بررسی اولیه ایمنی‌زایی اسپوروزوآیت و مروزوآیت *ایمریا تنلا* در ماکیان

دکتر سیدمصطفی رضوی‌دینانی[1] دکتر صادق رهبری[2]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۳، ۴-۱، (۱۳۷۹)

کوکسیدیوز یکی از مهمترین بیماریهای اقتصادی صنایع پرورش ماکیان در دنیاست. در حال حاضر شیمی درمانی مهمترین روش کنترل و پیشگیری از این بیماری می‌باشد. اخیراً تلاشهایی در جهت القاء ایمنی در برابر کوکسیدیوز پرندگان صورت گرفته و چند واکسن زنده تخفیف حدت یافته به‌صورت تجاری به بازار عرضه شده‌اند. مطالعهٔ حاضر به‌منظور بررسی ایمنی‌زایی اسپوروزوآیت و مروزوآیت *ایمریا تنلا* از راه تلقیح داخل رکتوم انجام شده است. تعداد صد قطعه جوجه یکروزه نژاد تخمی به پنج گروه بیست‌تایی تقسیم شدند. چهار گروه از جوجه‌ها با مقادیر کم و زیاد اسپوروزوآیت و مروزوآیت و گروه پنجم (گروه شاهد) با بیست میکرولیتر محیط استریل هنکس تلقیح گردیدند. همه جوجه‌های ایمن شده و غیرایمن به‌وسیله ده هزار اواوسیست *ایمریا تنلا* (سویه متجانس) در سن سه هفتگی چالش شدند. مدفوع پرنده‌ها به‌صورت روزانه تا ۸ روز پس از دوره پیش‌آشکاری مورد آزمایش قرار گرفت و متوسط تعداد اواوسیست در گرم (OPG) در هر گروه محاسبه شد. نتایج حاصله اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) را بین پرندگان ایمن شده به‌وسیله اسپوروزوآیت و گروه شاهد نشان داد. به‌علاوه اختلاف معنی‌داری بین پرندگان ایمن‌شده با دز بالای مروزوآیت و گروه شاهد مشاهده شد. هیچ اختلاف معنی‌داری بین جوجه‌های ایمن‌شده با دز پایین مروزوآیت و گروه شاهد وجود نداشت. جوجه‌های ایمن‌شده با اسپوروزوآیت محافظت بالاتری را نسبت به گروه ایمن‌شده با مروزوآیت نشان دادند. یافته‌ها نشان داد که تشکیل و بلوغ شیزونت نسل اول *ایمریا تنلا* نقش مهمی در القاء پاسخ ایمنی دارد. انجام تجربه در شرایط مزرعه مؤید محافظت طولانی مدت در اثر تلقیح دز پایین اسپوروزوآیت بود که به‌نظر می‌رسد به‌علت بلع اواوسیست‌ها و عرضه پادگنی مداوم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : اسپوروزوآیت، مروزوآیت، *ایمریا تنلا*، کوکسیدیوز ماکیان.

کوکسیدیوز ماکیان از جمله مهمترین بیماریهای اقتصادی در صنعت پرورش طیور می‌باشد. این بیماری با بروز علایم بالینی و تلفات یا بدون ایجاد علایم بالینی مشخص با افت تولید، کاهش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذا خسارات قابل توجهی را به تولیدکنندگان وارد می‌سازد. از طرفی هزینه ناشی از درمان و پیشگیری نیز قابل توجه است (۲۷ و ۱۵).

