شناسایی گونه های مختلف *آیمریاهای* جدا شده از طیورایران به وسیله واکنش زنجیر پلیمراز (PCR)

دکتر نسرین نوذری[۱] دکتر باقر یخچالی[۲] دکتر صادق رهبری[۳]* دکترغلامرضا مؤذنی جولا[۴]

دریافت مقاله: ۱۶ آبان ماه ۱۳۸۰
پذیرش نهایی: ۴ آبان ماه ۱۳۸۲

هدف: شناسایی و تفکیک گونه های مختلف *آیمریاهای* طیور ایران با استفاده از روش (PCR).

طرح: استفاده از نرم افزار آنالیز جمعیتهای ژنتیکی جهت تعیین ضریب شباهت.

حیوانات: واحدهای مرغداری مرغ مادر، از ۵ منطقه آب و هوایی ایران که واکسن کوکسیدیوز استفاده نکرده بودند، جهت نمونه برداری انتخاب و تعداد ۱۱۴ نمونه بستر به طور تصادفی از این مرغداریها تهیه شد.

روش: اواوسیست های موجود در نمونه ها به روش شناورسازی جدا و DNA آنها به وسیله فنل کلروفرم و با استفاده از پروتئینازK استخراج شد. برای شناسایی و تفکیک گونه های مختلف آیمریا از چهار جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده از سکانس ناحیه DNA, Internal transcribed spacer-1(ITS1) ریبو زومی *آیمریا آسروولینا، آیمریا برونتی، آیمریا نکاتریکس* و *آیمریا تنلا* و یک جفت پرایمر یونیورسال BSEF-BSER که ناحیه ITS1 گونه های مختلف آیمریاها را تکثیر می کند استفاده شد.

نتایج: DNA ژنوم اواوسیست های جدا شده از مدفوع طیور آلوده با پرایمرهای اختصاصی توسط واکنش زنجیر پلیمراز تکثیر و برحسب نوع گونه آیمریا یک قطعه DNA در اندازه ۳۲۰ جفت باز (*آیمریا آسروولینا*)، ۳۱۱جفت باز (*آیمریا برونتی*)، ۳۸۴ جفت باز (*آیمریا نکاتریکس*) و ۲۸۷ جفت باز (*آیمریا تنلا*) بر روی ژل آگارز حاوی اتیدیوم بروماید مشاهده شد. برا ی شناسایی گونه ها در نمونه هایی که آلودگی مخلوط داشتند و گونه های خالصی که برای آنها جفت پرایمر اختصاصی وجود نداشت از جفت پرایمر یونیورسال استفاده شد. در این بررسی ۵ گونه *آیمریا ماکزیما، آیمریا برونتی، آیمریا تنلا، آیمریا آسروولینا* و *آیمریا میتیس* شناسایی شدند که شناسایی و گزارش *آیمریا میتیس* و *آیمریا برونتی* برای اولین بار در ایران در این بررسی صورت گرفته است.

نتیجه گیری: در پایان با توجه به نتایج به دست آمده، جفت پرایمرها معرفی شده کاملاً اختصاصی عمل نمودند و جفت پرایمر یونیورسال نیز توانست ۵ گونه ایمریا را در نمونه های آلوده و همچنین نمونه هایی که برای آنها جفت پرایمر اختصاصی وجود نداشت را از یکدیگر تفکیک و مورد شناسایی قرار دهد. بنا براین تشخیص گونه های آیمریا با روش (PCR)، یک روش بسیار سریع، دقیق، آسان و ارزان است و نیاز به خالص سازس و تکثیر ندارد. پیشنهاد می گردد این روش به عنوان یک روش روزمره در آزمایشگاه های کشور که امکانات لازم را دارند مورد استفاده قرار گیرد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۳)، دوره ۵۹، شماره ۲، ۱۳۰-۱۲۵.

واژه های کلیدی: واکنش زنجیر پلیمراز (PCR)، ایران، ماکیان، طیور، کوکسیدیوز، *آیمریا*.

۱) *سازمان دامپزشکی کشور تهران، تهران - ایران.*
۲) *مرکز تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهران، تهران - ایران.*
۳) *گروه آموزشی انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.*
۴) *مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج، کرج - ایران.*
*) *نویسنده مسؤول* srahbari@ut.ac.ir

Identification of *Eimeria spp* isolated from poultry breeder farms in Iran by PCR

Nowzari, N.,[1] Yakhchali, B.,[2] Rahbari, S.,[3] Moazeni.Jula, G.H.[4]
[1]*Laboratory Department of Veterinary organization.* [2]*Research Genetic Engineering Center and Biological technology.* [3]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.* [4]*Razi Serum and Vaccine Research Institute Hesarak Karaj, Karaj-Iran.*

Objective: This study was carried out for identification of *Eimeria spp* isolated from poultry breeder farms in Iran by PCR.
Design: Pop-Gene Analysis.
Animals: Poultry breeder farms.
Procedures: A total of 114 litter samples from poultry breeder farms without previous exposure to anticoccidial vaccine were collected randomly from relatively five different climate regions of Iran. DNA was extracted from oocysts of samples, using phenol-chloroform and proteinase-K. Four pairs of specific primers, designated from Internal Transcribed Spacer-1(ITSI) regions of ribosomal DNA of *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, and *E. tenella* and one pairs of universal primer BSEF-BSER which amplify ITS1 of different *Eimeria* were used in PCR assay. In tests on purified genomic DNA from all species of *Eimeria* isolated from infected samples, each of four primer pairs amplified the ITS1 region of their respective target species only. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis
Results: DNA fragments in sizes of 320 pairs (*E. acervulina*), 311 pairs (*E. brunette*), 384 pairs (*E. necatrix*) and 287 pairs (*E. tenella*) were detected on agarose gel electrophoresis. Universal primer pairs also amplified ITS1 of five *Eimeria* which isolated from infected samples.
Laboratory implications: The results of this study were showed that PCR technique is a conventional method, faster, technically easier and very cheaper than other methods to identify the *Eimeria spp*. Finally, this technique can be recommended to be a routine work in well equipped veterinary diagnostic labs in IRAN. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 59, 2: 125-130, 2004.***
Key words: Iran, Poultry, Coccidiosis, *Eimeria*, PCR.
Corresponding author email:srahbari@ut.ac.ir

