P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2012 ,( 6), ( 1 ) :19-28

(*JUAPS*) **مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة**

Open Access

# تقييم تأثير الكلوبيولين المناعي IgY على مناعة الدجاج المخمج بطفيلي *Eimeria tenella*

**ثائر عبد القادر صالح*  شهاب احمد محمد**  توفيق إبراهيم الالوسي*****

*جامعة الانبار – كلية العلوم

**جامعة تكريت – كلية التربية

*** جامعة تكريت - كلية الطب البيطري

**معلومات البحث:**

تاريخ التسليم: 2012/2/26
تاريخ القبول: 2012/6/10
تاريخ النشر: 30/ 10/ 2012

DOI: 10.37652/juaps.2012.62116

**الكلمات المفتاحية:**

تقييم،
IgY،
الدجاج،
Eimeria tenella.

**الخلاصة:**

تم الحصول على عزلة محلية Eimeria tenella من خلال اخذ منطقة الأعورين من 850 عينة من مجازر ذبح الدجاج في مدينة الرمادي، وبعد تنقيتها شخصت من خلال شكل وحجم الطفيلي ومنطقة الإصابة، حُصل على عتره التحدي من خلال تقوية العزلة وتكثيرها في دجاج فروج لحم نوع Ross 308 خمس مرات، حقنت العترة الضارية في الدجاج البياض نوع Luhman تحت الجلد وفي عضلة الصدر وعضلة الفخذ بعد مزجها مع محلول Freund's incomplete oil adjuvant، ثم الحصول على الكلوبيولين المناعي IgY من صفار البيض الذي بدأ جمعه بعد ثلاثة أيام من الجرعة الثالثة، كُشف عن IgY بواسطة استخدام اختبار الانتشار المناعي المفرد واختبار الانتشار المناعي المزدوج، استخدم IgY ضد Eimeria tenella في المعاملة بتركيز 4/1 مع جرعة مقدارها 5 x104من عترة التحدي وبثلاث مكررات في المعاملة، أظهرت نتائج التجربة أن الأفراخ المعالجة بـ IgY بعد ثلاثة أيام من إعطاء جرعة التحدي قد أعطت نسبة حصانة بلغت 51.12% بينما أظهرت نتائج إعطاء عزلة التحدي مع محلول IgY نسبة حصانه بلغت 75.55% وأخيرا إعطاء جرعة التحدي بعد إعطاء محلول IgY بثلاثة أيام فقد أعطى نسبة حصانه بلغت 88.88% دون حدوث أي ضرر في الأفراخ المعاملة في التجربة مقارنة مع معاملة السيطرة الموجبة والتي اعطت نسبة حصانه بلغت 95.55% مقارنة بالسيطرة السالبة التي اعطت نسبة حصانه بلغت 17.78 %، كما أثبتت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية على مستوى احتمالية 0.05 بين جميع المعاملات ما عدا المعاملة الأولى مع المعاملة الخامسة.

## المقدمة

الباحثان Tyzzer عام 1929 و Johnson عام 1938 هما اللذان وضعا الأسس المعتمدة في تشخيص داء الاكريات Coccidiosis في الدواجن [1]، داء الاكريات يعد من الأمراض المهمة التي تخمج الحيوانات كافة إذ تسببه أوالي أحادية الخلية تعود إلى صنف البوغيات Sporozoaida التابعة لشعبة معقدة الفم Apicomplexa [3,2]، تتميز أكياس بيض جنس *Eimeria* المبوغة Sporulated Oocysts بشكلها البيضوي Ovoid واحتوائها على أربع أكياس بوغية Sporocysts، يحوي كل كيس بوغي على زوج من البويغات Sporozoites، وتتميز الأنواع التابعة لجنس الايميريا بالخصوصية العالية للمضيف والخصوصية العالية للعضو المصاب [4]، أن بروز ظاهرة المقاومة لمضادات الاكريات من قبل طفيلي *Eimeria* جعل المخاطرة تهيمن على الثبات الاقتصادي لصناعة فروج اللحم[5]. لذلك فرض على الباحثين جهوداً علمية كبيرة للبحث عن طرائق بديلة للسيطرة على داء الاكريات، وذلك بزيادة المعرفة عن سلوك الطفيلي والاستجابة المناعية فضلاً عن التحويرات الغذائية، وبالرغم من التطور الحاصل في الأدوية الوقائية والعلاجية تبقى السيطرة على المرض تكلف صناعة الدواجن مبالغ باهظة، ففي عام 2000 لوحظ أن أعداد الأفراخ التي تصرف لها العلاجات بحدود 88,166,826 فرخاً وبشكل مستمر على عموم محافظات العراق [6].

أن كلمة المناعة ( Immunity ) تعني قدرة الجسم على حماية نفسه من المستضدات الغريبة، وتكوين الجسم للكلوبيولينات المناعية Igs

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Science;
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5859-6212 .Mobil:777777
E-mail address:

ضد معظم المستضدات Ags الغازية هو في الحقيقة وسيلة علاجية تنقذ الجسم مما قد تسببه تلك المستضدات من أمراض وأضرار، وان استخلاص الأجسام المضادة المتخصصة ضد مستضد معين وحقنها في جسم آخر سوف يولد مناعة ضد نوع المستضد المراد الوقاية منه (التمنيع المنفعل Passive immunization)[7]، ولأن الكمية المنتجة من الكلوبيولينات المناعية قليلة في اللبأ فقد تم البحث عن بديل تكون فيه نسبة الكلوبيولينات المناعية عالية لذلك تم التوجه إلى مح البيض Yolk Egg، أن IgY الذي يتواجد في صفار البيض وبكميات كبيرة يكون له دور أساسي في حماية الجسم من المستضدات الدخيلة، ونظراً للقيمة الغذائية العالية لمنتجات الدواجن(اللحم والبيض) فقد ازداد الطلب الاستهلاكي عليها في جميع أنحاء العالم مما ولد ضرورة مُلحة تهدف نحو تحسين السلالات المستخدمة في التربية لغرض الارتقاء في إنتاجيتها إلى مستويات عالية [8]، ولكن ضعف الاستجابة المناعية للسلالات الحديثة لفروج اللحم جعلها عرضة للأمراض والهلاكات المستمرة، وأصبحت مشكلة انتشار الأمراض وعلاجها واحدة من أهم المشاكل التي تعترض التوسع في تربية الدواجن [10,9]، لذلك هدفت الدراسة إلى استخلاص وتنقية الكلوبيولين المناعي IgY من صفار البيض ودراسة دوره في حماية (تمنيع Immunization ) أفراخ التجربة نوع Ross 308 المخمجة بالطفيلي *Eimeria tenella*.

