

## تأثیر عفونت تجربی کوکسیدیایی بر ایمنی سلولی حاصل از واکسیناسیون نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی

بهرام شجاع‌دوست<sup>۱\*</sup>، فرهید همت زاده<sup>۲</sup>، جلال غلامی سید کلاهی<sup>۱</sup>، صادق رهبری<sup>۳</sup>، محمد طاهری<sup>۴</sup>

۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) گروه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۳) گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۴) آزمایشگاه فرانس، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۳ آبان ماه ۱۳۸۵، پذیرش نهایی: ۱۵ اسفند ماه ۱۳۸۶)

### چکیده

با هدف بررسی اثر تضعیف ایمنی احتمالی عفونت کوکسیدیایی بر ایمنی سلولی جوجه‌های گوشتی، ۶۴۰ قطعه جوجه‌گوشتی یک روزه از جنس نرسویه تجاری راس ۲۰۸ بطور تصادفی به ۴ گروه ۱۶۰ قطعه‌ای (هر یک شامل ۴ تکرار ۴۰ تایی) تقسیم شدند. گروه شاهد منفی تا انتهای آزمایش چالش نشده باقی ماند، در حالی که ۳ گروه دیگر مخلوطی از آیمیر یا آسروولینا و آیمیر یا ماکزیما را در غالب دوزهای بالا، متوسط و پایین در سن ۱۵ روزگی دریافت کردند. برای ارزیابی فعالیت سیستم ایمنی سلولی پرنده از آزمایش ممانعت از مهاجرت ماکروفاژ (MIF) استفاده شد. وبه همین منظور خونگیری در سن ۱۵، ۲۲ و ۳۶ روزگی انجام شد. در سن ۱۵ روزگی (قبل از چالش) اختلاف معنی داری در میزان MIF بین گروه‌های مختلف، دیده نشد ( $p > 0.05$ ). در سن ۲۲ و ۳۶ روزگی (۳ هفته پس از چالش) اختلاف معنی داری در میزان MIF بین گروه چالش شده با دوز بالا و شاهد منفی مشاهده گردید ( $p < 0.05$ ). بر اساس این مطالعه مشخص گردید که آلودگی به عفونت کوکسیدیایی با دوز بالا در جوجه‌های گوشتی موجب تضعیف ایمنی سلولی اختصاصی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کوکسیدیوز، ایمنی سلولی، جوجه گوشتی.

کلسیم، فسفر و آهن در پرندگان آلوده به کوکسید یا کمتر از پرندگان سالم است (۶). در ضمن عفونت کوکسیدیایی سبب کاهش رشد و بازده غذای استفاده شده می‌گردد (۶، ۸). به علاوه غلظت روی کبدی توسط کوکسیدیوز کاهش می‌یابد (۵). علاوه بر آن میزان Fe پلاسما و Fe باند شده در کوکسیدیوز حاد کاهش می‌یابد (۲۰). در تحقیقی دیگر معلوم شد عفونت کوکسیدیایی سبب کاهش آرژنین، اسید آسپاراژینیک، ترئونین، سرین، پرولین، گلیسین در پلاسما و آهن خون جوجه‌های آلوده می‌گردد (۱۶، ۲۰). به علاوه در عفونت کوکسیدیایی غلظت اسید آسکوریک پلاسما نیز کاهش می‌یابد (۱۶) نقش یافته‌های فوق هنگامی اهمیت بیشتری می‌یابد که بدانیم Vit A، اسیدهای آمینه و پروتئین، Vit E، سلنیم، Vit C، Vit B12، روی و آهن دارای نقش مسلم در ایمنی سلولی و هومورال پرنده می‌باشند (۲۳).

