

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

رضا طبری پور<sup>۱</sup> محمد رضا یوسفی<sup>۲\*</sup> صادق رهبری<sup>۳</sup> محمد ارغوان<sup>۳</sup>

(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 آبان ماه ۱۳۹۶)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** هموپروتئوس یک تک یاخته انگلی است که بالغ بر ۱۲۰ گونه از آن به طور عمده از پرندگان وحشی آبی، 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 بررسی 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 نمونه‌هایی که در گسترش خون رنگ آمیزی شده به روش گیمسا مثبت تشخیص داده شدند با پرایمرهای مربوط به ژن سیتوکروم b تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (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. نتیجه گیری 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، فیلوزنی، 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 پرند 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 پرند 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 آبی و سایر پرندگان را آلوده می‌کنند. گونه‌های کمی از هموپروتئوس نظیر *H. columbae*، *H. meleagridis*، *H. nettionis* و *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 کولیکوتیده و حشرات هیپوبوسیده انتقال می‌یابند (۳۴). 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 پرند منتقل می‌شود. سپس شیزونت‌های 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 پرند آلوده به این تک یاخته با دهان باز نفس کشیده و دچار ضعف، بی اشتهاپی 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 ناقین



جدول ۱. توالی پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم b میتو کندریایی هموپروتئوس کولومبه.

Primer	(۵' - ۳') Sequence
Forward	ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG
Reverse	CATTATCTGGATGTGATGTGATAATG

۱/۵ واحد Taq DNA polymerase انجام شد. شرایط تکثیر DNA در ترموسایکلر  $94^{\circ}\text{C}$  سه دقیقه، سپس  $35^{\circ}\text{C}$  سیکل در  $94^{\circ}\text{C}$  یک دقیقه،  $53^{\circ}\text{C}$  به مدت  $45$  ثانیه،  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت  $72$  ثانیه و نهایتاً  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت  $10$  دقیقه بوده است. محصولات حاصل از روش PCR بمنظور صحت انجام واکنش با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ بررسی شدند و پس از اطمینان از صحت انجام واکنش، محصولات حاصله جهت تعیین توالی یک طرفه با استفاده از پرایمر (Forward): ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG به شرکت bioneer ارسال گردیدند. پس از تعیین توالی کروماتوگرام توالیها با استفاده از نرم افزار chromas version ۳/۱ تجزیه و تحلیل گردیده و سپس با استفاده از نرم افزار Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) با دیگر توالیهای موجود در بانک ژن مقایسه شدند. پس از آن توالیها با استفاده از روش clustalW از نرم افزار Mega هم تراز شده و آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از روش Maximum Likelihood صورت گرفت. از توالی نوکلئوتیدی Plasmodium reichenow (AF۰۶۹۶۱۰) به عنوان گروه خارجی (Out group) استفاده شد.

## نتایج

طی بررسیهای انجام شده با روش میکروسکوپی، نتایج نشان می دهد که از ۱۵۰ نمونه خون جمع آوری شده از کبوتران خانگی استان مازندران، تعداد ۱۷ عدد از آن ها آلوده به تک یاخته هموپروتئوس بودند و درصد آلودگی ۱۱/۳۳٪ می باشد و بر اساس کلید تشخیصی Levine و همکاران در سال ۱۹۷۳ (۱۴) همگی هموپروتئوس کولومبه تشخیص داده شدند (تصویر ۱).

پس از تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم b توسط واکنش زنجیره ای پلی مرز 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 کولومبه (*Haemoproteus columbae*) نشان دادند.

ارتباط فیلوژنتیکی بین توالیهای جدا شده و ژنوتیپهای مختلف از هموپروتئوس بر اساس ژن سیتوکروم b و نتایج درختچه فیلوژنتیک نشان می دهد گونه مطالعه شده از لحاظ فیلوژنتیکی قرابت نزدیکی با دیگر گونههای *Haemoproteus columbae* ثبت شده دارد. در جدول ۲ میزان اختلاف بین گونه هموپروتئوس مطالعه شده و دیگر توالیهای

خون خوار انجام می شود (۴). از نظر پراکندگی جغرافیایی، بیشتر گونههای انگل هموپروتئوس پرندگان در زیستگاه هایی با آب و هوای گرمسیری یا نیمه گرمسیری پراکنده شده اند (۱۶). درجه شیوع و میزان آلودگی انگلی در گونههای مختلف پرندگان، فصل های سال و در زیستگاه های مختلف متغیر است (۲۲). مطالعات مختلفی در زمینه بررسی تک یاخته هموپروتئوس در نقاط مختلف جهان انجام گرفته است ولی در کشور ما بخصوص در مناطق شمالی کشور تاکنون هیچگونه مطالعه ملکولی بر روی این تک یاخته صورت نگرفته است. در این مطالعه سعی بر آن بوده است که به بررسی این تک یاخته انگلی با دو روش مشاهده مورفولوژیک و روش مولکولی پرداخته شود 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 آن ها 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 مابقی خون بلافاصله به دو ظرف میکروتیوب 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 شد و پس از درج کد مربوطه نمونهها به فریژر  $20^{\circ}\text{C}$  - انتقال داده شدند.

