المقدمة

Introduction

المُقدّمة Introduction:

يؤدي الازدياد الهائل لعدد السكان في العالم إلى ارتفاع حاجة المجتمعات البشرية للمزيد من المنتجات واللحوم الحيوانية، وتعد لحوم الأرانب من المصادر الهامة في هذا المجال، ويمكن أن تقوم بدور رديف لمصادر اللحوم التقليدية كالدجاج والأغنام والأبقار.

وكما هو معروف تعد الأرانب من الحيوانات المخبرية الهامة في دراسات الأمراض والمناعة وبالتالي إنتاج الكثير من اللقاحات والأمصال والمواد واللوازم المخبرية، بالإضافة لما سبق تُربى الأرانب لأهداف اقتصاديّة متنوعة كإنتاج الفرو واللحم، فهي حيوانات فعالة في تحويل المصادر النباتية وبقايا المزروعات إلى بروتين حيواني عالي الجودة، وتتميز أيضاً بسرعة تكاثرها الكبيرة. وتختلف كثافة تربية الأرانب والاعتماد عليها من بلد لآخر فهي متقدمة ومتطورة في دول كالهند ومصر في حين مازالت مهملة في العديد من البلدان الأخرى (Tripathi *et al.*, 1995).

إلا أن تربية الأرانب لا تزال تواجه العديد من المشكلات الصحية والمسببات المرضية المختلفة والتي تؤثر سلباً في إنتاجيتها ولا سيما في حالات التربية المكثفة، إذ تُعد عاملاً مساعداً يرفع من إمكانية انتقال الأخماج المختلفة اليها. وتشكل الأمراض الطفيليّة جانباً رئيساً في هذا الإطار سواء الأوالـيّ منها أو الديدان ومفصليات الأرجل. ويعد الخمج الطفيلي بالأيمريّة الستيداويّة Eimeria stiedae المسببة لداء الأكريات (Coccidiosis) من الإصابات الشائعة عند الأرانب والتي تسبب النفوق بنسبٍ مرتفعة، ولابد من الإشارة هنا إلى أن هذا النوع من الآيميريات يصيب كبد الأرانب.

يُعد داء الأكريات واحداً من أهم المشاكل الصحية التي تعاني منها مزارع تربية الأرانب، حيث يرتفع معدل النفوق والإصابة بهذا المرض وبشكل خاص في الأجواء الرطبة أو بعد الفصل الماطر في بعض البلدان (Wang and Tsai,1991)، لا تظهر أعراض المرض عادةً على الأرانب الكبيرة فهي تحمل المسبب وتنشره، وتُشكل مصدراً محتملاً لإصابة الأرانب الفتية التي غالباً ما تكون أعراض وعواقب المرض خطيرةً عندها وقد تنتهي بالنفوق (Wang and Tsai, 1991).

وقد تم في العمل ولأول مرة في سورية الكشف عن الأوزان الجزيئيّة لأهم المستضدّات ذات القدرة الاستمناعية عند الأيمريّة الستيداويّة من عُزلة محلية، وتم إحصاء البيوض المتكيّسة في البراز الناتجة عن الخمج التجريبي بهذا الطفيلي يومياً، وذلك بهدف إعطاء صورة واضحة عن المرض وتقدير أهميته الحقلية في إعاقة تربية الأرانب والتي باتت تُعد من مصادر البروتين الحيواني المهمة والبديلة، ومن ثم محاولة وضع بعض المقترحات والتوصيات اللازمة للحد من انتشار العدوى الطفيليّة وقطع دورة الحياة والحد من انتشار المرض مما يسهم في تحسين نظم ووسائل تربية الأرانب.

ونظراً لعدم وجود دراسات حول هذا الطفيلي في سورية وجدنا أنه من الواجب إجراء هذه الدراسة التي ستُشكل لبنة هامة لدراسات قادمة تساهم في الحد من تأثيرات هذا المرض الطفيلي، ***لذلك هدفت هذه الدراسة إلى:***

1- عزل الأيمريّة الستيداويّة وإكثارها في الأرانب السليمة وكذلك المثبطة مناعيا، والمقارنة أيهما أنسب لعملية الإكثار.

2- تحديد الكتلة الجزيئيّة النسبيّة لمستضدّات البيوض المتكيّسة المتبوّغة، والحيوانات البوغيّة.

3- تحديد أهم المستضدّات ذات القدرة الاستمناعيّة والمسؤولة عن تكوين الأضداد بعد الخمج.

-الفصل الأول-

سرد الأبحاث

Literature Review

سرد الأبحاث Literature Review

1- وصفٌ وتعريف Definition and Description:

تُعد الإصابة بالأيمريّة المسببة لداء الأكريات مرضاً طفيليّاً منتشراً يصيب الأرانب مسبّباً تدهوراً خطيراً في النمو وفي معدّل الاستفادة من العلف (Abdel-Megeed *et al*., 2005) ويُسبّب نسبة نفوق مرتفعة (El-Akabawy *et al*., 2004 ; Darwish and Golemansky, 1991)، وخسائر اقتصادية في التربية عند المؤسسات التي تعاني من سوء تدبير مرافق الصَّرف الصحي (Al-Quraishy, 2012، Tehrani *et al*., 2013).

ويعدّ داء الأكريات مرضاً طفيلياً تسببه أوالي Protozoa وحيدة المثوى تسمى بالأيمريّات وتتبع لتحت شعبة معقدات القمة Subphylum Apicomplexa صنف الأكريات Class Coccidia تحت صنف Subclass Coccidiasina رتبة الأكريات الحقيقية Order Eucoccidiida تحت رتبة الأيمريّة Suborder Eimeriina عائلة الأيمريّة Family Eimeriidae جنس الأيمريّة Genus Eimeria (Schnieder and Tenter, 2006). وقد وُصفت البيوض المتكيّسة للأيميريّة الستيداويّة في البداية من قبل عالم الأحياء الهولندي (Antoni Van Leeuwenhoek) في القنوات الصّفْراويّة عام 1674 (Donald *et al*., 2010)، والتي تُسمّى في وقتنا الحالي الأيمريّة الستيداويّة.

سُجّلت الإصابة بالأيمريّة عند الأرانب في جميع أنحاء العالم (Satyanarayana *et al*., 1982)، وبلغت نسبة الإصابة في سورية 4% في عام 1991 (Darwish and Golemansky, 1991). وتشير الأبحاث إلى ندرة الدراسات حول الأيمريّة الستيداويّة في الكبد مثلما هو الحال عند الأنواع الأخرى التي تصيب الأرانب، ويذكر هنا أنَّ الأيمريّة الستيداويّة (Eimeria stiedae) هي واحد من أكثر أنواع الأيمريّة إمراضية عند الأرانب حيث تسبب ارتفاعاً في نسب النفوق لتصل إلى 100% (Darwish and Golemansky, 1991).

وعلى الرغم من قلة الدراسات والبيانات الإحصائية المتعلقة بالأيمريّة الستيداويّة ونسب انتشارها حول العالم، غير أنه تم تسجيل الإصابة بالأيمريّة الستيداويّة عند الأرانب في جميع أنحاء العالم، مع اختلاف نسبة الإصابة باختلاف الموقع الجغرافي، ففي دراسة إحصائية أُجريت عام 1930م في كاليفورنيا على حوالي 2000 أرنب، تبين بعد الفحص أن نسبة الإصابة بلغت 9% من الأرانب المدروسة، أما نسبة النفوق الناتجة عن الإصابة بالأيمريّة الستيداويّة فقد بلغت نحو 5% من عدد حالات النفوق الكلية المسجلة (Meek,1943 ; المحمد،2017).

في دراسة مشابهة أُجريَت على عدد من الأرانب في كلٍّ من فرنسا والبرازيل، تبين أن نسبة النفوق نتيجة الإصابة بالأيمريّة الستيداويّة بلغت نحو 22.5% من حالات النفوق الكليّة عند الأرانب المدروسة، وكانت النسبة في البرازيل وحدها 48% (Varga,1982).

وفي اختبارات تجريبية أُجريت على مجموعة من الأرانب تم فيها إحداث الخمج التجريبي بالأيمريّة الستيداويّة عن طريق الفم بجرعة قدرها (10000−100000) بيضة مُتكيّسة مُتبوّغة، بلغت نسبة النفوق 40% و 80% على التوالي (Percy and Barthold,1993). أما الأرانب التي بقيت على قيد الحياة بعد إحداث الخمج التجريبي لديها أظهرت بعض الأعراض التي تمثلت بانخفاض في الوزن، واضطراب في استقلاب الفيتامينات الذوّابة بالدهون، وقلة الحيوية (Darzi *et al*.,2003)، وهذا ما أدى إلى حدوث خسائر اقتصادية هائلة تمثلت بتأخر النمو، وتراجع الوزن، وارتفاع معدلات الإصابة والنفوق (Cowan,1983). وفي كينيا دُرِسَ داء الأكرية الكبدية عند مجموعة من الأرانب في إحدى مزارع تربية الأرانب، وتبين أن 83% من معدلات الإصابة بين الأرانب كانت ناتجة عن الإصابة بداء الأكرية، وأن 69% من معدلات النفوق كانت ناتجة عن الإصابة بداء الأكرية من معدل النفوق الكلي للأرانب المدروسة (Hungu *et al*.,2013).

ينتقل الخمج بالأيمريّة بنوعيها الكبديَّة والمعويَّة عن طريق ابتلاع العلف والماء الملوّثَين بالبيوض المتكيّسة المتبوّغة (Oncel *et al*., 2011)، وتتعلق شدة الإصابة بالأيمريّة بجرعة البيوض المتكيّسة المأخوذة عن طريق الفم (Harcourt–Brown, 2002).

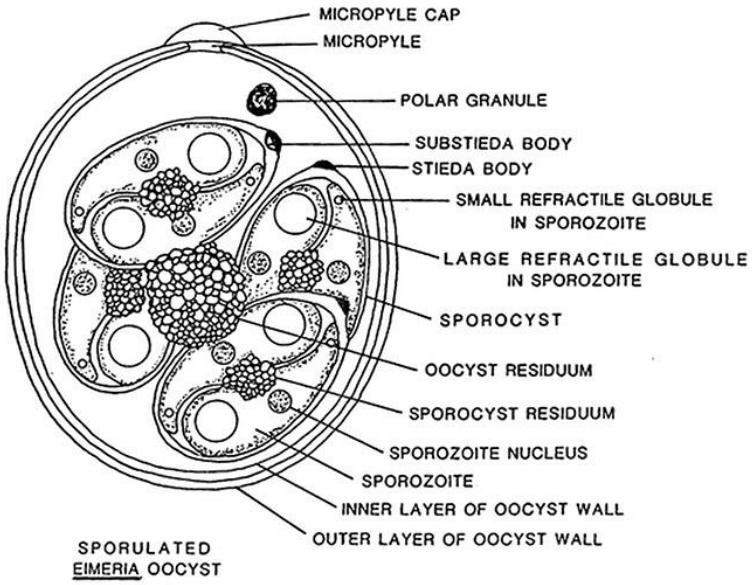
ويعد نوع الأيمريّة الستيداويّة (E. Stiedae) العامل المسبب للشكل الكبدي (Coudert *et al*., 1995)، وهو من أكثر الأنواع إمراضيّة في الأرانب مسبّبة إصابة شديدة وزيادة معدل الوفيات (EL-Akabawy *et al*., 2004 ;Hauptman *et al*., 2001)، وهي تتطفل ضمن الخلايا الظهارية للقنوات الصّفْراويّة مسببة تلف الكبد الحاد وخسائر اقتصاديّة كبيرة (Zerrin and Yesari, 2006).

