

## جداسازی، شناسایی و تعیین هویت مولکولی گونه‌های آیمریا در گوساله‌ها

• وحید نصیری (نویسنده مسئول)

آزمایشگاه تک‌یاخته شناسی، بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج، ایران  
• حبیب اله پایکاری

آزمایشگاه تک‌یاخته شناسی، بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج، ایران  
• فرنوش جامعی

آزمایشگاه تک‌یاخته شناسی، بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج، ایران  
• غلامرضا کریمی

آزمایشگاه تک‌یاخته شناسی، بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج، ایران



تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۴-۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۷-۰۶

Email: v.nasiri@rvsri.ac.ir

### چکیده

تشخیص گونه‌های آیمریا براساس خصوصیات مورفولوژی بسیار محدود بوده و استفاده از روش‌های مولکولی این محدودیت‌ها را برطرف می‌سازد. نمونه‌های مدفوع گوساله‌ها از استان البرز و شهر شاهرود جمع‌آوری شده و پس از تغلیظ به روش شیتز به طریق میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌های مثبت با استفاده از روش پی‌سی‌آر و با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی گونه از نظر مولکولی نیز ارزیابی شدند. با استفاده از روش فلوتاسیون شیتز و گسترش مستقیم در ۵ نمونه (۱۰٪) از ۵۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از شهر شاهرود و ۱۰ نمونه (۹/۰۹٪) از ۱۱۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از استان البرز تک‌یاخته جنس آیمریا تشخیص داده شد. در مجموع در میان ۱۶۰ راس دام مورد آزمایش ۱۵ مورد (۹/۳۷٪) با استفاده از گسترش مستقیم و تغلیظ فلوتاسیون مثبت تشخیص داده شدند. از آنجائی‌که تمام موارد مثبت مربوط به نمونه‌های غیر اسهالی بود، ارتباط معنی داری بین وضعیت اسهال و حضور این انگل مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ). از نظر توزیع فصلی تفاوتی در میزان موارد اسهالی و موارد مثبت انگلی مشاهده نشد. با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی گونه‌های آیمریا در گاو و استفاده از روش پی‌سی‌آر بر روی نمونه‌های مثبت حاصل از روش تغلیظ با فلوتاسیون آب شکر تنها ۳ گونه آیمریا زورنئی، آیمریا بوویس و آیمریا اوبورنسیس جداسازی گردید.

کلمات کلیدی: آیمریا، کوکسیدیوزیس، گوساله، مولکولی

- Veterinary Researches & Biological Products No 129 pp: 31-40

#### Isolation, Characterization and molecular identification of Eimeria spp. in young calves

By: Nasiri, V., (Corresponding Author) Protozoology laboratory, Parasitology department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz, Iran . Paykari, H., Protozoology laboratory, Parasitology department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz, Iran . Jameie, F., Protozoology laboratory, Parasitology department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz, Iran . and Karimi, GH., Protozoology laboratory, Parasitology department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz, Iran .

Received: 2019-07-15 Accepted: 2019-09-28

Email: v.nasiri@rvsri.ac.ir

In this study, the ITS-1 region of ribosomal RNA genes of six bovine Eimeria species: E. alabamensis, E. auburnensis, E. bovis, E. cylindrica, E. ellipsoidalis and E. zuernii analysed by PCR and the results of molecular methods analysed to find any relationship between presence of parasites and diarrhetic status. Studies were conducted in calves aged less than 3 months for a period of 2 years. During the study period, 160 dung samples were collected from neonatal calves and examined first microscopically and then by molecular techniques. Stools were analyzed for the presence of Eimeria Spp. oocysts by Sheather's Sugar Flotation Solution method. DNA was extracted and PCR were done to identify six cattle-adapted specie (E.alabamensis, E.auburnensis, E.bovis, E.cylindrica, E.ellipsoidalis and E.zuernii). Eimeria spp. infection was detected in 15 (9.37%) of 160 calves without a history of diarrhea infection and pathogenic Eimeria spp. was asymptomatic in all animals that was not positively related to the diarrhetic status of the calves ( $P>0.05$ ). According to microscopic analysis 6 species (E.alabamensis, E.auburnensis, E.bovis, E.canadensis, E.ellipsoidalis, and E. zuernii) identified and with molecular technique 3 species (E.auburnensis, E.bovis, E. zuernii) were detected. Different risk factors were considered to affect the rate of infection of calves with this protozoan parasite. For controlling disease, Immune status of the calves should be improved by providing sufficient amount of colostrum within the first 24 hours after birth and good hygiene as well as reducing and monitoring stress levels caused by weaning, a change in feed and overcrowding.

**Key words:** Eimeria Spp., diarrhea, calves

خونی ایجاد می‌کنند. عفونت‌هایی که توسط گونه‌های فوق الذکر یا سایرین ایجاد می‌شود ممکن است علائم تحت بالینی تا اسهال غیرخونی موقتی را نشان دهند (۹). تک‌یاخته آیمیریا از میزبان‌های مختلفی گزارش گردیده است. البته آلودگی با این انگل منجر به تلفات کمی در میزبان‌های آلوده می‌شود ولی می‌تواند منجر به بروز خسارات اقتصادی قابل توجهی در صنعت دامپروری گردد. گرچه وقوع کوکسیدیوزیس در دام از کشورهای مختلف گزارش شده است ولی در موارد معدودی به صورت کوکسیدیوزیس بالینی گزارش گردیده‌اند. در ایران نیز با توجه به شرایط آب و هوایی خشک تا نیمه خشک حاکم بر اکثر مناطق کشور به خصوص در مناطق شمال غرب و غرب، آلودگی گاوها با گونه‌های مختلف آیمیریا مطرح است (۱۹).

