مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۴، ۴۰۲-۳۹۷
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.217312.2532

بررسی مولکولی تک یاخته هموپروتئوس در کبوتران خانگی (*Colombia livia* domestica) در استان مازندران

رضا طبری پور[1] محمد رضا یوسفی[2]* صادق رهبری[3] محمد ارغوان[3]
۱) گروه سلولی ملکولی، واحد بابل دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران
۲) گروه انگل شناسی، واحد بابل دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران
۳) گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱ شهریور ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۹ ابان ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: هموپروتئوس یک تک یاخته انگلی است که بالغ بر ۱۲۰ گونه از آن به طور عمده از پرندگان وحشی آبزی، کبوتر سانان و سایر راسته‌های پرندگان گزارش شده است. تاکنون هیچ گونه مطالعه‌ای در خصوص تعیین گونه‌های این تک یاخته در شمال کشور صورت نگرفته است. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی ملکولی و ساختاری تک یاخته هموپروتئوس در خون کبوترهای آلوده در استان مازندران بود. **روش کار:** در این مطالعه به بر رسی مولکولی هموپروتئوس در کبوتران خانگی استان مازندران پرداخته شده است. به این منظور از ۱۵۰ کبوتر خانگی بصورت تصادفی از نقاط مختلف استان نمونه گیری انجام شد. در ابتدا نمونه‌های خون از نظر حضور گامتوسیت تک یاخته هموپروتئوس به روش گیمسا مورد رنگ آمیزی قرار گرفتند. سپس نمونه هایی که در گسترش خون رنگ آمیزی شده به روش گیمسا مثبت تشخیص داده شدند با پرایمرهای مربوط به ژن سیتوکروم b تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) قرار گرفتند. **نتایج:** نتایج بدست آمده پس از بررسی ریخت شناسی، بیان گر ۱۷ نمونه مثبت بود که نشان دهنده ۱۱/۳۳ ٪ آلودگی می‌باشد. بررسی‌های مولکولی و آنالیز محصولات PCR، نشان دادند که تمامی نمونه‌های هموپروتئوس از گونه کولمبه بوده‌اند. **نتیجه‌گیری نهایی:** آشنایی دقیق با این قبیل تک یاخته‌ها و گونه‌های آن سبب دوری از بسیاری از اشتباهات شده و به تشخیص تفریقی گونه‌های مختلف آن کمک می‌کند. طی این مطالعه نشان داده شد که رایجترین هموپروتئوس در کبوترهای استان مازندران گونه کولمبه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: هموپروتئوس کولمبه، کبوتران خانگی، فیلوژنی، PCR