أظهر الفحص المجهري للبيوض المتكيّسة للأيميريّة الستيداويّة أنها مكونة من طبقتين داخليّة وخارجيّة، تأخذ الشكل البيضي، ويتلون جدارها بلون أصفر وقرنفلي، وتتراوح أبعادها بين 16–25 ميكرون عرضاً، و28–40 ميكرون طولاً، وهي ذات نهاية مسطحة وبُويب، وتحتوي حبيبات لاقطبية وتحتوي على خليّة واحدة تسمى بمولدة الأبواغ Sporont، بينما تضم البيوض المتكيّسة المتبوّغة أربعة من الكيسات البوغيّة Sporocysts ويضم كل كيس بوغي حيوانيين بوغيين Sporozoites، وذلك كما هو الحال في البنية التركيبية لأنواع الأيمريّة عموماً

(khider *et al* ., 2015 ;Schimidt,1988 ;Gomez-Bautista *et al*.,1987)

الشكل (1) البيوض المتكيّسة غير المتبوّغة لطفيلي الأيمريّة الستيداويّة

/http://dora.missouri.edu/rabbits/hepatic-coccidia



الشكل(2) البنية الشكلية للبيضة المتكيّسة المتبوّغة للأيمريّة

http://www.encyclopediaofarkansas.net/media/gallery/Document/Coccidia2_f.jpg

2- قابليَّة الإصابة:

أشارت معظم الأبحاث والدراسات إلى وجود علاقة ارتباط قويّة بين الإصابة بالأيمريّة وعمر الثوي، حيث تقل نسبة الإصابة مع ازدياد عمر الثوي (Wang and Tasi, 1991). حيث تعد الحيوانات الفتيّة أكثر حساسية للإصابة بالأيمريّة، بينما تكون الحيوانات البالغة المصابة حاملة للخمج فقط (Abed and Yakoob, 2013)، كذلك أثبت (Al-Mathal, 2008) أنَّ أعلى نسبة إصابة بالأيمريّة الستيداويّة عند الأرانب تحدث بعمر(1-2 شهر)، كما أكد الأخير أيضاً على عدم وجود فروق معنويّة في نسبة الإصابة مابين الذكور والإناث.

تحدث الإصابة بالأيمريّة بنوعيها المعويَّة والكبديَّة بشكل رئيس في الأرانب اليافعة الصغيرة (المفطومة حديثاً)، ولا تتأثر نسبة الإصابة بالعرق أو الجنس (Pakandl *et al*., 2008; Al-Mathal, 2010; Papeschi *et al*., 2013; Tehrani *et al*., 2013).

تؤدي إصابة الأرانب الصغيرة بالأيمريّة الستيداويّة إلى إصابة كبديّة شديدة تنتهي بالموت (Yakhchali and Tehrani, 2007)، بينما تصبح الأرانب البالغة المصابة حاملة للمرض فقط دون ظهور أعراض (AL- Naimi *et al*., 2012)، ويعود السبب في ذلك عند الأرانب الصغيرة إلى ضعف المناعة ونقص التغذية وسوء الوضع الصحي (Erdogmus and Eroksuz, 2006). وأظهرت الدراسات الوبائيّة المتعلقة بانتشار داء الأكرية عند الأرانب في كل من أستراليا و نيوزيلاندا وبريطانيا أنّ الإصابة كانت أشد عند صغارها والتي لا تكون مناعتها متطوّرة ضد الإصابات والأمراض (Oppelt *et al*.,2010).

في دراسة أُجريت في أحد مزارع تربية الأرانب في أستراليا وُجدَ فيها أن داء الأكرية أدى لحدوث النفوق عند الأرانب بنسبة 8-10 % خلال عامين متتاليين (Oppelt *et al*.,2010)، وأشار (Hobbs *et al*.,1999) إلى أن الإصابة بداء الأكرية لم تُظهِر معدل نفوق هام عند الأرانب البريّة ، وفي تجربة قام بها (Henning *et al*.,2008) في إحدى مزارع تربية الأرانب في نيوزيلاندا تبين أن نسبة النفوق عند أرانب المزرعة بلغت 1% عند عمر فوق 3 سنوات، وقد أظهرت الأرانب المصابة بالأيمريّة الستيداويّة أظهرت زيادة في وزن الكبد بنسبة 5.6 % مقارنة مع السليمة (Lello *et al*.,2005).

تُعتبر العدوى المختلطة بالأيمريّات شائعة الحدوث بشكل عام، اذ إنه من الممكن أن تصاب الأرانب بعدة أنواع من الأيمريّات المعويّة معاً (Toula and Ramadan,1998). وبحسب دراسة قام بها (Levine,1985)، بلغت نسبة إصابة الأرانب 86% في حالات الإصابة بأخماج مختلطة بالأيمريّات. ويُعزى اختلاف معدل انتشار داء الأكرية عند الأرانب إلى العديد من العوامل وأهمها المنطقة

الجغرافية، والاختلاف في البيئة الزراعية، والظروف البيئية والمناخية المحيطة ولاسيما الرطوبة ودرجات الحرارة (Harcourt-Brown,2002).

وذكرت بعض الدراسات أنّ البيوض المتكيّسة (Oocysts) يمكن أن تبقى حية وقادرة على الخمج في الوسط الخارجي لفترة زمنية طويلة، وذلك في البيئة الرطبة، لكنها تبقى عرضة لظروف الجفاف، ويعتبر تناول الفرشة أو البراز أحد العادات السيئة التي تقوم بها الأرانب عند نقص الفيتامينات والمعادن في أجسامها، مما يساهم في انتشار العدوى في المزرعة وانتقال الخمج من الأرانب المصابة إلى الأرانب السليمة (Harcourt-Brown,2002). ويمكن أن تؤدي الإصابة لظهور الأعراض الإكلينيكية وخاصة عند صغار الأرانب، أما الحيوانات البالغة فتعتبر غالباً حاملة للمرض (Coudert *et al.*,1995).

إنّ الإصابة بداء الأكرية تحدث نتيجة مجموعة من التفاعلات المعقدة بين الطفيلي والثوي المضيف، بالإضافة لوجود بعض الظروف البيئيّة المحيطة (Hashemnia *et al.*,2014)، وتُعد الحيوانات المصابة مصدراً طبيعياً لتلوث البيئة المحيطة وحدوث الخمج عند الأرانب السليمة وخاصة الفتية منها (Lima,2004)، وتختلف درجة تلوث البيئة حسب طبيعة التربية عادة، حيث يصبح الخطر أكبر في حال التربية المكثفة، وتلعب الظروف البيئية المحيطة كالرطوبة، درجة الحرارة، دوراً مهماً في تبوغ البيوض المتكيّسة في الوسط الخارجي وبالتالي زيادة خطر الإصابة (Darzi *et al.*,2003; Ruiz *et al.*,2006 ;Lima,2004).

3- دورة حياة الأيمريّة :

تكون دورة حياة الطفيلي مباشرة ولا تحتاج إلى ثوي متوسط، كما أنها تكون متشابهة في جميع أنواع الأيمريّة، وتختلف فيما بينها في الوقت الذي تستغرقه الأطوار المختلفة، حيث تستغرق دورة الحياة عند معظم أنواع الأيمريّات المعوية مابين 4-14 يوم بحسب نوع الأيمريّة (Mwangi and Okumu,2010).

وتبدأ الدورة بابتلاع الثوي للماء والعلف الملوثين بالبيوض المتكيّسة المتبوّغة (Sporulated oocysts)، حيث يدخل الطور الخامج بعد ابتلاعه الى داخل جسم الثوي، ويحدث تحللاً في جدار البيوض المتكيّسة وتتحرر الكيسات البوغيّة (Sporocysts) منها، وبالتالي الحيوانات البوغيّة (Sporozoites) عقب انفجار الكيسات البوغيّة بتأثير أنزيم الأمعاء التربسين، والصفراء وتوفر O_2، إذ تعمل الصفراء على تنشيط حركة الحيوانات البوغيّة داخل الكيسات البوغيّة، بينما يُحدث التربسين تغيرات على جدار الكيسة البوغيّة، وبالنهاية تخرج الحيوانات البوغيّة منها لتصبح حرة في تجويف الأمعاء، ثم تخترق الخلايا الظهاريّة وتتكور فيها متحوّلة إلى أتاريف (Trophozoites)، تنمو وتتطور

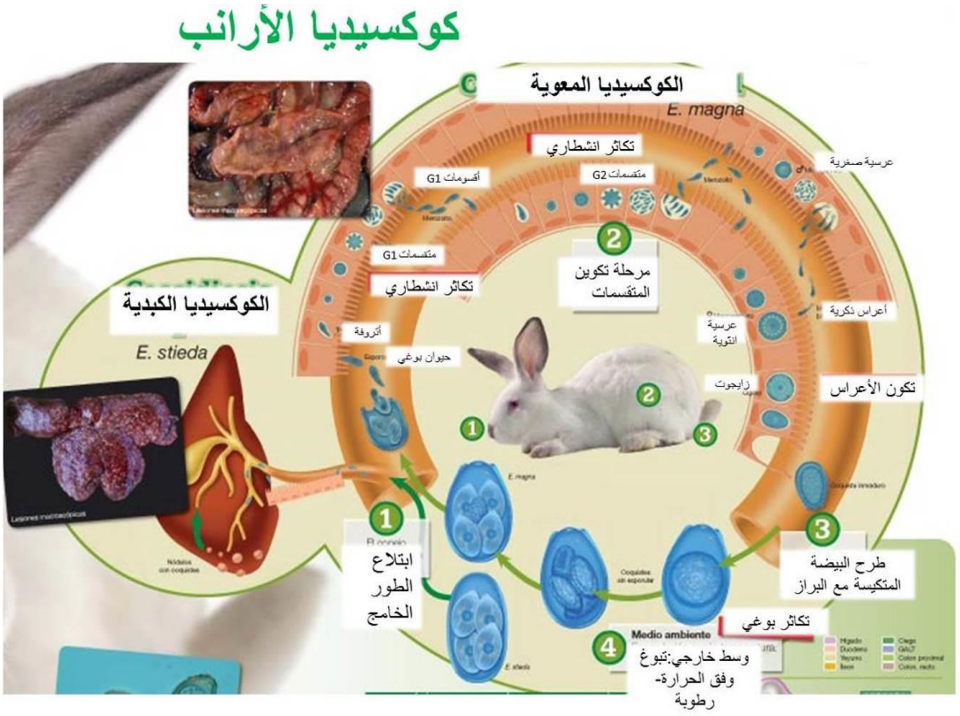
إلى متقسمات الجيل الأوّل (Schizonts-1) عن طريق الانشطار المتعدد المباشر. إذ تحتوي كل متقسمة بعد نضوجها على عدد معيّن من الأقسومات (Merozoites) ويتعلق عددها وحجمها بنوع الأيمريّة. إذ يصل إلى (900) أقسومة عند *E. tenella*. ويكتمل نضوجها خلال ثلاثة أيام من الخمج، عندها تنفجر مما يؤدي إلى انفجار الخلايا الظهارية وتتحرر أقسوماتها لتغزو مجدداً خلايا ظهارية سليمة وتبدأ في تكوين الجيل الثاني من المتقسمات كتشكل متقسمات الجيل الأول، ليكتمل بعد خمسة أيّام من الخمج، والتي تكون أحياناً أكبر أو أصغر من متقسمات الجيل الأوّل. وقد يستمر التكاثر اللاجنسي هذا لعدة أجيال، ويحدده عادة نوع الأيمريّة والوضع المناعي عند الثوي (مرحلة تكوين المتقسمات)(Hortvikova and Bedrnak, 2002;McAllister and Upton ,1989) .