#### مقدمه

کوکسیدیوزیس گاوی بیماری است که توسط عفونت آیمیریا در گاو ایجاد می‌شود و از نظر اقتصادی مهم‌ترین بیماری گاو در سرتاسر جهان است. گوساله‌های در سنین مابین ۳ هفته تا ۶ ماه عموماً علائم بالینی ابتلا به کوکسیدیوزیس را متعاقب اولین مواجهه خود با انگل نشان می‌دهند، که برآیند وضعیت ایمنی تکامل نیافته آن‌ها می‌باشد (۹). بیش از ۲۰ گونه از انگل آیمیریا گزارش شده است که می‌تواند گونه گاوی (بوس توروس) را آلوده نماید (۱۲)، ولیکن تنها ۱۱ گونه در آلمان و ژاپن جدا شده و ۱۳ گونه در ایالات متحده گزارش شده است. از این گونه‌ها آیمیریا آلابامنیسیس، آیمیریا اوبورنسیسیس، آیمیریا بوویس، آیمیریا الیپسوییدالیس و آیمیریا زورنئی پاتوژن تشخیص داده شده‌اند و البته آیمیریا بوویس و آیمیریا زورنئی بسیار پاتوژن هستند تا جایی که آن‌ها معمولاً مدفوع

و ثبت اطلاعات دموگرافیک و برخی اطلاعات دیگر از جمله سن، جنس و غیره، در ظروف مخصوص از گوساله‌ها نمونه مدفوع گرفته شد. نمونه‌گیری به روش توشه رکتال انجام گردید. در مواردی که توشه رکتال امکان‌پذیر نبود از بستر حیوان تازه‌ترین نمونه مدفوع جمع‌آوری گردید. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه تک‌یاخته شناسی بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی موسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی کرج، ابتدا وضعیت فیزیکی و قوام مدفوع را بررسی کرده و آن را در برکه مخصوص ثبت نموده و برای جستجوی اووسیست‌ها در نمونه‌ها از روش تغلیظ شناورسازی شیتر استفاده گردید. ابتدا محلول قندی با چگالی ۱/۱۵ تا ۱/۳۰ (ترجیحاً ۱/۲۰) تهیه و سپس ۱ تا ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مدفوع در سرم فیزیولوژی که جهت گرفتن موکوس و ذرات درشت آشغال از دو لایه گاز تنزیب عبور داده شده است در یک لوله سانتیفوژ ریخته شده و سپس تا سه چهارم لوله از محلول قندی پر شده و به شدت به هم زده و ۳ دقیقه با دور ۵۰۰ g سانتیفوژ گردید (۶). با استفاده از یک پیپت پاستور اووسیست‌ها را از سطح محلول شیتر در لوله‌ای جمع‌آوری نموده و با سرم فیزیولوژی دو تا سه بار رسوب حاصل را شستشو داده و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی‌های ۱۰، ۴۰ و ۱۰۰ عدسی شیئی مشاهده گردید و پس از تغلیظ اووسیست‌ها و تایید حضور انگل، نمونه‌های مثبت جهت مراحل مولکولی و استخراج DNA در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

#### بررسی مولکولی

#### استخراج DNA با روش فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل

DNA انگل به روش بوم و همکارانش استخراج شد (۳). بدین صورت که ۲۵۰ میکرولیتر از اووسیست تغلیظ شده و شسته شده با سرم فیزیولوژی را در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته، سپس با ۱۰۰۰۰ g به مدت

علائم کلینیکی کوکسیدیوزیس تقریباً در تمامی موارد به واسطه رشد انگل در قسمت انتهایی ایلئوم، سکوم و کولون ایجاد می‌شود. یکی از علائم برجسته کوکسیدیوزیس صرف نظر از نوع آیمریا، بی‌اشتهایی می‌باشد. نشان داده شده است که به هنگام کوکسیدیوزیس حاصل از آیمریا بوویس از روز ۲۰ تا ۲۴ پس از ابتلا، اشتها به میزان ۶۰ درصد کاهش می‌یابد که تا روز ۲۸ ادامه دارد. بیماری‌هایی که با کاهش اشتها همراه می‌باشند حیوان را در وضعیت کاتابولیک قرار داده که حاصل آن نقل و انتقال پروتئین‌ها و چربی‌هاست. با استفاده از داروهای آنابولیک می‌توان از این حالت جلوگیری به عمل آورد (۱۵). مطالب فوق اهمیت تعیین گونه‌ها در مناطق مختلف پرورش دام را نشان داده و اهمیت تحقیق را توجیه می‌نماید.

در حال حاضر مشاهده مورفولوژیکی اووسیست‌ها تنها روش عملی برای تشخیص گونه‌های کوکسیدیای گاو است و هرچند، روش مورفولوژیکی کاملاً قابل اعتماد نیست زیرا چندین گونه دارای ویژگی‌های گیج‌کننده در کنار تنوع داخل گونه‌ای هستند. علاوه بر این، مشاهدات مورفولوژیکی همراه با آزمایش مدفوع بسیار دشوار است و نیاز به تکنیک‌های ماهرانه‌ای دارد (۵) که به همین منظور تحقیق حاضر برای اولین بار در ایران و با استفاده از روش نستد پی‌سی‌آر بر روی نمونه‌های مدفوع حاصل از گوساله‌های دامداری‌های استان البرز و شهر شاهرود انجام پذیرفت.

#### مواد و روش کار

#### جمع‌آوری نمونه‌های مورد مطالعه

نمونه‌برداری از اواخر اسفند ماه ۱۳۹۴ شروع و تا مهر ماه ۱۳۹۶ صورت گرفت. کلیه نمونه‌ها از دامداری‌های صنعتی و از گاوهای اصلاح نژاد شده استان البرز و شهر کرج و همین‌طور شهر شاهرود تهیه شد. بعد از هماهنگی با مسئولین مربوطه، پس از اخذ رضایت‌نامه آگاهانه از دامدارها

جدول ۱- برنامه مراحل PCR مورد استفاده جهت تکثیر ناحیه ITS-۱ جنس آیمریا (۳۴۸-۵۴۶ bp)، (۱۰).

