

## بررسی اولیه ایمنی‌زایی اسپوروزوآیت و مرروزوآیت ایمریا تنلا در ماکیان

دکتر سیدمصطفی رضوی‌دینانی<sup>۱</sup> دکتر صادق رهبری<sup>۲</sup>

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۳، ۴-۱، (۱۳۷۹)

بار در کشور به ارزیابی ایمنی حاصل از دو مرحله اسپوروزوآیت و مرروزوآیت ایمریا تنلا می‌پردازد. راه داخل رکتومی از این جهت انتخاب گردید، است که اولاً مراحل مذکور بعنوان پادگنهای زنده با ایجاد عفونت ملایم و برقراری چرخه حیاتی انگل، موجب راه‌اندازی پاسخهای ایمنی میزبان می‌شوند و ثانیاً این روش از نظر تجاری جنبه کاربردی داشته و هنگام تعیین جنسیت در کارخانه جوجه‌کشی قابل اجراست.

### مواد و روش کار

۱ - جدا کردن تک اواوسیست: در این مطالعه به منظور جدا کردن تک اواوسیست از روش تعدیل یافته لی (۱۹۷۹) استفاده گردید (۱۹). اواوسیست مورد استفاده از سویه زیاران انتخاب گردید.

۲ - ایجاد آلودگی تجربی و جداسازی اواوسیست‌های دفع‌شده: تک اواوسیست جدا شده از راه داخل چینه‌دانی به جوجه با سن یک هفته تلقیح شد و پس از ۱۶۸ ساعت به مدت یک هفته مدفوع دفع شده جمع‌آوری و اواوسیست‌های موجود به روش شناورسازی با آب شکر (چگالی ۱/۲۰) جمع‌آوری گردیدند و در محلول بی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد قرار گرفتند (۱۰ و ۷).

۳ - هاگدار کردن اواوسیست‌ها: سوسپانسیون محتوی اواوسیست به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۲۸ درجه سانتیگراد قرار داده شد و عمل هوادهی با پمپ آکواریوم انجام گرفت.

۴ - تکثیر و نگهداری اواوسیست‌ها: اواوسیست‌های هاگدار شده به سی قطعه جوجه با سن دو هفته تلقیح و مدفوع آنها به روش گفته شده (مرحله ۲) جمع‌آوری و اواوسیست‌های موجود جدا شدند. کلیه اواوسیست‌ها با روش گفته شده (مرحله ۳) هاگدار گردیدند و تا زمان مصرف در محلول ۲/۵ درصد بی‌کرومات پتاسیم و در شرایط یخچال (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند.

۵ - تهیه و خالص‌سازی اسپوروزوآیت: به منظور تهیه اسپوروزوآیت از روش هافمن و ریدر (۱۹۹۰) استفاده شد (۱۲). این روش شامل مراحل ضدعفونی کردن اواوسیست با هیپوکلریت سدیم تجاری، شکستن دیواره اواوسیست و تولید اسپوروسیست با استفاده از ضربات مکانیکی، انتقال اسپوروسیست‌ها به محیط شکوفایی (Excysting Medium) شامل محیط هنکس (pH=۷/۸)، تریپسین (۰/۴ درصد)، صفرای گاو (۸ درصد) و انکوباسیون در حرارت ۴۱ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت می‌باشد. به منظور خالص‌سازی اسپوروزوآیت‌ها و جداسازی آنها از بقایای دیواره اواوسیست و اسپوروسیست از روش دیویس (۱۹۷۳) استفاده گردید (۷). اسپوروزوآیت‌ها تا زمان مصرف در محیط هنکس و شرایط یخچال نگهداری شدند.