يبدأ بعد ذلك تحول وتمايز عدد كبير من أقسومات الجيل الثاني داخل الخلايا الظهاريّة إلى طور العرسيات الكبريّة (Macrogametocytes) دائرية الشكل تظهر على حوافها حبيبات باستر الزرقاء، ونواتها كبيرة مركزية التوضع، ويحصل لها انقسام اختزالي لتعطي في النهاية عروساً كبرية واحدة. بينما يتحول عدد قليل من الأقسومات إلى عرسيّات صغريّة (Microgametocytes)، وتتشكل الأعراس الصغريّة بعد حدوث انقسام اختزالي للعرسيّات الصغريّة لتعطي عدداً كبيراً من الأعراس الصغرية التي تتصف بشكلها الانسيابي، وطرفها الأمامي المدبب، وباحتوائها على سوطين صغيرين يساعدانها على الحركة بعد خروجها إلى تجويف الأمعاء باحثة عن العروس الكبريّة. فإذا ما نجحت في إخصابها تتشكل اللَاقِحَة zygote ويتم ذلك داخل الخلايا الظهاريّة، بعدها تتمدد حبيبات باستر الزرقاء وتلتحم مكوّنة جداراً ثابتاً للاقحة وتُدعى عندئذ بالبيضة المتكيّسة. تنفجر بعدها الخلايا المصابة لتصبح البيوض المتكيّسة حرة في تجويف الأمعاء، وتصل مع البراز إلى الوسط الخارجي.

تصل البيوض المتكيّسة غير المتبوّغة مع البراز إلى الوسط الخارجي، وهي محتوية على مولدة الأبواغ (Sporont)، وعند توفر الظروف البيئيّة الخارجيّة من حرارة ورطوبة وأوكسجين، يبدأ انقسام النواة إلى أربع أرومات بوغية (Sporoplasts) منفصلة. تتحول بعدها إلى أربع كيسات بوغيّة عن طريق تشكل حيوانين بوغيين في كل كيسة بوغية. وعند اكتمال نمو الحيوانات البوغيّة تتحول إلى بيوض متكيّسة متبوّغة قادرة على إحداث الخمج و تستغرق مدة التبوغ في الوسط الخارجي عادة (3-5) أيّام، وهي ترتبط بعوامل الوسط الخارجي من حرارة ورطوبة وتوفر الأوكسجين (مرحلة تكوين البوائغ) (Lawn and Rose, 1982 ; Levine, 1982 ; Trout and Lillehoj, 1993 ; Allen and Fetterer, 2002 ; McDougald, 2003).

أما عند الأيمريّة الستيداويّة: فتختلف عن دورة الحياة العامة بأنّه بعد خروج الحيوانات البوغيّة من الكيسات البوغيّة تخترق مخاطية الأمعاء، وتمر عبر العقد الليمفاوية المساريقية والنظام البابي الكبدي إلى الكبد، حيث تدخل الخلايا الظهارية للقنوات الصّفْراويّة وتستمر بنفس مراحل دورة الحياة العامة لكن داخل

الخلايا الظهاريّة للقنوات الصّفْراويّة حتى تشكل البيوض المتكيّسة، حيث يتم طرح هذه البيوض عبر القنوات الصّفْراويّة مع الصفراء ومنها إلى الأمعاء لتطرح مع البراز إلى الوسط الخارجي بعد 18 يوم من بداية العدوى (Levine, 1985; Urquhart *et al*., 1987; Barriga, 1997; Gardiner *et al*., 1998; Lacey, 2016).



شكل(3) مخطط دورة حياة أيمريّات الأرانب

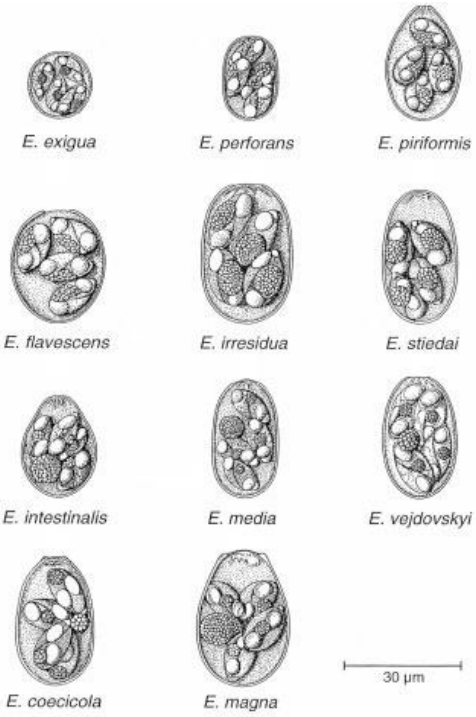
http://www.infoexoticos.com/coccidiosis-en-conejos

وفي دراسة أجراها (Abu-El-Ezz *et al*., 2012) عن الخمج التّجريبيّ بالأيمريّة الستيداويّة عند الأرانب وجد أنَّ البيوض المتكيّسة للطفيلي تبدأُ بالظهور في الروث في اليوم 16 بعد الخمج التّجريبيّ، وتزداد يومياً ليصل عددها في البراز إلى أعلى مستوى له (276860 بيضة متكيّسة/غ روث) في اليوم 22 بعد الخمج، ثمَّ يبدأ عددها بالتراجع التدريجيّ ليصل باليوم 46 بعد الخمج إلى (1000 بيضة مُتكيّسة/غ روث)، في حين أنَّها اختفت من الروث اعتباراً من اليوم 47 بعد الخمج وحتى نهاية التَّجربة.

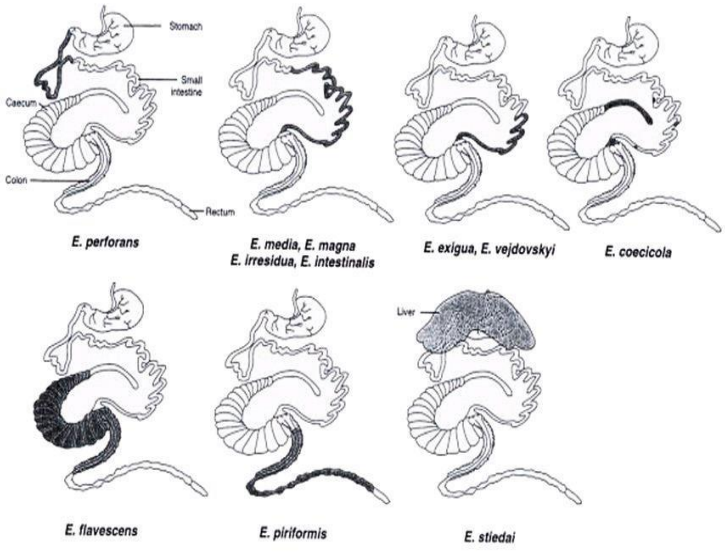
4- أنواع الأيمريّة عند الأرانب:

تم تحديد خمسة عشر نوعاً من الأيمريّة الممرضة عند الأرانب، والتي تتطفل في الأمعاء الدقيقة باستثناء E.Piriformis التي تصيب الأعور والقولون و E.Stiedai التي تغزو الكبد والقنوات

الصّفْراويّة أما أنواع الأيمريّة المعوية فتضم: E. Perforans، E. Exigua، E. Media، E. Magna، E. Coecicola، E. Vejdovskyi، E. Flavescens، E. Intestinalis، E. Matsubayashi، E.Irresidua، E. Nagpurensis، E. Elongate، E. Neoleporis (Taylor *et al.*, 2007; Schoeb *et al.*, 2007). وغالباً ما تصاب أمعاء الأرانب بأخماج متزامنة بعدة أنواع من الأيمريّة المعويّة(أخماج مختلطة)(Norton *et al.*,1979).



الشكل(4) يوضح حجم و شكل البيوض المتكيّسة لأنواع الأيمريّة عند الأرانب(Coudert *et al.*, 2000)



الشكل(5) يوضح مكان التطفل لكل نوع من أنواع الأيمريّة عند الأرانب(Coudert *et al.*,2000)

5- الأعراض الإكلينيكيَّة:

تبدو على الأرانب المصابة بالأيمريّة الستيداويّة علامات الضعف، فقدان الشهية، الإسهال المائيّ البنيّ أو الإمساك والهُزال وخشونة الشعر واليرقان والحبن وانتفاخ وتدلي البطن، وعند جس البطن يلاحظ تضخُّم الكبد، وينتهي المرض بالموت (Joyner *et al*., 1983; Peeters and Geeroms, 1986; Soulsby, 1986; Polozowski, 1993; Karaer, 2001).

تُؤدِّي الإصابة الشديدة إلى فقدان مبكر للأرانب، كما تكون الأرانب المصابة بالأيمريّة معرضة للإصابة بأمراض أخرى، كما تؤدي إلى انخفاض معنويٍّ في كلٍّ من معدَّل الزيادة الوزنيَّة واستقلاب الفيتامينات الذوَّابة بالدُّهون، وهضم الدُّهون وإنتاج الطَّاقة (Cheeke, 1987; Pakes and Gerrity, 1994).

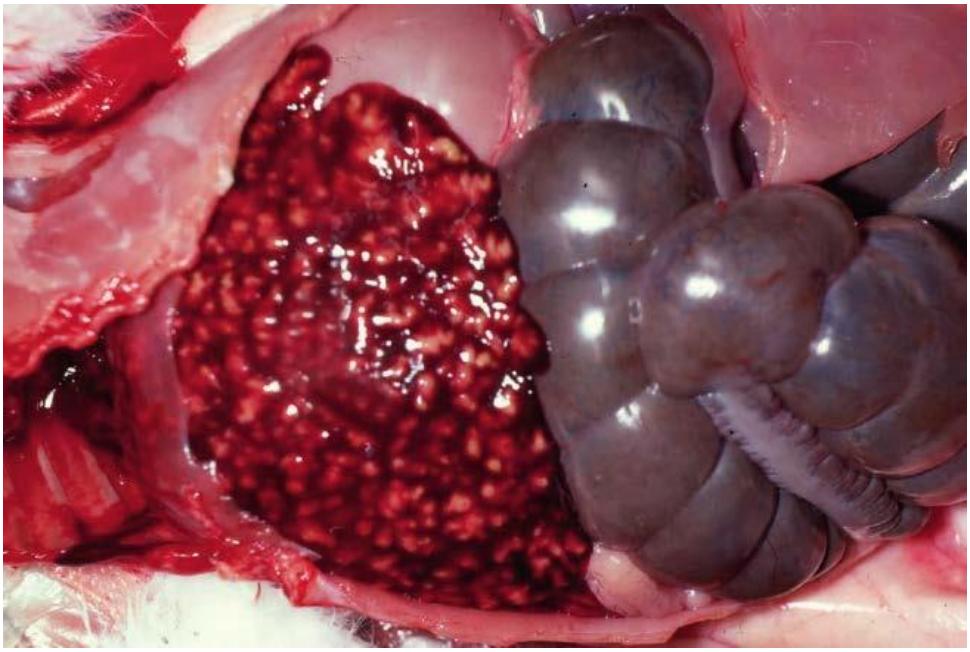
يحدث الإسهال والهزال وخشونة الشعر بسبب إصابة الأمعاء بالبداية وذلك قبل نفوذ الحيوانات البوغيّة إلى الغشاء المخاطيّ للأمعاء الدقيقة ومرورها عبر النظام البابي الكبدي إلى القنوات الصّفْراويّة في الكبد لبدء الشكل الكبديّ (Kraus *et al*., 1984; AL- Naimi *et al*., 2012).