در حال حاضر شیمی درمانی مهمترین راه درمان و کنترل و پیشگیری است. سالانه میلیونها دلار برای خرید داروهای ضدکوکسیدیوز هزینه می‌شود که با توجه به شرایط دشوار اقتصادی و کمبود منابع ارزی کشور، رقمی قابل توجه و در خور تأمل است. علی‌رغم تلاشهای گسترده جهانی در زمینه ساخت واکسن هنوز واکسن کاملاً مؤثر و مقرون به صرفه اقتصادی عرضه نشده است. واکسنهای فعلی شامل مخلوطی از اواوسیست‌های گونه‌های مهم ایمریا هستند که با تابش اشعه یا پاساژهای متوالی تخفیف حدت یافته‌اند (۳۱، ۲۵، ۲۱، ۱۴). تحقیقات جدید در خصوص ساخت واکسنهای نوین شامل شناسایی پادگنهای ایمنی‌زای مراحل مختلف سیر تکاملی و تولید واکسنهای نوترکیب می‌باشد اما هنوز چنین واکسنهایی در حد تجاری عرضه نشده‌اند (۳۰، ۲۹، ۲۲، ۱۳، ۵). شناسایی دقیق پاسخهای ایمنی در برابر انگل و ارزیابی ایمنی‌زایی مراحل مختلف سیر تکاملی، اولین گام بنیادین در مسیر ساخت واکسن خواهد بود. مطالعه حاضر برای اولین بار در کشور به ارزیابی ایمنی حاصل از دو مرحله اسپوروزوآیت و مروزوآیت *ایمریا تنلا* می‌پردازد. راه داخل رکتومی از این جهت انتخاب گردیده، است که اولاً مراحل مذکور به‌عنوان پادگنهای زنده با ایجاد عفونت ملایم و برقراری چرخه حیاتی انگل، موجب راه‌اندازی پاسخهای ایمنی میزبان می‌شوند و ثانیاً این روش از نظر تجاری جنبه کاربردی داشته و هنگام تعیین جنسیت در کارخانه جوجه‌کشی قابل اجراست.

مواد و روش کار

۱ - جداکردن تک اواوسیست : در این مطالعه به‌منظور جداکردن تک‌اواوسیست از روش تعدیل یافته لی (۱۹۷۹) استفاده گردید (۱۹). اواوسیست مورد استفاده از سویه زیاران انتخاب گردید.

۲ - ایجاد آلودگی تجربی و جداسازی اواوسیست‌های دفع‌شده : تک اواوسیست جداشده از راه داخل چینه‌دانی به جوجه با سن یک هفته تلقیح شد و پس از ۱۶۸ ساعت به‌مدت یک هفته مدفوع دفع شده جمع‌آوری و اواوسیست‌های موجود به روش شناورسازی با آب شکر (چگالی ۱/۲۰) جمع‌آوری گردیدند و در محلول بی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد قرار گرفتند (۱۰ و ۷).

۳ - هاگدارکردن اواوسیست‌ها : سوسپانسیون محتوی اواوسیست به‌مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۲۸ درجه سانتیگراد قرار داده شد و عمل هوادهی با پمپ آکواریوم انجام گرفت.

۴ - تکثیر و نگهداری اواوسیست‌ها : اواوسیست‌های هاگدار شده به سی قطعه جوجه با سن دو هفته تلقیح و مدفوع آنها به روش گفته شده (مرحله ۲) جمع‌آوری و اواوسیست‌های موجود جدا شدند. کلیه اواوسیست‌ها با روش گفته شده (مرحله ۳) هاگدار گردیدند و تا زمان مصرف در محلول ۲/۵ درصد بی‌کرومات پتاسیم و در شرایط یخچال (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند.

۵ - تهیه و خالص‌سازی اسپوروزوآیت : به‌منظور تهیه اسپوروزوآیت از روش هافمن و ریدر (۱۹۹۰) استفاده شد (۱۲). این روش شامل مراحل ضدعفونی‌کردن اواوسیست با هیپوکلریت سدیم تجاری، شکستن دیواره اواوسیست و تولید اسپوروسیست با استفاده از ضربات مکانیکی، انتقال اسپوروسیست‌ها به محیط شکوفایی (Excysting Medium) شامل محیط هنکس (pH=۷/۸)، تریپسین (۰/۴ درصد)، صفرای گاو (۸ درصد) و انکوباسیون در حرارت ۴۱ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت می‌باشد. به‌منظور خالص‌سازی اسپوروزوآیت‌ها و جداسازی آنها از بقایای دیواره اواوسیست و اسپوروسیست از روش دیویس (۱۹۷۳) استفاده گردید (۷). اسپوروزوآیت‌ها تا زمان مصرف در محیط هنکس و شرایط یخچال نگهداری شدند.

