DOI: 10.22092/vj.2019.126890.1595
شماره ۱۲۹ زمستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

جداسازی، شناسایی و تعیین هویت مولکولی گونه های آیمریا در گوساله ها

• **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: ۲۴-۰۴-۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۰۶-۰۷-۱۳۹۸
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 شیتر 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 شیتر 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 تکیاخته‌جنس 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>۰/۰۵). 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 اوبورننسیس 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 diarretic 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 diarrheic status of the calves (P>0.05). According to microscopic analsis 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

مقدمه

کوکسیدیوزیس گاوی بیماری است که توسط عفونت آیمریا در گاو ایجاد می‌شود و از نظر اقتصادی مهم‌ترین بیماری گاو در سرتاسر جهان است. گوساله‌های در سنین مابین ۳ هفته تا ۶ ماه عموما علایم 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 آیمریا 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 آیمریا آلابامنسیس، آیمریا اوبورننسیس، آیمریا بوویس، آیمریا الیپسوئیدالیس و آیمریا زورنئی پاتوژن تشخیص داده شده‌اند و البته آیمریا بوویس و آیمریا زورنئی بسیار پاتوژن هستند تا جایی که آن‌ها معمولا مدفوع 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 آیمریا از میزبان های 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 هوائی خشک تا نیمه خشک حاکم بر اکثر مناطق کشور به خصوص در مناطق شمال غرب و غرب، آلودگی گاوها با گونه‌های مختلف آیمریا مطرح است (۱۹).

علائم کلینیکی کوکسیدیوزیس تقریبا در تمامی موارد به واسطه رشد انگل در قسمت انتهایی ایلئوم،سکوم وکولون 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 اواوسیست‌ها تنها روش عملی برای تشخیص گونه‌های کوکسیدیای گاوی است و هرچند، روش مورفولوژیکی کاملا قابل اعتماد نیست زیرا چندین گونه دارای ویژگی‌های گیج کننده 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 و ثبت اطلاعات دموگرافیك 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 واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، ابتدا وضعیت فیزیکی و قوام مدفوع را بررسی کرده و آن را در برگه مخصوص ثبت نموده و برای جستجوی اواوسیست‌ها 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 یك لوله سانتریفوژ ریخته شده و سپس تا سه چهارم لوله از محلول قندی پر شده و به شدت به هم زده و ۳ دقیقه با دور g ۵۰۰ سانتریفوژ گردید (۶). با استفاده از یک پیپت پاستور اواوسیست‌ها 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 بزرگنمایی‌های۱۰، ۴۰ و ۱۰۰ عدسی شیئی مشاهده گردید و پس از تغلیظ اواوسیست‌ها 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 اواوسیست تغلیظ شده و شسته شده با سرم‌فیزیولوژی را در یك میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته، سپس با g۱۰۰۰۰ به مدت

جدول۱- برنامه مراحل PCR مورد استفاده جهت تکثیر ناحیه ITS-۱ جنس آیمریا (۳۴۸-۵۴۶ bp)، (۱۰).

مرحله سیکل	واسرشت	اتصال	پلیمریزاسیون یا طویل شدن	تعداد سیکل ها
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

۵ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع‌رویی دور ریخته شد. ۲۵۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده به لوله اضافه شده و کاملاً مخلوط شد. سپس با۱۴۰۰۰g 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 یك شب در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد (جهت هضم پروتئین‌ها و اتصالات بین سلولی) انکوبه شد. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر محلول فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) به لوله اضافه کرده و لوله به آرامی یك دقیقه سر و ته شد.سپس به مدت یك 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- ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه و لوله به آرامی سر و ته شده، سپس در ۱۰۰۰۰ g به مدت یك 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 میکرولیتر اتانول سرد به آن اضافه شد. اتانول باعث آب‌گیری نمونه و رسوب DNA می‌گردد. لوله حاوی DNA به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر۷۰- 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 خشك 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 آیمریا و گونه‌های آن انجام واکنش‌های PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام پذیرفت (۱۰). به جهت طراحی پرایمرهای عمومی در حد جنس انگل آیمریا و با هدف تکثیر بخش‌هایی از DNA که حاوی تمام ناحیه ITS-۱ از گونه‌های مختلف آیمریا باشد، توالی‌های پایدار از انتهای ´۳ ژن‌های ۱۸S rRNA و

جدول ۲- توالی پرایمرهای اینترنال اختصاصی گونه جهت جداسازی گونه های آیمریا، (۱۰).

