نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۰؛ ۱۵(۱): ۷۹-۸۸.

بررسی شاخص‌های انگل‌شناسی، هماتولوژی و بیوشیمیایی در آلوده‌سازی تجربی بره با آیمریا آهساتا

نادر احمدی صالح بابری[۱] ، غلامرضا رزمی [۲*]، ایرج کریمی[۳]، حسین نورانی[۲]، حمیدرضا عزیزی[۲]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.
۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.
۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

دریافت: ۲۴ آذرماه ۱۳۹۹ **پذیرش:** ۸ بهمن‌ماه ۱۳۹۹

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی تغییرات بیوشیمیایی ایجاد شده در خلال آلودگی تجربی بره‌ها با *آیمریا آهساتا* از زمان آلوده‌سازی تا ۴۲ روز پس از آلودگی انجام شد. تعداد ۱۲ رأس بره ۲ ماهه نژاد لری- بختیاری خریداری گردید، پس از آزمایش مدفوع و اطمینان از عدم آلودگی، بره‌ها به دو گروه کنترل و تیمارتقسیم شدند. به گروه تیمار به ازای هر بره $10^5 \times 1$ اووسیست اسپوردار *آیمریا آهساتا* خورانده شد و گروه کنترل بدون آلوده‌سازی به‌عنوان شاهد نگه‌داری شدند. از روز ۷ پس از آلوده‌سازی، از هر بره به‌طور جداگانه و به‌صورت روزانه از مدفوع نمونه‌برداری انجام گرفت و تعداد اووسیست‌ها در هر گرم مدفوع به روش مک ماستر شمارش و ثبت شد، همچنین در فواصل زمانی ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ روز پس از آلوده‌سازی، خون‌گیری انجام گرفت. از نمونه‌های خون بدون EDTA، به منظور سنجش میزان CBC (Cell Blood Count) و از سرم جداسازی شده نمونه‌های خون حاوی EDTA، به منظور بررسی شاخص‌های ALT (Alanine aminotransferase)، AST (Aspartate aminotransferase)، ALP (alkaline phosphatase)، ALB (Albumin)، GGT (gamma glutamyltransferase) و PRO (total protein) استفاده شد. در گروه تیمار بیشترین میزان دفع اووسیست در روزهای ۳۳-۳۲ پس از آلوده‌سازی مشاهده شد و میزان شاخص‌های ALT، AST، ALB، GGT، ALP و PRO در مقایسه با گروه کنترل تغییر چندانی نکرده بودند. از میان عوامل هماتولوژی، بیوشیمیایی و OPG (Oocyst per gram)، تنها در میزان CBC و OPG اختلاف معنی‌داری بین دو گروه کنترل و تیمار مشاهده گردید ($P<0/05$). این مطالعه تأیید می‌کند که آلودگی به آیمریا آهساتا، در بره‌ها باعث افزایش گلبول‌های سفید می‌گردد. در این مطالعه مشخص گردید کوکسیدیوز ایجاد شده توسط آیمریا آهساتا، بیشترین میزان دفع اووسیست را در روزهای ۳۳-۳۲ پس از آلوده‌سازی دارد.

واژه‌های کلیدی: *آیمریا آهساتا*، بره، شاخص‌های هماتولوژی، شاخص‌های بیوشیمیایی، OPG.

مقدمه

کوکسیدیوز روده‌ای یکی از بیماری‌های انگلی دستگاه گوارش نشخوارکنندگان کوچک در جهان است. عامل این بیماری تک یاخته ایمریا (*Emeria*) است (۲۶). بیماری بیشتر در بره‌ها در سنین ۶-۴ ماهه دیده می‌شود، همچنین شرایط پرورشی و وجود عوامل استرس‌زا مانند از شیر گرفتن، آب‌وهوای نامساعد، تغییرات غذایی، حمل و نقل و انتقال به آغل جدید، نقش مهمی در بروز بیماری در نشخوارکنندگان کوچک دارد (۲۰) با توجه به سیکل زندگی انگل، جنس آیمریا سبب مرگ تعداد زیادی از سلول‌های روده میزبان و به‌دنبال آن، کاهش جذب الکترولیت‌ها و مواد غذایی مورد نیاز میزبان می‌شود. رایج‌ترین علائم بیماری شامل اسهال همراه با پوشش خشن و ژولیده، کاهش وزن، کم‌خونی و ضعف هستند (۳۷). علاوه بر این بیماری سبب کاهش رشد، کاهش تولید فراورده‌های گوشتی، شیری و مرگ‌ومیر می‌شود. ساز و کار و درجه آسیب بافتی، بستگی به گونه آیمریا، تعداد اووسیست های عفونی خورده شده، استرس، سن، وضعیت