۶ - تهیه و خالص‌سازی مرروزوآیت نسل اول: برای این منظور مطابق با روش دانفورس (۱۹۸۶) ابتدا پنج قطعه جوجه سه هفته هر کدام با ۴۰ هزار اواوسیست هاگدار ایمریا تنلا (سویه متجانس) تلقیح و پس از ۷۲ ساعت ذبح و بافت روده کور در PBS شستشو داده شد. قطعات خرد شده بافت به محیط DMEM منتقل و به مدت ۴۵ دقیقه به وسیله همزن مغناطیسی تکان داده شد تا شیزونت‌های نسل اول پاره شده و مرروزوآیت‌ها در داخل محیط رها شوند (۴). برای خالص‌سازی مرروزوآیت‌ها نیز از روش گفته شده (مرحله ۵) استفاده گردید.

کوکسیدیوز یکی از مهمترین بیماریهای اقتصادی صنایع پرورش ماکیان در دنیا است. در حال حاضر شیمی درمانی مهمترین روش کنترل و پیشگیری از این بیماری می‌باشد. اخیراً تلاشهایی در جهت القاء ایمنی در برابر کوکسیدیوز پرندگان صورت گرفته و چند واکسن زنده تخفیف حدت یافته به صورت تجاری به بازار عرضه شده‌اند. مطالعه حاضر به منظور بررسی ایمنی‌زایی اسپوروزوآیت و مرروزوآیت/ایمریا تنلا از راه تلقیح داخل رکتوم انجام شده است. تعداد صد قطعه جوجه یکروزه نژاد تخمی به پنج گروه بیست تایی تقسیم شدند. چهار گروه از جوجه‌ها با مقادیر کم و زیاد اسپوروزوآیت و مرروزوآیت و گروه پنجم (گروه شاهد) با بیست میکرولیتر محیط استریل هنکس تلقیح گردیدند. همه جوجه‌های ایمن شده و غیرایمن به وسیله ده هزار اواوسیست/ایمریا تنلا (سویه متجانس) در سن سه هفتگی چالش شدند. مدفوع پرنده‌ها به صورت روزانه تا ۸ روز پس از دوره پیش‌آشکاری مورد آزمایش قرار گرفت و متوسط تعداد اواوسیست در گرم (OPG) در هر گروه محاسبه شد. نتایج حاصله اختلاف معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را بین پرندگان ایمن شده به وسیله اسپوروزوآیت و گروه شاهد نشان داد. به علاوه اختلاف معنی‌داری بین پرندگان ایمن شده با دز بالای مرروزوآیت و گروه شاهد مشاهده شد. هیچ اختلاف معنی‌داری بین جوجه‌های ایمن شده با دز پایین مرروزوآیت و گروه شاهد وجود نداشت. جوجه‌های ایمن شده با اسپوروزوآیت محافظت بالاتری را نسبت به گروه ایمن شده با مرروزوآیت نشان دادند. یافته‌ها نشان داد که تشکیل و بلوغ شیزونت نسل اول/ایمریا تنلا نقش مهمی در القاء پاسخ ایمنی دارد. انجام تجربه در شرایط مزرعه مؤید محافظت طولانی مدت در اثر تلقیح دز پایین اسپوروزوآیت بود که به نظر می‌رسد به علت بلع اواوسیست‌ها و عرضه پادگنی مداوم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپوروزوآیت، مرروزوآیت، ایمریا تنلا، کوکسیدیوز ماکیان.

کوکسیدیوز ماکیان از جمله مهمترین بیماریهای اقتصادی در صنعت پرورش طیور می‌باشد. این بیماری با بروز علائم بالینی و تلفات یا بدون ایجاد علائم بالینی مشخص با افت تولید، کاهش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذا خسارات قابل توجهی را به تولیدکنندگان وارد می‌سازد. از طرفی هزینه ناشی از درمان و پیشگیری نیز قابل توجه است (۲۷ و ۱۵).

