



## تشخیص مولکولی و غربالگری آلودگی به باکتری *Wolbachia* در ساس‌های سیمکس همیپتروس شهر مشهد، ایران

مهدی باباگلزاده<sup>۱</sup>، نادیا طایفی نصرآبادی<sup>۲</sup>، الهام مقدس<sup>۲</sup>، علی مشاوری‌نیا<sup>۳</sup>

- ۱- گروه انگل‌شناسی دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
- ۲- گروه انگل‌شناسی و فارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
- ۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

دریافت مقاله: ۹ دی ۱۴۰۳، بازنگری: ۲۰ دی ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۲۴ دی ۱۴۰۳



10.22034/nfvm.2025.496595.1272

### چکیده

باکتری‌های *Wolbachia* و *لباخیا* که در بسیاری از حشرات از جمله ساس‌ها شناسایی شده‌اند باکتری‌های درون سلولی هستند و به صورت عمودی قابل انتقال هستند. با وجود انجام چندین مطالعه بر روی شیوع باکتری *لباخیا* در ساس‌های سیمکس لکتولاریس *Cimex lectularius*، تاکنون مطالعه چاپ شده‌ای در این زمینه در میان جمعیت ساس‌های سیمکس همیپتروس *Cimex hemipterus* در ایران منتشر نشده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی مولکولی شناسایی باکتری *لباخیا* به باکتری *ولباکیا* در میان ساس‌های جمع‌آوری شده از شهرستان مشهد انجام پذیرفته است. نمونه‌های ساس تختخواب از مناطق مختلف شهر مشهد جمع‌آوری شدند. محل‌های نمونه‌برداری شامل آپارتمان‌های قدیمی و خوابگاه‌های کارگران بود. به طور کلی، تعداد ۳۵ جمعیت ساس جمع‌آوری و سیمکس همیپتروس تشخیص داده شد. روش مولکولی شناسایی باکتری *لباخیا* بر اساس مارکر پروتئین سطحی *لباخیا* (WSP) و مقایسه با سایر توالی‌های ثبت شده *لباخیا* در بانک ژنی انجام شد. بر اساس مطالعه حاضر، ۱۳ ایزولیت از ۳۵ جمعیت جمع‌آوری شده (۳۷/۱۴ درصد) از لحاظ آلودگی به *لباخیا* مثبت گزارش شد. توالی ژن تکثیر یافته در این مطالعه، با توالی‌های ژن WSP در سیمکس همیپتروس ثبت شده در بانک ژن ۹۷/۳۵ درصد، سیمکس لکتولاریوس ۹۵/۷۱ درصد و سیمکس ویکاریوس ۹۵/۶۰ درصد مشابهت داشتند. ترسیم درخت فیلوژنی بر اساس ژن WSP نشان داد *لباخیا*‌های با منشأ سیمکس همیپتروس در یک کلاد قرار می‌گیرند و نمونه تعیین توالی شده در مطالعه حاضر نیز در همین کلاد قرار گرفت. مطالعه حاضر اولین مطالعه روی این باکتری در ساس سیمکس همیپتروس ایران می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** ساس تختخواب، سیمکس همیپتروس، *لباخیا*، مشهد

