P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2014 ,(8), (3) :41-57

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

Open Access

استعمال الكلوبيولين المناعي النوعي IgY المنقى من صفار البيض ومعرفة تأثيره في أوزان وأطوال الأعضاء الداخلية في الدجاج المخمج بالطفيلي *Eimeria tenella*

ثائر عبد القادر صالح* شهاب احمد محمد توفيق إبراهيم الالوسي*** هاجر عمار عبد اللطيف* زياد طارق الضنكي*****

*جامعة الانبار – كلية العلوم

**جامعة تكريت – كلية التربية

***جامعة تكريت – كلية الطب البيطري

****جامعة الانبار –كلية الزراعة

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2013/00/00
تاريخ القبول: 2014/5/6
تاريخ النشر: / / 2022

DOI: 10.37652/juaps.2014.124109

الكلمات المفتاحية:

الكلوبيولين المناعي النوعي IgY،
صفار البيض،
الأعضاء الداخلية، الدجاج،
Eimeria tenella.

الخلاصة:

تم الحصول على عزلة محلية من الطفيلي *Eimeria tenella* من خلال اخذ منطقة الأعورين من 850 عينة من مجازر ذبح الدجاج في مدينة الرمادي، وبعد تنقيتها وتبويغها خارج الجسم الحي شخصت من خلال شكل وحجم الطفيلي ومنطقة الإصابة، كما تم تأكيد تشخيص العينة في المستشفى البيطري/الرمادي، حُصل على عتره التحدي من خلال تقوية العزلة وتكثيرها في دجاج فروج لحم نوع Ross 308 خمس مرات، تم تكسير الطفيلي بواسطة جهاز الموجات فوق الصوتية Sonicater واستخراج Sporocyst و Sporozoite، حقنت العترة الضاريةChallenge Strain بعد ذلك في الدجاج البياض نوع Luhman في مناطق مختلفة تحت الجلد وفي عضلة الصدر وعضلة الفخذ وعضلة الرقبة بعد مزجها مع محلول Freund's incomplete oil adjuvant، جُمع البيض منذ اليوم الأول من الجرعة الأولى وحتى نهاية الجرعة الرابعة لمراقبة تتابع زيادة الكلوبيولين المناعي IgY في صفار البيض، أُستخلص الكلوبيولين المناعي IgY من صفار البيض بشكل يومي وتمت ديلزته وترحيل البروتين المستخلص الخام بواسطة تقنية الترحيل الكهربائي العمودي Electrophoresis مع بعض البروتينات القياسية، وقياس تركيز البروتين الخام بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طول موجي 540 نانومتر حسب طريقة بايوريت إذ بلغ أعلى مستوى له 137.12609 ملغم/بيضة، تم فصل IgY باستخدام تقنية كروماتوكرافيا العمود المعبأ بهلام Sephacryl S300 HR بارتفاع 95سم وقطر 1.6سم وتقدير وزنه الجزيئي من خلال فصل صبغة Blue Dextran 2000 وسبعة بروتينات قياسية مختلفة الأوزان الجزيئية لعمل المنحنى القياسي، بعد ذلك اجري للعينة (IgY) مسح ضوئي Spectra Scanning لتحديد الطول ألموجي المناسب من خلال قياس أعلى قمة، إذ تم الحصول على أعلى قمة في الطول ألموجي 280 نانوميتر وبلغت 0.749، كما تم قياس تركيز IgY المستخرج بعد الفصل بالعمود بواسطة Spectrophotometer وعلى طول موجي 280 نانوميتر، إذ بلغ أعلى مستوى له 117.61764 ملغم/بيضة، تم ترحيل IgY بواسطة Electrophoresis مع IgG القياسي للكشف عن حزمة الكاما كلوبيولين، اجري كشف التلازن عن IgY مع العترة الضارية بواسطة استخدام اختبار Single radial immunodiffusion test واختبار Ouchterlony Double immunodiffusion لمعرفة مدى تخصصه ضد نوع العزلة واستخراج التركيز الملائم لاستخدامه كعلاج في التجارب اللاحقة، تم حفظ عينة IgY بواسطة التجميد بدرجة –4 م^0، أظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين المعاملات وخصوصاً منطقة الإصابة (الأعورين) حيث تبين ان هناك فرق معنوي بين نسبة وزن وطول الأعورين إلى نسبة وزن الجسم، وان أفضل وسيلة للعلاج كانت عن طريق إعطاء العلاج بالحقن في الغشاء البريتوني وفي صفار البيض داخل الجسم مقارنة مع السيطرة السالبة ومع بقية المعاملات.

المقدمة:

أن كلمة المناعة (Immunity) تعني قدرة الجسم على حماية نفسه من المستضدات الغريبة، وتكوين الجسم للكلوبيولينات المناعية Igs 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) [1]، ولأن الكمية المنتجة من الكلوبيولينات المناعية قليلة في اللبأ وكذلك تنتهي خلال أيام قليلة لذلك تم البحث عن بديل تكون فيه نسبة الكلوبيولينات المناعية عالية ومستمرة في العطاء لذلك تم التوجه إلى صفار 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 [2]، ولكن ضعف الاستجابة المناعية للسلالات الحديثة لفروج اللحم ودجاج البيض جعلها عرضة للأمراض والهلاكات المستمرة، وأصبحت مشكلة انتشار الأمراض وعلاجها واحدة من أهم المشاكل التي تعترض التوسع في تربية الدواجن [4,3]، الباحثان Tyzzer عام 1929 و Johnson عام 1938 ذكرا وجود أكثر من نوع واحد يسبب داء الاكريات Coccidiosis بالدواجن، والعديد من الباحثين أكدوا بأن *E. necatrix, E. tenella* هما أكثر الأنواع خطراً وأمراضية في الدجاج [5]، 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 [7,6]، تتميز بيوض 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 [8]، ولعدة سنوات خلت كانت الوسيلة الوحيدة للسيطرة على داء الاكريات في صناعة فروج اللحم هي بإضافة مضادات الاكريات إلى الأعلاف Anticoccidial feed additives، إذ لها دور مهم في تطور تلك الصناعة التي بلغ إنتاجها السنوي بحدود 7.6 بليون فروجه لحم سنوياً، إلا أن بروز ظاهرة المقاومة لمضادات الاكريات من قبل طفيلي *Eimeria*، جعل المخاطرة تهيمن على الثبات الاقتصادي لصناعة الفروج [9]، ويبدو أن المحاولات التي تبديها الصناعات الدوائية لتطوير جيل جديد من مضادات الاكريات جعل من عملية التحدي لظاهرة المقاومة التي تبديها أنواع *Eimeria* تفرض 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، وعند مراجعة سجلات الشركة العامة للبيطرة في العراق لعام 2000 لوحظ أن أعداد الأفراخ التي تصرف لها العلاجات يكون بشكل مستمر على عموم محافظات القطر، حيث تبين أن هناك كميات كبيرة جداً من الأدوية العلاجية والوقائية قد صرفت للعلاج، إذ بلغ أعداد الأفراخ المعالجة لعام 2000 بحدود 88,166,826 فرخاً [10]، يعتمد الأساس النظري لهذه التجربة على إن الأجسام المضادة والمتخصصة نوع IgY الموجودة في مصل دم الدجاج والمنتقلة إلى صفار البيض إذا احتفظت بفعاليتها داخل الجسم فإنها سوف تعادل في مفعولها كمية الطفيلي الداخلة إلى الجسم وبالتالي تمنع حدوث الخمج وكذلك التغلب عليه، لذلك هدفت الدراسة إلى استخلاص وتنقية وتقدير الوزن الجزيئي للكلوبيولين المناعي IgY من صفار البيض في الدجاج المُخَّمج بالطفيلي *Eimeria tenella* ومعالجة الدجاج المخمج بالطفيلي ومعرفة أفضل طريقة لإيصال العلاج من خلال إجراء القياسات الدمية والمصلية ومعرفة شدة الآفة العيانية.