مرحله سیکل	واسرشت	اتصال	پلیمریزاسیون یا طولی شدن	تعداد سیکل‌ها
سیکل اول	۹۴ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه	---	---	۱
سیکل اصلی	۹۴ درجه سانتیگراد ۱۰ ثانیه	۵۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه	۳۵
سیکل نهایی	---	---	۷۲ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه	۱

میکرولیتر اتانول سرد به آن اضافه شد. اتانول باعث آب‌گیری نمونه و رسوب DNA می‌گردد. لوله حاوی DNA به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته، سپس با اتانول ۷۰ درصد به مدت چند ثانیه با سرعت بالا سانتریفوژ شد تا رسوب شستشو داده شود. اتانول بطور کامل خالی شده و درب لوله ۱۰-۵ دقیقه باز گذاشته شد تا اتانول تبخیر گردد. سپس رسوب خشک شده در ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به خوبی حل گردید و محلول حاصل تا هنگام استفاده جهت PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

#### استفاده از روش PCR جهت تعیین هویت مولکولی انگل

جهت جداسازی و تایید انگل‌های جنس آیمیریا و گونه‌های آن انجام واکنش‌های PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام پذیرفت (۱۰). به جهت طراحی پرایمرهای عمومی در حد جنس انگل آیمیریا و با هدف تکثیر بخش‌هایی از DNA که حاوی تمام ناحیه ITS-۱ از گونه‌های مختلف آیمیریا باشد، توالی‌های پایدار از انتهای ۳' ژن‌های rRNA ۱۸S و

۵ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع‌رویی دور ریخته شد. ۲۵۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده به لوله اضافه شده و کاملاً مخلوط شد. سپس با ۱۴۰۰۰g به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ و مایع‌رویی دور ریخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده اضافه و کاملاً با رسوب مخلوط شد. سپس سوسپانسیون ۱۰ مرتبه در نیتروژن مایع منجمد و در بن ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد (جهت سست شدن دیواره سلول) ذوب گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K از محلول ذخیره (۱mg/ml) به لوله اضافه شده و کاملاً مخلوط و به مدت یک شب در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد (جهت هضم پروتئین‌ها و اتصالات بین سلولی) انکوبه شد. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر محلول فنل-کلروفرم-ایزوامیل‌الکل (۲۵:۲۴:۱) به لوله اضافه کرده و لوله به آرامی یک دقیقه سر و ته شد. سپس به مدت یک دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شده، آنگاه مایع‌رویی برداشته و به لوله تمیز انتقال داده شد. هم حجم فاز شفاف جدا شده روی لوله محلول کلروفرم-ایزوامیل‌الکل (۲۴:۱) اضافه و لوله به آرامی سر و ته شده، سپس در ۱۰۰۰۰g به مدت یک دقیقه سانتریفوژ (جهت حذف مولکول‌های فنل) گردید. مایع‌رویی به لوله تمیزی انتقال داده شده و سپس ۵۰ میکرولیتر سدیم استات ۳ مولار به همراه ۱۰۰۰

جدول ۲- توالی پرایمرهای اینترنال اختصاصی گونه جهت جداسازی گونه‌های آیمیریا، (۱۰).

توالی پرایمر اینترنال	قطعه تکثیر شده (bp)
CAATTCACACATTGTTCTTTCAG GCTTCCAAACTAATGTTCTCG	۱۸۴
TAAATTGGTGCGATGAGGGA GCAATGAGAGAAAGATTTAATA	۲۹۵
TCATAAAACATCACCTCCAA ATAATTGCGATAAGGGAGACA	۲۳۸
GACATTTAAAAAACCGATTGGT GGCTGCAATAAGATAGACATA	۳۰۴
CAACGTTTTTCTTTTCTATCA ACTGCGATGAGAGAGACCG	۱۴۸
AACATGTTTCTACCCACTAC CGATAAGGAGGAGACAAC	۳۴۲-۴

استفاده از روش گسترش مستقیم و تغلیظ به روش فلوتاسیون شیت در ۵ نمونه (۱۰٪) از ۵۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از شاهرود تک‌یاخته جنس آیمیریا تشخیص داده شد. از ۵۰ نمونه جمع‌آوری شده در این منطقه ۱۵ نمونه اسهالی بودند که البته تمام موارد مثبت مربوط به نمونه‌های غیر اسهالی بود و لذا ارتباط معنی‌داری بین وضعیت اسهال و حضور این انگل مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ). از ۱۱۰ راس دام مورد بررسی در استان البرز، ۹۰ راس آن مربوط به گوساله‌های زیر یک ماه بود و ۷۰ راس از آنها دچار اسهال بودند. کلیه موارد اسهالی مربوط به گوساله‌های زیر یک ماه بود. از میان ۱۱۰ راس دام مورد بررسی در استان البرز ۱۰ مورد (۹/۰۹٪) آن‌ها از نظر میکروسکوپی مثبت تشخیص داده شدند. در مجموع در میان ۱۶۰ راس دام مورد آزمایش ۱۵ مورد (۹/۳۷٪) با استفاده از گسترش مستقیم و تغلیظ فلوتاسیون مثبت تشخیص داده شدند (جدول ۵). از آنجائی‌که تمام موارد مثبت مربوط به نمونه‌های غیراسهالی بود، در نمونه‌های جمع‌آوری شده در این تحقیق ارتباط معنی‌داری بین وضعیت اسهال و حضور این انگل مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ). از نظر توزیع فصلی تفاوتی در میزان موارد اسهالی و موارد مثبت انگلی مشاهده نشد.