۶ - تهیه و خالص‌سازی مروزوآیت نسل اول : برای این منظور مطابق با روش دانفورس (۱۹۸۶) ابتدا پنج قطعه جوجه سه هفته هر کدام با ۴۰ هزار اواوسیست هاگدار *ایمریا تنلا* (سویه متجانس) تلقیح و پس از ۷۲ ساعت ذبح و بافت روده کور در PBS شستشو داده شد. قطعات خردشده بافت به محیط DMEM منتقل و به‌مدت ۴۵ دقیقه به‌وسیله همزن مغناطیسی تکان داده شد تا شیزونت‌های نسل اول پاره شده و مروزوآیت‌ها در داخل محیط رها شوند (۴). برای خالص‌سازی مروزوآیت‌ها نیز از روش گفته شده (مرحله ۵) استفاده گردید.

۱) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.
۲) گروه آموزشی انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

مروزوآیت‌های حاصله تا زمان مصرف در محیط هنکس و شرایط یخچال نگهداری شدند.

۷ - مطالعه ایمنی‌زایی اسپوروزوآیت و مروزوآیت در شرایط قفس : تعداد یکصد قطعه جوجه یکروزه نژاد تخمی به ۵ گروه ۲۰ تایی تقسیم شدند. عمل تلقیح به‌صورت داخل رکتومی و با استفاده از میکروپی‌پت اتوماتیک صورت گرفت. مقادیر تلقیح‌شده به گروهها از نظر حجم یکسان (۰/۰۲ میلی‌لیتر) و شامل ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ مروزوآیت و ۱۰۰۰ و پیش‌آشکاری به‌مدت ۸ روز جمع‌آوری و اواوسیست‌های موجود در آن به‌روش Clayton-lane شمارش گردید.

۸ - مطالعه ایمنی‌زایی اسپوروزوآیت در شرایط بستر : تعداد ۵۰ قطعه جوجه یکروزه هر کدام با ۱۵۰۰ اسپوروزوآیت *ایمریا تنلا* (سویه P-11؛ اخذشده از آقای دکتر کسری اسماعیل‌نیا، گروه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) به روش گفته شده در قبل تلقیح شدند و ۴ هفته بعد، هر کدام با ۲۰ هزار اواوسیست (سویه متجانس) چالش و میانگین OPG آنها در ۵ روز متوالی محاسبه شد. گروه شاهد شامل ۵۰ قطعه جوجه یکروزه بودند که به‌طور همزمان با محیط هنکس استریل تلقیح شده و در شرایط کاملاً مساوی نگهداری می‌شدند. این جوجه‌ها نیز همزمان با جوجه‌های گروه ایمن و با همان تعداد اواوسیست چالش شدند.

کلیه نتایج حاصله در این مطالعه با برنامه آماری SX و آزمون آنالیز واریانس یکطرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

تذکر : به‌منظور جلوگیری از عفونتهای مضاعف، در طول این مطالعه از دان اتوکلاوشده استفاده گردید و هیچ واکسنی مورد مصرف قرار نگرفت.

نتایج

در شرایط قفس : میانگین OPG در گروههای ایمن شده با اسپوروزوآیت و مروزوآیت و گروه شاهد برحسب روزهای متوالی پس از چالش در جدول ۱ آمده است. در کلیه گروهها، دفع اواوسیست ابتدا روندی صعودی و سپس روندی نزولی داشت. میانگین OPG در گروه ایمن شده با ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ اسپوروزوآیت و نیز گروه ایمن شده با ۵۰۰۰ مروزوآیت اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان داد ($P<0/05$). OPG گروه ایمن شده با ۱۰۰۰ مروزوآیت و گروه شاهد هیچ اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P<0/05$).