قطعه تکثیر شده (bp)	توالی پرایمر اینترنال	
۱۸۴	CATTCACACATTGTTCTTTCAG GCTTCCAAACTAATGTTCTG	آیمریا آلابامنسیس(E. alabamensis)
۲۹۵	TAAATTGGTGCGATGAGGGA GCAATGAGAGAAAGATTTAATA	آیمریا اوبورننسیس (E. auburnensis)
۲۳۸	TCATAAAACATCACCTCCAA ATAATTGCGATAAGGGAGACA	آیمریا بوویس(E. bovis)
۳۰۴	GACATTTAAAAAACCGATTGGT GGCTGCAATAAGATAGACATA	آیمریا سیلندریکا (E. cylindrica)
۱۴۸	CAACGTTTTTCCTTTTCCTATCA ACTGCGATGAGAGAGAGCG	آیمریا الیپسوئیدالیس(E. ellipsoidalis)
۳۴۳-۴	AACATGTTTCTACCCACTAC CGATAAGGAGGAGGACAAC	آیمریا زورنئی (E. zuernii)

انتهای ´۵ ژن‌های ۵,۸S rRNA 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 آیمریا 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 آیمریا 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 آیمریا آلابامنسیس، آیمریا اوبورننسیس، آیمریا بوویس، آیمریا سیلندریکال، آیمریا الیپسوئیدالیس و آیمریا 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 استفاده از روش گسترش مستقیم و تغلیظ به روش فلوتاسیون شیتر در ۵ نمونه (۱۰٪) از ۵۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از شاهرود تک‌یاخته جنس آیمریا 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>۰/۰۵). 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>۰/۰۵). از نظر توزیع فصلی تفاوتی در میزان موارد اسهالی و موارد مثبت انگلی مشاهده نشد.

یافته‌های بررسی مولکولی

نمونه هایی که به واسطه روش تغلیظ با فلوتاسیون آب شکر مثبت تشخیص داده شده بودند با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی گونه‌های آیمریا 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 اواوسیست‌ها و استخراج DNA انگل کفایت نمود. جهت PCR به منظور تفکیک گونه‌ها ازجفت پرایمرهای اختصاصی استفاده شد (۱۰) که جهت جداسازی انگل آیمریا در حد جنس (شکل ۱)

جدول۳- برنامه مراحل PCR مورد استفاده جهت تکثیر ناحیه اختصاصی گونه هایآیمریا، (۱۰).

مرحله سیکل	واسرشت	اتصال	پلیمریزاسیون یا طویل شدن	تعداد سیکل ها
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	۳۵
سیکل نهایی	----	----	۷۲ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه	۱

و جداسازی گونه‌های آیمریا (شکل ۲) استفاده گردید.
در بررسی مولکولی تنها ۳ گونه آیمریا زورنئی،آیمریا اوبورننسیس و آیمریا 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 آیمریا در شاخه آپی کمپلکسا ایجاد می‌شود. این تک یاخته چرخه زندگی مستقیم داشته و آلودگی با آن به دلیل تولید و دفع اواوسیست‌های مقاوم اتفاق می‌افتد (۱۹). بیماری از حیوانی به حیوان دیگر از طریق تماس با مدفوع و بلع اواوسیست 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 درحیوانات 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 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 عموما به کوکسیدیا حساس می‌باشند. یک گونه از آیمریا به تنهایی و یا به همراه با سایر گونه‌های بیماری‌زا ممکن است ایجاد بیماری نماید ولی ندرتا 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 تاثیری داشته باشند. شروع دفع اواوسیست گونه‌های مختلف آیمریا در گوساله‌ها از سن ۳ هفتگی می‌باشد. با توجه به اینکه دوره اختفای آیمریا 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 اواوسیست‌ها تنها روش عملی برای تشخیص گونه‌های کوکسیدیای گاوی بوده ،ولیکن این روش‌های مورفولوژیکی کاملا قابل اعتماد نبوده و چندین گونه دارای ویژگی‌های

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

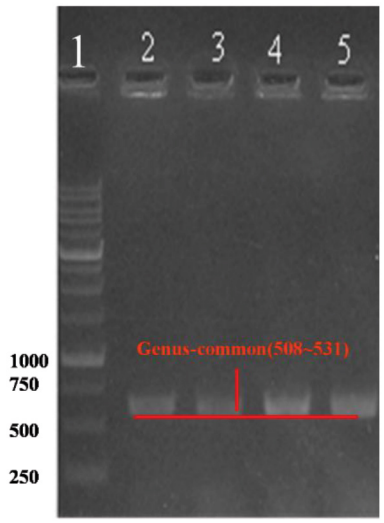
منطقه نمونه گیری	تعداد نمونه	جنسیت دام		فصل نمونه گیری				سن گوساله ها	
		نر	ماده	بهار	تابستان	پاییز	زمستان	زیر یک ماه	بالای یک ماه
البرز	۱۱۰	۵۰	۶۰	۳۰	۲۵	۲۵	۳۰	۹۰	۲۰
شاهرود	۵۰	۲۰	۳۰	۱۰	۱۵	۱۰	۱۵	۲۰	۳۰
مجموع	۱۶۰	۷۰	۹۰	۴۰	۴۰	۳۵	۴۵	۱۱۰	۵۰