در حال حاضر شیمی درمانی مهمترین راه درمان و کنترل و پیشگیری است. سالانه میلیونها دلار برای خرید داروهای ضدکوکسیدیوز هزینه می‌شود که با توجه به شرایط دشوار اقتصادی و کمبود منابع ارزی کشور، رقمی قابل توجه و در خور تأمل است. علی‌رغم تلاشهای گسترده جهانی در زمینه ساخت واکسن هنوز واکسن کاملاً مؤثر و مقرون به صرفه اقتصادی عرضه نشده است. واکسنهای فعلی شامل مخلوطی از اواوسیست‌های گونه‌های مهم ایمریا هستند که با تابش اشعه یا پاساژهای متوالی تخفیف حدت یافته‌اند (۳۱، ۲۵، ۲۱، ۱۴). تحقیقات جدید در خصوص ساخت واکسنهای نوین شامل شناسایی پادگنهای ایمنی‌زای مراحل مختلف سیر تکاملی و تولید واکسنهای نو ترکیب می‌باشد اما هنوز چنین واکسنهایی در حد تجاری عرضه نشده‌اند (۳۰، ۲۹، ۲۲، ۱۳، ۵). شناسایی دقیق پاسخهای ایمنی در برابر انگل و ارزیابی ایمنی‌زایی مراحل مختلف سیر تکاملی، اولین گام بنیادین در مسیر ساخت واکسن خواهد بود. مطالعه حاضر برای اولین

۱) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.  
۲) گروه آموزشی انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.



جدول ۲ - میانگین OPG در گروه ایمن شده با اسپوروزوآیت و گروه شاهد برحسب روزهای متوالی پس از چالش (در شرایط بستر)

روزهای متوالی پس از چالش					OPG
۹	۸	۷	۶	۵	
۸۲۰	۷۵۰	۸۵۵	۷۵۶	۱۶۵	گروه ایمن شده
۴۹۷۵	۱۷۷۵۰	۱۵۳۹۵	۲۲۹۵۰	۱۴۱۰۰	گروه شاهد

### بحث

مطالعات انجام شده در مورد ماهیت ایمنی در کوکسیدیوز بیانگر نقش ایمنی هومورال و سلولی می باشد. با این وجود پاسخ ایمنی با واسطه سلولی از اهمیت بیشتری برخوردار است همچنان که در عفونت های حاصل از سایر ارگانیسدهای داخل سلولی نیز چنین است (۲۱، ۲۰، ۱۰). از دیرباز مشخص شده است که پرندگان ایمن شده بر علیه کوکسیدیوز در مقایسه با پرندگان غیرایمن، تعداد اووسیست کمتری دفع می نمایند و این واقعیت به عنوان معیاری مطمئن برای ارزیابی پاسخ ایمنی مورد توجه محققین مختلف قرار گرفته است (۲۷، ۲۴، ۲۳، ۱۵، ۱۰، ۹، ۷، ۶). اصولاً بین سطح ایمنی گله و دفع اووسیست یک رابطه معکوس وجود دارد به طوری که با افزایش سطح ایمنی، دفع اووسیست کاهش می یابد و بمرور در اثر برخورد پرنده با تعداد اووسیست کمتر، سطح ایمنی کاهش یافته و این خود موجب افزایش دفع اووسیست می گردد (۱۵ و ۲۷). طالبی و مولکاهی (۱۹۹۵) در تجربه خود بر روی ایمنی زایی ایمریا ماکزیمیا نشان دادند که پاسخ ایمنی سلولی و هومورال پس از دو هفته به حداکثر رسیده و بین پاسخ ایمنی سلولی و میزان دفع اووسیست رابطه منفی معنی داری وجود دارد (۲۸).

در مطالعه حاضر به منظور حذف نقش عوامل مؤثر بر دفع اووسیست، از نتایج تک اووسیست ایمریا تنلا استفاده شد و شرایط نگهداری، ترکیب جیره و تعداد اووسیست های دز چالشی در هر دو گروه ایمن شده و شاهد یکسان بود. بنابراین عوامل مؤثر بر دفع اووسیست تأثیری بر نتایج حاصله نداشته و یا حداقل تأثیر یکسانی در پرندگان ایمن شده و شاهد داشته اند.