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

* Corresponding author at: College of Science, University of Anbar
E-mail address:

الزراعية/المنطقة الغربية/الفرع الثاني/عانه، واستخدم 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 منطقة الأعورين وفحصها للتأكد من إصابتها بداء الاكريات، كما تم تأكيد تشخيص العينة في المستشفى البيطري/الرمادي، 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 الناضجة 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 تكثير 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 محقنه بلاستيكية Syringe سعة 3 مل، إذ تم إدخالها عن طريق الفم مباشرة إلى الحوصلة In Crop بعالق يحوي 5 x 10^4 كيس بيض مبوغ/فرخ، بخمس تمريرات باستخدام 10 أفراخ لكل تمريره بأعمار 14، 21، 28، 30، 35 يوم على التوالي، ووضع إناء بلاستيكي ملحق بالقفص حاوي على محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم 2,5% 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 خارج الجسم بعد جمعها لغرض التجريع 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 Challenge Strain.

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 ألمجهري 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.

تخميج الدجاج البياض

أخذت 10 دجاجات بياضه نوع Luhman وتم حقنها بالعترة الضارية للطفيلي (جرعة التحدي) بعد تكسير Oocyst للطفيلي بواسطة جهاز الموجات فوق الصوتية Sonicator إذ تم مزجها مع محلول فرويند الناقص Freund's incomplete oil adjuvant وبجرعات متتابعة حيث تم توزيع إعطاء الجرعة الأولى تحت الجلد وفي عضلة الصدر وعضلة الفخذ وعضلة الرقبة ومقدارها 5×10^4 وبعد أسبوعين أعطيت الجرعة الثانية بمقدار 1×10^4 أما الجرعة الثالثة فقد أعطيت بعد أسبوعين أيضاً وبمقدار 1×10^3 والجرعة الرابعة بعد 20 يوم بمقدار 1×10^3 لغرض الحصول على الجسم المضاد IgY لهذه العترة حيث تم جمع البيض منذ بداية إعطاء الجرعة الأولى إلى نهاية التجربة والتي استمرت 87 يوم [22، 23]

عزل الكلوبيولين المناعي IgY من صفار البيض (PEG - 6000)

اتبعت طريقة [24، 25، 26، 27] في عزل الكلوبيولين المناعي IgY من صفار البيض.

الترحيل الكهربائي العمودي للبروتينات الخام بهلام متعدد الاكريلامايد Electrophoresis

استخدمت طريقة PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (PAGE- SDS) كما أوردها [28]. باستخدام جهاز الهجرة الكهربائية العمودي الذي جهزته شركة Pharmacia السويدية، لترحيل البروتينات ومتابعة تنقيتها.

قياس الامتصاصية الضوئية : تم قياس الامتصاصية الضوئية على طول موجي 540 نانوميتر لاستخراج التركيز الكلي للبروتين (IgY) الخام حسب طريقة بايوريت باستخدام المحاليل المحضرة من قبل شركة S.L.،Linear Chemicals حيث طبقت المعادلة : التركيز mg/ml = امتصاصية العينة/امتصاصية المحلول القياسي * 70 [29].

فصل وتنقية IgY بالترشيح الهلامي Gel Filtration باستخدام هلام Sephacryl- S- 300- HR

تحضير هلام Sephacryl S 300 HR

حضر هلام Sephacryl S 300 HR وفقا لتعليمات الشركة المجهزة (Pharmacia Fine Chemicals) وكذلك حسب [30،33،32،31] بواسطة رج العلبة المحتوية على Sephacryl S 300 HR لحين المزج الجيد، تم اخذ 125 مل من المزيج وأجريت عملية إزالة الغازات (Degassing) باستعمال مضخة تحت التفريغ Pump لمدة ساعتين وعبأ في العمود بصورة مائلة وعلى جوانب العمود الداخلية ليعطي

هلاماً بأبعاد (1.6× 95) سم وأجريت غسل العمود بمحلول الدارئ PBS وأجريت عملية الموازنة والاسترداد بسرعة جريان مقدارها 18 مل/ساعة وبمعدل 3 مل لكل جزء مفصول Fraction. وبعدها تم تقدير حجم الفراغ للعمود باستعمال المحلول المحضر من الدكستران الأزرق، ثم قُدر حجم الاسترداد للعمود باستعمال سبعة بروتينات قياسية معلومة الوزن الجزيئي و ذلك بإضافة و استرداد كل بروتين على حدة وبالظروف نفسها لاسترداد الدكستران الازرق، كما قدر حجم الاسترداد لبروتينات المناعة المفصولة بالطريقة نفسها أعلاه، ثم قيست الامتصاصية الضوئية على طول موجي 280 نانومتر لكل جزء من الأجزاء المنفصلة بغية تحديد حجم الاسترداد لكل بروتين قياسي، رسم المنحنى القياسي للعلاقة بين حجم الاسترداد/ حجم الفراغ (Ve/ Vo) ولوغاريتم الأوزان الجزيئية، وقدر الوزن الجزيئي لبروتين المناعة IgY المفصول من مقارنة قيمة (Ve/ Vo) مع المنحنى القياسي.

جدول (2) : البروتينات القياسية المستعملة في اختبار الترشيح الهلامي.