مقدمه

انگل‌های پرندگان مدت زمان زیادی است که شناخته شده‌اند و بخش مهمی از بیماری‌های پرندگان را تشکیل می‌دهند و جزو شایع‌ترین عفونت‌ها در پرندگان هستند (۱۷). تک یاخته‌های انگلی، گروه عظیمی را در بر می‌گیرند که برخی از آن‌ها قادرند بیماری‌های خطرناک و کشنده‌ای را به وجود آورند (۱۷). کبوتر یکی از پرندگان اهلی است که از دیرباز با انسان قرابت داشته و در زمان‌های دور به عنوان قاصد و امروزه به عنوان پرنده زینتی مطرح است که گاهی نقش تغذیه‌ای و یا سرگرمی و ورزشی نیز می‌یابد. علاوه بر این کبوتر در زمینه انتقال بیماری‌ها به طیور صنعتی حائز اهمیت می‌باشد. با این وجود تحقیقات انجام گرفته در خصوص بیماری‌های انگلی این پرنده بسیار ناچیز است(۱۴). هموپروتئوس جزء تک یاخته‌های انگلی است که از پرندگان، خزندگان و دوزیستان جدا می‌شود . نام هموپروتئوس برای اولین بار توسط شخصی به نام Cruise در سال ۱۸۹۰ مورد استفاده قرار گرفت و چون این تک یاخته را از خون کبوتر جدا کرد بنابراین آن را هموپروتئوس کولمبه نامید (۱۴). چرخه زندگی و مورفولوژی انگل هموپروتئوس توسط Beynon و همکاران در سال ۱۹۹۶ (۵)، Heidenreich و همکاران در سال ۱۹۹۷ (۱۱) و Apanius و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۳) شرح داده شد.گونه‌های انگل هموپروتئوس اغلب انگل‌های خونی پرندگان وحشی‌اند(۷). البته غیر از پرندگان وحشی، مرغان آبزی و سایر پرندگان را آلوده می‌کنند. گونه‌های کمی از هموپروتئوس نظیر H. nettionis، H. meleagridis و columbae Heamoproteus به ترتیب در بوقلمون، اردک و قاز، کبوتر و قمری گزارش شده که می‌توانند بیماری بالینی و کلینیکی ایجاد کنند (۷،۸). بیش از ۱۴۰ گونه هموپروتئوس پرندگان شناسایی شده است (۱۲)که توسط پشه‌های ریز گزنده کولیکوئیده و حشرات هیپوبوسیده انتقال می‌یابند(۲۴). هم چنین بیان شده که بسیاری از گونه‌های انگل هموپروتئوس را، پشه‌های ریز گزنده سراتوپوگونیده و گونه‌های کمی را حشرات هیپوبوسیده انتقال می‌دهند (۱۸). در سیر تکاملی تک یاخته هموپروتئوس، اسپوروزوآیت‌های انگل طی خون خواری پشه به پرنده منتقل می‌شود. سپس شیزونت های نسل اول و دوم در بدن میزبان ایجاد می‌شود. هم چنین باید به این مطلب اشاره کرد که شیزونت نسل دوم انگل هموپروتئوس در طحال، کبد و ریه تشکیل شده و گامتوسیت‌ها در داخل گلبول‌های قرمز ایجاد می‌شود پرنده آلوده به این تک یاخته با دهان باز نفس کشیده و دچار ضعف، بی اشتهایی و لاغری مفرط می‌شود در کالبد گشایی پرندهای تلف شده در اثر بیماری نیز ذات الریه و هپاتومگالی مشاهده می‌شود(۵). به طور کلی تکامل غیر جنسی انگل هموپروتئوس در خون محیطی پرندگان و تکامل جنسی در ناقلین

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۱۱-۳۲۴۱۵۱۵۹ نمابر: ۰۱۱-۳۲۴۱۵۰۹۰ Email: Youssefi 929 @hotmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

خون خوار انجام می‌شود(۴). از نظر پراکندگی جغرافیایی، بیشتر گونه‌های انگل هموپروتئوس پرندگان در زیستگاه هایی با آب و هوای گرمسیری یا نیمه گرمسیری پراکنده شـده‌اند (۱۶). درجه شیوع و میزان آلودگی انگلی در گونه‌های مختلف پرندگان، فصل‌های سـال و در زیستگاه‌های مختلف متغیر است(۲۲). مطالعات مختلفی در زمینه بررسی تک یاخته هموپروتئوس در نقاط مختلف جهان انجام گرفته اسـت ولی در کشـور ما بخصوص در مناطق شمالی کشـور تاکنون هیچگونه مطالعه ملکولی بر روی این تک یاخته صورت نگرفته اسـت . در این مطالعه سـعی بر آن بوده است که به بررسـی این تک یاخته انگلی با دو روش مشـاهده مورفولوژیک و روش مولکولی پرداخته شـود تا گونه هموپروتئوس آلوده کننده کبوتران خانگی استان مازندران به طور دقیق مشخص شود.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه: تعداد ۱۵۰ قطعه کبوتر خانگی (Columba livia domestica) بصورت تصادفی طی ماه‌های دی ۱۳۹۳ تا تیر سال ۱۳۹۴ از نقاط مختلف استان مازندران انتخاب شدند و از آن‌ها خون گیری به عمل آمد. خون از ورید زیر بال کبوترها با سرنگ انسولین به میزان ۱ cc گرفته شد. یک قطره از خون بمنظور تهیه گسترش خونی مورد استفاده قرار گرفت و مابقـی خون بلافاصله به دو ظرف میکروتیـوپ ۱/۵ cc هر کدام حاوی ۰/۵cc خون انتقال داده شد و به سطح بالای خون برای جلوگیری از قارچ زدگی الکل اتانول اضافه شـد و پـس از درج کد مربوطه نمونه‌ها به فریزر ۲۰°C- انتقال داده شدند.