## المواد وطرق العمل

### تحضير العلف

حضرت عليقه واحدة لجميع المعاملات طيلة فترة التجارب، إذ تم إعداد تركيب العليقة من قبل المختصين في مركز أعالي الفرات للأبحاث الزراعية / المنطقة الغربية، واستخدام المركز البروتيني النباتي المستورد المسمى Preconex لأنه لا يحتوي على مضاد الاكريات كما في الجدول (1).

**جدول(1) تركيب العليقة المستخدمة في الدراسة**

| المواد | النسبة المئوية% |
|---|---|
| ذرة صفراء | 60 |
| صويا | 27 |
| مركز بروتيني | 10 |
| حجر كلس | 0.7 |
| ملح | 0.3 |
| دهن نباتي | 2 |
| المجموع | 100 |

### الايميريا تنيلا *Eimeria tenella*

تم استخدام عزلة محلية حديثة من الـ *E. tenella* التي تم الحصول عليها من إحدى مجازر ذبح الدجاج في محافظة الانبار/ مدينة الرمادي من خلال اخذ الأعورين وفحصها للتأكد من إصابتها بداء الاكريات، كما تم تأكيد تشخيص العينة في المستشفى البيطري / الرمادي وكذلك من قبل د. حيدر محمد علي / جامعة بغداد / كلية الطب البيطري، وقد تم تحضير أكياس البيض للطفيلي بإتباع ما يلي :

تحضير أكياس البيض الناضجة

جمعت أكياس البيض من خلال اخذ الأعورين (مع محتوياتها) خلال شهر كانون الأول 2010، وتم وضعها في خلاط كهربائي Blender، ثم أخُذ الخليط ورشح بواسطة مصفاة ( منخل )50مش/سم$^2$، بعدها رشح بواسطة قطعة من قماش التول للتخلص من البقايا العالقة، ثم رُسب الخليط بواسطة الطرد المركزي بسرعة 3000دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق، غُسل الراسب بالماء المقطر ورُسب مرة أخرى ( أعيدت الطريقة ثلاث مرات )، بعدها تم تطويف Floatation الراسب بواسطة محلول شيذر السكري أو المحلول الملحي المشبع Nacl ( أعيدت عملية التطويف ثلاث مرات ) وفي كل مره يوضع الراشح مع سابقه في قنينة نظيفة، اخُذ الراشح وخفف بالماء المقطر بنسبة 1 راشح : 10 ماء مقطر، ووضع الخليط الكلي مع كمية مساوية من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم بتركيز 2,5% لحفظ أكياس البيض، وضع العالق ( الراشح ) في دورق زجاجي نظيف ومعقم ووضع في حمام مائي هزاز Shaker Water Bath بدرجة حرارة 25–28 $^{o}$م لمدة 72 ساعة وغطى الدورق بالورق الفضي Aluminum Foil المعقم المثقب الذي يسمح بدخول الأوكسجين الضروري لحدوث عملية التبويغ Sporulation [11]، وإكمال العالق بالماء المقطر بين مدة وأخرى لكي لا يجف العالق [12] تم التأكد من نضوج أكياس البيض من خلال فحصها تحت المجهر [13].

### تنقية و تعقيم أكياس البيض

تم تنقية أكياس البيض للطفيلي وتعقيمها اعتماداً على ما جاء في[14, 15, 16].

### حساب أكياس البيض

تم حساب وعد أكياس البيض الناتجة في المليلتر المكعب الواحد بعد تخفيف العينة 100 مرة بالماء المقطر، وحسبت بواسطة جهاز (شريحة) عد كريات الدم Haemocytometer وفي المربعات

المخصصة لعد كريات الدم البيضاء للحصول على معدل الأكياس في المربع الواحد، حيث تم تقسيم العدد الكلي على أربعة ثم ضرب × 100 [17].

**تكثير أكياس البيض**

تم تنقية العزلة في المختبر وذلك بتخميجها لأفراخ فروج لحم Ross 308 وبتمريرات متعددة كالآتي :-

بعد تنقية العزلة تم تنشيط العترة النقية وتكثير أكياس البيض وذلك باستخدام 50 فرخاً ربيت في أقفاص حديدية ذات أرضية مشبكه في غرفة معزولة وقدم لها الماء والعلف الخالي من مضادات الاكريات، وتم تخميجها باستخدام محقنة بلاستيكية سعة 1 مل، إذ تم إدخالها عن طريق الفم مباشرة إلى الحوصلة In Crop بعالق يحوي $5 \times 10^4$ كيس بيض/ فرخ، بخمس تمريرات باستخدام 10 أفراخ لكل تمريره بأعمار 14، 21، 28، 30، 35 يوم على التوالي، ووضع إناء بلاستيكي ملحق بالقفص حاوي على 2,5% من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم تحت الأرضية المشبكة للقفص في اليوم الرابع والخامس والسادس والسابع والثامن وقتلت الأفراخ في اليوم التاسع من الخمج وتم تشريحها، تم تحضير أكياس البيض وتبويغها للتجريع مرة ثانية، وكذلك تم تجميع أفراخ التجربة الثانية بالطريقة المذكورة أعلاه، أما الهدف من ذلك كان:

1- التأكد من كون العزلة تنتمي للـ *E. tenella* من خلال فحص منطقة الأعورين.

2- زيادة ضراوة العزلة والحصول على عتره التحدي.

3- تحضير جرع كافية من أكياس البيض المبوغة لاستخدامها في هذه الدراسة.

