مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۳، ۲۸۴-۲۷۹
Journal of Veterinary Research. 70,3: 279-284, 2015
Original Article

بررسی ایمنی هومورال در طیور چالش شده با ایمریا قبل و پس از واکسیناسیون به روش الایزا

صدیقه نبیان[1] فاطمه عرب خزائلی[1*] محمد حسین کفایتی[1] مهرداد مدیر صانعی[2]

۱) گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲) گروه بهداشت و تغذیه دام و طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۲۰ اردیبهشت ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۱ تیر ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: علیرغم استفاده فراوان از داروهای ضدکوکسیدیایی و توسعه واکسن علیه ایمریا، این انگل کماکان در میان ماکیان شایع می‌باشد. درک مکانیسم‌های ایمنی، محققان را در پیشگیری کار آمدتر این عفونت انگلی یاری می‌نماید. **هدف:** مطالعه حاضر به منظور بررسی ایمنی هومورال علیه کوکسیدیوز طیور با استفاده از الایزا، قبل و پس از مصرف واکسن تخفیف حدت یافته لیواکوکس Q انجام شده است. **روش کار:** یکصد و بیست جوجه یک روزه گوشتی سویه تجاری رأس به صورت تصادفی به ۴ گروه ۳۰ قطعه‌ای تقسیم گردیده وواکسن لیواکوکس Q در سن ۴روزگی و دز عفونی در ۱۴روزگی به صورت داخل دهانی به هر جوجه تلقیح گردید. ضمن ارزیابی شاخص‌هایی نظیر میزان افزایش وزن، ضایعات روده‌ای و تعداد اُسیست در ۲۱ روزگی، ایمنی هومورال با روش الایزا بر روی نمونه‌های سرمی‌تهیه شده از جوجه‌ها در ۷ و ۲۱ روزگی مورد بررسی قرارگرفتند. **نتایج:** سه روز پس از واکسیناسیون میانگین جذب نوری گروه‌های بدون دریافت واکسن- چالش نشده (۰/۵۵۳) اختلاف معنی‌داری با گروه‌های دریافت کننده واکسن - چالش نشده (۰/۶۸۶) داشت ($p<0/05$). در سن ۲۱ روزگی میانگین جذب نوری سرم در گروه‌های بدون دریافت واکسن- چالش نشده (کنترل منفی) (۰/۳۳۱) با گروه‌های دریافت کننده واکسن - چالش نشده (شاهد واکسن) (۰/۶۶۳) و گروه‌های دریافت‌کننده واکسن- چالش-شده (آزمایش) (۰/۶۶۲) اختلاف معنی‌داری را نشان داد. در گروه‌های آزمایش، میانگین امتیاز ضایعات روده‌ای ۲/۲۲ و این امتیاز در پرندگان بدون دریافت واکسن- چالش شده (شاهد آلوده) ۳/۷۸ بود که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد. ارتباط معنی‌داری میان میانگین افزایش وزن و میزان دفع اُسیست با سطح سرمی‌پادتن در گروه‌های آزمایش و شاهد آلوده مشاهده نگردید. **نتیجه‌گیری نهایی:** بر اساس مطالعه حاضر می‌توان گفت استفاده از واکسن زنده تخفیف حدت یافته، اثری مشابه چالش با اُسیست حاد بر ایمنی داشته و سبب افزایش میزان پادتن‌ها در سرم می‌گردد. همچنین استفاده از واکسن روی شاخص‌هایی مانند ضایعات روده‌ای، که در ارزیابی بیماریزایی و آسیب‌شناسی کوکسیدیا کاربرد دارند، دارای اثر مهارکنندگی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: واکسن ضدکوکسیدیا، کوکسیدوز، ایمنی هومورال، ایمریای ماکیان