6- الإمراضية Pathogenesis:

ترتبط الإمراضية بنوع وفوعة طفيلي الأيمريّة ، وقدرته على التكاثر، وعدد أجيال المتقسمات، وجرعة الخمج، وتعدَ مرحلة التكاثر اللاجنسي (تكوين المتقسمات) هي المسؤولة الرئيسة عن توليد التغيّرات المرضيّة في الأنسجة المصابة. يؤدي التكاثر اللاجنسي المتكرر إلى حدوث تلف وتخرب الخلايا الظهاريّة المصابة، وتسبب الأنواع التي تتطور في الطبقة تحت الظهاريّة أضراراً أكبر من الأنواع المتطفلة في الخلايا الظهاريّة. فضلاً عن ذلك تساهم عوامل أخرى في إحداث الإمراضية، مثل عدد البيوض المتكيّسة المتبوّغة التي يتناولها الثوي، وعمر الثوي، وحالته الصحيّة، والمناعة، والإصابة بالكائنات الحيّة الدقيقة الممرضة الأخرى التي تحدث أخماجاً جرثومية ثانوية(Tabares *et al*., 2004).

تكون كل من الآفات العيانية والمجهريّة واضحة المعالم محددة بشكل جيد، فالكبد هو العضو المتضرّر الأكبر من هذا الطفيلي، فيلاحظ وجود عقيدات بيضاء متعددة البؤر على سطحه التي يتراوح حجمها بين 2 سم (Wang and Tsai, 1991; Schoeb *et al*., 2007).

كما يمكن مشاهدة تضخم الكبد والمرارة والقنوات الصّفْراويّة عند تشريح الأرنب (Van Praag, 2009)، و لوحظ وجود نضح مخاطي أخضر داكن داخل لمعة الأمعاء (Wang and Tsai, 1991)، يؤدي فرط التنسج والتضخم الكيسي لظهارة القنوات الصّفْراويّة إلى ظهور العقيدات البيضاء على سطح الكبد(Pakes and Gerrity,1994).



الشكل(6) كبد أرنب مصاب بالأيمريّة الستيداويّة(Mark *et al*.,2012)

ويمكن البرهان على وجود الطفيلي بمراحل متعددة من دورة حياته من خلال ظهور البيوض المتكيّسة في لمعة القناة الصّفْراويّة واجراء مقاطع نسيجية تُظهر ارتشاح الخلايا الالتهابية (الخلايا البلازمية مع امكانية وجود الخلايا البالعة والعدلة) حول القناة، ويمكن أن يؤدي تضخم القناة الصّفْراويّة إلى تمزق وتورم حبيبي وتليف، هذا التليف يزداد مع تكرار الإصابة (Pakes and Gerrity, 1994; Schoeb *et al*., 2007)، وعادة لا تتأثر الأعضاء الأخرى بالأيمريّة الستيداويّة إلا أنه من الممكن أن تمهد لإصابتها بأخماج جرثومية ثانويّة (Van Praag, 2009). تؤدي هجرة البيوض المتكيّسة المتسربة عبر الاثنا عشر إلى الكبد عن طريق المجرى الدموي أو اللمفاوي وخمجها لخلايا ظهارة القنوات الصّفْراويّة إلى تفاعلات التهابيّة مترافقة مع يرقان انسدادي لطرح البيوض المتكيّسة في القنوات الصّفْراويّة مؤديا لظهور الأعراض المرضية (Omata *et al*., 2001).

ووفقاً للإمراضية والأنواع المسؤولة عن داء الأكرية تم تصنيف الأيمريّات إلى أربعة أنواع:

1- ذات إمراضية ضعيفة: مثل (E.Exigua)، (E.Perforans)، (E. Vejdoveeskyi).

2- ذات إمراضية متوسطة: مثل (E. Irresidua)، (E. Media).

3- ذات إمراضية شديدة: مثل (E. Flavescens)، (E. Intestinalis).

4- ممرضة تبعاً لجرعة العدوى: وتضم (E.Stiedae)، وتعتبر هذه الصفة مميزة للأيميريّة الستيداويّة عن الأنواع الأخرى للآيميريات والتي تتطفل في الأمعاء(Coudert *et al.*,1995; Taylor *et al.*,2007).

7- **التغيّرات التشريحيّة المرضية Pathological changes:**

أ- **التغيرات العيانيّة Macroscopic changes:**

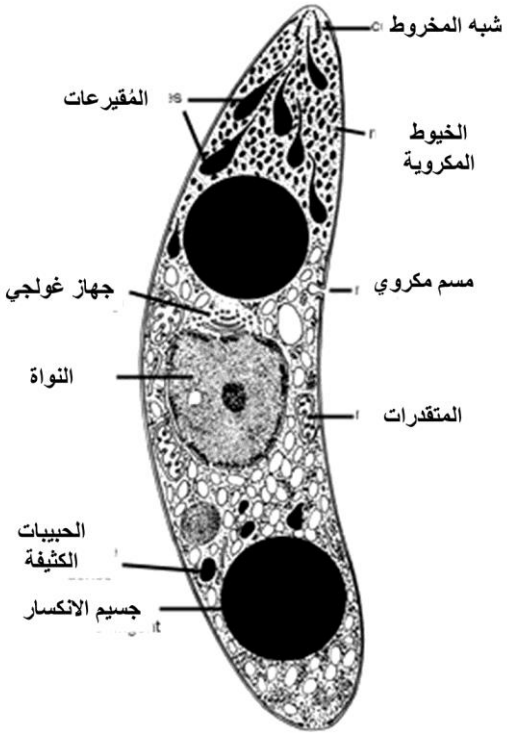
أشارت العديد من الدراسات إلى أن التغيرات المرضية الناتجة عن الإصابة بالأيمريّة الستيداويّة عند الأرانب تتركز في الكبد والأمعاء، وتتجلى بحدوث انتفاخ في الأمعاء الدقيقة وامتلائها بمواد خضراء رمادية شبه صلبة، بالإضافة إلى احتواء القولون أعلافاً غير مضهومة. أما في الكبد تتمثل التغيرات المرضيّة بوجود عقيدات بيضاء مصفرّة ذات قطر 1-3 مم منتشرة في متن الكبد ومرتفعة عن سطح النسيج السليم المجاور، إضافة إلى احتقان شديد في نسيج الكبد السليم المحيط بهذه العقيدات، وكذلك يحدث تضخم في القناة الصّفراويّة (Al-Rukibat *et al.*,2001; ونوس،2017). وفي دراسة مماثلة أجريت على الأيمريّة الستيداويّة وبعد إجراء الصفة التشريحيّة شوهد تضخم الكبد، ووجود عقيدات صفراء مختلفة الأشكال والأحجام على سطح الكبد تحتوي بداخلها البيوض المتكيّسة ضمن مواد دهنية، بالاضافة إلى توسع وتضخم القنوات الصّفْراويّة (Gomez-Bautista *et al.*,1987; المحمد،2017).

ب-**التغيرات المجهرية Microscopic changes:**

في دراسة قام بها (Al-Rukibat *et al.*,2001; ونوس،2017) على الأرانب المصابة بالأيمريّة الستيداويّة تبين حدوث فرط تنسج في الخلايا الظهارية المبطنة للقنوات الصّفْراويّة ونموها بشكل حليمي أو بشكل تفرعات شجريّة، واحتواء هذه الخلايا على كميات معتدلة من الهيولى ذات اللون الأزرق الداكن، بالإضافة إلى إحاطة القنوات الصّفْراويّة بحزام من النسيج الضام ورد فعل التهابي ورمي حبيبي مكون أساساً من البلاعم وبنسبة أقل من اللمفاويّات. أما نسيج الكبد المحيط بالقنوات الصّفْراويّة، فتعرّض لدرجات مختلفة من التنكس والنخر على شكل تنكس غيمي Cloudy swelling أو تنكس مائي Hydropic degeneration أو تراكم للغليكوجين في الخلايا الكبديّة المصابة، بالإضافة لاحتواء بعض الخلايا الكبديّة على حبيبات مصفرة وهي عبارة عن صباغ البيليروبين، بسبب حدوث اليرقان الناتج عن انسداد القنوات الصّفْراويّة وركود الصفراء. وفي دراسة مماثلة أجريت على الأرانب المصابة بالأيمريّة الستيداويّة، أُخِذَت عينات من الأكباد المصابة وتم تحضير الشرائح النسيجية وتلوينها بصبغة الهيماتوكسيلين والأيوزين، ودراستها تحت المجهر، تبين وجود توسع في القنوات الصّفْراويّة، وزيادة سماكة جدرانها نتيجة فرط تنسج الخلايا المبطنة للقنوات الصّفْراويّة، مع وجود البيوض المتكيّسة ضمن لمعة هذه القنوات وتخريب للعديد من الخلايا الكبديّة المجاورة للقنوات الصّفْراويّة نتيجة توسع هذه القنوات وإحاطتها بالنسيج الضام (Gomez-Bautista *et al.*,1987; المحمد،2017).

8- اجتياح الطفيلي لخلايا الثوي Invasion of host cells:

تمتاز الأشكال المتحركة لمعقدات القمة لجميع أنواع الأيمريّة بقابليتها على مهاجمة واختراق خلايا الثوي، يتميز الحيوان البوغي بأنه متحرك وله القابلية على غزو الأنسجة، وتركيبه الدقيق مكوّن من جُليدة pellicle وشبه مخروط Conoid والحلقة القطبية Polar ring والمُقيرعات Rhoptries والخيوط المكرويــة Micronemes والحبيبــات الكثيفةDense granule(Dubremetz *et al*.,1998)، وأشارت هذه الدراسة الى أهمية هذه الأجزاء (المُقيرعات والخيوط المكرويّة والحبيبات الكثيفة) المتواجدة بكل الأشكال المتحركة لطفيليات معقدة القمّة، في عملية مهاجمة وغزو خلايا الثوي (Dubremetz *et al*., 1998). وتقوم بهذه العملية بواسطة المعقد القمي { شبه المخروط conoid والحلقة القطبية polar ring والمُقيرعات rhoptries والخيوط المكروية micronemes والحبيبات الكثيفة dense granule} (Carruthers and Sibley, 1997).