**بررسیهای میکروسکوپی:** گسترش های خون تهیه شده با استفاده از متانول، به مدت ۳ دقیقه تثبیت گردید سپس بوسیله محلول رنگ گیمسا (شرکت مرک) به مدت ۲۵-۳۰ 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.

**بررسیهای مولکولی:** در این مطالعه تعداد ۱۷ نمونه خون کبوتر آلوده به تک یاخته هموپروتئوس بمنظور انجام بررسیهای مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. لازم به ذکر است که کبوترهایی که مورد بررسی قرار گرفتند فاقد علائم بالینی بودند.

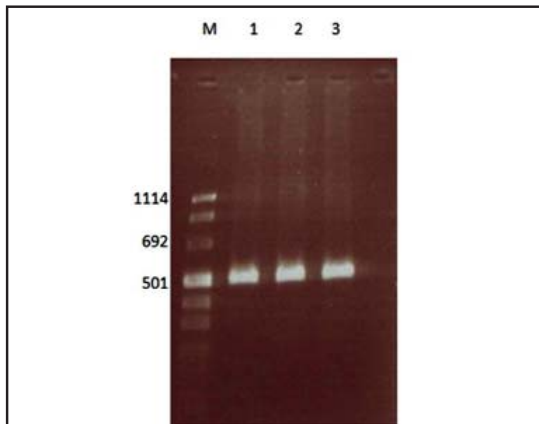
DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج Roche (Roche, Mannheim, Germany) با توجه به پروتکل موجود در کیت مذکور از نمونههای مربوطه استخراج گردید. سپس نمونههای DNA ژنومیک جهت تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم b میتو کندریایی با اندازه تقریبی ۵۳۰ جفت باز بوسیله پرایمرهای اختصاصی که در جدول ۱ نشان داده شده مورد استفاده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

تکثیر قطعه مورد نظر در حجم  $50\ \mu\text{l}$  با حضور  $200\ \mu\text{M}$  از dNTPs،  $1/5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$   $200\ \text{nM}$  از هر یک از پرایمرهای اختصاصی،

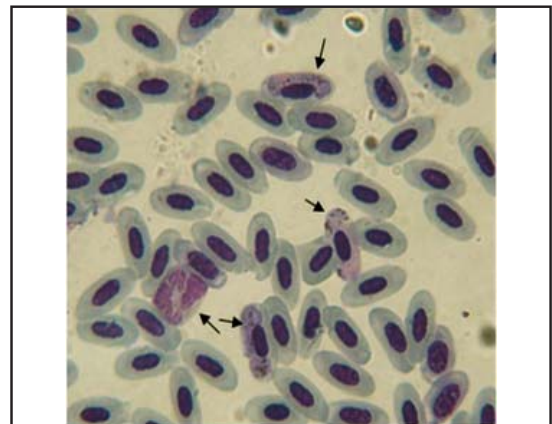


جدول ۲. میزان اختلاف بین توالی ژن سیتوکروم اکسیداز b هموپروتوس کولمبه در این مطالعه (KU۹۶۳۲۱۲) و دیگر گونه‌های هموپروتوس موجود در بانک ژن.

	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
AF۲۹۵۵۵۲.۲	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
KJ۴۸۸۰۳.۸	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
KM۰۵۶۴۳۳.۹	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	۰/۰۳		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	۰/۰۱	۰/۰۲
AF۰۶۹۶۱-P-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	۰/۲۲	۰/۲۰	۰/۲۱	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲



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



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

### بحث

در شمال کشور ایران بعلاوه شرایط و اقلیم مناسب برای پرندگان و همچنین ازدیاد ناقلین این انگل، انجام تحقیقات در ارتباط با تک یاخته هموپروتوس می‌تواند حائز اهمیت باشد (۸). مطالعات مختلفی در خصوص بررسی مورفولوژیک تک یاخته هموپروتوس 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 هموپروتوس در کبوتران خانگی شمال کشور ایران (۲۲، ۱۰) در

*Haemoproteus columbae* آورده شده است. نتایج حاصل از توالی سیتوکروم b که از کبوتران خانگی در استان مازندران به دست آمده در بانک 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 هموپروتوس در بانک ژنی با شماره دسترسی KU۱۳۱۵۸۵، KM۰۵۶۴۳۳، AY۷۱۴۱۹۳، JQ۹۸۸۶۸۳، JQ۹۸۸۷۲۹، KJ۴۸۸۰۳، KU۱۳۱۵۸۴ نشان می‌دهد.