از آنجاکه تکثیر ایمریها در لوله گوارش سبب آسیب و تخریب بافتی و بدنبال آن وقفه تغذیه‌ای و اختلال در جذب مواد مغذی ضروری در رشد و نمودستگاه‌های بدن از جمله سیستم ایمنی می‌گردد. این سوال در ذهن ایجاد می‌گردد که آیا عملکرد ایمریها بر سیستم ایمنی سلولی تأثیر سؤ دارد یا خیر؟ بدین منظور مطالعه‌ای با ایجاد عفونت تجربی کوکسیدیایی در جوجه‌های گوشتی و با استفاده از روش سنجش ممانعت از مهاجرت ماکروفاژ صورت گرفت. هدف از بکارگیری این آزمون مطالعه اثر عفونت کوکسیدیایی بر وضعیت ایمنی سلولی اختصاصی (وابسته به آنتی ژن) بود. در آزمایش ممانعت از مهاجرت، لمفوسیت‌های حساس شده به آنتی ژن خاص و ماکروفاژها دخالت دارند. در صورتی که جمعیت ماکروفاژی خاص

### مقدمه

کوکسیدیوز یکی از بیماری‌های انگلی است که توسط تک یاخته‌هایی از جنس آیمیر یا ایجاد می‌شود. این انگل از طریق ایجاد انتریت، کاهش بازدهی و افزایش تلفات در گله‌های طیور خسارات فراوانی را به صنعت طیور ایران و سایر کشورهای جهان وارد می‌نماید (۸، ۱۳).

گله‌های سالم معمولاً بازدهی خوبی دارند، اما پرورش یک گله سالم به عوامل متعددی بستگی دارد. مدیریت تغذیه، برنامه واکسیناسیون و مهمتر از همه وضعیت تکامل سیستم ایمنی پرنده از جمله این عوامل می‌باشند (۱۷). سرکوب پاسخ‌های ایمنی در پرنده باعث کاهش سطوح محافظت ایجاد شده بوسیله واکسن و افزایش شدت بیماریزایی عوامل بیماریزای طیور شده و بدنبال آن کاهش رشد، کاهش بازدهی گله، افزایش تلفات، افزایش مصرف دارو در گله و در نهایت خسارت‌های اقتصادی رخ می‌دهد. کوکسیدیاها به واسطه تکثیر در سلول‌های اپی تلیال باعث تخریب آنها شده و از طریق آسیبی که به مخاط و زیر مخاط روده وارد می‌کنند، در روده ایجاد جراحت می‌نمایند (۱۷). در پی آسیب به روده و ضخیم شدن ویلی‌ها اختلال در هضم و جذب مواد غذایی، بی‌اشتهایی و میل کمتر به آب در موارد حاد می‌گردد (۱۷). میزان متابولیسم پایه در پرندگان آلوده به کوکسیدیا کمتر از پرندگان غیر عفونی است. به علاوه میزان آلبومین، کاروتنوئید، آهن، گلوکز، فسفر و سدیم پلاسما در این پرندگان نسبت به گروه کنترل کمتر است (۳، ۵، ۱۹، ۲۰). در یکی از تحقیقات انجام شده مشخص شد میزان سدیم،



فیلتراسیون به میزان ده درصد FBS و ده هزار واحد پنی سیلین و ده میلی گرم استرپتومایسین در میلی لیتر به آن اضافه گردید.

برای تهیه محیط کشت سلول مخصوص محفظه ست MIF به ۲۰ میلی لیتر از RPMI، ۳ میلی لیتر FBS، ۶۰۰ میلی گرم آنتی ژن ویروس نیوکاسل، ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول آنتی بیوتیکی که حاوی ۱۰۰۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر استرپتومایسین بوده اضافه گردید. برای شمارش و تنظیم تعداد سلولها بعد از جداسازی هترو فیلها و لنفوسیتها و منوسیتها، از رنگ آمیزی با تریپان بلو استفاده گردید. برای مشخص کردن سلولهای خونی در مراحل مختلف جداسازی از رنگ آمیزی گیمسا استفاده شد.