## مقدمه

ظهور ساس تختخواب در ساختمان‌ها و مناطق مسکونی در سراسر جهان مشکلات فراوانی را به وجود آورده است. دو گونه رایج از این انگل‌های خون‌خوار عبارتند از ساس تختخواب معمولی (سیمکس لکتولاریس) که به‌طور معمول در مناطق معتدل زندگی می‌کند و ساس تختخواب گرمسیری (سیمکس همیپیتروس) که در مناطق گرمسیری یافت می‌شوند (۱). این حشرات اعضای خانواده سیمیسیده هستند که از خون انسان، پرندگان و خفاش‌ها تغذیه می‌کنند (۲). گرچه گزش این حشرات ممکن است تحریک پوستی ایجاد کند، اما تا کنون نقش آنها در انتقال پاتوژن‌ها اثبات نشده است (۳). بلو و همکاران گزارش کرده‌اند که احتمالاً این موجودات قادر به انتقال مکانیکی ویروس هپاتیت ب می‌باشند (۴). اخیراً سالازار و همکاران و همچنین لولمی و همکاران نقش توانایی ناقل بودن سیمکس لکتولاریس برای تریپانوزوم کروزوی و بارتونلا کوبینتانا در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کردند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر توسط سانز و همکاران، عفونت ساس‌های تختخواب به بورخولدیریا مولتی و رانس گزارش شد (۵). انتشار ساس‌های تختخواب معمولاً توسط مسافرین بین‌المللی، مکان‌های عمومی و حتی مکان‌های مسکونی اتفاق می‌افتد. با وجود تمام واقعیت‌های گفته شده بالا، هیچ‌گونه گزارش موردی مستدلی که نشان دهد ساس‌های تختخواب در شرایط طبیعی قادر به انتقال پاتوژن‌ها به انسان باشند وجود ندارد. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که باکتری ولباخیا به تناوب از حشرات مختلف جدا می‌شود (۶). این ارگانیزم یک باکتری همزیست درون‌سلولی است که می‌تواند به‌صورت عمودی شبیه به باکتری‌های ریکتزایی انتقال یابد. این باکتری‌ها به‌صورت گسترده باعث آلودگی نماتودها و حشرات می‌شوند. ولباخیا قادر به تأثیرات مخرب بر روی سیستم تولید مثلی میزبان خود هستند. با توجه به این توانایی‌ها، باکتری ولباخیا به‌عنوان کاندیدی جهت کنترل انتشار بیماری‌های ویروسی و انگل‌های پاتوژن قابل انتقال توسط حشرات از قبیل تب

دانگ و مالاریا مطرح هستند (۷). جداسازی و شناسایی باکتری‌های ولباخیا از طیف گسترده‌ای از حشرات نشان می‌دهد که این میزبان‌ها با سویه‌های مختلفی از ولباخیا آلوده می‌شوند. به‌عنوان مثال در مطالعه گذشته که توسط چویی و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد، نشان داده شد که سه گونه مختلف سوسک با سویه‌های مختلف این باکتری آلوده شده‌اند (۸). جستجو و غربالگری ولباخیا به‌صورت عمده در ساس‌های سیمکس لکتولاریس انجام شده است (۹)، در حالی که وجود این باکتری در ساس‌های سیمکس همیپیتروس نیز امکان‌پذیر است. با وجود دانستن انتشار عفونت ولباخیا در میان میزبانان بندپای مختلف، میزان شیوع آلودگی به ولباخیا در جمعیت‌های ساس تختخواب جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران به اندازه کافی مطالعه نشده است. مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی آلودگی ساس‌های سیمکس همیپیتروس جمع‌آوری شده از شهرستان مشهد به باکتری ولباخیا با کمک تکنیک‌های مولکولی انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری ساس‌ها:** تعداد ۳۵ جمعیت و از هر جمعیت حداقل ۱۰ عدد ساس تختخواب بین سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۴۰۲ از مناطق مختلف شهر مشهد جمع‌آوری شدند. محل‌های نمونه‌برداری شامل آپارتمان‌های قدیمی و خوابگاه‌های کارگران بود. نمونه‌ها در ظروف نمونه‌گیری قرار گرفته و بر اساس محل جمع‌آوری شماره‌گذاری شدند و در اتانول ۹۶ درجه قرار گرفتند. بخشی از نمونه‌ها به دمای منفی ۲۰ درجه به‌منظور نگهداری ماده ژنومیک انتقال داده شدند.

**استخراج ماده ژنومیک:** استخراج ماده ژنومیک باکتری از ساس‌های مورد مطالعه با کمک کیت استخراج ژنومیک کیا/امپ (کیاژن، هیلدن، آلمان) بر اساس پروتکل کیت انجام شد. ماده ژنومیک استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه قرار داده شد.

