* دراسة التغيرات في بعض معايير صورة الدم الناجمة عن الأصابة التجريبية بطفيلي *Eimeria tenella* في أفراخ الدجاج المحلي والأجنبي

تاريخ الاستلام 2015/1/18 تاريخ القبول 2015//3/1

خيري عبد الله داود العكَيلي
فرع الأحياء المجهرية/ كلية الطب
خالد ثامر مطر الشيباني
قسم علوم الحياة/ كلية التربية
جامعة القادسية
khbio7@gmail.com

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة للمدة من 2013/9/1 ولغاية 2014/9/1 ، بهدف التحري عن طفيلي *Eimeria tenella* في الدجاج المصاب طبيعياً بهِ وعزلهِ من الحالات المصابة الواردة الى المستشفى البيطري والعيادات البيطرية من حقول تربية الدواجن حيث تم تشخيصها مبدئياً بواسطة المجهر الضوئي وتسجيل الحالات الموجبة ومن ثم تشخيصهِ جزيئياً بتقنية تفاعل السلسلة المتبلمرة الأعتيادي Conventional- Chain Reaction Polymerase (PCR) وبعدها تم تقدير بعض المعايير الكيموحيوية لمصل الدم لأفراخ الدجاج المحلي والأجنبي بعد أحداث الأصابة التجريبية فيها بالطفيلي المعزول بعد تبويغهِ .

من خلال الدراسة الحالية تم فحص 315 حالة دجاج مريضة وقد بينت النتائج أصابة (186من أصل315)عينة براز وبنسبة 59 % ، الدراسة التجريبية تضمنت إحداث الإصابة التجريبية للطفيلي وبنوعين من أفراخ الدجاج هما أفراخ دجاج الروزRoss الأجنبي وأفراخ الدجاج المحلي Local breed بعمر 21 يوماً بجرعة (10^4 x 5) كيس بيض ناضج / طائر لطفيلي *E.tenella* ، حيث تم أصابة 30 فرخ دجاج من كل نوع على حدى كما وضعت مجموعتين من الأفراخ غير المصابة (سيطرة) لأجل المقارنة.

أظهرت نتائج معايير صورة الدم لأفراخ الدجاج الأجنبي المصابة حصول إنخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من مستوى تركيز هيموكلوبين الدم (5.94 ملغم /100 مل) في الإسبوع الرابع للإصابة وحجم خلايا الدم المرصوص (18.47 %) في الإسبوع الخامس للإصابة والعدد الكلي لخلايا الدم الحمر (10^6 x 1.58) في الإسبوع الرابع للإصابة ، كما ادت الإصابة ايضاً إلى وجود فرق معنوي في العدد الكلي لخلايا الدم البيض (10^3 x 30.19) في الإسبوع السابع للإصابة مقارنة بأفراخ مجموعة السيطرة .

أما نتائج أفراخ الدجاج المحلي فقد أظهرت حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من مستوى تركيز هيموكلوبين الدم (7.13 ملغم /100 مل) وحجم خلايا الدم المرصوص(21.26%) في الاسبوع الخامس للاصابة والعدد الكلي لخلايا الدم الحمر(10^6 x 2.05) في الاسبوع الرابع للاصابة بينما اظهر العدد الكلي لخلايا الدم البيض ارتفاعاً عالي المعنوية ($P<0.05$) في الاسبوع السادس للاصابة إذ بلغ(10^6 x 30.63) مقارنةً بأفراخ مجموعة السيطرة .

كلمات مفتاحية: الدجاج، الأيميريا تنلا، PCR ،معايير صورة الدم.

Microbiology Classification QR 171

* بحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثاني.

العاشر مع توفر الظروف المناسبة له من رطوبة وقلة التهوية والتربية المكثفة فضلاً عن سوء الأدارة [7].

يشمل داء الأكريات جميع الأمراض المتسببة عن الإصابة بالأنواع التابعة لجنس الـ *Eimeria* [8] وهي أكثر تعقيداً من الجراثيم والفيروسات [9] إذ انها طفيليات بوغية وحيدة الخلية تعود إلى عائلة Eimeriidae والتي تضم تسعة أنواع هي : *E. tenella* ، *E. acervulina* ، *E. maxima* ، *E. brunetti , E. necatrix* ، *E. mitis* ، *E. mevati* ، *E. hagani* و *E. praecox* [10] [11] وهذه الأنواع تختلف في شدتها وضراوتها ، إذ تعد الأنواع الأربعة *E. tenella* ، *E. necatrix* ، *E. maxima* و *E. acervulina* أكثرها ضراوة لما تسببه من أضرار تحدث نسب هلاكات عالية في حقول الدواجن مقارنةً بباقي أنواع الـ *Eimeria* الإخرى [12].

الأدوار المختلفة للطفيلي تغزو الخلايا الظهارية المبطنة لأمعاء الدواجن في أماكن مختلفة حسب النوع لأنها تمتاز بالخصوصية العالية للمضيف و العضو المصاب ، إذ إن النوع الذي يتطفل على مضيف معين فأنه لا يتطفل على مضيف آخر، كما أن لها القدرة العالية على التطور في أماكن خاصة من القناة الهضمية دون غيرها[13] كما تميزت هذهِ الطفيليات بخصوصية الإستجابة المناعية Imnuno response specific ، إذ إن المناعة المتكونة ضد نوع معين لا تعطي مناعة ضد الأنواع الإخرى من هذا الجنس ، أي إختفاء المناعة المشتركة بين الأنواع [9] .