در شرایط بستر : میانگین OPG گروه ایمن‌شده با ۱۵۰۰ اسپوروزوآیت و گروه شاهد در شرایط بستر در جدول ۲ آمده است. برخلاف پرندگان نگهداری‌شده در قفس، این پرندگان به مدفوع خود دسترسی داشته و به‌علت بلع مداوم اواوسیست، مرتباً دچار آلودگی شدند. بنابراین دفع اواوسیست در این گروه به‌صورت کلاسیک نبوده و تقریباً در روزهای متوالی پس از دوره پیش‌آشکاری یکنواخت بود. میانگین OPG در پنج روز متوالی در گروه ایمن‌شده ۶۶۸ و در گروه شاهد ۱۳۰۳۴ بود. مقایسه OPG دو گروه شاهد و ایمن‌شده اختلاف آماری بسیار معنی‌داری ($P<0/01$) را نشان داد.

جدول ۲ - میانگین OPG در گروه ایمن‌شده با اسپوروزوآیت و گروه شاهد برحسب روزهای متوالی پس از چالش (در شرایط بستر)

OPG	روزهای متوالی پس از چالش				
	۵	۶	۷	۸	۹
گروه ایمن‌شده	۱۶۵	۷۵۶	۸۵۵	۷۵۰	۸۲۰
گروه شاهد	۱۴۱۰۰	۲۲۹۵۰	۱۵۳۹۵	۱۷۷۵۰	۴۹۷۵

بحث

مطالعات انجام‌شده در مورد ماهیت ایمنی در کوکسیدیوز بیانگر نقش ایمنی هومورال و سلولی می‌باشد. با این وجود پاسخ ایمنی با واسطه سلولی از اهمیت بیشتری برخوردار است همچنان‌که در عفونتهای حاصل از سایر ارگانیسمهای داخل سلولی نیز چنین است (۲۱، ۲۰، ۱۰). از دیرباز مشخص شده است که پرندگان ایمن‌شده برعلیه کوکسیدیوز در مقایسه با پرندگان غیرایمن، تعداد اواوسیست کمتری دفع می‌نمایند و این واقعیت به‌عنوان معیاری مطمئن برای ارزیابی پاسخ ایمنی مورد توجه محققین مختلف قرار گرفته است (۲۷، ۲۴، ۲۳، ۱۵، ۱۰، ۹، ۷، ۶). اصولاً بین سطح ایمنی گله و دفع اواوسیست یک رابطه معکوس وجود دارد به‌طوری که با افزایش سطح ایمنی، دفع اووسیست کاهش می‌یابد و بمرور در اثر برخورد پرنده با تعداد اواوسیست کمتر، سطح ایمنی کاهش یافته و این خود موجب افزایش دفع اواوسیست می‌گردد (۱۵ و ۲۷). طالبی و مولکاهی (۱۹۹۵) در تجربه خود برروی ایمنی‌زایی *ایمریا ماکزیما* نشان دادند که پاسخ ایمنی سلولی و هومورال پس از دو هفته به حداکثر رسیده و بین پاسخ ایمنی سلولی و میزان دفع اواوسیست رابطه منفی معنی‌داری وجود دارد (۲۸).

در مطالعه حاضر به‌منظور حذف نقش عوامل مؤثر بر دفع اواوسیست، از نتایج تک اواوسیست *ایمریا تنلا* استفاده شد و شرایط نگهداری، ترکیب جیره و تعداد اواوسیست‌های دز چالشی در هر دو گروه ایمن‌شده و شاهد یکسان بود. بنابراین عوامل مؤثر بر دفع اواوسیست تأثیری بر نتایج حاصله نداشته و یا حداقل تأثیر یکسانی در پرندگان ایمن‌شده و شاهد داشته‌اند.