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Razmi@um.ac.ir

فیزیکی، حساسیت ژنتیکی و درجه ایمنی میزبان دارد. به‌دلیل حساسیت حیوانات جوان، بیماری به فرم بالینی بیشتری در این سنین گزارش می‌شود (۱۸). شایع‌ترین ضایعات کوکسیدیوز درمانگاهی در گوسفند و بزهای جوان، پلاک‌های غیر ندولی مایل به سفید روی مخاط روده کوچک است؛ در موارد پیشرفته ضخیم شدن و چسبیده شدن ندول‌های ضخیم به هم‌دیگر دیده می‌شود (۲۰). تاکنون ۱۵ گونه آیمریا در گوسفند گزارش شده است که شامل: *ایمریا اوینوئیدالیس* (*E. ovinoidalis*)، *ایمریا کراندالیس* (*E.crandallis*)، *ایمریا ویبرجنسیس* (*E. weybridgensis*)، *ایمریا اینتریکاتا* (*E. intricata*)، *ایمریا پاروا* (*E. parva*)، *ایمریا پالیدا* (*E. pallida*)، *ایمریا مارسیکا* (*E. marsica*)، *ایمریا فوره‌ای* (*E. faurei*)، *ایمریا گرانولوزا* (*E. granulosa*)، *ایمریا باکونسیس* (*E. bakuensis*)، *ایمریا گونزالزی* (*E. gonzalezi*)، *ایمریا اوینا* (*E. hawkinsi*)، *ایمریا آهساتا* (*E. ahsata*)، *ایمریا گیلروتی* (*E. gilruthi*) و *ایمریا دالی* (*E. dali*) می‌شود که از میان آن‌ها ایمریا اوینوئیدالیس (*E. ovinoidalis*)، *ایمریا آهساتا* (*E. ahsata*) و *ایمریا باکونسیس* (*E. bakuensis*) گونه‌های بیماری‌زا در نظر گرفته می‌شوند (۲۶). شیزونت‌های *آیمریا آهساتا* در سلول های پوششی روده تشکیل می‌شوند و مراحل تکاملی انگل همراه با سلول‌های التهابی و بقایای سلول های پوششی، ندول های سفید رنگی به قطر ۰/۵ تا ۶ میلی‌متر در مخاط روده تشکیل می‌دهند. علائم بالینی شامل، اسهال، کاهش وزن بدن، ضخیم شدن دیواره ایلئوم به‌خصوص در قسمت قدامی آن و وجود التهاب در پلاک‌های پیر است (۱۱ و ۲۸). با توجه به شیوع نسبتاً بالای کوکسیدیوز در نوزادان نشخوارکنندگان کوچک به‌ویژه در شهرستان شهرکرد و خسارت‌های اقتصادی ناشی از این بیماری و معرفی *آیمریا آهساتا* به‌عنوان شایع‌ترین عامل کوکسیدیوز، مطالعه تغییرات هماتولوژی و بیوشیمیایی ناشی از این انگل در بره‌ها ضروری تشخیص داده شد، لذا این پژوهش به‌منظور بررسی تغییرات بیوشیمیایی ایجاد شده در خلال آلودگی تجربی با *آیمریا آهساتا* از زمان آلوده‌سازی تا ۴۲ روز پس از آن انجام شد.

مواد و روش کار

با توجه به این که شایع‌ترین گونه آیمریا، در گوسفندان منطقه شهرکرد، آیمریا آهساتاست و تا کنون مطالعه‌ای در این خصوص انجام نشده است، لذا این پژوهش به‌منظور بررسی تغییرات هماتولوژی و بیوشیمیایی ایجاد شده در خلال آلودگی تجربی از زمان آلوده‌سازی تا ۴۲ روز پس از آن انجام می‌شود؛ بنابراین به‌منظور جداسازی گونه شایع و بیماری‌زای تک‌یاخته آیمریا، نمونه‌های مدفوع از گوسفندان زنده و تلف شده با علامت اسهال که برای دام‌دار برای تشخیص بیماری به کلینیک دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد آورده شده بود، جمع‌آوری گردید. نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری شده به آزمایشگاه انگل‌شناسی منتقل و آزمایش شدند. میزان OPG در نمونه‌های مدفوع آلوده با روش مک‌ماستر تعیین شد (۱۰). نمونه‌های مدفوع با OPG بالای ۵۰۰ عدد برای کشت در محلول دی کرومات پتاسیم انتخاب گردیدند. بدین‌منظور ابتدا ۳ گرم مدفوع در ۴۲ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات مخلوط شده، پس از تهیه سوسپانسیون، از الک ۱۰۰ چشمه عبور داده شد تا ذرات درشت آن جدا گردند. سوسپانسیون صاف‌شده در دور ۲۰۰۰ برای مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل، حداقل ۵ برابر حجم اولیه، محلول دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ ٪ اضافه شد و ظرف محتوی سوسپانسیون به انکوباتور ۲۷ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت، پس از گذشت ۱۰ روز و حصول اطمینان از هاگ‌دار شدن حداقل ۹۰ ٪ اووسیست ها، ظرف حاوی نمونه از انکوباتور خارج شد و ظرف محتوی اووسیست‌ها تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (۲۴).

برای شناسایی، جداسازی و شمارش‌گونه *آیمریا آهساتا* در این مرحله صرفاً اووسیست هایی که به‌طور کامل اسپوردار شده و دارای ویژگی‌های ظاهری و طبیعی هستند، با کلیدهای مورفولوژی موجود شناسایی شدند (۱۰و۲۹).برای جداسازی،محلول دی‌کرومات پتاسیم حاوی اووسیست در دور ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصل، با محلول PBS و عمل سانتریفیوژ، ۲ بار شست‌وشو داده شد. در نهایت با اضافه کردن آب مقطر، حجم محلول به ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و تعداد

اووسیست در هر میلی‌لیتر با لام مک ماستر محاسبه گردید (۲۹).

برای ایجاد آلودگی تجربی، تعداد ۱۲ رأس بره ۲ ماهه از گله‌های فاقد آلودگی و بدون سابقه بیماری خریداری شد و به مرکز تحقیقات دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد منتقل شدند و پس از انجام آزمایش‌های پاراکلینیکی و تأیید سلامتی و عدم آلودگی حیوانات به ایمریا، بره‌ها به دو گروه مساوی تقسیم شدند. برای جلوگیری از بروز آلودگی احتمالی، قبلاً کف و دیوارهای محل نگه‌داری با شعله‌دهی ضد عفونی شد. در دوران مطالعه، بره‌ها به‌صورت جداگانه در اتاق ضد عفونی شده با قفس‌های مجزا نگه‌داری شدند. قبل از آلوده‌سازی حیوانات، به‌منظور ایجاد علائم بالینی، آلوده‌سازی به‌صورت خوراکی با تعداد معین $۱۰^۵ \times ۱$ اووسیست در بره های گروه اول انجام شد (۲۵). بره های گروه دوم بدون آلوده‌سازی به‌عنوان شاهد نگه‌داری شدند.

نمونه‌های مدفوع از روز هفتم پس از آلودگی به‌صورت روزانه برای مشخص کردن شروع دفع اووسیست آزمایش شدند. برای این منظور ۵-۳ گرم مدفوع مستقیماً از مقعد برداشت و با روش مک ماستر میزان OPG محاسبه گردید (۳۴). نهایتاً تعداد اووسیست‌های شمارش‌شده در ضریب رقت ضرب شد و به‌عنوان OPG در جدول مربوط به هر گروه، ثبت شد.