کوکسیدیوز یکی از مهمترین و شایعترین بیماریهای طیور است که عامل آن انگل تک یاخته درون سلولی از شاخه اپی کمپلکسا و جنس *آیمریا* است. این بیماری مشکلات فراوانی را در صنعت پرورش ماکیان در سراسر جهان به وجود می آورد. کوکسیدیوز به دو شکل درمانگاهی (با بروز علایم بالینی و تلفات) و تحت درمانگاهی (بدون علائم بالینی مشخص، همراه با افت تولید، کاهش رشد و افزایش ضریب تبدیل غذایی) ظاهر می شود و خسارات اقتصادی قابل توجهی را به صنعت طیور وارد می آورد. علاوه بر آن جهت درمان، کنترل و پیشگیری بیماری، سالانه هزینه های بسیار زیادی بابت استفاده از داروهای مختلف مصرف می شود. در نتیجه می توان گفت یکی

از پرهزینه ترین بیماریهای شناخته شده در ماکیان است، بنابراین بهترین روش برای پیشگیری و کنترل آن، استفاده از واکسیناسیون است، به همین دلیل تاکنون در ایران از واکسن های تخفیف حدت یافته وارداتی که حاوی چهارگونه آیمریاست استفاده شده است (۱). استفاده بهینه از واکسن، مستلزم کاربرد واکسن حاوی گونه های موجود در ایران است، از اینرو لازم است گونه های موجود به طور دقیق شناسایی شوند تا براساس آنها بتوان واکسن مؤثری تهیه کرد. برای تشخیص انگلهای کوکسیدیایی انسان و حیوان از روشهای تعیین خصوصیات بیومتریک (۹،۲۰)، الکتروفورز ایزوآنزیم (۱۸،۱۹) شناسایی اختلاف ژنتیکی DNA (۱۲،۱۴،۱۷) و اخیراً روش تکثیر زنجیر پلیمراز (PCR) استفاده می شود (۱۵). در این راستا Schnitzler و همکاران در سال ۱۹۹۸ برای شناسایی و تفکیک چهارگونه پاتوژن آیمریا چهارجفت پرایمر اختصاصی (EAF- EAR/ ENF-ENR / EBF- EBR / ETF - ETR) (جدول ۱) بر اساس سکانس ناحیه DNA ITS1 *ریبوزومی آیمریا آسروولینا، آیمریا نکاتریکس، آیمریا تنلا، آیمریا برونتی* طراحی نموده اند که برای شناسایی گونه های *آیمریای* جدا شده از نمونه ها در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش کار

۱- جمع آوری نمونه ها:

۱-۱ تهیه نمونه از بستر: از تعداد ۱۱۴ نمونه بستر گله های مرغ مادر تخمگذار نژاد آرین مربوط به پنج منطقه آب و هوایی ایران شامل استانهای تهران، قزوین، فارس، اصفهان، یزد، کرمان، گیلان و مازندران (جدول ۱) که از واکسن کوکسیدیوز طیور استفاده نکرده بودند به طور تصادفی نمونه گیری به عمل آمد، سپس ۰/۵ کیلو از هر نمونه به طور جداگانه، در ظروف استریل در آب خیس شد و به روش شناورسازی با استفاده از آب نمک اشباع (وزن مخصوص ۱/۱۹)، اواوسیست های موجود در نمونه ها جداسازی شدند. به اواوسیست های جدا شده، بی کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد (کمپانی سیگما) اضافه و برای مدت ۴۲ الی ۷۲ ساعت هوادهی شد تا اواوسیست ها اسپوردار شدند و در یخچال ۴ درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش باقی ماندند (۱۲،۲۰، ۸،۹،۱۱).

۱-۲ تهیه گونه های آیمریاهای شناسایی شده در ایران: ۴ گونه از نمونه های جدا شده از بستر مرغداریها در استانهای ذکر شده که با استفاده از روش بیومتریک و بیولوژیک در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران شناسایی شده بودند نیز جهت تشخیص با روش PCR بوسیله پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده قرار گرفتند (۱).

۱-۳ تهیه اواوسیست های شاهد: اواوسیست های ۶ گونه از آیمریاهای طیور به نامهای *تنلا، ماکزیما، آسروولینا، برونتی، نکاتریکس* و *میتیس* که از دانشگاه آپسالا در سوئد تهیه و در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی موجود بودند به عنوان نمونه های شاهد مورد استفاده قرار گرفتند تا اواوسیست های جدا شده در ایران با آنها مقایسه و مورد تأیید قرار گیرند.

۲- آماده کردن جایگاه نگهداری و خوراک جوجه های تحت آزمایش:

مقداری از نمونه هایی که میزان اواوسیست جدا شده از آنها کمتر از ۳۰ عدد بود، به جوجه های ۲ الی ۴ هفته عاری از اواوسیست خورانده شد جایگاه و قفسهای نگهداری جوجه ها با آب گرم و دترجنت شسته وسپس با محلول اواوسید ضد عفونی می شد و خوراک تهیه شده با فرمول پیش دان بدون ترکیبات ضد کوکسیدیوز نیز، قبل از مصرف در اتو کلاو تحت فشار ۱۵ پوند، به مدت ۲۰ دقیقه قرار می گرفت تا استریل و عاری از اواوسیست شود و از روز چهارم، مدفوع جوجه ها مورد آزمایش قرار گرفت. در صورت مشاهده اواوسیست، مدفوع آنها جمع آوری و اواوسیست ها با روش شناورسازی جدا و جمع آوری می شدند (۸،۱۲،۱۵،۲۰).

۳- استخراج DNA:

اواوسیست های جمع آوری شده از هر نمونه، در بی کرومات پتاسیم به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰(rpm) در درجه حرارت اتاق سانتریفیوژ (اپندورف آلمان) شدند تا اواوسیست ها رسوب کنند. برای عاری شدن از بی کرومات پتاسیم رسوب به دست آمده ۳-۲ مرتبه با آب مقطر استریل، شستشو داده شد. از اواوسیست های شسته شده (بسته به میزان اواوسیست جدا شده از نمونه ها)۳۰ الی ۱/ ۰۰۰/۰۰۰ اواوسیست در شیشه های کوچک درب دار ریخته و به هر شیشه تعداد ۱۰ عدد گلوله کوچک شیشه ای و یک میلی لیتر بافر TE (۱۰ میلی مولار تریس ، ۰/۱ میلی مولار EDTA با pH = ۷/۵) استریل اضافه شد. شیشه حاوی اواوسیست بر روی شیکر لوله با دور ۲۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت تا حدود ۷۰ درصد اواوسیست ها شکسته شوند و اسپوروسیست های آنها آزاد شود. سپس محلول حاوی اسپوروسیست ها به لوله اپندورف منتقل و با دور ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا اسپوروسیست ها و اواوسیست های باقیمانده رسوب کنند. پس از دور ریختن مایع رویی به رسوب باقیمانده ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده با pH = ۸ (۰/۱ مولار تریس ـ اسید کلریدریک با pH = ۷/۵، ۰/۱ مولار نمک طعام، ۵۰ میلی مولار EDTA با pH = ۸ ، ۱درصد سدیم دودسیل سولفات و ۵ میلی گرم پروتئیناز K در میلی لیتر) اضافه شد و پس از مخلوط کردن، به مدت یک شب در بن ماری با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در ادامه کار، DNA آنها با روش فنل- کلروفرم (۱۴) استخراج و با الکل اتیلیک مطلق، رسوب داده شد. بیشترین مقدار DNA زمانی به دست آمد که مخلوطی از الکل اتیلیک مطلق و استات سدیم ۴ مولار در دمای ۴ درجه سانتیگراد به DNA استخراج شده اضافه و مدت یکشب نگهداری شد. محلول به دست آمده با دور ۱۲۰۰۰(rpm) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد تا DNA در ته لوله رسوب کند. پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب حاصل دو مرتبه با اضافه کردن ۱ میلی لیتر الکل ۷۰ درصد شستشو داده تا نمک و دیگر ضایعات اطراف DNA شسته و خارج شود. سپس مانند مرحله قبل، محلول سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل در هوا زیر هود لامینار فلوکلاس ۲ قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. پس از آن ۵۰ میکرولیتر TE استریل به رسوب اضافه

شد تا در آن حل شود (۷). بالاخره میزان غلظت DNA با اندازه گیری جذب نوری محلول، در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد.

برای تعیین خلوص DNA ، جذب نوری آن در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. اگر نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر به جذب نور در طول موج ۲۸۰ نانومتر، کمتر از ۱/۳ بود، دوباره مراحل استخراج DNA تکرار می شد تا DNA خالص به دست آید (۲،۳،۴،۵) .

۴- الیگونوکلئوتیدها:

در این بررسی از چهار جفت پرایمر اختصاصی و یک جفت پرایمر یونیورسال که در جدول ۱ نشان داده شده است، برای شناسایی گونه های مختلف آیمریاهای طیور در ایران استفاده شد (۱۹). پرایمرهای ETF- ETR / ENF-ENR و EAF-EAR توسط مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی ایران ساخته و پرایمرهای BSEF-BSER وEBF-EBR به وسیله شرکت سیناژن در خارج از کشور تهیه شدند. جفت پرایمرهای BSEF-BSER می توانند ناحیه (ITS1) Internal transcribed spacer-1 ریبوزومی را در گونه های مختلف آیمریاهای طیور، در اندازه های مختلف تکثیر نمایند. این جفت پرایمر برای مشخص کردن وجود یا عدم وجود گونه های *آیمریا میتیس* و*آیمریا نکاتریکس* و همچنین تأیید و تشخیص گونه های *آیمریا ماکزیما*، *آیمریاتنلا* و*آیمریا آسروولینا* مورد استفاده قرار گرفت. همراه با نمونه های جمع آوری شده در این بررسی، DNA ژنوم نمونه های آیمریاهای مختلف از کشور سوئد نیز به عنوان کنترل مثبت و مقایسه با نمونه های ایرانی، تکثیر شد.

۵- تکثیرDNA به وسیله واکنش زنجیر پلیمراز(PCR amplification):

در این بررسی ۵۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به عنوان الگو برای انجام مراحل PCR مورد استفاده قرار گرفت: بنابراین برای واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر، مطابق پروتکل زیر عمل شد (۷،۱۳) بافر PCR (۱۰X) ۵ میکرولیتر، کلرور منیزیم (۵۰μM) ۱/۵ میکرولیتر، مخلوط دئوکسی نوکلئوتید فسفات (۱۰μM) یا ۱dNTP میکرولیتر، آنزیم تک DNA پلیمراز (۵ واحد) ۰/۵ میکرولیتر، آب مقطر استریل ۳۵ میکرو لیتر، پرایمر اختصاصی (Forward ۱۰mM) ۱ میکرولیتر، پرایمر اختصاصی (Reverse ۱۰μM) ۱ میکرولیتر، یک نمونه به عنوان کنترل منفی و یک نمونه به عنوان کنترل مثبت (DNA آیمریاهای شاهد) در نظر گرفته شد. واکنش توسط دستگاه ترموسایکلر (اپندروف آلمان) انجام گرفت. واکنش PCR با حرارت اولیه ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه برای شروع و سپس مرحله یک ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه (Denaturation)، مرحله دو ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه (Annealing)، مرحله سه ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت دو دقیقه (Extention)، این سه مرحله در ۳۰ سیکل تکرار شد و Extention نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۱۰ دقیقه برای تکمیل زنجیر DNA صورت گرفت.

۶- آنالیز محصول:

بررسی محصولات واکنشPCR، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز (سیگما) انجام شد. ۸ میکرولیتر ازمحصولPCR هرنمونه، با ۲ میکرولیتر بافر بارگیری (۲۰ درصد فیکول، ۲۵ میلی مولار EDTA، ۰/۰۵ درصد برموفنل بلو، ۰/۰۳ درصد گزیلن سیانول) مخلوط شد و در داخل چاهک های ژل آگارز ۱/۵ درصدحاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم درمیلی لیتر) که قبلاً تهیه و در تانک الکتروفورز (ساخت اپندرف آلمان) حاوی TBE 1X (Tris borate buffer) متشکل از ۱۰۹ میلی گرم باز تریس، ۹/۳ میلی گرم EDTA، ۵۵ میلی گرم اسید بوریک در حجم نهایی یک لیتر با pH = ۸/۳ (۵) قرار داده شده بود، ریخته شد و در حفره وسط نیز ۱۰ میکرولیتر از مارکر ۱۰۰ bp ladder plus (Fermentas) قرار داده و با ولتاژ ۷۰ ولت، الکترو فورز شد (۳،۱۳). قطعات DNA به دست آمده توسط دستگاه UV trans illuminator (اپندروف

جدول ۱ - خصوصیات نمونه های مورد بررسی در مرغان تخمگذار نژاد آرین.