مقدمه

اهمیت اقتصادی کوکسیدیوز در صنعت پرورش طیور به اندازه‌ای است که ایمن‌سازی ماکیان در برابر این بیماری، از دیر باز هدف عده زیادی از محققین بوده است. با توجه به پیچیدگی پاسخ‌های ایمنی در برابر کوکسیدیا دستیابی به یک روش ایمن‌سازی رضایت بخش، مستلزم شناسایی و درک ماهیت پاسخ‌های ایمنی و پادگن‌های ایمنی‌زا می‌باشد (۱۵). ایمنی در کوکسیدیوز بسیار پیچیده بوده و تحت تأثیر عوامل مختلف اختصاصی و غیراختصاصی شامل فاگوسیت‌ها، لکوسیت‌ها، سدهای فیزیکی و آنتی بادی‌ها، لیمفوسیت‌ها و سایتوکاین‌ها قرار دارد (۵).بررسی‌ها نشان داده اند بافت‌های لنفوئیدی وابسته به لوله گوارش در ماکیان حاوی لنفوسیت‌های B و T بوده که سبب بروز پاسخ‌های ایمنی اکتسابی علیه انگل‌های خانواده کوکسیدیا می‌شوند. شروع این مکانیسم توسط لنفوسیت‌های B روده‌ای می‌باشد که در مدت کوتاهی پس از آلوده شدن، با تولید آنتی‌بادی اختصاصی ضد انگل ایفای نقش می‌نماید. در مرحله بعد، ایمنی سلولی وارد عمل شده و توسط سلول‌های ایمنی موجود در بافت اپی‌تلیال و لامینا پروپریای روده‌ای با ترشح یک سری از اجزای ایمنی و سایتوکاین‌ها، ایمنی سلولی را آغاز می‌نماید (۲۰). پرندگانی که با ایمریا مواجه می‌شوند سه کلاس آنتی‌بادی شامل IgA، IgY (IgG) و IgM در جریان خون آنها قابل ردیابی است. هرچند این آنتی بادی‌ها تهاجم انگل به سلول‌های میزبان را در سطح مخاط روده کاهش می‌دهند ولی در نقاطی که مواجهه با آنتی بادی وجود ندارد، انگل در ورود به سلول موفق خواهد بود. مطالعه بر روی پرندگانی که بورس فابریسیوس آنها حذف شده است نشان داده است که آنتی بادی‌ها نقش محافظتی چندانی در کوکسیدیوز طیور برعهده ندارند (۵). از سوی دیگر اولین و تنها واکسن تحت واحد مورد مصرف، CoxAbic®، برمبنای انتقال آنتی بادی‌های محافظت‌کننده از مرغ ایمن به جنین طراحی شده که نشان‌دهنده نقش آنتی بادی‌ها در ایجاد مقاومت می‌باشند و مطالعات نیز نشان داده‌اند که افزایش آنتی بادی‌ها در سرم، همزمان و موازی با شکل‌گیری ایمنی سلولی رخ می‌دهد (۲). در صورتی که انگل قبل از ورود به سلول میزبان در تماس نزدیک با پادتن‌های موضعی واقع شوند، این امکان وجود دارد که پادتن‌ها بتوانند با تشدید تخریب اسپوروزوآیت‌ها در داخل محوطه روده تهاجم بعضی از گونه‌ها (و نه همه گونه‌ها) را کاهش دهند (۱۲). با توجه به این که آنتی بادی‌ها در مطالعات

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۴۹ نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲۲ Email: farab@ut.ac.ir

اپیدمیولوژیک و پایش مواجهه گله با ایمریا کاربرد دارندو با در نظرداشتن این که الایزا روشی نسبتاً کم هزینه و دارای قابلیت بررسی تعداد بسیار زیاد نمونه به صورت همزمان می‌باشد، می‌توان از الایزا در پایش وضعیت ایمنی گله‌ها استفاده نمودبا توجه به این که واکسن‌های تخفیف حدت یافته سیرتکاملی کوتاه‌تری نسبت به سویه‌های وحشی دارند احتمالاً ایمنی میزبانی را به گونه‌ای متفاوت از سویه‌های وحشی تحریک نمایند. بنابراین در این مطالعه تلاش شد تا با استفاده از روش الایزا، ایمنی هومورال قبل و پس از مصرف واکسن تخفیف حدت یافته لیواکوکس Q و نیز پس از چالش با جدایه مزرعه‌ای مورد بررسی قرارگیرد.

مواد و روش کار

جداسازی، تخلیص اُوسیست‌ها، تکثیر و تعیین دز عفونی جدایه انتخابی: از اردیبهشت تا مرداد سال ۱۳۸۹ به منظور دستیابی به مناسب‌ترین جدایه جهت آلوده‌سازی تجربی پرندگان، روده‌های پرندگان یا نمونه‌های بستر از مزارع مختلف طیور صنعتی از استان‌های مختلف کشور، مطابق روش استاندارد جداسازی اُوسیست‌های ایمریا مورد بررسی قرارگرفتند (۳،۶). جدایه‌ای مربوط به استان همدان که بیشترین تعداد اُوسیست را در بررسی اولیه داشت، جهت آلوده سازی تجربی انتخاب گردید. بر اساس شمارش‌های ابتدایی و درصد تقریبی گونه‌ها در این جدایه و با توجه به مشاهدات در زمان چالش تجربی اولیه جهت تکثیر، دز عفونی به گونه‌ای تنظیم شد که بیشترین کاهش وزن و کمترین مرگ و میر در پرندگان القا گردد (۳).