البروتين القياسي		الوزن الجزيئي (دالتون)
رايبونيوكليز	Ribonuclease	13700
كيموتريسين أي	Chymotrypsinogen A	25000
البومين مصل البيض	Ova Albumin	43000
الفوسفاتيز الحامضي	Acid phosphatase	55000
البومين مصل البقر	Bovine Serum Albumin	67000
الكلوبيولين ج	IgG	160000
الكلوبيولين ام	IgM	900000

الترحيل الكهربائي العمودي لكلوبيولينات المناعة بهلام متعدد الاكريلامايد:

استخدمت طريقة (PAGE-SDS) لترحيل كلوبيولينات المناعة كما أوردها [28]، باستخدام جهاز الهجرة الكهربائية العمودي الذي جهزته شركة Pharmacia السويدية.

المسح الضوئي Spectra لمحلول IgY

تم إجراء المسح الضوئي Spectra لعينة IgY بواسطة جهاز Spectrophotometer لمعرفة أعلى قمة يصلها وفي أي طول موجي لكي يتم قياس الامتصاصية الضوئية لعينة IgY على نفس الطول ألموجي حيث إن أعلى قمة يصلها تمثل أفضل طول موجي يمكن من خلاله قياس امتصاصية العينة واستخراج تركيزها.

قياس الامتصاصية الضوئية وتقدير كمية IgY الكلي بعد تنقية العينة

تم قياس الامتصاصية الضوئية للنموذج (العينة IgY) على طول موجي 280 نانوميتر Optical Density of 280 nm (OD_{280}) بعد إذابة العينة (IgY) بمحلول PBS ذات رقم هيدروجيني 7.2، وتم استخراج تركيز العينات المقاسة وفقاً لقانون Lambert – Beer Law بمعامل اختلاف 1.36 للـ IgY [30]، حيث تم تطبيق المعادلة أدناه لغرض استخراج تركيز IgY في العينة [31] :

$$\text{IgY Concentration (mg/ml)} = \text{OD280 Value} \times 10/1.36$$

اختبار الانتشار المناعي المزدوج (طريقة اوكتلوني) واختبار الانتشار المناعي المفرد (طريقة مانسيني)

استعمل هلام الاكاروز Agarose بنسبة 1% في البفر PBS ذات pH=7.2 وحسب طريقة [34].

إعطاء IgY للدجاج

تم إعطاء محلول IgY بطرق مختلفة وبتركيز 4/1 [29]

تصميم التجربة

تم استخدام 135 فرخ فروج لحم نوع (Ross 308) للتجربة واستخدم فيها تسع معاملات لكل معاملة 15 فرخاً ولكل معاملة خمس مكررات، لكل مكرر 3 أفراخ وبعمر 28 يوم، حيث تم إعطاء العترة الضارية عن طريق التجريع داخل الحوصلة وإعطاء العلاج بعد يوم من إعطاء العترة الضارية، وكانت المعاملات كما يلي :

المعاملة الأولى : ماء مقطر (سيطرة سالبة).

المعاملة الثانية : العترة الضارية فقط (سيطرة موجبة).

المعاملة الثالثة : إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY عن طريق الكبسولة داخل الفم.

المعاملة الرابعة : إعطاء IgY عن طريق التجريع بالحوصلة بعد إعطاء معادلة حموضة

المعاملة الخامسة : إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY عن طريق الحقن بالغشاء البريتوني.

المعاملة السادسة : إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY عن طريق الحقن بعضلة الفخذ والصدر والرقبة.

المعاملة السابعة : إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY عن طريق الحقن داخل الصفار فوق منطقة السرة.

المعاملة الثامنة : إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY تحت الجلد بالقرب من عضلة الفخذ والصدر والرقبة.

المعاملة التاسعة : إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY عن طريق الحقن داخل الوريد الجناحي.

كما تم تلقيح الأفراخ بكافة اللقاحات المطلوبة وهي : نيوكاسل سلالة لاسوتا + التهاب الشعب الهوائية المعدي IP (عن طريق الرش الخشن) بعمر 2 يوم، نيوكاسل سلالة لاسوتا (عن طريق الرش الخشن وماء الشرب) بعمر 9 يوم، كمبورو سلالة لوكارد (عن طريق ماء الشرب) بعمر 14 يوم، التهاب الشعب الهوائية المعدي IP (عن طريق الرش الخشن وماء الشرب) بعمر 17 يوم، كمبورو سلالة لوكارد (عن طريق ماء الشرب) بعمر 19 يوم، نيوكاسل سلالة لاسوتا (عن طريق الرش) بعمر 23 يوم.

صفات الذبيحة وأوزان الأعضاء الداخلية

تم حساب نسبة التصافي وأوزان قطعيات الذبيحة و أوزان الأعضاء الداخلية حسب [35].

التحليل الإحصائي

اجري التحليل الإحصائي باتجاه واحد حسب ما جاء في برنامج SAS الجاهز الإصدار 9.1 [36].

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 [37]، دراسة البحث الحالية أشارت إلى الاستخلاص والتنقية والكشف عن IgY وعن تخصصه ضد داء الاكريات نوع *Eimeria tenella* بسبب خطورتها الكبيرة إذ تعتبر من اخطر أنواع الكوكسيديا التي تصيب الدواجن والتي تسبب هلاكات عالية جداً تصل من 5–50 % وربما تصل إلى 100% عند التباطؤ في علاجها [38]، 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 [39]، كذلك أجري غسل وتنقية لأكياس البيض بواسطة هايبوكلورات الصوديوم بنسبة 6% (القاصر)، وقد ظهرت طبقة طافية من أكياس بيض الطفيلي، الجدول (3) والشكل (1).

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 (4).

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 [39]، كما تم تأكيد تشخيص العينة من قبل المستشفى البيطري/الرمادي وكذلك د. حيدر محمد علي في كلية الطب البيطري/جامعة بغداد/قسم الطفيليات، الجدول(5) والشكل(2).

جدول (3) يوضح 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

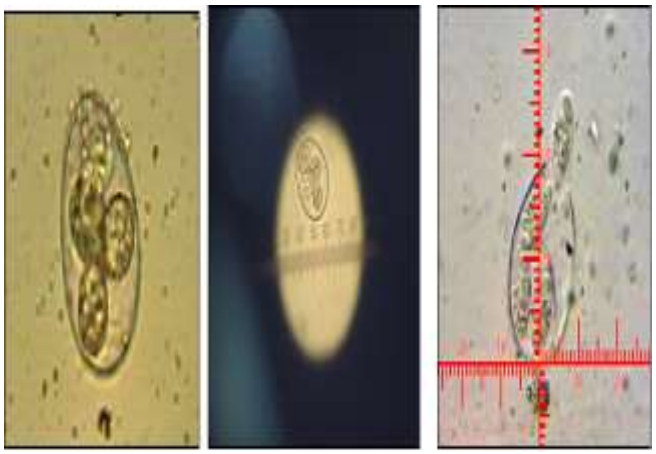
شكل (1) تبين انفصال طبقة بشكل حزمة تحتوي على أكياس بيض طفيلي *Eimeria tenella*

جدول (4) يوضح نسبة الخمج وعدد العينات المفحوصة

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

جدول(5) يوضح تشخيص أكياس بيض Oocysts للطفيلي *Eimeria tenella*

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



شكل (2) تبين عملية خروج Sporocyst من الكيس Oocyst بعملية Excystation وكذلك شكل وحجم الطفيلي بعد التبويغ.