بررسی‌های میکروسکوپیک: گسترش‌های خون تهیه شده با استفاده از متانول، به مدت ۳ دقیقه تثبیت گردید سپس بوسیله محلول رنگ گیمسا (شرکت مرک) به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند و پس از شستشو با آب و خشک شدن در جریان هوا به وسیله میکروسکوپ نوری مورد مشاهده و بررسی دقیق قرار گرفتند.

بررسـی‌های مولکولـی: در ایـن مطالعه تعداد ۱۷ نمونـه خون کبوتر آلوده به تک یاخته هموپروتئوس بمنظور انجام بررسی‌های مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. لازم به ذکر است که کبوتر هایی که مورد بررسی قرار گرفتند فاقد علایم بالینی بودند.

DNA ژنومیـک با اسـتفاده از کیـت اسـتخراج Roche (Roche, Mannheim, Germany) بـا توجه به پروتکل موجود در کیت مذکور از نمونه‌های مربوطه اسـتخراج گردید. سپس نمونه‌های DNA ژنومیک جهت تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم b میتوکندریایی باندازه تقریبی ۵۳۰ جفت باز بوسیله پرایمرهای اختصاصی که در جدول ۱ نشان داده شده مورد استفاده قرار گرفت.

تکثیر قطعه مورد نظر در حجم ۵۰ µl با حضور ۲۰۰ µM از dNTPs ، ۱/۵ mM ،MgCl۲ ۲۰۰ nM از هـر یـک از پرایمرهای اختصاصی، ۱/۵ واحد Taq DNA polymerase انجام شـد. شـرایط تکثیر DNA در ترموسـایکلر ۹۴ °C سه دقیقه، سپس ۳۵ سیکل در ۹۴ °C یک دقیقه ،۵۳ °C بـه مـدت ۴۵ ثانیـه، ۷۲ °C به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتـاً ۷۲°C به مـدت۱۰ دقیقه بوده اسـت. محصـولات حاصـل از روش PCR بمنظور صحت انجام واکنش با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ ٪ بررسـی شـدند و پس از اطمینان از صحت انجام واکنش ، محصولات حاصلـه جهت تعیین توالی یک طرفه با اسـتفاده از پرایمر (Forward:ATGGTGCTTTCGATATATGCATG) به شرکت bioneer ارسال گردیدنـد. پس از تعیین توالی کروماتوگرام توالی‌ها با اسـتفاده از نرم افزار chromas version ۳/۱ تجزیه و تحلیل گردیده و سـپس با اسـتفاده از نـرم افـزار Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) با دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسـه شـدند. پس از آن توالیها با استفاده از روش clustalW از نرم افزار Mega۵ هم تراز شده و آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از روش Maximum Likelihood صورت گرفت. از توالـی نوکلئوتیـدی Plasmodium reichenow (AF۰۶۹۶۱۰) به عنوان گروه خارجی (Out group) استفاده شد.

جـدول ۱. توالـی پرایمرهـای اختصاصـی جهـت تکثیر بخشـی از ژن سـیتوکروم b میتوکندریایی هموپروتئوس کولومبه.