برای تحریک پاسخ ایمنی از روشهای مختلفی استفاده شده که‌متداولترین آنها خورانیدن اواوسیست‌های تخفیف حدت‌یافته است (۳۱، ۳۰، ۲۶، ۲۵، ۲۲، ۱۱). علاوه‌بر این عده‌ای از محققین از روش تزریقی برای معرفی پادگنهای زیرواحدی و نوترکیب استفاده کرده‌اند (۳۰، ۲۹، ۲۲، ۵، ۳). در مطالعه حاضر روش داخل رکتومی از این جهت انتخاب شده است که اولاً این شیوه در ۲۴ ساعت اول پس از تولد یعنی زمان تعیین جنسیت در کارخانه جوجه‌کشی قابل اجراست و ثانیاً مراحل اسپوروزوآیت و مروزوآیت به‌عنوان پادگنهای زنده عمل کرده و با ایجاد عفونت و برقراری چرخه حیاتی انگل موجب راه‌اندازی پاسخهای مطلوب سیستم ایمنی میزبان می‌شوند. از این روش در گذشته به‌منظور اهداف مختلف استفاده شده است (۱۰، ۹، ۶).

در مورد ایمنی‌زایی مراحل مختلف چرخه حیاتی انگل مطالعاتی در

جدول ۱ - میانگین دفع اواوسیست (OPG) در گروههای ایمن‌شده و گروه شاهد برحسب روزهای متوالی پس از چالش (در شرایط قفس)

OPG گروه ایمن‌شده با	روزهای متوالی پس از چالش							
	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
۱۰۰۰ اسپوروزوآیت	۳۸۰۰	۸۵۰۰	۱۸۰۰۰	۲۰۱۰۰	۱۵۱۰۰	۴۹۰۰	۲۲۰۰	۶۰۰
۵۰۰۰ اسپوروزوآیت	۱۲۰	۸۰۰	۲۴۰۰۰	۱۵۴۰۰	۳۵۰۰	۱۷۰۰	۱۱۰۰	۲۰۰
۱۰۰۰ مروزوآیت	۴۳۰۰	۹۰۰۰	۴۷۰۰۰	۴۶۵۰۰	۳۷۳۰۰	۲۴۵۰۰	۱۶۰۰	۷۰۰
۵۰۰۰ مروزوآیت	۴۴۰۰	۶۰۰۰	۲۴۵۰۰	۳۲۲۰۰	۱۸۰۰۰	۴۳۰۰	۱۷۰۰	۵۰۰
گروه شاهد	۵۲۰۰	۱۱۷۰۰	۵۸۵۰۰	۴۸۳۰۰	۳۶۵۰۰	۲۸۵۰۰	۳۴۰۰	۹۰۰

پرندگان و نیز گاو صورت گرفته است. کندال و مک کلوق (۱۹۵۲) تشکیل شیزونت نسل دوم *ایمریا تنلا* را مسئول القاء پاسخ ایمنی اعلام کردند (۱۸). رز (۱۹۶۷) در تجربه مشابهی به این نتیجه رسید که مراحل گامتوگونی *ایمریا تنلا* و *ایمریا نکاتریکس* توانایی ایمنی‌زایی کمی دارند. وی مراحل شیزوگونی این دو گونه را عامل اصلی مقاومت در برابر عفونت مجدد دانست (۲۳). این محقق در سال ۱۹۷۳ با مطالعه برروی *ایمریا ماکزیما* ابراز کرد که مراحل جنسی این گونه ممکن است ایمنی‌زا باشند (۲۴). در مورد گونه‌های غیرماکیان، هاموند و همکاران (۱۹۶۴) با تلقیح مروزوآیت‌های نسل اول *ایمریا بویس* در داخل روده کور گوساله‌ها توانستند آنها را در برابر چالش دهانی ایمن کنند و این مؤید آن است که تکامل شیزونت نسل اول *ایمریا بویس* برای القاء پاسخ ایمنی ضروری نمی‌باشد (۹).