**تهیه سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی مرغ:** ابتدا از ورید بالی جوجه‌ها (که به صورت تصادفی انتخاب می‌شدند با سرنگ هپارینه به میزان ۲ml اقدام به خونگیری می‌شد. سپس خون هپارینه به لوله فالكون ۱۵ml در کنار شعله منتقل گردیده و لوله‌های فالكون در ۸۰۰g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و سپس لایه بافی کوت آن به همراه حداقل ممکن از گلبولهای قرمز توسط پیپت کشیده شده و به لوله فالكون دیگری منتقل می‌گردید. هم حجم لایه بافی کوت و RBCهای برداشتی محیط کشت سلول RPMI اضافه می‌شد و به آرامی بر روی 2ml فایکول منتقل می‌گردید به طوری که حداقل اختلاط بین فاز فایکول و خون ایجاد شود. لوله حاوی مواد مذکور در ۵۰۰g، به مدت ۱۰ دقیقه و در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده، پس از پایان زمان سانتریفوژ لوله‌های مذکور به آرامی خارج شده و فازهای سلولی تشکیل شده مشاهده می‌شدند. در زیرین ترین لایه‌ها گلبولهای قرمز مستقر شده و در سطح گلبولهای قرمز لایه فایکول به همراه هترو فیلهای خون محیطی مرغ قرار می‌گیرند. در روی لایه فایکول تجمع تک هسته‌ایها قرار داشته که به شکل یک لایه نازک سفیدرنگ مشاهده می‌گردند. در روی لایه تک هسته‌ایها پلاسمای رقیق شده قرار می‌گیرد.

در این آزمایش چون تنها به سلولهای تک هسته‌ای نیاز است، با دقت تمام لایه تک هسته‌ایها توسط سمپلر برداشته شده و به یک لوله ایندرف منتقل می‌گردید و در ۵۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ می‌گردید. پس از انجام سانتریفوژ محلول رویی را خارج کرده و پلت تشکیل شده در ته لوله با محیط کشت سلول شسته شده و مجدداً در ۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ می‌شدند. جمعیت ماکروفاژها به روش هموسیتمتر شمارش شده و در نهایت تعلیقی که حاوی  $10^6 \times 16$  سلول در میلی لیتر از محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم و آنتی بیوتیک به اضافه ۳۰ میکروگرم به ازای میلی لیتر محیط کشت، آنتی ژن ویروس نیوکاسل به حالت تعلیق در می‌آمد. سپس محلول سلولهای جدا شده در محیط کشت سلولی به داخل لوله هماتوکریت کشیده شده و در ۲۵۰g به مدت ۵ دقیقه و ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ می‌شد. پس از سانتریفوژ لوله‌های هماتوکریت سلیکونه، لوله حاوی سلولهای ته نشین شده با استفاده از قلم الماسه در یک میلی متر جلوی محل ته نشست سلولها بریده و به آرامی شکسته و در درون

در لوله مویینه ریخته شوند به منظور دریافت مواد غذایی بیشتر از لوله مؤین به خارج مهاجرت می‌کنند. ولی اگر لمفوسیت‌های متعلق به حیوان حساس با ماکروفاژهای حیوان حساس و یا غیر حساس مخلوط شده و در مجاورت پادگن قرار گیرند از مهاجرت ماکروفاژها ممانعت خواهد شد. بنابراین ممانعت بستگی به تعداد لمفوسیت‌های حساس دارد و به نظر می‌رسد که یک لمفوسیت فعال با ترشح عامل ممانعت از مهاجرت مانع از مهاجرت ۱۰۰۰ ماکروفاژ می‌گردد. لمفوسیت‌های حساس وقتی در مجاورت پادگن مربوطه قرار گیرند، پروتئین مخصوصی را می‌سازند که از مهاجرت ماکروفاژها جلوگیری می‌کند. این پروتئین به نام عامل ممانعت از مهاجرت (Factor MIF = Migration Inhibition) معروف است.

MIF در زمره سایتوکالین‌های مترشحه از لمفوسیتها است که با شناسایی انواع مختلف سایتوکالینها به نظر می‌رسد پدیده ممانعت از مهاجرت ماکروفاژها، وابسته به عملکرد شبکه‌ای از اینترلوکینها بوده و عامل منفردی مسئولیت این پدیده را بر عهده ندارد (۱). نکته دیگر آنکه، MIF قبل از تماس با پادگن در لمفوسیتها موجود نیست (۲۳).

