دراسة التغيرات النسيجية في منطقة الأعورين للدجاج المخ مج تجريبياً بطفيلي *Eimeria tenella* بعد معالجتها بالكلوبيولين المناعي IgY

ثائر عبد القادر صالح[1] ، شهاب احمد محمد[2] ، توفيق إبراهيم[3]

[1] العلوم ، جامعة الانبار ، رمادي ، العراق

[2] كلية التربية ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[3] كلية الطب البيطري ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

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 وكذلك من قبل جامعة بغداد / كلية الطب البيطري / قسم الطفيليات ، حصل 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 الضارية Challenge 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 جـ مع البيض منذ اليوم الأول من الجرعة الأولى وحتى نهاية الجرعة الرابعة لمراقبة تتابع زيادة الكلوبيولين المناعي IgY في صفار البيض ، أستخلص الكلوبيولين المناعي IgY من صفار البيض بشكل يومي وتمت دبلزته 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 Column Chromatography 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 Double immunodiffusion Ouchterlony test 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 تغييرات نسيجية من خلال المقاطع الحاصلة في الخمج التجريبي بين المعاملات ،و ان أفضل وسيلة للعلاج كانت عن طريق إعطاء العلاج بالحقن في الغشاء البريتوني وفي صفار البيض داخل الجسم مقارنة السيطرة السالبة و مع 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 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 ملحة 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 ،و العديد من الباحثين أكدوا بأن *E. necatrix*, *E. tenella* هما أكثر الأنواع خطراً وملر اضية في الدجاج[5] ، داء الاكريات يعد من الأمراض المهمة التي تخمج

ISSN:1813 – 1662

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 المُخمج بالطفيلي *Eimeria tenella* ومعالجة الدجاج المخمج بالطفيلي ومعرفة أفضل طريقة لإيصال العلاج من خلال اجراء 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 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 *E. 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 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 ، ووضعت في خلاط كهربائي Blender ، ثم أخذ الخليط ورشح بواسطة مصفاة (منخل) 50مش/سم^2 ، بعدها رشح بواسطة قطعة من قماش التول للتخلص من البقايا العالقة، ثم رسب الخليط بواسطة الطرد المركزي بسرعة 3000دورة/ دقيقة لمدة دقائق ، غسل الراسب بالماء المقطر ورسب 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 ، اخذ 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 °م لمدة 72 ساعة وغطى الدورق بالورق الفضي Aluminum Foil المعقم المثقب الذي يسمح بدخول الأوكسجين الضروري لحدوث عملية التبويغ Sporulation [11] واكمال 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 50فرخاً 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 5×10^4 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 و السادس 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 وتمت كالآتي:

أ- تم توزيع 120 فرخ نوع 308 Ross بصورة عشوائية وبمكررين لكل مكرر 60فرخاً 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) 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 $X1\ 10^4$ أما الجرعة الثالثة فقد أعطيت بعد أسبوعين أيضاً وبمقدار $X1\ 10^3$ والجرعة الرابعة بعد 20 يوم بمقدار $X1\ 10^3$ 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)

1- بعد كسر البيضة وضعت في مصفاة (منخل صغير 50 مش/سم^2) لكي يتم التخلص من أح البيض ، أُخذ المح ووضع 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

ISSN:1813 – 1662

المركزي المبرد Cooling Centrifuge بدرجة حرارة 4م° وبسرعة 13000دورة /دقيقة ولمدة 20دقيقة 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، ذُقي IgY بعد ذلك من الأملاح بواسطة عملية الديلزة Dialysis للمحلول المستحصل عليه ، حيث أُخذ كيس الديلزة 80000- 100000دالتون ، وغُسل بشكل جيد بواسطة 1% حامض الخليك لمدة نصف ساعة بعدها غُسل بالماء المقطر لمدة نصف ساعة أيضاً ، ووضع 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 محلول IgY بعدها من كيس الديلزة (المديلز) وحُفظ في الثلاجة لحين الاستعمال [24، 25، 26، 27] .

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 بجهاز Spectrophotometer

تم قياس الامتصاصية الضوئية على طول موجي 540 نانوميتر لاستخراج التركيز الكلي للبروتين (IgY) الخام حسب طريقة باوريت باستخدام المحاليلالمحضرة من قبل شركة , Linear Chemicals S.L. 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

(1) : المواد و المحاليل المستخدمة:

(أ): محلول الدارئ PBS بتركيز 0.01M واس هيدروجيني 7.2 والمحتوي على 0.85% NaCl و 0.02% Sodium Azide.

(ب): محلول الدكستران الأزرق Blue Dextran 2000 : حضر بحجم 5 ملغم من صبغة الدكستران الأزرق 2000 المجهز من شركة (Pharmacia Fine Chemicals) مذاباً في 5 مللتر محلول الدارئ PBS

(ج): محاليل البروتينات القياسية معلومة الوزن الجزيئي

حضرت محاليل البروتينات القياسية في الجدول (2) والمجهزة من شركة (Pharmacia Fine Chemicals) بتركيز 10ملغم / 10مللتر مذابة بمحلول الدارئ PBS .

(2): تحضير هلام Sephacryl S 300 HR

حضر هلام Sephacryl S 300 HR وفقا لتعليمات الشركة المجهزة (Pharmacia Fine Chemicals) وكذلك [30، 31، 32، 33] 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 وعباً 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 .