برای تحریک پاسخ ایمنی از روشهای مختلفی استفاده شده که متداولترین آنها خوراندن اووسیست های تخفیف حدت یافته است (۳۱، ۳۰، ۲۶، ۲۵، ۲۲، ۱۱). علاوه بر این عده ای از محققین از روش تزریقی برای معرفی پادگنهای زیرواحدی و نو ترکیب استفاده کرده اند (۳۰، ۲۹، ۲۲، ۵، ۳). در مطالعه حاضر روش داخل رکتومی از این جهت انتخاب شده است که اولاً این شیوه در ۲۴ ساعت اول پس از تولد یعنی زمان تعیین جنسیت در کارخانه جوجه کشی قابل اجراست و ثانیاً مراحل اسپوروزوآیت و مرروزوآیت به عنوان پادگنهای زنده عمل کرده و با ایجاد عفونت و برقراری چرخه حیاتی انگل موجب راه اندازی پاسخهای مطلوب سیستم ایمنی میزبان می شوند. از این روش در گذشته به منظور اهداف مختلف استفاده شده است (۱۰، ۹، ۶).

در مورد ایمنی زایی مراحل مختلف چرخه حیاتی انگل مطالعاتی در

مرروزوآیت های حاصله تا زمان مصرف در محیط هنکس و شرایط یخچال نگهداری شدند.

۷ - مطالعه ایمنی زایی اسپوروزوآیت و مرروزوآیت در شرایط قفس: تعداد یکصد قطعه جوجه یکروزه نژاد تخمی به ۵ گروه ۲۰ تایی تقسیم شدند. عمل تلقیح به صورت داخل رکتومی و با استفاده از میکروپیپت اتوماتیک صورت گرفت. مقادیر تلقیح شده به گروهها از نظر حجم یکسان (۰/۰۲ میلی لیتر) و شامل ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ مرروزوآیت و ۱۰۰۰ و پیش آشکاری به مدت ۸ روز جمع آوری و اووسیست های موجود در آن به روش Clayton-lane شمارش گردید.

۸ - مطالعه ایمنی زایی اسپوروزوآیت در شرایط بستر: تعداد ۵۰ قطعه جوجه یکروزه هر کدام با ۱۵۰۰ اسپوروزوآیت ایمریا تنلا (سویه P-11؛ اخذ شده از آقای دکتر کسری اسماعیل نیا، گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) به روش گفته شده در قبل تلقیح شدند و ۴ هفته بعد، هر کدام با ۲۰ هزار اووسیست (سویه متجانس) چالش و میانگین OPG آنها در ۵ روز متوالی محاسبه شد. گروه شاهد شامل ۵۰ قطعه جوجه یکروزه بودند که به طور همزمان با محیط هنکس استریل تلقیح شده و در شرایط کاملاً مساوی نگهداری می شدند. این جوجهها نیز همزمان با جوجههای گروه ایمن و با همان تعداد اووسیست چالش شدند.

کلیه نتایج حاصله در این مطالعه با برنامه آماری SX و آزمون آنالیز واریانس یکطرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تذکر: به منظور جلوگیری از عفونت های مضاعف، در طول این مطالعه از دان اتوکلاو شده استفاده گردید و هیچ واکنشی مورد مصرف قرار نگرفت.

### نتایج

در شرایط قفس: میانگین OPG در گروههای ایمن شده با اسپوروزوآیت و مرروزوآیت و گروه شاهد برحسب روزهای متوالی پس از چالش در جدول ۱ آمده است. در ۲۰ گروهها، دفع اووسیست ابتدا روندی صعودی و سپس روندی نزولی داشت. میانگین OPG در گروه ایمن شده با ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ اسپوروزوآیت و نیز گروه ایمن شده با ۵۰۰۰ مرروزوآیت اختلاف معنی داری را با گروه شاهد نشان داد ( $P < 0/05$ ). OPG گروه ایمن شده با ۱۰۰۰ مرروزوآیت و گروه شاهد هیچ اختلاف معنی داری نداشتند ( $P < 0/05$ ).