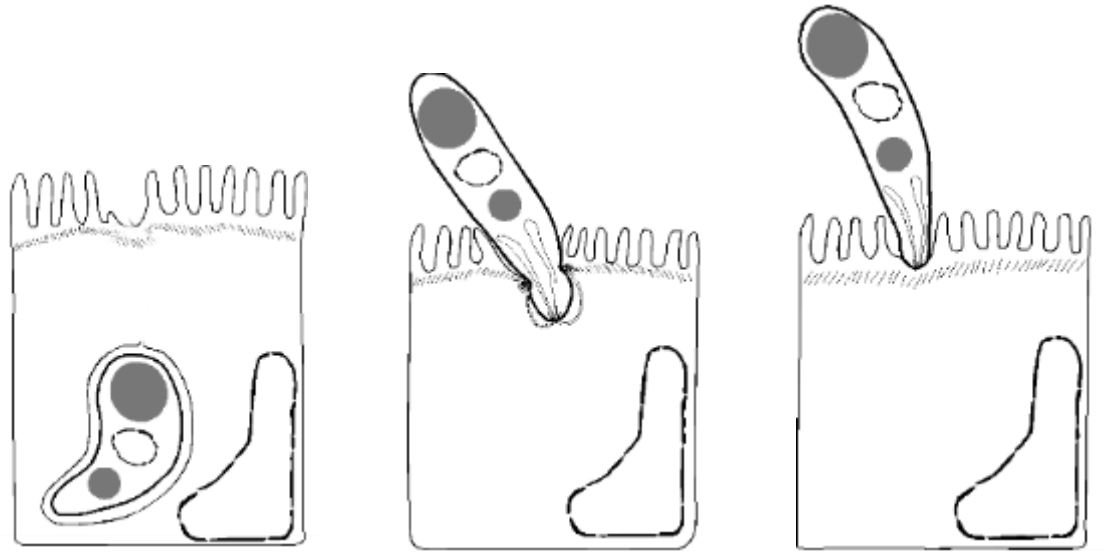


الشكل (7) البنية الشكلية للحيوان البوغي

http://eimeria.chez-alice.fr/structure.html

تغزو هذه الأشكال المتحركة خلايا الثوي بنشاط ولا يوجد دور للثوي بهذه العمليّة (Sibley *et al*,1998). وبعد التعرف الأولي بين الأشكال المتحركة وخلايا الثوي تبدأ عملية الاختراق عن طريق الاتصال بين قمة الأشكال المتحركة وسطح الخليّة، ويبدأ بالتحرك الى داخل الفجوة الطفيليّة Parasitophorous vacuole(PV) النامية، والمرحلة الأخيرة يكون داخل الخليّة محاط بفجوة (PV)

(الشكل8–ج) حيث تلعب مكونات المعقد القمي دوراً مهماً بعملية مهاجمة خلايا المضيف، إذ تُطلق مكوناتها بالتتابع، وتعتمد عملية المهاجمة التي يقودها الطفيلي على الحركة الانزلاقية للأشكال المتحركة والمعتمدة على الأكتين والميوزين (Augustine, 2001; Russell, 1983) .



أ- التصاق الحيوان البوغي بالخلايا الظهارية للأمعاء

ب-تلاشي هيكل الخلية وبداية تكون جيب سيتوبلازمي لتكوين (PV)

ج–دخول الحيوان البوغي داخل خلية المضيف ضمن (PV)

الشكل (8) آلية دخول الحيوان البوغي إلى خلايا المضيف

تهاجم الأشكال المتحركة لأنواع الأيمريّة خلايا معينة يحتوي غشاؤها على سطح خاص يسهل عملية الالتصاق والدخول داخل خلية الثوي (Lillehoj and Trout, 1996)، ويفضل الطفيلي اختيار الخلايا التي تسمح له بالتكاثر والبقاء بشكل مثالي. فيُلاحظ امتلاك الحيوان البوغي للأوالي ثمالات غالاكتوز– د D-galactose على سطحه، وتمتلك خلايا الثوي مستقبلات خاصة للتعرف على هذه الكربوهيدرات، ويؤدي التآزر بين هذه الثمالات ومستقبلاتها إلى الارتباط بسطح الخلايا ثم دخول الطفيلي الى خليّة الثوي (Baba *et al*., 1996).

تحمل الأقسومات والعرسيّات الصغريّة جزيئات شبيهة بالفبرونيكتينfibronectin– like التي تســـاهم في عملية التعرّف والاختراق لخلايا الثوي، وتمتلك الأقســومات مستقبلات للإنتغرين integrin والتي قد تلعـــــب دوراً في التآزر بيـــن الطفيلي وخلايـا الثوي (Lopez-Bernad *et al*., 1996).

9– الاستجابة المناعيّة Immune response:

تتأثر الاستجابة المناعيّة بعوامل تتعلق بالثوي، كتركيبه الوراثي وعمره ومدى استجابته للعامل الممرض، وعوامل تتعلق بالطفيلي كنوعه ومرحلة تطوره فضلاً عن عدد الطفيليات في جرعة التلقيح أو الإصابة (Rose *et al*.,1975 ; Rose,1987; الإدريس،2014).

تتنوع الاستجابة المناعيّة لطفيلي الأيمريّة بسبب دورة حياته المعقدة التي تتضمن أشكال داخل خلويّة وخارج خلويّة وأطوار جنسيّة ولاجنسيّة (Lillehoj and Dalloul, 2004)، وتُعد الحيوانات البوغيّة محفزاً جيداً للاستجابة المناعيّة نتيجة لاختراقها الخلايا الظهاريّة وتوضعها في الصفيحة الأساسية وهي الطبقة الغنية بالخلايا اللمفاويّة والشعيرات الدمويّة (Jeurissen *et al*., 1996).

تتصف أنواع الأيمريّة بأنها طفيليات نوعيّة للثوي وللعضو وللخليّة، ويتشكل عندها مناعة مكتسبة بعد تعرضها لخمج متكرر بأعداد قليلة من البيوض المتكيّسة المتبوّغة، وتكون هذه المناعة خلويّة بشكل أساسي مع وجود استجابة مناعيّة خلطية محدودة، وهي متخصصة لنوع الأيمريّة التي أدت الى تشكلها، ويمكن أن تلاحظ مناعة تصالبية ضعيفة بين الأنواع، بينما تكون متطابقة تقريباً تجاه ذراري النوع الواحد مع وجود بعض الاختلافات (Vermeuleun *et al*.,2001; Dalloul and Lillehoj, 2006; Peek and Landman., 2011).

تلعب الاستجابة المناعيّة الموضعيّة في الأمعاء دوراً هاماً في المناعة تجاه الإصابة بداء الأكريات بصورة أكثر فعاليّة من الاستجابة المناعيّة الجهازيّة عند الأرانب، وتشمل الأنسجة اللمفاويّة المعويّة كل من الزائدة الدودية Appendix، والكييس المستدير Rotandus Saculus (SR)، لطخ باير Peyer's patches (PP)، والكريات البيضاء في الصفيحة المخصوصة للأمعاء lamina propria leukocytes. تلعب الزائدة الدودية والتي تحتوي على اللمفاويات البائية والأضداد دوراً هاماً في عمل المناعة الجهازيّة عند الأرانب، ويختلف الجهاز المناعي لدى الأرانب عن الثديّات الأخرى من حيث البنية والوظيفة (Mage,1998;Weinstein *et al*.,1994)، ولذلك تعتبر الزائدة الدوديّة بمثابة نسيج لمفاوي Lymphoid tissue (Sehgal *et al*.,1998). ويعتبر الكييس المستدير مكون آخر من الأنسجة اللمفاوية المتعلقة بالأمعاء عند الأرانب ويقع في نهاية الأمعاء الدقيقة وعند مدخل الأعور، وهو يماثل ويشابه الزائدة الدودية من حيث البنية، وتعتبر معظم الأعضاء اللمفاويّة عند الأرانب متشابهة من حيث المنشأ الجنيني والتطور(Mage,1998).

بالرغم من أن رد الفعل المناعي الناتج عن الإصابة بداء الأكرية عند الأرانب لم يُدرس على نطاق واسع باستخدام التقنيات المناعية، إلا أن بعض الدراسات استَخدمت مؤشر طرح البيوض المتكيّسة بعد الإصابة بالأيمريّات كمعيار يمكن الاعتماد عليه (Comporti,1993; المحمد،2017).

في دراسة أجريت حول الأيمريّات المعويّة E.Intestinalis، أدت الإصابة بها إلى رد فعل مناعي كبير، حيث أظهرت الدراسة بأن تلقيح الأرانب بست بيوض متكيّسة أدى إلى خفض إطراح البيوض المتكيّسة مع البراز بنسبة 60% بعد خمج جديد، وفي تجربة أخرى تضمنت تلقيح الأرانب

بحوالي 600 بيضة متكيّسة أو أكثر، أدى إلى توقف طرح البيوض المتكيّسة مع البراز تماماً بعد خمج جديد آخر(Comporti,1993).

وفي دراسة تجريبية وُجِدَ بأنّ رد الفعل المناعي الناتج عن الإصابة بالنوع E. Flavescens والنوع E. Piriformes على التوالي كان ضعيفاً، وذلك اعتماداً على عدد البيوض المتكيّسة المطروحة مع البراز بعد إحداث العدوى التجريبية عند الأرانب (Norton *et al*.,1979). وفي دارسات تجريبية أخرى قام بها(Donald *et al*.,2010 ; Licois *et al*.,1994)، على كل من الأنواع E. Irresidua، E. Media، E.Magna على التوالي، أثبتوا من خلال دراساتهم بأنّ هذه الأنواع متوسطة الاستجابة المناعيّة.

أظهرت بعض الدراسات التجريبيّة التي تم فيها تحصين الأرانب ضد الأيمريّات انخفاضاً كبيراً في طرح البيوض المتكيّسة في البراز بعد الإصابة (Akhtar *et al*.,1998)، حيث أظهرت نتائج هذه الدراسات حدوث انخفاض كبير في أعداد البيوض المتكيّسة المطروحة مع البراز بعد تحصين الأرانب بلقاح محضر من البيوض المتكيّسة الصُوَّاتة (المعرضة للأمواج الصوتيّة)، ويعتمد اللقاح الفعال على إعطاء الحيوان المستضد المناسب من حيث الخصائص، وخاصة طبيعته البروتينيّة والمناعية (Levinson,2012)، حيث تتم صوتنة البروتينات لجعلها أكثر ثباتيةً واستقراراً تجاه العوامل الخارجية (Stefani and Dobson,2003)، ويجب أن تحتوي هذه البروتينات على حَوَاتِم مستضديّة Epitope تحفز الاستجابة المناعيّة التي تحمي الأرانب من العدوى.

ولقد عُرِفَ أن المناعة ضد الكائنات الحيّة الدقيقة الداخل خلوية بما فيها الأيمريّات هي من نوع المناعة الخلويّة Cellular immunity (CMI) (Levinson,2012)، ويمكن اعتبار المناعة الخلويّة استجابة مناعية تكيفيّة (Pakandl,2009)، وليس من السهل بمكان تقييم هذه الاستجابة، بينما يمكن قياس عيار الأضداد الناتجة عن الإصابة بالأيمريّات، والتي يمكن أن تعطي مؤشراً عن الاستجابة المناعية، وبالتالي يمكن أن تفيد في تقييم فعالية اللقاحات.

عند الإصابة بداء الأكرية تتشكل مناعة عند الثوي، وهذه المناعة تكون نوعية لنوع الأيمريّة التي تصيب هذا الثوي (Darzi *et al*.,2003)، وعند حدوث الإصابة بالأيمريّات يتحفز كل من العامل ($CD4^+$) اللمفاويّات التائية التي تعبر عن المستقبلة$CD4^+$(Lymphocytes which express CD4 receptor)، والعامل ($CD8^+$)، واللمفاويّات التائية (Suhwold *et al*.,2010)، بالإضافة إلى المناعة الخلويّة التي تحفز إنتاج الانترفيرون غاما(IFN-ϒ) Gamma – interferon (Taubert *et al*.,2008).

يعد إفـراز غاما(IFN-ϒ) مقياساً لمقدار الاستجابة المناعيّة الخلويّة التائية تجاه مستضدّات الأكريات (Martin *et al.*,1994 ; Byrnes *et al.*,1993 ; Prowse and Palliter, 1989). ويعمل على إعاقة تطور الطفيلي في المراحل الأولى من الخمج (Jenkins *et al.*,1993).

أوضحت دراسات تجريبيّة في الزجاج أن الانترفيرون غاما يحفز البالعات الكبيرة والمستغيرات على انتاج الوسائط الأوكسجينية الفعّالة التي تعمل على قتل الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة (Ovington *et al.*,1995). تشترك جميع أنواع الأيمريّات بصفة واحدة وهي أن الاستجابة المناعيّة الخلطية لا تحمي من الخمج المتجدد بالأيمريّة بشكل تام، وبالتالي فإن الخمج الأولي بالأيمريّة لها دور هام في إحداث رد فعل التهابي يحمي الثوي(Darzi *et al.*,2003).