### مواد و روش کار

برای انجام این مطالعه ۶۴۰ قطعه جوجه یکروزه نرگوشتی سویه راس ۲۰۸ به چهار گروه ۱۶۰ قطعه‌ای که هر یک شامل چهار تکرار ۴۰ قطعه‌ای بود، استفاده شد. تمام گروه‌ها از نظر وضعیت مدیریت بهداشت و پرورش، جیره غذایی و برنامه واکسیناسیون (برونشیت، نیوکاسل، گامبور) وضعیت یکسانی داشتند.

گروه یک، گروه کنترل منفی بود که هیچگونه چالش با سویه‌های ایمریای مورد مطالعه در آن صورت نگرفت. اما گروه ۲ با دوز پایین (۱۲۵۰۰ اووسیست اسپوریه ایمریایما ۶۲۵۰۰ اووسیست اسپوریه ایمریایا آسرو لینا) و گروه ۳ با دوز متوسط (۲۵۰۰۰ اووسیست اسپوریه ایمریایما ۱۲۵۰۰ اووسیست اسپوریه ایمریایا آسرو لینا) و گروه ۴ با دوز بالا (۵۰۰۰۰ اووسیست اسپوریه ایمریایما ۲۵۰۰۰ اووسیست اسپوریه ایمریایا آسرو لینا) چالش شدند و بر روی بستر پرورش یافتند. برنامه چالش ایمریا و خونگیری به قرار زیر صورت گرفت:

بعد از تکثیر و تنظیم مقدار اووسیست‌های اسپوروله چالش ایمریاها در سن ۱۵ روزگی و برنامه خونگیری در سن ۱۵ و ۲۲ و ۳۶ روزگی انجام گرفت. برای ارزیابی فعالیت سیستم ایمنی سلولی پرنده از آزمایش ممانعت از مهاجرت ماکروفاژها استفاده شد. لازم به ذکر است که ساخت ست MIF بطور ابتکاری بوده و از آنجا که مراحل روش MIF برای مرغ آماده بکار نبود، در راستای انجام طرح لازم بود تا آماده بکار (Set up) شود. در ضمن آزمایش OPG بستر از روز هفتم پس از چالش به مدت ۵ روز پیاپی انجام شد.

**تهیه محیط کشت سلول:** محیط کشت مورد استفاده در این آزمون محیط کشت سلول RPMI (محیط کشت سلولی معمولی) ۱۶۴۰ ساخت شرکت GIBCO بود که مطابق دستورالعمل سازنده تهیه شده و بعد از



اطمینان ۰/۹۵ در صورت معنی دار بودن از روش توکی برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها استفاده گردید.

### نتایج

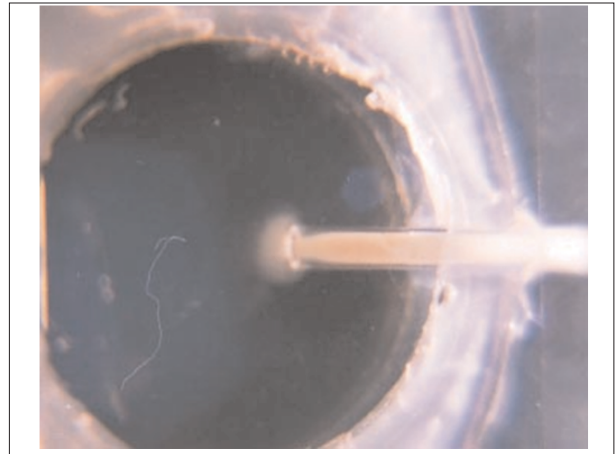
**MIF:** بر اساس اطلاعات بدست آمده در این تحقیق، در سن ۵ روزگی و قبل از چالش ایمریها اختلاف معنی داری بین گروه‌های مختلف چالش شده و چالش نشده از نظر آزمون ممانعت از مهاجرت ماکروفاژها (MIF) مشاهده نشد ( $p < 0/05$ ) (جدول ۱). در سن ۲۲ روزگی و یک هفته پس از چالش ایمری با میزان مهاجرت ماکروفاژها بر اساس فرمول نسبت مهاجرت در گروه‌های چالش شده نسبت به گروه شاهد منفی افزایش چشمگیری داشته و این اختلاف بخصوص بین گروه چالش با دز بالا و گروه شاهد معنی دار بوده است ( $p < 0/05$ ) (جدول ۱).