(3) تقدير حجم الفراغ للعمود

قدر حجم الفراغ (Vo) Void Volume للعمود باستعمال المحلول المحضر من الدكستران الأزرق، مرر 5 مللتر من هذا المحلول خلال العمود بشكل تدريجي على جدار العمود الداخلي بالقرب من سطح الهلام واسترد محلول الدكستران الأزرق بمحلول الدارئ PBS بجمع 3 مللتر /أنبوب و بسرعة ثابتة قدرها 18 مللتر /ساعة بعد تشكيل جهاز Peristaltic pump وتنظيمه لسحب 3 مل كل 10 دقيقة في أنابيب خاصة Tubes موضوعة في جهاز جامع النماذج Fraction Collector والذي تمت برمجته على التحرك كل 10 دقيقة حركة واحدة ، ثم قيس الامتصاص الضوئي في جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer للأجزاء المنفصلة عند طول موجي قدره 600 نانو ميتر، و قدر حجم الفراغ للعمود من حساب مجموع حجوم الأجزاء المنفصلة عند إمرار محلول الدكستران الأزرق من أول جزء إلى الجزء الذي يمثل اعلى امتصاص لقمة الدكستران الأزرق.

(4) تقدير حجم الاسترداد

قدر حجم الاسترداد (Ve) Elution Volume لسبعة 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 PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (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 التنقية في العينة

تم قياس الامتصاصية الضوئية للنموذج (العينة IgY) على طول موجي 280 نانوميتر(OD_{280} Optical Density of 280 nm) بعد إذابة العينة (IgY) بمحلول PBS ذات رقم هيدروجيني 7.2 ، تم تصفير ومعايرة الجهاز بواسطة محلول PBS ، بعدها تم قياس امتصاصية العينات منذ بداية جمع البيض ولحد نهاية التجربة ، 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] :

IgY Concentration (mg/ml) = OD280 Value x 10 / 1.36

اختبار الانتشار المناعي المزدوج (طريقة اوكتارلوني) Double immunodiffusion Ouchterlony test

1- 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 56 م^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 4ملم 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) ، 2/1، 4/1 ، 8/1 ، 16/1 ، ماء مقطر ، وسحب 10مايكروليتر من المستضد ووضع في الحفرة المركزية .

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

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

4- 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)[34] .

اختبار الانتشار المناعي المفرد (طريقة مانسيني) Single radial immunodiffusion

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

2-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 .

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

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

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

6-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) [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 الحوصلةوا ,عطاء 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 الكلوبيولين المناعي 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 :

العمر باليوم	اللقاحات
2	نيوكاسل سلالة لاسوتا + التهاب الشعب الهوائية المعدي IP (عن طريق الرش الخشن)
9	نيوكاسل سلالة لاسوتا (عن طريق الرش الخشن وماء الشرب)
14	كمبورو سلالة لوكارد (عن طريق ماء الشرب)
17	التهاب الشعب الهوائية المعدي IP (عن طريق الرش الخشن وماء الشرب)
19	كمبورو سلالة لوكارد (عن طريق ماء الشرب)
23	نيوكاسل سلالة لاسوتا (عن طريق الرش)

الآفة العيانية المرضية

تم قتل جميع الأفراخ بعمر 42يوم أي بعد مرور 14 يوم من تجريع الأفراخ وا ,حداث الإصابة والتأكد من وجود أكياس البيض في براز وفرشة الأفراخ بالإضافة إلى تشريح الهلاكات وسجلت النتائج لشدة الآفة العيانية المرضية حسب طريقة الباحث [35 ، 36] .

المقاطع النسيجية

بعد اخذ المقاطع النسيجية من منطقة الأعورين اتبعت معها خطوات التثبيت Fixation ، الغسل Washing ، سحب الماء (الانكاز) Dehydration ، الترويق Clearing ، التشريب Infiltration ، الطمر Embedding ، التقطيع Sectioning ، التصبيغ Staining وتم التلوين بملونة الهيماتوكسلين والايوسين Hematoxylin and Eosin Staining [37،38] .

التحليل الإحصائي

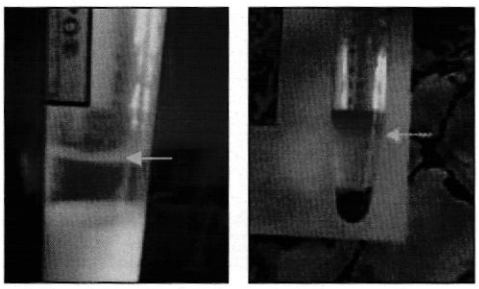
اجري التحليل الإحصائي باتجاه واحد (one way analysis) إذ شمل الاتجاه تأثيرات المعاملات التسعة وبإتباع النموذج الخطي العام General Linear Model وباستعمال برنامج SAS الجاهز الإصدار 9.1 واختبرت الفروقات المعنوية باستعمال اختبار Duncun متعدد الحدود عند مستوى معنوية 0.05 [39] .

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 [40] ، دراسة البحث الحالية أشارت إلى الاستخلاص و النقية و الكشف 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 [41] ، جمعت العينات والبالغة 850عينة 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 [42] ، كذلك أجري غسل و تنقية لأكياس البيض بواسطة هايبوكلورات الصوديوم بنسبة 6% (القاصر) ، وقد ظهرت طبقة طافية من أكياس بيض الطفيلي ، الجدول (3) والشكل (1) .

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*

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) .