تیمارها، واکسیناسیون و چالش پرندگان: ۱۲۰ جوجه یک روزه نر گوشتی سویه تجاری رأس۳۰۸ به صورت تصادفی به ۴ گروه ۳۰ قطعه‌ای، مشتمل بر سه تکرار شامل گروه آزمایش (چالش‌شده-دریافت کننده واکسن)، گروه شاهد آلوده (چالش شده-بدون دریافت واکسن)، گروه کنترل منفی (چالش نشده – بدون دریافت واکسن) و گروه کنترل واکسن (چالش نشده – دریافت‌کننده واکسن)، در قفس‌های سیمی‌تقسیم شدند. آب و غذا آزادانه در دسترس پرندگان قرار گرفت، نور ۲۴ ساعته در سالن برقرار و دمای سالن در هفته اول ۳۰°C تا ۳۲ و در ادامه به تدریج تا ۳ °C از دما به صورت هفتگی کاسته شد. واکسن لیواکوکس Q، حاوی گونه‌های تخفیف حدت یافته ایمریا آسرولینا، ایمریا تنلا، ایمریا نکاتریکس و ایمریا ماکسیما می‌باشد، طبق دستور شرکت سازنده (Biopharm, Czech Repulic) در سن ۴ روزگی به میزان ۱/۵mL به صورت داخل دهانی به گروه‌های دریافت کننده واکسن و دز عفونی نیز در ۱۴ روزگی به صورت داخل دهانی به جوجه‌های چالش شده تلقیح گردید. به پرندگان گروه کنترل منفی ۱/۵mL آب مقطر استریل خورانده شد.

نمونه‌های سرمی‌و آزمون الایزا: نمونه‌های سرمی‌در چندین نوبت از گروه‌های مختلف اخذ گردید؛ ۱- در ۷ روزگی (۳روز پس از واکسیناسیون) از ۱۳ پرنده واکسینه و ۱۳ پرنده غیر واکسینه با استفاده از سرنگ و از ورید بالی نمونه خون تهیه گردید. ۲- یک هفته پس از تلقیح دز عفونی، یعنی در سن ۲۲ روزگی (۱۸ روز پس از واکسیناسیون) ۹ پرنده به ازای هر گروه با قطع ورید وداج، کشتار و در هنگام سر بریدن، نمونه خون در لوله آزمایش جمع‌آوری گردید.

جهت تهیه پادگن از محتویات روده طیور کشتار شده، از روش Wallach و همکاران در سال ۱۹۹۴ استفاده شد. به صورت خلاصه، پس از اطمینان ازهاگدار شدن، اُوسیست‌هابا محلول بافر فسفات نمکی با pH=۷/۲ و هیپوکلریت سدیم (۵/۷٪)، به ترتیب شستشو و ضدعفونی شدند. اُوسیست‌های شسته شده به صورت استریل و با استفاده از ساچمه‌های شیشه‌ای و ورتکس نمودن مکرر در مجاورت یخ، شکسته و مایع رویی حاوی پروتئین‌های آنتی ژنی، جمع‌آوری و بااستفاده از روش Warburger پروتئین سنجی شدند (۷). پادتن کونژوگه (peroxidase goat anti-chicken) و سوبسترای رنگی مورد استفاده (sulphonic acid-۶-ethylbenzthiazoline-۳-۲,۲'-azino-bis) بوده است. کنترل مثبت از سرم پرندگانی انتخاب گردید که با سویه مزرعه‌ای تلقیح شده و وجود ضایعات کوکسیدیایی با مشاهده علایم بالینی، با روش‌های هیسوپاتولوژیک و نیز با مشاهده اُوسیست در تخریش روده به اثبات رسیده بود. در مقابل کنترل منفی از سرم پرندگانی تهیه شده که با اُوسیست ایمریا مواجهه‌ای نداشته‌اند و این موضوع با روش‌های هیستوپاتولوژیک و جستجوی اُوسیست در مدفوع نیز مورد تأیید مجدد قرار گرفته بود.

به روش چکر بورد با استفاده از سرم‌های کنترل مثبت و منفی، بهترین غلظت آنتی ژن کوت شده و بهترین رقت سرمی، به ترتیب ۴µg به ازای هر گودهو ۱:۱۲۰۰ تعیین گردید. در پلیت‌های ۹۶ گوده‌ای الایزا، از هر ۴ گوده برای آزمایش یک نمونه سرمی‌استفاده شد؛ به طوری که گوده اول حاوی آنتی ژن و سرم مورد آزمایش، گوده دوم تنها حاوی آنتی ژن، گوده سوم فقط حاوی سرم و گونه چهارم تنها حاوی بافر فسفات نمکی با pH =۷/۲ بود. جذب نوریگوده‌ها با استفاده از دستگاه خواننده الایزا (Awarness, USA) با طول موج ۴۰۵nm قرائت گردید. لازم به ذکر است که همیشه در هر پلیت یک سرم کنترل مثبت و یک سرم کنترل منفی نیز وجود داشت.