**واکنش زنجیره‌ای پلیمراز:** در مطالعه حاضر از مارکر

(پارس طوس، مشهد) انتقال و جداسازی شدند و در ادامه تحت ترانس لومیناتور مشاهده شدند.

**تعیین توالی کردن:** ملاک اصلی در تعیین عفونت ولباخیا در ساس‌های مورد مطالعه، بر اساس تکثیر موفقیت‌آمیز شاخص‌های مولکولی بود. بعلاوه، نمونه‌هایی که توسط تکنیک مولکولی مثبت گزارش می‌شدند به صورت دوطرفه تعیین توالی شدند (تکاپوزیست، ایران). تمامی نمونه‌های مثبت از محصولات مولکولی از ژن WSP از روی ژل الکتروفورز با استفاده از کیت تخلیص از ژل تخلیص و تعیین توالی شدند. تعیین توالی به کمک دستگاه تعیین توالی ABI 3730 انجام گردید. توالی‌های ارسال شده به منظور ارزیابی اشتباهات احتمالی در خوانش مورد ارزیابی قرار گرفتند. مشابهت‌یابی با توالی‌های ثبت شده موجود در بانک ژنی با استفاده از نرم‌افزار ارزیابی مشابهت‌یابی (Blast) انجام گرفت.

### نتایج

در این مطالعه، تعداد ۳۵ جمعیت ساس تختخواب از مناطق مختلف شهر مشهد جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. همه این جمعیت‌ها بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی به‌ویژه نسبت عرض پیش‌سینه به طول آن، سیمکس همیپتروس تشخیص داده شدند. از هر جمعیت یک ساس به‌منظور شناسایی ژن WSP باکتری ولباخیا مورد ارزیابی مولکولی قرار گرفت. نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نشان داد ۱۳ جمعیت از ۳۵ جمعیت مورد بررسی به باکتری ولباخیا آلوده بودند (تصویر ۱). به این ترتیب میزان شیوع آلودگی به ولباخیا در جمعیت‌های ساس جمع‌آوری شده از شهر مشهد ۳۷/۱۴ درصد محاسبه گردید.

مولکولی ولباخیا، ژن مرتبط با پروتئین سطحی ولباخیا (WSP) به‌منظور بررسی آلودگی به ولباخیا در ساس‌ها استفاده شد. به‌منظور تکثیر ژن‌های مورد بررسی با استفاده از تکنیک تکثیر پلیمرز (PCR)، ماده ژنومیک حاصل بافت از کل بدن ساس‌ها با دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، هامبورگ، آلمان) مورد غربالگری قرار گرفتند. برای این منظور پرایمر اختصاصی این ژن شامل پرایمرهای 81F (F: 5'-TGG TCCAATAAGTGATGAAGAAAC-691R (R: 5'-AAAAATTAAACG (3'-CTACTCCA-3') به‌منظور تکثیر قطعه‌ای ۶۰۰ جفت بازی مورد استفاده قرار گرفت (۱۰). پروتکل واکنش تکثیر زنجیره‌ای ژن پروتئین سطحی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه؛ ۳۵ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه؛ ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. همه پروتکل‌های واکنش زنجیره‌ای در مخلوطی شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از آنزیم تگ دی‌ان‌ای پلیمرز مسترمیکس (دانمارک)، ۳ میکرولیتر از ماده ژنومیک استخراج شده و ۱ میکرولیتر از هر پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۵ میکرومولار به‌منظور غربالگری باکتری ولباخیا استفاده شد. از آب مقطر دو بار تقطیر به‌منظور رساندن مخلوط واکنش به حجم ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. واکنش تکثیر زنجیره‌ای کنترل مثبت و کنترل منفی نیز به‌صورت همزمان انجام شد. به‌منظور تهیه کنترل منفی از آب مقطر دوبار تقطیر استفاده شد. کنترل مثبت در مطالعه حاضر ماده ژنومیک استخراج شده از درزوفیلا ملانوغاستر آلوده به باکتری ولباخیا بود. قطعات تکثیر یافته در مطالعه حاضر بر روی ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد رنگ شده با گرین ویور