Primer	(۳´-۵´) Sequence
Forward	ATGGTGCTTTCGATATATGCATG
Reverse	CATTATCTGGATGTGATGTGATAATG

نتایج

طی بررسی‌های انجام شده با روش میکروسکوپی، نتایج نشان می‌دهد که از ۱۵۰ نمونه خون جمع آوری شده از کبوتران خانگی استان مازندران، تعـداد ۱۷ عدد از آن‌هـا آلوده به تک یاخته هموپروتئـوس بودند و درصد آلودگی ۱۱/۳۳٪ می‌باشد و بر اساس کلید تشخیصی Levine و همکاران در سـال ۱۹۷۳ (۱۴) همگی هموپروتئوس کولمبه تشـخیص داده شـدند (تصویر ۱).

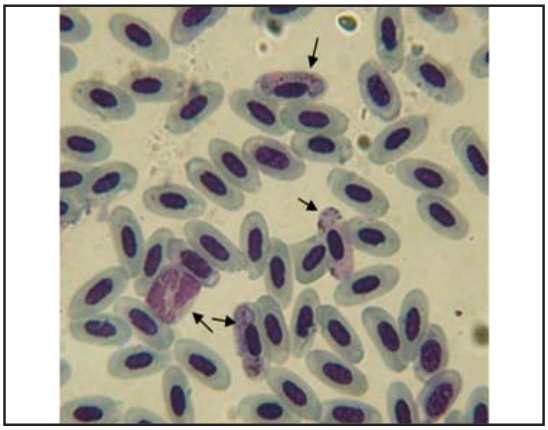
پس از تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم b توسط واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و تأیید قطعه مورد نظر (تصویر ۲) تعداد ۱۷ نمونه تعیین توالی گردید که همه نمونه‌ها توالی مشابه داشتند. باتعیین توالی یک طرفه تقریباً ۴۵۰ نوکلئوتید به طور صحیح مورد خوانش قرار گرفت. توالی‌های مربوطه تشابه زیادی را با هموپروتئوس کولمبه (*Haemoproteus columbae*) نشان دادند.

ارتباط فیلوژنتیکی بین توالی‌های جدا شـده و ژنوتیپ‌های مختلف از هموپروتئوس بر اساس ژن سیتوکروم b و نتایج درختچه فیلوژنیک نشان می‌دهـد گونه مطالعه شـده از لحاظ فیلوژنتیکی قرابـت نزدیکی با دیگر گونه‌هـای *Haemoproteus columbae* ثبـت شـده دارد. در جدول ۲ میـزان اختلاف بین گونه هموپروتوئس مطالعه شـده و دیگر توالی‌های

Archive of SID
www.SID.ir

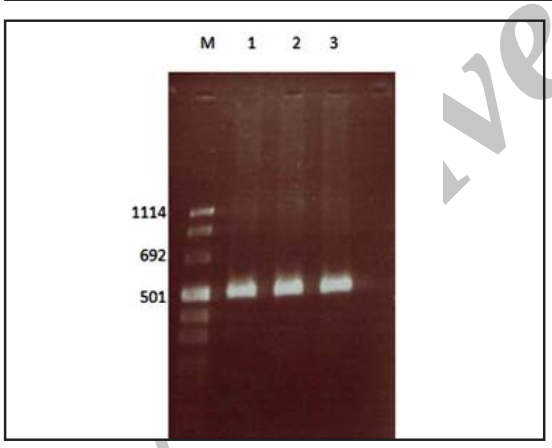
جدول ۲. میزان اختلاف بین توالی ژن سیتوکروم اکسیداز b هموپروتئوس کولمبه در این مطالعه (KU۹۶۳۲۱۲) و دیگر گونه‌های هموپروتئوس موجود در بانک ژن.