در شرایط بستر: میانگین OPG گروه ایمن شده با ۱۵۰۰ اسپوروزوآیت و گروه شاهد در شرایط بستر در جدول ۲ آمده است. برخلاف پرندگان نگهداری شده در قفس، این پرندگان به مدفوع خود دسترسی داشته و به علت بلع مداوم اووسیست، مرتباً دچار آلودگی شدند. بنابراین دفع اووسیست در این گروه به صورت کلاسیک نبوده و تقریباً در روزهای متوالی پس از دوره پیش آشکاری یکنواخت بود. میانگین OPG در پنج روز متوالی در گروه ایمن شده ۶۶۸ و در گروه شاهد ۱۳۰۳۴ بود. مقایسه OPG دو گروه شاهد و ایمن شده اختلاف آماری بسیار معنی داری ( $P < 0/01$ ) را نشان داد.

جدول ۱ - میانگین دفع اووسیست (OPG) در گروههای ایمن شده و گروه شاهد برحسب روزهای متوالی پس از چالش (در شرایط قفس)

روزهای متوالی پس از چالش								OPG گروه ایمن شده با
۱۴	۱۳	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	
۶۰۰	۲۲۰۰	۴۹۰۰	۱۵۱۰۰	۲۰۱۰۰	۱۸۰۰۰	۸۵۰۰	۳۸۰۰	۱۰۰۰ اسپوروزوآیت
۲۰۰	۱۱۰۰	۱۷۰۰	۳۵۰۰	۱۵۴۰۰	۲۴۰۰۰	۸۰۰	۱۲۰	۵۰۰۰ اسپوروزوآیت
۷۰۰	۱۶۰۰	۲۴۵۰۰	۳۷۳۰۰	۴۶۵۰۰	۴۷۰۰۰	۹۰۰۰	۴۳۰۰	۱۰۰۰ مرروزوآیت
۵۰۰	۱۷۰۰	۴۳۰۰	۱۸۰۰۰	۳۲۲۰۰	۲۴۵۰۰	۶۰۰۰	۴۴۰۰	۵۰۰۰ مرروزوآیت
۹۰۰	۳۴۰۰	۲۸۵۰۰	۳۶۵۰۰	۴۸۳۰۰	۵۸۵۰۰	۱۱۷۰۰	۵۲۰۰	گروه شاهد