تصویر ۱- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برای ژن WSP ولباخیا در ساس‌های سیمکس همیپتروس شماره ۱ تا ۱۳: نمونه‌های آلوده به ولباخیا، P: کنترل مثبت، Marker: مارکر 100 bp ، N: کنترل منفی

نتایج Blast نشان داد که توالی ژن‌های تکثیر یافته در این مطالعه، با توالی‌های ژن WSP در سیمکس همیپتروس ثبت شده در بانک ژن ۹۷/۳۵ درصد، سیمکس لکتولاریوس ۹۵/۷۱ درصد و سیمکس ویکاریوس ۹۵/۶۰ درصد مشابهت داشتند (MF687879; KR706518; MF687886).

**نتایج تعیین توالی:** قطعات تکثیر یافته با استفاده از پرایمرهای WSP با روش سنگر تعیین توالی شدند. صحت خوانش نوکلئوتیدها در توالی‌های به دست آمده با نرم‌افزار Chromas بررسی و پس از انجام هم‌ردیف‌سازی، با توالی‌های ولباخیا ثبت شده در بانک ژنی مقایسه شدند.

### Wolbachia endosymbiont of Cimex hemipterus isolate chembor surface protein (wps) gene, partial cds

Sequence ID: [MF687879.1](#) Length: 563 Number of Matches: 1

Range 1: 338 to 563 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
385 bits(208)	5e-102	220/226(97%)	0/226(0%)	Plus/Plus
Query 321	ACCCCTTTAAAGAGCACTGCGGGAGATAAAAAACATAGATTTGGTTTTGCTTACCAAGCAA	380		
Sbjct 338	ACCCCTTTAAAGAGCACTGCGGGAGATAAAAAACATGGATTTGGTTTTGCTTACCAAGCAA	397		
Query 381	AAACTGGTGTAACTATGATGTAACCTCCAGAAATCAATCTTTATGCTGGTGCTCGCTATT	440		
Sbjct 398	AAACTGGTGTAGCTATGATGTAACCTCCAGAAATCAAGCTTTATGCTGGTGCTCGCTATT	457		
Query 441	TCGGCTCTTATGGCGCTAACCTTGGATGGGCAAAAAACAAATCCTGCACATCCTGGCGATA	500		
Sbjct 458	TCGGCTCTTATGGCGCTAGCTTGGATGGGCAAAAAACAAAGATCCTGCACATCCTGGCGATA	517		
Query 501	TAACCAAAAAGGTTACTGATGAAGCGGTATACAAAGTCCTTTACAG	546		
Sbjct 518	TAACCAAAAAGGTTACTGATGAAGGTGTATACAAAGTCCTTTACAG	563		

تصویر ۲- همسان‌سازی توالی ژن WSP تعیین توالی شده در مطالعه حاضر با ژن مشابه در سیمکس همیپتروس ثبت شده در بانک ژن با شماره

دسترسی MF687879

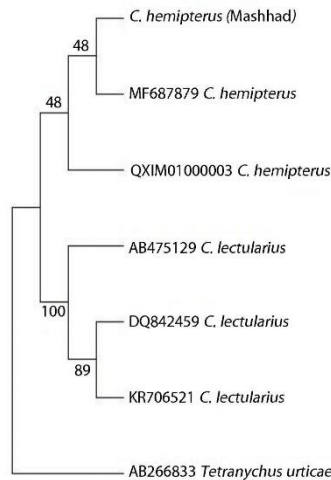
WSP در ساس‌های مورد مطالعه قرابت ژنتیکی زیادی به توالی این ژن در ولباخیا جدا شده از سیمکس همیپتروس (با منشأ نامشخص) با شماره دستیابی بانک ژن MF687879 داشت. در عین حال توالی ژن WSP ولباخیا جدا شده از سیمکس همیپتروس در مالزی با شماره