**تشخيص أكياس البيض**

شخصت العزلة من خلال الاعتماد على الفحص العياني للآفات وموقع التطفل والفحص المجهري لأكياس البيض من حيث الأشكال والأبعاد حسب [18 , 19 , 20]، وذلك باستخدام المجهر والعدسة العينية المدرجة Graduated Ocular Micrometer، وللحصول على معامل المجهر استخدمت المعادلة التالية :

معامل المجهر = معدل قياس المسرح الدقيق / معدل قراءات المقياس العيني * 100 مايكروميتر

الأبعاد الحقيقية لأكياس البيض = قياس أبعاد أكياس البيض بواسطة العدسة العينية المدرجة * معامل المجهر

كما تم تأكيد تشخيص العزلات في المستشفى البيطري / الرمادي وكذلك من قبل د. حيدر محمد علي في كلية الطب البيطري / جامعة بغداد / قسم الطفيليات.

قياس اقل جرعة من أكياس البيض الناضجة لأحداث 50% نفوق في الأفراخ المخمجة LD50

استخدمت طريقة الباحثين[21] في حساب اقل جرعة من أكياس البيض الناضجة لإحداث 50% نفوق في الأفراخ المخمجة وتمت كالآتي:

أ- تم توزيع 120 فرخ نوع Ross 308 بصورة عشوائية وبمكررين لكل مكرر 60 فرخاً إلى ستة مجاميع بحيث يكون نصيب كل مجموعة منها 10 أفراخ

ب- تم تخميج الأفراخ بعمر 30 يوم حسب الجرعة التالية :

المجموعة الأولى 30000 كيس بيض مبوغ.

المجموعة الثانية 40000 كيس بيض مبوغ.

المجموعة الثالثة 50000 كيس بيض مبوغ.

المجموعة الرابعة 60000 كيس بيض مبوغ.

المجموعة الخامسة 70000 كيس بيض مبوغ.

المجموعة السادسة ماء مقطر (سيطرة)

ج- تسجيل الهلاك من بداية اليوم الخامس وحتى نهاية اليوم الثامن وكذلك فأن هذه الأكياس يستفاد منها في التجربة الأساسية.

**تخميج الدجاج البياض**

أخذت 10 دجاجات بياضه نوع Luhman وتم حقنها بالعترة الضارية للطفيلي (جرعة التحدي) وبجرعات متتابعة حيث تم توزيع إعطاء الجرعة الأولى تحت الجلد وفي عضلة الصدر وعضلة الفخذ وعضلة الرقبة ومقدارها $5 \times 10^4$ وبعد أسبوعين أعطيت الجرعة الثانية بمقدار $1 \times 10^4$ أما الجرعة الثالثة فقد أعطيت بعد أسبوعين أيضاً وبمقدار $1 \times 10^3$ والجرعة الرابعة بعد 20 يوم بمقدار $1 \times 10^3$ لغرض الحصول على الجسم المضاد IgY لهذه العترة حيث تم جمع البيض منذ بداية إعطاء الجرعة الأولى والتي استمرت 87 يوم [22 , 23] طريقة عزل الكلوبيولين المناعي IgY من صفار البيض ( PEG - 6000 )

1- بعد كسر البيضة وضعت في مصفاة ( منخل صغير 50 مش/سم$^2$) لكي يتم التخلص من أح البيض، أُخذ المح وتم وضعه على ورقة ترشيح وتمت دحرجته للتخلص من اح البيضة بالكامل، ثُقب غشاء المح وسكب في أنبوب مدرج Tube 50 مل لمعرفة

كمية المح ( 15 مللتر )، أُكمل الحجم إلى 45مللتر بمحلول Phosphate Buffer Saline (PBS) ذات pH=7.2.

2- أُضيف 1.58غم من Polyethylene glycol 6000 (PEG) أي بنسبة 3.51% من كمية المحلول

3- خُلط جيداً بواسطة جهاز المازج الهزاز Vortex لمدة 30 ثانية، ثم وضع في حاضنة هزازة Incubator Roller Mixer لمدة 10 دقائق حتى تغير لونه إلى الأصفر الفاتح، تم وضعه في جهاز الطرد المركزي المبرد Cooling Centrifuge بدرجة حرارة 4م$^{o}$ وبسرعة 13000دورة /دقيقة ولمدة 20 دقيقة حتى فُصل إلى راسب وعالق.

4- أُخذ العالق ورُشح بواسطة ورقة ترشيح No.1، أُخذ الراشح بعدها وأُضيف له نسبة 8.5% من PEG ثم كررت الخطوة رقم (3).

5- أُخذ الراسب وأُضيف له 4 مللتر من محلول(PBS ( pH 7.2 ومُزج بواسطة جهاز المازج Vortex لمدة 30 ثانية مع استعمال عمود زجاجي بعد غسله وتعقيمه بواسطة الماء المقطر المعقم، أُكمل الحجم إلى 10مللتر من محلول PBS وأُضيف له نسبة 12% من PEG ثم كررت الخطوة رقم (3).

6- أُضيف إلى الراسب 4مللتر من PBS ومزج جيداً بواسطة Vortex، نُقي IgY بعد ذلك من الأملاح بواسطة عملية الديلزة Dialysis للمحلول المستحصل عليه، حيث أُخذ كيس الديلزة 80000- 100000 دالتون، وغُسل بشكل جيد بواسطة 1% حامض الخليك لمدة نصف ساعة بعدها غُسل بالماء المقطر لمدة نصف ساعة أيضاً، وضع المحلول في كيس الديلزة ووضع الكيس في بيكر يحتوي على كمية من PBS بحيث تغطي كيس الديلزة بالكامل، وتركت على جهاز الخلاط المغناطيسي Magnetic Stirrer بدرجة حرارة الغرفة لمدة 24ساعة، سُحب المحلول بعدها IgY من كيس الديلزة (المديلز) وحُفظ في الثلاجة لحين الاستعمال [24 , 25 , 26 , 27].

