مطالعه انگل‌های خونی در قورباغه مردابی *Pelophylax ridibundus* در شمال ایران

- **فریبا رجبی**: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
- **حسین جوان‌بخت***: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷

چکیده

بی‌دمان گونه‌هایی از دوزیستان نیمه‌آبزی هستند که انگل‌های خونی مختلفی را متحمل می‌شوند. در این مطالعه در مجموع ٦٦ قورباغه مردابی بالغ از شمال ایران بین اپریل و جولای سال ۲۰۱۷ به‌منظور بررسی فون انگل‌های خونی در آن‌ها گرفته شد. نمونه‌های خون با توجه به اندازه قورباغه از ورید صورت یا قلب گرفته شد. اسمیرهای خونی خشک شدند، با متانول فیکس شده و توسط گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری با استفاده از بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون به‌منظور جستجوی انگل‌های خونی مورد آزمایش قرار گرفتند. فون انگل‌های خونی شامل ریکتزیاها و هموگریگارینی‌های داخل گلبول قرمز و میکروفیلاریا و اشکال مختلف تریپانوزوم در خارج گلبول قرمز خون مشاهده شد. این اولین مطالعه جامع مورفولوژیکی روی فون انگل‌های خونی قورباغه مردابی در ایران است، مطالعه‌ای که انتظار می‌رود استفاده از آنالیزهای مولکولی به‌منظور شناخت بهتر این انگل‌های خونی، ناقل‌های احتمالی و دینامیک سیکل زندگی آن‌ها را توسعه دهد.