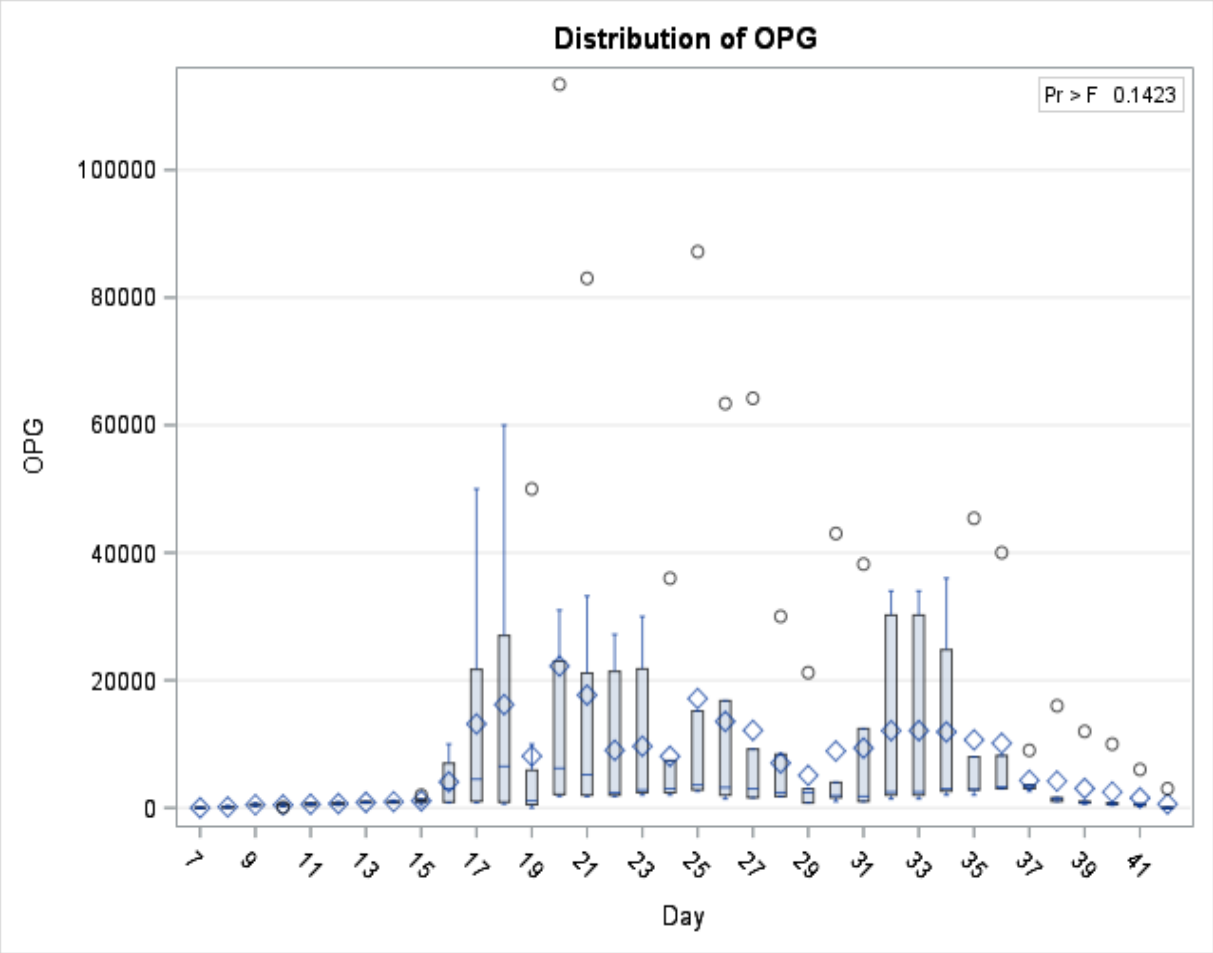
برای اندازه‌گیری شاخص‌های هماتولوژی و بیوشیمیایی، در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ روز پس از آلوده‌سازی از هر بره ۲/۵ میلی‌لیتر خون به‌طور جداگانه در لوله‌های حاوی EDTA و بدون EDTA گرفته شد. پس از لخته شدن خون در لوله‌های آزمایش بدون EDTA، سرم با سانتریفوژ کردن لوله‌ها در دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه جدا شد (Hettich company-Germany). سرم به‌دست آمده با سمپلر به لوله‌های دردار منتقل و تا هنگام آزمایش در فریزر منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. خون لوله‌های آزمایش، حاوی EDTA برای شمارش گلبول‌های سفید و قرمز با روش هموسیتومتری آزمایش شدند، همچنین شمارش تقریبی گلبول‌های سفید شامل لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت، ائوزینوفیل و بازوفیل با گسترش‌های رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا نیز انجام گرفت (۱۷). برای اندازه‌گیری ALT، AST، ALP، GGT، آلبومین و پروتئین تام نمونه‌های سرمی با کیت‌های شرکت (Dialab, Austeria) و با دستگاه اتوانالایزر (Biothecnical 1500, Italy) انجام گرفت.

نتایج هماتولوژی و بیوشیمایی حاصل از دو گروه تیمار و کنترل مورد آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه با به کارگیری تست توکی(Tukey) برای مقایسه میانگین ها قرار گرفتند. نتایج به‌صورت حداقل مربعات میانگین و خطای معیار میانگین بیان شد. مقادیر$p \leq ۰/۰۵$ به‌عنوان معنی‌دار تلقی گردید. از نرم‌افزار آماری SAS(Statistical Analysis system) برای تخمین اطلاعات استفاده شد، همچنین برای ارزیابی OPG از آنالیز آماری کورسکال والیس استفاده گردید.

نتایج

اووسیست‌های گونه آیمریا آهساتا، بیضی یا تخم مرغی شکل هستند و از مشخصات بارز این‌گونه وجود میکروپیل و کلاهک قطبی برجسته است که روی آن را می‌پوشاند. اندازه اووسیست ۳۳/۵-۲۹ در ۲۵-۲۲ میکرون و به‌طور متوسط ۳۲/۷-۲۳/۷ میکرون گزارش شده است. اندازه اسپوروسیست ۲۰-۸ در ۱۰-۷ میکرون و شامل جسم باقی‌مانده است. دوره پیش آشکاری اووسیست ۱۸ تا ۲۰ روز است (۱۹ و ۳۰).

