DOI: 1022092/VJ.2021.352838.1803
شماره ۱۳۴ بهار ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی مولکولی انگل هموپروتئوس در کبک‌های حیات وحش استان مازندران

• **سید رضا طبری‌پور**
گروه سلولی و ملکولی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران
• **محمد رضا یوسفی (نویسنده مسئول)**
گروه انگل شناسی دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران
• **حسین گیلانی**
دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۶-۰۹-۱۳۹۹ تاریخ پذیرش:۲۵-۱۲-۱۳۹۹
Email: youssefi929@hotmail.com

چکیده

Haemoproteus spp. تک‌یاخته داخل سلولی ماکیان می‌باشد که گلبول‌های هسته‌دار پرندگان را آلوده می‌کند. بالغ بر ۱۴۰ گونه از آن شناخته شده است، که به طور عمده از پرندگان وحشی و سایر راسته‌های پرندگان گزارش شده است. ناقل گونه‌های آن مگس‌های ***Hipoboscidae*** و پشه‌های ***Culicidae*** می‌باشند. در پرندگانی که ضعف سیستم ایمنی دارند، هموپروتئوزیس می‌تواند، منجر به آنمی همولایتیک، انورکسی و مرگ شود. هدف از این مطالعه بررسی مولکولی تک‌یاخته ***Haemoproteus. spp*** در کبک‌های حیات وحش استان مازندران و شناسایی گونه‌های موجود در منطقه می‌باشد. نخست از تعداد ۱۲ قطعه کبک‌های وحشی که با تله‌گذاری در طبیعت تهیه گردید پس از نمونه‌برداری از بال حیوان گسترش‌های خون رنگ‌آمیزی شده با گیمسا جهت شناسایی ماکرو و میکروگامت‌های ***Haemoproteus. spp*** در گلبول‌های قرمز پرندگان به عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شدند. سپس نمونه‌های خون تهیه شده از این کبک‌ها به منظور انجام آزمایش PCR، بر روی ژن سیتوکروم b، مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی لام خون محیطی بیان‌گر ۵ نمونه مثبت از ۱۲ قطعه کبک مورد بررسی بود. انجام آزمایش PCR و بررسی توالی نوکلئوتیدی الگو با نرم‌افزار $BLAST_n$، آلودگی انگل ***Haemoproteus. spp*** را در نمونه‌های مثبت تاییدکرد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی الگو با توالی نوکلئوتیدی گونه‌های دیگر انگل ***Haemoproteus. spp*** نشان داد، شباهت کمی بین توالی نوکلئوتیدی الگو با توالی‌های نوکلئوتیدی مذکور وجود دارد. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد، گونه‌ی شناسایی شده انگل ***Haemoproteus. spp*** در این مطالعه گونه‌ای جدید می‌باشد، که ***Haemoproteus. partridage*** نامیده شد.

کلمات کلیدی: ***Haemoproteus spp***. ، کبک، PCR ، Hipoboscidae

● Veterinary Researches & Biological Products No 134 pp: 116-122

Molecular Detection of Haemoproteous Parasite in Wild life Partridges in Mazandaran Province

By: Tabaripoor, S. R., Department of Cellular and Molecular, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. Youssefi, M. R., (Corresponding Author) Department of Parasitology, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. and Gilani, H., Faculty of Veterinary Medicine, Babol-Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

Received:2020-12-06 Accepted: 2021-03-15

Email: youssefi929@hotmail.com

Haemoproteus. spp., infactly is a protozoan parasite. Over than 140 species of that have been known that generally it is reported among wild birds and other birds categories. Its species vector is Hippoboscidae fly and colicoidae mosquito. In birds who involved in weakness of immune system, *Haemoproteus. spp.* may result in Hemolytic anemia, anorexia and death. The aim of this study, Molecular study on *Haemoproteus. spp.* parasite in wildlife Partridge of Mazandaran province and identifying new species of parasite. First, 12 Pieces of wild partridges were sampled with trapping in nature. Then smears of colored bloods by giemsa studied to identify macro- and micro-gametes of Haemoproteus spp. in birds red blood cells, then positive samples, were studied in order to perform PCR method, on cytochrome b like gene. Morphology study in this research demonstrate 5 positive of 12 samples. Infection of Haemoproteus spp. in Positive samples were confirmed by study with PCR method and investigating sample nucleotide sequence using "BLAST" software. Comparing sample nucleotide sequence with nucleotide sequence of other species of Haemoproteus spp. parasite showed that similarity between sample nucleotide sequences with mentioned nucleotide sequences is low. Data analysis showed that identified species of Haemoproteous parasite in this study is a new species called *"Haemoproteus. partridage*".