تتطور داخل جسم الثوي عند الإصابة بالأيمريّة سلسلة معقدة من التفاعلات والتي تهدف إلى منع تخريب ونخر الأنسجة والقضاء على العامل المسبب، والعمل على بدء عملية ترميم للأنسجة وعودتها إلى وضعها الطبيعي (Bauman and Gauldie,1994)، وخلال هذه المرحلة يتم إفراز بعض المواد الوسيطة من البلاعم النسيجية، وحيدات النوى، كالسيتوكينات، عامل نخر الورم Tumor necrosis factors (TNF)، والمحفزات IL−1 و IL−2 وهي المحفّزات الرئيسة لتخليق بروتينات الدم في المرحلة الحادّة (Billate ,2007 ;Singh and Pachauri,2002).

يمكن تصنيف هذه البروتينات بأنها إما إيجابية مثل السيروبلازمين Ceruloplasmin، ومولد الفبرين Fibrinogen وبروتين C التفاعلي C-reactive protein، ضد التربسين Antitrypsin والهابتوغلوبين Haptoglobin، أو بروتينات سلبيّة فتضم كل من ما قبل الألبومين (Pre-Albumin)، الألبومين Albumin والترانسفيرين Transferin (Kaneko *et al.*,2008).

تفترض بعض الدراسات أن الأضداد تعيق تطور العرسيّات gametocyte والبيوض المخصبة(اللاقحة) zygote الى طور البيضة المتكيّسة، وقد يعود سبب ذلك الى تأثير الأضداد في بروتينات الجـدار، و تصلب جدار البيوض المتكيّسة (Wallach,2010; Ferguson et al.,2003)، أو بسـبب ارتباطها بمستقبلات سطحية موجودة على العرسيات الكبروية macrogametocytes و من ثم منع نمو العرسيات أو تثبيط عملية اخصابها (Laxer et al.,1987; Wallach *et al.*,1992).

تقوم الأضّداد بتأثيرات مختلفة على جميع أطوار الأيمريّة كالتراص Agglutination، والتحلل lysis، ومعادلة Neutralization مستضدّات الأطوار المختلفة، كما تؤدي الى حدوث تغيرات شكلية عنـدما تكون على تمـاس مع الطفيلي (Rose,1987; Ayaz *et al.*,2008) كما يمكن للخلايا المحببة

(الحامضيّة و مُتَغايِرَةُ الحُبَيباتHeterophilic) بالاشتراك مع الضد IgG أن تقوم بدور في التخلص من الطفيلي (Rose, 1986).

أظهرت بعض الدراسات للحيوانات المصابة بالأيمريّة الستيداويّة بعد إجراء التحاليل زيادة في عدد الكريّات البيضاء وخاصة العدلات Neutrophilia ووحيدات النوى Monocytosis، وذلك في اليوم 28 بعد العدوى، ولوحظت زيادة بسيطة في أعداد كلٍّ من اللمفاويات lymphocyte، الحمضات Eosinophil والقعدات Basophil، طول فترة التجربة التي قام بها (Cam *et al.*,2008). ظهرت زيادة كبيرة في أعداد الكريّات البيضاء وخاصة العدلات في الأيام 16–24 بعد العدوى، أما اللمفاويات فقد لُوحظ ارتفاعها بوضوح بعد اليوم 24 بعد العدوى، كما أظهرت الدراسة انخفاض كلٍّ من الهيماتوكريت وخضاب الدم بشكل واضح في اليوم 24 بعد العدوى (Cam *et al.*,2008).

10- البنية المستضدية للأطوار المختلفة لطفيلي الأيمريّة Antigenic structure for Eimeria parasite:

تختلف المستضدّات باختلاف الأطوار المتعددة التي يمر فيها طفيلي الأيمريّة في دورة حياته:

أ- مستضدّات الأطوار اللاجنسيّة A sexual stages antigens:

تعد الأطوار اللاجنسيّة الأكثر أهميّةً في تشكل المناعة ضد الأكريات وبالأخص طور الحيوان البوغي (Brothers *et al.*, 1988; Danforth and McAndrew, 1987). لذلك اهتمت عدة دراسات بهذه الأطوار، إذ تم تحديد عدد من المستضدّات السطحية لطور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا باستخدام تقانة التبصيم المناعي وكانت أوزانها الجزيئيّة (14–18–32–37 –42–54 –67–73 –96–113) كيلو دالتون (Wisher, 1986). بينما أظهرت دراسة أخرى تسع مستضدّات غشائيّة لطور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا وبلغت أوزانها الجزيئيّة (23 و26 و40 و45 و68 و 82 و 94 و105 و235) كيلو دالتون (Murray and Galuska 1986). في حين كانت أهم المستضدّات التي تم ملاحظتها خلال الدراسة التي أجراها (الإدريس،2014) باستخدام تقنية التبصيم المناعي على طفيلي الأيمريّة تنيلا هي: بروتينات الحيوانات البوغيّة (8 و 13 و 38 و 51 و 63) كيلو دالتون، بروتينات الحيوانات البوغيّة المجمدة (13 و 39 و 77) كيلو دالتون، بروتينات البيوض المتكيّسة (13.9 و 15 و 38.8 و 53 و 73.5 و 167.8) كيلو دالتون. في حين أوضحت دراسة أخرى دور بعض المستضدّات الغشائيّة في اجتياح طفيلي الأيمريّة تينيلا للطبقة الظهاريّة للأعورين هما (37 و45) كيلو دالتون (Augustine and Danforth, 1985). وباستخدام طريقة الترسيب المناعي للمستضدّات الغشائيّة لطور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا، تبين وجود 5 من المستضدّات ذات الأوزان الجزيئيّة (10 و18 و21 و 26 و47) كيلو دالتون (Lillehoj and Trout, 1993).

وقد بّينت نتائج الدراسات تبايناً في عدد البروتينات المستضدّية للحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا وأوزانها الجزيئيّة (Wisher, 1986)، في حين أوضحت دراسة أخرى دور بعض المستضدّات الغشائية في اجتياح طفيلي الأيمريّة تينيلا للطبقة الظهارية للأعورين (Augustian and Danforth, 1985 ;Lillehoj and Trout,1993 ; Brothers *et al.*,1988). وباستخدام طرائق أخرى لعزل المستضدّات بطريقة التعليم بالآيودين المشع I^{125}-labeled و طريقة التعليم بالمثيونين -methionine labeled تم تسجيل عدد كبير من المستضدّات في طفيلي الأيمريّة اسيرفيولاينا والأيمريّة تينيلا إذ كان لكل نوع بحدود 32–45 من مستضدّات سطحيّة وداخليّة وتتراوح أوزانها الجزيئيّة (9–350) كيلودالتون (Jenkins and Dame, 1987). وهناك مستضدّات ذات أهمية كبيرة تقع في الأجسام النيّرة Refractile body للحيوان البوغي وتبلغ أوزانها الجزيئيّة (21–28)كيلودالتون (Danforth and Augustine,1989)، وتعد هذه المستضدّات محفوظة بالأيمريّة وتلعب دوراً مهماً في التطور اللاجنسي للطفيلي (Augustine) *et al.*, 1988). كما بينت دراسة سابقة وجود مستضد مشترك بين أطوار الحياة المختلفة (الحيوان البوغي والأقسومة والبيوض المتكيّسة الناضجة والكيسات بجميع مراحل نموها) لطفيلي الأيمريّة تينيلا وزنه الجزيئي 19 كيلو دالتون عند استـــخدامه أضـــــداد أرانب ضد البروتين المأشـــــوب للحيوان البوغي(sz-1) (Fetter *et al.*,2004). بينما توصلت دراسة أخرى الى وجود مستضد وزنه الجزيئي 22 كيلودالتون لبروتينات الحيوان البوغي بالتبصيم المناعي (Karkhanis *et al.*, 1991).

أشارت احدى الدراسات الى وجود مستضدّات مشتركة بين طوري الحيوان البوغي والبيوض المتكيّسة لطفيلي الأيمريّة تينيلا, وتراوحت أوزانها الجزيئيّة من 20 الى 30 كيلو دالتون (Karkhanis *et al.*, 1991). اهتم العديد من الباحثين بدراسة مستضدّات من أجزاء المعقد القمي للحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا لأهميّته في آليات غزو الطفيلي لخلايا الثوي، وتمتلك المُقيرعات مستضدّات معقدة، عُرف منها ست مستضدّات أوزانها الجزيئيّة (118،122،124،132،180،220) كيلو دالتون (Kawazoe *et al.*, 1992)، وأشارت دراسة أخرى لوجود ثلاثة مستضدّات في المُقيرعات العائدة لطفيلي *E.* nieschulzi، أوزانها الجزيئيّة (63 ،150 ،200) كيلو دالتـون (Dubremetz *et al.*,1989). ويحتوي الخيط المكروي عند الحيوان البوغي للأيميريّة تينيلا على عدة مستضدّات أوزانها الجزيئيّة (24 ، 54 ، 94 ، 96 ، 100 ، 110) كيلو دالتون (Kawazoe *et al.*, 1992).

وبيّنت دراسة (Mc-Donald *et al.*,1988) وجود أربع مستضدّات لطور أقسومات طفيلي الأيمريّة تينيلا تراوحت أوزانها الجزيئيّة (20–26–61–71) كيلو دالتون، وأشارت هذه الدراسة إلى وجود اختلافات في المكوّنات المستضدّية بين طور الحيوان البوغي وأجيال الأقسومات الأول والثاني، والى أهميّة طوري الحيوان البوغي والجيل الاول من الأقسومات في تكوين وتشكيل مناعة وقائّية.

ب- مستضدّات الأطوار الجنسيّة Sexual stages antigens:

اهتم عدد من الدراسات بتحديد دور مستضدّات الأطوار الجنسيّة في تشكل المناعة تجاه طفيلي الأيمريّة، وتبين أن أهم المستضدّات عند طور العرسيّات لطفيلي الأيمريّة ماكسيما هي المستضدّات ذات الوزن الجزيئي (56 ،82) كيلو دالتون، التي تم تحديدها بعد الحضن مع امصال أُخذت بعد 14 يوماً من الإصابة. بينما وجدت دراسة أخرى أجريت على طور العرسيّات لطفيلي الأيمريّة ماكسيما، بعد الحضن مع أمصال عُزلت بمرحلة متأخّرة من الإصابة، عدداً أكبر من المستضدّات (35 ،52 ،58 ،73 ،85) كيلو دالتون. و أوضحت هذه الدراسات أهميّة هذه المستضدّات للأطوار الجنسيّة وامكانية استخدامها كلقاحات لتساهم في الحد من انتشار المرض (Wallach *et al.*, 1989; Mencher *et al.*, 1989).

بيّنت الدراسات المناعيّة التي أُجريت على المستضدّات الخاصة بطور البيوض المتكيّسة وجود عدد من المستضدّات للبيوض المتكيّسة لطفيلي الأيمريّة تينيلا بلغت أوزانها الجزيئيّة (14 ، 20 ، 22 ،45) كيلو دالتون (Talebi, 1995). بينما وجدت دراسة اخرى سبع مستضدّات لبروتين البيوض المتكيّسة لطفيلي الأيمريّة تينيلا تفاعلت بقوة مع أمصـــــال ممنعة بالحيوانات البوغيّة بالتبصيم المناعي بلغت أوزانها الجزيئيّة (26 ،45 ،64 ،71 ،94 ،105 ،235) كيلو دالتون وأظهرت هذه الدراسة أهمية المستضد البروتيني للبيوض المتكيّسة بانخفاض عدد البيوض المتكيّسة وشدة الضرر الأعوري (Murray and Glauska, 1986).