اختبار الانتشار المناعي المزدوج (طريقة اوكتزلوني) Double mmunodiffusion Ouchterlony test

* أذيب هلام الاكاروز Agarose بنسبة 1% في البفر PBS ذات pH=7.2، وبعد الإذابة على درجة حرارة 90م$^{0}$ مع التحريك الهادئ المستمر إلى أن أصبح رائقاً، بُرد بالماء حتى أصبحت درجة حرارته 56م$^{0}$ تقريباً، سكب بهدوء في طبق ( 4.5 X 4.5 سم) نظيف جاف ومعقم وموضوع على سطح مستوي، بعد تصلب الهلام عملت فيه 6 حفر دائرية تحيط بحفرة مركزية قطر كل منها 4 ملم وبُعد كل دائرة محيطية عن الحفرة المركزية 1سم، وأزيلت القطع الدائرية من الحفر، خفف المضاد IgY بالبفر PBS بنسبة 1/1 (1مل IgY /1 مل PBS )،1/1،4/2، 8/1، 16/1، ماء مقطر، وسحب 10مايكروليتر من المستضد ووضع في الحفرة المركزية.

* وضع 10مايكروليتر من كل تخفيف من المضاد IgY في الحفر المحيطة.

* وضع الطبق في غرفة رطبة (الحاضنة) بدرجة حرارة الغرفة لمدة يوم إلى ثلاثة أيام، لوحظ بعدها وجود خطوط ترسيبية بين الحفر المحيطة والحفرة المركزية.

* غسل الطبق من IgY الزائد ثم جفف وصبغ بمحلول صبغة Comassie brilliant blue R-250 المحضرة بنسبة 0.05% في خليط الايثانول : حامض الخليك : ماء مقطر (45:5:50)[28].

اختبار الانتشار المناعي المفرد (طريقة مانسيني) Single radial immunodiffusion

* خفف المضاد IgY بنسبة 4/1 ونقل 1.2مل من المضاد المخفف إلى أنبوبة اختبار وضعت في حمام مائي على 56م$^{0}$.

* حضر هلام الاكاروز بنسبة 1% في البفر PBS، وبعد الإذابة على درجة حرارة 90م$^{0}$ مع التحريك الهادئ المستمر إلى أن أصبح رائقاً، بُرد بالماء حتى أصبحت درجة حرارته 56 م$^{0}$ وسحب 10.8مل منه وأضيف إلى الأنبوبة المحتوية على المضاد المخفف أو IgY المخفف وهو في الحمام المائي ومزجا جيداً.

* صب الهلام على طبق (4.5 X 4.5 سم) نظيف وجاف ومعقم موضوع على سطح مستوي.

* بعد التصلب ثقب الهلام ثقب مركزي وبقطر 4 ملم وأزيلت القطع الدائرية من الحفر.

* وضع 10 مايكروليتر من نموذج المستضد في حفرة وسطية للتأكد بأن التركيز المطلوب يُحدث تلازنٌ Agglutination، ثم وضع الطبق في مكان رطب مدة 18 ساعة على درجة حرارة 20-25م$^{0}$.

* غسل الطبق بماء خفيف جداً، ثم جفف وصبغ بمحلول صبغة Comassie brilliant blue R-250 المحضرة بنسبة 0.05% في خليط الايثانول : حامض الخليك : ماء مقطر (45:5:50)[28].

تجربة إعطاء صبغة بالفم عن طريق الكبسولة لمعرفة مكان وصولها

لغرض التأكد من مكان استقرار الكبسولة المعطاة وكذلك تحديد المكان الذي تفتح فيه الكبسولة داخل القناة الهضمية في جسم الطير أجريت هذه التجربة، حيث أعطيت كبسولة تحتوي على صبغة غذائية غير سامة وبعد ساعة من إعطائها تم تشريح الطير والتأكد من المكان الذي تفتح فيه الكبسولة ووصول الصبغة إلى المكان المحدد.

إعطاء IgY للدجاج

تم إعطاء محلول IgY عن طريق الفم بواسطة كبسولة صغيرة الحجم بعد أن وضع محلول IgY في داخلها وبتركيز 4/1 [29 a , b].

**تصميم التجربة**

تم استخدام225 فرخ فروج لحم نوع ( Ross 308 ) للتجربة واستخدم فيها خمس معاملات لكل معاملة 45 فرخاً ولكل معاملة ثلاث مكررات، لكل مكرر 15 فرخاً وبعمر 21 يوم، حيث تم إعطاء العترة الضارية عن طريق التجريع داخل الحوصلة، وكذلك الكلوبيولين المناعي IgY فقد تم إعطاءه بالتجريع حيث وضع في داخل كبسولة صغيرة وكانت المعاملات كما يلي :

المعاملة الأولى : ماء مقطر (سيطرة موجبة).

المعاملة الثانية : العترة الضارية فقط (سيطرة سالبة).

المعاملة الثالثة : إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY بتركيز 4/1 بعد إعطاء العترة الضارية بثلاثة أيام.

المعاملة الرابعة : إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY بتركيز 4/1 مع إعطاء العترة الضارية

المعاملة الخامسة : إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY بتركيز 4/1 قبل إعطاء العترة الضارية بثلاثة أيام.

التحليل الإحصائي

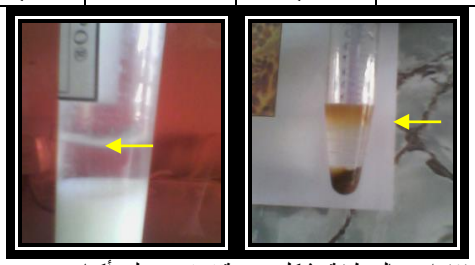
أتبع نظام التصميم العشوائي الكامل (C.R.D.)، وتحليل التباين (ANOVA)، واختبار أقل فرق معنوي (L.S.D.) حسب ما جاء في[30].