Key words: *Haemoproteus. spp*., partridge, Hippoboscidae, PCR

مقدمه

آلودگی‌های انگلی در پرندگان بخش مهمی از بیماری‌های پرندگان را تشکیل می‌دهند و جزء شایع‌ترین عفونت‌ها می‌باشند، که در این میان تک‌یاخته‌های انگلی گروه عظیمی ازاین عفونت‌ها هستند، که قادرند بیماری‌های خطرناک و کشنده‌ای را به وجود آورند. از این تک‌یاخته‌های انگلی می‌توان به انگل *Haemoproteus. spp* اشاره کرد(۱۲). انگل خونی *Haemoproteus. spp* در شاخه آپی کمپلکسا، رده اسپورزوا، زیر رده کوکسیدیاها، در راسته‌ی هموسپورینا و در خانواده پلاسمودیده جای می‌گیرد(۵). جنس‌های انگل‌های هموسپوریدین پرندگان شامل: Leucocytozoon، Plasmodium، *Haemoproteus. spp.* و *Falicia* می‌باشد. انگل *Haemoproteus. spp*. به جهت آن که بسیار شبیه به عامل مولد بیماری مالاریا است، مالاریای کاذب نامیده می‌شود(۱۲). تک یاخته *Haemoproteus. spp*. به دوتحت جنس *Haemoproteus. spp* و *Para Haemoproteus. spp* طبقه‌بندی شده است، که بیش از ۱۴۰ گونه از انگل *Haemoproteus. spp* در پرندگان شناسایی شده است. این گونه‌ها اغلب انگل‌های خونی پرندگان وحشی‌اند. البته غیر از پرندگان وحشی، مرغان آبزی و دیگر خانواده پرندگان را آلوده می‌کنند(۴). انگل *Haemoproteus. spp* علاوه بر پرندگان، خزندگان، دوزیستان و حتی پستاندران را آلوده می‌کند. تک‌یاخته *Haemoproteus. spp* را پشه‌های کولیکوئیده و مگس‌های هیپوبوسیده انتقال می‌دهند. همچنین بیان شده، که بسیاری از گونه‌های انگل *Haemoproteus. spp* را پشه‌های سراتوپوگونیده و گونه‌های کمی را مگس‌های هیپوبوسیده انتقال می‌دهند. در چرخه زندگی تک‌یاخته *Haemoproteus. spp*، اسپوروزوآیت‌های انگل طی خون خواری پشه(ناقل) به پرنده (میزبان) منتقل می‌شود. شیزونت‌ها در سلول‌های اندوتلیال عروق خونی ریه دیده می‌شوند، شاید شیزونت‌ها در کبد، طحال وکلیه یافت شوند و ماکرو و میکروگامت‌ها در داخل گلبول‌های قرمز میزبان ایجاد می‌شوند(۱۱).

به طور کلی چرخه غیرجنسی انگل *Haemoproteus. spp* در خون محیطی پرندگان و چرخه جنسی در ناقلین خون‌خوار انجام می‌شود. از نظر پراکندگی جغرافیایی بیشتر گونه‌های انگل *Haemoproteus. spp*. پرندگان در زیستگاه‌هایی با آب و هوای گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنده شده‌اند. درجه شیوع و میزان آلودگی انگلی (پارازیتمی) در گونه‌های مختلف پرندگان، فصل‌های سال و در زیستگاه‌های مختلف متغیر است. با توجه به این که تک‌یاخته *Haemoproteus. spp*. اغلب انگل‌های خونی پرنده‌های وحشی‌اند، اما نشانه‌های بالینی مشخصی از آلودگی به این انگل در جمعیت زیادی از پرندگان وحشی دیده نشده است(۲). ولی مطالعه این انگل بر روی پرندگان خانگی و اگزوتیک نشان داده، بیماری‌زایی آن معمولاً کم و نسبتاً ملایم است. هم چنین مطالعه‌ای

در جمعیت پرندگانی که به هر علت تحت استرس یا ضعف سیستم ایمنی بودند، نشان داد که هموپروتئوزیس منجر به بیماری سخت می‌شود که نتیجه آن آنمی همولایتیک، آنورکسی، افسردگی و حتی مرگ است(۷).