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

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 [43] ، 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 (5) يوضح تشخيص أكياس بيض Oocysts للطفيلي *Eimeria tenella*

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

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 [44] ، وعند مزجها مع محلول فرويند بشكله الناقص Freund's Incomplete Adjuvant Form (IFA or

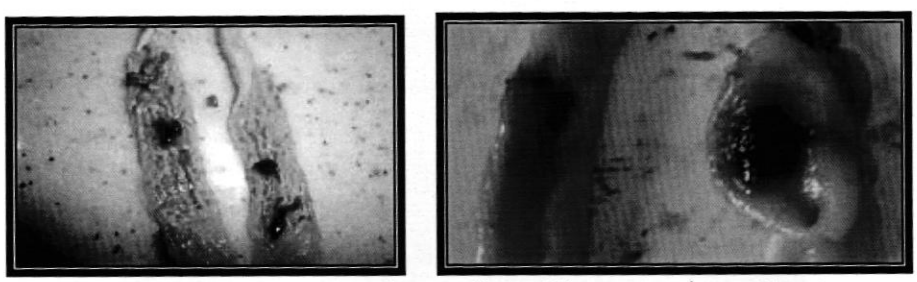
FIA) سوف يحفز مناعة الخلايا في الجسم وبالتالي يحفز إطلاق الكلوبيولينات المناعية immunoglobulin's [43] ، وفي هذه الدراسة تم اختيار كمية مناسبة من أكياس بيض الطفيلي لاستخدامها في التجربة وبتأثير 50% نفوق في الأفراخ المعاملة LD 50 لاستخراج كمية مناسبة من الـ IgY لغرض العلاج ، إذ تم اخذ 120 فرخاً بعمر 30 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
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 [45] ، الجدول (7) والشكل (4) .



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

جدول (7) يوضح التمريرات المتعددة للعزلة المنقاة في أفراخ فروج اللحم للحصول على العترة الضارية .

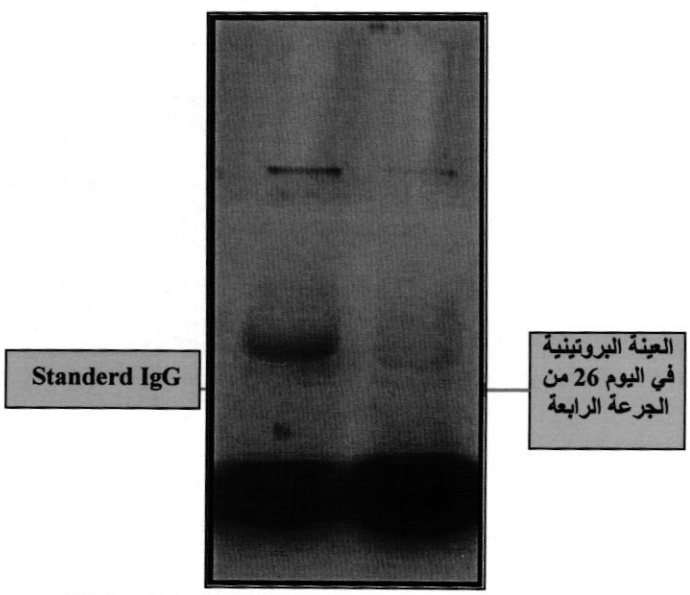
عدد التمريرات للتجربة	عدد الأفراخ الداخلة في التجربة	عمر الأفراخ الداخلة في التجربة	وقت ظهور العلامات السريرية	معدل الهلاكات في المعاملة	نسبة الهلاكات المئوية	اليوم الذي حصلت فيه الهلاكات
التمريرة الأولى	10	14 يوم	في اليوم الرابع	5	%50	في اليوم السادس
التمريرة الثانية	10	21 يوم	في اليوم الرابع	5	%50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

تم حقن الدجاج البياض نوع *Luhman* تحت الجلد وفي عضلة الصدر وعضلة الفخذ وعضلة الرقبة بعد مزجه مع محلول فرويند الناقص وبجرعات متناقصة من المستضد وتركت فواصل زمنية طويلة نسبياً لغرض الحصول على أضداد ذات ألفة مرتفعة [47،46] ، 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 الحيو ان [48a ، 48 b] ، الجدول (8) .

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	$5*10^4$كيس بيضة	أسبوعين	جمعت و أهملت البيوض بعد قياس تركيز البروتين الكلي و IgY فيها
	$1*10^4$كيس بيضة	أسبوعين	جمعت و أهملت البيوض بعد قياس تركيز البروتين الكلي و IgY فيها
	$1*10^3$كيس بيضة	20 يوم	تم جمع البيض في اليوم الثالث بعد الجرعة [43]
	$1*10^3$كيس 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 مستو ى 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) .

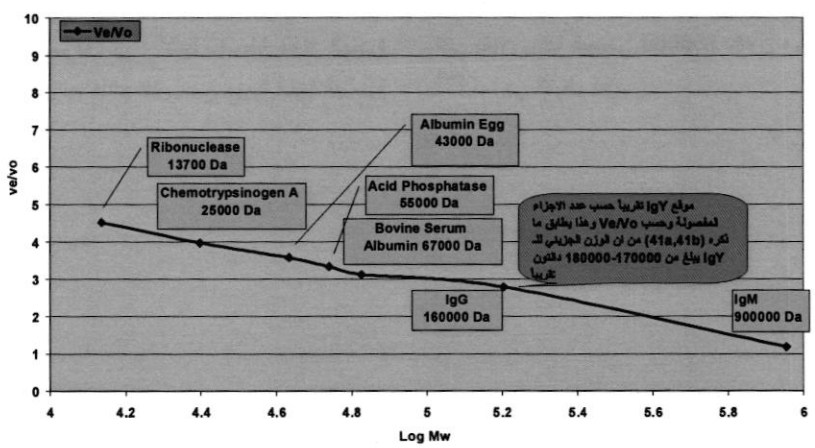


شكل (5) يوضح ترحيل عينات Crude IgY مع Standard IgG باستخدام جهاز الهجرة الكهربائية العمودي Electrophoresis

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 (Vo) Void Volume 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 60–50 ملغم مجفف من مح البيض البالغ تقريباً 15 مللتر [47] ، وقد ذكر [48a , 48b] ان الوزن الجزيئي للـ IgY يبلغ من 180000–170000 دالتون، أما [49] فقد ذكر بان الوزن الجزيئي للـ IgY يبلغ تقريباً 178000 دالتون .