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹
KU۹۶۳۲۱۲.۱		۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲
AF۴۹۵۵۵۴.۲	۰/۰۱		۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲
AY۷۱۴۱۹۳.۳	۰/۰۲	۰/۰۱		۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۲
JQ۹۸۸۶۸۳.۴	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۱		۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲
JQ۹۸۸۷۲۹.۵	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰		۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲
KF۵۳۷۳۱۴.۶	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۲		۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲
KJ۱۵۲۶۳۹.۷	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰		۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲
KJ۴۸۸۸۰۳.۸	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱		۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۲
KM۰۵۶۴۲۳.۹	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰		۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۲
KT۲۹۰۹۲۲.۱۰	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱		۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۲
KT۲۹۰۹۲۳.۱۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱		۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۲
KT۲۹۰۹۲۴.۱۲	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱		۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۲
KT۲۹۰۹۲۵.۱۳	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲		۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲
KT۲۹۰۹۲۶.۱۴	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۲		۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲
KT۲۹۰۹۲۷.۱۵	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۱	۰/۰۲		۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲
KU۱۳۱۵۸۳.۱۶	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲		۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲
KU۱۳۱۵۸۴.۱۷	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۱		۰/۰۱	۰/۰۲
KU۱۳۱۵۸۵.۱۸	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۱	۰/۰۱		۰/۰۲
AF۰۶۹۶۱۰P..۱۹ reichenow	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۳	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۰	۰/۲۱	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	



تصویر ۱. میکرو و ماکرو گامتوسایت هموپروتئوس کولمبه در گسترش خون کبوتر آلوده.

Haemoproteus columbae آورده شده است. نتایج حاصل از توالی سیتوکروم b که از کبوتران خانگی در استان مازندران به دست آمده دربانک ژنی با شماره دسترسی KU۹۶۳۲۱۲ ثبت شده است. بررسی توالی‌های الگوی هدف و برخی از توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی با استفاده از نرم افزار Mega۵ و آنالیز فیلوژنتیکی نشان داده که توالیهای جدا شده در این مطالعه قرابت نزدیکی با توالیهای ثبت شده دیگر گونه‌های هموپروتئوس در بانک ژنی با شماره دسترسی KU۱۳۱۵۸۵ ، KM۰۵۶۴۲۳ ، AYV۱۴۱۹۳ ، KJ۴۸۸۸۰۳ ، JQ۹۸۸۷۲۹، JQ۹۸۸۶۸۳ و KU۱۳۱۵۸۴ نشان می‌دهد.



تصویر ۲. الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های هموپروتئوس (۱، ۲ و ۳: نمونه M : مارکر).

بحث

در شمال کشور ایران بعلت شرایط و اقلیم مناسب برای پرندگان و همچنین ازدیاد ناقلین این انگل ، انجام تحقیقات در ارتباط با تک یاخته هموپروتئوس می‌تواند حائز اهمیت باشد (۸). مطالعات مختلفی در خصوص بررسی مورفولوژیک تک یاخته هموپروتئوس در کبوتران و سایر گونه‌های پرندگان از سراسر نقاط دنیا انجام گرفته است. در ایران مطالعات مختلفی از نقاط مختلف کشور انجام گرفته است که نتایج نشان می‌دهد میزان شیوع آلودگی هموپروتئوس در کبوتران خانگی شمال کشور ایران (۱۰،۲۲) در