آنالیز OPG نشان داد که تغییرات در روزهای مختلف دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p<۰/۰۰۰۱$). روند تغییرات تعداد اووسیست دفع شده در بره‌های آلوده‌سازی شده طی دوره مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- تعداد اووسیست‌های دفع‌شده در بره‌های آلوده‌سازی شده در طی روزهای مختلف.

روند تغییرات جمعیتی گلبول‌های سفید و قرمز طی مطالعه در دو گروه تیمار و شاهد ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که تنها جمعیت لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها از روز ۲۸ پس از آلودگی در گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵). الگوی تغییرات در جدول ۱ نشان داده شده است.

در این مطالعه میزان شاخص‌های ALB, AST, ALT, GGT, ALP و پروتئین تام در دو گروه تیمار و شاهد مقایسه شدند. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که الگوی تغییرات در دو گروه مشابه است (P>۰/۰۵). الگوی تغییرات در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- میانگین± انحراف معیار فاکتورهای هماتولوژی در گروه کنترل و مورد

DPI	Group	RBC (×10⁶)	WBC (×10³)	Lymphocyt(%)	Eosinophil (%)	Neutrophil (%)	Monocyt (%)	Basophil (%)
۰	کنترل	۸۹/۵±۱۷/۱۹ a	۱۱±۲/۷۵ a	۴۳/۵۰±۵/۳۱a	۰/۷±۰/۹۹ a	۴۴±۵/۲۲ a	۱۱/۷±۱/۸۱ a	۰±۰/۰۷ a
	مورد	۱۰۱/۷±۱۴/۰۴ a	۹/۳±۲/۲۵ a	۴۶/۷±۴/۳۴ a	۱/۳±۰/۸۱ a	۴۳/۱±۴/۲۶ a	۹±۱/۴۸ a	۰±۰/۰۶ a
۷	کنترل	۱۱۶/۵±۱۷/۱۹ a	۱۱±۲/۷۵ a	۴۸/۷±۵/۳۱ a	۰/۷±۰/۹۹ a	۳۹±۵/۲۲ a	۱۱/۵±۱/۸۱ a	۰±۰/۰۷ a
	مورد	۱۲۰/۹±۱۴/۰۴ a	۸/۵±۲/۲۵ a	۵۶±۴/۳۴ a	۱±۰/۸۱ a	۳۰/۱±۴/۲۶ a	۱۲/۸±۱/۴۸ a	۰±۰/۰۶ a
۱۴	کنترل	۱۲۴/۴±۱۹/۴۷ a	۹/۸±۳/۱۲ a	۵۳/۵±۵/۳۱ a	۳±۰/۹۹ a	۳۴±۵/۲۲ a	۹±۱/۸۱ a	۰±/۰۷ b
	مورد	۱۵۱/۸±۱۵/۳۷ a	۱۳/۸±۲/۴۶ a	۵۶/۱±۴/۳۴ a	۲/۶±۰/۸۱ a	۳۵/۱±۴/۲۶ a	۴/۸±۱/۴۸ a	۰/۳±/۰۶ b
۲۱	کنترل	۱۲۱/۳±۱۷/۱۹ a	۷±۲/۷۵ a	۴۹/۷±۵/۳۱ a	۳±۰/۹۹ a	۴۰/۲۵±۵/۲۲ a	۷±۱/۸۱ a	۰±۰/۰۷ a
	مورد	۱۰۱±۱۷/۱۹ a	۹/۲±۲/۷۵ a	۶۱/۵±۴/۳۴ a	۵±۰/۸۱ a	۳۱/۵±۴/۲۶ a	۴/۵±۱/۴۸ a	۰±۰/۰۶ a
۲۸	کنترل	۱۰۵/۲±۱۷/۱۹ a	۸/۴±۲/۷۵ a	۴۵/۷±۵/۳۱ b	۲/۲±۰/۹۹ a	۴۱/۲۵±۵/۲۲ b	۱۰/۷±۱/۸۱ a	۰±۰/۰۷ a
	مورد	۱۰۹/۶±۱۹/۸ a	۷/۶±۳/۱۸ a	۶۲/۳±۴/۳۴ b	۲/۳±۰/۸۱ a	۲۴/۸±۴/۲۶ b	۹±۱/۴۸ a	۰±۰/۰۶ a
۳۵	کنترل	۸۵±۱۷/۱۹ a	۱۰/۵±۲/۷۵ a	۴۷/۷±۵/۳۱ a	۳±۰/۹۹ a	۴۰/۲۵±۵/۲۲ a	۹±۱/۸۱ a	۰±۰/۰۷ a
	مورد	۵۹/۴±۲۴/۳۰ a	۶/۲±۳/۹۰ a	۳۹/۸±۴/۳۴ a	۲/۱±۰/۸۱ a	۴۰/۵±۴/۲۶ a	۶/۵±۱/۴۸ a	۰±۰/۰۶ a
۴۲	کنترل	۱۱۰/۷±۱۷/۱۹ a	۱۰/۴±۲/۷۵ a	۵۹/۷±۵/۳۱ b	۲±۰/۹۹ a	۳۵/۵±۵/۲۲ b	۲/۷۵±۱/۸۱ a	۰±۰/۰۷ a
	مورد	۱۰۹/۶±۱۹/۸ a	۳/۵±۵/۵۱ a	۴۲/۱±۴/۳۴ b	۱/۵±۰/۸۱ a	۵۲±۴/۲۶ b	۶/۱±۱/۴۸ a	۰±۰/۰۶ a

DPI: روزهای پس از آلوده‌سازی/ در هر ستون میانگین‌های دارای حروف غیر مشابه دارای تفاوت معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

