, these insects are carriers of some pathogens such as *Yersinia pestis*, *Rickettsia typhi* and *Bartonella hensle* to humans and animals. The aim of this study was to determine and evaluate the fauna of *Cetonecefalides canis* and *Pulex irritants* in western and northwestern Iran based on mitochondrial marker of cytochrome oxidaseI.

Methods: The present study was a descriptive cross-sectional and phonetic study conducted in a period of 13 months from May 2018 to June 2019 in five provinces of Kermanshah, Kurdistan, Azerbaijan Western, Lorestan and Hamedan considering the prevalence of 10% and 95% confidence level with 5% error rate. In the present study, samples were collected by optical trap, human prey and direct isolation from the host. The samples were kept in 70% alcohol and identified in the parasitology laboratory using valid diagnostic keys. After DNA extraction and a Polymerase chain reaction (PCR), 20 samples were sent to Takapouzist Company for sequencing. The sequences were sequenced and compared using Emboos Needle and Omega software.

Results: The collected samples included 918(47/39%) *C.canis* and 1019 (52/60%) *P.irritans*. The results of morphological studies revealed that there is no intraspecific difference between two species of fleas isolated from different hosts ($p<0.05$). However, the intraspecific difference based on the molecular marker of cytochrome oxidaseI for ten studied populations was 0.15% in *P.irritans* and zero in *C.canis*. The difference between two genus of *C.canis* and *P.irritans* based on the molecular marker of cytochrome oxidase I was 14%.

Conclusion: No significant difference was observed in morphological characteristics of samples collected from different hosts. However, there were slight differences based on mitochondrial markers in the study populations. The results from the phylogenetic tree based on mitochondrial markers showed that despite the slight differences in this sequence of different hosts and cities, all samples from different regions are in the same phylogeny. The results of mitochondrial genome analysis indicated that these pieces are useful for demonstrating intraspecific similarity, and differentiation at species level and genus.

Key Words: Fleas, *Ctenocephalides canis, Pulex irritans,* cytochrome oxidaseI

[*]**Corresponding author: Tavassoli M,** Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, West Azarbaijan, Iran.
Email: m.tavassoli@urmia.ac.ir

Please cite this article as follows:
Seidi Sh, Tavassoli M , Malekifard F. Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of Fleas *Ctenocephalides canis and Pulex irritans* in West and Northwest of Iran Based on Cytochrome Oxidase I. Armaghane-danesh 2021; 26(4): 511-526.