**النتائج والمناقشة**

أن الأجسام المناعية لصفار البيض تمثل احد أهم البدائل التي تتمتع بقدرة عالية على الوقاية من العديد من المسببات المرضية وكذلك فأن وفرته في صفار البيض وتخصصه ضد نوعية المرض وسهولة الحصول عليه وعدم سميته أثناء العلاج جميعها خصائص تميز استخدام هذا العلاج [31]، دراسة البحث الحالية أشارت إلى الكشف عن كفاءة IgY في حماية فروج اللحم المخمج بداء الاكريات نوع *Eimeria tenella*، جمعت العينات والبالغة 850 عينة براز وفُحصت تحت المجهر من خلال استخدام طريقة الترسيب وطرق التطويف بالمحلول السكري المشبع ( محلول شيذر السكري ) والمحلول الملحي المشبع Nacl، وقد أكدت النتائج أن محلول شيذر السكري كان الأكفأ في إظهار تشخيص عينة طفيلي *Eimeria tenella* يليها طريقة التطويف بالمحلول الملحي المشبع Nacl ثم طريقة الترسيب Sedimentation، وربما يعود سبب تفوق كفاءة المحلول السكري إلى شدة كثافة ولزوجة المحلول مما يجعله يرفع اكبر كمية موجودة من عزلة الطفيلي إلى الأعلى، كذلك أجريت تنقية لأكياس البيض بواسطة هايبوكلورات الصوديوم بنسبة 6%، وقد ظهرت طبقة طافية من أكياس بيض الطفيلي، الجدول (2) والشكل (1).

جدول (2) الطريقة الأفضل في الكشف عن الطفيلي *E. tenella*

| عدد العينات المفحوصة | طريقة التطويف بمحلول شيذر السكري | طريقة التطويف بالمحلول الملحي المشبع | طريقة الترسيب |
|---|---|---|---|
| 850 عينة | 366عينة موجبة 484 عينة سالبة | 360عينة موجبة 490 عينة سالبة | 351عينة موجبة 499 عينة سالبة |



شكل (1) انفصال طبقة بشكل حزمة تحتوي على أكياس بيض طفيلي *Eimeria tenella*

كما أكدت الدراسة أن هناك 366 عينة موجبة ( مصابة ) و484 عينة سالبة (غير مصابة) من مجموع العينات، أي أن نسبة الخمج المئوية بلغت 43,059% من مجموع العينات المأخوذة كما في جدول (3).

**جدول (3) نسبة الخمج وعدد العينات المفحوصة**

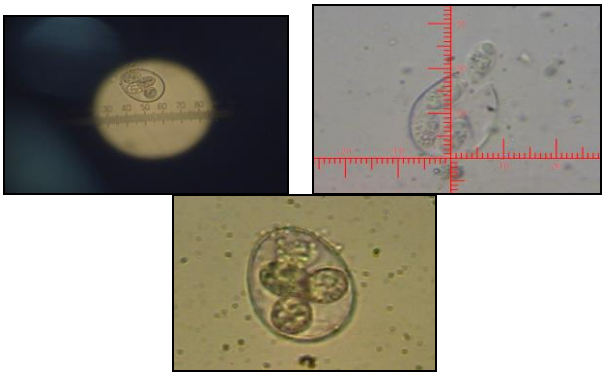
| عدد العينات المفحوصة | عدد العينات الخمجة | عدد العينات غير الخمجة | نسبة الخمج المئوية % |
|---|---|---|---|
| 850 عينة | 366عينة | 484عينة | %43,059 |

شُخص الطفيلي اعتماداً على شكل وحجم كيس البيض وموقع التطفل (الأعورين)، وقد كان حجم الطفيلي يتراوح بين 18–19 X 22–23 مايكروميتر وهذا يطابق ما ذكره [32]، كما تم تأكيد تشخيص العينة من قبل المستشفى البيطري / الرمادي وكذلك د. حيدر كلية الطب البيطري / جامعة بغداد / قسم الطفيليات، الجدول(4) والشكل(2).

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) **مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة** Open Access
2012 ,( 6), ( 1 ) :19-28

**جدول( 4 ) تشخيص أكياس بيض Oocysts للطفيلي *Eimeria tenella***

| نوع العزلة | قياس كيس البيض | | شكل كيس البيض | الصورة التوضيحية |
|---|---|---|---|---|
| *E. tenella* | مايكرومتر 19-18 | مايكرومتر 23-22 | بيضوي Ovoid | |



**شكل (2) عملية خروج Sporocyst من الكيس Oocyst بعملية Excystationوكذلك شكل وحجم الطفيلي بعد التبويغ.**

استعملت أكياس بيض *Eimeria tenella* الحية لانها مستضدات جيدة لتحفيز استجابة مناعية عالية [33]، وعند مزجها مع محلول فروند بشكله الناقص Freund's Incomplete Adjuvant Form (IFA or FIA) سوف يحفز مناعة الخلايا في الجسم وبالتالي يحفز إطلاق الكلوبيولينات المناعية immunoglobulin's [34] وفي هذه الدراسة تم اختيار كمية مناسبة من أكياس بيض الطفيلي لاستخدامها في التجربة وبتأثير 50% نفوق في الأفراخ المعاملة LD 50 لاستخراج كمية مناسبة من الـ IgY لغرض العلاج، إذ تم اخذ 120 فرخاً بعمر 30 يوم لإجراء التجربة كما في الجدول (5) والشكل(3).

شكل ( 3 ) نفوق بعض أفراخ التجربة وظهور علامات المرض من تهدل الأجنحة والانزواء والإسهال

جدول (5) قياس أقل جرعة من أكياس البيض Oocysts الناضجة لإحداث 50% نفوق في الأفراخ المخمجة

| مجاميع التجربة | أفراخ التجربة | عدد المكررات | زمن التجربة | جرعة الطفيلي | عدد الهلاكات | اليوم الذي حصلت فيه الهلاكات | نسبة الهلاكات المئوية |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| المجموعة الأولى | 20 | 2 | 14 يوم | $3*10^4$كيس بيضة | 4 | في اليوم التاسع | %20 |
| المجموعة الثانية | 20 | 2 | 14 يوم | $4*10^4$كيس بيضة | 6 | في اليوم الثامن | %30 |
| المجموعة الثالثة | 20 | 2 | 14 يوم | $5*10^4$كيس بيضة | 10 | في اليوم السادس | %50 |
| المجموعة الرابعة | 20 | 2 | 14 يوم | $6*10^4$كيس بيضة | 13 | في اليوم الرابع | %65 |
| المجموعة الخامسة | 20 | 2 | 14 يوم | $7*10^4$كيس بيضة | 16 | في اليوم الرابع | %80 |
| المجموعة السادسة | 20 | 2 | 14 يوم | ماء مقطر (سيطرة) | صفر | ----- | صفر% |

تمت تنقية العزلة بالتمريرات المتعددة لغرض الحصول على عزلة التحدي، كذلك تمت ملاحظة التأثيرات المرضية الواضحة في منطقة الإصابة ويعود سبب ذلك إلى أن الطفيلي يهاجم خلايا الطبقة الطلائية المبطنة لمنطقة الأعورين ويتكاثر في داخلها مما يقلل من كفاءة عملها [35]، الجدول (6) والشكل (4).