جدول ۲- میانگین± انحراف معیار فاکتورهای بیوشیمیایی در گروه کنترل و مورد

DPI	Group	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALBUMIN (g/L)	GGT (U/L)	ALP (U/L)	PRO (g/L)
۰	کنترل	۱۶۰/۷ ± ۱۶/۴۸ b	۱۴۹ ± ۱۴/۷۶ b	۲/۴ ± ۰/۱۷ a	۴۲/۱ ± ۸/۲۲ a	۳۲۰/۲ ± ۶۰/۴۸ a	۶/۲ ± ۰/۵۰ a
	مورد	۱۰۲/۵ ± ۱۳/۴۶ b	۱۰۰/۳ ± ۱۲/۰۵ b	۲/۵ ± ۰/۱۴ b	۵۴ ± ۶/۷۱ a	۲۸۹/۳ ± ۴۹/۳ a	۶/۵ ± ۰/۴۰ a
۷	کنترل	۱۱۸/۵ ± ۱۶/۴۸ a	۱۰۸/۵ ± ۱۴/۷۶ a	۲/۹ ± ۰/۱۷ a	۵۷ ± ۸/۲۲ a	۱۸۵/۵ ± ۶۰/۴۸ a	۷/۶ ± ۰/۵۰ a
	مورد	۱۰۳/۵ ± ۱۳/۴۶ a	۱۰۱ ± ۱۲/۰۵ a	۲/۷ ± ۰/۱۴ a	۶۱/۸ ± ۶/۷۱ a	۲۰۴/۶ ± ۴۹/۳۸ a	۷ ± ۰/۴۰ a
۱۴	کنترل	۱۱۳/۷ ± ۱۶/۴۸ a	۱۱۲/۲ ± ۱۴/۷۶ a	۳/۳ ± ۰/۱۷ a	۴۰/۷ ± ۸/۲۲ a	۱۴۲/۲ ± ۶۰/۴۸ a	۷/۷ ± ۰/۵۰ a
	مورد	۱۱۸/۴ ± ۱۴/۷۴ a	۱۱۱/۲ ± ۱۳/۲۰ a	۲/۸ ± ۰/۱۵ a	۴۱/۸ ± ۷/۳۵ a	۱۹۹/۴ ± ۵۴/۰۹ a	۶/۶ ± ۰/۴۴ a
۲۱	کنترل	۱۱۶/۶ ± ۱۹/۰۴ a	۱۰۳/۳ ± ۱۷/۰۵ a	۲/۶ ± ۰/۲۰ a	۳۲/۷ ± ۹/۴۹ a	۱۲۲/۲ ± ۶۹/۸۳ a	۵/۳ ± ۰/۵۷ a
	مورد	۹۹ ± ۱۶/۴۸ a	۹۵/۷ ± ۱۴/۷۶ a	۲/۵ ± ۰/۱۷ a	۵۴/۵ ± ۸/۲۲ a	۲۹۴/۵ ± ۶۰/۴۸ a	۶/۷ ± ۰/۵۰ a
۲۸	کنترل	۱۰۹/۲ ± ۱۶/۴۸ a	۱۰۳ ± ۱۴/۷۶ a	۲/۶ ± ۰/۱۷ a	۵۷/۲ ± ۸/۲۲ a	۳۲۵ ± ۶۰/۴۸ a	۷/۲ ± ۰/۵۰ a
	مورد	۱۲۲/۶ ± ۱۹/۰۴ a	۱۱۶/۶ ± ۱۷/۰۵ a	۲/۶ ± ۰/۲۰ a	۴۹ ± ۹/۴۹ a	۲۳۵/۶ ± ۶۹/۸ a	۷ ± ۰/۵۷ a
۳۵	کنترل	۱۰۴/۲ ± ۱۶/۴۸ a	۹۸/۵ ± ۱۴/۷۶ a	۲/۶ ± ۰/۱۷ a	۵۱/۷ ± ۸/۲۲ a	۳۰۷/۵ ± ۶۰/۴۸ a	۶/۵ ± ۰/۵۰ a
	مورد	۱۱۵/۵ ± ۲۳/۳۹ a	۱۰۷ ± ۲۰/۸۸ a	۲/۶ ± ۰/۲۴ a	۵۳/۵ ± ۱۱/۶۲ a	۳۶۴ ± ۸۵/۵۳ a	۷/۲ ± ۰/۷۱ a
۴۲	کنترل	۱۵۵/۵ ± ۱۶/۴۸ a	۱۴۰ ± ۱۴/۷۶ a	۲/۵ ± ۰/۱۷ a	۵۱/۵ ± ۸/۲۲ a	۳۴۶/۲ ± ۶۰/۴۸ a	۶/۷ ± ۰/۵۰ a
	مورد	۱۳۵ ± ۳۲/۹۷ a	۱۲۶ ± ۲۹/۵۳ a	۲/۶ ± ۰/۳۵ a	۵۵ ± ۱۶/۴۴ a	۲۸۴ ± ۲۰/۹۶ a	۷ ± ۰/۴۰ a

DPI: روزهای پس از آلوده‌سازی/ در هر ستون میانگین‌های دارای حروف غیر مشابه دارای تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

