الكشف الجزيئي عن داء المقوسات في القمل *Menacanthus stramineus* المتطفل على الدجاج المصاب طبيعياً باستخدام فحص تفاعل البلمرة التسلسلي الاعتيادي

فاطمة ابراهيم محمد الليباوي هادي مدلول حمزة الميالي
جامعة القادسية / كلية التربية / قسم علوم الحياة
email:hadihamza519@yahoo.com
(الاستلام 18 كانون الثاني 2015 ، القبول 15 شباط 2015)

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى اثبات دور القمل العاض *Menacanthus stramineus* في نقل طفيلي المقوسة الكوندية *Toxoplasma gondii* الى الدجاج باستخدام طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. جُمع 30 طيراً من الدجاج المحلي البالغ *Gallus gallus domesticus* بعمر أكبر من 4 أشهر المصاب إصابة كثيفة بالقمل من الأسواق المحلية لمدينة الديوانية ، سحب 5مل من الدم من كل طير وأخضعت جميع هذه العينات للفحص المصلي باستخدام اختبار تلازن اللاتكس Latex agglutination test الخاص بالكشف عن طفيلي المقوسة الكوندية *T.gondii* الذي أظهر أن هناك 17 عينة مصابة بطفيلي المقوسة الكوندية وبنسبة 56.66% وان أعلى نسبة في اصابة الطيور سجلت عند المعيار 1/80(41.17%) وأقل نسبة عند المعيار1/40 و1/640 إذ بلغت 5.88% لكل منهما. أظهرت نتائج استخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي الاعتيادي PCR عند فحص 22 عينة قمل وجود 12عينه موجبه للفحص وبنسبة 54.54%حيث تم تسجيل تواجد الجين B1(399bp) الخاص بطفيلي المقوسة الكونديه في انسجة القمل المذكور مما يدل على تواجد الطفيلي فيها. من خلال الدراسة نستنتج وجود الطفيلي في القمل وقدرته على نقل الطفيلي ضمن أجزاء جسمه.

الكلمات المفتاحية: داء المقوسات ، *Menacanthus stramineus* ، تفاعل البلمرة ، اختبار اللاتكس ، الدجاج.

Molecular detection of toxoplasmosis in biting lice (*Menacanthus stramineus*) on naturally infected chickens using polymerase chain reaction

Fatima I. AL-Lebawi Hadi M. AL-Mayali
Coll. of Education / Univ. of AL-Qadisiya

Abstract

The study aim to prove the role of biting lice *Menacanthu stramineus*to in transfer of *Toxoplasma gondii* to the chickens by using PCR technique. Thirty local chickens (*Gallus gallus domesticus*) more than 4 months age, have dense lice infestations were collected from the local markets of AL-Diwaniya city. Five ml of blood were collected from each bird, and all samples were tested by serological test using latex agglutination test to detect *Toxoplasma gondii* parasite. Results were indicate (17) 56.66% positive samples of *Toxoplasma gondii* parasite, and the highest proportion were recorded at the titer of 1/80 (41.17%) and the lowest at 1/40, and 1/640 (5.88% for each one). Result of conventional PCR reveals 12 (54.54%) positive out of 22 examined lice samples in which presence of the specific B1(399bp) gene of *T. gondii* were registered in lice tissue indicating the presence of parasite. In conclusion the study proves the presence of Toxoplasma parasite in lice tissue, and the ability of the lice to transmit the parasite within his body parts.

Key words: Toxoplasmosis, *Menacanthus stramineus*, PCR, LAT, chickens.

المقدمة

تعمل الطفيليات الخارجية كناقل للعديد من المسببات المرضية كالبكتريا والفايروسات اذ تكون مضائف وسطية للعديد من الديدان الشريطية والخيطية(1)، يعتبر قمل جسم الدجاج *Menacanthu sstramineus* مخزنا وناقلا للمسببات المرضية كمرض كوليرا الطيور والتيفوئيد والمقوسات Toxoplasmosis(2)، كما عزل فايروس التهاب دماغ الخيل من *M.stramineus* وعزل الكلاميديا chlamydia of ornithosis (مرض ينتقل من الطير الى

الانسان) من قمل *Menopon gallinae* على الدجاج والديك الرومي (3) ، كما ان القمل العاض يمكن ان ينقل الجراثيم مثل *Pasteurell amultocida* و *Salmonella gallinarium* و*Escherichia coli* و *Streptococcus sp.* (4).كما ينقل قمل *Trinotonanserinum* دودة القلب Heart worm الى البط والاوز(6,5) بينما يكون قمل الكلاب *Trichodectes* مضيف وسطي لبعض الديدان الشريطية Tape worm(7)، فضلا عن دور القمل العاض في نقل الديدان الخيطية Nematodes الى الطيور المائية.