افزایش وزن، شمارش اُوسیست‌های رودهو تعیین ضایعات روده‌ای: در هر گروه تغییرات وزن در طی ۷ روز، از روز ۱۴ تا ۲۱ روزگی، به عنوان افزایش وزن ثبت گردید. به منظور بررسی ارتباط احتمالی میان سطوح آنتی بادی‌های تولیدشده علیه کوکسیدیا با میزان دفع اُوسیست و ضایعات روده‌ای، در ۲۱ روزگی سه پرندهاز هر گروه ذبح گردیده ومحتویات روده‌ها جهت شمارش تعداد اُوسیست‌ها با لام مک مستر (۸) به آزمایشگاه منتقل گردیدند. برای بررسی جراحات روده‌ای، دستگاه گوارش از دئودنوم تا انتهای

رکتوم به صورت کامل از لاشه پرنده خارج و سطح مخاطی آن از نظر وجود ضایعات کوکسیدیایی در ۴ قسمت دئودنوم و ژوژنوم یا روده بالایی، روده میانی، روده پایینی یا ایلئوم و سکوم‌ها به صورت ماکروسکوپیک بررسی و امتیازدهی (صفر تا ۴) شدند (۳).

آنالیز اطلاعات: تجزیه و تحلیل داده‌ها در سن ۷ روزگی با روش t-test و در روز ۲۱ بر اساس آنالیز واریانس با روش GLM ($p<۰/۰۵$) و با کمک نرم‌افزار آماری SPSS۱۶ انجام گرفت.

نتایج

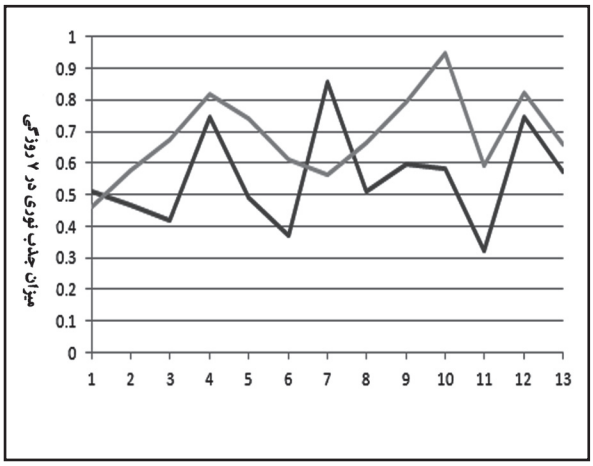
جدایه انتخاب شده جهت چالش، بر اساس اندیس شکل (عرض/طول) حاوی شش گونه رایج ایمریا (ایمریا آسرولینا ۴۰٪، ایمریا برونتی ۱۵٪، ایمریا ماکسیما ۲۵٪، ایمریا میتیس ۸٪، ایمریا تنلا ۶٪ و ایمریا نکاتریکس ۶٪) بود.

در ۷ روزگی (۳ روز پس از واکسیناسیون)، میانگین جذب نوری گروه واکسینه شده (۰/۶۸۷) با پرندگان غیرواکسینه (۰/۵۵۳) اختلاف آماری معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). حداقل و حداکثر جذب نوری در گروه‌های واکسینه شده به ترتیب ۰/۴۶۱ و ۰/۹۴۹ و در گروه‌های غیرواکسینه به ترتیب ۰/۳۲۱ و ۰/۸۵۸ بوده است (نمودار ۱).