استعملت أكياس بيض *Eimeria tenella* الحية لأنها مستضدات جيدة لتحفيز استجابة مناعية عالية وكذلك استعملت في الجرعة الرابعة أكياس البيض المتكسرة بواسطة جهاز الموجات فوق الصوتية Sonicator لتحرير Sporocyst و Sporozoite من Oocyst لغرض تجهيز مناعة خاصة ضد جميع أطوار الطفيلي المصيبة والمتكاثرة داخل خلايا الطبقة الطلائية في منطقة اعوري القناة الهضمية في الدجاج [40]، 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 [39]، 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 (6) والشكل(3).

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

جدول (6) قياس أقل جرعة من أكياس البيض Oocysts الناضجة لإحداث 50% نفوق في الأفراخ المخمجة

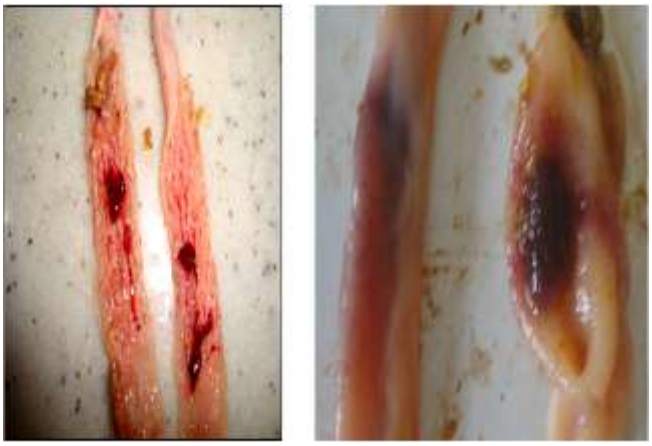
مجاميع التجربة	أفراخ التجربة	عدد المكررات	زمن التجربة	جرعة الطفيلي	عدد الهلاكات	اليوم الذي حصلت فيه الهلاكات	نسبة الهلاكات المئوية
1	20	2	14 يوم	10^4*3كيس بيضة	4	في اليوم التاسع	%20
2	20	2	14 يوم	10^4*4كيس بيضة	6	في اليوم الثامن	%30
3	20	2	14 يوم	10^4*5كيس بيضة	10	في اليوم السادس	%50
4	20	2	14 يوم	10^4*6كيس بيضة	13	في اليوم الرابع	%65
5	20	2	14 يوم	10^4*7كيس بيضة	16	في اليوم الرابع	%80
6	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 [41]، الجدول (7) والشكل (4).

تم حقن الدجاج البياض نوع *Luhman* تحت الجلد وفي عضلة الصدر وعضلة الفخذ وعضلة الرقبة بعد مزجه مع محلول فروبند الناقص وبجرعات متناقصة من المستضد وتركت فواصل زمنية طويلة نسبياً لغرض الحصول على أضداد ذات ألفة مرتفعة [42، 43]، إن صفار البيض يحتوى على IgY فقط من الكلوبيولينات المناعية 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 [44 a،44 b]، الجدول (8).

جدول (7) يوضح 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

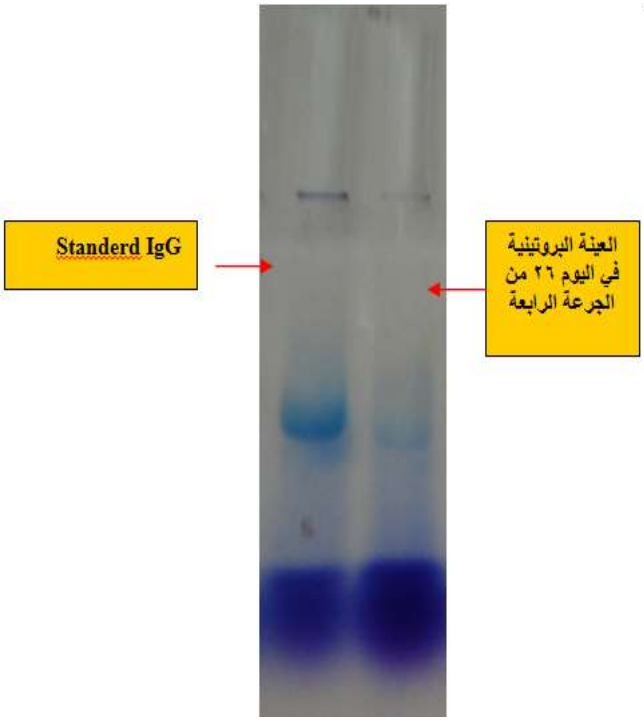


شكل (4) تبين الأعورين المصابة في احد أفراخ التجربة المخمج بالنوع *Eimeria tenella*

جدول (8) يوضح نتائج اختبار عزلة التحدي للحصول على الكلوبيولين المناعي IgY من صفار البيض في الدجاج البياض نوع *Luhman*

عدد الدجاج البياض	الجرعة من الطفيلي	زمن التجربة	جمع البيض
10 دجاجة	10^4*5كيس بيضة	أسبوعين	جمعت وأهملت البيوض بعد قياس تركيز البروتين الكلي وIgY فيها
	10^4*1كيس بيضة	أسبوعين	جمعت وأهملت البيوض بعد قياس تركيز البروتين الكلي وIgY فيها
	10^3*1كيس بيضة	20 يوم	تم جمع البيض في اليوم الثالث بعد الجرعة [43]
	10^3*1كيس بيضة	40 يوم	تم جمع البيض في اليوم الأول بعد الجرعة