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعات قبلی که روی کبوترهای اهلی و وحشی گیلان، مازندران، گلستان و سمنان انجام گرفته بین ۱۷/۴۷٪- ۳۰ ٪ و در سایر نقاط کشور میزان شیوع بین ۱۲/۵٪- ۸۸٪ در کبوتران وحشی و سایر گونه‌های پرندگان بوده است (۲،۱۵). در برزیل (۱،۱۵) و نیجریه (۲) مطالعات انجام گرفته بیان گر میزان شیوع آلودگی بین ۶/۵٪-۱۰۰٪ در کبوتران وحشی بوده است (۲۰). در مطالعه حاضر چناچه در نتایج نشان داده شده است از تعداد ۱۵۰ قطعه کبوتر دست آموز استان مازندران، تعداد ۱۷ (۱۱/۳۳٪) عدد آن‌ها آلوده به تک یاخته هموپروتئوس بودند که پس از بررسی دقیق گونه هموپروتئوس کولمبه تشخیص داده شدند. مطالعات قبلی نگارنده و همکاران در مقایسه با مطالعه حاضر نتایج نشان می‌دهد که میزان آلودگی کبوتران بررسی شده در این مطالعه مشابه میزان آلودگی کبوتران در سایر مناطق شمال کشور بوده که این میزان بیان گر تقریباً یکسان بودن میزان آلودگی در خطه شمال ایران است. همچنین در سایر مطالعات مقایسه‌ای انجام گرفته ، نتایج بیان گر این است که میزان شیوع آلودگی هموپروتئوس در کبوتران اهلی نسبت به کبوتران با کبوتران وحشی از میزان پائین تری برخوردار است و می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که در کبوتران اهلی بدلیل رعایت مسائل بهداشتی و استفاده از سموم حشره کش کمتر در معرض گزش میزبان ناقل قرار می‌گیرند و انتقال آلودگی کمتر صورت می‌گیرد بنابراین میزان شیوع آلودگی کمتری را نسبت به کبوتران با زندگی آزاد و یا کبوتران وحشی خواهند داشت (۶،۷). طی بررسی مطالعات قبلی در ارتباط با تشخیص مولکولی تک یاخته هموپروتئوس در پرندگان این مطلب حائز اهمیت است که در مطالعات مولکولی انجام شده ، ناحیه سیتوکروم b توالی ژنی هموپروتئوس به عنوان هدف مورد مطالعه بوده است و از دلایل عمده استفاده از ژن‌های میتوکندریایی این است که در این ژن‌ها به علت زیاد بودن تعداد نسخه‌های مضاعف هموژن، کار کردن با آن‌ها در مقایسه با ژن‌های هسته‌ای تک نسخه‌ای ساده‌تر بوده و وراثت مادری دقیق آن‌ها بویژه در سطح درون گونه‌ای مفید بوده است . از این رو ژن‌های سیتوکروم معمولاً تنها به صورت درون گونه‌ای یا برای گونه‌های مرتبط نزدیک به هم استفاده می‌شوند. طبق مطالب بیان شده ، در مطالعه حاضر PCR بر روی ناحیه ی سیتوکروم b ژن میتوکندریایی تک یاخته هموپروتئوس انجام شد. نتایج حاصل از تعیین هر نمونه نشان می‌دهد که قطعاتی به طول تقریبی ۴۵۰ جفت باز جداسازی شده‌اند. طی این مطالعه توالی‌های حاصل از تکثیر ناحیه سیتوکروم b ژن هموپروتئوس با توالی‌های یکسانی از NCBI هم ردیف شدند و مورد مقایسه قرار گرفتندکه در نهایت پس از انجام blastn ، مشخص شد که توالی‌های الگوی هدف در این آنالیز بیشترین میزان شباهت را به ژنوم سیتوکروم b هموپروتئوس کولمبه (۹۷٪-۱۰۰٪) داده‌اند.

نتیجه‌گیری: می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که گونه تک یاخته ی هموپروتئوس آلوده کننده کبوتران استان مازندران از نوع هموپروتئوس کولمبه می‌باشد. همانگونه که قبلاً نیز اشاره شد بیش از ۱۲۰ گونه این تک یاخته تاکنون در قسمتهای مختلف دنیا و در میزبانان گوناگون گزارش شده است. بنابراین مطالعات مولکولی روش مطمئنی جهت شناسایی گونه و بررسی‌های فیلوژنتیکی می‌باشد.

تشکر و قدر دانی

در پایان از کارشناس محترم انگل شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل جناب آقای نورالدین سلیمانی برای همکاری در این طرح کمال تشکر و قدر دانی به عمل می‌آید.