احمد و همکاران در سال ۲۰۱۰، در مطالعه خود بیان کردند، سولفادیازین وتری متوپریم درمانی مناسب برای هموپروتئوزیس در گله‌های کبوتر است و سم کومافوس بر علیه حشرات ناقل برای کنترل عفونت در کبوتر موثر است. اغلب مطالعات روی انگل *Haemoproteus spp.* برای شناسایی میزان شیوع آلودگی انگلی بر اساس گسترش‌های خونی و آزمایشات میکروسکوپی بوده است(۱).

همچنین مطالعات مولکولی مختلفی در جهان برای شناسایی انگل *Haemoproteus. spp* انجام شد. مطالعه هموپروتئوزیس در کبوتر به جهت بروز علایم بیماری و نقشی که کبوتر به عنوان پرنده دست‌آموز در انتقال بیماری به انسان و حیوانات خانگی، خصوصاً در ارتباط با پرورش طیور دارد، این مطالعات را حائز اهمیت کرده است(۱۰). همان طور که اشاره شد حشرات ناقل انگل *Haemoproteus. spp* اند و به علت تنوع حشرات ناقل و اندازه بسیار کوچک آن‌ها بررسی‌های زیادی در رابطه با ناقلین این تک‌یاخته صورت نگرفته است. ضرورت تحقیق درباره انگل *Haemoproteus. spp* بدین علت است، که این انگل دارای تنوع گونه‌ای بسیار فراوانی است و از سوی دیگر این گونه‌ها عمدتا میزبان پرندگان وحشی‌اند. مطالب بنابراین ردیابی عفونت *Haemoproteus. spp* در نمونه‌های خون کبک‌های حیات وحش و مقایسه آن با *Haemoproteus spp.* های حیوانات دست آموز و خانگی و تشابه یا قرابت آن‌ها می‌تواند از اهمیت بالایی برخوردار باشد.

مواد و روش‌ها

پرنده‌های مورد مطالعه کبک‌های حیات وحش بودند، که از زیستگاه‌های کوهستانی حیات وحش در استان مازندران در سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری شدند (۳۵°۵۲′ ۲۱′ شمالی ۵۲°۱۱′ ۲۰′ شرقی). سپس پرنده‌ها به آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل بخش انگل‌شناسی منتقل شدند. خون‌گیری از ۱۲ قطعه پرنده با استفاده از سرنگ‌های یک میلی‌لیتر، از ورید بال انجام شد. سپس نمونه‌های خون گرفته شده به داخل میکروتیوپ‌های دارای ماده ضد انعقاد EDTA و بدون ضد انعقاد ریخته شد و کد هر یک از نمونه‌ها بر روی این لوله‌ها ثبت شد. سپس نمونه خون در میکروتیوپ‌های بدون ضد انعقاد را سانتریفیوژ کرده و سرم را با استفاده از سمپلر جدا و متناسب با حجم باقی مانده نمونه خون در میکروتیوپ، اتانول ۹۶٪ اضافه گردید. یک قطره خون از میکروتیوپ‌های حاوی ماده ضد انعقاد را بر روی لام تمیز قرار داده، گسترش خونی نازک تهیه شد. سپس گسترش‌های خونی در مجاورت هوا قرار داده گرفته و کد مربوط به هر نمونه را متناسب با کد درج شده در روی لوله‌ها در کنار گسترش‌های خونی ثبت شدند. گسترش‌های خونی بعد از خشک شدن با الکل متانول تثبیت شدند. سپس گسترش‌های خونی به مدت ۲۰-۲۵ دقیقه با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند، پس از رنگ‌آمیزی لام‌ها با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند.