کلمات کلیدی: قورباغه مردابی، انگل خونی، تریپانوزوم، هموگری‌گارین

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: h.javanbakht@gmail.com

مقدمه

دوزیستان ساکن محیط‌های مختلف هستند و دارای الگوی تغذیه و اندازه و تولیدمثل متنوعی دارند (Dodd، ۲۰۱۳). در دوره زندگی خود حیواناتی هستند که قسمتی از زندگی در آب و قسمتی در خشکی زندگی می‌کنند. آن‌ها متعلق به شاخه مهره‌دارانند و در رده دوزیستان قرار می‌گیرند. آن‌ها در سراسر دنیا وجود دارند و بیماری‌ها یکی از مهم‌ترین فاکتورهای کاهش‌دهنده جمعیت دوزیستان در دنیا می‌باشد (Berger و همکاران، ۱۹۹۸؛ Daszak، ۲۰۰۰؛ Kiesecker و همکاران، ۲۰۰۱) و همین‌طور فاکتورهای دیگر شامل از دست رفتن زیستگاه و قطعه قطعه شدن زیستگاه، تغییرات آب و هوایی، ورود گونه‌های بیگانه، افزایش اشعه ماورا بنفش و نوسانات آلودگی هوا می‌باشد(Pechmann و همکاران، ۱۹۹۱؛ Knapp و Matthews، ۲۰۰۰). مشکلات سلامت و بیماری یکی از چالش‌های جمعیت‌های دوزیستان است که به شیوه‌های مختلفی انجام می‌شود. دوزیستان در معرض تعدادی از ناقل‌های خون‌خوار (زالوها و دوبالان) در زیستگاه‌های آبی و خاکی قرار دارند که این ناقل‌ها می‌توانند انتقال‌دهنده انگل به این موجودات باشند. طیف وسیعی از انگل‌های خونی داخل و خارج سلولی شامل ویروس‌ها، ریکتزیاها، گونه‌هایی از چندین جنس پروتوزوآ، مخمر و میکروفیلاریاها، دوزیستان را آلوده می‌کنند. بررسی انگل‌های خونی دوزیستان بی‌دم در چندین منطقه جغرافیایی انجام شده که در میان آن‌ها می‌توان به *Karyolysus sonomae*, *Haemogregarina boyli*, *Trypanosoma boyli* از *Rana boylii* (Lehmann، ۱۹۵۹a،b و c) *Haemogregarina aurora* از *Rana aurora* (Lehmann، ۱۹۶۰)، *Dactylosoma ranarum* در *Rana esculenta* (Wenyon، ۱۹۲۶) و *Lankesterella* sp. و *Trypanosoma* sp. در *Rana pretiosa* (Stenberg و Bowerma، ۲۰۰۸) اشاره کرد. هم‌چنین Zickus (۲۰۰۲) حضور *Trypanosoma rotatorium* را در *Rana esculenta- Bufo bufo lessonae*، *Rana temporaria* و *Bufo viridis* گزارش کرد. اخیراً بیماری‌های منتقل شده از طریق ناقل‌ها به‌عنوان یک خطر جهانی برای سلامتی انسان و حیوانات مورد توجه قرار گرفته است. گسترش و استقرار جمعیت‌های اندمیک از پاتوژن‌های بیگانه پیشین و ناقل‌های آن‌ها قبلاً مستند شده و فرض شده که نه تنها به‌دلیل تغییرات آب و هوایی بلکه به‌وسیله گسترش شهرنشینی و تجارت‌های بین‌المللی نیز به‌وجود می‌آید. این مشکلات در آینده حتی جدی‌تر هم مطرح خواهد شد (Harrus و Baneth، ۲۰۰۵). تعیین شیوع و شدت آلودگی به انگل اولین قدم برای بررسی تاثیر انگل در محیط‌های طبیعی است (Smallridge و Bull، ۲۰۰۰). به‌هرحال به‌میزان کمی در مورد انگل جمعیت‌های طبیعی و وحشی دانسته شده است. این موضوع مهم است زیرا انگل باعث تاثیرات منفی روی تعدادی از فاکتورهای اکولوژی و تکامل، انتخاب جنسی و رشد میزبان‌ها می‌شود (Smallridge و Bull، ۲۰۰۰؛ Eisen، ۲۰۰۱). مطالعه دوزیستان در ایران دارای سابقه نسبتاً طولانی است، به گونه‌ای که کشف چندین گونه جدید از سال ۱۵۹۵ به بعد نمایانگر وجود گونه‌های فراوان و ناشناخته دوزیستان در ایران می‌باشد، ازاین‌رو کشور ایران همیشه مورد توجه محققین بوده و در این راستا پژوهشگران زیادی در ایران به مطالعه و تحقیق پرداخته‌اند (Baloch و Kammei، ۱۳۸۵). درهمین راستا اثرات زیست‌محیطی بر روی گونه‌های دوزیستان و خزندگان ایران بررسی شده است (Kazemi و همکاران، ۲۰۱۵). مطالعات اندکی بر روی انگل‌های خونی خزندگان و دوزیستان در ایران صورت گرفته است که مهم‌ترین آن‌ها انگل‌های *Haemogregarina stepanowi* در لاک‌پشت‌های برکه‌ای *Emys orbicularis* (Dvorakova و همکاران، ۲۰۱۳؛ Javanbakht و Sharifi، ۲۰۱۴)، انگل‌های جنس *Haemoproteus* و *Hemolivia* در لاک‌پشت‌های خشکی *Testudo greaca* (Javanbakht و همکاران ۲۰۱۵ a و b)، گزارش انگل *Hepatozoon* از مار درختی (Javanbakht و Sajadi، ۲۰۱۷) و تنوع انگلی در مارهای ایران (Nasiri و همکاران، ۲۰۱۴) می‌باشند. ازجمله موارد بررسی انگل‌های خونی در دوزیستان می‌توان به گزارش انگل ریکتزیا توسط Vaissi و همکاران (۲۰۱۷) روی سمندرهای استان لرستان *Neurergus kaiseri* اشاره کرد. هم‌چنین اخیراً Rajabi و همکاران (۲۰۱۷) برای اولین‌بار *Hepatozoon magna* را از قورباغه *Pelophylax ridibundus* در ایران گزارش کردند. با این وجود مطالعه جامعی روی انگل‌های دوزیستان ایران انجام‌نگرفته‌است. قورباغه مردابی بانام علمی *Pelophylax ridibundus*، متعلق به خانواده Ranidae در تمامی نقاط ایران در جنگل‌ها، مرداب‌ها، خندق‌ها، مرغزارها و حومه شهرها زندگی می‌کند رژیم غذایی عمومی دارد و طیف گسترده‌ای از بی‌مهرگان کوچک را طعمه خود قرار میدهد(Mohammadi و همکاران، ۲۰۱۵). در این مطالعه بررسی اولیه در مورد تنوع انگل‌های خونی در قورباغه *Pelophylax ridibundus* و بررسی شیوع انگل‌ها در این قورباغه در دو استان گیلان و مازندران انجام گرفته است.