References

1. Adriano, E.A., Cordeiro, N.S. (2001) Prevalence and Intensity of *Haemoproteus columbae* in Three Species of Wild Doves from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 96: 175-178.
2. Akinpelu, AI. (2008) Prevalence and Intensity of Blood Parasites in Wild Pigeons and Doves (Family: Columbidae) from Shasha Forest Reserve, Nigeria, Asian. J Anim Vet Adv. 3: 109-114.
3. Apanius, V. (2000) Island and taxon effects in parasitism and resistance of lesser Antillean birds. Ecolog. 81: 1959-1969.
4. Bentz, S., Rigaud, T., Barrcoa, M., Martin-Laurent, F., Bru, D., Moreau, G., Faivre, B. (2006) Sensitive measure of prevalence and parasitaemia of haemosporidia from European blackbird (Turdus merula) populations: value of PCR-RFLP and quantitative PCR. Parasit. 133: 685-692.
5. Benyon, PH., Forbes, NA., Harcout, NH. (1996) Manual of Raptors, Pigeons and Waterfowl. (2nd ed.) Iowa State University Press, Ames, Iowa.
6. Bishop, MA., Bennett, GF. (1992) Host-parasite Catalogue of the Avian Haematozoa: Bibliography of the Avian Blood-Inhabiting Haematozoa. Memorial University of Newfoundland. (1st ed.) A John Wiley & Sons, Ltd., Publication. Iowa, USA.
7. Cardona, C.J., Ihejirika, A., McClellan, L. (2002) *Haemoproteus* lophortyx infection in bobwhite quail. Avian Dis. 46: 249-255.
8. Earle, RA., Bastianello, SS., Bennett, GF., Krecek, RC. (1993) Histopathology and mor-

Archive of SID
www.SID.ir

phology of the tissue stages of *Haemoproteus columbae* causing mortality in columbiformes. Avian Pathol. 22: 67-80.

9. Fakhar, M., Kalani, H., Rahimi-Esboei, B. (2012) Hemoprotozoa in free-ranging birds from rural areas of Mazandaran Province, northern Iran. Comp Clin Pathol. DOI 10.1007/s00580-012-1441-6.
10. Garnham, PCC. (1966) Malaria Parasites and Other Haemosporidia. (2nd ed.) Oxford: Blackwell Scientific Publications. london, UK.
11. Heidenreich, M. (1997) Birds of Prey Medicine and Management. (1st ed.) Blackwell Science Limited, Oxford, london, UK.
12. Iezhova, TA., Dodge, M., Sehgal, RNM., Smith, TB., Valkiūnas, G. (2011) New avian *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from African birds, with a critique of the use of host taxonomic information in hemoproteid classification. J Parasit. 97:682-94.
13. Križanauskienė, A., Pérez-Tris, J., Palinauskas, V., Hellgren, O., Bensch, S., Valkiūnas, G. (2010) Molecular phylogenetic and morphological analysis of haemosporidian parasites (Haemosporida) in a naturally infected European songbird, the blackcap Sylvia atricapilla, with description of *Haemoproteus* pallidulus sp. Parasit. 137: 217-27.
14. Levine,N. (1973) Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man. (2nd ed.) Burgess Publishing Company, Minneapolis, USA.
15. Marques, SMT., Quadroz, RMD., Silva, CJD., Baldo, M. (2007) Parasites of Pigeons (columba livia) in Urban of Lages, South. Braz., Parasit Latin. 62: 183-187.
16. Palinauskas, V., Iezhova, T. A., Križanauskienė, A., Markovets, M. Y., Bensch, S., Valkiūnas, G.(2013) Molecular characterization and distribution of *Haemoproteus* minutes(Haemosporida, Haemoproteidae): A pathogenic avian parasite. Parasit Intern. 62: 358-363.
17. Richard, FA., Sehgal, NM., Jones,HI., Smith,TB. (2002) A Comprative of PCR-Based Detection Methods For Avian Maiaria. J Parasitol. 88819-822.
18. Sá, MR. (2011) Studies of avian malaria and Brazilin the international scientific context (1907-1945). Hist Cienc Saude Mang. 18: 499-518.
19. Tabaripour, R., Youssefi, MR., Tabaripour, R. (2015) Genetic Identification of Orientobilharzia turkestanicum from sheep isolates in Iran. Iran J Parasit. 10: 62-68.
20. Valkiūnas, G. (2005) Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. (2nd ed.) Boca Raton CRC Press, Florida: USA.
21. Valkiūnas, G., Iezhova, TA., Križanauskienė, A., Palinauskas, V., Sehgal, RNM., Bensch S. (2008) A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. J Parasit. 94: 1395-401.
22. Youssefi, MR., Gerami sadeghian, A., Esfandiari B. (2010) Prevalence of *Haemoproteus columbae* infection in Columba livia in north of Iran. Word J Zoo. 5: 275-277.
23. Youssefi, MR., Tabaripour, R., Fallah-Omrani, V., Spotin, A., Esfandiari, B. (2013) Genotypic characteri-zation of Echinococcus granulosus in Iranian goats. Asian Pac J Trop Dis. 3: 362-366.
24. Ziegyte, R., Palinauskas, V., Bernotiene˙, R., Iezhova, T. A., Valkiunas, G. (2014) *Haemoproteus* minutus and *Haemoproteus* belopolskyi (Haemoproteidae): Complete sporogony in the biting midge Culicoides impunctatus (Ceratopogonidae), with implications on epidemiology of haemoproteosis. Exp Parasit. 145: 74-79.