چندین توالی از ژن WSP ولباخیاهای جدا شده از ساس سیمکس در بانک ژن که شباهت زیادی به توالی به دست آمده از مطالعه حاضر داشتند و یک توالی با مشابهت بسیار کم (Out group) انتخاب و با استفاده از نرم‌افزار MEGA11 درخت فیلوژنی رسم گردید. توالی ژن

## تشخیص مولکولی و غربالگری آلودگی به باکتری ولباخیا در ساس‌های سیمکس همیپتروس ...

درخت فیلوژنی رسم شده در تصویر شماره ۲ قابل مشاهده می‌باشد.

دست‌یابی بانک ژن QXIM01000003 قرابت ژنتیکی کمتری با توالی این ژن در مطالعه حاضر داشت. جزئیات



تصویر ۳- درخت فیلوژنی ولباخیا جدا شده از ساس سیمکس همیپتروس در مشهد و مقایسه آن با ولباخیا‌های جدا شده از ساس سیمکس در دنیا بر اساس شباهت توالی ژن WSP

### بحث و نتیجه‌گیری

با ظهور *PCR*، استفاده از روش‌های مولکولی توانست روش‌های رایج باکتری‌شناسی سنتی را کنار بگذارد (۱۱). تاکنون مطالعات محدودی برای تشخیص عفونت‌های ولباخیا در نمونه‌های ساس تختخواب گرمسیری و همچنین سیمکس لکتولاریس با استفاده از تست‌های مولکولی انجام شده است (۱۲-۱۵). مطالعات فراوانی نیز بر روی شیوع این باکتری در سایر حشرات انجام شده است (۱۶، ۱۷). باکتری مذکور قادر به تأثیرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گوناگون بر روی میزبان خود است. این باکتری قادر به ایجاد تغییرات در سیستم تولید مثلی میزبان خود است (۶، ۱۸). ولباخیا در میزبان‌های خود تغییراتی شامل ناسازگاری سیتوپلاسمی، القای بکرزایی، کشتن نرها و ماده‌سازی به وجود می‌آورد. مهم‌ترین تغییر این باکتری در میزبان خود، ناسازگاری سیتوپلاسمی است (۱۸). این حالت زمانی اتفاق می‌افتد که یک حشره نر آلوده به این باکتری با یک حشره ماده غیر آلوده جفت‌گیری می‌کند. ناسازگاری سیتوپلاسمی ممکن است تک‌سویه (آلوده به یک سویه از ولباخیا)، دوسویه (آلوده به دو سویه از ولباخیا) و یا حتی با سویه‌های

مختلفی از این باکتری آلوده باشد (۱۹)؛ بنابراین دانستن میزان شیوع ولباخیا در حشرات بسیار ضروری است؛ زیرا این باکتری دارای یک نقش مهم در کنترل جمعیت حشرات میزبان خود است (۲۰). مطالعات گوناگونی به‌منظور بررسی شیوع ولباخیا در میزبانان بندپای مختلف از جمله ساس‌های تختخواب انجام شده است. به‌طور کلی، سیمکس لکتولاریس و سیمکس همیپتروس دو گونه ساس انسان‌دوست با توانایی‌های مختلف در تحمل فاکتورهای محیطی مخصوصاً دما می‌باشند (۱۵). به‌طور مثال، ساس تختخواب گرمسیری دارای تحمل بالاتر نسبت به دمای بالا هستند و به‌طور معمول در کشورهای گرمسیری زندگی می‌کنند؛ بنابراین تصور می‌شود انتشار جغرافیایی باکتری ولباخیا در دو گونه ساس تختخواب متفاوت باشد. محققان نشان داده‌اند که آب و هوا و همچنین جغرافیا از فاکتورهای مهم دخیل در میزان شیوع ولباخیا می‌باشند (۲۱).