#### یافته‌های بررسی مولکولی

نمونه‌هایی که به واسطه روش تغلیظ با فلوتاسیون آب شکر مثبت تشخیص داده شده بودند با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی گونه‌های آیمیریا در گاو و با استفاده از روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. مراحل استخراج DNA به خوبی انجام پذیرفت و استفاده از روش انجماد-ذوب با به کارگیری ازت مایع و بن ماری ۶۰ درجه به تعداد ده سیکل جهت شکستن دیواره اوووسیست‌ها و استخراج DNA انگل کفایت نمود. جهت PCR به منظور تفکیک گونه‌ها از جفت پرایمرهای اختصاصی استفاده شد (۱۰) که جهت جداسازی انگل آیمیریا در حد جنس (شکل ۱)

انتهای ۵ ژن‌های rRNA ۵S، مربوط به گونه‌های:

*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* and *Toxoplasma gondii* (the GenBank with Accession Numbers: AY779492, AY779386, (AF026388 and X75429

مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب توالی زیر جهت پرایمرهای عمومی در حد جنس انگل آیمیریا مورد استفاده قرار گرفت:

‘Forward: 5’-GCA AAA GTC GTA ACA CGG TTT CCG-3

‘Reverse: 5’-CTG CAA TTC ACA ATG CGT ATC GC-3

دمای سیکل‌های PCR در جدول ۱ ذکر شده است.

جهت الکتروفورز محصول PCR، از ژل ۱/۵٪ به همراه سایبرسیف (جهت رنگ کردن DNA) استفاده شد. ناحیه ITS-۱ در گونه‌های مختلف آیمیریا اندازه متفاوتی داشته (۱۰) و لذا برای بررسی هر گونه در یک واکنش جداگانه PCR از جفت پرایمرهای اینترنال اختصاصی گونه مطابق جدول ۲ جهت جداسازی گونه‌های آیمیریا آلابامنسیس، آیمیریا اوبورنسیس، آیمیریا بوویس، آیمیریا سیلندریکال، آیمیریا الپسوتیدالیس و آیمیریا زورنئی استفاده گردید.

دمای سیکل‌های PCR در جدول ۳ ذکر شده است.

#### آنالیز آماری

جهت ارزیابی فاکتورهای مختلف اپیدمیولوژیکی از آزمون Chi-square با فاصله اطمینان ۰/۹۵ و با به کارگیری نرم‌افزار SPSS ۱۶ استفاده شد.

#### نتایج

۱۱۰ نمونه مدفوع از دامداری‌های موجود در استان البرز و ۵۰ نمونه مدفوع نیز از دامداری‌های شهر شاهرود جمع‌آوری گردید. از ۱۶۰ راس حیوان مورد آزمایش ۹۰ راس ماده و ۷۰ راس نر بودند (جدول ۴). با

جدول ۳- برنامه مراحل PCR مورد استفاده جهت تکثیر ناحیه اختصاصی گونه‌های آیمیریا، (۱۰).

مرحله سیکل	واسرشت	اتصال	پلیمریزاسیون یا طویل شدن	تعداد سیکل‌ها
سیکل اول	۹۴ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه	----	----	۱
سیکل اصلی	۹۴ درجه سانتیگراد ۱۰ ثانیه	۵۵ درجه سانتیگراد ۲۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتیگراد ۲۰ ثانیه	۲۵
سیکل نهایی	----	----	۷۲ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه	۱

قابل شناسایی می‌باشند یا خیر و اینکه روش‌های ریخت‌شناسی تا چه حدی می‌تواند در تشخیص گونه‌ها به ما کمک نمایند (۱۵). ابتلا به ۳ تا ۵ گونه کوکسیدیای بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا در بالغان امری طبیعی است و متعاقب ابتلاهای اولیه ایمنی حاصل می‌گردد با این حال ایمنی در بالغان قاطع نبوده ولی از شدت علائم کلینیکی به طور چشم‌گیری می‌کاهد و لیکن گوساله‌ها عموماً به کوکسیدیا حساس می‌باشند. یک گونه از آیمیریا به تنهایی و یا به همراه با سایر گونه‌های بیماری‌زا ممکن است ایجاد بیماری نماید ولی ندرتاً همان گونه دوباره در حیوان سالم ایجاد بیماری می‌کند. در شکل مدیریتی که از همان ابتدا گوساله‌ها از مادر جدا می‌گردند، به نظر نمی‌رسد بالغان در انتقال کوکسیدیا به گوساله‌ها تأثیری داشته باشند. شروع دفع اووسیت‌های مختلف آیمیریا در گوساله‌ها از سن ۳ هفته‌گی می‌باشد. با توجه به اینکه دوره اختفای آیمیریا حدود ۲ هفته می‌باشد بنابراین به نظر می‌رسد که ابتلای گوساله‌ها بلافاصله بعد از تولد صورت می‌گیرد. مهم‌ترین منبع آلودگی مدفوع حیوانات بیمار و آن‌هایی که ناقل هستند می‌باشد. گوساله‌ها با خوردن آب آلوده و یا لیسیدن یکدیگر مبتلا می‌شوند (۴، ۱۱، ۱۵، ۱۸). در حال حاضر مشاهده مورفولوژیکی اووسیت‌ها تنها روش عملی برای تشخیص گونه‌های کوکسیدیای گاوی بوده، ولیکن این روش‌های مورفولوژیکی کاملاً قابل اعتماد نبوده و چندین گونه دارای ویژگی‌های

و جداسازی گونه‌های آیمیریا (شکل ۲) استفاده گردید. در بررسی مولکولی تنها ۳ گونه آیمیریا زورنئی، آیمیریا اوبورنسیس و آیمیریا بوویس مشاهده شد (شکل ۲) که فراوانی گونه‌های جداسازی شده در جدول ۶ ذکر شده است.