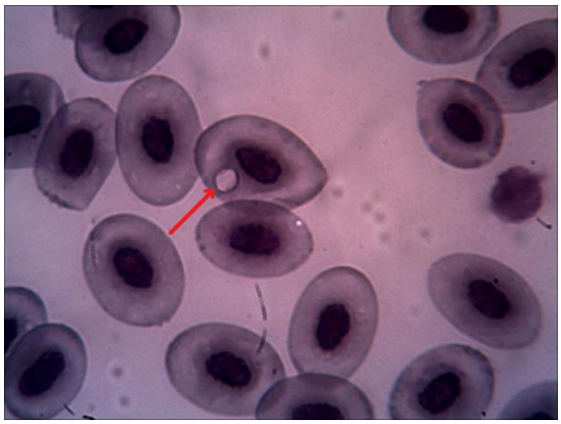
مواد و روش‌ها

قورباغه‌های مردابی از دو ناحیه در شمال کشور در طی تابستان ۱۳۹۶ توسط تور گرفته شدند. در مجموع ۶۶ قورباغه گرفته شد که ۳۰ عدد از استان گیلان حوالی رشت (′۱۷ °N۳۷، ′ ۳۳ °E۴۹) و ۳۶ عدد از استان مازندران حوالی ساری (′۰ °N۵۲، ′۳۵ °E۳۶) بود. خصوصیات مورفولوژیک نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. حدود ۰/۱ میلی‌لیتر خون توسط سرنگ انسولین از رگ‌های ناحیه گردن گرفته شد و گسترش

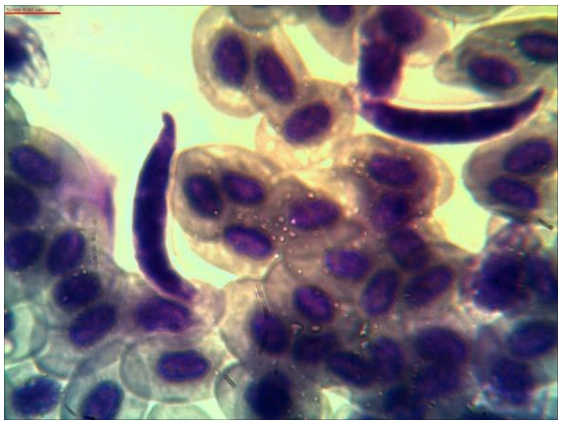
خونی بر روی لام ایجاد شد. در خون‌گیری از نمونه‌ها تلاش شد به قورباغه‌ها آسیب نرسد. خونگیری از ورید صورت و یا قلب بسته به اندازه قورباغه‌ها انجام شد. قورباغه‌ها بعد از خون‌گیری در محیط آزاد شدند. گسترش‌های خونی در حدود ۱۰ دقیقه در هوا خشک شدند و به‌مدت ۴ دقیقه توسط الکل متانول مطلق فیکس شدند. بعد از این‌که لام‌ها خشک شدند به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول گیمسا قرار گرفته و رنگ‌آمیزی شدند. بررسی لام‌ها و پارازیت‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و به‌کمک روغن ایمرسیون انجام شد. تلاش شد به‌طوریکسان ۱۰ میدان‌برای‌هر نمونه بررسی شود(Medrano-Tupiza و همکاران، ۲۰۱۷) تنوع و شیوع انگل‌های خونی در نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. عکس‌ها توسط نرم‌افزار TSVIEW ورژن ۶,۲,۴,۵ ثبت شدند.