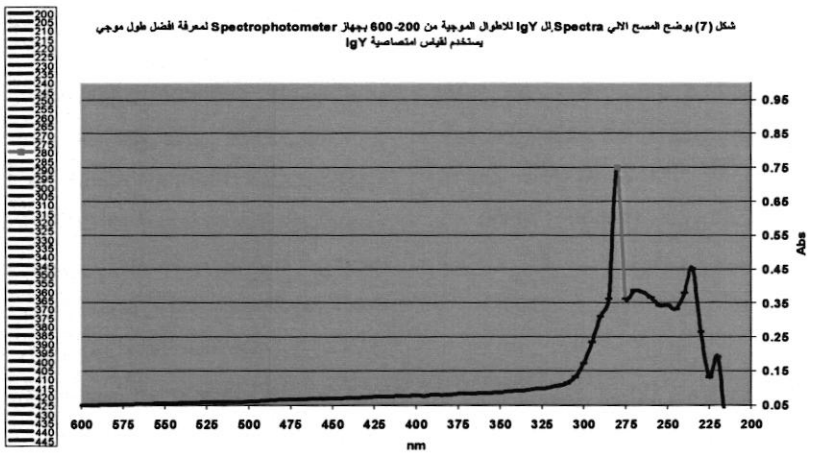
جدول (9) يوضح أعلى امتصاصية للعينات المفصولة بحجم 3مل لكل جزء (tube) وتطبيق المعادلة (Ve/Vo) ولوغارتم الأوزان الجزيئية

العينة Sample	الوزن الجزيئي مقدرة بالدالتون Dalton	لوغاريتم الوزن الجزيئي للعينات القياسية Log Mw	أعلى امتصاصية في الجزء المفصول Fraction No.	مضروب في حجم العينة 3مل	تطبيق المعادلة Ve/Vo واستخراج ناتجها
Blue Dextran 2000	1000000	6	33	99 مل	Ve / Vo (99)
IgM	900000	5.954243	39	117 مل	1.1818182
IgY المفصول	القيمة التقديرية لل 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



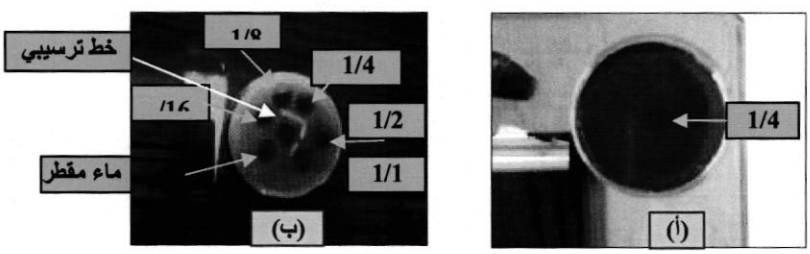
شكل (6) يوضح المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي للـ IgY المفصول بتقنية الترشيح الهلامي

ثم جرى بعد ذلك مسح آلي Spectra لل IgY المفصول باستخدام جهاز المطياف الضوئي لمعرفة أعلى قمة امتصاص نستطيع من خلالها قياس تركيز الـ IgY المعزول كما في الشكل (7) .



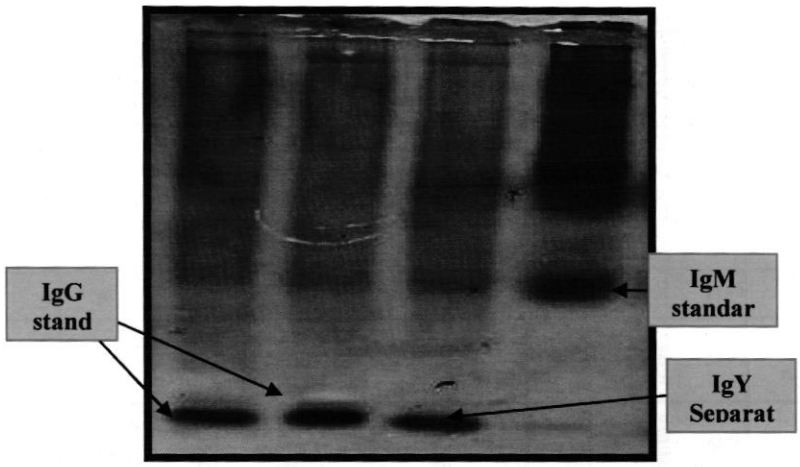
شكل (7) يوضح المسح الالي Spectra لل IgY للاطوال الموجية من 200–600 بجهاز Spectrophotometer لمعرفة افضل طول موجي يستخدم لقياس امتصاصية IgY

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 .



شكل (8) توضح تلازن العترة الضارية مع مستخلص IgY بطريقتي الانتشار الانتشار المناعي المفرد (ب) الانتشار المناعي المزدوج .

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 [50] كما في الشكل (9).



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

من الجدول (10) 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 بين الجدول أن طريقة إعطاء العلاج عن طريق حقن الـ IgY في الغشاء البريتوني وفي صفار البيض الموجود في أعلى منطقة السرة داخل جسم الطير قد خفضت وبشكل ملحوظ عدد أكياس البيض المطروحة خلال حصول الخمج كما حدثت هلاكات في السيطرة الموجبة.