### بحث و نتیجه‌گیری

کوکسیدیوزیس یکی از بیماری‌های انگلی دام با گسترش جهانی است که جزء پنج بیماری با اهمیت اقتصادی در صنعت پرورش گاو محسوب می‌شود. کوکسیدیوزیس گاو توسط گونه‌های مختلف تک‌یاخته کوکسیدیایی آیمیریا در شاخه آپی کمپلکسا ایجاد می‌شود. این تک‌یاخته چرخه زندگی مستقیم داشته و آلودگی با آن به دلیل تولید و دفع اووسیت‌های مقاوم اتفاق می‌افتد (۱۹). بیماری از حیوانی به حیوان دیگر از طریق تماس با مدفوع و بلع اووسیت رخ می‌دهد. اسهال که ممکن است در موارد شدید خونی باشد اولین علامت کوکسیدیوزیس است. بیشتر حیواناتی که با کوکسیدیوزیس آلوده می‌شوند بدون علامت هستند اما در حیوانات جوان یا دچار سرکوب ایمنی ممکن است منجر به بروز علائم شدید و مرگ شود. با توجه به اهمیت بیماری و زیان‌های اقتصادی حاصل از آن این پرسش مطرح می‌گردد که چه گونه‌هایی در بیماری‌زایی نقش موثرتری دارند و آیا این گونه‌ها با روش‌های مولکولی

جدول ۴- مشخصات اپیدمیولوژیک تحقیق براساس فاکتورهای جنس، سن دام و فصل نمونه‌گیری.

منطقه نمونه‌گیری	تعداد نمونه	جنسیت دام		فصل نمونه‌گیری			
		نر	ماده	بهار	تابستان	پاییز	زمستان
البرز	۱۱۰	۵۰	۶۰	۳۰	۲۵	۲۵	۳۰
شاهرود	۵۰	۲۰	۳۰	۱۰	۱۵	۱۰	۱۵
مجموع	۱۶۰	۷۰	۹۰	۴۰	۴۰	۳۵	۴۵

جدول ۵- مشخصات نمونه‌های مورد بررسی از نظر قوام و نتایج موارد مثبت.

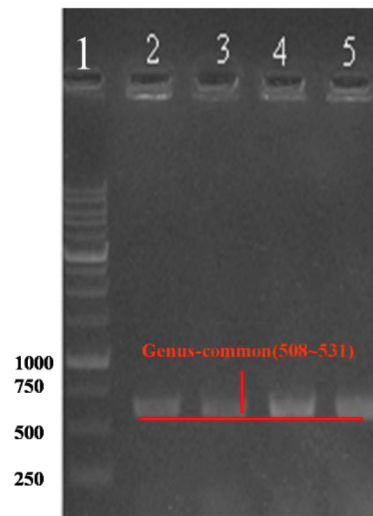
منطقه نمونه‌گیری	تعداد نمونه	قوام مدفوع		موارد مثبت در گسترش مستقیم		درصد موارد مثبت در گسترش مستقیم
		اسهالی	غیر اسهالی	موارد اسهالی مثبت	موارد غیر اسهالی مثبت	
البرز	۱۱۰	۷۰	۴۰	۰	۱۰	۹/۰۹٪
شاهرود	۵۰	۱۵	۳۵	۰	۵	۱۰٪
مجموع	۱۶۰	۸۵	۷۵	۰	۱۵	۹/۳۷٪

واحد رونویسی قرار دارد. به علت ناهمگونی در ترکیبات و طول هر دو توالی در میان گونه‌های مختلف، ناحیه ITS-1 یک هدف نویدبخش برای طراحی پرایمرهای اختصاصی است.

مطالعات بسیاری در سایر کشورها در زمینه‌های مختلف اپیدمیولوژی بیماری صورت پذیرفته ولیکن در ایران مطالعات تنها محدود به بررسی و تعیین گونه‌های عامل بیماری با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیکی بوده است. در تحقیقی شجاعی و همکاران در زمینه بررسی میزان شیوع کوکسیدیوزیس در تعدادی از گاوداری‌های صنعتی استان البرز نشان دادند که آلودگی آیمریایی در گاوها مشاهده نشد که مطابق با استنباط آن‌ها با توجه به رابطه سن و میزان آلودگی آیمریایی که به علل مختلف از جمله سطح ایمنی دارای یک رابطه معکوس می‌باشد و همچنین بالا بودن سطح کیفی مدیریت بهداشتی این دامداری‌ها قابل توضیح است (۱۶). میزان آلودگی در گوساله‌ها نیز در سطح پایینی بود که در این مورد با توجه به بررسی‌های انجام شده میدانی، مدیریت بهداشتی و پرورشی در گاوداری‌های مورد بررسی در سطح خوبی قرار داشت و علت پایین بودن میزان آلودگی در این گاوداری‌ها را می‌توان بیشتر به این موضوع نسبت داد (۱۶). آلودگی کلی ۲٪ در دامداری‌های مورد بررسی در این مطالعه با توجه به نتایج بررسی‌های رضوی و قدرتی با درصد آلودگی ۴/۶۱٪ که در اطراف شیراز انجام گرفته است تقریباً نزدیک بود ولی میزان آلودگی نسبت به مطالعات انجام شده در سایر کشورها کمتر بود (۱۶). در سال ۱۹۷۲ در بررسی شیوع کوکسیدیوزیس در نیوزلند نشان داده شد که ۵۳٪ از نمونه‌های مورد آزمایش برای کوکسیدیوزیس مثبت بودند و بیش از ۱۰ گونه آیمریایی شناسایی شد که بیشترین آن‌ها آیمریا زورنتی و آیمریا بوویس بوده‌اند (۱۴). در سال ۱۹۸۴ در بررسی‌هایی که توسط کاسیما و همکاران در عربستان بر روی ۲۰۵ نمونه مدفوع گاو اهلی جهت وجود انگل آیمریا انجام گرفت مشخص شد که ۳۴/۱٪ از کل نمونه‌ها دارای اووسیست کوکسیدیایی بودند. آلودگی‌های مخلوط نیز در ۱۵/۷٪ از نمونه‌ها وجود داشت که آیمریا زورنتی و آیمریا بوویس در بیشتر نمونه‌ها موجود بودند. گونه‌های یافت شده در مطالعه وی و همکاران شامل آیمریا ویومینجنسیس، آیمریا زورنتی، آیمریا سیلیندریکا، آیمریا الپسوتیدالیس، آیمریا بوویس و آیمریا اوبورنسیس بودند (۸). علی و همکاران در سال ۱۹۸۹ گزارش دادند که شیوع کوکسیدیوزیس