تعد أكياس البيض المتبوغة هي الطور المعدي للطيور الداجنة حيث إن أكياس البيض لا تنمو ولا تتطور إلى الطور المعدي مالم تطرح مع البراز خارج جسم المضيف ، كما يجب أن تتوفر لها ظروف محيطة مناسبة لكي تتحول إلى الطور المعدي مثل الرطوبة و الحرارة والأوكسجين كما إن إرتفاع درجات الحرارة و إنخفاض نسبة الرطوبة يؤدي بالنتيجة إلى قتل أكياس البيض [15] .

المقدمة Introduction

ان التوسع الكبير والسريع في صناعة الدواجن قد واجه تحديات كبيرة اهمها هو تعرضها للاصابه بالعديد من الامراض الطفيلية المعدية التي تسببت بحدوث خسائر اقتصادية كبيرة جداً تقدر بملايين الدولارات سنوياً جراء هلاك اعداد كبيرة منها ، وقلة الأنتاجية والمبالغ الكبيرة التي تصرف على الأدوية المستعملة للعلاج والوقاية ، ، ولعل اهم ابرز هذه الامراض هي داء الاكريات[1] الذي يمتاز بسرعة حدوثهِ وانتشارهِ بين قطعان الدجاج في أي مرحلة من مراحل حياتهِ على مدار السنة في جميع أنحاء العالم [2] وهو يتسبب بواسطة اوالي طفيلية تعود الى صنف البوغيات Sporozoa جنس الايميريا *Eimeria* الذي يتميز بالخصوصية العالية للمضيف والعضو الذي يتطفل عليه إذ يتطفل في القناة الهضمية للطيور الداجنة مسبباً لها أضراراً بالغة نتيجةً لتكاثر الطفيلي في خلايا المضيف [3] وهذا الضرر يتداخل مع هضم الغذاء وامتصاص العناصر الغذائية ويسبب أيضا فقدان الدم والجفاف [4] مما يؤدي الى حدوث خسائر اقتصادية كبيرة جداً لتأثيرهُ المباشر على الحالة الصحية والأنتاجية للدجاج المصاب فضلاً عن نسب الهلاكات العالية بين الأفراخ المصابة في القطيع [5].

يعد داء الأكريات Coccidiosis من أخطر الأمراض الطفيلية التي تصيب الدواجن ، ليس في العراق فحسب وإنما في الوطن العربي والعالم أجمع ، بالرغم من التقدم العلمي الذي حصل في مجال الوقاية والعلاج من الأمراض بصورة عامه إلا إنه يبقى العدو الطفيلي الأول الذي يواجه صناعة الدواجن لما يسببه من مشاكل صحية تؤدي إلى خسائر إقتصادية فادحه تتمثل في ضياع الدخل وتكلفة العلاج والوقاية ومكافحة التلوث فضلاً عن الهلاكات العالية التي يسببها بين قطعان الدواجن وهذا يتطلب تربية قطعان جديدة خالية من المرض [6] وهو شائع الحدوث في أفراخ الدجاج عادة في الأعمار الفتية الأكثر من اسبوعين وتصل ذروتها من الأسبوع الرابع وحتى

tenella في عينات البراز وذلك بالأعتماد على طريقة (*et* Hamidinejat *al*., 2010) وأستعمالهِ في فحص الـ PCR ، كما تم تجهيز البوادئ من شركة Bioneer الكورية ، بعدها تم تحضير مزيج التفاعل لسلسلة البلمرة بأستعمال عدة الـ PCR المجهزة من شركة Bioneer الكورية وبعد وضع المزيج في انابيب الـ PCR المجهزة مع العدة تم غلق الأنابيب ومزجت بعناية بجهاز المازج لمدة 10 ثوانٍ ، بعد ذلك نقلت الى جهاز PCR Thermo Cycler لأجراء حالات الدورات الحرارية PCR Thermo Cycler Condition وبعد أنتهاء الوقت اللازم أجري الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بنسبة 1 % ومن ثم قراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة بواسطة جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV لتحديد النتائج الموجبة بمطابقتها مع الحامض النووي القياسي DNA Ladder .

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

تشخيص الطفيلي

تم اجراء استخلاص الحامض النووي DNA من عينات البراز المعزولة من حالات الدجاج المريضة الواردة وذلك بإستعمال عدة الاستخلاص الخاصة بالبراز Stool Genomic DNA extraction kit المجهزة من شركة Bioneer الكورية ، تم الكشف عن الحامض النووي الـ DNA المستخلص من عينات البراز وذلك من خلال إستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer الخاص بالكشف وقياس تركيز الاحماض النووية ، إذ يتم الكشف عن الحامض النووي من خلال تحديد تركيزه وقياس نقاوة الحامض النووي الـ DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين 280/260 nm ، كما تم تصميم البادئات الخاصة بالجين (ITS1) Internal transcribed spacer 1 المسؤول عن تشخيص طفيلي *Eimeria* تكون بمستوى صدرهِ. أستخدم ماء الصنبور العادي وتم تغذية جميع طيور المعاملات على عليقة البادئ (من عمر يوم واحد إلى ثلاث أسابيع) والعليقة النهائية (من عمر أربعة أسابيع فأكثر)