نتایج

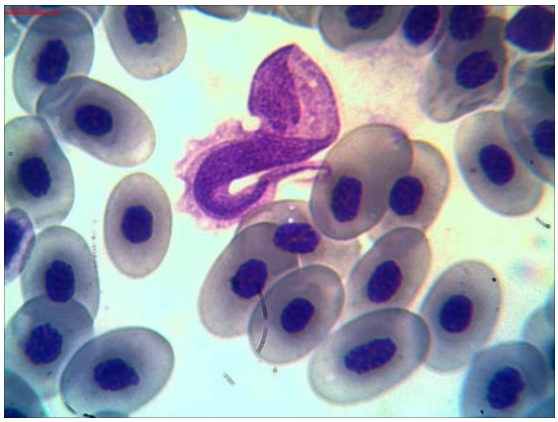
نمونه‌های قورباغه مردابی (*P. ridibundus*) مورد بررسی به‌صورت تصادفی گرفته شده و در سنین مختلف قرار داشتند. اما همه نمونه‌ها بالغ بوده‌اند. انکلوزیون‌های تقریباً کروی داخل سلولی ریکتزیا (*Rickettsia*) معمول‌ترین پارازیت مشاهده شده در گلبول‌های قرمز قورباغه مردابی در این مطالعه بود (Bacteria: Proteobacteria, *Rickettsiales*). اندازه آن‌ها معمولاً کوچک است (۷-۳×۹-۳). از بین مجموع ۶۶ نمونه مورد بررسی قرار گرفته ۲۴ نمونه(۳۶/۳۶ درصد) آلوده به انگل ریکتزیا بودند (شکل ۱). ۱۴ مورد از آلودگی‌های ریکتزیایی در نمونه‌های ساری و ۱۰ مورد در نمونه‌های رشت مشاهده شد. میکروفیلاریاها از گروه نماتدها (Animalia: Nematoda: Filariodea, *microfilariae*) گروه دیگر از انگل‌های خونی خارج سلولی قورباغه مردابی بودند که دو نمونه (۳٪) آلودگی به این میکروفیلاریاها دیده شد(شکل ۲). میکروفیلاریاها نیز در نمونه‌های هر دو لوکالیته مشاهده شدند. انگل خارج سلولی تریپانوزوم (Protista: Sarcomastigophora: Kinetoplastida, *Trypanosoma* sp) به‌طور نسبتاً معمول انگل خارج سلولی خونی در قورباغه‌های موردمطالعه بود. دربین نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته ۱۱ (۱۶/۶ درصد) نمونه آلوده به تریپانوزوم که با فرم‌های مختلف در نمونه‌های مختلف یافت شدند (شکل ۳). هم‌چنین تریپانوزوم‌ها نیز در هر دو لوکالیته مورد بررسی یافت شدند که ۶ مورد از نمونه‌های رشت و ۵ مورد در نمونه‌های ساری به این انگل آلوده بودند. انگل داخل سلولی هموگری گارین در یکی از نمونه‌های قورباغه‌های رشت (۱/۵٪) مشاهده شد (Apicomplexa: Eucoccidiida, *Haemogregarines*). این انگل‌ها معمولاً براساس شکل داخل سلولی دراز، گاهی تا حدودی خمیده همراه با هسته مشخص شناخته می‌شوند (شکل ۴). شناخت دقیق هموگری‌گارین‌ها براساس شکل داخل گلبول قرمز امکان‌پذیر نیست و باید مراحل تکوین آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد.



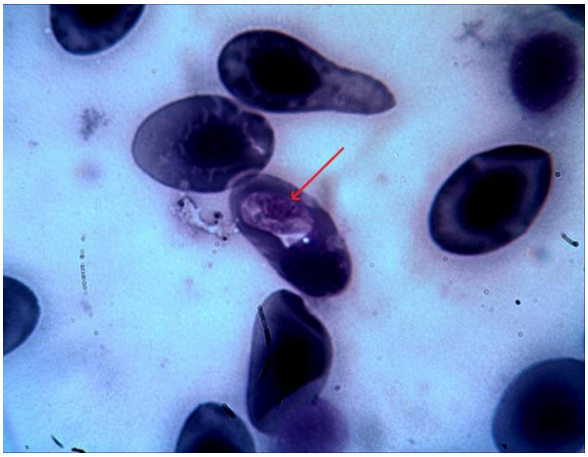
شکل ۱: انگل خونی ریکتزیا در گلبول‌های قرمز قورباغه مردابی