نتایج جذب نوری و سایر پارامترهای ثبت شده در ۲۱ روزگی، در جدول۱ به صورت خلاصه نمایش داده شده است. میانگین جذب نوری در پرندگان گروه چالش شده بدون دریافت واکسن (۰/۸۷۴) با گروه‌های چالش شده با دریافت واکسن (۰/۶۶۲) و چالش نشده با دریافت واکسن (۰/۶۶۳) اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. میانگین جذب نوری گروه کنترل منفی چالش نشده بدون دریافت واکسن (۰/۳۳۱) اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها دارد. تعداد اُوسیست در پرندگان گروه کنترل واکسن $۰/۲۷\times۱۰^{۵}$، در گروه کنترل منفی صفر و فاقد اختلاف آماری معنی‌دار بوده است. این تعداد در گروه‌های آزمایش و شاهد آلوده بدون اختلاف آماری و به ترتیب $۱۳/۴۵\times۱۰^{۵}$ و $۱۴/۰۹\times۱۰^{۵}$ بوده است. بیشترین جراحات روده‌ای مربوط به گروه چالش شده بدون دریافت واکسن و در ناحیه سکوم بوده است (۳/۷۸). به جز در ناحیه روده بالایی و روده پایینی، در سایر قسمت‌های روده، شدت جراحات در پرندگان گروه چالش شده‌واکسینه شده به صورت معنی‌داری کمتر از گروه چالش شده غیرواکسینه بوده است. میانگین افزایش وزن در گروه‌های کنترل واکسن و کنترل منفی، به ترتیب ۳۴۰/۱۶g و ۳۷۱/۲۸ بوده است که با گروه‌های چالش شده دریافت کننده واکسن (۱۸۵/۲۵g) و چالش شده بدون دریافت واکسن (۱۶۳/۹۰g) دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند.

بحث

به‌نظر می‌رسد با توجه به بروز مقاومت به انواع ترکیبات ضدکوکسیدیایی،



نمودار ۱. میزان جذب نوری سرم در سن ۷ روزگی در دو گروه سیزده تایی جوجه‌های غیر آلوده- بدون واکسن و غیرآلوده- واکسینه شده در سن ۴ روزگی.
جوجه های واکسینه شده — جوجه های واکسینه نشده —

مهم‌ترین راه کنترل کوکسیدیوز در ماکیان طی سال‌های آینده القای ایمنی مناسب در این حیوانات باشد(۱۹). در دست داشتن اطلاعات کافی از واکنش و پاسخ ایمنی میزبان به انگل، برای انتخاب روش کنترلی مناسب، لازم به نظر می‌رسد. با توجه به این که الایزا روشی نسبتاً کم هزینه و دارای قابلیت بررسی تعداد بسیار زیاد نمونه به صورت همزمان می‌باشد، در این مطالعه تلاش شد با استفاده از روش الایزا، ایمنی هومورال قبل و پس از مصرف واکسن تخفیف حدت یافته لیواکوکس Q و نیز پس از چالش با یک جدایه مزرعه‌ای مورد بررسی قرارگیرد.

همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد، تنوع در حداقل و حداکثر میزان جذب نوری در ۷ روزگی در میان افراد گروه واکسینه شده و نیز در میان افراد گروه غیرواکسینه اختلاف زیادی را نشان می‌داد که این می‌تواند به علت تفاوت‌های فردی ناشی از ایمنی مادری منتقل شده از طریق زرده باشد. گزارش شده است که IgY (IgG) منتقل شده از طریق زرده می‌تواند ایمنی مناسبی علیه چالش با سویه همسان (هومولوگ) و ایمنی جزیی در چالش با سویه‌های غیرهمسان (هترولوگ) ایجاد نماید (۱۳،۱۶،۱۷). اخیراً نیز گزارش شده که ایمن نمودن جوجه‌های گوشتی به صورت خوراکی با استفاده از زرده‌هایپرایمن حاصل از چالش مرغان تخمگذار با سه گونه ایمریا تنلا، ایمریا ماکسیما و ایمریا آسرولینا، در ایجاد ایمنی غیرفعال مؤثر بوده است (۹،۱۰).

در میانگین جذب نوری نمونه‌های سرمی‌اخذ شده در سن ۲۱روزگی از گروه‌های آزمایش، کنترل واکسن و شاهد آلوده اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید که نشان دهنده این است که واکسیناسیون با اُوسیست‌های تخفیف حدت یافته، ایمنی هومورال را به اندازه چالش با اُوسیست‌های حاد، تحریک می‌نماید. در این مطالعه، ارتباط آماری معنی‌داری میان جذب نوری سرم و میزان دفع اُوسیست توسط پرندگان گروه آزمایش و گروه شاهد آلوده مشاهده نگردید. هرچند مطالعات in vivo نشان داده‌اند که مواجه نمودن انگل با آنتی بادی اثرات زیان باری مانند آگلوتیناسیون، لیز، خنثی سازی

جدول ۱. اثر واکسیناسیون† بر میزان آنتی بادی‌های هومورال و سایر پارامترهای رشد و بیماریزایی در پرندگان چالش شده ‡ و چالش نشده با جدایه مخلوط مزرعه‌ای ایمریا در ۲۱روزگی. حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار هستند (p<۰/۰۵). *D: دئودنوم و ژوژنوم یا روده بالایی،M: روده میانی؛ I: روده پایینی یا ایلئوم؛ C: سکوم‌ها؛ OPG: اُسیست در گرم. † واکسن لیواکوکس Q در ۳ روزگی به صورت داخل دهانی به جوجه‌ها خورانده شد. ‡ جدایه مخلوط ایمریا به میزان ۲۵۰۰۰۰ اُسیست به صورت داخل دهانی در ۱۴ روزگی به پرندگان چالش شده خورانده شد.