## References

1. Al-Saadii, Z.J.L. and Al-Attar, M.A. Immunization of chickens against *Eimeria tenella* by intramuscular inoculation of sporozoites. *Pure and Applied Sciences*, 21(6), 7-12, (1994).
2. Awadlalla, S.F. Effects of low-level infection of *Eimeria tenella* for a short duration on development of specific immunity in chicken. *Vet. Med. J. Giza*, 41(3), 9-12, (1993).
3. Brake, D.A., Strang, G., Lineberger, J.E., Fedor, C.H., Clare, R., Banas, T.A. and Miller, T. Immunogenetic characterization of a tissue cultured derived vaccine that affords partial protection against avian coccidiosis. *Poultry Science* 76, 974-983, (1997).
4. Danforth, H.D. Development and use of hybridoma antibodies directed against *Eimeria acervulina* merozoites for cross reactive and ferritin-labelling studies. *Avian Diseases*, 31(1), 99-104, (1986).
5. Danforth, H.D., Augustine, P.C., Ruff, M.D., McCandliss, R., Strausberg, R.L. and Likel, M. Genetically engineered antigen confers partial protection against avian coccidial parasites, *Poultry Science*, 68(12), 1643-52, (1989).
6. Davies, S.F.M., Joyner, L.P. and Kendall, S.B. *Coccidiosis*. Oliver and Boyd Company, Edinburgh, PP: 30-39, (1963).
7. Davis, L.R. *Techniques in* : Hammond, D.M. and Long, P.L. (Eds) *The coccidia*, University Park Press, London, PP: 413-450, (1973).
8. Edgar, S.A. Control of cecal coccidiosis by active immunization. *Auburn Vet.* 10: 79-81, (1954).
9. Hammond, D.M., Anderson, F.L. and Miner, M.L. Response of immunized and non-immunized calves to cecal inoculation of first-generation merozoites of *Eimeria bovis*. *J. Parasitol.* 50: 209-213, (1964).
10. Hammond, D.M. and Long, P.L. *The coccidia*, University Park Press. London, PP: 296-341, (1973).
11. Hein, H. Vaccination against infection with *Eimeria tenella* in broiler chickens. *Proc. 17th World Vet. Congress*, 2: 1443-1452, (1963).
12. Hofmann, J. and Reather, W. Improved techniques for the invitro cultivation of *Eimeria tenella* in primary chick kidney cells. *Parasitol.*, 76: 479-486, (1990).
13. Jenkins, M.C., Castle, M.D. and Danforth, H.D. Protective immunization against the intestinal parasite, *Eimeria acervulina* with recombinant coccidial antigen. *Poultry Science*, 70(3): 539-547, (1991).
14. Jenkins, M.C., Seferian, P.G., Augustine, P.C. and Danforth, H.D. Protective immunity against coccidiosis elicited by radiation-attenuated *Eimeria maxima* sporozoite that are incapable of asexual development. *Avian Disease* (37), 1: 78-82, (1993).
15. Jordan, F.T.W. *Poultry Disease*. Third Edition, Bailliere Tindall PP: 226-241, (1990).

## بررسی اولیه ایمنی‌زایی اسپوروزایت و مرزوآیت ایمریا تنلا در ماکیان

پرنندگان و نیز گاو صورت گرفته است. کندال و مک کلوق (۱۹۵۲) تشکیل شیزونت نسل دوم ایمریا تنلا را مسئول القاء پاسخ ایمنی اعلام کردند (۱۸). رز (۱۹۶۷) در تجربه مشابهی به این نتیجه رسید که مراحل گامتوگونی ایمریا تنلا و ایمریا نکاتریکس توانایی ایمنی‌زایی کمی دارند. وی مراحل شیزوگونی این دو گونه را عامل اصلی مقاومت در برابر عفونت مجدد دانست (۲۳). این محقق در سال ۱۹۷۳ با مطالعه بر روی ایمریا ماکزیمایم ابراز کرد که مراحل جنسی این گونه ممکن است ایمنی‌زا باشند (۲۴). در مورد گونه‌های غیرماکیان، هاموند و همکاران (۱۹۶۴) با تلقیح مرزوآیت‌های نسل اول ایمریا بویس در داخل روده کور گوساله‌ها توانستند آنها را در برابر چالش دهانی ایمن کنند و این مؤید آن است که تکامل شیزونت نسل اول ایمریا بویس برای القاء پاسخ ایمنی ضروری نمی‌باشد (۹).