البادئ المستعمل للكشف عن طفيلي *E.tenell*

Primers	Sequence(5'-3')		Product size
E.tenella	F	AGCAGGTAGTCGTCGGTGTT	409 bp
	R	AGCAAAGTTCCAAGCAGCAT	

تم الحصول على عينات طفيلي الإيميريا من الحالات المصابة الواردة الى المستشفى البيطري والعيادات البيطرية حيث تم إجراء الصفة التشريحية لها وفتح الأعورين للطائر بواسطة مقص حاد ، بعدها تم قشط الغشاء المخاطي المبطن لهما بواسطة شريحة زجاجية نظيفة ، أخذت منها نماذج لغرض التشخيص بتقنية الـ PCR ووضعت مواد القشط مع المحتويات والبراز الدموي المائي المتبقية في محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) بتركيز 2.5 %، بعد اتمام عملية تشخيص النوع *Eimeria tenella* تم ترشح العالق ومن ثم اجراء عملية التبويغ حسب [16] بعدها تم غسل وتنقية وتعقيم الاكياس المتبوغة حسب [18]

الافراخ وإدارتها Birds and Management

تم أجراء التجارب في غرف البيت الحيواني التابع لكلية التربية في جامعة القادسية، أستعمل في التجارب أفراخ دجاج بعمر يوم واحد تعود الى نوعين هما المحلي Local والاجنبي سلالة روز Ross التركية ، إذ تم الحصول على النوعين من مفقس الديوانية (من تفقيس بيض مخصب)، وربيت كل الأفراخ على الفرشة من عمر يوم واحد ولحين انتهاء فترة التجربة (في نهاية الاسبوع السابع) وقد خضعت الافراخ في كل المجاميع منذ اليوم الاول الى نفس الظروف البيئية من تغذية واضاءة والنظام الوقائي والصحي ، إستعملت نشارة الخشب كفرشة للأرضية وبسمك 5 سم قسمت الغرفة التي أبعادها (3 × 3) م^2 إلى أكنان أرضية Pens مقسمة بحواجز سلكية مشبكة وبأبعاد (1.5 × 1.5) م^2 وقسم كل كَن الى مكررين وجهزت الأكنان بمستلزمات التربية الأساسية مثل المناهل البلاستيكية المقلوبة وأواني العلف وبواقع منهل ومعلف لكل مكرر يتم رفعها تدريجياً مع تقدم عمر الطائر لكي

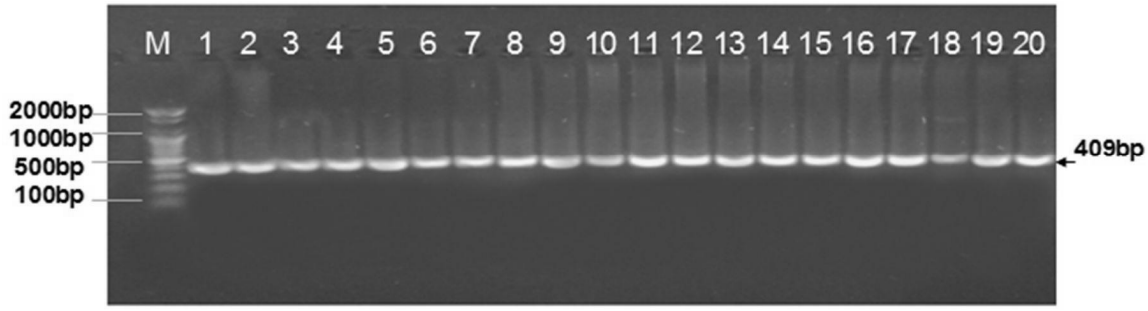
Oocyst Count حسب[18] [19] .

النتائج Results

تشخيص الطفيلي

تم الحصول على نتائج التضخيم للجين (IST-1) بنجاح في 186 عينة براز موجبة من أصل 315 وبنسبة (59%) للنوع *E.tenella* فقد أظهر البادئ المستعمل حزم الأحجام المطلوبة بعد أجراء عملية الترحيل الكهربائي بهلام الأگاروز 1% ، إذ أظهر زوج البادئ (E.tpF - E.tpR) حزمة بحجم (409 bp) زوج قاعدي كما في الشكل (1).

PCR من خلال الأستخلاص المباشر للـ DNA من عينات البراز المأخوذه من الحالات الواردة لغرض تشخيص طفيلي E.tenella



الشكل (1): الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز 1% ، لنواتج تقنية PCR لجين ITS1 الخاص بطفيلي *E.tenella* ، حيث يمثل M الدليل الحجمي لناتج PCR (100- bp2000) DNA ladder ، والعينات (1- 20) تمثل النتائج الموجبة للجين المتضخم (409 bp).

وبفارق معنوي ملحوظ عمّا سجل في مجاميع افراخ دجاج السيطرة السليمة ، إذ احرزت افراخ الدجاج الاجنبي المصابة اقل القيم (5.94 و 6.10 ملغم/100مل دم) ، تلتها افراخ الدجاج المحلي المصاب بنفس النوع وهي (7.55 و 7.13 ملغم/100مل دم) في الأسابيع الرابع والخامس من العمر على التوالي في التجربة الأولى من الدراسة الحالية .