در مطالعه حاضر دفع اواوسیست در جوجه‌های ایمن‌شده با هزار و پنج هزار اسپوروزوآیت و نیز پنج هزار مروزوآیت اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت ($P<0/05$). از طرفی مقایسه دفع اواوسیست در گروههای ایمن‌شده با اسپوروزوآیت و مروزوآیت، اختلاف بسیار معنی‌داری ($P<0/01$) را نشان داد. همان‌طور که قبلاً گفته شد تلقیح داخل رکتومی اسپوروزوآیت و مروزوآیت موجب ادامه سیر تکاملی انگل در میزبان می‌شود اما تفاوت عمده در دو گروه ایمن‌شده با اسپوروزوآیت و مروزوآیت، تشکیل یا عدم تشکیل شیزونت نسل اول است. لیلهوج و تروت (۱۹۹۳) (۲۱) نقش مراحل اولیه سیر تکاملی ایمریا را در ایجاد پاسخ ایمنی بسیار مهم دانسته و نتایج مطالعه حاضر با نتایج این دو محقق و نیز با نتایج هاموند و همکاران (۱۹۶۴) همخوانی دارد اما با نتایج کندال و مک‌کلوق (۱۹۵۲) (۱۸) مبنی‌بر نقش بیشتر شیزوگونی نسل دوم در القاء پاسخ ایمنی مطابقت ندارد. احتمالاً در گروه ایمن‌شده با هزار مروزوآیت میزان پادگن ارایه‌شده برای تحریک ایمنی مناسب کافی نبوده بنابراین اختلاف قابل توجهی با گروه شاهد نداشته است. آنچه که از نتایج حاضر می‌توان استنباط کرد اینکه تشکیل شیزونت نسل اول *ایمریا تنلا* از اهمیت بیشتری در القاء پاسخ ایمنی برخوردار است. نتیجه مذکور مبنی‌بر نقش ایمنی‌زایی اسپوروزوآیت *ایمریا تنلا* با نتایج السعادی و العطار (۱۹۹۴) (۱) همخوانی دارد.

در بخش اصلی مطالعه حاضر به‌منظور جلوگیری از عفونت تدریجی، جوجه‌های تحت آزمایش در شرایط قفس نگهداری شدند تا به مدفوع خود دسترسی نداشته باشند. با توجه به جدول ۱، دفع اواوسیست ابتدا آهنگ صعودی داشته و پس از رسیدن به حداکثر، بتدریج کاهش یافته است. این مسئله مؤید آن است که در طول آزمایش عفونت جدیدی رخ نداده و آلودگیها همزمان بوده است. از طرفی در تحقیق حاضر به‌عنوان یک مطالعه جنبی، ایمنی حاصل از تلقیح داخل رکتومی اسپوروزوآیت در شرایط بستر ارزیابی شد که نتایج حاصله مؤید اختلاف بسیار معنی‌دار ($P<0/01$) با گروه شاهد بود. علت این امر، تداوم ایمنی القاءشده به‌علت نوک‌زنی به بستر و بلع اواوسیست‌های دفع‌شده بوده است. این یافته مبنی‌بر نقش عفونت تدریجی در تداوم پاسخ ایمنی با نتایج دیگر محققین همخوانی دارد (۱۷، ۱۶، ۸، ۲).

تعیین طول دوره ایمنی و مقایسه نتایج محققین مختلف با توجه به روشهای مختلف ارزیابی پاسخ ایمنی دشوار است. در مطالعه حاضر طول دوره پاسخ ایمنی مدنظر نبوده اما پیشنهاد می‌شود که برای این امر از چالشهای متوالی پرنده پرهیز کرده و از سایر روشها بویژه روش فلوسیتومتری استفاده شود. در غیر این صورت چالشها خود موجب تأثیر بر نتایج خواهند شد.