ISSN:1813 – 1662

جدول (10) يوضح نسبة الخمج مع المتوسطات الحسابية وعدد أقماص بيض الطفيلي المطروحة لكل غم/رطل عدد ايام التجربه بعد إعطاء جرعه المعدي واعطاء المعاملات

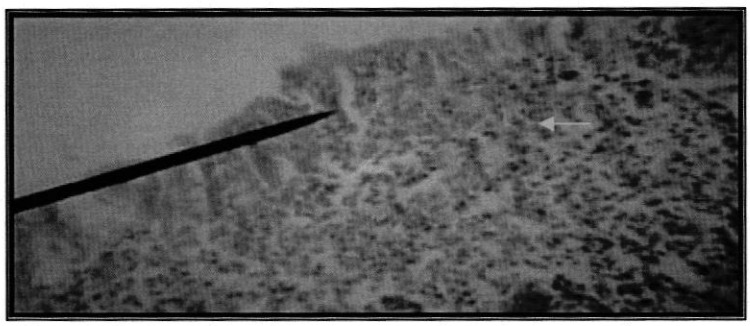
المعاملات																	
سيطرة سالبة	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
سيطرة موجبة	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
معقل حصوصة	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
حقن بالشفار	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
حقن بالبيروكود	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
المدمج بالكصورة	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
حقن تحت الجلد	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
حقن بالعضلة	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
حقن بالوريد	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
متوسط الخطأ القياسي	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
المتوسط العام	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
مستوى المعنوية	غ م	غ م	غ م	غ م	غ م	غ م	غ م	غ م	غ م	غ م	غ م	غ م	غ م	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	0.0001	0.0001	0.0001
	1620322	148861.3	1327790.3	1167990.3	1033771	848570.9	673500	67029	672380.6	391650.9	308334.8	174894.3	125977.7	60077.7	26141.1	0	0
	1620322	148861.3	1327790.3	1167990.3	1033771	848570.9	673500	67029	672380.6	391650.9	308334.8	174894.3	125977.7	60077.7	26141.1	0	0
	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	0.0221	0.0117	غ م	غ م
	736400 A	735066.6 A	701000 A	676133.3 A	591456.6 A	503466.6 A	410666.6 A	379733.3 A	342200 A	317866.6 A	272133.3 A	197333.3 A	97066.7 A	77866.7 A	30933.3 A	23466.7 A	0 A
	75733.3 CD	69266.7 BCD	60800 BC	56666.7 BCD	53500 BC	52266.7 BC	45700 B	39700 B	33666.7 B	28800 B	21333.3 B	19200 B	12133.3 B	6133.3 BC	0 B	0 B	0 A
	40080 CD	38580 CD	36960 BC	34760 D	32800 BC	29180 BC	26880 B	21760 B	16620 B	9540 B	6656 B	2316 B	1956 B	0 C	0 B	0 B	0 A
	67766.7 CD	66666.7 BCD	56666.7 BC	49800 CD	45866.7 BC	39486.7 BC	32000 B	28800 B	25500 B	21333.3 B	15966.7 B	12200 B	9133.3 B	3200 BC	1066.7 B	0 B	0 A
	195566.7 BC	163666.7 BC	168833.3 B	140200 BC	126600 B	109900 B	85633.3 B	75266.7 B	59066.7 B	49333.3 B	34966.7 B	26833.3 B	16266.7 B	11700 BC	5600 B	2866.7 B	0 A
	204233.3 BC	190566.7 BC	161133.3 B	145600 BC	125566.7 B	104833.3 B	81033.3 B	60200 B	47500 B	36333.3 B	28466.7 B	22133.3 B	14366.7 B	10000 BC	5146.7 B	650 B	0 A
	266533.3 B	214500 B	177633.3 B	159900 B	126766.7 B	108466.7 B	93800 B	75633.3 B	63666.7 B	38666.7 B	28500 B	23100 B	16700 B	14000 B	6066.7 B	0 B	0 A
	151100 BC	150300 BCD	147533.3 B	135033.3 BC	122400 B	101533.3 B	83366.7 B	66400 B	52066.7 B	33833.3 B	22100 B	13866.7 B	9900 B	6346.7 BC	2933.3 B	0 B	0 A
	96072.4	89566.7	80031.4	67328.8	56133.8	51600	61122.1	60771.3	56782.2	49057.5	29196.1	34782.5	12101.9	7391.3	10156.5	7403.2	0
	178754.8	162032.3	148861.3	132790.3	116790.3	103371	84870.9	73500	67029	67280.6	39150.9	30834.8	17489.3	12597.7	6007.7	2614.1	0