در سن ۳۶ روزگی (۳ هفته پس از چالش ایمری) نیز بر اساس فرمول، نسبت مهاجرت در گروه‌های عفونی نسبت به گروه شاهد منفی افزایش داشته و این اختلاف بخصوص بین گروه عفونی با دز بالا و گروه شاهد معنی دار بوده است ( $p < 0/05$ ) (جدول ۱). در ضمن میزان دفع اسپست‌ها در گروه شاهد منفی، برابر با صفر بود.

### بحث

اثرات تضعیف ایمنی برخی از بیماری‌های انگلی در پرندگان مورد بررسی قرار گرفته است (۷). از آنجایی که کوکسیدیوز بصورت بالینی و تحت بالینی صنعت طیور کشور را تهدید می‌کند و با توجه به اثراتی که کوکسیدیاز بر ساختار و اعمال روده می‌گذارد این سوال پیش می‌آید که آیا عفونت کوکسیدیایی بر ایمنی پرند نیز اثراتی دارد یا خیر؟ در این تحقیق تأثیرات این عفونت بر دستگاه ایمنی طیور مورد بررسی قرار گرفت. شاید کاهش جذب عوامل تغذیه ای شرکت کننده در مراحل مختلف ایمنی سلولی در پی بیماری کوکسیدیوز (همچنان که در قسمت مقدمه به تفصیل در مورد آنها صحبت شد) بتواند تا حدی توجه کننده تضعیف ایمنی ایجاد شده باشد. با وجود این، برای یافتن چگونگی مکانیسم اثر تضعیف ایمنی توسط ایمریها نیاز به تحقیقات گسترده می‌باشد.

در این مطالعه در میزان مهاجرت ماکروفاژها با استفاده از روش MIF یک هفته و سه هفته بعد از چالش اوو سیست‌ها بین گروه دریافت کننده بالاترین میزان اوو سیست‌ها و گروه شاهد اختلاف معنی داری مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). در برخی از تحقیقات انجام شده اثرات عفونت کوکسیدیایی بر ایمنی طیور مورد بررسی قرار گرفته است. در یک تحقیق اثر عفونت با E.necatrix روی پاسخ جوجه‌ها به واکنس نیوکاسل بررسی شد و در پایان مشخص شد عفونت با این ایمری باعث تضعیف پاسخ ایمنی به واکنسیناسیون با روش HI شده است. (۱۱) در یک تحقیق دیگر اثر عفونت E.necatrix بر پاسخ جوجه‌ها به واکنس نیوکاسل بررسی شد و در پایان مشخص شد بین تیترو متوسط گروه‌های آلوده و تیترو کنترل اختلاف معنی دار وجود



تصویر ۱- در تصویر فوق لوله موئینه که در محفظه MIF قرار داده شده مشاهده می‌گردد. مهاجرت ماکروفاژها به صورت هاله‌ای در انتهای لوله مشخص می‌باشد.

مخزن مهاجرت قرار می‌گرفت.

مخزن مهاجرت به شکل یک گوده‌ای است که در کنار آن شیری به اندازه لوله هماتوکریت تعبیه شده است. لوله هماتوکریت به شکلی در مخزن قرار می‌گیرد که قسمت باز لوله تقریباً در مرکز گوده قرار گرفته و در اطراف آن محیط کشت سلولی با ترکیبی مشابه آنچه قبلاً ذکر گردید ریخته می‌شود. جهت جلوگیری از نشت مایع کشت سلول از مخزن مهاجرت، اطراف مخزن و اطراف لوله موجود در شیار توسط سلیکاژل مسدود می‌گردید، در نهایت سطح مخزن توسط لامل استریل پوشانده شده و مجموعه حاصله به انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد در اتمسفر  $CO_2$  ۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌گردید. در هر مورد شاهد منفی (مخزن فاقد آنتی ژن) در نظر گرفته می‌شد (۲،۴).