در مطالعه حاضر دفع اوووسیست در جوجه‌های ایمن‌شده با هزار و پنج هزار اسپوروزایت و نیز پنج هزار مرزوآیت اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت ( $P < 0/05$ ). از طرفی مقایسه دفع اوووسیست در گروه‌های ایمن‌شده با اسپوروزایت و مرزوآیت، اختلاف بسیار معنی‌داری ( $P < 0/01$ ) را نشان داد. همان‌طور که قبلاً گفته شد تلقیح داخل رکتومی اسپوروزایت و مرزوآیت موجب ادامه سیر تکاملی انگل در میزبان می‌شود اما تفاوت عمده در دو گروه ایمن‌شده با اسپوروزایت و مرزوآیت، تشکیل یا عدم تشکیل شیزونت نسل اول است. لیلهوج و تروت (۱۹۹۳) (۲۱) نقش مراحل اولیه سیر تکاملی ایمریا را در ایجاد پاسخ ایمنی بسیار مهم دانسته و نتایج مطالعه حاضر با نتایج این دو محقق و نیز با نتایج هاموند و همکاران (۱۹۶۴) همخوانی دارد اما با نتایج کندال و مک کلوق (۱۹۵۲) (۱۸) مبنی بر نقش بیشتر شیزوگونی نسل دوم در القاء پاسخ ایمنی مطابقت ندارد. احتمالاً در گروه ایمن‌شده با هزار مرزوآیت میزان یادگن ارایه‌شده برای تحریک ایمنی مناسب کافی نبوده بنابراین اختلاف قابل توجهی با گروه شاهد نداشته است. آنچه که از نتایج حاضر می‌توان استنباط کرد اینکه تشکیل شیزونت نسل اول ایمریا تنلا از اهمیت بیشتری در القاء پاسخ ایمنی برخوردار است. نتیجه مذکور مبنی بر نقش ایمنی‌زایی اسپوروزایت ایمریا تنلا با نتایج السعادی و العطار (۱۹۹۴) (۱) همخوانی دارد. در بخش اصلی مطالعه حاضر به منظور جلوگیری از عفونت تدریجی، جوجه‌های تحت آزمایش در شرایط قفس نگهداری شدند تا به مدفوع خود دسترسی نداشته باشند. با توجه به جدول ۱، دفع اوووسیست ابتدا آهنگ صعودی داشته و پس از رسیدن به حداکثر، بتدریج کاهش یافته است. این مسئله مؤید آن است که در طول آزمایش عفونت جدیدی رخ نداده و آلودگیها همزمان بوده است. از طرفی در تحقیق حاضر به‌عنوان یک مطالعه جنبی، ایمنی حاصل از تلقیح داخل رکتومی اسپوروزایت در شرایط بستر ارزیابی شد که نتایج حاصله مؤید اختلاف بسیار معنی‌دار ( $P < 0/01$ ) با گروه شاهد بود. علت این امر، تداوم ایمنی القاء‌شده به‌علت نوک‌زنی به بستر و بلع اوووسیست‌های دفع‌شده بوده است. این یافته مبنی بر نقش عفونت تدریجی در تداوم پاسخ ایمنی با نتایج دیگر محققین همخوانی دارد (۱۷، ۱۶، ۸، ۲).

تعیین طول دوره ایمنی و مقایسه نتایج محققین مختلف با توجه به روشهای مختلف ارزیابی پاسخ ایمنی دشوار است. در مطالعه حاضر طول دوره پاسخ ایمنی مدنظر نبوده اما پیشنهاد می‌شود که برای این امر از چالشهای متوالی پرنده پرهیز کرده و از سایر روشها بویژه روش فلوسیتومتری استفاده شود. در غیر این صورت چالشها خود موجب تأثیر بر نتایج خواهند شد.

## تشکر و قدردانی

کلیه اعتبارات مالی این تحقیق از محل مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه تهران هزینه شده است و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به‌خاطر پرداخت هزینه‌ها، از آقای دکتر عباس برین به‌خاطر مشاورتهای علمی در مراحل مختلف و از آقای عباس گرامی‌صادقیان، به‌خاطر همکاری در انجام مراحل اجرایی تشکر و قدردانی نمایند.