وهذا يطابق ما ذكره [52،51] 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 التخلص من الإصابة ، وتبين إن أعلى نسبة مطروحة من أعداد أكياس البيض مع البراز كانت في السيطرة الموجبة إذ بلغت في اليوم العشرون بعد المعاملة 786400 كيس بيض ، فقد أشار [53] إلى أن طفيلي الايميريا بأنواعه المتواجد في فراغ القناة الهضمية (Lumen) يؤدي إلى سوء هضم العناصر الغذائية (Malabsorption) وقد يرجع ذلك إلى انخفاض نشاط الإنزيم المفرز من Brush border وهذا بدوره يؤدي إلى إضعاف مناعة الجسم ويقلل من الآلية الدفاعية وتقليل كفاءتها مما يتيح للطفيلي التحول والتكاثر داخل الخلايا الطلائية وطرح أعداد اكبر من أكياس البيض مع البراز ، وأكد [54] إن الإصابة بالتتلا تؤدي إلى خفض نسبة ارتفاع الزغابات مقارنة مع سمك الطبقة المخاطية بشكل كبير في ألاثني عشري مما يؤدى إلى انخفاض كفاءة امتصاص الأحماض الامينية في الأفراخ المصابة مقارنة بغير المصابة ولاحظوا حدوث زيادة في تركيز البروتين الكلي في بلازما الطيور غير المصابة بعد 1.5 – 2.5 ساعة بينما تأخر ارتفاع تركيز البروتين الكلي في بلازما الطيور المصابة إلى 26 ساعة وأشاروا إلى أن بطئ ارتفاع بروتين البلازما بعد الإصابة بالايميريا يعد دليلا على حالة سوء الامتصاص والذي يؤدي إلى تموت القناة الهضمية مما يؤدي إلى زيادة الأحماض الامينية المطروحة في الفضلات وهذا يشير أما إلى سوء امتصاص الأحماض الامينية او نضوح الأحماض الامينية الى القناة الهضمية نتيجة النزف في الأمعاء كذلك نتيجة قصر الزغابات مع قلة عمق الجزء الغدي للأنسجة مؤديا إلى قلة نسبة طول الزغابات إلى سمك النسيج المخاطي وهذه التغيرات تتزامن مع وقت وموقع فعالية الطفيلي ويظهر كأساس للتدمير الفسلجي ، بينما كانت اقل نسبة لأكياس البيض في معاملة إعطاء IgYعن طريق كيس الصفار إذ بلغت 40080 كيس بيض ، يليها طريقة إعطاء العلاج في الغشاء البريتوني 67766.7 كيس بيض ، وربما يكون السبب في تقليل نسبة أكياس البيض المطروحة إلى طريقة إعطاء العلاج حيث إن إعطاء العلاج بالغشاء البريتوني أو في كيس الصفار ربما تكون اقرب نقطة إلى منطقة الإصابة وأفضل مكان لدخول العلاج ووصوله في الوقت المناسب إلى المنطقة المصابة وبالتالي يحصل التفاعل بين الضد والمستضد لتكوين معقد (انتجين – كلويبولين نوعي) ويشغل مكان المعينات المستضدية على سطح الطفيلي فيساعد على ايقاف نمو الطفيلي داخل خلايا المضيف بسبب عدم ارتباطه مع الخلايا الطلائية للمضيف او يُبطأ من استمراريته في إصابة خلايا جديدة أو يجعله كعلامة Marker للخلايا الملتهمة الكبيرة Macrophage ، او ربما يكون السبب في ان IgY يعتبر مكمل غذائي Dietary supplement في منح الحصانة السلبية Conferring passive immunity ضد *E. tenella* ومؤازرة الجهاز المناعي وتطوير آلية الدفاع في الجسم [48a] ، وقد لاحظ [55] عند قيامهم بدراسة ايض الطاقة والبروتين لفروج اللحم المصاب بالـ *Eimeria acervulina* او *Eimeria tenella* الى ان كفاءة الاستفادة من الطاقة المتأيضة (Efficiency of utilization of ME) للطيور المصابة تبلغ 0.43 خلال اول ثمانية أيام بعد إصابة التحدي وبلغت 0.52 في مجموعة الطيور غير المصابة وهذا يساعد الجهاز المناعي في زيادة كفاءته الدفاعية ضد الاجسام الغريبة ، او قد يعود السبب الى ان عملية الحفاظ على الاغشية المخاطية لجدار الأمعاء بسبب إعطاء العلاج في الوقت المناسب او وصولة بطريقة مناسبة قد يعمل في الحفاظ على الغدد الفارزة للهرمونات المعوية والتي تعد من اكبر الغدد الصماء في الجسم وهذه الهرمونات لها دور كبير في انتظام حركة الأمعاء وفعالية الإنزيمات الهاضمة والذي ينعكس ايجابيا على الأداء الإنتاجي .

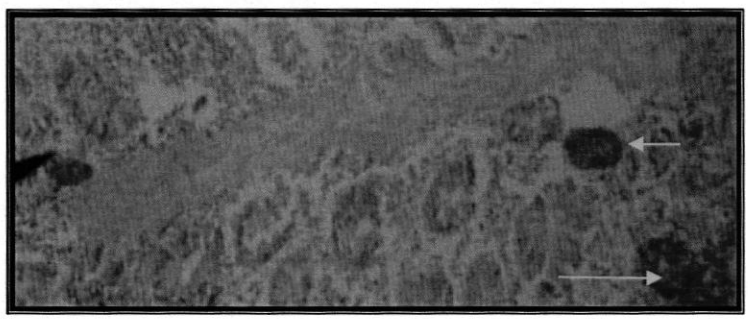
ان كثير من الباحثين قد أوضحوا بان العلاج بالكلوبيولينات المناعية تكون غير ضارة من الناحية الصحية وكذلك فان الطفيليات او البكتريا او الفايروسات لم يثُبت انها قد طورت مقاومة ضد هذا العلاج [56،57] ، إن استخدام إستراتيجية التمنيع المنفعل (المناعة السالبة Passive Immunity) باستخدام المناعة المفرطة Hyper immunity للأجسام المناعية IgY المستخلصة من صفار البيض Egg Yolk والمفرزة ضد نوعية الطفيلي *Eimeria tenella* تعتبر واحدة من الطرق الجيدة لمكافحة داء الاكريات بدون الحاق الضرر بالجسم إضافة إلى عدم ظهور صفة المقاومة من قبل الطفيلي لنوعية العلاج [48a,b] .