بحث

در مطالعات غیر تجربی الگوی دفع اووسیست‌ها در کوکسیدیوز به‌صورت دقیق قابل بررسی نیستند؛ زیرا دام‌ها در طبیعت به‌طور مستمر اووسیست را دریافت می‌کنند؛ بنابراین بررسی الگوی دقیق دفع اووسیست در کوکسیدیوز باید بر اساس مطالعات تجربی انجام شود. در پژوهش حاضر شروع دفع اووسیست در مدفوع دام‌های آلوده در دو بره از روز ۱۶ و در ۴ بره از روز ۱۷ مشاهده شد. حداکثر میزان دفع اووسیست (OPG) در روزهای ۳۳-۳۲ پس از آلوده‌سازی مشاهده شد و سپس روند کاهشی را نشان داد و میزان OPG به‌حدود ۲۰۰ رسید. Coleman و همکاران در سال ۱۹۶۰ دوره پیش آشکاری *آیمریا آهساتا* را ۲۰-۱۸ روز گزارش کردند، که با مطالعه حاضر تقریباً مطابقت دارد (۵). Amarante و Barbosa در مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۲ بیشترین میزان OPG را در بره‌های ۸-۴ هفته اعلام کردند (۲). نتایج این مطالعه کمی با نتایج به‌دست آمده‌ی مطالعه حاضر متفاوت است. شاید یکی از دلایل این اختلاف، تعیین OPG بر اساس شمارش انواع گونه‌های آیمریا گوسفند در مدفوع بوده باشد، در حالی‌که در مطالعه حاضر این میزان فقط براساس شمارش گونه *اهساتا* تعیین گردیده است. در مطالعات دیگر Gregory و همکاران در سال ۱۹۸۰ بیشترین میزان دفع اووسیست (OPG) را در بره‌های ۷-۴ هفته گزارش کردند (۱۳)، همچنین Mason در مطالعه‌ای در سال ۱۹۷۷ نشان داد که بیشترین میزان دفع اووسیست در بره‌های ۵۰-۴۰ روزه است (۲۳). Taylor و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۵ بیشترین میزان دفع اووسیست (OPG) را در بره‌های ۵-۴ هفته اعلام کردند (۳۳)، در این مطالعه، تعداد گلبول‌های سفید شامل لنفوسیت‌ها، مونوسیتها، نوتروفیل‌ها و بازوفیل‌ها تا روز ۱۴ افزایش یافت و سپس روند کاهشی آن تا روز ۴۲ مشاهده گردید. افزایش در تعداد گلبول‌های سفید به‌دلیل افزایش روند لنفوپویز در پی پاسخ سیستم ایمنی بدن میزبان به عوامل التهابی است. افزایش گلبول‌های سفید به نظر می‌رسد که با دوز اووسیست تلقیح‌شده رابطه مستقیم دارد. در پژوهشی Ghanem و Abd El-Raof در سال ۲۰۰۵ با نمونه‌گیری از بره‌هایی که دارای کوکسیدیوز طبیعی بودند، لوکوسیتوزیس همراه با ائوزینوفیلی و لنفوسیتوپنی را گزارش کردند، که کاهش لنفوسیت‌ها را می‌توان به آتروفی فولیکول‌های پلاک‌های پیر نسبت داد (۱۲). Al-dujaily و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ در عربستان در بره‌های مبتلا به کوکسیدیوز، لکوسیتوز با افزایش معنی‌داری در نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها را گزارش کردند (۱). در مطالعه‌ای دیگر Shommein و Osman در سال۱۹۸۰ در سودان افزایش گلبول‌های سفید مانند لنفوسیت، مونوسیت و ائوزینوفیل‌ها و سطح نرمال نوتروفیل‌ها و بازوفیل‌ها را در آلودگی تجربی بزها با آیمریا آرلوینگی گزارش کردند (۲۷). Ghanem و Abd El-Raof در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۵ و Al-dujaily و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ افزایش لکوسیت‌ها را در بره‌های مبتلا به کوکسیدیوز گزارش کردند، که تقریباً با پژوهش حاضر مطابقت دارد (۱۲ و ۱). Kockaya و Ozsensoy در مطالعه‌ای در ترکیه در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید بره‌های ۸-۳ هفته مبتلا به کوکسیدیوز وجود ندارد (۲۱). در بررسی حاضر، در میانگین تعداد گلبول‌های قرمز از روز ۲۸ تا ۳۵ پس از آلودگی روند کاهشی مشاهده گردید. هاشم‌نیا و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ در بزغاله‌های آلوده‌سازی شده با *آیمریا آرلوینگی* در ارزیابی گلبول‌های قرمز، تفاوت قابل ملاحظه‌ای در طول مدت آزمایش مشاهده نکردند (۱۴). Ghanem و Abd El-Raof در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۵ در مصر کاهش قابل توجه گلبول‌های قرمز در بره‌های مبتلا به کوکسیدیوز را گزارش کردند (۱۲)، همچنین Kockaya و Ozsensoy در سال ۲۰۱۶ در بررسی شاخص‌های خونی بره‌های مبتلا به کوکسیدیوز در ترکیه، کاهش گلبول‌های قرمز را گزارش کردند (۲۱) که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه‌ای علت کاهش گلبول‌های قرمز خون را آماس روده به همراه اسهال خونی در بره‌های مبتلا به کوکسیدیوز دانستند (۹).

در مطالعه حاضر، میزان پروتئین تام سرم در بره‌های گروه مورد، اختلاف معنی‌داری گزارش نگردید. در بررسی Dai و همکاران در سال ۲۰۰۶ در چین در بررسی تجربی پروتئین تام سرم در بزهای آلوده با *آیمریا نیناکولی کیموی* تفاوت معنی‌داری گزارش نگردیده است (۷). در مطالعه‌ای که از سوی Tadayon و همکاران در سال ۱۳۹۵

در شیراز انجام شد، نشان دادند که در کوکسیدیوز تجربی بز با *آیمریا آرلوینگی*، میزان پروتئین تام سرم و هند افزایش میزان پروتئین تام سرم در بزهای آلوده به کوکسیدیوز طبیعی را گزارش کردند (۳) که ممکن است در اثر افزایش سطح گلبولین‌ها در خون رخ داده باشد. در مطالعه‌ای دیگر Ghanem و Abd El-Raof در سال ۲۰۰۵ میزان پروتئین‌های تام سرم در بره‌های آلوده به کوکسیدیوز طبیعی را پایین‌تر از گروه کنترل گزارش کردند (۱۲). هاشم‌نیا و همکاران در سال ۲۰۱۱ در شیراز در بررسی تجربی بزغاله‌ها با *آیمریا آرلوینگی* کاهش غلظت پروتئین‌های تام سرم در روزهای ۷ تا ۲۱ پس از آلوده‌سازی گزارش کردند (۱۵). کاهش قابل توجه پروتئین تام سرم ممکن است به‌علت کاهش جذب مواد غذایی به‌دلیل آسیب‌دیدگی سلولی مخاط روده توسط آیمریا باشد (۴).