**نحوه ارزیابی تست MIF:** میزان مهاجرت هر نمونه در مقایسه با شاهد بر اساس مسافت طی شده از انتهای محفظه مهاجرت بر حسب میلیمتر سنجیده می‌شد. معمولاً چون پراکندگی ماکروفاژهای مهاجرت کرده به شکل کلاهیک قارچ مانند است (تصویر ۱) لذا مسافت طی شده توسط سلول‌ها از انتهای محفظه تا راس کلاهیک قارچ مانند به عنوان میزان مهاجرت سنجیده و در نظر گرفته می‌شود. معمولاً میزان مهاجرت در حضور آنتی ژن کمتر از میزان مهاجرت در عدم حضور آنتی ژن است. بر اساس فرمول زیر خارج قسمت این دو معیار به عنوان میزان ممانعت از مهاجرت در نظر گرفته می‌شود.

$$\text{میزان مهاجرت} = X = \text{تقسیم بر } Y \text{ ضرب در } 100$$

$$X = \text{میزان مهاجرت ماکروفاژها در محفظه حاوی محیط کشت سلول و}$$

آنتی ژن

$$Y = \text{میزان مهاجرت ماکروفاژها در محفظه حاوی محیط کشت سلول و}$$

بدون آنتی ژن

اطلاعات بدست آمده از تست MIF با استفاده از نرم افزار آماری

SPSS10 و با استفاده از روش ANOVA مورد بررسی قرار گرفت سطح



ایمیرهای با قدرت بیماری زایی بالاتر (مانند ایمیریا تنلا و نکاتریکس) می تواند باعث تضعیف شدیدتر ایمنی سلولی گردد که بروز شرایط فوق در فارم دور از انتظار نمی باشد. اما برای مشخص شدن جزئیات بیشتر در مورد چگونگی بروز این تضعیف ایمنی، انجام تحقیقات بیشتر ضروری است.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند که از زحمات فراوان و بی شائبه کارشناسان محترم آزمایشگاه مرکزی و بخش میکرب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، خصوصا سرکار خانم یوسفی، سرکار خانم احمدزاده و جناب آقای غفاری قدر دانی نماید. ضمناً از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی، به جهت تامین هزینه های این طرح تشکر می گردد.

### References

1. Abol, K. A. (2000) Cellular and Molecular Immunology. (4<sup>th</sup>ed.) Saunders company, Philaselfhia, USA. pp. 1447-1454.
2. Agrawal, P., Reynolds, D.L. (1991) Evaluation of the cell-mediated immune response of chickens vaccinated with Newcastle Disease virus as determined by the under-agarose leukocyte- migration- inhibition technique. Avian Dis. 35: 360 - 364.
3. Augustine, P.C., Ruff, M.D. (1983) Changes in carotenoid and vitamin A levels in young turkeys infected with E. meleagrimitis or E.adenoideis. Avian Dis. 27: 963-971.
4. Bavry, R., Bloom. (1971) Invitro methods in cell mediated immunity. Academic Press. New york, USA. pp. 289-312.
5. Bafundo, K. W., BAKER, D. H., Fitzgerald, P.R. (1984) The iron-zink interrelationship in the chick as influenced by E.acervulina infection. J. Nutr. 114:1306-1312.
6. Bhanushali, J.K., Long, P. L. (1985) E.tenella infection: does it affect humoral immune responses to heterologous antigens? J. Parasitol. 71: 850-852.
7. Bhopale, S. T., Deore, M. D. (1998) Immunosuppression in birds experimentally infected with single and mixed parasitic infections. J. Bombay Vet. Coll. 6: 17-19.
8. Calnek, B.W., Barner, J.H., Beard, C.W., Reid, W.M., Yoder, H.W. (1996) Dis. Poult. (10<sup>th</sup>ed.) Iowa, USA. pp. 865-883.

جدول ۱- میزان مهاجرت ماکروفاژها بر اساس نسبت X/Y در سنین مختلف (قبل و پس از چالش) (خطای استاندارد میانگین)، \* غیر معنی دار، \*\* معنی دار، توجه: اعدادی که با حروف انگلیسی غیر مشترک نشان داده شده اند دارای اختلاف آماری معنی دار هستند (در سطح  $p < 0.05$ ) معنی دار است).