برای استخراج DNA، از کیت Bioneer کره استفاده شد. سپس DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. برای آنالیز ژنتیکی از تکنیک PCR استفاده شد، تا قطعه‌ای از ژن میتوکندریایی سیتوکروم *b Haemoproteus. spp.* تکثیر یابد. بررسی‌های مولکولی بر روی ناحیه سیتوکروم b ژن میتوکندریایی تک یاخته *Haemoproteus spp.* از علل استفاده از ژن میتوکندریایی این است، که در این ژن‌ها به علت زیاد بودن تعداد نسخه‌های مضاعف هموژن کار کردن با آن‌ها در مقایسه با ژن‌های هسته‌ای که تک نسخه‌ای‌اند ساده‌تر و وراثت مادری دقیق آن‌ها به خصوص در سطح درون گونه‌ای مفید می‌باشد. از سوی بیان این ژن‌ها منجر به تولید پروتئین‌ها می‌شود، با وجود جهش‌ها فراوانی که در آن‌ها رخ می‌دهد، منجر به تغییر ساختار پروتئین‌ها نمی‌شود. برای انجام واکنش PCR جهت شناسایی گونه انگل *Haemoproteus. spp* از پرایمرهای مستقیم و معکوس ساخت شرکت Bioneer استفاده شد. توالی پرایمر استفاده شده برای تشخیص و شناسایی گونه *Haemoproteus. spp* در جدول ۱ آورده شده است. تکثیر قطعه مورد نظر در حجم ۵۰ میکرولیتر با حضور ۲۵۰ µM dNTPs ،Mgcl2 1/2mM ،nM 200 از هر یک از پرایمرهای اختصاصی و ۱/۵ واحد Taq DNA polymerase انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Techne تحت شرایط ۹۴ درجه سانتی‌گراد سه دقیقه، سپس ۳۵ سیکل در ۹۴ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد بـه مـدت ۴۵ ثانیـه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتـا ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مـدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصولات PCR با استفاده، از الکترفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور UV مشاهده و عکس‌برداری انجام شد. سپس محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer ارسال گردید. پس از تعیین توالی کروماتوگرام توالی‌ها با اسـتفاده از نرم‌افزار chromas بررسی و سـپس با اسـتفاده از نرم‌افزار Basic Local

جدول ۱- پرایمر های استفاده شده برای بررسی تک یاخته هموپروتئوس در کبک‌های حیات وحش.

توالی	پرایمر
-۵ATGGTGCTTTCGATATATGCATG۳-	Forward
-۵CATTATCTGGATGTGATGTGATAATG۳-	Reverse

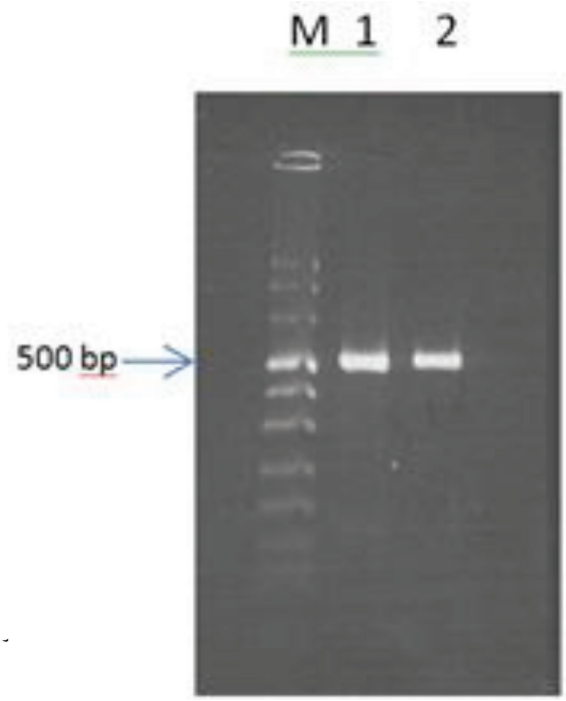
(Alignment Search Tool (BLAST با دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. پس ازآن توالی‌ها با استفاده از روش clustalW از نرم‌افزار Mega7 هم‌تراز شده و آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-Joining صورت گرفت. از توالی نوکلئوتیدی Plasmodium reichenow (AF۰۶۹۶۱۰) به عنوان گروه خارجی (Outgroup) استفاده شد.