منطقه	محل جغرافیایی	نوع آب و هوا	نوع بستر	سن	تعداد نمونه
۱	مازندران و گیلان	معتدل و مرطوب	پوشال چوب	۲۲ هفته	۱۶
۲	مشهد	معتدل و سرد	خاک اره	۱۶ ماه	۱۶
۳	تهران و قزوین	معتدل	پوشال چوب	۱۰ ماه	۵۲
۴	فارس و اصفهان	معتدل کوهستانی	پوشال چوب	۴۶ هفته و ۵۵ هفته	۲۱
۵	یزد و تهران	گرم و خشک	پوشال چوب	۲۸هفته	۸

جدول ۲- پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده برای شناسایی گونه های مختلف آیمریاهای طیور ایران.

نوع پرایمر	توالی بازها از ۵ به ۳	تعداد باز	گونه ایمریا	دمای Annealing (سانتیگراد)	اندازه DNA ساخته شده (b.p)
EAF-EAR	GGC TTG GAT GAT GTT TGC TG CGA ACG CAA TAA CAC ACG CT	۲۰ ۲۰	*آسروولینا*	۶۲	۳۲۰
EBF-EBR	GAT CAG TTT GAG CAAA CCT TCG GTA CGT CGG AT TGG TCT TCC	۲۲ ۲۰	*برونتی*	۶۲	۳۱۱
ENF-ENR	TAC ATC CCA ATC TTA GAA TCG GGC ATA CTA GCT TCG AGC AAC	۲۱ ۲۱	*نکاتریکس*	۶۲	۳۸۴
ETF-ETR	AAT TTA GTC CGC AAC CCT CGA GCG CTC TGC ATA CGA CA	۲۱ ۲۰	*تنلا*	۶۲	۲۸۷
BSEF-BSER	CTG TGA ATT CAT CGG A ATC GCA TTT CGC TGC GTC CT	۱۶ ۲۰	گونه های مختلف آیمریا	۵۰	*آ. تنلا* ۷۵۳،*آ. آسروولینا* ۵۸۶، *آ. برونتی*۶۲۹،*آ. نکاتریکس* ۷۷۸

جدول ۳ - آیمریاهای شناسایی شده در ۵ منطقه آب و هوایی ایران.

منطقه	محل جغرافیایی	نوع گونه های آیمریا	توضیحات
۱	مازندران و گیلان	*آیمریا ماکزیما - آیمریا آسروولینا - آ. تنلا*	
۲	مشهد	*آ. ماکزیما - آ. آسروولینا - آ. تنلا - آ. میتس - آ. برونتی*	
۳	تهران و قزوین	*آ. ماکزیما - آ. آسروولینا - آ. تنلا*	
۴	فارس و اصفهان	*آ. ماکزیما - آسروولینا - آ. تنلا - آ.میتیس*	*آ. میتیس* از استان اصفهان
۵	یزد و تهران	*آ. ماکزیما - آ. آسروولینا - آ. تنلا - آ. برونتی*	*آ. برونتی* از استان یزد

آلمان)، در طول موج ۳۲۰ لاندا قابل رؤیت بود که با دوربین پولاروید از آنها عکس گرفته شد.

نتایج

۱- تکثیر زنجیر DNA آیمریاها با پرایمرهای اختصاصی: در واکنش زنجیر پلیمراز، ژنوم گونه های آیمریاهای جدا شده از نمونه های مورد بررسی و آیمریاهای شاهد، به ترتیب با جفت پرایمرهای ENF- ENR / ETF-ETR / EAF- EAR و EBF-EBR قطعات DNA در اندازه های ۲۸۷ جفت باز (تصویر ۱، لاین های ۱،۲،۳، ۴،۵ و ۷) برای *آ یمریا تنلا*، ۳۲۰ جفت باز (تصویر ۲، لاین های ۱،۲،۳،۴،۵،۷و ۸) برای *آ یمریا آسروولینا* و ۳۱۱ جفت باز (تصویر ۳، لاین های ۱،۲،۳،۴ و ۵) برای *آ یمریا برونتی* تکثیر و بر روی ژل آگارز مشاهده شد، اما هیچ کدام از ژنوم ها با جفت پرایمر ENF- ENR برای ژنوم *آ یمریا نکاتریکس* تکثیر نشد و باندی مشاهده نگردید.

۲- تکثیر زنجیر DNA آیمریاها با پرایمریونیور سال BSEF-BSER: در واکنش زنجیر پلیمراز، ژنوم گونه های آیمریاهای جدا شده از نمونه های مورد بررسی(مخلوط، خالص و آیمریاهای شاهد) با جفت پرایمر BSEF -BSER، قطعات DNA در اندازه های زیر تکثیر و بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت:

۷۵۳جفت باز (*آ یمریا تنلا*، تصویر ۵، لاین های ۲، ۵، ۸ و ۱۰)، ۵۸۶ جفت باز (*آ یمریا آسروولینا* تصویر ۳، لاین های ۷،۸،۹،۱۰ و ۱۱و تصویر ۵، لاین های ۲،۳،۵،۷،۸،۱۰ و ۱۱)، حدود ۴۰۰ جفت باز (*آ یمریا ماکزیما*، تصویر ۵، لاین های ۱، ۵، ۸ و ۱۰)، ۶۲۹ جفت باز (*آ یمریا برونتی*، تصویر ۵، لاین های۱، ۵ و۸) فقط در نمونه های مربوط به استانهای خراسان و یزد، حدود ۷۰۰ جفت باز (*آ یمریا میتیس*) فقط در نمونه های مربوط به استانهای اصفهان و خراسان (تصویر ۲، لاین های ۹،۱۰ و۱۱ و تصویر ۵، لاین های ۳،۴و۱۰)، ۷۷۸ جفت باز برای *آ یمریا نکاتریکس* (تصویر ۴، لاین های ۵ و ۶).

بحث

در این بررسی از چهار جفت پرایمر اختصاصی و یک جفت پرایمر یونیورسال استفاده شد که نتایج به دست آمده از نمونه های مورد بررسی و نمونه های شاهد، بیانگر اختصاصی بودن این چهار جفت پرایمر است که با نتایج به دست آمده توسط Schuitzler و همکاران در سال ۱۹۹۸ یکسان بود، به جز پرایمر *آ یمریا نکاتریکس* که با ژنوم *آ یمریا نکاتریکس* نمونه ها و شاهد تکثیر نشد و باندی بر روی ژل الکتروفورز نداشت، ولی پرایمر یونیورسال توانست فقط ژنوم *آ یمریا نکاتریکس* شاهد را تکثیر کند، در نتیجه، قطعه DNA در اندازه ۷۷۸ جفت باز، روی ژل اگارز مشاهده شدکه می تواند بیانگر عدم وجود ژنوم گونه *آ یمریا نکاتریکس* در نمونه ها باشد،همچنین می توان نتیجه گرفت که پرایمر اختصاصی *نکاتریکس* به علت اینکه خوب سنتز نشده است، نتوانسته ژنوم *آ یمریا نکاتریکس* شاهد را تکثیر کند.