یکی از پروتئین‌های فاز حاد عفونت آلبومین است (۶ و ۳۶). الگوی تغییرات آلبومین در گروه درمان نسبت به گروه کنترل روند کاهشی داشته ولی از لحاظ آماری در مدل مورد مطالعه تغییرات به‌دست امده معنی‌دار نبودند. میزان آلبومین به‌ویژه در عفونت‌های مزمن تمایل به روند کاهشی دارد. به‌طور کلی، اسهال موجب از دست رفتن پروتئین و متعاقب آن کاهش غلظت پروتئین تام سرم می‌شود (۲۲و ۳۵). Anumol و همکاران در سال ۲۰۱۲ در برزیل، گزارش کردند که میانگین آلبومین سرم در بزهای آلوده به آیمریا کمتر از گروه کنترل بوده است (۳). در بررسی تجربی هاشم‌نیا و همکاران در سال ۲۰۱۱ در شیراز، گزارش کردند که غلظت آلبومین در روز ۷ پس از آلوده‌سازی به *آیمریا آرلوینگی* در بزغاله‌ها روند کاهشی داشته است (۱۵)، همچنین در مطالعه‌ای دیگر Chapman در سال ۱۹۷۹ در شمال انگلستان در کوکسیدیوز تجربی و طبیعی بره‌ها، افزایش معنی‌داری در پروتئین تام سرم مشاهده نکرد، ولی در آلبومین سرم کاهش معنی‌داری را گزارش کرد (۳). کاهش آلبومین سرم به‌دلیل آسیب اپیتلیوم روده در اثر کوکسیدیوز و در نتیجه کاهش جذب در محل آسیب‌دیده است (۲۷).

در بررسی حاضر میزان آنزیم‌های کبدی GGT,ALT, گلوبولین‌ها در بزغاله‌های بیمار، تغییر معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (۳۲). Anumol و همکاران در سال ۲۰۱۲ در ALP و AST در سرم بره‌های مطالعه‌شده اندازه‌گیری شد. بررسی حاضر نیز نشان داد که میزان ALT و ALP ابتدا روند کاهشی سپس روند افزایشی داشته‌اند، ولی در میزان GGT و AST اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. تغییرات آنزیم‌های کبدی، ALT، ALP و پروتئین کل نشان می‌دهد که کبد ممکن است تحت تأثیر کوکسیدیوز قرار گیرد. درجات مختلفی از ضایعات پاتولوژیک در کبد بزغاله‌های آلوده به *آیمریا نیناکل یاکیموی* به‌صورت طبیعی یا تجربی همراه با تعداد زیادی اووسیست در مجاری صفراوی و تعداد کمی مراحل تکاملی انگل در پارانشیم کبد گزارش شده است (۷). Ghanem و Abd El-Raof در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۵ روی بره‌های دارای کوکسیدیوز طبیعی و بره‌های سالم، افزایش معنی‌دار سرمی ALT, AST, ALP و GGT را در مقایسه با بره‌های سالم گزارش کردند (۱۲).

در مطالعه هاشم‌نیا و همکاران در سال ۲۰۱۴ در شیراز به انجام رسید، در بررسی تجربی آلودگی بزغاله‌ها با *آیمریا آرلوینگی* ابتدا کاهش آنزیم‌های ALT و GGT و سپس افزایش در روز ۲۱ پس از آلوده‌سازی را گزارش کردند، همچنین فعالیت آنزیم AST از روز ۷ پس از آلوده‌سازی کاهش داشته است، اما اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. در آنزیم ALP ولی کاهش قابل توجهی مشاهده گردید (۱۴). در بررسی‌های آلودگی تجربی و طبیعی *آیمریا آلابامنیس* در گوساله‌ها (*E. alabamenis*) در سوئد نیز کاهش فعالیت آنزیم ALP گزارش گردید و در میزان پروتئین تام سرم اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردیده است (۱۶). در یک بررسی دیگر Dash و همکاران در سال ۱۹۹۱ در بررسی تجربی کوکسیدیوز بزها در هند کاهش میزان فعالیت آنزیم ALP در بزهای دارای آلودگی هم‌زمان با *آیمریا آرلوینگی*، *آیمریا نیناکل یاکیموی* و *آیمریا آهساتا* در مقایسه با بزهای غیر آلوده را گزارش کردند، اما این گونه‌ها بر میزان فعالیت آنزیم AST میزبان تأثیری نداشتند و میزان این آنزیم درمحدوده نرمال‌گزارش

گردیده است (۸).

این مطالعه تأیید می‌کند که آلودگی به آیمریا آهساتا در بره‌ها باعث افزایش گلبول‌های سفید می‌گردد. در این مطالعه مشخص گردید کوکسیدیوز ایجاد شده توسط آیمریا آهساتا بیشترین میزان دفع اووسیست را در روزهای ۳۳-۳۲ پس از آلوده‌سازی دارد.

منابع

1- Al-dujaily AH, Al-mialy AJ. Clinical and hemato-biochemical studies in Awassi lambs infected with coccidiosis. Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences. 2017;8(1):1-7.

2- Amarante A, Barbosa M. Species of coccidia occurring in lambs in Sao Paulo State, Brazil. Veterinary Parasitology. 1992;41(3-4):189-93.

3- Anumol J, Tresamol P, Vinodkumar K, Saseendranath M. Haemato biochemical alterations in goats infected with coccidiosis. 2012.

4- Catchpole J, Gregory M. Pathogenicity of the coccidium Eimeria crandallis in laboratory lambs. Parasitology. 1985;91(1):45-52.

5- Coleman Jr P, Sonett C, Judge D, Smith E. Some preliminary results of the Pioneer V magnetometer experiment. Journal of Geophysical Research. 1960;65(6):1856-7.

6- Cray C, Zaias J, Altman NH. Acute phase response in animals: a review. Comparative medicine. 2009;59(6):517-26.

7- Dai Y, Liu X, Liu M, Tao J. Pathogenic Effiects of the Coccidium Eimeria ninakohlyakimovae in Goats. Veterinary research communications . 2006;30(2):60-149.

8- Dash B, Misra S, Panda M. A note on serum enzym-activity in expromental coccidiosis in kids. Indian Veterinary ASSN 7 chamlers road Nandanam, Madras 600 0, India; 1991. p. 185-6.

9- Deghidy N, Hilali M, Hassanin M. Coccidiosis of sheep in Egypt. Assuit Vet MJ. 1984;13:165-74.

10- Eckert J BR, Shirley MW, Coudert P. Guidelines on techniques in coccidiosis research. COST 89/820 European Commission. 1995;DGXII:103-17.

11- Gessner T, Smith J. Comparative detoxication. 8. The metabolism of chlorobenzene in locusts: phenolic metabolites ,a comparison with some vertebrate species. Biochemical Journal. 1960;75(1):172-9.