گیج‌کننده در کنار تنوع داخل گونه‌ای هستند. بنابراین، لازم است که یک روش سریع، قابل اعتماد و با هزینه‌ای مناسب را جهت تشخیص گونه‌های این انگل استفاده کنیم و از این رو، توسعه تکنیک‌های حساس و قابل اعتماد برای شناسایی صحیح گونه‌ها ضروری است.

آگاهی از وضعیت آپی کمپلکسا در سطح ژنوم به طور مداوم عمیق‌تر شده، و چندین روش PCR برای شناسایی مولکولی گونه‌های این شاخه ارائه شده است ولیکن تا به امروز، آنالیز فیلوژنتیک در گونه‌های آیمریاهای موجود در گاو بسیار انگشت شمار بوده است (۹). مشخص شده است که تفاوت‌های بین گونه‌ای در توالی ژن ۱۸ S rRNA ریبوزومی (rRNA) کوکسیدیای گاو کم است (۱۳)، و لذا برای شناسایی گونه بر اساس روش PCR کارایی ندارند. یکی از اهداف مورد توجه در سطح ژنومی، ناحیه ITS-1 است که بین دو ژن rRNA قرار دارد. این ناحیه بین انتهای ۳ ژن ۱۸ S rRNA و انتهای ۵ ژن ۵.۸ S rRNA در هر



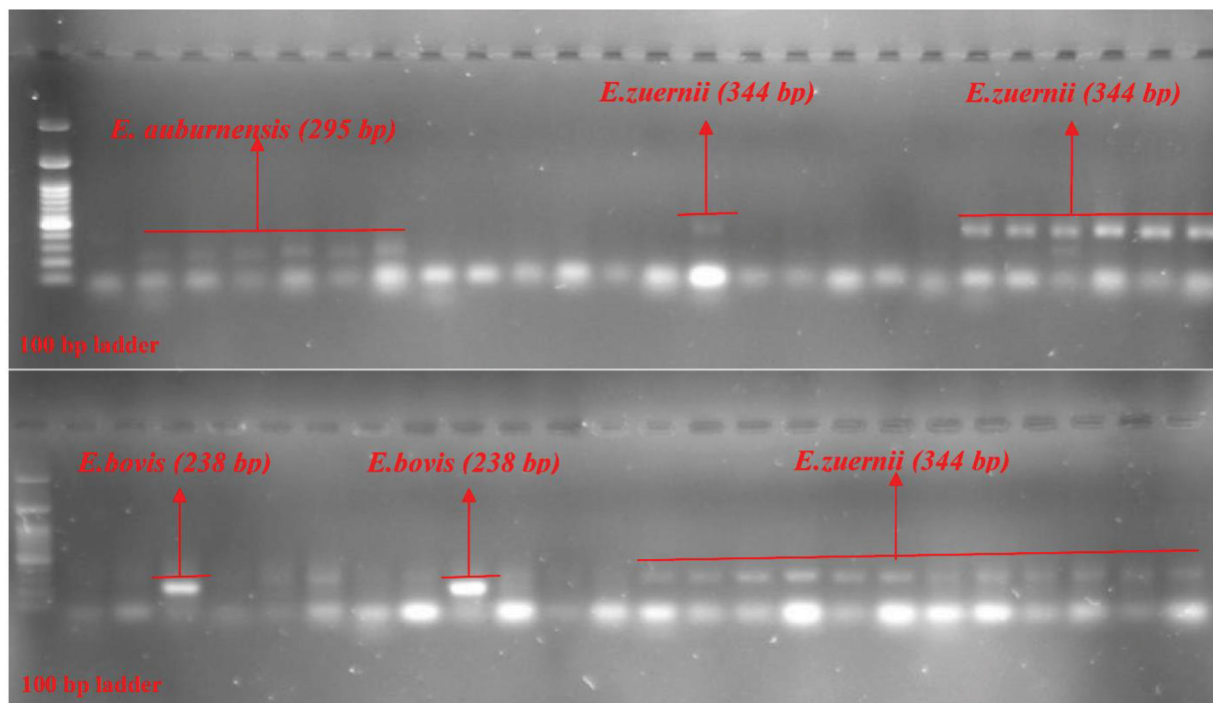
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های مورد آزمایش با پرایمرهای اختصاصی جنس که نشان دهنده حضور آیمریاهای موجود در گاو می‌باشد. ستون سمت چپ لدر ۱kb می‌باشد.

جدول ۶- میزان فراوانی گونه‌های جداسازی شده در نمونه‌های مورد بررسی به روش مولکولی.