تشکر و قدردانی

کلیه اعتبارات مالی این تحقیق از محل مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه تهران هزینه شده است و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به‌خاطر پرداخت هزینه‌ها، از آقای دکتر عباس برین به‌خاطر مشاورتهای علمی در مراحل مختلف و از آقای عباس گرامی‌صادقیان، به‌خاطر همکاری در انجام مراحل اجرایی تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Al-Saadii, Z.J.L. and Al-Attar, M.A. Immunization of chickens against Eimeria tenella by intramuscular inoculation of sporozoites. Pure and Applied Sciences, 21(6), 7-12, (1994).
2. Awadalla, S.F. Effects of low-level infection of Eimeria tenella for a short duration on development of specific immunity in chicken. Vet. Med. J. Giza, 41(3), 9-12, (1993).
3. Brake, D.A., Strang, G., Lineberger, J.E., Fedor, C.H., Clare, R., Banas, T.A. and Miller, T. Immunogenetic characterization of a tissue cultured derived vaccine that affords partial protection against avian coccidiosis. Poultry Science 76, 974-983, (1997).
4. Danforth, H.D. Development and use of hybridoma antibodies directed against Eimeria acervulina merozoites for cross reactive and ferritin-labelling studies. Avian Diseases, 31(1), 99-104, (1986).
5. Danforth, H.D., Augustine, P.C., Ruff, M.D., McCandliss, R., Strausberg, R.L. and Likel, M. Genetically engineered antigen confers partial protection against avian coccidial parasites, Poultry Science, 68(12), 1643-52, (1989).
6. Davies, S.F.M., Joyner, L.P. and Kendall, S.B. Coccidiosis. Oliver and Boyd Company, Edinburgh, PP: 30-39, (1963).
7. Davis, L.R. Techniques in : Hammond, D.M. and Long, P.L. (Eds) The coccidia, University Park Press, London, PP: 413-450, (1973).
8. Edgar, S.A. Control of cecal coccidiosis by active immunization. Auburn Vet. 10: 79-81, (1954).
9. Hammond, D.M., Anderson, F.L. and Miner, M.L. Response of immunized and non-immunized calves to cecal inoculation of first-generation merozoites of Eimeria bovis. J. Parasitol, 50: 209-213, (1964).
10. Hammond, D.M. and Long, P.L. The coccidia, University Park Press. London, PP: 296-341, (1973).
11. Hein, H. Vaccination against infection with Eimeria tenella in broiler chickens. Proc. 17th World Vet. Congress, 2: 1443-1452, (1963).
12. Hofmann, J. and Reather, W. Improved techniques for the invitro cultivation of Eimeria tenella in primary chick kidney cells. Parasitol., 76: 479-486, (1990).
13. Jenkins, M.C., Castle, M.D. and Danforth, H.D. Protective immunization against the intestinal parasite, Eimeria acervulina with recombinant coccidial antigen. Poultry Science, 70(3): 539-547, (1991).
14. Jenkins, M.C., Seferian, P.G., Augustine, P.C. and Danforth, H.D. Protective immunity against coccidiosis elicited by radiation-attenuated Eimeria maxima sporozoite that are incapable of asexual development. Avian Disease (37), 1: 78-82, (1993).
15. Jordan, F.T.W. Poultry Disease. Third Edition, Bailliere Tindall PP: 226-241, (1990).

16. Joyner, L.P. and Norton, C.C. The immunity arising from contineous low-level infection with Eimeria tenella. Parasitol. 67: 333-340, (1973).

17. Karim, M.J. Trickle infections for the development of complete immunity in young chicks against Eimeria tenella. Pakistan Vet. J., 14(3): 138-140, (1994).

18. Kendall, S.B. and McCullough, F.S. Relationship between sulfamezathine therapy and acquistion of immunity to Eimeria tenella. J. Comp., path., 62: 116-124, (1952).

19. Lee, E.H. Single and Low-level oocyst infections of drug-resistant field strains of Eimeria tenella in medicated birds. Can. vet. J., 20: 102-104, (1979).