ان التغيرات النسجية للأعورين في المعاملة الثانية (سيطرة موجبة) والتي خمجت بالطفيلي أظهرت توسف في الخلايا الظهارية وحدوث النخر وبالتالي انفصالها عن الطبقة المخاطية وسقوطها في تجويف الأعورين ، وان ظهور الآفات النسجية ما هو الا استجابة التهابية للجراثيم والطفيلي التي تتموضع في ظهارة الأعورين فتعمل على تحفيز الجذب الكيميائي للخلايا البلعمية الى موقع الخمج [58] ، فضلاً عن ان تحفيز الخلايا البلعمية نتيجة المسببات المرضية تساهم في تحرير الخمائر الحالة للنسيج مما يسبب حدوث النخر التجلطي [20] . شكل (10)

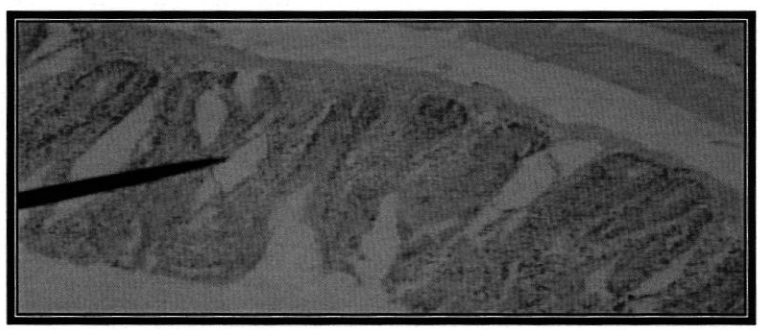
كما تميزت التغييرات النسيجية للأعورين في أفراخ المجموعة الثانية والسادسة والسابعة والمعاملة الثامنة والتاسعة بوجود المراحل التطورية المختلفة للطفيلي اذ لوحظ وجود إعداد من المفلوقات الناضجة وغير الناضجة وكذلك في الطبقة المخاطية وتحت المخاطية مع ملاحظة إعداد كبيرة من الأمشاج والتي تمثل المراحل التطورية للطفيلي نتيجة غزو هذا الطفيلي لنسيج الأعورين والذي يسبب تخريب الطبقات المخاطية وتحت المخاطية [60، 59] كما في الأشكال (11)(12)(13) .



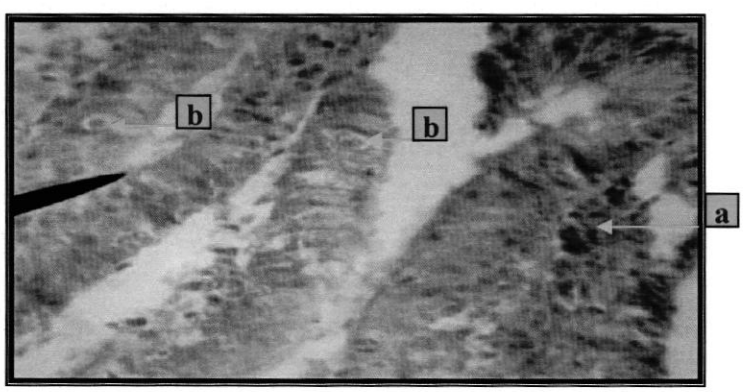
شكل (10) مقطع نسيجي لأعورين المعاملة الثانية يلاحظ ارتشاح وانتشار الخلايا الالتهابية ، الصبغة H&E(40x)



شكل (11) مقطع نسيجي للأعورين يلاحظ وجود الجيل الثاني من المفلوقات والأمشاج ، الصبغة H&E(40x)



شكل (12) مقطع نسيجي للأعورين يلاحظ وجود ارتشاح الخلايا الالتهابية مع تحلل النسيج ، الصبغة H&E(40x)



شكل (13) مقطع نسيجي للأعورين يلاحظ وجود أعداد كبيرة من الأمشاج (a) وأكياس البيض (b) في الخلايا الظهارية لغدد ليبركن ، الصبغة H&E(40x)

و عند إجراء التشريح وجدت شدة الآفة النسيجية بشكل واضح في الأعورين تمثلت بتثخن جدار الأعورين مع وجود الدم المتخثر في محتوياته نتيجة التخديش المستمر في نسيج الأعورين من قبل الطفيلي مما يتسبب في إحداث نزف مستمر مع تثخن جدار الأعورين وكانت

ISSN:1813 – 1662

شدة الآفة +4 في المعاملة الثانية (سيطرة موجبة) ومعاملة الحقن بالعضلة (المعاملة الثامنة) ومعاملة الحقن تحت الجلد (السابعة) ومعاملة العلاج بالكبسولة (السادسة) ومعاملة الحقن بالوريد (التاسعة) في نهاية التجربة ، او ربما يكون السبب هو الإصابة المشتركة بجرثومة السالمونيلا والطفيلي معاً مما يؤدي الى ازدياد نسبة الخمج [61a,b ; 62] . الشكل (4)

لم تسجل أفراخ السيطرة السالبة وبعض المعاملات مثل معاملة الحقن بالغشاء البريتوني والحقن بالصفار أي تغييرات نسيجية واضحة في منطقة الأعورين وان الارتشاح للخلايا اللمفية مع فرط التنسج في الطبقة المخاطية وتحت المخاطية في المعاملات الأخرى دليل على ان الخلايا اللمفية نوع T والمسؤولة عن المناعة الخلوية تؤثر بصورة مباشرة على البويغات داخل الخلايا الظهارية [64،63] كذلك الخلايا اللمفاوية المساعدة بنوعيها Th1 , Th2 تقوم بإفراز المدورات اللمفية بعد تفاعلها مع المستضد الخاص Ag وهذه المدورات لها تأثير مباشر على تطور الطفيلي في المراحل الأولى للإصابة والسيطرة على إنتاج الأضداد [65] وايضاً فان الخلايا الكاسية والخلايا احادية النواة والمتغايرات لها تأثير مهم ضد البويغات الغازية للطبقة الظهارية وبذلك فان الاستجابة المناعية للخمج تعتمد على زيادة تركيز هذه الخلايا [66] ، ظهرت العلامات السريرية ومنها الاسهال المدمم نتيجة لاختراق البويغات للنسيج الظهاري للأعورين عند إكمال دورة حياة الطفيلي داخل الجسم وهذا يتفق مع [67] .