نتایج

مطالعه انگل‌شناسی بررسی نمونه‌های خونی ۱۲ قطعه کبک‌های حیات وحش نشان داد، که ۵ نمونه از آن‌ها آلوده به انگل *Haemoproteus spp.* (شکل ۲) بوده‌اند. پس از تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم b توسط واکنش زنجیرهای پلی‌مراز و تأیید قطعه مورد نظر(شکل ۱) تعداد ۵ نمونه تعیین توالی گردید و توالی این تک‌یاخته در بانک جهانی ژن با شماره دسترسی (KJ634468.1) ثبت گردیده است. ارتباط فیلوژنتیکی بین توالی‌های جدا شده و ژنوتیپ‌های مختلف از هموپروتئوس بر اساس ژن سیتوکروم b نشان می‌دهد گونه مطالعه شده از لحاظ فیلوژنتیکی قرابت اندکی با دیگر گونه‌های *Haemoproteus. spp* ثبت شده دارد. و این بدان معناست که گونه *Haemoproteus sp.* جداسازی شده از کبک‌های منطقه می‌تواند گونه‌ای جدید باشد.

بحث

گونه‌های مختلف *Haemoproteus. spp* معمولاً باتوجه به میزبانی که در آن مشاهده شده است، نام‌گذاری شده‌اند موووسفر و همکاران در سال ۲۰۱۰ مشاهده کردند که میزان شیوع آلودگی Haemoproteus columbae در حیوانات بالغین قابل ملاحظه است. که در بالغین حدوداً ۵ برابر جوجه‌ها مشاهده می‌گردد و نشان دادند پرندگانی که دچار آلودگی می‌گردند دچار ایمنی نسبتا مناسبی در آلودگی‌های بعدی پیدا می‌کنند(۸). والداستروم و همکاران در سال ۲۰۰۲ توانستند با استفاده از روش‌های ملکولی برروی ژن سیتوکروم *b Haemoproteus. spp* توالی ژنی تک‌یاخته *Haemoproteus. spp* را از خون پرندگان آوازخوان آفریقا جدا کنند و نشان دهند که گونه موجود در این پرندگان گونه Haemoproteus columbae می‌باشد(۱۵). والکوناس و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطالعه‌ای را بر روی ۴۷۲ پرنده از نقاط مختلف جهان شامل: اروپا، آفریقا و شمال آمریکا با دو روش بررسی میکروسکوپی و بررسی ملکولی بر روی ژن سیتوکروم b براساس پرایمرهای اختصاصی انجام دادند و نشان دادند که در بررسی‌های میکروسکوپی ۲۱ ٪ و در بررسی ملکولی ۲۲ ٪ از این پرندگان مثبت گزارش گردیدند. همچنین ایشان اذعان داشتند که روش‌های ملکولی روش دقیق‌تری بخصوص برای مطالعات تاکسونومی به شمار می‌رود(۱۴). لواین و همکاران در سال ۲۰۱۱ با استفاده از تکنیک PCR بر روی نمونه‌های خون پرندگان آلوده، Haemoproteus aivara را شناسایی و جداسازی کردند. Haemoproteus aivara میزبان پرندگان شکاری و برخی پرندگان آبزی است(۶). پالیناسکاس و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه خود



شکل۱- محصولات PCR دو نمونه Haemoproteus partridage در مقایسه با مارکر بر روی ژل آگارز.