جدول (6) التمريرات المتعددة للعزلة المنقاة في أفراخ فروج اللحم للحصول على العترة الضارية.

| عدد التمريرات للتجربة | عدد الأفراخ الداخلة في التجربة | عمر الأفراخ الداخلة في التجربة | وقت ظهور العلامات السريرية | معدل الهلاكات في المعاملة | نسبة الهلاكات المئوية | اليوم الذي حصلت فيه الهلاكات |
|---|---|---|---|---|---|---|
| التمريرة الأولى | 10 | 14 يوم | في اليوم الرابع | 5 | %50 | في اليوم (السادس) |
| التمريرة الثانية | 10 | 21 يوم | في اليوم الرابع | 5 | %50 | في اليوم (السادس) |
| التمريرة الثالثة | 10 | 28 يوم | في اليوم الرابع | 5 | %50 | في اليوم (السادس) |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| التمريرة الرابعة | 10 | 30 يوم | في اليوم الرابع | 6 | %60 | في اليوم الخامس |
| التمريرة الخامسة | 10 | 35 يوم | في اليوم الثالث | 7 | %70 | في اليوم الرابع |

شكل (4) الأعورين المصابة في احد أفراخ التجربة المخمج بالنوع *Eimeria tenella*

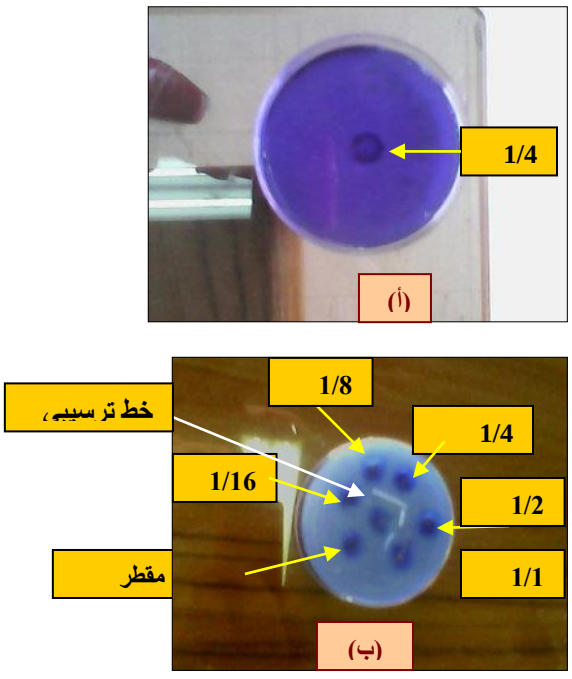
حقن الدجاج البياض نوع *Luhman* تحت الجلد وفي عضلة الصدر وعضلة الفخذ بعد مزجه مع محلول فروند الناقص وبجرعات متناقصة من المستضد وتركت فواصل زمنية طويلة نسبياً لغرض الحصول على أضداد ذات ألفة مرتفعة [36]، إن صفار البيض يحتوى على IgY فقط ولذلك فان طريقة الحصول عليه تكون أكثر سهولة من الحصول على IgG من مصل الحيوانات الثديية، كما إن استخدام الطريقة التقليدية لذبح الحيوان للحصول على IgG المتخصص من الدم تكون أصعب وأكثر كلفة من الحصول على IgY من خلال جمع البيض من الدجاج المحصن بدون ذبح الحيوان [30]، الجدول (7).

جدول (7) نتائج اختبار عزلة التحدي للحصول على الكلوبيولين المناعي IgY من صفار البيض في الدجاج نوع *Luhman*

| عدد الدجاج البياض | الجرعة من الطفيلي | زمن التجربة | جمع البيض |
|---|---|---|---|
| 10 دجاجة | $5*10^4$كيس بيضة | أسبوعين | أهملت البيوض |
| | $1*10^4$كيس بيضة | أسبوعين | أهملت البيوض |
| | $1*10^3$كيس بيضة | 28 يوم | تم جمع البيض في اليوم الثالث بعد الجرعة[39] |

ان كل بيضة ممنعة بمرض معين تعطي كمية من IgY مقدارها حوالي 60-100ملغم مجفف من مح البيض البالغ تقريباً 15 مللتر [37]، كُشف عن IgY بطريقة التلازن مع العترة الضارية بطريقة الانتشار المناعي المفرد والمزدوج بسبب ان هذه الاختبارات الكمية تكون دقيقة لتقدير تركيز وفعالية مستضد معين حتى وان كان موجوداً مع مستضدات أخرى [28]، ومن الشكل (5) نلاحظ وجود هالة حول الحفرة (أ) ووجود الخطوط الترسيبية (ب).

أعطيت جرعة العترة الضارية عن طريق الفم إلى الحوصلة مباشرة In crop، أما محلول IgY فقد تم إعطاءه عن طريق الفم بواسطة كبسولة صغيرة [29 a , b]، بعد أن أجريت تجربة إعطاء صبغة غير سامة (صبغة البيبسي ) والتعرف على مكان وصول الكبسولة وانفتاحها ونشر الصبغة، لذلك فقد تمت تغطية محلول IgY بنجاح والتخلص من عملية هضمه من قبل العصارات الهاضمة في المعدة وانفتاح الكبسولة في المكان المحدد لها، لقد أعطت نتيجة العلاج بعد ثلاثة أيام من إعطاء جرعة التحدي حماية من المرض بلغت 51.12% بينما كانت نتيجة حصانة إعطاء IgY مع العترة الضارية 75.55% أما بالنسبة لإعطاء العلاج IgY قبل ثلاثة أيام من إعطاء العترة الضارية فقد بلغت نسبة الحصانة 88.88% وبدون ظهور أعراض سريرية ومرضية على الدجاج المعالج، وبسبب عدم ظهور علامات سريريه في الأفراخ المعاملة بعد التمنيع بـ 14 يوم، يؤكد أن التمنيع لم يؤثر سلبا في صحة الأفراخ ولم يسمح بتطور المرض، وهذا يتفق مع ما وجده [29 a , b]، بينما كانت نسبة الهلاكات للعترة الضارية لوحدها ( سيطرة سالبة ) 82.22% مقارنة مع مجموعة السيطرة ( سيطرة موجبة ) في نهاية التجربة كما في الجدول ( 8 )، كذلك بينت التحاليل الإحصائية وجود فروق معنوية بين جميع المعاملات تحت مستوى معنوية 0.05 ما المعاملتين الأولى والخامسة إذ لا يوجد فروق معنوية بينهما.