المواد وطرائق العمل

جُمع (30) طيراً من الدجاج المحلي البالغ *Gallus gallusdomesticus* بعمر أكبر من 4 أشهر من الأسواق المحلية لمدينة الديوانية بعد التأكد من إصابتها إصابة كثيفة بالقمل العاض لغرض التحري عن طفيلي المقوسة الكوندية في مصولها باستخدام اختبار اللاتكس وكذلك جمع عينات القمل *M. stramineus* إذ شخصت نماذج القمل بالاعتماد على عدة مفاتيح تصنيفية معدة من قبل الباحثين السابقين (10,9,8) لغرض التحري عن الطفيلي نفسه في انسجتها بطريقة اختبار تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR) من خلال تحديد وجود احد الجينات التشخيصية الخاصة بالطفيلي في انسجة القمل لدراسة إمكانية كون القمل ناقل للطفيلي في الدواجن من خلال تحديد وجود هذا الجين. سحبت عينات الدم (3-5 مل) من الدجاج المصاب طبيعياً بالقمل العاض من المنطقة الواقعة تحت الجناح بواسطة سرنجة معقمة حجم 5 مل (11) ، ثم وضعت في انابيب معقمة وبعد فصل المصل وضعت في انابيب خاصة معقمة وحفظت في-20مْ لحين اجراء فحص تلازن اللاتكس Latex agglutination test الخاص بداء المقوسات والمتكون من مصل السيطرة الموجب المتكون من مصل الانسان المخفف مضافاً اليه الاجسام المضادة IgG للأرانب ومصل السيطرة السالب ويتكون من مصل الانسان المخفف بدون الاجسام المضادة فضلاً عن كاشف بشكل جزيئات معلقة من البولي أسترين المغطاة بالمستضدات الذائبة لطفيلي المقوسة الكوندية وبحسب الطريقة الموصوفة من قبل (12). استخلصت المادة الوراثية DNA من عينات القمل وذلك باستعمال عدة Genomic DNA extraction kit والمجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية ونظرا لعدم وجود دراسات سابقة حول استخلاص DNA من عينات القمل فقد تم اعتماد طريقة (13) التي اعتمدها لاستخلاص DNA من حشرات ذبابة الرمل للتحري عن طفيلي اللشمانيا وقد استعملت بادئات *Toxoplasma gondii* مع تسلسلها النيوكليوتيدي والمجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية وذلك باستعمال تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR. لغرض التحري عن الجين B1gene بناتج 399bp وزن جزيئي الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية (جدول1).

جدول (1): بادئات *Toxoplasma gondii* مع تسلسلها النيوكليوتيدي والمجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية.

البادئ Primer	تتابع الأحماض Sequence		حجم الناتج qPCR product size	الشفرة Gen Bank Code no.
Toxoplasma gondii B1 gene	F	GAACCACCAA AAATCGGAGA	399bp	AF1798 71.1
	R	GATCCTTTTG CACGGTTGTT		

وقد حضر مزيج التفاعل لسلسلة البلمرة باستعمال عدة AccuPower® PCR pre Mix شركة Bioneer وبحسب تعليمات الشركة تم وضع المزيج في انابيب PCR والمجهزة في العدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة واضيفت المكونات الاخرى لمزيج التفاعل (primers,3µL/DNA,5µL/PCRwater,12µL) ثم تغلق الانابيب وتمزج بواسطة المازج وتنقل الانابيب لجهاز PCR Thermocycler لأجراء مراحل الدورات الحرارية لتضخيم DNA وفق البرنامج الآتي:
الخطوة الأولى: المسخ Denaturation بدرجة حرارة95مْ .الخطوة الثانية: الالتحام Annealing بدرجة حرارة55مْ الخطوة الثالثة: الاطالة Extension بدرجة حرارة 72مْ. وقد تم تضخيم DNA بـ 30 دورة بعد ذلك اجري الترحيل الكهربائي لنواتج التضخيم على هلام الاكاروز بنسبة 1.5 % وبعد اكتمال عملية الترحيل يفحص الهلام الحاوي على ناتج PCR باستخدام جهاز الاشعة فوق البنفسجية UV transluminatorلتحديد النتائج الموجبة للعينات والمطابقة مع سلم القياس DNA ladder.