تم عزل Crude IgY من صفار البيض باستخدام – PEG 6000 وتمت ديلزته للتخلص من الأملاح، بعدها تم قياس الامتصاص الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر حسب طريقة بايوريت للكشف عن وجود العينة البروتينية وتركيزها وكذلك لمعرفة مدى ارتفاع مستوى الأضداد في العينة إذ أعطت أعلى تركيز في اليوم 26 من الجرعة الرابعة وبلغت 137.12609 ملغم/ بيضة، تم كذلك ترحيل العينات كهربائياً مع بعض البروتينات القياسية لفصل بروتينات المناعة وتقدير الوزن الجزيئي للبروتينات في العينة كما في الشكل (5) جرى بعد ذلك تنقية العينة البروتينية باستخدام تقنية العمود Column Chromatography باستخدام Sephacryl S 300 HR Gel Filtration بعد إزالة الغازات وتعبئة العمود بواقع 125 مل من الهلام على طول العمود 95سم وعرض 1.6سم، إذ تم تقدير الحجم الفراغي للعينة Void Volume (Vo) باستخدام صبغة Blue Dextran 2000 ذات الوزن الجزيئي 1000000 دالتون، إذ تم قياس الامتصاصية الضوئية على طول موجي 600 نانوميتر، وتم استرداد (حجم الاسترداد Elution Volume Ve) العينات البروتينية القياسية بسرعة جريان بلغت 18/ساعة وبمعدل 3 مل جزء مفصول/ 10 دقيقة، وتم قياس الامتصاصية الضوئية للبروتينات القياسية على طول موجي 280 نانوميتر، وقدر الحجم الفراغي للعمود من حساب مجموع حجوم الأجزاء المنفصلة عند إمرار محلول الدكستران الأزرق من أول جزء إلى الجزء الذي يمثل أعلى امتصاص لقمة الدكستران الأزرق، تم رسم المنحنى القياسي للعلاقة بين حجم الاسترداد/الحجم الفراغي (Ve/Vo) ولوغارتم الأوزان الجزيئية، قدر الوزن الجزيئي بعدها للـ IgY من مقارنة قيمة (Ve/Vo) مع المنحنى القياسي للبروتينات القياسية [31] كما في الجدول (9) والشكل (6)، ان كل بيضة ممنعة بمرض معين تعطي كمية من IgY مقدارها حوالي 60–150ملغم مجفف من مح البيض البالغ تقريباً 15 مللتر [43]، وقد ذكر [44a، 44b] ان الوزن الجزيئي للـ IgY يبلغ من 170000–180000 دالتون، أما [45] فقد ذكر بان الوزن الجزيئي للـ IgY يبلغ تقريباً 178000 دالتون. ثم جرى بعد ذلك مسح آلي Spectra لـIgY المفصول باستخدام جهاز المطياف الضوئي لمعرفة أعلى قمة امتصاص نستطيع من خلالها قياس تركيز الـ IgY المعزول كما في الشكل (7).



شكل (5) يوضح ترحيل عينات Crude IgY مع IgG Standard باستخدام جهاز Electrophoresis

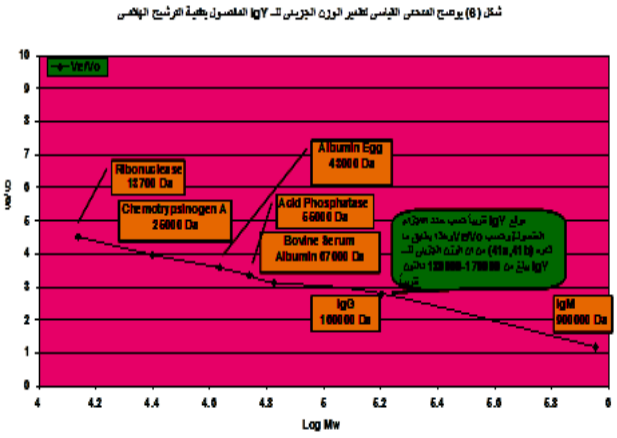
جدول (6) يوضح أعلى امتصاصية للعينات المفصولة بحجم 3مل لكل جزء (tube)

Sample العين	الوزن الجزيئي مقدرة بالدالتون Dalton	لوغاريتم الوزن الجزيئي للعينات القياسية Log Mw	أعلى امتصاصية في الجزء المفصول Fraction No.	مضروب في حجم العينة 3مل	Ve/Vo المعادلة واستخراج ناتجها
Blue Dextran 2000	1000000	6	33	99 مل	Ve/Vo (99)
IgM	900000	5.954243	39	117 مل	1.181818 2
IgY المفصول	القيمة التقديرية لـ IgY من 180000-168000	5.250420	89	267 مل	2.6969697
IgG	160000	5.20412	92	276 مل	2.787879
Bovine Serum Albumin	67000	4.82607	103	309 مل	3.1212125

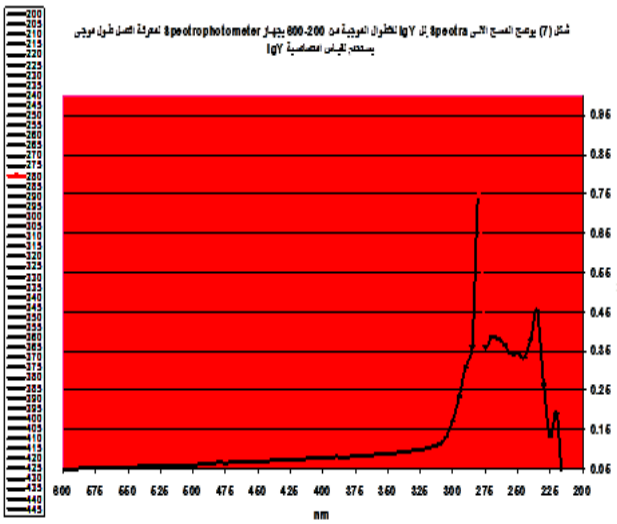
Acid Phosphatase	55000	4.74037	110	330 مل	3.3333334
Albumin Egg	43000	4.6335	118	354 مل	3.575758
Chemotrypsinogen A	25000	4.3979	131	393 مل	3.969697
Ribonuclease	13700	4.1367	149	447 مل	4.515152

بعدها جرى قياس امتصاصية IgY المنقى لمعرفة تركيزه في العينة المفصولة وعلى طول موجي 280 نانوميتر وحسب نتيجة المسح الآلي، إذ بلغ تركيزه 117.6176471 ملغم/بيضة في العينة رقم 26 من الجرعة الرابعة، تم الكشف بعدها عن IgY بطريقة التلازن مع العترة الضارية بطريقة الانتشار المناعي المفرد والمزدوج لان هذه الاختبارات الكمية تكون دقيقة لتقدير تركيز وفعالية مستضد معين حتى وان كان موجوداً مع مستضدات أخرى [34]، ومن الشكل (8) نلاحظ وجود هالة حول الحفرة (أ) ووجود الخطوط الترسيبية (ب)، حيث تبين إن التخفيف 4/1 من IgY هو أفضل كمية (جرعة) لعلاج الإصابة بالعترة الضارية بتركيز 50000 كيس بيض مبوغ.