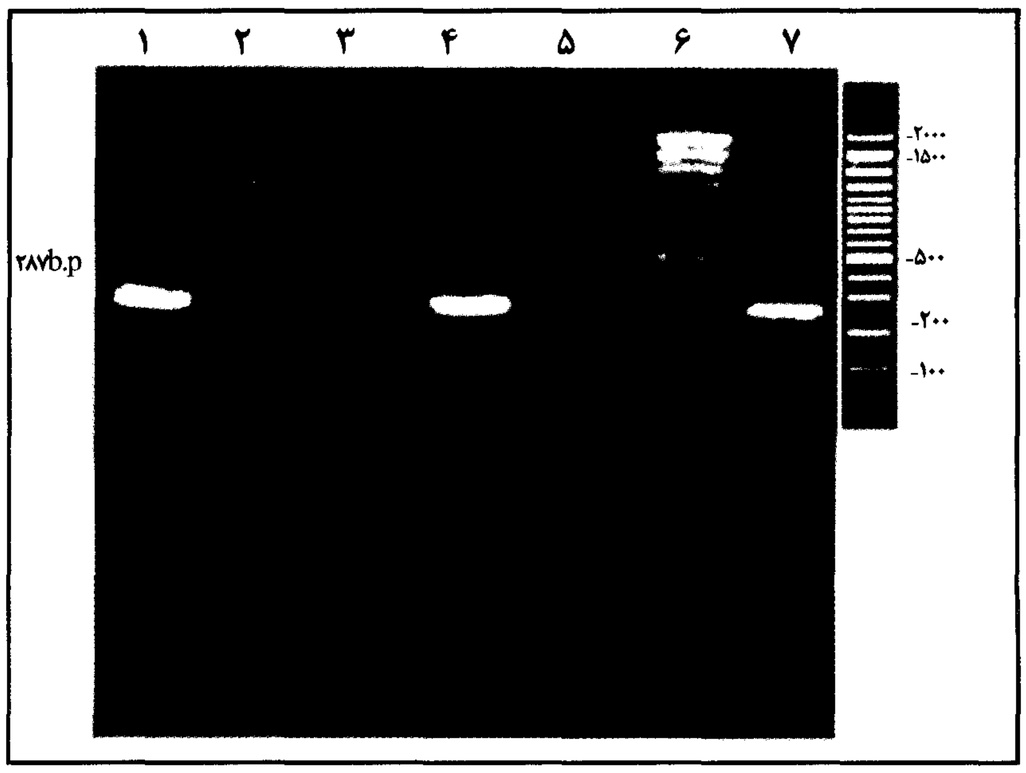
نتایج حاصل از واکنش زنجیر پلیمراز ژنوم گونه هایی که با روش بیولوژیک و بیومتریک تشخیص داده شده بودند نشان داد که شناسایی گونه های آیمریا با روش بیولوژیک و بیومتریک، روش چندان دقیق و مطمئنی نیست. این نتایج با آن چه توسط Procunier در سال ۱۹۹۳ به دست آمده، یکسان است. او اعتقاد دارد که گونه های آیمریا را نمی توان به راحتی با روش چشمی تشخیص داد. در این بررسی، ژنوم آیمریاها یی که با روش بیولوژیک و بیومتریک، *آ یمریا نکاتریکس* تشخیص داده شده بودند با روش PCR و استفاده از پرایمر یونیورسال BSEF-BSER تکثیر شد و قطعه DNA ساخته شده با حدود ۷۰۰ جفت باز، روی ژل آگارز مشاهده شد که این قطعه هم اندازه قطعه DNA ساخته شده با *آ یمریا میتیس* شاهد بود. با این پرایمر، مشخص شد که گونه آیمریای جدا شده از نمونه ها، *آ یمریا میتیس* بوده است نه *آ یمریا نکاتریکس*، بنابراین در این بررسی با استفاده ازپرایمر یونیورسال BSEF-BSER توانستیم موارد زیر را به اثبات برسانیم.

۱- نتایج حاصل ازشناسایی، گونه های مختلف آیمریاها را با استفاده از پرایمر اختصاصی مورد تأیید قرار داد، از جمله گونه *آ یمریا برونتی* را که برای اولین بار در این بررسی شناسایی و گزارش می شود.

۲- برخی از نمونه هایی که با روش بیولوژیک و بیومتریک خالص شده بودند خالص نیستند. بلکه با یک یا دو گونه مخلوط می باشند (تصویر ۵، لاین های، ۱،۲،۳،۵،۸ و ۱۰).

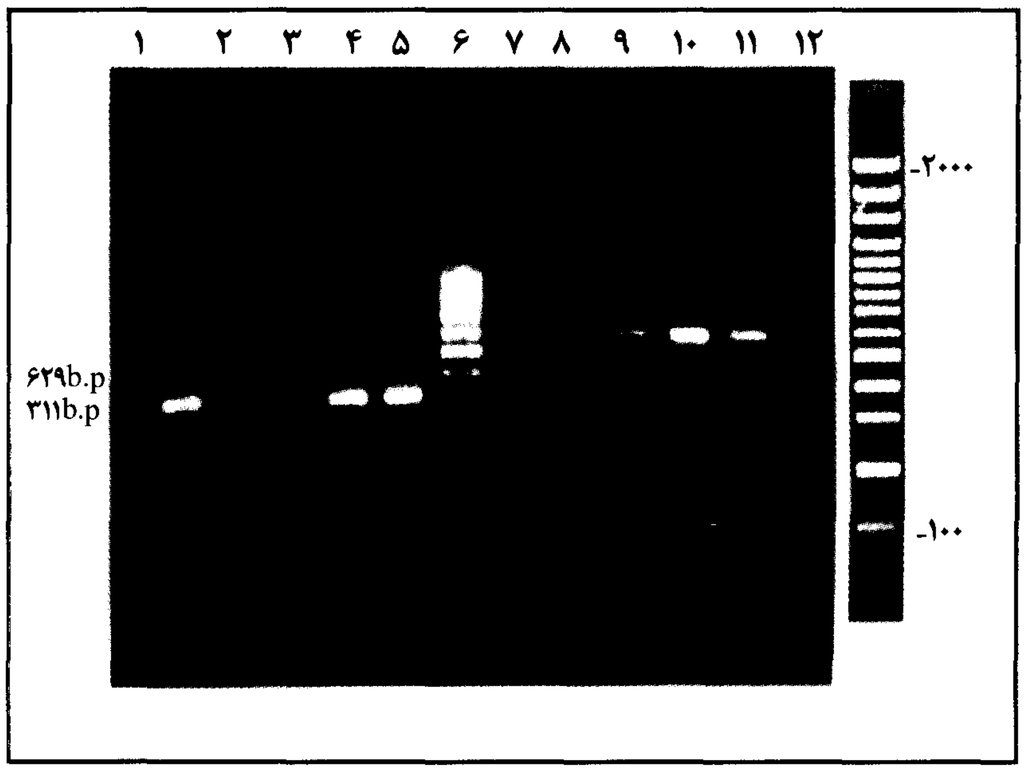
۳- شناسایی گونه های جدید و یا گونه هایی که برای آنها پرایمر اختصاصی معرفی نشده بود، از جمله شناسایی گونه *آ یمریا میتیس* که برای اولین بار در ایران شناسایی و گزارش می شد (تصویر ۲، لاین های ۹،۱۰،۱۱ و تصویر ۵ لاین های، ۳ و ۱۰).