در مطالعه حاضر مشخص شد میزان شیوع ولباخیا در ساس‌های سیمکس همیپتروس جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شهر مشهد ۳۷/۱۴ درصد است. این میزان آلودگی در مقایسه با مطالعه‌ای که در کامرون بر روی سیمکس

نامشخص (انجام شده در اروپا) نسبت به سیمکس همیپتروس مالزی دیده شد. این وضعیت در مورد سیمکس لکتولاریوس نیز صدق می‌کند و گونه ژاپن (AB475129) با دو گونه نزدیک به هم اروپا (KR706521) و آمریکا (DQ842459) فاصله بیشتری دارد. داده‌ها در خصوص توالی ژن WSP در ولباخیا همزیست با ساس‌ها بسیار محدود و کم می‌باشد و از ساس‌های ایران هیچ گزارشی وجود ندارد. بنابراین در مطالعه حاضر برای مشابهت‌یابی و ترسیم درخت فیلوژنی محدودیت‌هایی وجود داشت و امکان مقایسه توالی به‌دست آمده با داده‌ای از ایران و کشورهای همسایه وجود نداشت.

مطالعه حاضر اولین گزارش ولباخیا در ساس سیمکس همیپتروس و توالی‌یابی ژن WSP مربوط به آن در ایران می‌باشد. در این مطالعه میزان شیوع باکتری ولباخیا در جمعیت‌های ساس سیمکس همیپتروس جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شهر مشهد ۳۷/۱۴ درصد گزارش گردید. مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن WSP این باکتری در مطالعه حاضر با توالی‌های ژن مشابه در بانک ژنی نشان‌دهنده شباهت بیشتر با ولباخیا جدا شده از ساس سیمکس همیپتروس و در درجه بعدی سیمکس لکتولاریوس بود.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج که هزینه این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه‌کرد پایان‌نامه‌های دانشجویان (پایان‌نامه دکتری) فراهم نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

#### References

- 1- Tiotour M, Shaddel M, Aminianfar M, Mirahmadi H, Barzegar G, Solgi R, et al. Identification of Knockdown Resistance Mutations in the Cimex hemipterus (Hemiptera: Cimicidae) in Iran. *Am J Trop Med Hyg*. 2022; 107(1): 204.
- 2- Doggett SL, Lee C-Y. Historical and Contemporary Control Options Against Bed Bugs, Cimex spp. *Annu Rev Ent*. 2023; 68: 169-90.
- 3- Zorrilla-Vaca A, Silva-Medina MM,

همیپتروس انجام شده و میزان آلودگی به ولباخیا را ۴/۸ درصد گزارش کرده است همخوانی ندارد (۲۲). مطالعه انجام شده بر روی ساس سیمکس لکتولاریوس در فرانسه در سال ۲۰۱۶ میزان آلودگی به ولباخیا را ۳۸/۲۰ درصد گزارش کرد که به نتایج حاصل از مطالعه حاضر نزدیک است (۹). مطالعه دیگری روی ساس‌های سیمکس همیپتروس و سیمکس لکتولاریوس در پاریس و اطراف آن میزان شیوع آلودگی به ولباخیا را ۷۱/۷۰ درصد نشان داد که نسبت به نتایج مطالعه حاضر بیشتر می‌باشد (۲۳). بررسی میزان فراوانی آلودگی به ولباخیا در ساس سیمکس لکتولاریوس در آمریکا نشان داده است هیچ رابطه معنی‌داری بین میزان فراوانی آلودگی به ولباخیا و منطقه جغرافیایی، جنسیت و مراحل مختلف زندگی ساس وجود ندارد (۲۴). تفاوت در میزان شیوع آلودگی به ولباخیا در ساس‌ها در مطالعات مختلف و از طرفی اهمیت این مسأله در کنترل این انگل نیازمند مطالعات بیشتری است و می‌تواند زمینه تحقیقاتی مناسبی برای پژوهشگران این حوزه باشد.