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

منطقه نمونه گیری	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

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 RNA ریبوزومی (rRNA) کوکسیدیای گاوی 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 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.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR نمونه های مورد آزمایش با پرایمرهای اختصاصی جنس که نشان دهنده حضور آیمریاهای موجود در گاو می باشد. ستون سمت چپ لدر ۱kbمی باشد.

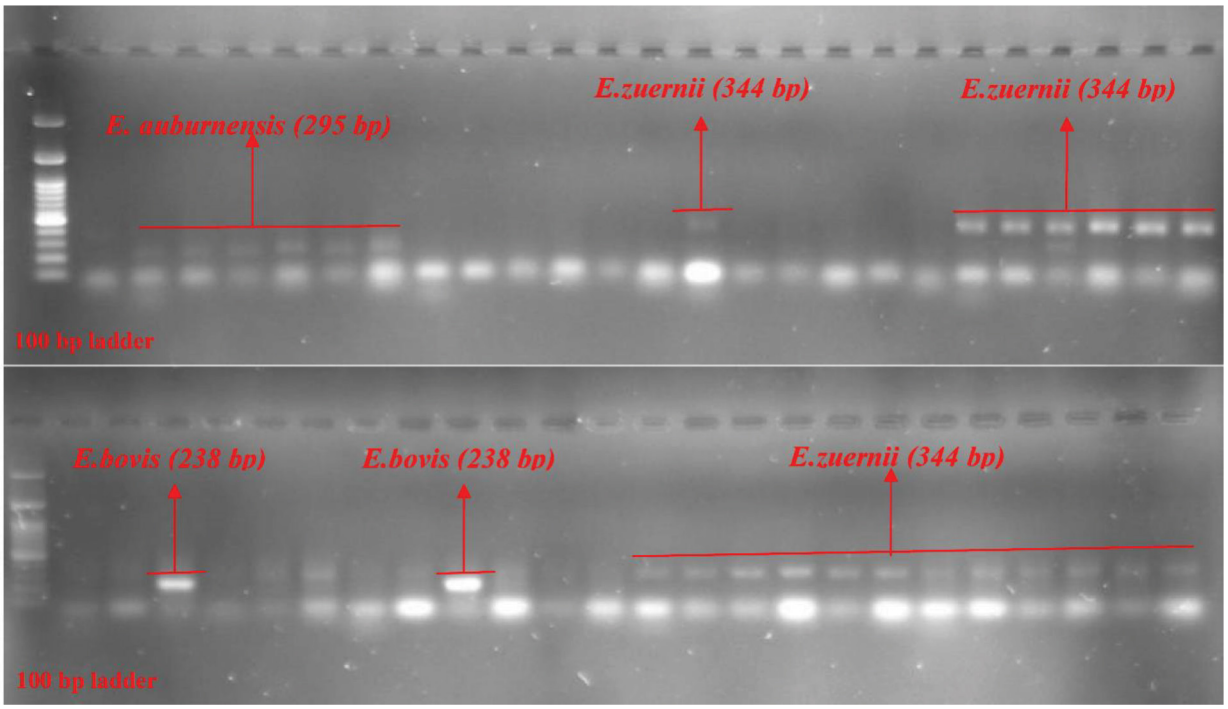
مطالعات بسیاری در سایر کشورها در زمینه‌های مختلف اپیدمیولوژی بیماری صورت پذیرفته ولیکن در ایران مطالعات تنها محدود به بررسی و تعیین گونه‌های عامل بیماری با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیکی بوده است. در تحقیقی شجاعی و همکاران در زمینه بررسی میزان شیوع کوکسیدیوزیس در تعدادی از گاوداری‌های صنعتی استان البرز 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 تقریبا 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 زورنئی 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 اواوسیست کوکسیدیایی بودند. آلودگی‌های مخلوط نیز در ۱۵/۷٪ از نمونه‌ها وجود داشت که آیمریا زورنئی و آیمریا بوویس در بیشتر نمونه‌ها موجود بودند. گونه‌های یافت شده در مطالعه وی و همکاران شامل آیمریا ویومینجنسیس، آیمریا زورنئی، آیمریا سیلیندریکا، آیمریا الیپسوئیدالیس، آیمریا بوویس و آیمریا اوبورننسیس بودند (۸). علی و همکاران در سال ۱۹۸۹ گزارش دادند که شیوع کوکسیدیوزیس

جدول ۶- میزان فراوانی گونه های جداسازی شده در نمونه های مورد بررسی به روش مولکولی.