النتائج

1- الكشف المناعي

اظهرت نتائج الفحص المناعي للكشف عن داء المقوسات في مصل طيور الدجاج المفحوصة والمصابة طبيعيا بالقمل وجود (17) حالة اصابه موجبه بالطفيلي وبنسبه 56.66% من مجموع الطيور المفحوصة والبالغ عددها 30 طيراً حيث ظهرت اجسام الضد وبمعيارية مختلفة تراوحت ما بين 1/20 و1/640 وظهرت أعلى نسبة معياريه (41.17%) لأجسام الضد عند المعيارية 1/80 وأقل نسبة عند المعيارية1/40و1/640حيث بلغت (5.88%) لكليهما (جدول2).

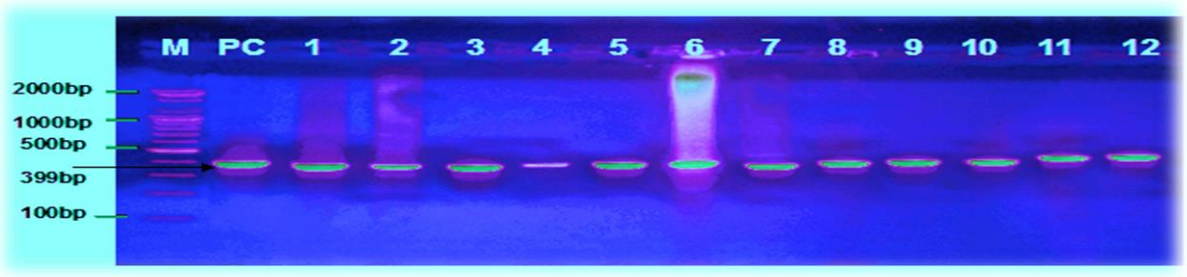
2- الكشف الجزيئي

تم الاعتماد على نتائج فحص اللاتكس الذي استخدم لتحديد اجسام الضد لطفيلي المقوسة الكوندية في مصول الدجاج المصاب طبيعياً بالقمل والتي أظهرت نتائج موجبه للفحص حيث تم جمع عينات القمل *Menacanthus stramineus* من الحالات الموجبة للدجاج وخاصة ذات المعيارية العالية للتحري عن الجين التشخيصي B1 ذو

الوزن الجزيئي 399bp الخاص بطفيلي المقوسة الكونديه. أظهرت نتائج استخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي الاعتيادي في فحص 22 عينة قمل وجود 12عينه موجبه للفحص وبنسبة 54.54% حيث تم تسجيل تواجد الجين B1(399bp) الخاص بطفيلي المقوسة الكونديه في انسجة القمل المذكور مما يدل على تواجد الطفيلي فيها (شكل1).

الجدول(2) يبين نسب ومعيارية أجسام الضد لطفيلي المقوسة الكونديه *Toxoplasma gondii* في مصول الدجاج المفحوص المصاب طبيعيا بالقمل باستخدام فحص اللاتكس.

العينات		الحالات الموجبة ونسبها المئوية (%) حسب المعيارية					
العدد الكلي	العدد المصاب (%)	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
30	17(56.66)	3(17.64)	1(5.88)	7(41.17)	3(17.64)	2(11.67)	1(5.88)



الشكل (1): تمثل صورة الترحيل الكهربائي النهائي لعينات الحامض النووي DNA الموجبة فقط للقمل *M. stramineus* من الدجاج المحلي على هلام الاكاروز بتركيز (1.5%) تظهر نتائج فحص ال PCR ظهور الجين B1 gene الخاص بتشخيص طفيلي المقوسة الكونديه فيه. حيث يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و PC: DNA تمثل السيطرة الموجبة والعينات1-12 تمثل العينات الموجبة للفحص للجين B1 gene بناتج 399bp وزن جزيئي.