منطقه نمونه گیری	تعداد نمونه	تعداد کل موارد مثبت	آیمریا بوویس	آیمریا زورنتی	آیمریا اوبورنسیس
البرز	۱۱۰	۱۰ (۹/۰۹٪)	۶ (۵/۴۵٪)	۱ (۰/۹٪)	۴ (۳/۶۳٪)
شاهرود	۵۰	۵ (۱۰٪)	۲ (۴٪)	۰ (۰٪)	۳ (۶٪)
مجموع	۱۶۰	۱۵ (۹/۳۷٪)	۸ (۵٪)	۱ (۰/۶٪)	۷ (۴/۳٪)

الیپسوئیداليس (۷٪) داشتند (۱۹). در ایران، آلودگی گاو به گونه‌های آیمیریا در دامداری‌های اطراف شهرستان تبریز ۴۶/۲٪ گزارش گردید که گونه غالب آیمیریا در این تحقیق آیمیریا وایومینجنسیس (۲۵٪) بود (۲۱) در صورتی که میزان شیوع آلودگی در گاوداری‌های اطراف شهرستان سنندج ۲۱/۳٪ بود که در این مطالعه آیمیریا وایومینجنسیس (۳۰٪) گونه غالب از میان هشت گونه آیمیریای شناسایی شده در گاوهای بدون علائم کوکسیدیوزیس بالینی در گاوداری‌های شهرستان سنندج بود. در این مطالعه علیرغم آلودگی گاوها به آیمیریا زورنثی اسهال در گاوهای تحت مطالعه گزارش نگردید (۲۰). در مطالعه‌ای در استان همدان و در میان ۴۰۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از گاوداری‌های استان میزان آلودگی نهایی گاوها ۸/۲۵٪ نشان داده شد. در این بررسی در میان موارد مثبت دو گونه پاتوژن آیمیریا بوویس (۲۳/۷٪) و آیمیریا زورنثی (۱۹/۲٪) و هفت گونه غیر پاتوژن آیمیریا کانادنسیس (۱۲/۶٪)، آیمیریا الیپسوئیداليس (۱۱/۴٪)، آیمیریا آلابامنسیس (۱۰/۴٪)، آیمیریا پلپتا (۹/۱٪)، آیمیریا اوبورنسیس (۶/۸٪)، آیمیریا سیلیندریکا (۴/۶٪) و آیمیریا بوکیدونسیس (۲/۳٪) مشاهده گردید (۷). بنابراین ملاحظه می‌کنیم که میزان آلودگی آیمیریایی در گاوداری‌های سایر نقاط جهان بویژه در کشورهای حاصلخیز که دارای

در دامداری‌های اطراف بغداد ۳۱/۵٪ و بیشترین میزان آلودگی در گوساله‌های زیر یک سال با میزان ۴۶/۱٪ بوده است (۱). سونسون و همکاران در سال ۱۹۹۷ گزارش دادند دلیل اصلی اسهال فصلی زودرس در اولین چرای فصل گاوها در کشور سوئد، کوکسیدیوزیس ناشی از آیمیریا آلابامنسیس می‌باشد (۱۷). در نمونه‌گیری‌هایی که ارسال و همکاران در سال ۱۹۹۸ در بخش‌های اروپایی ترکیه انجام دادند ۳۶٪ از کل نمونه‌ها از نظر آیمیریا بوویس و ۲۶٪ از نظر آیمیریا زورنثی مثبت بودند (۲). در ایران نیز با توجه به شرایط آب و هوایی خشک تا نیمه خشک حاکم بر اکثر مناطق کشور به خصوص در مناطق شمال غرب و غرب، آلودگی گاوها با گونه‌های مختلف آیمیریا مطرح است. مطالعات یخچالی و همکاران در خصوص شیوع آلودگی‌های آیمیریایی در مناطق غرب و شمال غرب ایران نیز بیانگر این واقعیت است (۱۹). در مطالعه‌ای که در مورد آلودگی آیمیریایی گاوهای شیری در دامداری‌های صنعتی اطراف کنگاور در استان کرمانشاه انجام پذیرفت نشان داده شد که با توجه به ریخت شناسی و مورفومتیک انگل جنس آیمیریا، در مجموع ۷ گونه شناسایی شده است، به طوری که در کل دوره مطالعه بیشترین و کمترین فراوانی را به ترتیب گونه‌های آیمیریا زورنثی (۲۸/۲۵٪) و آیمیریا



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR نمونه های مورد آزمایش با پرایمرهای اختصاصی گونه که نشان دهنده حضور سه گونه آیمیریا زورنثی، آیمیریا بوویس، و آیمیریا اوبورنسیسی باشد. ستون سمت چپ لدر ۱۰۰ bp می باشد.



2015. Diversity of eimeria spp. In dairy cattle of guwahati, assam, india. *Veterinary World*, 8(8), 941–945. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.941-945>

5. Eckert J., Taylor M., Catchpole J., Licois D., Coudert P., Bucklar H. 1995: Morphological characteristics of oocysts. In: J. Eckert, R. Braun, M.W. Shirley and P. Coudert (Eds.), *Guidelines on techniques in coccidiosis research*. European Commission, Directorate-General XII, Science, Research and Development Environment Research Programme, pp. 103–119.

6. Fayer, R., & Xiao, L. 2007. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC press.

7. Heidari, H., Sadeghi-Dehkordi, Z., Moayedi, R., & Gharekhani, J. (2014). Occurrence and diversity of Eimeria species in cattle in Hamedan province, Iran. *Veterinari Medicina*, 59(6), 271–275.

8. Kasim, A. A., & Al-Shawa, Y. R. 1985. Prevalence of Eimeria in faeces of cattle in Saudi Arabia. *Veterinary Parasitology*, 17(2), 95–99.

9. Kawahara, F. 2009. Parasitological analyses of Eimeria infections in domestic animals and the development of molecular methods for species discrimination. Hokkaido University.