منطقه نمونه گیری	تعداد نمونه	تعداد کل موارد مثبت	آیمریا بوویس	آیمریا زورنئی	آیمریا اوبورننسیس
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 ٪)

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 آیمریا آلابامنسیس می‌باشد (۱۷). در نمونه‌گیری‌هایی که ارسلان و همکاران در سال ۱۹۹۸ در بخش‌های اروپایی ترکیه انجام دادند ۳۶ ٪ از کل نمونه‌ها از نظر آیمریا بوویس و ۲۶٪ از نظر آیمریا زورنئی مثبت بودند (۲).

در ایران نیز با توجه به شرایط آب و هوائی خشک تا نیمه خشک حاکم بر اکثر مناطق کشور به خصوص در مناطق شمال غرب و غرب، آلودگی گاوها با گونه‌های مختلف آیمریا مطرح است. مطالعات یخچالی و همکاران در خصوص شیوع آلودگی‌های آیمریایی در مناطق غرب و شمال غرب ایران نیز بیانگر این واقعیت است (۱۹). در مطالعه‌ای که در مورد آلودگی آیمریایی گاوهای شیری در دامداری‌های صنعتی اطراف کنگاور در استان کرمانشاه انجام پذیرفت نشان داده شد که با توجه به ریخت شناسی و مورفومتریک انگل جنس آیمریا، در مجموع ۷ گونه شناسایی شده است، به طوری که در کل دوره مطالعه بیشترین و کمترین فراوانی را به ترتیب گونه‌های آیمریا زورنئی (۲۸/۲۵٪) و آیمریا الیپسوئیدالیس (۷٪) داشتند (۱۹). در ایران، آلودگی گاو به گونه‌های آیمریا در دامداری‌های اطراف شهرستان تبریز ۴۶/۲٪ گزارش گردید که گونه غالب آیمریا در این تحقیق آیمریا وایومینجنسیس (۲۵٪) بود (۲۱) در صورتی که میزان شیوع آلودگی در گاوداری‌های اطراف شهرستان سنندج ۲۱/۳٪ بود که در این مطالعه آیمریا وایومینجنسیس (۳۰٪) گونه غالب از میان هشت گونه آیمریای شناسایی شده در گاوهای بدون علایم کوکسیدیوزیس بالینی در گاوداری‌های شهرستان سنندج بود. در این مطالعه علیرغم آلودگی گاوها به آیمریا زورنئی 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 آیمریا بوویس (۲۳/۷٪) و آیمریا زورنئی (۱۹/۲٪) و هفت گونه غیر پاتوژن آیمریا کانادنسیس (۱۲/۶ ٪)، آیمریا الیپسوئیدالیس (۱۱/۴٪)، آیمریا آلابامنسیس (۱۰/۴٪)، آیمریا پلیتا (۹/۱٪)، آیمریا اوبورننسیس (۶/۸ ٪)، آیمریا سیلیندریکا (۴/۶٪) و آیمریا بوکیدوننسیس (۲/۳٪) مشاهده گردید (۷). بنابراین ملاحظه می‌کنیم که میزان آلودگی آیمریایی در گاوداری‌های سایر نقاط جهان بویژه در کشورهای حاصلخیز که دارای



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR نمونه های مورد آزمایش با پرایمرهای اختصاصی گونه که نشان دهنده حضور سه گونه آیمریا زورنئی، آیمریا بوویس، و آیمریا اوبورننسیسمی باشد. ستون سمت چپ لدر ۱۰۰ bpمی باشد.

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 آیمریایی 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 مونسین 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 آیمریایی گاو و نیز توزیع فصلی و تنوع گونه‌ای آیمریا 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 علایم بالینی مشاهده گردیدند. در این تحقیق برای اولین بار در ایران بررسی مولکولی گونه‌های آیمریای 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 ۹۴۰۰۳-۹۴۵۹-۱۸-۱۸-۱۲تامین مالی و علاوه بر آن فضا و تجهیزات آزمایشگاهی نیز توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی 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 eimeridosis in Thracia, Turkey. T*urkish 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. 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 oocyts. 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. *Veterinarni 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 Ei m e ria 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 Coccidioses 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., & Wadeh, 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., Uggla, A., & Pehrson, B. 1994. Eimeria alabamensis infection as a cause of diarrhoea in calves at pasture. *Veterinary Parasitology*, 53(1–2), 33–43.

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., & Zareei, 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.