المناقشة

أشارت نتائج الكشف المناعي باستخدام اختبار تلازن اللاتكس ، إلى ان اعلى معيارية للأجسام المضادة لطفيلي المقوسة الكوندية في مصول الدجاج المصاب طبيعياً بالقمل سجلت عند المعيار 80/1 (41.17%) واقلها عند المعيارين40/1 و640/1 إذ بلغت (5.88%) لكليهما. وهذه الدراسة تختلف عما سجل في الدراسات الاجنبية والعربية السابقة حيث ذكر كل من (16,18,15,20,19,14,17)، بأن اعلى معيارية للأجسام المضادة في مصول الدجاج المحلي وفروج اللحم كانت عند المعيار60/1(45.45%) و320/1(30.5%) و5/1 و10/1(28% لكل معيار) و128/1(15%) و320/1(32.6%) و128/1(34.32%) و80/1(25.81%) على التوالي ، في حين ذكر (16,15,18,20) بأن اقل معيارية لأجسام الضد في مصول الدجاج المحلي كانت عند المعيار 20/1(5%) و20/1(2%) و2/1(5.22%) و640/1(6.45%) على التوالي. تشير التراكيز العالية للأجسام المضادة في مصول الدجاج الى وجود الاصابات الحادة Acute infections بطفيلي المقوسة الكوندية والذي يدل على التعرض القريب للطفيلي في حين تدل التراكيز الواطئة للأجسام الى وجود الاصابات المزمنة Chronic Infections بالطفيلي وهذا يتفق مع ما ذكره (21). استخدمت تقنية تفاعل سلسلة البلمرة كطريقة تشخيصية لتأكيد نتائج الاختبارات المصلية التي تمثلت باختبار تلازن اللاتكس ، لما تمتاز هذه التقنية من حساسية وخصوصية عاليتين عند استخدامها للكشف عن طفيلي المقوسة الكوندية في مختلف العينات البيولوجية (23,22). أشارت نتائج استخدام تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي للكشف عن الجين B1(399bp) الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية في 22 عينة قمل الى ان النسبة الكلية لوجود الجين B1 بلغت 54.54% (12 عينة موجبة) وتتفق هذه الدراسة مع دراسة (16) حيث سجلت اصابة (14 عينة دم) من الدجاج المحلي بالمقوسة الكوندية وبنسبة 17.5% باستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي للكشف عن الجين B1 (399bp) في دمائها ، اما في دراستنا الحالية فقد تم الكشف عن هذا الجين B1(399bp) في انسجة القمل المعزول من الدجاج المصاب طبيعياً بالقمل وطفيلي المقوسة الكوندية وهذا يؤكد دور هذا القمل في نقل طفيلي المقوسة الكوندية الى الطيور السليمة من الطيور المصابة اثناء تغذيته على دمائها وهذا يتفق مع (22) والذي اكد اصابة الفئران المختبرية وطيور الدجاج السليمة بالمقوسة الكوندية بعد حقنها بمسحوق من عينات القمل M. stramineus التي جمعت من طيور دجاج مصابة بالمقوسة الكوندية. كما تتفق ايضاً مع (2) والذي اكد ان قمل M. stramineus هي مخزناً وناقلاً للمقوسة الكوندية. وقد يعود السبب في ظهور جين الطفيلي في انسجة عينات القمل الى كونه حاملاً او ناقلاً للطفيلي في اثناء تغذيته على طيور مصابة ومن ثم نقلها الى الطيور السليمة في اثناء عمليات التغذية على الدم مما يعطي مؤشرا واضحا على الارتفاع الكبير في حالات الإصابة بطفيلي المقوسة الكوندية الذي أشارت إليه الدراسات السابقة (28,15,25,27,26).

المصادر

1-Permin A, Hansen JW (1998) Epidemiology, diagnosis and control of poultry parasites FAO Animal Health Manuals 4. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Pp.160.

2-Saxena AK, Agarwal GP, Chandra S, Singh OP (1985) Pathogenic involvement of Mallophaga. Zurangewandte Entomologie,99:294-300.

3-Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR , Fadly AM, McDougal CR, Swagne DE (2003) Diseases of Poultry.11th ed. Iowa State Press, Black well publishing Co.

4-Trivedi MC, Sharma S, Rawat BS, Saxena AK (1990) Haematophagus nature of ambluceranph-thiraptera, Menacanthuscornutus Schommer, infesting poultry bird *Gallus domesticus*L. India. J. Appl. Ent., 110: 107-111.

5-Seegar WS, SchillerEL, Sladen WJL, TrpisM (1976) A Mallophaga, Triton anserium, asacyclo developmental vector for a heart worm parasite of water fowl.Science194:739-741.

6-Cohen S, Greenwood MT, Fowler JA (1991) The louse *Trinotonanserium* (Amblycera: Phthiraptera) ; an intermediate host of *sarconemaeurycera* (Filariodea: Nematoda), a heartworm of swans. Med. Veter. Entomol.5:101-110.

7-Kim KC,Emerson KC, Price R D (1973) Lice. In: R.J. Flynn (ed.) parasites of laboratory animals, pp.376-397. Iowa State Univ. press, Ames.

8-Barriga OO (1995) Veterinary Parasitology. Gerden Press, Columbus, Ohio, USA.

9-Soulsby EJL (1982) Helminthes, Arthropods and Protozoa of Domestic Animal. 7th ed. Balliere, Tindall& Cassell,London.P.973.