20. Lillehoj, H.S. Immunity and Host genetic based control strategies for avian coccidiosis. World Poultry-Misset, 17-19, (1996).

21. Lillehoj, H.S. and Trout, J.M. Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. Avian Pathology, 22: 3-31, (1993).

22. Rhalem, A., Sahibi, H., Dakkak, A., Laurent, F., Kazanji, M., Yvore, P. and Pery, P. Protective oral immunization of chickens against Eimeria tenella with sporozoite surface antigens. Vet. Immunology and Immunopathology, 38(3-4): 327-340, (1993).

23. Rose, M.E. Immunity to Eimeria brunetti and Eimeria maxima infections in the fowl. Parasitol., 57: 363-370, (1967).

24. Rose, M.E. Immunity. In: Hammond, D.M. and Long, P.L. (Eds) The coccidia, University Park Press, London, PP: 295-341, (1973).

25. Shirley, M.W., Bushell, A.C., Bushell, J.E., McDonald, V. and Roberts, B. A live attenuated vaccine for the control of avian coccidiosis: trials in broiler breeder and replacement layer flock in the U.K., Vet. Rec. 137: 453-457, (1995).

26. Singh, U.M. Preliminary evaluation of a commerical coccidiosis vaccine in broiler parental flocks. Vet. Rev. Kathmandu, 11(2): 61-62, (1996).

27. Soulsby, E.J.L. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7th Ed., Bailliere Tindall, PP: 631-645, (1982).

28. Talebi, A. and Mulcahy, G. Correlation between immune responses and oocyst production in chickens monospecifically infected with Eimeria maxima. Avian Pathology, 24, 485-495, (1995).

29. Wallach, M., Smith, N.C., Petracca, M. Miller, C.M.D., Eckert, J. and Braun, R. Eimeria maxima gametocyte antigens: potential use in a subunit maternal vaccine against coccidiosis. Vaccine, 13(4): 347-354, (1995).

30. Wallach, M. and Vermeulen, A. Progress towards a subunit vaccine against coccidiosis. World Poultry-Misset: 22-24, (1996).

31. Waxler, S.H. Immunization against cecal coccidiosis in chickens by the use of X-ray attenuated oocysts. J. Am. Vet. Med. Ass. 99: 481-485, (1941).

The primary study of immunogenecity of sporozoite and merozoite of E. tenella in chicken

Razavi, S.M.[1], Rahbari, S.[2]

[1]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.* [2]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.*

Coccidiosis is regarded as one of the most important economic diseases of poultry industries in the world. Chemotheray is the most important method of it's control and prevention. Recently, some attemps have been directed to induce the immunity against avian coccidiosis and some live-attenuated vaccines have been introduced commerically. The present study was carried out to investigate the immunogenecity of sporozoite and merozoite of E. tenella by intra-rectal inoculation. One hundred day-old chickens were divided to five groups which including 20 birds. Four groups of birds were inoculated by low and high dose of sporozoite and merozoite, remainder by 20 µl of sterile Hank's medium as control group. All immunized and nonimmunized chickens were challenged by 10,000 sporulated oocysts of homologous strain at 3-week-old age. The bird faeces were examined daily 8 days after prepatent period and the mean of oocyst per gram (OPG) was calculated in each group. The results showed significant difference between birds immunized by sporozoite and control group. Furthermore, there was significant difference between birds immunized by high dose of merozoite and control group. The results indicated no significant difference between birds immunized by low dose of merozoite and control group. There was higher protection in chickens immunized by sporozoite. The finding revealed that the formation and maturation of first generation schizont of Eimeria tenella has an important role in induction of immune response. Field study was carried out to show long-term protection by low dose of sporozoite, it seems that litter rearing cause contineous ingestion of oocysts which introduce antigen presentation contineously.

Key words : Sporozoite, Merozoite, Eimeria tenella, Chicken.