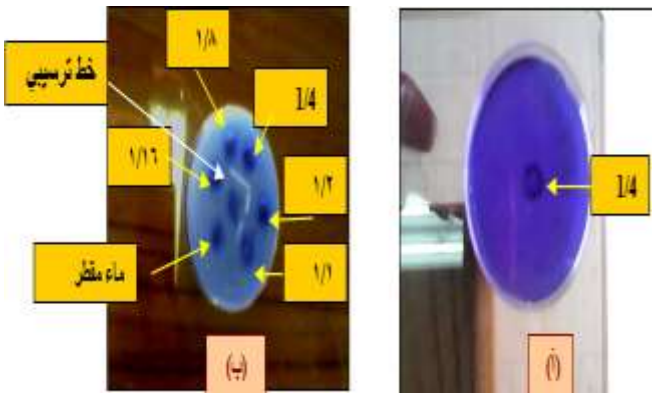
كما تم ترحيل العينة المفصولة من IgY بواسطة جهاز الهجرة الكهربائية العمودي وقد تبين ان هناك تقارب مع حزمة IgG القياسية التي يكون وزنها الجزيئي 160000 دالتون، وهذا يطابق مع ما ذكره [46] كما في الشكل (9).



شكل (8) يوضح المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لـ IgY المفصول بطريقة الترشيح الهلامي

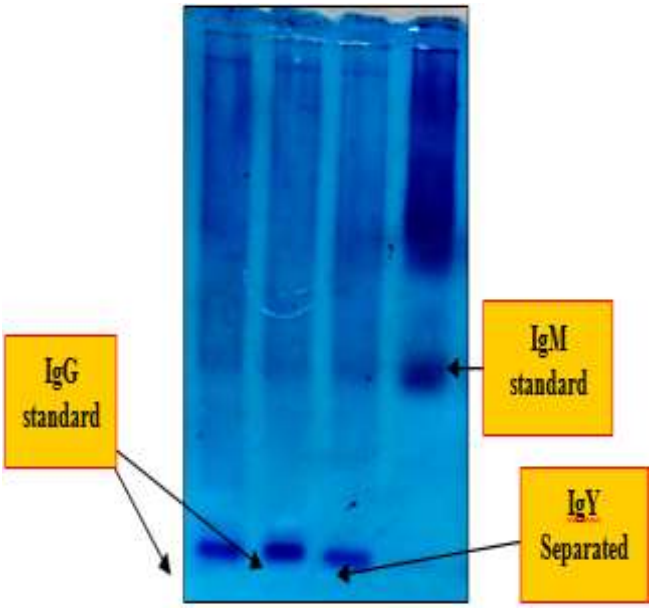


شكل (7) يوضح المسح الآلي Spectra لـ IgY لمطوال الموجية من 200-800 بجهاز Spectrophotometer لمعرفة اطول طول موجي يستخدم لقياس امتصاصية IgY



شكل (8) توضح تلازن العترة الضارية مع مستخلص IgY بطريقتي الانتشار

(أ) الانتشار المناعي المفرد (ب) الانتشار المناعي المزدوج.



شكل (9) يوضح ترحيل حزمة IgY المنقى بواسطة الترشيح الهلامي مع IgG،IgM Standard لتقدير الوزن الجزيئي للعينة.

من الجدول (7) نلاحظ وجود فروق معنوية في نسبة الخمج بين معاملات إعطاء العلاجات مقارنة مع السيطرة الموجبة التي أعطي فيها جرعة التحدي فقط، كذلك هنالك فروق معنوية واضحة بين السيطرة الموجبة والسيطرة السالبة التي لم يعطى لها أي معاملة، فقد تبين أن أفضل طريقة لإعطاء العلاج كان عن طريق حقن الـ IgY في الغشاء البريتوني وفي صفار البيض الموجود في أعلى منطقة السرة داخل جسم الطير، حيث أن هاتين المعاملتين قد خفضت وبشكل ملحوظ عدد أكياس البيض المطروحة خلال حصول الخمج كما حدثت هلاكات في السيطرة الموجبة وهذا يطابق ما ذكره [47، 48] من أن إعطاء IgY خلال الغشاء البريتوني وصفار البيض ينقل المناعة السالبة Passive immunity إلى الطير ويعطيه حماية كاملة ضد الخمج بالكوكسيديا، حيث يؤازر المناعة الفاعلة في الجسم مما يقوي من مناعة الطير ويساعده في القضاء على الإصابة.

أما جدول (8) فانه يوضح قياسات نسب أوزان وأطوال الأعضاء الداخلية لأفراخ المعاملات ويبين الفروقات المعنوية أيضا بين معاملة السيطرة الموجبة وبقية العاملات مقارنة مع السيطرة السالبة، إذ وجد انخفاض ملحوظ في وزن وطول الأعورين منطقة الإصابة في السيطرة الموجبة مقارنة مع السيطرة السالبة والمعاملات إضافة إلى زيادة وزن غدة الفابريشيا والطحال في السيطرة الموجبة مقارنة مع السيطرة السالبة والمعاملات وهذا ما أشار إليه [48،44a] من أن هنالك تغيرات في وزن الأعورين وتأثر الطحال وازدياد وزن وحجم غدة الفابريشيا أثناء التعرض للإصابة بطفيلي *Eimeria tenella* حيث ظهرت على الطير المصاب العلامات السريرية أيضا من خمول وانزواء وإسهال مصحوب بنزف دموي.

المصادر

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

2- 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.

3- 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.

4-El.Behairy, A.M. (2005): Immuno-characterization on some Eimeria spp. Infecting chicken in Egypt. M.V.Sc. Thesis Fac. Of vet. Med.,CairoUniversity.

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

6- 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.

7- 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.

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

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

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

11-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.

12-Bowman, D.D. and Lynn, R.C. (1995) George's Parasitology for veterinarians, Philadelphia,

22–جـوامير نهـاد محمـد علـي عبـد الله (1996).اسـتخلاص ودراسـة فعاليـة بروتينـات المناعـة من صـفار بعض الطيور الداجنـة. رسـالة 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 by polyethylene 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.

27- Diana، P.; Pablo, A.C.;Esteban، G.C.; Bjorn,B. and Rudiger،S. (2011). IgY Technology:Extraction of Chicken Antibodes from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipition. Journal of Visualized Experiments (jove). 51:pp 1-5

28- Laemmli، U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature ; 227 (15)، 680 - 685

29- Layne, E. (1957). Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins (Spectrophotometric Determination of Total Protein-Biuret Method). Methods in Enzymology. University of Central Arkansas 10: 447-455.

30 - Protocol for Biotinylation of IgY/Version 1.0، (2011). www. immunsystem. com.

London, Toronto, Tokyo. WB Sanders Company.2th Ed. pp297.