شكل (5) تلازن العترة الضارية مع مستخلص IgY بطريقتي الانتشار (أ)الانتشار المناعي المفرد (ب) الانتشار المناعي المزدوج.

جدول (8) اختبار نتائج التحدي لفعالية الكلوبيولين المناعي IgY مع استخدام جرعة التحدي للعترة الضارية لـ *E. tenella* داخل الجسم الحي In-vivo

| المعاملات | عدد الأفراخ | عدد الهلاكات | | | نسبة الهلاكات % | نسبة الحمالة | كمية الجرعة المعطاة |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | مكرر1 | مكرر2 | مكرر3 | | | |
| بدون معاملة (سيطرة موجبة) a | 45 | 2 | 0 | 0 | 4.45 | 95.55 | ----- |
| العترة الضارية (سيطرة سالبة) ab | 45 | 11 | 13 | 13 | 82.22 | 17.78 | 5*10⁴كيس بيضة / فرخ |
| IgY بتركيز 4/1 بعد ثلاثة أيام من إعطاء العترة الضارية abc | 45 | 9 | 6 | 7 | 48.88 | 51.12 | 5*10⁴كيس بيضة / فرخ |
| IgY بتركيز 4/1 إعطاء العترة الضارية مع abcd | 45 | 3 | 3 | 5 | 24.45 | 75.55 | 5*10⁴كيس بيضة / فرخ |
| IgY بتركيز 4/1 أيام من إعطاء العترة الضارية قبل ثلاثة bcd | 45 | 1 | 3 | 1 | 11.12 | 88.88 | 5*10⁴كيس بيضة / فرخ |

**الأحرف المتشابهة تعني أن هناك فرق معنوية** **L.S.D = 1.832026**

**المصادر**


1- Kheysin, Y.M. (1972). Life cycles of coccidia of domestic animals. University Parck Press, Baltimore, London, Tokyo. 3th Ed

2- Crurrent, W. L.; Upton, S. J. and Long, P. L. (1990). Taxonomy and life cycles. In:Long, P. L. (ed). Coccidiosis of man and domestic animals. Boca Raton, Florida. CRC Press. pp. 1-16.

3- Trees, A. J. (1990). Parasitic diseases. In: Jordan, F. I. W. (ed).Poultry Diseases. 3rd ed. English language book. Society, Bailliere, Tindall, pp.226-233.

4- Shiotan, N.; Baba, E.; Fukata, T.; Arakawa, A. and Nakanishi, T. (1992). Distribution of oocysts Sporocysts of Eimeria tenella and Eimeriamaxima in the digestive tract of chicken. Vet. Parasitol., 41:17-22.

5- Allen, P. C. and Fetterer, R. D. (2002). Recent advances in biology andimmunobiology of Eimeria species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. Clin. Microbiol. Rev., 15: 58-65.

6- الصفار، ربى احمد شوقي عبد الوهاب (2001). الكفاءة التمنيعية لطفيلي الاكريات المضعفة بأشعة كاما في دجاج اللحم، رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري جامعة بغداد، العراق.

7- Keri Marshall, N.D. (2004). Therapeutic Applications of Whey Protein AAltern. Med. Rev.,9(2):136-156).

8- Havenstein , G.B., P.R. Ferket , and B.T. Larson ,(1994). Growth ,livability and feed , conversion of 1975 vs. 1991. broiler fed typical 1957 and 1991 broiler diets poultry Sci. 73:1785-1794.

9- Qureshi , M.A. , and K. E. Anderson ,. (1995). Comparison of immunologic functions of random bred verus present day SCWL. Laying hen strains. poultry science association. 48th. annual meeting. Abs.No.176 10-El.Behairy, A.M. (2005): Immuno-characterization on some Eimeria spp. Infecting chicken in Egypt. M.V.Sc. Thesis Fac. Of vet. Med.,CairoUniversity.11-Bowman, D.D. and Lynn, R.C. (1995) George's Parasitology forveterinarians, Philadelphia, London, Toronto, Tokyo. WB Sanders Company.2th Ed. pp297.

12-Edagar, S.A. (1955). Sporulation of oocysts at specific temperatures and notes on the prepatent period of several species of avian coccidiosis. J. Parasitol. 41:214-216.

13-Ibrahim, A.L.; Arafa, E.A. and Msahlabe, A.A. (1997). Study onpathogenicity and immunoginicity of irradiated sporulated intestinal Eimeria oocysts in chickens. Ass. Vet. Med. J. 37:133-140.

14-Jeffers, T. K. (1978). Eimeria tenella sensitivity of recent field isolants to monensin. Avian Dis., 22: 157-161.

15-Davis, L.R. (1973). Techniques. In: The Coccidia. Ed. by:Hammond, D.H. and Long, P.L. Baltimore.

27- Diana , P.; Pablo, A.C.;Esteban , G.C.; Bjorn,B. and Rudiger ,S. (2010). IgY Technology:Extraction of Chicken Antibodes from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipition. vedio internet.

28- Johnston, A. and Thorpe, R. (1987). Immunochemistry in Practice. 2nd ed. Blackwell scientific publications , London , England.