گروه	میانگین جذب نوری	میانگین OPG	میانگین امتیاز جراحات روده‌ای*				میانگین افزایش وزن (g)
			D	M	I	C	
چالش شده-دریافت کننده واکسن	۰/۶۶۲ a	۱۳/۴۵×۱۰^۵a	۲/۱۱ a	۱/۳۳ b	۱/۱۱ a	۲/۲۲ b	۱۸۵/۲۵ b
چالش شده-بدون دریافت واکسن	۰/۸۷۴ a	۱۴/۰۹×۱۰^۵a	۲/۴۴ a	۲/۱۱ a	۱/۰۰ a	۳/۷۸ a	۱۶۳/۹۰ b
چالش نشده –بدون دریافت واکسن	۰/۳۳۱ b	۰ b	۰ b	۰ c	۰ b	۰ c	۳۷۱/۲۸ a
چالش نشده – دریافت‌کننده واکسن	۰/۶۶۳ a	۰/۲۷×۱۰^۵b	۰/۲۵ b	۰/۱۶ c	۰ b	۰/۰۸ c	۳۴۰/۱۶ a

عفونت و تغییرات مورفولوژیک را به دنبال دارد (۱۴) ولی مطالعات دیگری نیز عدم وجود ارتباط میان میزان دفع اُسیست با سطح پادتن در سرم (۵،۱۱) و عدم وجود تطابق میان میزان آنتی بادی‌های سرم و دفع اُسیست و وجود همبستگی منفی میان میزان دفع اُسیست با پرولیفراسیون لمفاوی (۱۸) را نشان داده‌اند.

همانطور که از نتایج مشخص است واکسیناسیون به تنهایی اثر سوئی در القای ضایعات روده‌ای در قسمت‌های مختلف روده نداشته است ولی در پرندگان چالش شده، در سکوم و روده میانی شدت جراحات روده‌ای به صورت معنی‌داری کاهش یافته است. علیرغم این که جراحات روده‌ای به فراوانی در ارزیابی اثربخشی ترکیبات ضدکوکسیدیایی به کار می‌روند ولی وابسته بودن آن به فرد عامل، عدم افزایش آن به طور همزمان با افزایش تعداد اُسیست تلقیح شده به صورت خطی و نیز عدم همخوانی آن با افزایش وزن، استفاده از این معیار را با ملاحظات خاص همراه نموده است (۱،۴).

وجود اختلاف آماری معنی‌دار در میانگین افزایش وزن پرندگان گروه شاهد آلوده با گروه کنترل منفی نشان دهنده مناسب بودن دز چالش می‌باشد. واکسیناسیون در گروه‌های چالش نشده، تأثیر منفی بر افزیش وزن نداشته و میانگین افزایش وزن در دو گروه کنترل منفی و شاهد واکسن اختلاف آماری معنی‌داری نشان نمی‌دهند. میانگین افزایش وزن گروه چالش شده با دریافت واکسن اختلاف آماری معنی‌داری با گروه چالش شده بدون دریافت واکسن نداشته است. هرچند Williams و Catchpole در سال ۲۰۰۰ اعلام کرده‌اند که افزایش وزن در پرندگان واکسینه شده در دوره ۷ روزه پس از چالش با جدایه واجد یک گونه حاد کوکسیدیا، شواهد کافی از ایمن بودن پرندگان را نشان می‌دهد، ولی از آنجا که پرندگان در سیستم قفس شانس اندکی برای مواجهه با مدفوع، به عنوان منبعی از اُسیست‌های تخفیف حدت یافته، دارند، ایمنی در آنها به صورت کامل شکل نمی‌گیرد.