11- تحضير مستضدّات الأيمريّة الستيداويّة:

أظهرت نتائج الدراسات امكانيّة تحديد وتحضير أهم مستضدّات الأيمريّة من طوري الطفيلي(الحيوان البوغي، البيضة المتكيّسة) ذات القدرة الاستمناعية والمسؤولة عن تكوين الأضداد بعد الخمج التجريبي للأرانب، بدءاً من البيوض المتكيّسة المعزولة من الكبد وتبويغها وتنقيتها.

أ- الخمج التجريبي:

حُدِّدت جرعة الخمج للأرانب من البيوض المتكيّسة للأيميريّة اللازمة لإحداث المرض تجريبيًّاً في دراسات سابقة، ولكنّها لم تكن متماثلةً، وقد وجد الباحثان (Barriga and Arnoni, 1979) أنَّ شدَّة الإصابة تتعلَّق بعدد البيوض المتكيّسة فِي جرعة التحدِّي، حيث أدَّى إعطاء 50 ألف بيضة مُتكيّسة للأرنب الواحد كجرعة تحدي إلى إصابة شديدة ونسبة نفوق عالية وصلت إلى 80% في اليوم 50 بعد الخمج التجريبيّ ، وإنَّ إعطاء 40 ألف بيضة متكيسة للأرنب الواحد تؤدِّي إلى إصابة أقل شدَّة من السَّابقة وبلغت نسبة النفوق 40% في اليوم50 بعد الخمج التّجريبيّ، بينما كانت نسبة النُّفوق 0% عند إعطاء 20 ألف بيضَة متكيّسة كجرعة تحدِّي مع حدوث إصابة خفيفة. على حين تم اكثار البيوض

المتكيّسة للأيميريّة الستيداويّة عن طريق الخمج التجريبي الفموي لأرانب بعمر (3–4) أسابيع بجرعة 30000–50000 بيضة متكيِّسة للأرنب الواحد (Катранджи,1988).

كما أكَّد الباحثان (Percy and Barthold, 1993) ارتفاع شدة الإصابة ونسبة النفوق في الأرانب الصغيرة المخموجة تجريبياً بالأيمريّة الستيداويّة مع ازدياد جرعة الخمج التّجريبيّ، حيث بلغت نسبة النفوقِ (80)% عند إعطاء (100000) بيضة متكيّسة للأرنب. من ناحية أخرى وجد كل من (Balbaa *et al*., 2012 ;Abu-El-Ezz *et al*., 2012) أنّ إعطاء (50000) بيضة متكيّسة متبوّغة للأرنب كافيةً لإحداث المرض، في حين وجد (Abed and Yakoob, 2013) أنَّ إعطاء (40000) بيضة متكيّسة متبوّغة للأرنب تكفي لإحداث المرض، وفي أحدث دراسة للخَمج التجريبيّ بالأيمريّة الستيداويّة أُجريت من قبل (Ali *et al*., 2015)، تمَّ إعطاء (10000) بيضَة مُتكيّسة متبوّغة للأرنب لإحداث الخمج التّجريبيّ.

ب- عزل البيوض المتكيّسة وتبويغها:

يتم الحصول على البيوض المتكيّسة من كبد الأرانب المخموجة أو برازها، وقد أظهرت الدراسات أن إطراح البيوض المتكيّسة في برازِ الأرانبِ يبدأ في اليومِ 16 بعد إحداث الخمج التّجريبيّ(Катранджи,1988; kutkat*et al*.,1998 ;Abdel-Megeed and Abu-El Ezz,2005; المحمد،2017; ونوس،2017). بينما أظهرت نتائج (Barriga and Arnoni,1981) أن إطراح البيوض المتكيّسة بدأ في اليومِ 18 بعد إحداث الخمج التّجريبيّ، يبدأ بعدها عدد البيوض المتكيّسة المطروحة في البرازِ بالإزدياد بشكلٍ يوميّ ليصلَ إلى أعلى مستوى لهُ في اليومِ 20 بعدَ الخَمج (ونوس،2107)، أو اليوم 21 (Abdel-Mageed *et al*., 2005)، أو باليوم 22 (kutkat *et al*.,1998 ;المحمد،2017)، في حين وجدَ كلٌّ من (Lammler and Hein, 1981; Abu-Akkada *et al*.,2010) أنَّ أعلى عددٍ من البيوض المتكيّسة في الرَّوثِ يظهرُ مابين اليومِ17 و 22 بعدَ الخَمج. كما أمكن عزل البيوض المتكيّسة لطفيلي الأيمريّة الستيداويّة من الحوصلة الصّفراويّة والعقيدات المنتشرة في النسيج الكبدي عند الارانب ، وكانت عملية عزلها اسهل من بقية أنواع الأيمريّة (Tomely 1997 ; Катранджи,1988).

يتم عزل البيوض المتكيّسة بطريقة التعويم باستعمال محلول ملح الطعام المشبع، والتي يمكنها أن تتبوغ تجريبياً باستخدام ثنائي كرومات البوتاسيوم، إلا أنَّ سرعة ونسبة تبوغها يختلف من بيئة إلى أخرى. فقد أظهرت نتائج (Катранджи,1988) أن نسبة تبوغ البيوض المتكيّسة للأيميريّة الستيداويّة والتي تم الحصول عليها من الكبد بلغت 97% خلال (11) يوماً، وإلى 85% خلال (15) يوماً، والى 44%

خلال (30) يوماً وذلك عند حضنها بدرجة 25–27 م في محاليل 2,5% ثاني كرومات البوتاسيم، 0,1% تربسين، الماء العادي على التوالي. بينما وصلت هذه النسبة للبيوض التي تم الحصول عليها من البراز الى 98% خلال (5) ايام، وإلى 97%خلال (6) ايام، والى 95% خلال (6) ايام في محاليل 2,5% ثاني كرومات البوتاسيم، 0,1% تربسين، الماء العادي على التوالي. بينما تباينت نسبة تبوغ البيوض المتكيّسة وفترتها مع دراسات أخرى حيث وصلت إلى 92 % خلال (5–7) أيام (المحمد،2017)، وإلى 89 % خلال (3) أيام (ونوس،2017).

ت– تعقيم البيوض المتكيّسة:

يتم تحضير مستضدّات الأيمريّة الستيداويّة من البيوض المتكيّسة المتبوّغة المعقمة، والحيوانات البوغيّة، وذلك عن طريق تعقيم البيوض المتكيّسة المتبوّغة النقية باستعمال محلول هيبوكلوريد الصوديوم Sodium hypochlorite المبرد 6% لمدة 10 دقائق مع التحريك (Davis *et al*.,1973; Abi-Ghanem,2006;الإدريسن2014)، وقد تم تعقيمها بنجاح خلال (2–3) ساعة (Катранджи,1988). وبعدها تغسل بالماء المقطر المعقم للتخلص من الكلور وتحفظ بالدارئة الفوسفاتية (pH=7.4) وبدرجة 4°م أو تستخدم مباشرة".

ت– استخلاص الحيونات البوغيّة:

يتم استخلاص الحيونات البوغيّة sporozoites Excystation من خلال عملية ميكانيكية وهضم أنزيمي للبيوض المتكيّسة المتبوّغة المعقمة، حيث يتم تحطيمها أولاً في زجاجات ذات غطاء تحوي (3.3) غ من الكرات الزجاجيّة Glass beads قطر(0.5) سم (Tahir, 1998)، وخلال (10–15) دقيقة تم التحطيم الميكانيكي لـ 80–85% من البيوض المتكيّسة المتبوّغة للآيمريّة الستيداويّة (Катранджи,1988)، وخلال (3) دقائق البيوض المتكيّسة المتبوّغة للأيميريّة تينيللا حيث تم الحصول على أعداد كبيرة من الكيسات البوغيّة نتيجة تحطيم البيوض المتكيّسة حديثة التبوغ مقارنة بالبيوض المتكيّسة القديمة التي يزيد عمرها عن 3 اشهر بسبب زيادة قساوة جدارها مع مرور الوقت ومن ثم صعوبة تحطيمها(Abi Ghanem,2006; الإدريس،2014).

تخضع بعدها الكيسات البوغيّة إلى الهضم الأنزيمي بمزيج من التربسين trypsin والعصارة الصّفْراويّة rabbit bile التي تم الحصول عليها من الحوصلة الصّفْراويّة للأرانب (المحفوظة في أنابيب ابندورف بالتجميد –20 لحين الاستعمال)، وتتعلق نسبة الاستخلاص بتركيز كلّ من التربسين والصفراء من جهة، وبفترة مكوث الكيسات البوغيّة في هذا المزيج من جهة أخرى. حيث اضيف محلول صفراء الأرانب بنسبة 5–10–20%، ومحلول التربسين بنسبة 0,25 – 0,5 – 1% بنسبة 1:1 وحضّنت في حمام مائي (38–39) م. حيث تم الحصول على النسبة العظمى للحيونات البوغيّة في المزيج المؤلف

من 1% محلول التربسين و20% محلول صفراء فوصلت إلى 99–100% خلال (20) دقيقة، بينما وصلت هذه النسبة 11% عند حضن الكيسات البوغيّة في محلول التربسين فقط خلال ساعة واحدة، على حين معاملة الكيسات البوغيّة بمحلول صفراء فقط لم تؤدي العملية إلى خروج أياً من الحيوانات البوغيّة (Катранджи,1988). على حين أمكن الحصول على 50–60% من الحيوانات البوغيّة عند حضن الكيسات البوغيّة للأيميريّة تنيللا في مزيج مؤلف من 0,25% محلول التربسين و5% من محلول صفراء (Dulski,1990, الإدريسي،2014). تختلف النسبة المئوية للإخراج بالاعتماد على عدة عوامل منها نوع أملاح الصفراء المستخدمة في التجربة فقد ذكر كل من(Patton and Brigman,1979; Abi-Ghanem,2006) أنَّ استخدام حامض Taurodeoxycholic بدلاً من أملاح الصفراء كان أفضل بعملية الإخراج للحيوانات البوغيّة. كما أن استخدام chymotrypsin أعطى نتائج أفضل من استخدامtrypsin (Wang and Stotish, 1975). كما يُعتبر عمر البيوض المتكيّسة عاملاً مهماً جداً في التأثير على النسبة المئويّة للإخراج فكلما كانت البيوض المتكيّسة قديمة كانت نسبة الإخراج قليلة (Abi-Ghanem,2006; Ruff *et al*., 1981). وأشار(Dulski and Turner,1988) إلى حدوث تحلل للحيوانات البوغيّة التي تم اخراجها من البيوض المتكيّسة بعمر أكثر من شهر.