فحوصات صورة الدم

تركيز هيموگلوبين الدم : بينت النتائج الموضحة في الجدول (1) أن افراخ مجاميع السيطرة السليمة للدراسة الحالية قد حققت تفوقاً معنوياً بمستوى ($P<0.05$) في مستويات تركيز هيموگلوبين الدم وعلى مدار كل اسابيع الدراسة مقارنة بمجاميع الأفراخ المصابة بطفيلي *E.tenella* التي حققت ادنى المستويات في تركيز هيموگلوبين الدم خصوصاً في الاسبوع الرابع من العمر

[17]) بعدها تم حساب عدد اكياس البيض لجرعة التحدي

الفحوصات المرضية الدميّة Hematological Tests

تم جمع نماذج الدم من الوريد الجناحي Wing vein من الأفراخ المصابة بالاكياس الناضجة لطفيلي الايميريا والأفراخ غير المصابة (مجموعة السيطرة)في نهاية كل اسبوع ابتداءاً من الأسبوع الرابع والخامس والسادس بأستعمال محاقن طبية سعة 3 مل ووضع في انابيب حاوية على مانع التخثر EDTA لأجراء فحوصات صورة الدم مثل قياس تركيز هيموگلوبين الدم Hb وحجم خلايا الدم المرصوصPCV والعدد الكلي لخلايا الدم البيض WBC و الحمر RBC .

تم قياس تركيز هيموگلوبين الدم حسب [22] وحجم خلايا الدم المرصوص حسب [23] والعدد الكلي لخلايا الدم البيض حسب [24] و الحمر حسب [25] .

كما بينت نتائج الدراسة الجزيئية أن طريقة أستخلاص الـ DNA المستعملة في هذه الدراسة هي طريقة ناجحة وجيدة للحصول على تركيز ونقاوة مناسبة لأستعمال الـ DNA الناتج كقالب Templet في تقنية الـ

المئوية في حجم خلايا الدم المرصوصة مقارنة بمجاميع السيطرة السليمة وهذا دليل على حصول أصابة طفيلية شديدة بهذا النوع بين افراخها ، وخصوصاً أفراخ الدجاج الأجنبي فقد أظهرت نتائجها وجود هبوط واضح وشديد في النسب المئوية لحجم خلايا الدم المرصوصة أدنى القيم 18.7% و 18.4% في الاسابيع الرابع والخامس من العمرعلى التوالي كانت من نصيب افراخ مجموعة دجاج الروز الاجنبي المصابة تلتها بالنسب أفراخ الدجاج المحلي المصابة بنفس النوع إذ بلغت أقل نسبة 21.56% في الأسبوع الخامس من العمر.

حجم خلايا الدم المرصوصة : اشارت النتائج المذكورة في الجدول (2) الى وجود فروقاً معنوية بمستوى ($P<0.05$) في النسبة المئوية لحجم خلايا الدم المرصوصة بين الافراخ المصابة بطفيلي الايميريا وأفراخ مجاميع السيطرة السليمة ، إذ سجلت الأفراخ المصابة ادنى النسب المئوية عند مقارنتها بأفراخ مجاميع السيطرة السليمة التي احرزت قيماً اعلى ، إذ ان افراخ مجاميع السيطرة السليمة للدجاج المحلي قد احرزت نسباً مئوية اعلى في حجم خلايا الدم المرصوصة وبفارق معنوي عن افراخ مجاميع السيطرة السليمة لدجاج الروز الاجنبي في بعض أسابيع الدراسة . أما مجاميع الافراخ المصابة فقد سجلت اوطئ النسب

جدول (1) : معدلات مستوى تركيز هيموكلوبين الدم لأفراخ مجاميع دجاج الروز الاجنبي والمحلي خلال اسابيع الدراسة . (ملغم/100مل دم)

نوع الدجاج	المجموعة	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس	الاسبوع السابع
الاجنبي	سيطرة	**11.06**±0.64 C b	**12.24**±0.72 B a	**12.33**±0.55 B a	**13.48**±0.52 A a
	مصابة	**5.94**±0.38 B d	**6.10**±0.39 B c	**7.40**±0.45 A b	**7.57**±0.57 A b
المحلي	سيطرة	**12.44**±0.46 B a	**12.19**±0.38 B a	**12.56**±0.65 B a	**13.32**±0.42 A a
	مصابة	**7.55**±0.38 B c	**7.13**±0.31 B b	**7.79**±0.30 AB b	**8.08**±0.28 A b

جدول (2) : معدلات النسب المئوية لحجم خلايا الدم الحمر المرصوصة لأفراخ مجاميع دجاج الروز الاجنبي والمحلي خلال اسابيع الدراسة . (%)

نوع الدجاج	المجموعة	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس	الاسبوع السابع
الاجنبي	سيطرة	**30.31**±0.90 C a	**30.76**±0.53 C b	**31.61**±0.43 B a	**32.12**±0.67 A a
	مصابة	**18.70**±0.63 C c	**18.47**±0.68 C d	**19.76**±0.55 B c	**22.15**±0.94 A c
المحلي	سيطرة	**30.82**±0.60 C a	**31.74**±1.01 B a	**31.42**±0.80 B a	**32.61**±0.68 A a
	مصابة	**22.36**±0.82 B b	**21.56**±1.82 C c	**22.43**±1.15 B b	**25.12**±1.51 A b

العدد الكلي لخلايا الدم الحمر: أظهرت النتائج المبينة في الجدول (4) وجود فروقاً معنوية بمستوى ($P<0.05$) في العدد الكلي لخلايا الدم الحمر بين افراخ مجاميع السيطرة السليمة والمصابة بطفيلي *E.tenella* ، فقد سجلت ادنى القيم من قبل افراخ المجاميع المصابة مقارنة بافراخ مجاميع السيطرة التي احرزت اعلى القيم في العدد الكلي لخلايا الدم الحمر ، فقد سجلت افراخ مجموعة دجاج الروز الاجنبي المصاب بالنوع *E.tenella* ادنى القيم خلال الاسابيع من الرابع الى السادس من العمر (1.58 و 1.75 و 1.92 مليون خلية / ملم^3 دم) على التوالي ، تلتها افراخ الدجاج المحلي لنفس الاسابيع اعلاه (2.05 و 2.14 و 2.08 مليون خلية / ملم^3 دم) على التوالي .