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 عبد الوهاب (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, 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.

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 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.

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- Jonhson, J.& Ried, W.M.(1970). Anticoccidial drugs lesions scoring techniques in battery & floor_pen experiments with chickens .Exp. Parasitol. 28: 30_36.

36- Reid, W. M.; Long, P.; McDouglod, L. R. (1984). "Coccidiosis: In Disease of Poultry". 3rd edn. by: Hofstad, Lowa State University press, pp. 692 –716 .

37- Bancroft, J.D. and Stevens, A.A. (1975). Haematoxylin and eosin and the applications of haematoxylins. In: J.D. Bancroft, and A.A. Stevens (eds). Histopathlogical stain and their diagnostic uses. Churchill Livingston, Edinburge, London . pp:1-11.

38- Humason, G.L. (1967). Animal Tissue Techniques. 2nd.edn., W.H. Freeman Company, San Francisco.

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

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

41- الشيخلي، فؤاد إبراهيم. (1982). أمراض الدواجن. مطبعة جامعة الموصل. نينوى. العراق.

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

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

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

45- 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.

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

47- 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, 200, 82:1554-1558.

48-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. 48-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. (2009b). Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. Poultry Science 88:562–566.

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

enteritidis infection in Leghorn chicks . *Poult. Sci.*, 73(3), 396 – 401.

60- Baba, E. ; Yaono, M. ; Fukata, T. ; Arakawa, A. (1985). Effect of *Salmonella typhimurium, S . agona , S. enteritidis* or *S.infantis* of chicks with caecal coccidiosis . *Br. Poult Sci.* 26(4) , 505 – 11 .

61- Qin, Z. R.; Fukata, T.; Baba, E.; Arakawa, A. (1995a). Effect of lactose and lactobacillus acidophilus on the colonization of *Salmonella enteritidis* in chicks concurrently infected with *Eimeria tenella . Avian Dis.* , 39 (3) , 548 - 553 .

61-Qin, Z. R. ; Fukata, T. ; Baba, E. ; Arakawa, A. (1995b). Effect of *Eimeria tenella* infection on *Salmonella enteritidis* infection in chickens . *Polut. Sci.*, 74(1) , 1- 7 .

62- Ventzislav, K. (2005) . Effect of an experimental *Eimeria tenella* invasion upon an artificial *Salmonella Typhimurium* infection in broiler-chickens, *veterinary Archeives*, 75(4), 349-357.

63- 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.

64- McDonald, V.(1999). Gut interaepithelial lymphcytes & immunity to coccidian. J. Parasit. 15:483_487.

65- Choi,K.D.&Lillehoj,H.S.(2000).Role of chicken Il_2on gamma delta T_cell & Eimeria acervulina induced changes in intestinal Il_2 mRNA expression & gamma delta T_cells. Veterinary immunology Immuno. 73:309_321.

66- Yun,C.H.;Lillehoj,H.G. & Choi K.D. (2000). Chicken IFN_ gamma monoclonal antibodies & their application in Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay. Vet. Immmuno. Immunopathol. 73:297_308.

67- Kazumi, S.; Raymond, H.; Fetterer, H. L.; Satomi, M.; Constantin, C. C.; Makoto, M. Hiroyuki, T.; Eiichiroh, B. (2008). Characterization of monoclonal antibodies that recognize the *Eimeria tenella* microneme protein MIC2. J. Parasitology. 94 (6), 1432-1434.

50- 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.

51-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.

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

53- Walk, C. L.; A. J. Cowieson; J. C. Remus; C. L. Novak and A. P. McElroy. 2011. Effects of dietary enzymes on performance and intestinal goblet cell number of broilers exposed to live coccidian oocyst vaccine. J. Poultry Sci.,90:91-98.

54- Joyner, L. P.;D. S. P. Patterson; S. Berrett; C. D. H. Boarer; F. H. Cheong and C. C. Norton. 1975. Amino acid malabsorption and intestinal leakage of plasma proteins in young chicks infected with *Eimeria acervulina*. Avian Pathology, 4: 17-33.

.55- Takhar, B. S. and D. J. Farrell. 1979. Energy and nitrogen metabolism of chicken infected with either *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella*. Br. Poult. Sci. 20, 197 – 211.

56- Mojca Narat .(2003). Production of Antibodies in Chickens. University of Ljubljana, *Food Technol. Biotechnol. 41* (3) 259–267 .

57- 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.

58- Henderson, S.; Bounous, D.; Lee, M. (1999). Early events in the pathogenesis of avian *Salmonellosis*. *Infec. Imm*, 3580 – 3586.

59- Tellez, G.; Kogut, M.; Hargis, B. (1994). *Eimeria tenella* or *Eimeria adenoeides* of morphological changes and increased resistance to *Salmonella*

Histological study the changes in the ceacal of experimental infected chickens by *Eimeria tenella* parasite post treatment with immunoglobulin IgY

Thaer A. S.[1], Shehab A. ALjebory[2] , Tawfiq A. AL-Aloosi[3]

[1] College of Scince , Al- Anbar University , Iraq
[2] College of Education, Tikrit University, Tikrit , Iraq
[3] College of Veterinary Medicine , Tikrit University, Tikrit , Iraq

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 as well as by Baghdad University / College of Veterinary Medicine / Department of Parasitology , 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 Determination 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 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.