نتایج مشابهت‌یابی توالی ژن WSP با توالی‌های مشابه در بانک ژنی مشابهت حدود ۹۷ درصد با توالی همین ژن در ساس سیمکس همیپتروس با منشأ نامشخص نشان داد. ترسیم درخت فیلوژنی نیز این یافته‌ها را تأیید کرد و نشان داد توالی ژن‌های WSP مربوط به سیمکس همیپتروس در یک شاخه اصلی و سیمکس لکتولاریوس در شاخه مجزایی قرار می‌گیرند. با این حال قرابت ژنتیکی بیشتری بین سیمکس همیپتروس مشهد با گونه همیپتروس با منشأ

Escandón-Vargas K. Bedbugs, Cimex spp.: their current world resurgence and healthcare impact. *Asian Pac J Trop Dis*. 2015; 5(5): 342-52.

4- Blow JA, Turell MJ, Silverman AL, Walker ED. Stercorarial shedding and transtadial transmission of hepatitis B virus by common bed bugs (Hemiptera: Cimicidae). *J Med Entomol*. 2001; 38(5): 694-700.

5- Saenz VL, Maggi RG, Breitschwerdt EB,

**Kim J, Vargo EL, Schal C.** Survey of Bartonella spp. in US bed bugs detects Burkholderia multivorans but not Bartonella. *PLoS One*. 2013; 8(9): e73661.

**6- Landmann F.** The Wolbachia endosymbionts. *Microbiol Spectr*. 2019; 7(2).

**7- Manoj RRS, Latrofa MS, Epis S, Otranto D.** Wolbachia: endosymbiont of onchocercid nematodes and their vectors. *Parasites & vectors*. 2021; 14(1): 1-24.

**8- Hassan NHM, Ismail DE, Seri Masran SNA, Majid AHA.** Molecular detection and screening of Wolbachia infections in tropical bed bugs Cimex hemipterus (Hemiptera: Cimicidae) from Peninsular Malaysia populations. *Malays J Microbiol*. 2019; 15(2): 166-172.

**9- Akhoundi M, Cannet A, Loubatier C, Berenger J-M, Izri A, Marty P, et al.** Molecular characterization of Wolbachia infection in bed bugs (Cimex lectularius) collected from several localities in France. *Parasite*. 2016; 23.

**10- Zhou W, Rousset F, O'Neill S.** Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biol Sci*. 1998; 265(1395): 509-15.

**11- Wang Z-y, Deng C, Yun Y-l, Jian C, Peng Y.** Molecular detection and the phylogenetics of Wolbachia in Chinese spiders (Araneae). *J Arachnol*. 2010; 38(2): 237-41.

**12- Rasgon JL, Scott TW.** Phylogenetic characterization of Wolbachia symbionts infecting Cimex lectularius L. and Oeciacus vicarius Horvath (Hemiptera: Cimicidae). *J med entomol*. 2004; 41(6): 1175-8.

**13- Sakamoto JM, Feinstein J, Rasgon JL.** Wolbachia infections in the Cimicidae: museum specimens as an untapped resource for endosymbiont surveys. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(5): 3161-7.

**14- Fisher ML, Watson DW, Osborne JA, Mochizuki H, Breen M, Schal C.** Growth kinetics of endosymbiont Wolbachia in the common bed bug, Cimex lectularius. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 11444.

**15- Ndiaye EHI, Diatta G, Diarra AZ, Berenger JM, Bassene H, Mediannikov O, et al.**

Morphological, molecular and MALDI-TOF MS identification of bedbugs and associated Wolbachia species in rural Senegal. *J Med Entomol*. 2022; 59(3): 1019-32.