العدد الكلي لخلايا الدم البيض : تشير النتائج في الجدول (3) الى وجود فروقاً معنوية بمستوى ($P<0.05$) في معدل العدد الكلي لخلايا الدم البيض بين افراخ مجاميع السيطرة السليمة و المصابة ، حيث كانت اعلى القيم من نصيب مجاميع الافراخ المصابة في حين قد احرزت مجاميع السيطرة السليمة اقل قيم العدد الكلي لخلايا الدم البيض خلال الدراسة الحالية ،وقد ظهرت فروقاً احصائية مهمة جداً بين افراخ مجموعتي الدجاج المحلي والاجنبي المصابة بالنوع *E.tenella* في معدل العدد الكلي لخلايا الدم البيض،إذ سجلت أفراخ الدجاج المحلي من الاسبوع الرابع الى السادس (29.81 و 30.16 و 30.63 ألف خلية / ملم^3 دم) على التوالي ، في حين قد سجلت افراخ مجموعة دجاج الروز الاجنبي المصابة بنفس النوع اعلاه اقل من هذه القيم إذ بلغت (25.82 و 29.42 و 29.87 ألف خلية / ملم^3 دم) لنفس الاسابيع وعلى التوالي.

جدول (3) : معدلات العدد الكلي لخلايا الدم البيض لأفراخ مجاميع دجاج الروز الاجنبي والمحلي خلال اسابيع الدراسة . (x 10^3/ ملم^3 دم)

نوع الدجاج	المجموعة	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس	الاسبوع السابع
الاجنبي	سيطرة	**19.55**±1.50 d C	**20.64**±1.21 B d	**21.45**±1.18 A d	**21.93**±0.91 A b
	مصابة	**25.82**±0.46 C b	**29.42**±0.66 AB b	**29.87**±0.24 A b	**30.19**±0.95 A a
المحلي	سيطرة	**21.08**±1.29 B c	**21.23**±0.88 B c	**22.09**±0.48 A c	**22.17**±0.48 A b
	مصابة	**29.81**±0.77 B a	**30.16**±0.47 AB a	**30.63**±0.38 AB a	**30.47**±0.93 A a

جدول (4) : معدلات العدد الكلي لخلايا الدم الحمر لأفراخ مجاميع دجاج الروز الاجنبي والمحلي خلال اسابيع الدراسة . (x 10^6/ ملم^3 دم)

نوع الدجاج	المجموعة	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس	الاسبوع السابع
الاجنبي	سيطرة	**2.59**±0.39 C b	**2.88**±0.19 B b	**3.00**±0.16 B b	**3.31**±0.37 A b
	مصابة	**1.58**±0.02 D c	**1.75**±0.12 C d	**1.92**±0.05 B d	**2.17**±0.19 A d
المحلي	سيطرة	**2.90**±0.21 C a	**3.37**±0.31 B a	**3.27**±0.11 B a	**3.72**±0.12 A a
	مصابة	**2.05**±0.12 B d	**2.14**±0.32 B c	**2.08**±0.14 B c	**2.38**±0.33 A c

والبالغة 31.5% في مدينة خوزستان الايرانية بأستعمال نفس الجين المستهدف فضلاً عن عن تشخيص خمسة انواع من طفيلي الايميريا هي *E.tenella* ، *E.maxima* ، *E.acervulina* ، *E.mitis* و *E.necatrix* بنسب 31% ، 24.6% ، 23% ، 12.7% و 8.73% على التوالي . واقل من النسبة التي أشار إليها[27] والتي بلغت 64% لـ 128 عينة براز موجبة من مجموع 200 عينة مفحوصة في مدينة شيراز الايرانية ومشخصاً اربعة انواع

المناقشة Discussion

تشخيص الطفيلي *E.tenella*

اشارت نتائج أستخدام تقنية الـ PCR للكشف عن الجين IST1 الخاص بطفيلي *E.tenella* في 315 عينة براز لدجاج مريض ، تضمنت تشخيص النوع *E.tenella* بنسبة 59% (186عينة براز موجبة) ، أن نسبة تواجد الجين IST1 المسجلة في الدراسة الحالية هي أعلى من النسبة المسجلة في الدجاج المحلي الايراني من قبل[26]

المرصوصة والعدد الكلي لخلايا الدم الحمر خصوصاً في افراخ مجموعة دجاج الروز الاجنبي المصاب إذ اعطت اقل القيم مقارنة بافراخ الدجاج المحلي المصابة و هذه النتيجة جاءت مقاربة لما وجده [31] [32] .