تک یاخته تاکنون در قسمتهای مختلف دنیا و در میزبانان گوناگون گزارش شده است. بنابراین مطالعات مولکولی روش مطمئنی جهت شناسایی گونه و بررسی های فیلوژنتیکی می باشد.

### 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 می آید.

### References

- 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.
- 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.
- Apanius, V. (2000) Island and taxon effects in parasitism and resistance of lesser Antillean birds. Ecolog. 81: 1959-1969.
- 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.
- Benyon, PH., Forbes, NA., Harcourt, NH. (1996) Manual of Raptors, Pigeons and Waterfowl. (2<sup>nd</sup> ed.) Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Bishop, MA., Bennett, GF. (1992) Host-parasite Catalogue of the Avian Haematozoa: Bibliography of the Avian Blood-Inhabiting Haematozoa. Memorial University of Newfoundland. (1<sup>st</sup> ed.) A John Wiley & Sons, Ltd., Publication. Iowa, USA.
- Cardona, C.J., Ihejirika, A., McClellan, L. (2002) *Haemoproteus lophortyx* infection in bobwhite quail. Avian Dis. 46: 249-255.
- Earle, RA., Bastianello, SS., Bennett, GF., Krecek, RC. (1993) Histopathology and mor-

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 گونه های 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 چنانچه در نتایج نشان داده شده است از تعداد ۱۵۰ قطعه کبوتر دست آموز استان مازندران، تعداد ۱۷ (۱۱/۳۳٪) عدد آن ها 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 می دهد 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 مقایسه ای 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 می توان اینگونه نتیجه گیری کرد که در کبوتران اهلی بدلیل رعایت مسائل بهداشتی و استفاده از سموم حشره کش کمتر در معرض گزش میزبان ناقل قرار می گیرند و انتقال آلودگی کمتر صورت می گیرد 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 ژن های میتوکندریایی این است که در این ژن ها به علت زیاد بودن تعداد نسخه های مضاعف هموژن، کار کردن با آن ها در مقایسه با ژن های هسته ای تک نسخه ای ساده تر بوده و وراثت مادری دقیق آن ها بویژه در سطح درون گونه ای مفید بوده است . از این رو ژن های سیتوکروم معمولاً تنها به صورت درون گونه ای یا برای گونه های مرتبط نزدیک به هم استفاده می شوند. 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 می دهد که قطعاتی به طول تقریبی ۴۵۰ جفت باز جداسازی شده اند. طی این مطالعه توالی های حاصل از تکثیر ناحیه سیتوکروم b ژن هموپروتئوس با توالی های یکسانی از NCBI هم ردیف شدند و مورد مقایسه قرار گرفتند که در نهایت پس از انجام blastn ، مشخص شد که توالی های الگوی هدف در این آنالیز بیشترین میزان شباهت را به ژنوم سیتوکروم b هموپروتئوس کولمبه (۹۷٪-۱۰۰٪) داده اند. نتیجه گیری: می توان اینگونه نتیجه گیری کرد که گونه تک یاخته ی هموپروتئوس آلوده کننده کبوتران استان مازندران از نوع هموپروتئوس کولمبه می باشد. همانگونه که قبلاً نیز اشاره شد بیش از ۱۲۰ گونه این



- 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. (2<sup>nd</sup> ed.) Oxford: Blackwell Scientific Publications. London, UK.
  11. Heidenreich, M. (1997) Birds of Prey Medicine and Management. (1<sup>st</sup> 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. (2<sup>nd</sup> 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 minutus* (Haemosporida, Haemoproteidae): A pathogenic avian parasite. Parasit Intern. 62: 358-363.
  17. Richard, FA., Sehgal, NM., Jones, HI., Smith, TB. (2002) A Comparative of PCR-Based Detection Methods For Avian Malaria. J Parasitol. 88:819-822.
  18. Sá, MR. (2011) Studies of avian malaria and Brazil in 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. (2<sup>nd</sup> 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 characterization of *Echinococcus granulosus* in Iranian goats. Asian Pac J Trop Dis. 3: 362-366.
  24. Ziegyte, R., Palinauskas, V., Bernotienė, R., Iezhova, T. A., Valkiūnas, G. (2014) *Haemoproteus minutus* and *Haemoproteus belopol'skyi* (Haemoproteidae): Complete sporogony in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Ceratopogonidae), with implications on epidemiology of haemoproteosis. Exp Parasit. 145: 74-79.





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

Tabaripour, R.<sup>1</sup>, Youssefi, M.R.<sup>2\*</sup>, Rahbari, S.<sup>3</sup>, Arghavan, M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Cellular and Molecular, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran

<sup>2</sup>Department of Parasitology, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran

<sup>3</sup>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 *Haemoproteus* 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 Mazandaran province is *Haemoproteus columbae*.

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

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Sequence specific primers for amplification of mitochondrial cytochrome b gene of *Haemoproteus 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 *Columba livia* blood smear.

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