شکل ۲: لارو کرم‌های نماتد (میکروفیلاریا) در گلبول‌های قرمز خون قورباغه مردابی



شکل ۳: انگل خارج سلولی تریپانوزوم در گلبول‌های قرمز خون قورباغه مردابی



شکل ۴: انگل داخل گلبول قرمز هموگری‌گارین در قورباغه مردابی

بحث

دوزیستان در سیکل زندگی خود در چندین زیستگاه ساکن هستند و دارای الگوی زندگی، تولیدمثلی، اندازه بدن، مدل‌های غذایابی و سطوح تغذیه ای مختلفی هستند (Dodd، ۲۰۱۳). به این دلیل جوامع دوزیستان میزبان‌هایی مناسب برای انگل‌ها و تنوع و توزیع گونه‌ای آن‌ها محسوب می‌شوند. مطالعات زیادی روی انگل‌های گونه‌های مختلف دوزیستان صورت گرفته است، با این‌حال کم‌تر مطالعه جامع با تمرکز روی انگل‌های خونی صورت گرفته است. یکی از دلایلی که انگل‌های پروتوزوآ دوزیستان کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته است به‌دلیل فقدان صفات مورفولوژیک موثر برای تشخیص پروتوزوآها می‌باشد. بیش‌تر گونه‌های تریپانوزوم دوزیستان پلی‌مورفیک هستند و یک گونه ممکن است به شکل‌های مختلفی دیده شود. اغلب چند شکل یک گونه از تریپانوزوم ممکن است یک گونه از دوزیست را آلوده کند و تشخصیص این‌که آیا آن‌ها متعلق به یک گونه پلی‌مورفیک هستند یا چند گونه مونومورفیک در اغلب موارد غیرممکن است (Diamond، ۱۹۶۵). به‌علاوه گامونت تعدادی از گونه‌های Hepatozoon که گلبول‌های قرمز خون را در قورباغه‌ها آلوده می‌کنند از لحاظ مورفولوژیکی غیرقابل تشخیص هستند درحالی‌که تاثیرات متفاوتی روی سلول‌های قرمز خونی میزبان دارند. برای مثال گامونت *H. clamatae* باعث آسیب به هسته سلول میزبان می‌شود درحالی‌که گامونت *H. catesbianae* با همان مورفولوژی آسیبی به میزبان نمی‌زند (Kim و همکاران، ۱۹۹۸). به‌هرحال آلودگی هم‌زمان به چندین انگل نیز ممکن است در یک میزبان دیده شود. بعضی از سلول‌های قرمز خون دارای هسته آسیب دیده و بعضی سالم هستند و مشخص نیست که آیا آلودگی با گامونت نابالغ *H. clamatae* ایجاد شده است یا ترکیبی با *H. clamatae* و *H. catesbianae* ایجاد شده است (Shannon، ۲۰۱۳).

بررسی‌های مختلفی که انجام گرفته است پشه‌های کولکس به‌عنوان ناقل‌های انگل‌های Hepatozoon گزارش شده اند (Noden و همکاران، ۲۰۱۵). هم‌چنین شواهدی وجود دارد که پشه‌های کولکس و آئدس ممکن است ناقل تریپانوزوم نیز باشند (Ramos و Urdaneta-Morales، ۱۹۷۷). انگل‌های داخل سلولی ریکتزیا شامل واکوئل‌های کروی در سیتوپلاسم اریتروسیت‌ها هستند که به‌صورت ذراتی در میکروسکوپ نوری مشاهده می‌شوند. در بیش‌تر موارد دیواره آن‌ها به‌صورت متراکم رنگ شده بود. ریکتزیاها از بی‌دمان مختلف مانند *R. esculenta*، *R. catesbeiana*، *R. septentrionalis* و *R. clamitans* گزارش شده است (Barta و همکاران، ۱۹۸۹). شناسایی ریکتزیاها با میکروسکوپ نوری امکان‌پذیر نیست (Berger و همکاران، ۱۹۹۸). ریکتزیاهایی از جنس *Aegyptianella* به‌عنوان یک انگل جهانی انحصاری از قورباغه‌های شمال آمریکا، اروپا و آفریقا گزارش کرد. هم‌چنین شواهد اولیه نشان می‌دهد زالوها به‌عنوان ناقل این جنس از ریکتزیاها در قورباغه‌ها شناخته شده‌اند (Desser، ۱۹۸۷). ریکتزیاهای مشاهده شده در این مطالعه جزئیاتی مشابه با ریکتزیاهای گزارش شده در مارهای آبی *Natrix natrix* و *Natrix tessellate* در استان گیلان که اخیرا به‌وسیله Sajadi و Javanbakht (۲۰۱۷) گزارش شده‌اند دارند. این امکان وجود دارد به‌دلیل یکسان بودن لوکالیته این قورباغه‌ها با مارهای آبی و هم‌چنین وجود زالوها به‌عنوان ناقل، جنس‌ها یا گونه‌های مشابه‌ای از این انگل‌های باکتریایی باعث آلودگی شوند. چون قورباغه‌ها قابلیت مهاجرت اندکی دارند و توانایی انتقال محدودی دارند پراکنش وسیع این انگل در جمعیت‌ها قابل توجیه است. تریپانوزوم‌ها جزو معمول‌ترین انگل‌های خونی خارج سلولی در قورباغه‌ها هستند. تعداد زیادی از گونه‌های تریپانوزوم از دوزیستان توصیف شده است (Bernal و Pinto، ۲۰۱۶). به‌هرحال *Trypanosoma* sp می‌توانند پلی‌مورفیک باشند و بنابراین اعتبار این گونه‌ها می‌تواند مورد تردید باشد. Desser (۲۰۰۱) بیان کرد که در صورتی می‌تواند این گونه‌ها معتبر باشند که داده‌های مورفولوژی و مورفومتری، ارتباط با میزبان و لوکالیته جغرافیایی و هم‌چنین مراحل انتقال توسط ناقل توصیف شوند و این مراحل باید در قورباغه‌ها به‌طور آزمایشگاهی بررسی شود. در بررسی‌های مولکولی صورت گرفته توسط ۱۸s rRNA به‌دلیل فقدان اطلاعات لازم مقایسه‌ای در ژن بانک نتایج کاملی به‌دست نیامده است (Shannon، ۲۰۱۳). در این مطالعه فرم‌های مختلف از تریپانوزوم‌ها در قورباغه مردابی دیده شد و در مواردی حتی چندین مورف مختلف در یک قورباغه دیده شده است که نیاز به مطالعات مقایسه‌ای آزمایشگاهی و مولکولی برای شناسایی دقیق آن‌ها در حد گونه می‌باشد.