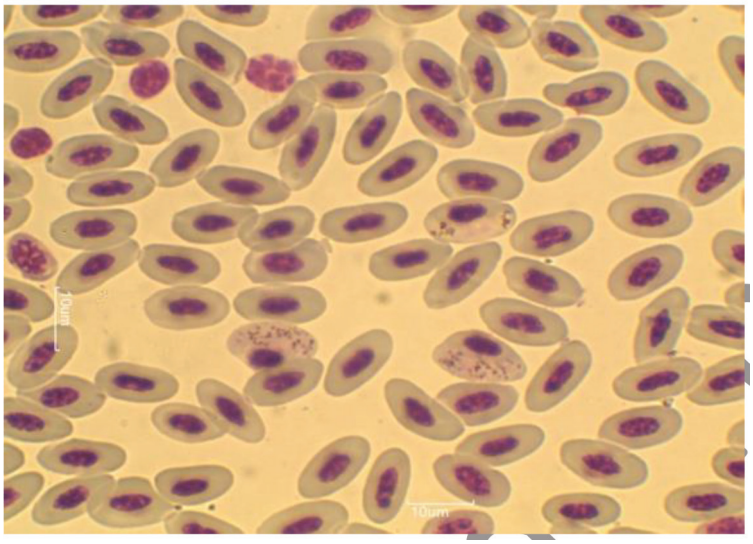
توانستند، با بررسی‌های مولکولی سویه‌های مختلفی از Haemoproteus minutus را مشخص و نام‌گذاری کنند. مطالعه آن‌ها نشان داد، بعضی از سویه‌های *Haemoproteus. spp* بیماری کشنده را در پرندگان در قفس ایجاد می‌کند. به خصوص Haemoproteus minutus که مسئول ابتلا طوطی‌های در قفس در اروپا است و از طوطی‌ها مرده گزارش شد(۹). دوستی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه خود، ۲۲۰ نمونه خون جمع‌آوری شده از کبوترها را با استفاده از تکنیک PCR مورد بررسی قرار دادند، ۵۱ کبوتر (۲۳/۱۸٪) به Haemoproteus columbae آلوده بودند. هم چنین در مطالعه آن‌ها اندازه قطعه محصولات PCR در نمونه آلوده به *Haemoproteus. spp* قطعه bp۲۰۷ بود(۳). در مطالعه طبری‌پور و همکاران در سال ۲۰۱۸ که بر روی کبوتران استان مازندران انجام پذیرفت نشان داده شد که پس از بررسی ریخت‌شناسی، بیان گر ۱۷ نمونه مثبت بود که نشان دهنده‌ی ۱۱/۳۳ ٪ آلودگی می‌باشد. بررسی‌های مولکولی و آنالیز محصولات PCR، نشان دادند که تمامی نمونه‌های Haemoproteus از گونه columbae بوده‌اند(۱۳). اگر چه مطالعات مولکولی محدودی راجع به انگل *Haemoproteus. spp* در ایران انجام شد، اما بررسی توالی الگوهای بدست آمده در این مطالعه با نرم‌افزار BLASTn نشان داد، بیشترین میزان شباهت را به ژنوم سیتوکروم اکسیداز b میتوکندریایی جنس انگل *Haemoproteus. spp* دارد. همچنین در این مطالعه میزان هم‌پوشانی توالی‌های الگو با توالی‌های جفت شده مذکور بین ۹۷٪- ۹۸٪، بوده است. مقدار E.Value، توالی‌های الگو با توالی‌های جفت شده صفر مشاهده گردید، این بدین معناست که توالی‌های جفت شده با تولی‌های الگو به صورت تصادفی جفت نشده و ارتباط معنی‌دار بین این دو توالی وجود دارد.، همچنین امتیاز حاصل از هم ردیفی دوگانه بین توالی‌های الگو در مقایسه ناحیه سیتوکروم b ژنوم سیتوکروم اکسیداز تک یاخته *Haemoproteus spp*. بین ۸۲۶-۸۴۸ می‌باشد. پس از Alignment کردن نتایج بدست آمده در این بررسی و مقایسه الگوی ژنی بدست آمده با ژن‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن می‌توان ادعا کرد گونه مشاهده شده در کبک‌های استان مازندران می‌تواند یک گونه جدید *Haemoproteus spp*. به حساب آمده و پیشنهاد نویسندگان به نامگذاری آن با نام partridge Haemoproteus می‌باشد که این پیشنهاد به بانک جهانی ژن نیز داده شده است همانطور که قبلاً نیز اشاره شده بود این ژن با شماره (GenBank: KJ۶۳۴۴۶۸,۱) در حال بررسی برای نام‌گذاری فوق می‌باشد. مطالعه اخیر از این نگاه حائز اهمیت می‌باشد که در نوع خود نخستین تحقیق در رابطه با بررسی انگل *Haemoproteus. spp* هم از جنبه مطالعه میکروسکوپی و هم مولکولی در کبک‌های وحشی به خصوص در منطقه شمال ایران است. و توانسته با بررسی مولکولی و آنالیز ژنتیکی گونه جدیدی از انگل *Haemoproteus spp*. را در کبک‌های حیات وحش استان مازندران شناسایی کند.