Archive of SID
www.SID.ir

Molecular identification of *Haemoproteus* in domestic pigeons (*Colombia livia domestica*) in Mazandaran Province

Tabaripour, R.[1], Youssefi, M.R.[2*], Rahbari, S.[3], Arghavan, M.[3]

[1]*Department of Cellular and Molecular, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran*
[2]*Department of Parasitology, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran*
[3]*Department of Veterinary Parasitology, Tehran University, Tehran, Iran*
(Received 23 August 2017, Accepted 20 November 2017)

Abstract:

BACKGROUND: *Haemoproteus* is a parasitic protozoa, of which over 120 species have been reported from wild aquatic birds, sparrows and other birds orders. So far, no study has been performed to determine the species of this protozoa in the north of Iran. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to investigate the molecular and structural properties of Heamoproteus protozoa in the blood of infected pigeons in Mazandaran province. **METHODS:** In the present study molecular investigation of *Haemoproteus* infection was carried out in domestic pigeons of Mazandaran province. For this purpose, samples were obtained randomly from 150 pigeons in different regions of Mazandaran. At first, blood samples were stained with Gimsa stain and examined for presence of *Haemoproteus* gametocytes. Then, positive samples were used for PCR by Cytochrome b genes. **RESULTS:** Obtained results after morphological survey showed that 17 samples were positive indicating infection rate of 11.33%. Molecular investigation and analysis of PCR products showed that all of the samples belonged to *Haemoproteus columbae* species. **CONCLUSIONS:** Being precisely familiar with this kind of protozoan and its species can prevent many mistakes and be helpful in differential diagnosis of different species. This study has revealed that the most common species of *Haemoproteus* in Mazanadran province is *Haemoproteus columbae*.

Keyword: *Haemoproteus columbae*, *Columbia livia* domestica, phylogeny, PCR

Archive of SID

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Sequence specific primers for amplification of mitochondrial cytochrome b gene of Haemoproteous columbae.

Table 2. The difference between the sequence of *Haemoproteus columbae* (cytb gene) in this study and other *Haemoproteus* species in Genbank.

Figure 1. Micro and Macro gametocyte *Haemoproteus columbae* in Columbia livia blood smear.

Figure 2. Electrophoresis of PCR products of *Haemoproteus* samples (1, 2 and 3: samples M: marker).

***Corresponding author's email: Youssefi929@hotmail.com@ut.ac.ir, Tel: 011-32415159, Fax: 011-32415090**

www.SID.ir