لاروهای نماتد (میکروفیلاریا)، انگل‌های خونی خارج سلولی هستند که متناوباً در دوزیستان گزارش شده است (Barta و همکاران،

۱۹۸۹). آن‌ها معمولاً توسط پشه‌های کولکس انتقال می‌یابند. دو جنس *Icosiella* و *Foleyella* تقریباً به‌صورت جهانی در دوزیستان و خزندگان یافت می‌شوند (Barta و همکاران، ۱۹۸۹). در نمونه‌های قورباغه‌ها بررسی شده در این مطالعه این انگل به‌وضوح در دو قورباغه مشاهده شدند. برای شناسایی دقیق این انگل‌ها نیاز به بررسی دقیق فرم بالغ آن‌ها می‌باشد.

طبق نظر Desser و همکاران (۱۹۹۳) انگل‌های خونی اسپورزوآ از خانواده‌های Lankesterella و Haemogregarina در دوزیستان گزارش شده است. گونه‌هایی از جنس *Haemogregarina*، *Hepatozoon*، *Lankesterella* و *Schellackia* در دوزیستان یافت شده است. در طی این مطالعه در یک نمونه، گونه‌هایی هموگریگارین مشاهده شده‌اند. Desser و همکاران (۱۹۹۵) ثابت کردند که پشه‌های کولکس که از قورباغه‌ها تغذیه می‌کنند به‌عنوان میزبان قطعی انگل Hepatozoon شناخته می‌شوند. هم‌چنین زالوها به‌عنوان ناقل انگل *Lankesterella* شناخته شده است (Desser و Barta، ۱۹۸۴).

این مطالعه در زمره اولین مطالعه جامع در قورباغه مردابی برای بررسی انگل‌های خونی در ایران است. به‌هرحال نتایج حاصل از این مطالعه داده‌های ضروری را برای مطالعات آینده به‌خصوص مطالعات مولکولی برای شناخت دقیق این انگل‌ها و ناقل‌های بالقوه آن‌ها برای انگل‌شناسان فراهم می‌کند.

منابع

۱. **Baloch, M. and kammei, H., 1385.** Amphibian Iran, Tehran University Press. pp: 711-712.

۲. **Barta, J.R.; Boulard, Y. and Desser, S.S., 1989.** Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern North American ranids in the context of host phylogeny. Transactions of the American Microscopical Society. Vol. 108, pp: 6-20.

۳. **Berger, L.; Speare, R.; Daszak, P.; Green, D.E.; Cunningham, A.A.; Goggin, C.L.; Slocombe, R.; Ragan, M.A.; Hyatt, A.D.; McDonald, K.R.; Hines, H.B.; Lips, D.R.; Marantelli, G. and Parkes, H., 1998.** Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Vol. 95, pp: 9031-9036.

۴. **Bernal, X.E. and Pinto, C.M., 2016.** Sexual differences in prevalence of a new species of trypanosome infecting túngara frogs. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. Vol. 5, pp: 40-47.

۵. **Daszak, p., 2000.** Emerging infection diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. science. Vol. 287, pp: 1756-1756.