13-Ibrahim, A.L.; Arafa, E.A. and Msahlabe, A.A. (1997). Study on pathogenicity 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. 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. and Dalgliesh, R.J. (1997). Isolation and pathogenicity of Australian strains of Eimeria 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. and Saif, 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.

for animal health, Compton, New Burg Berks. Pp. 95-96.

41- 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,

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

43- 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، 82:1554-1558.

44-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 tenella and Eimeria maxima infections. Veterinary Parasitology. 163: 123- 126.

44-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.

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

46- Michael، A. et al. (2010). Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. Indian Journal of Science and Technology. Vol.3.No.4 ; pp 468-474.

31- Diana، P.; Pablo, A.C.;Esteban، G.C.; Bjorn,B. and Rudiger،S. (2011). IgY Technology:Extraction of Chicken Antibodes from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipition. Journal of Visualized Experiments (jove). 51:pp 1-5.

32-Hang، M.C. et al. (1999). Productivity and some Properties of Immunoglobulin Specific against Streptococcus mutans Serotype c in Chicken Egg Yolk (IgY). American Chemical Society. J. Agric. Food Chem. 47 ; 61-66.

33- Amersham Biosciences. (2002). Gel Filtration (principle and methods).chapter two (chromatography). pp 45-52

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

35- الفياض، حمدي عبد العزيز وناجي، سعد عبد الحسين. (1989). تكنولوجيا منتجات الدواجن، ط 1. مديرية مطبعة التعليم العالي. بغداد.

36- SAS، 2004. SAS User's guide: statistical system, Inc. Cary, NC. USA.

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

38- Bowman، D. D. and Lynn، R. C. (1995). Diagnostic parasitology in : Georgis parasitology for veterinarias 6th ed.philadelphia، W.B. Sounders Company. pp297.

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

40- Danforth, H.D. (1997). Use of live oocysts based vaccines in a vain coccidian control. In: Control of coccidiosis into next millennium. Ed by Shirley, M.W.; Tomley, F.M. and Freeman,B.M. Institute

47-Hyun S. Lillehoj, Sung H. Lee, Lucio E. Decanini. (2005). Hyperimmune Egg Yolk IgY Antibodies Against Eimeria Mediate Protective Immunity Against Avian Coccidiosis by Inhibiting Sporozoite Invasion and Reducing Proinflammatory Cytokine Response. Animal Parasitic Diseases Laboratory, Usda-ars, Beltsville.

48- Hyun، S.L. (2007). Gut immune responses and intervention strategies against Eimeria and Salmonella. United States Department of Agriculture. pp 1-2.

49- Lillehoj، H. S., Min W. and R. A. Dalloul. (2004). Recent Progress on the Cytokine Regulation of Intestinal Immune Responses to Eimeria. College of Veterinary Medicine, University of Maryland. Poultry Science 83:611–623.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2014 ,(8), (3) :41-57

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

جدول (7) يوضح نسبة الخمج مع المتوسطات الحسابية وعدد أكياس بيض الطفيلي المطروحة لكل غم/مل

المعاملات	عدد أيام التجربة بعد إعطاء جرعة التحدي والعلاج																			
	الأول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس	السادس	السابع	الثامن	التاسع	العاشر	الحادي عشر	الثاني عشر	الثالث عشر	الرابع عشر	الخامس عشر	السادس عشر	السابع عشر	الثامن عشر	التاسع عشر	العشرون
سيطرة سالبة	A 0	A 0	A 0	A 0	C 0	0 C	0 C	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B	0 C	0 B	0 B	0 D	0 D
سيطرة موجبة	0 A	0 A	0 A	0 A	503466.6 A	551466.6 A	626133.3 A	704000 A	733066.6 A	786400 A										
معادل حموضة	0 A	0 A	0 A	0 A	52266.7 BC	53500 BC	58666.7 BCD	60800 BC	68266.7 BCD	75733.3 CD	28800 B	33066.7 B	37200 B	45700 B	19200 B	21333.3 B	12133.3 B	6133.3 BC	77866.7 A	97066.7 A	197333.3 A	242133.3 A	317866.6 A	342400 A	379733.3 A	410666.6 A
حقن بالصفار	0 A	0 A	0 A	0 A	29180 BC	32800 BC	34760 D	36980 BC	38580 CD	40080 CD	9540 B	16620 B	21760 B	26880 B	2316 B	6656 B	1956 B	0 C	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B
حقن بالبريتون	0 A	0 A	0 A	0 A	39466.7 BC	45866.7 BC	49800 CD	56666.7 BC	60666.7 BCD	67766.7 CD	21333.3 B	25500 B	28800 B	32000 B	12300 B	15966.7 B	9133.3 B	3200 BC	1066.7 B								
العلاج بالكبسولة	0 A	0 A	0 A	0 A	109900 B	126600 B	140200 BC	168833.3 B	183666.7 BC	198566.7 BC	49333.3 B	59066.7 B	75266.7 B	85633.3 B	26833.3 B	34966.7 B	18266.7 B	11700 BC	5600 B	2866.7 B							
حقن تحت الجلد	0A	0 A	0 A	0 A	104433.3 B	125566.7 B	143600 BC	161133.3 B	190566.7 BC	204233.3 BC	36333.3 B	47500 B	60200 B	81033.3 B	22133.3 B	28466.7 B	14366.7 B	10000 BC	5146.7 B	680 B							
حقن بالعضلة	0A	0 A	0 A	0 A	108466.7 B	126766.7 B	159900 B	177633.3 B	214500 B	266533.3 B	38866.7 B	53666.7 B	75633.3 B	93800 B	23100 B	28500 B	16700 B	14000 B	6066.7 B	0 B							
حقن بالوريد	0A	0 A	0 A	0 A	101533.3 B	122400 B	135933.3 BC	147533.3 B	159300 BCD	181100 BC	32833.3 B	52066.7 B	66400 B	83366.7 B	13866.7 B	22100 B	9900 B	6346.7 BC	2933.3 B	0 B							
متوسط الخطأ القياسي	0	0	0	0	51690	56131.8	57328.8	80931.4	89556.7	96072.4	49052.5	56783.2	60771.3	61123.1	34783.5	29395.1	12102.9	7391.3	10156.5	7403.2	0	0	0	0	0	0	0
المتوسط العام	0	0	0	0	103371	116790.3	132790.3	148861.3	162032.3	178754.8	52380.6	62029	73500	84870.9	30834.8	39150.9	17499.3	12507.7	5007.7	2614.1	0	0	0	0	0	0	0
مستوى المعنوية	غ م	غ م	غ م	غ م	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0222	0.0117	غ م	غ م	غ م	غ م	0.0001	0.0001	0.0001