10-Wall R, Shearer D (1997)Veterinary Entomology Arthropod Ecto- parasites of veterinary Importance .Chapman & Hall,p.151.

11-Strukie PD (1965) Avian physiology. Cornell. Ini. Press:75

12-JacobsL (1973) New knowledge of *Toxoplasma* and Toxoplasmosis In: Advanced in parasitology Edited by. Dawes, B. Academic press. London and NewYork.11:631-670.

13-Sanei Dehkordi A, Rassi Y, Oshaghi M, Abai M R, Rafizadeh S, Yag-hoobi M R, Mohebali M, Zarei Z, Mohtarami F, Jafarzadeh B, Ranj-barkhah A, Javadian E (2011) Molecular Detection of *Leishmaniain fantum* in naturally infected *phlebotomus perfillewitrans caucasicus* in Bilesaver District, Northwestern Iran. Iran J. Arthropod-Borne Dis.: 5(1) 20-27.

14- الطائي، احلام فتحي محمود ، عباس ، نشوان عدنان ، محمد ، واقد حسن ، جرجيس ، بشار محمد ، حسين ، يسرى يحيى (2005) الكشف عن اضداد مقوسات كوندي*T.gondii* في فروج اللحم في محافظة نينوى .مجلة طب دهوك .(2): 264 -267.

15- داخل ، محمد حبيب (2012) دراسة بايلوجية جزئية ومناعية للإصابة بطفيلي المقوسة الكوندية *Toxoplasma gondii* في الحمام البري والمنزلي والدجاج المحلي. رسالة ماجستير . جامعة القادسية. كلية التربية .119 صفحة.

16- الخالدي ، خديجة عبيس حمود (2014) التحري عن طفيلي المقوسة الكوندية *Toxoplasma gondii* في الطيور الداجنة في منطقة الفرات الاوسط والقطط في محافظة الديوانية باستخدام التقنيات المصلية والجزيئية. اطروحة دكتوراه. جامعة القادسية كلية التربية.168صفحة.

17-Lindasy DS, Smith PC, Blagurn BL (1994) Prevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from wild turkey in Alabam. J. Helmintholo. Soci. Washington., 61:115-117.

18-AL-Khaled MJA (2012) Serological and molecular study of Toxoplasmosis in chickens and ducks in some regions of middle Euphrates. Thesis Vet. Med. Uni. Baghdad .pp135.

19-Dubey JP, Edelhofer R, MarcetP, Vianna MC, Kwok OC, Lehmann T (2005) Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. Vet. Parasitol.,133:299-306.

20-Sedlak K, Literak I, VitulaF, Benak J (2010) High susceptibility of partridges (*Predixpredix*) to Toxoplasmosis compared with other gallinaceaus birds. Avian Pathol.,(29): 563-569.

21-DubeyJP, JKLunney SK, Shen O CH, Kwok D AA, shfordThulliez P (1996) Infectivity of low numbers of *Toxplasma gondii* oocysts to pigs. J. Parasitol., 82: 438-443.

22-Burg JL, Grover CM, pouletty P, Boothroyd J (1989) Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction .J. Clin. Microbiol., 27(8):1787-1792.

23-Ho-Yen DO (1992) Clinical features .In D.O. Ho-Yen, and A.W.L. Joss (ed.), Human Toxoplas-mosis. Oxford Medical publications, Oxford, United Kingdom, 56-78.

24-Derylo A (1977) Studies on the Role of biting lice, *Eomenacanthusstramineus* (Nitzsch) in the transmission of Toxoplasmosis to chickens. Wiadimosciparasitologiczne .23(1-3):131-134

25-الجبوري ، سعدية عزيز عنه(2010) الاصابات الطفيلية الداخلية والخارجية في الدجـــاج المنزلي *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus,1758). في مدينـة الديوانيـة. رسالة ماجستير، كلية التربية ، جامعة القادسية : 116 صفحة.

26-DubeyJP, Graham DH, Blackston CR , Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AMA, Nishi S M, ShenSK, Kwok O C, Hill E, Thulliezd P (2002) Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo Barazil. Int. J. parasito, 32:99-105.

27-Asgari O, Farzaneh A, Kalantari M, Akrami, Mohajeri F, Moana M, Zarifi M, Esmaeilzadeh B and Motazedian MH (2006) Seroprevalence of free-ranging chickens toxoplasmosis in sub-urban regions of Shiraz , Iran. J. Poult .Sci. 5:262-264.

28-Zakaria EG (2011) Detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in different meat juices. Raf. J. Sci., Vol. 22, No.4pp17-25.