۶. **Desser, S.S. and Barta. J.R., 1984.** An intraerythrocytic virus and rickettsia of frogs from Algonquin Park, Ontario. Canadian Journal of Zoology. Vol. 62, pp: 1521-1524.

۷. **Desser, S.S., 1987.** *Aegyptianella ranarum* sp. n. (Rickettsiales, Anaplasmataceae): ultrastructure and prevalence in frogs from Ontario. Journal of Wildlife and Disease. Vol. 23, pp: 52-59.

۸. **Desser, S.S.; Hong, H. and Martin D.S., 1995.** The life history, ultrastructure and experimental transmission of *Hepatozoon catesbianae* n. comb., an apicomplexan parasite of the bullfrog, *Rana catesbeiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algonquin Park, Ontario. Journal of Parasitology. Vol. 81, pp: 212-222.

۹. **Desser, S.S., 2001.** The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. Journal of Parasitology. Vol. 87, pp: 152-160.

۱۰. **Diamond, L.S., 1965.** A study of the morphology, biology and taxonomy of the trypanosomes of Anura. Wildlife Disease. Vol. 44, pp: 1-85.

۱۱. **Dodd, C.K.J., 2013.** Frogs of the United States and Canada. 2 Volumes. Johns Hopkins University Press, Baltimore. 962 p.

۱۲. **Dvorakova, N.; Kvicerova, J.; Papousek, I.; Javanbakht, H.; Tiar, G.; Kami, H.G. and Siroky, P., 2013.** Haemogregarines from western Palaearctic freshwater turtles (genera *Emys*, *Mauremys*) are conspecific with *Haemogregarina stepanowi* Danilewsky, 1885. Parasitology. Vol. 141, pp: 522-530.

۱۳. **Eisen, R.J., 2001.** Absence of measurable malaria-induced mortality in western fence lizards (Sceloporus occidentalis) in nature: a 4- year study of annual and over-winter mortality. Oecologia. Vol. 127, pp: 586-589.

۱۴. **Harrus, S. and Baneth, G., 2005.** Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. International Journal of Parasitology. Vol. 35, No. 11-12, pp: 1309-1318.

۱۵. **Javanbakht, H.; Kvicerov, Y.; Dvorakova, N.; Mikulıcek, P.; Sharifi, M.; Kautman, M.; Marsıkov, p. and Siroky, P., 2015a.** Phylogeny, Diversity, Distribution, and Host Specificity of *Haemoproteus spp*. (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) of Palaearctic Tortoises. Journal of Eukaryotic Microbiology. Vol. 62, No. 5, pp: 670-678.

۱۶. **Javanbakht, H.; Široký, P.; Mikulíček, P. and Sharifi, M., 2015b.** Distribution and abundance of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) and its vector *Hyalomma aegyptiumin* tortoises of Iran. Biologia. Vol. 70, No. 2, pp: 229-234.

۱۷. **Kazemi, S.M.; Rastegar-Pouyani, E.; Shafiei Darabi, S.A.; Ebrahim Tehrani, M.; Hosseinzadeh, M.S.; Mashayekhi, M. and Mobaraki, A., 2015.** Annotated checklist of amphibians and reptiles of Qom Province, central Iran. Iranian Journal of Animal Biosystematics. Vol. 77, No. 7, pp: 42-27.

۱۸. **Kiesecker, J.M.; Blaustin, A.R. and Belden, L.K., 2001.** Complex causes of amphibian population declines. Nature. Vol. 410, pp: 681-684.

۱۹. **Kim, B.; Smith, T.G. and Desser, S.S., 1998.** The life history and host specificity of *Hepatozoon clamatae* (Apicomplexa: Adeleorina) and ITS-1 nucleotide sequence variation of *Hepatozoon* species of frogs and mosquitoes from Ontario. Journal of Parasitology. Vol. 84, pp: 789-797.

۲۰. **Knapp, R.A. and Matthews, K.R., 2000.** Non-native fish introductions and the decline of the mountain yellow-legged frog from within protected areas. Conservation Biology. Vol. 14, pp: 428-438.

۲۱. **Lehmann, D.L., 1959a.** The description of *Haemogregarina boyli* n. sp. from the yellow-legged frog, *Rana b. boyli*. Journal of Parasitology. Vol. 45, pp: 198-203.