10. Kawahara, F., Zhang, G., Mingala, C. N., Tamura, Y., Koiwa, M., Onuma, M., & Nunoya, T. 2010. Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine Eimeria parasites. *Veterinary Parasitology*, 174(1–2), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.001>

11. Lassen, B. 2009. Diagnosis, Epidemiology and Control of Bovine Coccidiosis in Estonia. <https://doi.org/ISBN: 978-9949-426-73-7>

12. Levine, N. D., & Ivens, V. 1967. The sporulated oocysts of Eimeria illinoisensis n. sp. and of other species of Eimeria of the ox. *The Journal of Protozoology*, 14(2), 351.

13. Li, G., Xiao, S., Zhou, R., Li, W., & Wade, H. 2007. Molecular characterization of Cyclospora-like organism from dairy cattle. *Parasitology Research*, 100(5), 955.

14. McKenna, P. B. 1972. The identity and prevalence of coccidia species in sheep and cattle in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 20(12), 225–228.

15. Shirley, M. W., & Coudert, P. 1995. Guidelines on techniques in coccidiosis research. Eimeria and Isospora.

16. Shojaei, S.Sh.R., Shaghayegh, A., Ahmadi, A. 2011. A Study on the prevalence of Bovine Coccidiosis in some Dairy Farms at Alborz Province (Iran). *J. Vet. Clin. Res*, 2(1), 25–31.

17. Svensson, C., Ugglå, A., & Pehrson, B. 1994. Eimeria alabamensis infection as a cause of diarrhoea in calves at pasture. *Veterinary Parasitology*, 53(1–2), 33–43.

آب و هوای مرطوب هستند بسیار بیشتر از چند مورد بررسی شده در ایران می‌باشد. البته برای قضاوت دقیق‌تر در مورد میزان کوکسیدیوزیس در گاوداری‌های ایران و مقایسه آن با سایر کشورها لازم است مطالعات بیشتری در سایر نقاط ایران انجام شود.

با توجه به اهمیت آلودگی آیمیریایی در گاوداری‌های صنعتی پیشگیری از کوکسیدیوزیس گاوهای جوان واجد اهمیت است و پیشگیری از کوکسیدیوزیس تحت بالینی گاوها می‌تواند با کاهش تراکم دام در واحد سطح، بلند نمودن ارتفاع آخور و آبشخور، افزودن داروهای ضدکوکسیدیایی نظیر لازالوسید و مونسنین به جیره غذایی دام، زه کشی و خشک نگه داشتن بستر و محل زایش گاوها تا حدودی میسر باشد. به علاوه توصیه به مطالعات تکمیلی برای داشتن برآوردی صحیح از خسارات اقتصادی حاصل از عفونت‌های آیمیریایی گاو و نیز توزیع فصلی و تنوع گونه‌ای آیمیریا در گاوهای بومی و نشخوارکنندگان وحشی به عنوان میزبان‌های مخزن برای دام‌های اهلی در منطقه انجام پذیرد. در رابطه با دام‌های آبستن توصیه می‌گردد مراقبت بیشتری از آن‌ها در ماه‌های آخر آبستنی انجام گرفته و ضدعفونی نمودن محل زایمان دام‌ها و جدا بودن محل زایمان و مراقبت از آن‌ها تا چند هفته پس از زایمان توصیه می‌گردد. نوزادان و دام‌های بزرگی که دچار اسهال هستند از سایر دام‌ها جدا شده و نوزادان تازه متولد شده از خوردن آغوز مادر محروم نگردند. با توجه به تحقیق حاضر مشاهده گردید که ارتباطی مابین وقوع اسهال در گوساله‌ها و حضور انگل وجود ندارد و از طرفی گونه‌هایی که به عنوان گونه‌های بیماری‌زا محسوب می‌گردیدند در دام‌های بدون علائم بالینی مشاهده گردیدند. در این تحقیق برای اولین بار در ایران بررسی مولکولی گونه‌های آیمیریایی گاوها انجام پذیرفت که می‌تواند آغازی در مسیر تعیین دقیق نقش این انگل در ایجاد اختلال در سلامت دام‌ها باشد.

#### تشکر و قدردانی

از ریاست و معاونت محترم پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج که تسهیلات لازم را برای اجرای این پروژه فراهم نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم. کلیه هزینه‌های این تحقیق در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ثبت ۹۴۰۰۳-۹۴۵۹-۱۸-۱۸-۱۲ تا مین مالی و علاوه بر آن فضا و تجهیزات آزمایشگاهی نیز توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی فراهم گردیده است.

#### منابع مورد استفاده

1. Ali, S. R., & Latif, B. M. A. 1989. Bovine coccidiosis in Baghdad area-Iraq. *Magallat Buhut' Ulum Al-Hayat*, 20(3), 483–488.

2. Arslan, M. Ö., & Tüzer, E. 1998. Prevalence of bovine eimeridiosis in Thracia, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 22(2), 161–164.

3. Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & Van der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495–503.

4. Das, M., Deka, D. K., Sarmah, P. C., Islam, S., & Sarma, S.

18. Yakhchali, M. 2010. The prevalence and intensity of *Eimeria* spp. infection in sheep of Malayer suburb, Iran, 65(1), 27–32.
19. Yakhchali, M., & Rahmati, R. . 2015. *Eimeria* infection in dairy cattle of industrial farms in kangavar sub-urban of Kermanshah province, Iran. *Journal of Veterinary Research*, 70(3), 263–271.
20. Yakhchali, M., & Gholami, E. 2008. Prevalence of *Eimeria* and *Cryptosporidium* spp in cattle of Sanandaj city (Kurdistan province), Iran. *Pajouhesh and Sazandegi*, 87, 81–87.
21. Yakhchali, M., & Zareci, M. 2008. A survey of frequency and diversity of *Eimeria* species in cattle and buffalo in Tabriz region. *Scientific-research Iranian Veterinary Journal*, 4(1(18)), 94–102.