همچنین تأیید گونه *آ یمریا ماکزیما* که برای آن پرایمر اختصاصی معرفی نشده بود در این مورد با پرایمر یونیورسال قطعه DNA به اندازه قطعه DNA ساخته شده توسط *آ یمریا ماکزیما* ی شاهد (حدود ۴۰۰ جفت باز) تکثیر و



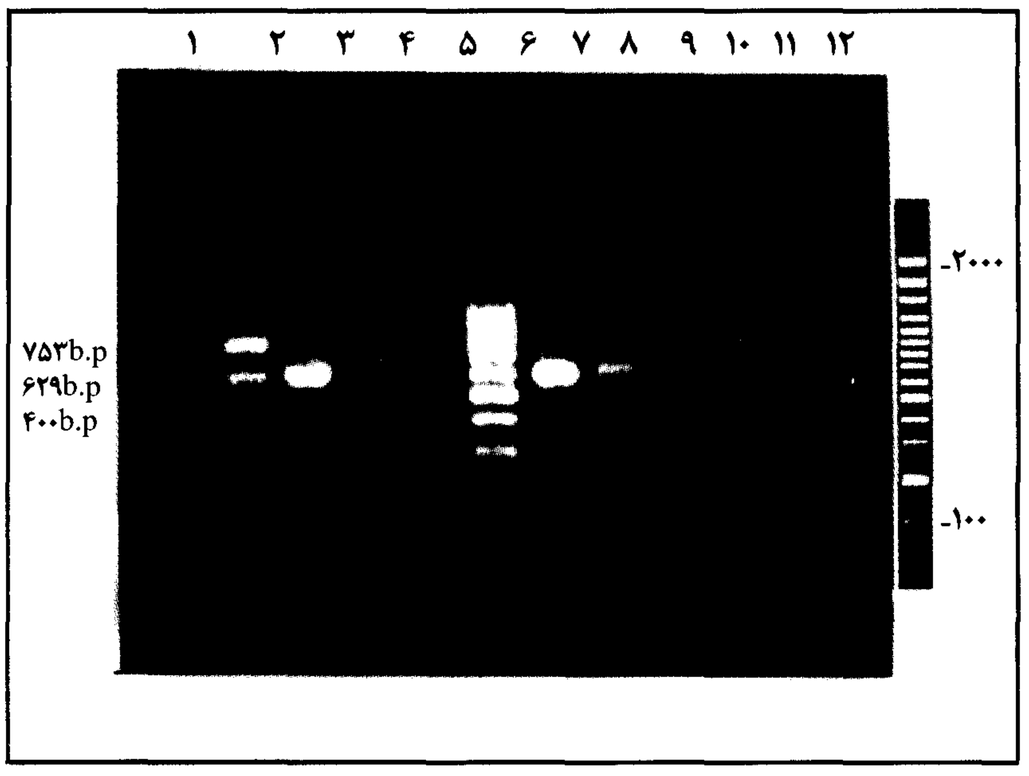
تصویر ۱ - محصول به دست آمده با پرایمر اختصاصی ETF-ETR برای شناسایی گونه *آیمریاتنلای* ۵ منطقه بر روی ژل آگارز الکتروفورز.

لاین ۱- *آیمریاتنلای* سوئد (کنترل)، لاین ۲- *آیمریاتنلای* فارس، لاین ۳- *آیمریاتنلای* مازندران، لاین ۴- *آیمریاتنلای* یزد، لاین ۵- *آیمریاتنلای* مشهد، لاین ۶- مارکر، لاین ۷- *آیمریاتنلای* تهران.



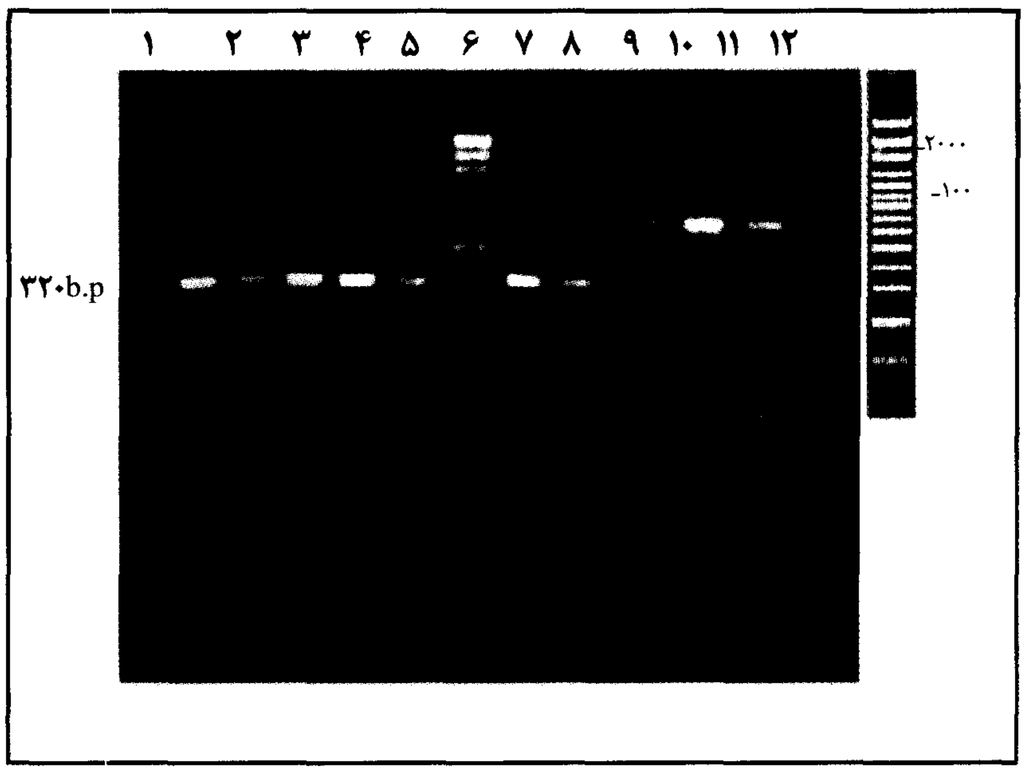
تصویر ۳ - الگوی محصول PCR به دست آمده با جفت پرایمر اختصاصی EBF-EBR و *آیمریا آسروولینا* با جفت پرایمر یونیورسال BSEF-BSER بر روی ژل آگاروز اکلتروفورز.