در مجموع، به نظر می‌رسد اهمیت اقتصادی کوکسیدیوز در صنعت پرورش طیور به اندازه‌ای است که ایمن سازی ماکیان در برابر این بیماری، از دیر باز هدف عده زیادی از محققین بوده است. اگرچه مشخص شده است که آنتی بادی‌های اختصاصی کوکسیدیا متعاقب عفونت، در سرم افزایش می‌یابند اما نقش آنها در حفاظت علیه انگل، به دلیل رشد مراحل مختلف آن در روده مشخص نمی‌باشد. از سوی دیگر به دلیل وجود پادگن‌های مشترک در گونه‌های مختلف مراحل مهاجم انگل و در نتیجه رویداد واکنش متقاطع میان پادتن تولید شده توسط یک گونه با سایر گونه‌ها، الایزا نمی‌تواند گونه عامل مسبب کوکسیدیوز را شناسایی نماید؛ ولی از آنجا که در سطح مزرعه معمولاً عفونت ایمریایی به صورت چند گونه‌ای رخ می‌دهد و نیز به دلیل همزمانی حضور پادتن با ایمنی محافظت کننده سلولی در کوکسیدیوز، اهمیت و کاربرد الایزا در ارزیابی و پایش وضعیت ایمنی یا عفونت درگله غیرقابل انکار است (۲).

بر اساس مطالعه حاضر می‌توان گفت با توجه به کم هزینه بودن الایزا و قابلیت بالای آن در بررسی تعداد بسیار زیاد نمونه به صورت همزمان، می‌توان از الایزا در پایش وضعیت ایمنی گله‌ها پس از واکسیناسیون استفاده نمود. همچنین مشخص گردید که استفاده از واکسن زنده تخفیف حدت یافته، اثری مشابه چالش با اُسیست حاد بر ایمنی داشته و سبب افزایش میزان پادتن‌ها در سرم می‌گردد. به علاوه استفاده از واکسن روی شاخص‌هایی مانند ضایعات روده‌ای، که در ارزیابی بیماریزایی و آسیب‌شناسی کوکسیدیا کاربرد دارند، دارای اثر مهارکنندگی قابل توجهی است که می‌تواند در کاهش خسارات ناشی از بیماری مؤثر باشد. البته چالش با جدایه حاوی یک گونه و استفاده از سویه‌های هومولوگ و هترولوگ می‌تواند اطلاعات بیشتری از ایمنی‌زایی واکسن‌های رایج در کشور فراهم نماید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شده و مؤلفین مراتب قدرانی و تشکر خود را از این معاونت اعلام می‌دارند.

References

1. Chapman, H.D. (1989) Sensitivity of field isolates of *Eimeria tenella* to anticoccidial drugs in the chicken. Res Vet Sci. 47: 125-128.
2. Constantinoiu, C.C., Molloy, J.B., Jorgensen,

W.K., Coleman, G.T. (2008) Antibody response against endogenous stages of an attenuated strain of *Eimeria tenella*. Vet Parasitol. 154: 193-204.

3. Conway, D.P., McKenzie, M.E. (2007) Poultry Coccidiosis Diagnosis and Testing Procedures, (3rd ed.) Blackwell Publishing, Iowa, USA. p. 41-49.
4. Conway, D.P., McKenzie, M.E., Dayton, A.D. (1990) Relationship of coccidial lesion scores and weight gain in infections of *Eimeria acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* in broilers. Avian Pathol. 19: 489-496.
5. Gilbert, E.R., Cox C.M., Williams, P.M., McElroy, A.P., Dalloul, R.A., Ray,W.K., Barri, A., Emmerson, D.A., Wong, E.A., Webb, Jr.K.E. (2011) *Eimeria species* and genetic background influence the serum protein profile of broilers with coccidiosis. PLoS ONE. 6: e14636. doi:10.1371/journal. pone. 0014636
6. Holdsworth, P.A., Conway, D.P., McKenzie, M.E., Dayton, A.D., Chapman, H.D., Mathis, G.F., Skinner, J.T., Mundt, H.C. and Williams, R.B. (2004) World association for advancement of veterinary parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in chickens and turkeys. Vet Parasitol. 121: 189-212.
7. Hudson, H.P., Hay, F.C. (1989) Practical Immunology. (3rd ed.) Blackwell Publishing, Oxford, London, UK.
8. Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Dalloul, R.A., Park, D. W., Hong, Y.H., Lin, J.J. (2007) Influence of Pediococcus-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. Poult Sci. 86: 63-66.
9. Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Park, D.W., Jang, S.I., Morales, A., García, D., Lucio, E., Larios, R., Victoria, G., Marrufo, D., Lillehoj, E.P. (2009) Induction of passive immunity in broiler chickens against Eimeriaacervulina by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. Poult Sci. 88: 562-566.
10. Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Park, D.W., Jang, S.I., Morales, A., Garcia, D., Lucio, E., LArios, R., Victoria, G., MArrufo, D., Lillehoj, E.P. (2009) Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria-maxima* infections. Vet parasitol. 163: 123-126.
11. Lillehoj, H.S. (1989) Intestinal intraepithelial and splenic natural killer cell responses to eimerian infections in inbred chickens. Infect Immune. 57: 1879-1884.
12. Lillehoj, H.S. (1996) Immunity and host genetic based control strategies for avian coccidiosis. Poult Sci. 35: 294-301.
13. Rose, M.E. (1972) Immunity to coccidiosis: maternal transfer in *Eimeria maxima* infections. Parasitol. 65: 273-282.
14. Rose, M.E., Hesketh, P. (1982) Immunity to coccidia in chickens: adoptive transfer with peripheral blood lymphocytes and spleen cells. Parasite Immunol. 4: 171-185.
15. Rose, M.E. (1973) Immunity to Emeriabrunetti and *Eimeria maxima* infections in the fowl. Parasitology. 57: 363-370.
16. Smith, N.C., Wallach, M., Miller, C.M., Morgenstern, R., Braun, R., Eckert, J. (1994) Maternal transmission of immunity to *Eimeria maxima*: enzyme-linked immunosorbent assay analysis of protective antibodies induced by infection. Infect immune. 62: 1348-1357.
17. Smith, N.C., Wallach, M., Petracca, M., Braun, R., Eckert, J. (1994) Maternal transfer of antibodies induced by infection with *Eimeria maxima* partially protects chickens against challenge with *Eimeria tenella*. Parasitology. 109: 551-558.
18. Talebi, A., Mulcahy, G. (1995) Correlation between immune responses and oocyst production in chickens monospecifically infected with *Eimeria maxima*. Avian Pathol. 24: 485-495.
19. Wallach, M. (2010) Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis. Trends parasitol. 26: 382-387.
20. Wallach, M., Smith, N.C., Miller, C., Eckert, J. (1994) *Eimeria maxima*: ELISA and western blot analysis of protective sera. Parasite Immunol. 16: 377-383.
21. Williams, R.B., Catchpole, J. (2000) A new protocol for a challenge test to assess the efficacy of live anticoccidial vaccines for chickens. Vaccine. 18: 1178-1185.