29-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 a). Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodes against Eimeria tenellaand Eimeria maxima infections. Veterinary Parasitology. 163: 123- 126.29-Lee ,S. H., Lillehoj, H. S., Park , D. W., Jang ,S. I., Morales, A., Garcia , D., Lucio, E., Larios, R., Victoria ,G., Marrufo, D., and Lillehoj, E. P.(2009 b). Induction of passive immunity in broiler chickens against Eimeria acervulina by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. Poultry Science 88:562–566.

30- Little , T. M. and Hills. F. J. (1972): Statistical Methods agricultural research. Agricultural extension. University of California.

31-Watts, A.M. and Kennedy, R.C. (1999). DNA vaccination strategies against infections disease. Int.J. of Parasitol. 29: 1149-1163.

32- Long , P. and Gruber , A.( 2005). Proceedings of The IXth International Coccidiosis Conference. chapter 1. Universidade de São Paulo (USP) – Brazil.

33- Danforth, H.D. (1997). Use of live oocysts based vaccines in a vain coccidian control. In: Control of coccidiosis into next millennium. Ed byShirley, M.W.; Tomley, F.M. and Freeman,B.M. Institute for animal health, Compton, New Burg Berks. Pp. 95-96.

34- Armentero MT, Levandis G, Nappi G, Bazzini E, Blandini F (2006),"Peripheral inflammation and neuroprotection: systemic pretreatment with complete Freund's adjuvant reduces 6-yyhydroxydopamine toxicity in a rodent model of Parkinson's disease", Neurobiol. Dis. 24 (3):492–505, doi:10.1016/j.nbd. 2006. 08.016, PMID 17023164.

35- Jenkins, M.C. (2004). Control of avian coccidiosis: drug & Vaccines. Miscellaneous publishing information Bulletine, Feed information. News Service, P.3

Butter worth, London, University Park Press.Pp.411-458.

16-Jorgensen, W.K.; Stewart, N.P.; Jeston, P.J.; Molloy, J.B.; Blight, G.W. andDalgliesh, R.J. (1997). Isolation and pathogenicity of Australian strains ofEimeria praecox and Eimeria mitis Animal Research Institute, Moorooka;Queensland, 4105. Pp10-18.

17-Al-Attar, M.A. (1981). Factors effecting the pathogenesis Eimeria necatrix infections in chicken. PhD. Thesis University of Guelph. Canada.

18-Calnek, B.W.; Barnes, H.J.; Beard, C.W.; McDougald, L.R. andSaif, Y.M.(1997). Disease of poultry. 10th ed. Mosby, Wolf. pp.865-878.

19-Edagar,S.A.(1992):Field diagnosis of coccidiosis in chickens. Agri- Bio Corporation.

20-Amer,M.M.; Awaad, M.H.H; El-Khateeb,R.M.; Abu-Elezz,N.M.; Said, S.A ; Ghetas, M.M. and Kutkat, M.A :(2010). Isolation and Identification of Eimeria from Field coccidiosis in chickens. Journal of Amrican science. (2010); 6(10).

21-Morehouse, N. F. and Baron, R. R. (1970). Coccidiosis: Evaluation of coccidiostats by mortality, weight gains and fecal scores. Exp. Parasitology 28:25-29.

22-جوامير نهاد محمد علي عبد الله (1996).استخلاص ودراسة فعالية بروتينات المناعة من صفار بعض الطيور الداجنة. رسالة ماجستير. كلية الزراعة، جامعة بغداد.

23-Hansen, P.; Scoble, J.A.; Hanson, B.; Hoogenraad, N.J.(1998).Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. J.Immunol.Meth., 215:1-7.

24- polson ,A. (1990). Isolation of IgY from the yolks of eggs bypolyethylene glycol 6000 procedure. Immun Invest. 19:253-258.

25- Rodiger , S. ; Michael , E. ; Christian , S. (2000). Chicken egg yolk antibodies ( Production and Application ).chapter 4 ( Isolation of IgY from yolk ). eds,68-85 , Sub protocol 5, Springer Lab. Manual

26- Javier, F. ; Brito-De, E. and Torrestiana, B.(2010). Purification of egg yolk immunoglobulin (IgY) by Ultrafiltation : Effect of pH , Ionic Strength, and Membrane Properties. J. of Agri. and Food Chem. 2010,58:187-193.

Haak-Frendscho. (1994). Why IgY? Chicken Polyclonal Antibody, An Appealing Alternative. Promega Notes Magazine Number 46, p.11

36- Kim , W.K and Patterson ,P.H..(2003).Production of an egg yolk antibody specific to microbial uricase and its inhibitory effects on uricase activity. Poultry Science ,2003,82:1554-1558. 37- Mary,

# Evaluation the effect of the use Immunoglobulin IgY immunity of infected chickens with the *Eimeria tenella* parasite

THAER A. S. AL-ALOOSI SHEHAB A. ALJEBORY TAWFIQ A. AL-ALOOSI

ABSTRACT:

Been obtained for the isolation of local Eimeria tenella by taking the Cecca of 850 samples from chickens slaughterhouses in the city of Ramadi, and after purification was diagnosed through the shape and size of the parasite and the infection , obtained the challenge strain by strengthening the isolation in Chicken type Ross 308 five times, injected challenge strain in laying hens Type Luhman under the skin and muscle of the chest and thigh after mixing with Freund's incomplete oil adjuvant solution, then get IgY from egg yolk, which began collected three days after the third dose, detection of IgY by using singular and double immunodiffusion test, use the IgY against Eimeria tenella in the treatment concentration of 1/4 with a dose of 5x 104 of the challenge strain and three replicates of treatment, showed the experiment results of the treated chicks with IgY, three days after giving the challenge dose has given the proportion of immunity amounted to 51.12%, while the results given the challenge dose with a solution of IgY given the proportion of immunity amounted to 75.55%, and finally give the challenge dose after giving the solution IgY in three days gave the proportion of immunity amounted 88.88% without any damage in chicks treated in the experiment compared with the control treatment of positive and which gave the proportion of immunity amounted 95.55% compared to control negative, which gave the proportion of immunity amounted 17.78%, as demonstrated by the study of statistical significant differences at the level of probability of 0.05 for all transactions except for the first treatment with the treatment of five.