16. Joyner, L.P. and Norton, C.C. The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria tenella*. *Parasitol.* 67: 333-340, (1973).
17. Karim, M.J. Trickle infections for the development of complete immunity in young chicks against *Eimeria tenella*. *Pakistan Vet. J.*, 14(3): 138-140, (1994).
18. Kendall, S.B. and McCullough, F.S. Relationship between sulfamezathine therapy and acquisition of immunity to *Eimeria tenella*. *J. Comp., path.*, 62: 116-124, (1952).
19. Lee, E.H. Single and Low-level oocyst infections of drug-resistant field strains of *Eimeria tenella* in medicated birds. *Can. vet. J.*, 20: 102-104, (1979).
20. Lillehoj, H.S. Immunity and Host genetic based control strategies for avian coccidiosis. *World Poultry-Misset*, 17-19, (1996).
21. Lillehoj, H.S. and Trout, J.M. Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathology*, 22: 3-31, (1993).
22. Rhalem, A., Sahibi, H., Dakkak, A., Laurent, F., Kazanji, M., Yvone, P. and Pery, P. Protective oral immunization of chickens against *Eimeria tenella* with sporozoite surface antigens. *Vet. Immunology and Immunopathology*, 38(3-4): 327-340, (1993).
23. Rose, M.E. Immunity to *Eimeria brunetti* and *Eimeria maxima* infections in the fowl. *Parasitol.*, 57: 363-370, (1967).
24. Rose, M.E. Immunity. In: Hammond, D.M. and Long, P.L. (Eds) *The coccidia*, University Park Press, London, PP: 295-341, (1973).
25. Shirley, M.W., Bushell, A.C., Bushell, J.E., McDonald, V. and Roberts, B. A live attenuated vaccine for the control of avian coccidiosis: trials in broiler breeder and replacement layer flock in the U.K., *Vet. Rec.* 137: 453-457, (1995).
26. Singh, U.M. Preliminary evaluation of a commercial coccidiosis vaccine in broiler parental flocks. *Vet. Rev. Kathmandu*, 11(2): 61-62, (1996).
27. Soulsby, E.J.L. *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. 7th Ed., Bailliere Tindall, PP: 631-645, (1982).
28. Talebi, A. and Mulcahy, G. Correlation between immune responses and oocyst production in chickens monospecifically infected with *Eimeria maxima*. *Avian Pathology*, 24, 485-495, (1995).
29. Wallach, M., Smith, N.C., Petracca, M. Miller, C.M.D., Eckert, J. and Braun, R. *Eimeria maxima* gametocyte antigens: potential use in a subunit maternal vaccine against coccidiosis. *Vaccine*, 13(4): 347-354, (1995).
30. Wallach, M. and Vermeulen, A. Progress towards a subunit vaccine against coccidiosis. *World Poultry-Misset*: 22-24, (1996).

31. Waxler, S.H. Immunization against cecal coccidiosis in chickens by the use of X-ray attenuated oocysts. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 99: 481-485, (1941).

### The primary study of immunogenicity of sporozoite and merozoite of *E. tenella* in chicken

Razavi, S.M.<sup>1</sup>, Rahbari, S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran. <sup>2</sup>Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.

Coccidiosis is regarded as one of the most important economic diseases of poultry industries in the world. Chemotherapy is the most important method of its control and prevention. Recently, some attempts have been directed to induce the immunity against avian coccidiosis and some live-attenuated vaccines have been introduced commercially. The present study was carried out to investigate the immunogenicity of sporozoite and merozoite of *E. tenella* by intra-rectal inoculation. One hundred day-old chickens were divided to five groups which including 20 birds. Four groups of birds were inoculated by low and high dose of sporozoite and merozoite, remainder by 20 µl of sterile Hank's medium as control group. All immunized and nonimmunized chickens were challenged by 10,000 sporulated oocysts of homologous strain at 3-week-old age. The bird faeces were examined daily 8 days after prepatent period and the mean of oocyst per gram (OPG) was calculated in each group. The results showed significant difference between birds immunized by sporozoite and control group. Furthermore, there was significant difference between birds immunized by high dose of merozoite and control group. The results indicated no significant difference between birds immunized by low dose of merozoite and control group. There was higher protection in chickens immunized by sporozoite. The finding revealed that the formation and maturation of first generation schizont of *Eimeria tenella* has an important role in induction of immune response. Field study was carried out to show long-term protection by low dose of sporozoite, it seems that litter rearing cause continuous ingestion of oocysts which introduce antigen presentation continuously.

**Key words :** Sporozoite, Merozoite, *Eimeria tenella*, Chicken.