X/Y در سنین مختلف	۱۵ روزگی	۲۲ روزگی	۳۶ روزگی	نام گروه
	۲۳±۵/۶	۷۰/۲±۵/۷ <sup>a</sup>	۸۱/۵±۴/۸ <sup>a</sup>	شاهد
	۲۷±۵/۱	۱۰۹/۵±۹/۳ <sup>b</sup>	۱۳۳/۱±۲۲/۱ <sup>b</sup>	دوز بالا
	۲۶±۶/۰	۱۰۲/۶±۱۲/۸ <sup>ab</sup>	۱۰۲/۰±۵/۲ <sup>ab</sup>	دوز متوسط
	۲۱±۳/۳	۷۵/۸±۶/۴ <sup>ab</sup>	۹۱/۴±۷/۴ <sup>ab</sup>	دوز پایین
p.value	*۰/۶	**۰/۰۱	**۰/۰۳	

داشت. جوجه ها در گروهی که به طور همزمان به همراه واکسیناسیون با E.necatrix آلوده شدند یک اثر تضعیف کنندگی از سومین دوره شیزونت روی شکل گیری آنتی بادی داشتند (۱۲). مطالعه دیگری نشان هنده اثر تضعیف ایمنی حاصل از عفونت E.tenella برای ایمنی همورال بوده است (۶). در یک تحقیق انجام شده تیتر آنتی بادی علیه NDV در تمامی گروه های آلوده شده با E.grenieri نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. (۱۵) در ضمن مشخص شد E.necatrix سبب سرکوب معنی دار ایمنی هورال می گردد (۱۱). عفونت با E.necatrix قبل، حین و بعد از واکسن زنده نیوکاسل (در ۷ روزگی) به مدت یک هفته موجب سرکوب ایمنی می شود (۱۲). در یک تحقیق که با عنوان ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی در جوجه های واکسینه شده با واکسن بیماری نیوکاسل انجام شد سه هفته بعد از واکسیناسیون زیر جلدی جوجه ها در سن ۸-۶ هفتگی با واکسن R2B حداکثر میزان ممانعت از مهاجرت لکوسیت و فاکتور واکنش دهنده پوست دیده شد (۲۱).

در پی مواجهه لنفوسیت ها با آنتی ژن اختصاصی موادی تحت عنوان فاکتور ممانعت کننده مهاجرت ماکروفاژها ترشح می شود که در پی تکرار این برخورد میزان و سرعت تولید این ماده بیشتر می شود. در زمانی که ماده ممانعت کننده از مهاجرت ماکروفاژها توسط لنفوسیت ها ترشح نشود، ماکروفاژها به سمت محیط کشت با غذای بیشتر مهاجرت می کنند که این مسئله در دو حالت اتفاق می افتد. اول آنکه اگر آنتی ژن در محیط موجود نباشد تا لنفوسیت های خاطره ای به صورت اختصاصی فاکتور ممانعت از مهاجرت را ترشح کنند. دوم آنکه عمل سرکوب سیستم ایمنی رخ دهد. آزمایش مورد نظر تحت شرایط ذکر شده مسئله سرکوب سیستم ایمنی سلولی را در ۳ هفته پس از چالش ایمیریا در روش MIF نشان می دهد.

اما از آنجا که نتایج این تحقیق حاکی از بروز تضعیف ایمنی سلولی فقط در گروهی بود که با دوز بالای ایمیریا چالش شده بودند، لذا می توان به این نتیجه رسید که شدت عفونت کوکسیدیایی در میزان تضعیف ایمنی حاصله دخیل است. لذا چه بسا که عفونت های با شدت بیشتر موجب تضعیف شدیدتری در ایمنی سلولی گردند. بنابراین احتمالاً ایجاد عفونت با تعداد بیشتر اووسیت، تکرار چالش به دفعات بیشتر و یا استفاده از