**16- Kaur R, Shropshire JD, Cross KL, Leigh B, Mansueto AJ, Stewart V, et al.** Living in the endosymbiotic world of Wolbachia: a centennial review. *Cell host & microbe*. 2021; 29(6): 879-93.

**17- Ogunlade ST, Meehan MT, Adekunle AI, Rojas DP, Adegboye OA, McBryde ES.** A review: Aedes-borne arboviral infections, controls and Wolbachia-based strategies. *Vaccines*. 2021; 9(1): 32.

**18- Fukatsu T, Gottlieb Y, Duron O, Graf J.** Microbial associates of blood-sucking arthropods and other animals: relevance to their physiology, ecology and evolution. *Front Microbiol*. 2023; 14.

**19- Turelli M, Katznelson A, Ginsberg PS.** Why Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility is so common. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022; 119(47): e2211637119.

**20- Bourtzis K.** Wolbachia-based technologies for insect pest population control. *Transgenesis and the management of vector-borne disease*. 2008: 104-13.

**21- Toju H, Fukatsu T.** Diversity and infection prevalence of endosymbionts in natural populations of the chestnut weevil: relevance of local climate and host plants. *Mol Ecol*. 2011; 20(4): 853-68.

**22- Ngnindji-Youdje Y, Lontsi-Demano M, Zan Diarra A, Mahamat MA, Tchuinkam T, Berenger JM, et al.** Morphological, molecular, and MALDI-TOF MS identification of bed bugs and associated Wolbachia species from Cameroon. *Acta Trop*. 2004; 249.

**23- Chebbah D, Hamarsheh O, Sereno D, Elissa N, Brun S, Jan J, et al.** Molecular characterization and genetic diversity of Wolbachia endosymbionts in bed bugs (Hemiptera: Cimicidae) collected in Paris. *PLoS One*. 2023; 18(9).

**24- Sakamoto JM, Rasgon JL.** Geographic distribution of Wolbachia infections in Cimex lectularius (Heteroptera: Cimicidae). *J Med Entomol*. 2006; 43(4): 696-700.



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


Mahdi Babagolzadeh<sup>1</sup>, Nadia Taiefi Nasrabadi<sup>1\*</sup>, Elham Moghaddas<sup>2</sup>, Ali Moshaverinia<sup>3</sup>

1- Department of Veterinary Parasitology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

2- Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

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

Receive: December 29, 2024; Revise: January 09, 2025; Accept: January 13, 2025

 10.22034/nfvm.2025.496595.1272

### Summary

*Wolbachia* bacteria, which have been identified in many insects including mosquitoes, are intracellular bacteria and can be transmitted vertically. Despite numerous studies on the prevalence of *Wolbachia* in *Cimex lectularis* population, no published studies have reported on this topic among tropical bedbug's populations in Iran. The present study was conducted to investigate the molecular prevalence of *Wolbachia* bacteria among tropical bedbug from Mashhad city. Bed bugs were collected from different areas of Mashhad city. The sampling locations included old apartments and workers' dormitories. In total, 35 bed bug isolates were collected and identified as *Cimex hemipterus*. The molecular identification method of *Wolbachia* bacteria was performed based on the *Wolbachia* surface protein (WSP) and comparison with other registered *Wolbachia* sequences in the GeneBank. According to the present study, 13 isolates out of 35 populations of *C. hemipterus* (37.14%) were found to be infected with *Wolbachia*. The sequences obtained from this study were edited, aligned and compared to homologous sequences in GenBank. The results showed 97.35%, 95.71% and 95.60% identity with WSP gene sequence of *C. hemipterus*, *C. lectularis* and *C. vicarius*, respectively. The phylogenetic tree based on WSP gene showed that *Wolbachia* with *C. hemipterus* origin were clustered together as a clade and sequenced WSP gene in this study was placed in this clade. This is the first study on *Wolbachia* endosymbiont bacterium in *C. hemipterus* in Iran.

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