ان هذا الانخفاض في معدلات قيم صورة الدم هي احدى التأثيرات المهمة الناجمة عن الاصابة بداء الاكريات وقد يعزى ذلك الى عدة اسباب اهمها فقدان كميات كبيرة من الدم بسبب النزف الدمي الحاصل في بطانة الاعورين نتيجة لنمو وتطورالمفلوقات في الطبقة القاعدية للاعورين وبالتالي حصول نقص شديد في الاوكسجين والغذاء فينتقل الطفيلي وينتشر نحو الاوعية الدموية للحصول على الغذاء والاوكسجين الكافي للنمو والتضاعف وبالتالي حصول تلف كبير وتمزق في هذه الاوعية الدموية فيحصل النزف الدموي وفقدان كميات كبيرة من الدم والسوائل الجسمية ، فضلاً عن فقدان الشهية وقلة تناول العلف والماء وتسبب الطفيلي بحصول تلف واضطراب كبير في عمل القناة الهضمية مما يسبب انخفاض القابلية على الهضم والأمتصاص وعدم الاستفادة من المواد الغذائية وهذا ما انعكس سلباً على صحة الافراخ المصابة وحصول نقص في الحديد ومن ثم اصابتها بفقر الدم Anemia إذ أن ضعف الحالة الصحية الذي كان واضحاً على الافراخ المصابة مما أدى الى حصول أنخفاض شديد في تركيز هيموكَلوبين الدم وحجم خلايا الدم المرصوصة والعدد الكلي لخلايا الدم الحمر، اما [33] فقد عزى هذا الانخفاض في قيم معايير صورة الدم الى قلة معدل العمليات الايضية جراء الأصابة بطفيلي *E.tenella*.

اما بالنسبة للعدد الكلي لخلايا الدم البيض فقد أظهرت نتائج التحليل الأحصائي حصول ارتفاع معنوي($P<0.05$) في معدلاتها في دم الافراخ المصابة بطفيلي *E.tenella* مقارنةً مع أفراخ السيطرة السليمة وقد أتفقت هذهِ النتائج مع ما توصل اليه كل من [34] الذين اكدوا ان الاصابة الطفيلية غالباً ما يصاحبها ارتفاعاً في العدد الكلي لخلايا الدم البيض، ان ارتفاع معدلات العدد الكلي لخلايا الدم لطفيلي الايميريا ممرضة للدواجن هي *E.tenella* ، *E.acervulina* ، *E.necatrix* و *E.maxima* بنسب 24% ، 18% ، 12% و 10% على التوالي وقد يعزى سبب الأختلاف في النسب المسجلة بالدراسة الحالية والدراسات الاخرى الى أختلاف عدد العينات المفحوصة وظروف التجربة وأختلاف الظروف المناخية لكون اكياس بيض هذه الطفيليات تحتاج الى رطوبة ودرجة حرارة لضمان حصول عملية التبوغ ومن ثم حصول الاصابة .

كذلك بينت النتائج ايضاً ان طريقة استخلاص الـ DNA المستعملة في الدراسة الحالية كانت ناجحة وجيدة جداً في الحصول على تركيز ونقاوة مناسبة لأستعمال الـ DNA كقالب Templet في تقنية الـ PCR كما ان نجاح البادئ المتخصص المستعمل في كشف وتضخيم الـ DNA للنوع *E.tenella* قد يعود الى حقيقة ان البادئ المستعمل قد صمم بشكل خاص ودقيق لأستهداف الجين IST1، لذلك فقد اظهرت النتائج ان التضاعف الذي تم الحصول عليه بأستعمال هذا الجين ذو خصوصية عالية جداً في تشخيص طفيلي الـ *Eimeria* وهذا ما توصل اليه[28] الذي اكد على اهمية طرق استخلاص الـ DNA من العينات المفحوصة في الحصول على النتائج المطلوبة ، في حين أكد الباحثين [29] [30] على أن كسر اغلفة اكياس البيض مهم جدا لضمان نجاح عملية الاستخلاص وهذا يتطلب زيادة في عدد ساعات التجميد لأكياس البيض او اتباع طرق اخرى كالحضن في الفينول الساخن .

الدراسة التجريبية Experimental Study

فحوصات صورة الدم (Hb – PCV – RBC - WBC)

تعد صورة الدم من اهم مؤشرات التأثيرات المرضية للاصابة الطفيلية ، فقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية ان لطفيلي *E.tenella* تأثيراً كبيراً على معدلات معايير صورة الدم مسبباً حصول انخفاض عالي المعنوية ($P<0.05$) في قيم تركيز الهيموكَلوبين وحجم خلايا الدم

الدجاج المحلي وهذا يتفق مع ما اشار اليه كل من [35] مع تقدم الافراخ المصابة بالعمر فقد ابدت بعضها تحسناً ملحوظاً في حالتها الصحية وبشكل تدريجي وهذا ما انعكس بشكل إيجابي على قيم صورة الدم وهذا قد يعود الى اخذ أكياس البيض من الفرشة بأستمرار و تسببها في تقوية الجهاز المناعي للافراخ المصابة ، في حين أن [36] فقد عزى ذلك الى الفيتامينات المعطاة مع النظام الصحي والوقائي الذي أتبع خلال تربية الأفراخ وحصول الترميم لبعض الأضرار التي حصلت في ظهارة القناة الهضمية .

البيض في دم الافراخ المصابة بطفيلي *E.tenella* مقارنةً بغير المصابة قد يمثل استجابة طبيعية بسبب دخول اكياس بيض طفيلي الـ *Eimeria* الى داخل خلايا الامعاء مما أدى الى زيادة اعداد خلايا الدم البيض كرد فعل من الجسم والتي تعد كخلايا دفاعية .