منابع مورد استفاده

1- Ahmed, F. E. and A.-H. H. Mohammed. 1978. Haemoproteus spp. columbae: course of infection, relapse and immunity to reinfection in the pigeon. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 57: 229-236.

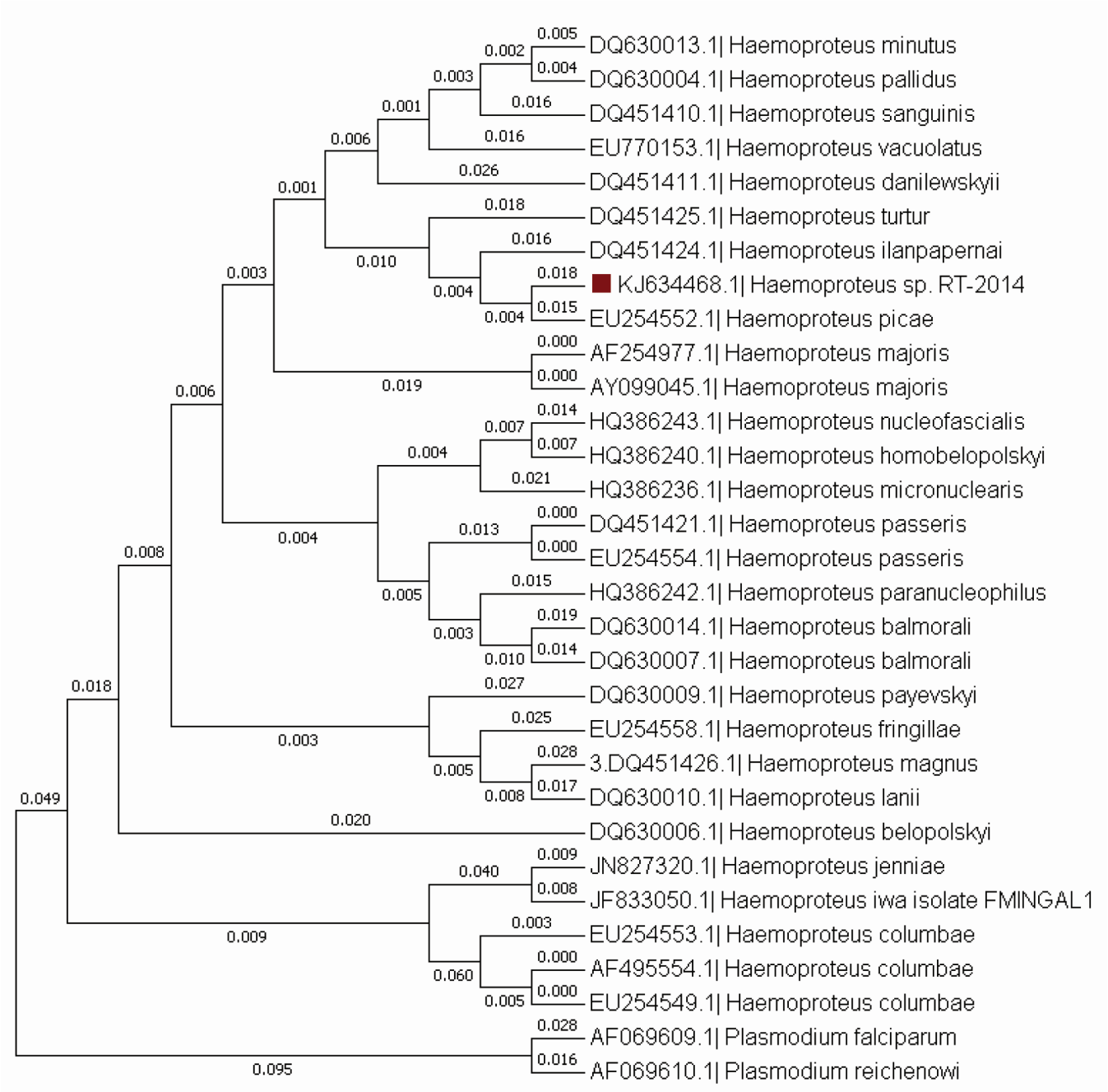
2- Clark, N. J., S. M. Clegg and M. R. Lima. 2014. A review of global diversity in avian haemosporidians (Plasmodium and Haemoproteus spp.: Haemosporida): new insights from molecular data. *International Journal for Parasitology* 44: 329-338.