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2014 ,(8), (3) :41-57

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

جدول (8) يوضح نسبة أوزان وأطوال الأعضاء الداخلية للدجاج إلى وزن الجسم في المعاملات

المعاملات	نسبة وزن القلب/وزن الجسم	نسبة وزن الكبد/وزن الجسم	نسبة وزن القانصة/وزن الجسم	نسبة وزن المعدة الغدية/وزن الجسم	نسبة وزن الطحال/وزن الجسم	نسبة وزن الفابريشيا/وزن الجسم	نسبة وزن الصفراء/وزن الجسم	نسبة وزن البنكرياس/وزن الجسم	نسبة وزن الاثنى عشري/وزن الجسم	نسبة وزن الصائم/وزن الجسم	نسبة وزن الثلفائي/وزن الجسم	نسبة وزن الأعورين/وزن الجسم	نسبة وزن الاثنى عشري/طول الاثنى عشري	نسبة وزن الصائم/طول الصائم	نسبة وزن الثلفائي/طول الثلفائي	نسبة وزن الأعورين/طول الأعورين
سيطرة سالبة	A 0.731	A 2.031	1.584A BC	A 0.337	0.101A	0.050 AB	0.055 AB	0.211 A	0.639 AB	1.023 AB	0.832 A	0.453 ABCD	40.04 A	31.19 A	25.39 A	43.02 AB
سيطرة موجبة	0.720 A	2.826 B	1.227 C	0.330 A	0.186 B	0.105 A	0.083 AB	0.190 A	0.802 A	1.327 A	1.000 A	0.297 A	39.90 A	27.03 AB	21.16 A	35.73 A
معامل حموضة	0.574 A	2.084 AB	1.408 BC	0.374 A	0.100 A	0.039 B	0.100 AB	0.195 A	0.545 B	0.893 B	0.669 A	0.607 CD	35.96 A	25.55 AB	19.74 A	62.92 C
حقن بالصفار	0.610 A	2.075 AB	1.564 ABC	0.364 A	0.081 A	0.091 AB	0.095 AB	0.217 A	0.594 AB	1.038 AB	0.834 A	0.568 BCD	35.62 A	29.67 AB	24.72 A	61.10 BC
حقن بالبريتو نيال	0.648 A	2.535 AB	1.779 AB	0.321 A	0.080 A	0.053 AB	0.048 B	0.203 A	0.540 B	0.733 B	0.821 A	0.612 CD	31.51 A	19.05 B	21.15 A	53.75 ABC
العلاج بالكيسو لة	0.611 A	2.043 A	1.917 A	0.378 A	0.105 A	0.097 A	0.083 AB	0.208 A	0.593 AB	0.940 B	0.884 A	0.440 ABC	39.54 A	29.09 AB	25.61 A	55.52 BC
حقن تحت الجلد	0.647 A	2.087 AB	1.813 AB	0.364 A	0.124 AB	0.092 AB	0.103 A	0.186 A	0.579 B	0.885 B	0.910 A	0.620 D	36.77 A	25.94 AB	24.42 A	53.44 ABC
حقن بالعضلة	0.568 A	2.194 AB	1.526 ABC	0.382 A	0.102 A	0.065 AB	0.078 AB	0.195 A	0.565 B	1.003 AB	0.776 A	0.414 AB	40.51 A	29.73 AB	25.01 A	45.64 ABC
حقن بالوريد	0.730 A	2.052 A	1.591 ABC	0.328 A	0.078 A	0.075 AB	0.073 AB	0.180 A	0.585 B	0.815 B	0.927 A	0.533 BCD	37.01 A	22.67 AB	24.59 A	61.52 BC
متوسط الخطأ القيا	0.1092	0.0813	0.2352	0.0513	0.0085	0.0291	0.0272	0.0046	0.1167	0.2036	0.1878	0.0247	5.8331	5.7777	5.6802	2.3368
المتوسط العام	0.6478	2.2096	1.6002	0.3539	0.1060	0.0750	0.0809	0.1995	0.6048	0.9650	0.8502	0.507	37.368	26.770	23.577	52.827
مستوى المعنوية	غ م	0.247	0.0522	غ م	0.062	0.1100	0.2322	0.645	0.2583	0.0885	غ م	0.004	غ م	0.2637	غ م	0.043

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2014 ,(8), (3) :41-57

Use specific immunoglobulin IgY purified from egg yolk and see its effect on the weights and lengths of the internal organs in chickens infected parasite *Eimeria tenella*

Thaer A. S. Shehab A. ALjebory Tawfiq A. AL-Aloosi Hajir A.A C. Z. T. Al-Dhanki

Abstract:

Been obtained for the isolation of a local parasite *Eimeria tenella* by taking the cecca of 850 samples from slaughterhouses chickens in the city of Ramadi, and after purification and In vitro Sporolated diagnosed through the shape and size of the parasite and the infection, as has been confirmed diagnosis of the sample in the veterinary hospital/Ramadi، he received the strain challenge by strengthening the isolation and written consent of Chicken type Ross 308 five times, has been cracking the parasite by an ultrasound Sonicater and extract Sporocyst and Sporozoite in fourth Dose، injected Challenge Strain then in laying hens Type Luhman in different areas under the skin and muscle of the chest and thigh muscle and the muscle of the neck after mixing with the solution of Freund's incomplete oil adjuvant, was then the collection of eggs from the first day of the first dose until the end of the fourth dose of the control sequence to increase immunoglobulin IgY in egg yolk, extracted immunoglobulin IgY from egg yolk on a daily basis and has Dialysis and the deportation of protein extract crude by Vertical Electrophoresis with some standard protein, and measuring the concentration of crude protein by means of a spectroscope optical Spectrophotometer at wavelength 540, depending on Baurit it reached its highest level 137.12604 mg/egg، were separated IgY using Technology Column Chromatography packed gel Sephacryl S300 HR 95 cm high and 1.6 cm diameter and Determenation of molecular weight by separating the dye Blue Dextran 2000 and seven proteins that record different molecular weights and the work of the curve index, were also measured concentration of IgY extracted after separation column by Spectrophotometer it reached its highest level 117.61764 mg/egg, was deported IgY by Electrophoresis with standard IgG for the detection of a package Kama Globulin، conducted revealed clumping of IgY with strain fierce by the use of Single radial immunodiffusion test and Double immunodiffusion Ouchterlony test to determine the extent of specialization against the type of isolation and extraction of focus appropriate for use as a treatment in subsequent experiments, you saved the sample IgY by freezing degree zero -4 C The results showed significant differences between the treatments especially in infection region (ceacum) and that the best way to cure by giving injection therapy in the peritoneum and egg yolk inside body compared with negative control and the rest of the transactions.