ان ظهور ارتفاعاً عالي المعنوية ($P<0.05$) في قيم معدلات العدد الكلي لخلايا الدم البيض لصالح افراخ الدجاج المحلي المصابة مقارنة بأفراخ الدجاج الاجنبي في التجربتين الاولى والثانية قد يعود الى زيادة مقاومة افراخ

المصادر References

1- De Gussem, M. (2007). Coccidiosis in poultry: Review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health. in Proc. 16th Eur. Symp. on Poult. Nutr. World's PoultryScience Association, Beekbergen, the Netherlands., p 253-261.

2- Farooq M.;Durranil F.R.;Waheedullah W.;Sajjad A.;Sohail A. and Asghar A.(1999).Prevalence of Coccidiosis in Broilers in the Subtropical Environment , ARS Parasite Biology , Beltsville , Md .

3- Augustine, P. C. (2001). Cell: sporozoite interactions and invation by apicomplexan parasites of genus *Eimeria*. J. Parasitol., 31(1): 1-8.

4- Julie, D. H. (1999). Coccidiosis in Poultry. Clemson University livestock Health Programs POB 102406, Columbia, SC 29224 (803) 788-2260. Scientific article. jhelm@clemson. edu www.clemson. Edu/LPH.

5- Shirzad, M. R., S.; Seifi, H. R.; Gheisari, B. A.; Hachesoo, H.; Habibi, and Bujmehrani H. (2011). Prevalence and risk factors for subclinical coccidiosis in broiler chicken farms in Mazandaran Province, Iran. Trop. Anim. Health Prod., 43: 1601-1640.

6- Jadhav, B. N.; Nikam, S. V. ; Bhamre, S. N. and Jaid, E. L. (2011). Study of *E. necatrix* in broiler chicken from Aurangabad District of Maharashtra state India. Intern. Multidis. Res. J., 1:p11-12.

7- Nematollahi A, G.; Moghaddam, H. and Farshbaf P. R. (2009). Prevalence of *Eimeria* species among broiler chicks in Tabriz (Northwest of Iran). Mun. Ent. Zool., 4: p53-58.

8- Fetterer, R. H. and Allen. P. C. (2001). *E. tenella* Infection in Chickens: Effect on Plasma and Muscle 3-Methylhistidine Poult. Sci., 80:p1549-1553.

9- Carmichael,I. and Melb, D.V.(1998).Coccidiosis,Chief Vet.Parasitologist,South Australia.

10- Nematollahi, A.; Moghaddam, G.h.and Niyazpour, F. (2008). Prevalence of *Eimeria sp*. among broiler chicks in Tabriz (Northwest of Iran). Res. J. Poult. Sci. 2 (3):p 72–74.

11- Mc Dougald, L. R. (2003). Coccidiosis in :Disease of poultry.11 Th Ed. Edited by Saif, Y.M. Iowa State Press., p 973-990 .

12- Gupta, A. R. and Agrawal, P. (2010). Coccidiosis in poultry. A review . Technical Articles List., p 10. Engromix. Com.

13- Haug, A.; Thebo, P. and Mattsson, J.G. (2007). A simplified protocol for molecular
identification of Eimeria species in field samples. Vet. Parasitol., 147:p 35- 45.

14- Conway, D. P. and McKenzie, M. E. (2007). Poultry coccidiosis diagnostic and testing procedures third edition. Blackwell publishing professional avenue, Ames, lowa 50014 USA 2121., p 1-162.

15- Ryley, J.F.; Meade, R.; Judith H. H. and Thelma, E. R. (1976): Methods in coccidiosis research: separation of oocyst from faeces. Parasitol., 73: p 311-326.

16- Barwick, W. M.; Stevenson, G. T.; Johnson, R. V.; Casores, D. R. and Hymas, T. A. (1970). Coccidiosis evalution of techniques for battery testing of field collected *Eimeria* Oocysts . Exp. Parasitol., 28:p37-41.

17- 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 strain of *E. praecox* and *E. mitis* Animal Research Institue , Moorooka; Queensland., 4105: p 10-18.

18- AL-Attar, M. A. (1981). Factors Affecting the pathogenesis of *E.necatrix* infections in chicken. Thesis Ph.D. Dissertation.University of Guelph. Canada.

19- زكريا، إحسان كوركيس و الطائي، أحلام فتحي و عبد الله، دنيا عبد الرزاق.(2010). دراسة التغييرات النسجية في الأعورين للإصابة التجريبية بجرثومة السالمونيلا وطفيلي الايميريا تنيلا في أفراخ فروج اللحم. مجلة علوم الرافدين. (4) 21 :- 27 40 .

20- Allen, P. C., Danforth H. D., and. Levander O. A.(1997). Interaction of Dietary Flaxseed with Coccidia Infections in Chickens. Poultry Sci., 76:p 822–827.

21- Coles, E.H. (1980). Veterinary Clinical Pathology. 3ed ed. W. B. Sanders. Co. Philadelphia., p 190-192.

22- Hillman, R. S. and Ault, K.A. (2002). Haematology in Clinical Practice. 3rd ed., McGraw-Hill Co, New York.