9. Cihak, et al. (1994) T cell development in the chicken. *Poultry Sci.* 73: 1012-1018.
10. Elchiev, Y.A. (1980) Biochemical assessment of the therapeutic efficacy of coccidin (dinitalimide) in chicken coccidiosis. *Parazitologiya.* 14: 452-456.
11. Elwanis, N.A., Derhalli, E. L. (1991) Effect of infection with *E.necatrix* on the response of chickens to ND vaccines. I. Using mesogenic komarov K strain of NDV. *Assiut Vet. Med. J.* 26: 124-137.
12. Elwanis, N. A., Derhalli, E. L. (1991) Effect of infection with *E.necatrix* on the response of chickens to ND vaccines. LI. Using lentogenic Hitchner B. (HB1) Strain of NDV. *Assiut Vet. Med. J.* 25: 80-88.
13. Jordan, F.T.W. (1996) *Poultry diseases.* (4<sup>th</sup>ed.) Saunders company. London, England. pp. 411-421.
14. Koinarski, V., Kamburov, P. (1985) Changes in some blood indices in turkey poults with experimental *E.adenoides* infection; *Veterinarn omeditsinski Nouki.* 22: 20-26.
15. Onaby, F., Edris, A., Hegazy, G. O. (1994) Possible immunosuppressive effect of *E.grenier* infected guinea fowl: the effect on vaccination with Newcastle Disease virus K strain. *Ann. Agric. Sci. Moshtohor.* 32: 2205- 2211.
16. Padmavathi, P., Muralidharam, S.R.G. (1986) Studies on the alteration in the serum metabolites during the *E.tenella* infection in chicks. *Indian. Vet. J.* 63: 530 - 536.
17. Seif, Y. M. (2008) *Diseases of poultry.* (12<sup>th</sup>ed.) Blackwell publishin, Iowa. USA. pp. 1068-1085.
18. Singh, C.V., Joshi, H.I. (1976) Biochemical studies in intestinal coccidiosis of poultry. *Pantnagar J. Res.* 1: 63-66.
19. Southern, L. L., Baker, D. H. (1983) *E. acervulina* infection and the zinc- copper interrelation ship in the chick. *Poultry Sci.* 62: 401 - 404.
20. Southern, L. L., Baker, D. H. (1982) Iron status of the chick as affected by *E. acervulina* infection and by variable iron ingestion. *J. Nutr.* 112: 2353- 2362.
21. Sundar, N., Basith, S. A. (2002) Effect of *E. necatrix* infection on Ranikhet Disease vaccination in chicken. *Indian Vet. J.* 7: 619 - 621.
22. Tajbakhsh, H. (1981) *Fundamental immunology.* (1<sup>st</sup>ed.) University of Tehran, Iran. press. pp. 305- 311.
23. Tizard Ian, R. (2000) *Veterinary immunology: an introduction.* (6<sup>th</sup>ed.) Saunders company. Philadelphia, USA. pp. 391-426.



# EFFECT OF EXPERIMENTAL COCCIDIAL INFECTION ON CELLULAR IMMUNITY INDUCED BY NEWCASTLE DISEASE VACCINATION IN BROILERS

Shojadoost, B.<sup>1\*</sup>, Hemmat zade, F.<sup>2</sup>, Gholami seyed klaee, J.<sup>1</sup>, Rahbari, S.<sup>3</sup>, Taheri, M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran .

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran .

<sup>3</sup>Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran .

<sup>4</sup>Reference Laboratories, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

(Received 14 November 2006 , Accepted 6 March 2008)

---

## Abstract:

In order to evaluate the possible immunosuppressive effects of coccidial infection on Cell Mediated Immunity (CMI) of broiler chickens, 640 Ross male day old broiler chicks were randomly divided into 4 equal groups of 160 (each consist of 4 replicates of 40). The negative control group remained unchallenged, while the other three groups challenged with 3 different levels of high, medium and low doses of mixed inoculums of *E.acervulina* and *E.maxima* at 15 days of age. For the assessment of CMI, Macrophage Migration Inhibition (MIF) test was performed. For this purpose blood samples were collected at 15, 22, 36 days of age. No significant difference was observed among MIF of different groups at 15 days of age ( $p > 0.05$ ) . At 22 and 36 days of age a significant difference observed among MIF of high dose and control groups ( $p < 0.05$ ). According to the results, it can be concluded that severe coccidial infection may compromise specific CMI activity in broilers.

**Key words:** coccidiosis, cellular, immunity, broiler.

\*Corresponding author's email: bshojae@ut.ac.ir, Tel: 021-61117150, Fax: 021-66933222