(*آیمریا برونتی*) لاین ۱- *آیمریا برونتی* سوئد (کنترل مثبت)، لاین ۲- تهران، لاین ۳- مازندران، لاین ۴- مشهد، لاین ۵- یزد، لاین ۶- مارکر، (*آیمریا آسروولینا*)، لاین ۷- تهران، لاین ۸- مازندران، لاین ۹- مشهد، لاین ۱۰- فارس، لاین ۱۱- یزد، لاین ۱۲- کنترل کیفی.



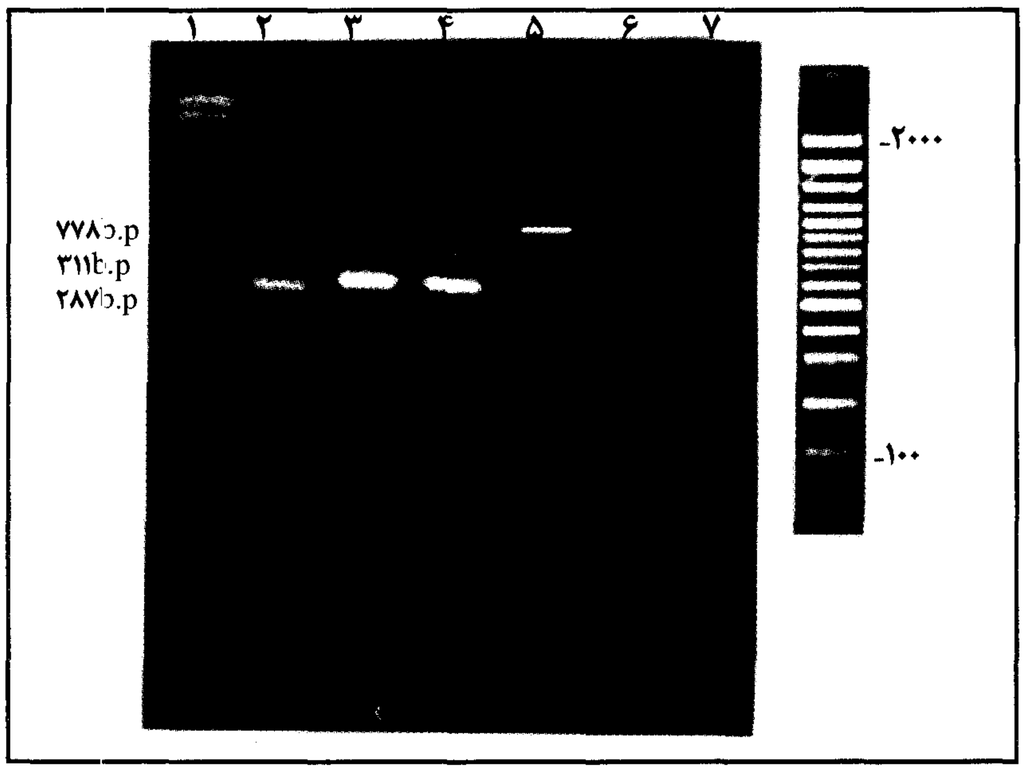
تصویر ۵ - الگوی محصول PCR نمونه های مخلوط با پرایمر یونیورسال.

لاین ۱- *آ. ماکزیما*، *آ. برونتی* (کنترل مثبت)، لاین ۲- *آ. تنلا*، *آ. سروولینا* (تهران)، لاین ۳- *آ. آسروولینا*، *آ. میتیس* ، لاین ۴- *آ. میتیس* (کنترل مثبت)، لاین ۵- *آ. تنلا*، *آ. برونتی*، *آ. آسروولینا* و *آ. ماکزیما* (اصفهان)، لاین ۶- مارکر، لاین ۷- *آ. آسروولینا* (تهران)، لاین ۸- *آ. تنلا*، *آ. برونتی*، *آ. آسروولینا* و *آ. ماکزیما* (یزد)، لاین ۹- (تهران)، لاین ۱۰- *آ. تنلا*، *آ. میتیس*، *آ. آسروولینا* و *آ. ماکزیما* (مشهد)، لاین ۱۱- *آسروولینا* (فارس)، لاین ۱۲- کنترل منفی.



تصویر ۲ - الگوی محصول PCR *آیمریا آسروولینای* ۵ منطقه با پرایمر اختصاصی EAF-EAR و محصول PCR *آیمریا میتیس* با پرایمر یونیورسال BSEF-BSER بر روی ژل آگاروز اکلتروفورز.

لاین ۱- *آیمر آسروولینای* سوئد (کنترل مثبت)، لاین ۲- مشهد، لاین ۳- اصفهان، لاین ۴- فارس، لاین ۵- مازندران، لاین ۶- مارکر، لاین ۷- یزد، لاین ۸- تهران، لاین ۹- *آیمریا میتیس* کنترل مثبت، لاین ۱۰- *آیمریا میتیس* اصفهان، لاین ۱۱- *آیمریا میتیس* مشهد، لاین ۱۲- کنترل منفی.



تصویر ۴ - الگوی محصول نمونه های مشکوک به *آیمریا برونتی* یا پرایمرهای اختصاصی EBF-EBR و *آیمریا نکاتریکس* با جفت پرایمر یونیورسال BSEF-BSER بر روی ژل آگارز الکتروفورز.