23- Dacie, J.V. and Lewis, S.M. (1984). Practical Haematology. 6th ed., Edinburgh, Churchill Livingstone., p 40-55.26- Tokushima , R. ; B.sulistiyanto, ; Takahashi K. and Akiba, R. (2003).Insulin-glucose interactions characterized in newly hatched broiler chicks . British poultry sci., 44:p 776- 751.

-

24- Hall, R. and Malia, R.G. (1984) .Medical laboratory haematology, Butterworth and CO. publishers Ltd . London .

25 - Hamidinejat H.; Seifiabad S. M.R..; Mayahi M.;and Pourmehdi B. M.(2010). Characterization of Eimeria Species in Commercial Broilers by PCR Based on ITS1 Regions of rDNA. Iranian J. Parasitol., 5(4) : p 48-54.

26- Hadipour, M. ; Olyaie, A.; Naderi, M.;Azad, F. and Nekouie, O. (2011). Prevalence of *Eimeria* species in scavenging native chickens, Shiraz, Iran,Aft. J. Microbiol.Res., 5: p 3296-3299.

27- Carvalho, F.S. ; Wenceslau, A.A.; Teixeira, M.and Albuquerque, G.R.(2011). Molecular diagnosis of Eimeria species affecting naturally infected Gallus gallus . Genetics and Molecular Research 10 (2): 996-1005.

28- Jinneman KC, Wetherington JH, Hill WE, Adams AM, Johnson JM, Tenge BJ, Dang NL, Manger RL, Wekell MM.(1998). Template preparation for PCR and RFLP of amplification products for the detection and identification of *Cyclospora sp*. and *Eimeria spp*. oocysts directly from raspberries. J. Food Protect.,61(11):p 1497-1503.

29- Zhao X., DuszynskiD.W.and Loker E.S.(2001). A simple method of DNAextraction for Eimeria species, J. Microbiol Methods., 44(2): 131-137.

30- Vegad ,J.L.(2007).A color atlas of poultry diseases to farmers and Poultry professionals .1st ed. IBCD. Indian .,p 121- 122.

31- الشمري، مجيد حميد عبود (2010). تقييم فعالية بعض المستخلصات النباتية في الأداء الإنتاج والفسلجي لفروج اللحم المخمج بطفيلي *Eimeria tenella*. رسالة ماجستير، الكلية التقنية ، المسيب، هيئة التعليم التقني.117 ص.

32- Hirani, N. D.; Hasnani, J. J.; Dhami , A. J. and Khanna, K. (2007). Haemato-biochemical profile of broilers affected with coccidiosis . J.of Vet. Parasitol., 21(1):p1-2.

33- Irshaid,F.and Mansi,K.(2009).The effects of methanol extract derived from

Studies on Coccidia of Egyptian Balady Breed Chickens, Life Sci. J., 9(3) :568-576 .35- Porter, S. B.; Ong, D. E. and Chytil, F. (1986). Vitamin A status effected chromatin structure. Int. J. Vita .Nutr. Res., 56:11.

Urtica pilulifera leaves on some hematological and biochemical parameters of diabetic rats , Biological Sci. , 4 (6):p 675-682.

34- Al-Gawad,A.A. Mahdy,O.A. El-Massry,A.A.and Al-Aziz,S.A.(2012).

* A Study of Some Blood Picture Parameters during Experimental Infection with *Eimeria tenella* in Local breeds and Foreign of Chicken

Receved :18/1/2015 Accepted : 1/3/2015

Dawood, K. A. **AL-Shaibany, K. T.**
Dept. Microbiology/ Medicine College **Dept. Biolgy/College of Education**
Al-Qadisiya University
khbio7@gmail.com

Abstract:

The study was conducted in Animal house of the department of Biology, College of Education, Al-Qadisiya University during the period from 1/9/2013 to 1/9/2014. The study diagnosed the parasite of *E.tenella* in naturally infected chickens in poultry farms. *E.tenella* was isolated from the infected cases in Vet. hospital and Vet. clinics.Then,the cases diagnosed initially in the laboratory direct examining stool by ordinary microscope and the positive cases were recorded and diagnosed by using the technique of Conventional Polymerase Chain Reaction(PCR). There are 315 cases of infected chicken which are examined and the results showed that (186 out of 315) stool Samples,59%, The experimental infection for each experiment was done in age 21 day with dosage of (5×10^4) grown oocysts/chicken for *E.tenella* in two types of chickens(Ross and local breed) Also,two groups of uninfected chickens (control) are used for the sake of comparison.

Hematological parameters in Ross chickens showed significant decrease ($p<0.05$) in fourth week of infection), percentage of Packed cell volume (PCV)(18.47% in the fifth week of infection) and Red blood cell (RBC) count was ($1.58x10^6$ in the fourth week of infection) . Also , the infection led to significant difference of white blood cell (WBC) count ($30.19x10^3$ in the seventh week of infection) comparison of uninfected chickens of the control group. While The hematological parameters in local breed showed significant decrease ($p<0.05$) in Hb concentration and percentage of PCV (7.13mg/100ml , 21.26% respectively in the fifth week of infection) , while the RBC count was (2.05×10^6 in the fourth week of infection and significant increased ($p<0.05$) in WBC count was (30.63×10^6 the sixth week of infection) in comparison with the chickens of the control group.

Key words: Chiken, *Eimeria tenella*,PCR, Biochemical parameters.

Microbiology Classification QR 171

*The research is apart of on Ph.D. Thesis in the case of the second research.