12- Ghanem M, Abd El-Raof Y. Clinical and Haemato-Biochemical studies on lamb Coccidiosis and changes following amprolium and sulphadimthoxine therapy. Benha Vet Med J. 2005;16(2):286-99.

13- Gregory M, Joyner L, Catchpole J, Norton C. Ovine coccidiosis in England and Wales 1978-1979. Veterinary Record. 1980;106(22):461-2.

14- Hashemnia M, Khodakaram-Tafti A, Razavi SM, Nazifi S. Hematological and serum biochemical analyses in experimental caprine coccidiosis. Journal of parasitic diseases. 2014;23-116;(1)38.

15- Hashemnia M, Khodakaram-Tafti A, Razavi SM, Nazifi S. Changing patterns of acute phase proteins and inflammatory mediators in experimental caprine coccidiosis. The Korean Journal of Parasitology. 2011;49(3):213.

16- Holst H, Svensson C. Changes in the blood composition of calves during experimental and natural infections with Eimeria alabamensis. Research in veterinary science. 1994;57(3):377-83.

17- Jain NC. Hematological techniques. Schalm's veterinary hematology. 1986:20-86.

18- Jolley WR, Bardsley KD. Ruminant coccidiosis. Veterinary Clinics: Food Animal Practice. 2006;22(3):613-21.

19- Kheysin YM. Life cycle of coccidian of domestic animals. University Park Press Baltimore, London. 1977:201-6.

20- Khodakaram-Tafti A, Hashemnia M. An overview of intestinal coccidiosis in sheep and goats. Revue Médecine Vétérinaire. 2017;168:1-3.

21- Koçkaya M, Ozsensoy Y. Determination of some blood parameters and macro elements in coccidiosis affected Akkaraman Kangal lambs. Journal of Asian Scientific Research. 2016;6(9):138.

22- Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW. Veterinary laboratory medicine: clinical pathology: Iowa State Press; 2003.

23- Mason P. Naturally acquired coccidia infection in lambs in Otago. New Zealand veterinary journal. 1977;25(1-2):30-3-.

24- Norton C. Coccidia of the domestic goat Capra hircus, with notes on Eimeria ovinoidalis and E. bakuensis (syn. E. ovina) from the sheep Ovis aries. Parasitology. 1986;92(2):279-89.

25- Odden A, Enemark HL, Ruiz A, Robertson LJ, Ersdal C, Nes SK, et al. Controlled efficacy trial confirming toltrazuril resistance in a field isolate of ovine Eimeria spp. Parasites & vectors. 2018;11(1):394.

26- Reeg KJ, Gauly M, Bauer C, Mertens C, Erhardt G, Zahner H. Coccidial infections in housed lambs: oocyst excretion, antibody levels and genetic influences on the infection. Veterinary parasitology. 2005;127(3-4):209-19.

27- Shommein A, Osman H. The effect of goat coccidiosis on certain blood components. Rev Elev Med Vet Pays Trop. 1980;33:371-5.

28- Soulsby EJH. arthropods, animals,p.o.d., 1947. L.1982.

29- Soulsby E. Helminths. Arthropods and Protozoa of domesticated animals. 1982;291.

30- Soulsby EJL. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 1968.

31- Stockham SL, Scott MA. Fundamentals of veterinary clinical pathology: John Wiley & Sons; 2013.

32- Tadayon S, Razavi SM, Nazifi S. Dynamic patterns of systemic innate immunity and inflammatory associated factors in experimental caprine coccidiosis. The Korean journal of parasitology. 2016;54(6):719.

33- Taylor M. Diagnosis and control of coccidiosis in sheep. In Practice. 1995;17(4):172-7.

34- Tembely S, Lahlou-Kassi A, Rege J, Sovani S, Diedhiou M, Baker R. The epidemiology of nematode infections in sheep in a cool tropical environment. Veterinary parasitology. 1997;70(1-3):129-41.

35- Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW. Veterinary hematology and clinical chemistry: John Wiley & Sons; 2012.

36- Tothova C, Nagy O, Kovac G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. Veterinarni Medicina. 2014;59(4).

37- Wang C, Xiao J, Chen A, Chen J, Wang Y, Gao J, et al. Prevalence of coccidial infection in sheep and goats in northeastern China. Veterinary Parasitology. 2010;174(3-4):213-7.

Vol.14/No.1
Spring-Summer 2020

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2021; 14(1): 79-87.

Evaluation of parasitological, hematological and biochemical parameters in experimental infection of lamb with Eimeria ahsata

Nader Ahmadi Saleh Baberi[1]; Gholamreza Razmi[2*]; Iraj Karimi[3]; Hosein Nourani[2]; Hamidreza Azizi[3]

1. Ph.D Student of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad-Iran.
2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad-Iran.
3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Received: 15 December 2020 ***Accepted:*** 28 January 2021

Summar

This study was conducted to investigate the hematological and biochemical changes that caused by *Eimeria ahsata* infection during a 42-days post-infection period in lambs. Twelve 2-months-old Lori-Bakhtiari lambs were provided and randomly allocated into two groups (control and treatment) after confirmation of their healthiness. The animals in the treatment group were orally infected with 1×10^5 sporulated oocysts of *Eimeria ahsata*. From day 7 post-infection, daily fecal sampling was performed separately for each lamb and the number of oocysts per gram of feces (OPG) were counted by using McMaster method. Blood sampling was done on days 7, 14, 21, 28, 35 and 42 post-infection. Hematological parameters were measured in EDTA-containing samples. Biochemical parameters including ALB (Albumin), ALP (alkaline phosphatase), ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), GGT (gamma glutamyltransferase), PRO (total protein) were measured in the serum that were separated from EDTA-free blood samples. The highest rate of oocyst excretion was observed in 32-33 days post-infection. The CBC findings indicated that the mean number of lymphocytes and neutrophils were increased in the infected group compared to the control group on day 28 post-infection. The levels of ALB, ALP, ALT, AST, GGT, and PRO showed no significant different between two groups.

Keywords: *Eimeria ahsata*, lamb, Hematological parameters, Biochemical parameters, OPG

* Corresponding Author email: razmi@um.ac.ir