3- Doosti, A., R. Ahmadi, Z. Mohammadalipour and A. Zohoor. 2014. Detection of Haemoproteus spp. columbae in Iranian pigeons



شکل۲- میکرو و ماکروگامتوسیت Haemoproteus partridage در خون محیطی کبک های حیات وحش در استان مازندران.

using PCR. *Inter Con Biol Civ Environ Eng* 25: 36-38.
4- Ferrer, E. S., V. García-Navas, J. J. Sanz and J. Ortego. 2014. Individual genetic diversity and probability of infection by avian malaria parasites in blue tits (Cyanistes caeruleus). *Journal of evolutionary biology* 27: 2468-2482.
5- Islam, M. A., A. Anisuzzaman, A. R. Rabbi, M. Islam and M. Rahman. 2013. Haemoproteus spp. spp. infection of domestic poultry of Bangladesh. *Veterinary Scandinavia* 7: 26-29.
6- Levin, I. I., G. Valkiūnas, T. A. Iezhova, S. L. O'Brien and P. G. Parker. 2012. Novel Haemoproteus spp. species (Haemosporida:



شکل ۳- رسم درخت فیلوژنی هموپروتئوس پارتریجی ، جدا شده از کبک‌های استان مازندران.

Haemoproteidae) from the swallow-tailed gull (Lariidae), with remarks on the host range of hippoboscid-transmitted avian haemoproteids. *Journal of Parasitology* 98: 847-854.

7- Marzal, A., J. Balbontín, M. Reviriego, L. García-Longoria, C. Relinque, I. G. Hermosell, S. Magallanes, C. López-Calderón, F. de Lope and A. P. Møller. 2016. A longitudinal study of age-related changes in Haemoproteus spp. infection in a passerine bird. *Oikos* 125: 1092-1099.

8- Msoffe, P., A. Muhairwa, G. Chiwanga and A. Kassuku. 2010. A study of ecto-and endo-parasites of domestic pigeons in Morogoro Municipality, Tanzania. *African Journal of Agricultural Research* 5: 264-267.

9- Palinauskas, V., T. A. Iezhova, A. Križanauskienė, M. Y. Markovets, S. Bensch and G. Valkiūnas. 2013. Molecular characterization and distribution of Haemoproteus spp. minutus (Haemosporida, Haemoproteidae): a pathogenic avian parasite. *Parasitology international* 62: 358-363.

10- Quillfeldt, P., J. Martínez, J. Hennicke, K. Ludynia, A. Gladbach, J. F. Masello, S. Riou and S. Merino. 2010. Hemosporidian blood parasites in seabirds—a comparative genetic study of species from Antarctic to tropical habitats. *Naturwissenschaften* 97: 809-817.

11- Rivero, A. and S. Gandon. 2018. Evolutionary ecology of avian malaria: past to present. *Trends in parasitology* 34: 712-726.

12- Samani, A. D., K. P. Kheirabadi and A. Mohebbi. 2016. Effect of Haemoproteus spp. columbae infection on the hemogram of the Pigeons (Columba livia domestica). *Journal of parasitic diseases* 40: 1406-1410.

13- Tabaripour, R., M. Youssefi, S. Rahbari and M. Arghavan. 2017. Molecular identification of Haemoproteus spp. in domestic pigeons (Colombia livia domestica) in Mazandaran province. *Journal of Veterinary Research* 72:54-58.

14- Valkiūnas, G., T. A. Iezhova, C. Loiseau and R. N. Sehgal. 2009. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of hemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected birds. *Journal of Parasitology* 95: 1512-1515.

15- Waldenström, J., S. Bensch, S. Kiboi, D. Hasselquist and U. Ottosson. 2002. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology* 11: 1545-1554.