Analysis of humoral immunity in broilers challenged with *Eimeria* prior to and following anticoccidial vaccination, by means of ELISA

Nabian, S.[1], Arabkhazaeli, F.[1*], Kefayati, M.H.[1], Modirsanei, M.[2]

[1]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*
[2]*Department of Animal and Poultry Health and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 10 May 2015, Accepted 22 Juan 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Despite the use of prophylactic chemotherapy and vaccination, coccidiosis is still one of the most devastating diseases in poultry industry. Understanding the immune mechanism helps researchers to prevent this parasitic infection more effectively. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to evaluate the antibody response in chickens, induced by a live attenuated vaccine (Livacox Q), before and after challenge, by means of ELISA. **METHODS:** One hundred and twenty one-day-old male Ross 308 broiler chicks were randomly divided into 4 groups of 30 birds. In 4th day of age, half the birds were orally vaccinated. The challenged groups received the infective dose at 14th day of age via oral administration. Besides recording weight gain, lesion score and oocyst count in 21st day old birds, humoral immunity was assessed by means of ELISA on serum samples taken from 7 and 21day-old birds. **RESULTS:** Three days post vaccination, the average of optical density (OD) showed significant difference between vaccinated (0.553) and unvaccinated (0.686) birds ($p \leq 0.05$). In 21 day-old birds, the OD of unvaccinated-unchallenged (negative control) groups (0.331) differed significantly with vaccinated-unchallenged (0.663) birds. The average of lesion score in vaccinated-challenged birds (2.22) showed significant dissimilarity with unvaccinated-challenged groups. No difference and correlation were observed in comparing average of weight gain and oocyst count with serum optical density among treatment and control groups. **CONCLUSIONS:** The results indicated that ELISA can be used for evaluating immunity uniformity of a flock after vaccination. Besides inducing antibody responses comparable to challenge with wild oocysts, vaccination with live attenuated coccidiosis vaccines may have inhibitory effects in intestinal lesion scores which are responsible for pathogenesis and economic loss during coccidial infections.

Keyword: anticoccidial vaccine, coccidiosis, humoral immunity, poultry *Eimeria*

Figure Legends and Table Captions

Graph 1. Serum optical density in 7 day-old chickens in two groups of 13 unvaccinated-unchallenged and vaccinated-unchallenged chickens.

Table 1. Effect of vaccination † on humoral antibody levels and performance and pathogenesis parameters in birds challenged ‡ and unchallenged with mixed Eimeria isolate on day 21.

***Corresponding author's email: farab@ut.ac.ir, Tel: 021-61117049, Fax: 021-66933222**