۲۲. **Lehmann, D.L., 1959b.** *Karyolysus sonomae* n. sp., a blood parasite from the California yellow-legged frog, *Rana boyli*

boyli. Proceedings of the American Philosophical Society. Vol. 103, pp: 545-547.

۲۳. **Lehmann, D.L., 1959c.** *Trypanosoma boyli* n. sp. from the California yellow-legged frog, *Rana b. boyli*. Transactions of the American Microscopical Society. Vol. 78, pp: 370-373.

۲۴. **Lehmann, D.L., 1960.** *Haemogregarina aurora* n. sp. from *Rana aurora*. Proceedings of the American Philosophical Society. Vol. 104, pp: 202-204.

۲۵. **Medrano-Tupiza, E.; Morales-Arciniega, S.; Santander Parra, S.; Núñez-Naranjo, L. and Puga-Torres, B., 2017.** Absence of Hemoparasites in Wildlife Snakes, Located in the Ecological Reserves Cota 70, Cotacachi-Cayapas and Sumaco-Napo-Galeras in Ecuador. Research in Zoology. Vol. 7, No. 1, pp: 7-10.

۲۶. **Mohammadi, Z.; Khajeh, A.; Ghorbani, F. and Kami, H.G., 2015.** A biosystematic study of new records of the marsh frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 7117) (Amphibia: *Ranidae*) from the southeast of Iran. Journal of Asia-Pacific Biodiversity. Vol. 1, No. 4, pp: 711-714.

۲۷. **Nasiri, V.; Mobedi, I.; Dalimi, A.; Zare Mirakabadi, A.; Ghaffarifar, F.; Teymurzadeh, S.; Karimi, G.; Abdoli, A. and Paykari, H., 2014.** A description of parasites from Iranian snakes. Experimental Parasitology. Vol. 147, pp: 7-15.

۲۸. **Noden, B.H.; Coburn, L.; Wright, R. and Bradley, K., 2015.** Updated distribution of *Aedes albopictus* in Oklahoma, USA, and implications for arbovirus transmission. Journal of the American Mosquito Control Association. Vol. 31, pp: 93-96.

۲۹. **Pechmann, J.H.K.; Scott, D.E.; Semlitsch, R.D.; Caldwell, J.P.; Vitt, L.J. and Gibbons, J.W., 1991.** Declining amphibian populations: The problem of separating human impact from natural fluctuations Science. Vol. 253, pp: 892- 895.

۳۰. **Rajabi, F.; Javanbakht, H. and Sajjadi, S.S., 2017.** A preliminary study of haemoparasites in marsh frogs, *Pelophylax ridibundus* (Ranidae) from Iran. Journal of Entomology and Zoological Studies. Vol. 5, No. 4, pp: 1314-1317.

۳۱. **Ramos, B. and Urdaneta-Morales, S., 1977.** Hematophagous insects as vectors for frog trypanosomes. Revista de Biologica Tropical. Vol. 25, pp: 209-217.

۳۲. **Sajjadi, S. and Javanbakht, H., 2017.** Study of Blood Parasites of the Three Snake Species in Iran: *Natrix natrix*, *Natrix tessellata* and *Zamenis longissimus* (Colubridae). Journal of Genetic Resource. Vol. 1, pp: 1-6.

۳۳. **Shannon, R.P., 2013.** Amphibian blood parasites and their potential vectors in the great plains of the united states. MSC thesis. Oklahoma State University.

۳۴. **Smallridge, C.J. and Bull, C.M., 2000.** Prevalence and intensity of the blood parasite *Hemolivia mariae* in a field population of the skink *Tiquila rugosa*. Parasitology Research. Vol. 86, pp: 655-660.

۳۵. **Stenberg, P.L. and Bowerman, W.J., 2008.** Hemoparasites in Oregon Spotted Frogs (*Rana pretiosa*) from Central Oregon, USA. Journal of Wildlife and Disease. Vol. 44, No. 2, pp: 464-468.

۳۶. **Vaissi, S.; Parto, P.; Haghighi, Z.M. and Sharifi, M., 2017.** Intraerythrocytic rickettsial inclusions in endangered Kaiser ’s mountain newt, Neurergus kaiseri (Caudata: Salamandridae. Journal of Appleid Animal Research. Vol. 45, No. 1, pp: 505-507.

۳۷. **Zickus, T., 2002.** The first data on the fauna and distribution of blood barasites of amphibians in Lithuania. Acta Zoologica Lituanica. Vol. 12, No. 2, pp: 197-202.