لاین ۱- مارکر، لاین ۲- *آیمریا تنلا*، لاین ۳- *آیمریا برونتی* سوئد (کنترل مثبت)، لاین ۴- *آیمریا برونتی* مشهد، لاین ۵- *آیمریا نکاتریکس* سوئد (کنترل مثبت)، لاین ۶- *آیمریا نکاتریکس* یزد، لاین ۷- کنترل کیفی.

بر روی ژل آگارز مشاهده شد. (تصویر ۵ لاین های ۱،۵،۸ و ۱۰). لازم به ذکر است که *آیمریا ماکزیما* نسبت به آیمریاهای دیگر دارای اندازه بزرگتر است و از طریق شکل ظاهری قابل تشخیص است (۶).

۴- با استفاده از پرایمر یونیورسال توانستیم با یک آزمایش چندین گونه آیمریا ی موجود در نمونه های بستر را مورد شناسایی و تفکیک قرار دهیم (تصویر ۵).

در مجموع همان طورکه Schnitzler و همکاران ادعا کرده بودند، روش PCR یک روش بسیار ارزان، سریع و مطمئن است و نیاز به خالص سازی و تکثیر اواوسیست ندارد. زیرا با حداقل اواوسیست (۲۵عدد) می توان گونه ها را شناسایی کرد. در صورت کم بودن تعداد اواوسیست می توان قطعه ای از روده جوجه های مشکوک را جدا کرد و مورد آزمایش قرار داد. زیرا با این روش استخراج DNA از مراحل اولیه تشکیل اواوسیست، مانند مراحل تشکیل شیزونت، مروزوآیت یا گامتوسیت ها نیز می تواند

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با یونیورسال تکثیر و مورد شناسایی و تفکیک قرار گیرند. این روش نسبت به روشهای دقیق دیگر بسیار ارزانتر و سریعتر است و به عنوان یک روش ساده و ارزان می تواند در آزمایشگاه های کشور برای شناسایی و تفکیک گونه های آیمریا مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مدیریت قطب پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، معاونت محترم امور اداری سازمان دامپزشکی، مدیر کل محترم تدارکات و پشتیبانی سازمان دامپزشکی، مؤسسه محترم تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، سرکار خانم دکتر تهرانی، جناب آقای دکتر احمد کاظمی و سرکار خانم محمدی که در تأمین امکانات تحقیق، ویرایش و تایپ این مقاله مرا یاری نموده‌اند تشکر می شود.

References

۱. چرخکار، س. (۱۳۸۰): شناسایی گونه های آیمریای جدا شده از طیور ایران به روش خصوصیات بیومتریک و بیولوژیک، پایان نامه دوره تخصصی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صفحه: ۹۱ـ۶۳.

۲. صادقی خواه، ح. (۱۳۷۸): جداسازی و تخلیص ژنوم RNA روتا ویروس جهت کلون کردن ژن کد کننده NSP 4، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، مرکز علوم پایه پزشکی، صفحه: ۷۲ـ۵۰.

۳. طباطبائی، م.، نوری دلوئی، م.ر. و تقی بیگلو، چ. (۱۳۷۲): بیوتکنولوژی مولکولی (ترجمه)، چاپ اول، انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، صفحه: ۶۵ـ۶۲.

۴. نوری دلوئی، م.ر.، خسروی نیا، س. و مجیدفر، ف. (۱۳۷۳): فرهنگ مهندسی ژنتیک (ترجمه)،چاپ اول، انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، صفحه: ۲۸ـ۲۲.

5. Barrett,T. (1995): Diagnosis Using the Polymerase Chain Reaction, practical course organised by the Laea, Vienna, Austria. PP: 110-121.

6. Barta, G.R., Coles, B.A., Schito, M.L., Fernando, M.A., Martin, A. and Danforth, H.D. (1998): Analysis of Intraspecific variation among five strains of *Eimeria maxima* from North America, International For Parasitology. 28: 458 - 492.

7. Cere, N., Licois, D. and Humbert, G.F. (1997): Comparision of the genomic fingerprints generated by the Random Amplification of Polymorphic DNA between Precocious Lines and Parental Strains of *Eimeria spp*. From the rabbit, Parasitol. Res. 83: 300-302.

8. Guidelines on techniques in coccidiosis research (1998): A Laboratory Manual used In Razi Vaccine and Serum Research Institute, Iran. PP: 18-35.

9. Karim, M.J. and Begum, N. (1995): MorpHological and biological characterization of chicken Eimeria with special reference to species identification, Veterinary - Review - Kathmandu. PP: 9-10.

10. Levine, N.D. (1985): Veterinary Protozoology. Iowa State University Press, Ames, IA. PP: 414.

11. Long, P.L. and Joyner, L.P. (1984): Problems in the identificaion of species of *Eimeria*. J. Protozool. 31: 535-541.

12. Manual of veterinary parasitologyical laboratory techniques (protozoology), (1987): Ministry of Agriculture, fisheries and food.

13. Procunier, J.D., Fernando, M.A. and Barta, J.R. (1993): Species and Strain diffrentiation of *Emeria spp*. of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers, parasitol. Res. 79: 98- 102.

14. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989): Molecular cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harvor Laboratory Press.

15. Schnitzler, B., Thebo, P.L., Mattsson., J.G., Tomley, F. and Shirley, M.W. (1998): Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria spp* of the chicken, Avian. Pathol. 27: 490- 497.

16. Shirley, M.W. and Bumsted, N. (1944): Intera-specific variation within *Eimeria tenella* detected by random amplification of polymorphic DNA, parasitol. Res. 80: 346-351.

17. Shirley, M.W. (1994): Coccidial Parasites from the chicken: discrimination of different population of *Eimeria tenella* by DNA hybridisation. Res. Vet. Sci. 57: 10 -14.

18. Shirley, M.W. (1989): New Methods for the identification of species and strains of Eimeria, coccidia and intestinal coccidiomorphs, in: Proceeding of the 5th International Coccidiosis conference, Tours (France). 17 -20.

19. Shirley, M.W. (1075): Enzyme variation in *Eimeria spp* of the chicken, Parasitology. 71: 369 - 376.

20. Thebo, P., Lunden, A., Uggla A. and Hooshmand - Rad, P. (1998): Identification of seven *Eimeria spp* in Swedish domestic fowl, Avian Pathol. 127: 613-617.