ج- تنقية الحيوانات البوغيّة:

يتم تنقية الحيوانات البوغيّة Sporozoites purification للأيميريّة الستيداويّة عن طريق التثفيل المتدرج على سرعة 700–800 د/ دقيقة (Катранджи,1988)، أو التثفيل باستعمال البركول متدرج الميل Gradient Centrifugation (Percoll)، أو عمود فصل التبادل الأيوني باستخدام مادة الدياسليلوز–52(DE-52 anion exchange chromatography) في تنقية الحيوانات البوغيّة للأيميريّة تنيلا (Riggs and Perryman, 1987; Dulski and Turner,1988; الإدريس،2014). يتم بعدها الحصول على الخلاصة البروتينيّة باضافة دارئة الحلمهة (Lysis buffer) الى راسب الحيوانات البوغيّة النقية وحضنها مدة 24 ساعة على هزاز دائري في درجة حرارة +4 °م. ويتم قياس تركيز البروتين باستعمال طريقة برادفورد (Bradford)، وتعد معايرة البروتينات بهذه الطريقة من الطرائق الدقيقة والسريعة جدا لتقدير كمية البروتينات في الخلاصات الخلويّة، كما وتتطلب كميات قليلة من البروتينات. والمبدأ الأساسي لهذه الطريقة هو استعمال صباغ أزرق الكومازي اللماع G–250 الذي يرتبط مع البروتين ويُكّون معقداً ويمكن أن يتم الكشف عنه بمقياس الطيف الضوئي وبطول موجي 595 نانومتر، اذ تتناسب شدة الامتصاصيّة طردا مع تركيز البروتينات في العيّنة (Bradford,1976). وبالطريقة نفسها يتم تحضير مستضدّات معلق البيوض المتكيّسة عن طريق اضافة دارئة الحلمهة الى

البيوض المتكيّسة المتبوّغة بعد تحطيمها واخضاعها للتجميد (– 20)°م ، والاذابة في حمام مائي بدرجة 45°م (Bradford,1976; Murray and Glauska,1986 ; Talebi, 1995 ; الإدريس،2014) .

ح– الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد(polyacrylamide gel electophoresis):

يعد الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد بوجود مركب سلفات دودوسيل الصوديوم SDS طريقة بسيطة لتوصيف البروتينات، ومقارنتها بعضها ببعض وذلك من خلال فصل مكونات مزيج من البروتينات، وتعيين كتلتها الجزيئيّة النسبيّة وتحديد كميّتها(Laemmli, 1970). إنَّ عمل سلفات دوديسيل الصوديوم هو فصل البروتينات بعضها عن بعض كما تقوم بفصلها عن اللبيدات التي يمكن أن تكون مرتبطة بها. فضلاً عن ذلك تقوم بفصل البروتين إلى السلاسل عديدة الببتيد المكونة له وتزود هذه السلاسل شحنة سالبة متناسبة مع أوزانها الجزيئيّة. وبتمرير تيار كهربائي تهاجر هذه السلاسل عديدة الببيتيد المشحونة بشحنة سالبة من القطب السالب إلى القطب الموجب لجهاز الرحلان الكهربائي حسب كتلها الجزيئيّة النسبيّة (Murray and Glauska,1986 ; Talebi, 1995 ;الإدريس،2014).

تم التعرف على المكونات البروتينيّة لخلاصات البيوض المتكيّسة والحيوانات البوغيّة عند الأيمريّة تينيلا، وقد لوحظ وجود اختلاف في عدد العصائب البروتينيّة وفي ثخانتها (الإدريس،2014). وإن الاختلافات الناتجة بالأوزان الجزيئيّة بين الدراسات لطفيلي الأيمريّة تنيلا قد تعود الى اختلافات التقنية البسيطة المتعلقة بهذه الحجوم و الهلامة المحضرة (Karim *et al*.,1996). بينما ذكر(Stotish *et al*.,1978) أن هناك تغاير بسيط بالوزن الجزيئي لمتعددة الببتيدات بسبب التكسير العشوائي للأجزاء الصغيرة منها اثناء الإذابة، لذلك استخدم كل من (Murray and Glauska,1986) طريقة مختلفة بتحضير البروتينات، عن طريق استعمال جهاز مجانس العينات tissue homogenizer لتحضير البيوض المتكيّسة، بينما استخدما عملية التجميد والإذابة والتكسير باستخدام جهاز الذبذبات فوق الصوتيّة sonicated لتحضير بروتينات الحيوانات البوغيّة.

خ– التبصيم المناعي Western blot:

يتم استخدام هذه التقانة للكشف عن المستضدّات التي تحرض الجهاز المناعي على تشكيل أضداد نوعية، ويمكن بهذه الطريقة التحري عن بروتين ما ضمن مزيج من البروتينات باستعمال الضد النوعي لهذا البروتين. تفصل أولاً البروتينات بالرحلان الكهربائي بعدها تنقل إلى غشاء النتروسيللوز ويحضن الغشاء مع أضداد أولية نوعية ضد البروتين الهدف. ثم تضاف أضداد ثانوية تكون موسومة بأنزيمات مثل انزيم Alkaline Phosphatase، ثم يحدث التفاعل الأنزيمي الذي يعطي راسب ملون في موضع الارتباط بعد إضافة الركيزة الملائمة (Allen and Fetterer,2002).

12- الوقاية والعلاج Prevention and treatment:

تُعتبر الأيمريّة الستيداويّة من الأمراض الفتاكة لدى الأرانب، والتي تؤدي إلى ارتفاع معدل الإصابة والنفوق (Kvicerova *et al*., 2008). تعتمد السيطرة على داء الأكرية على تحسين الإجراءات الصحية، بالإضافة لعلاج الحيوانات المصابة، والوقاية الكيميائيّة باستخدام بعض مضادات الأيمريّات (Ruiz *et al*., 2006).

هناك العديد من الإجراءات الوقائية التي يجب أخذها بعين الاعتبار للحد من تفشي داء الأكرية، حيث أن انخفاض مستوى النظافة، ارتفاع الرطوبة، ارتفاع نسبة الأمونيا وغاز ثاني أوكسيد الكربون، كل هذا يؤدي إلى ارتفاع معدل تبوغ البيوض المتكيّسة للأيميريّة الستيداويّة، وبالتالي زيادة الأطوار المُعدِيَة للطفيلي(Smith and Sherman,2009)، لذلك يجب الحفاظ على بيئة نظيفة في حظائر تربية الحيوان، وتقليل كثافة التربية، وتقديم الأعلاف والمياه النظيفة، مما يقلل من نسبة العدوى عن طريق ابتلاع البيوض المتكيّسة المتبوّغة(Lima,2004). إن البيوض المتكيّسة مقاومة للعوامل البيئية الخارجية، وتزداد مقاومتها بعد حدوث التبوغ (Smith and Sherman,2009)، لكن البيوض المتكيّسة يمكن أن تضعف وتقل أعدادها بتأثير الجفاف، أشعة الشمس، الحرارة وبعض المطهرات ذات التراكيز العالية مثل هيبوكلوريد الصوديوم أو الكريسول (Lima.,2004).

ترتكز القاعدة الأساسية لآليات تأثير مضادات الأيمريّات على الاختلافات الجوهرية في مسالك الأيض Metabolism بين طفيلي الأيمريّة وخلايا الثوي (Shane, 2005). واعتمدت أولى العلاجات (قبل عام 1936) على استخدام الفحم الحيواني وسلفات المغنيزيوم والخل وزيت الخروع كمضاد للأكريات (Horton-smith and Long, 1959 ; الإدريس،2014)، وفي عام 1936 لوحظ أن الكبريت Sulphur كان فعالاً في خفض شدة الإصابة بداء الأكريات والحد من تكون الآفات المرضية شريطة أن يُعطى قبل حصول الإصابة.

تعمل هذه الأدوية على تثبيط الطفيلي أو قتله (Jordan and Pattison, 1977; الإدريس،2014)، وتعتبر الأدوية الوقائية والعلاجية ضد داء الأكريات أهم وأقدم طرائق السيطرة على هذا المرض الطفيلي، التي مازالت تستخدم إلى يومنا هذا، و ذلك من خلال إما إضافتها إلى العلف بصورة مستمرة أو اضافتها إلى الماء خلال فترة زمنية محددة (Adams, 2001).

- أهم الأدوية المستخدمة في السيطرة على داء الاكريات:

1- مجموعة مركبات السلفا Sulphonamides :

قام العالم Levine عام1939 بإدخال مركبات السلفا في علاج الأكريات، وأضاف بذلك تقدماً كبيراً في مجال السيطرة على هذا المرض، وتعد مركبات السلفا من الأدوية الكابحة (الموقفة) للأكريات (Coccidiostatic)، وتعتمد آلية عمل هذه المركبات على إعاقة تكوين حمض الفوليك folic acid داخل الطفيلي, ومن مركبات السلفا المستعملة:

السلفادوكسين Sulphadoxin والسلفاغواندين Sulphguanidine والسلفاميثازين Sulphamethazine والسلفاميثوكزول Sulphamethoxazole والسلفادايزين Sulphadiazine والسلفادايميثكسين Sulphadimethoxin والسلفاكوينوكسالين Sulphaquinoxaline (Soulsby,1982).

2- مجموعة الأيونوفور متعددة الإيتر Polyether ionophorous:

تعمل هذه المضادات على تكوين مركبات دهنية على غشاء الخلية ومن ثم تؤثر في مرور أيونات الصوديوم و البوتاسيوم والكالسيوم إلى داخل الخلية ونتيجة لذلك يتم موت الطفيلي بسبب زيادة الضغط التناضحي داخله (Long, 1978). واستعملت هذه الأدوية منذ عام 1950 وحتى الآن (Adams, 2001)، ومن الجدير ذكره أن تطور المقاومة الدوائية لدى الأيمريّة تجاه مركبات الأيونوفور تكون بطيئة جداً لذلك تعد من أفضل العقاقير المستخدمة في السيطرة على الأكريات. وأهم الأدوية التي تنتمي إلى هذه المجموعة: المونينسين Monensin (Zhu *et al*, 1994)، لاسالوسايد Lasalocide (Adams,2001)، ماديورا مايسين Maduramicin, ناراسينNarasin ، سالنيومايسين Salinomycin (Bowman *et al*., 2003).

3- الامبروليوم Amprolium:

يثبط الامبروليوم تكوين الجيل الأول من المتقسمات ويعمل على اعاقة تكوين الأقسومات والخلايا الجنسية (Mathis and McDougald, 1981)، وكثيراً ما يضاف للأمبروليوم مركب الإيثوبابيت Ethopabate لتعزيز فعاليته وقدرته على قتل الأطوار المختلفة للطفيلي، وترتكز آلية عمل الأمبروليوم على كبح امتصاص الثيامين (فيتامين ب 1) من قبل الطفيلي، وهذا الدواء فعال ضد كل أنواع الأيمريّات وعند كل الحيوانات عملياً (Soulsby, 1982).

4-مجموعة الكينولونات Hydroxyquinolines:

تعمل الأدوية التابعة لهذه المجموعة على تثبيط العمليات التنفسية للحيوانات البوغيّة ومن ثم تمنع تطورها، ومن عيوبها التشكل السريع للمقاومة الدوائية، وتضم هذه المجموعة عدّة أنواع من الأدوية

Atovaquone ،Buparvauone ،Parvaquons ،Nequinate ،Decoquinate ،Buquinolate .(Adams, 2001).

5- كلوبيدولClopidol:

يمزج هذا العقار مع العلف لمنع تطور الأكريات وخاصة تطور الحيوان البوغي (Bowman *et al*., 2003).

6- مجموعة التريازين Triazines:

تضم هذه المجموعة اثنين من أهم مضادات الأيمريّات الفعالة والمستخدمة حالياً وهما التولترازوريل والديكلازوريل، إذ يؤثران في مختلف أطوار الطفيلي عن طريق تداخلهما مع الإنقسام النووي للأطوار داخل الخلوية للطفيلي، ومع نشاط المتقدرات، كما لوحظ تأثيرات أدت إلى تضخم الشبكة الهيولية الداخلية للطفيلي.(V´azquez and V´azquez, 1990) .

كذلك يمكن تطبيق الوقاية الدوائية من خلال إعطاء مضادات الأيمريّات واللقاحات، حيث استخدمت مضادات الأيمريّات على مدى عقود طويلة كإجراء فعال للوقاية من الإصابة بالأيمريّات ، لكن لسوء الحظ فإن العديد من المركبات لم تعد فعالة ضد هذا الطفيلي، بسبب تشكل مقاومة للأدوية(Chapman,1998)، بالإضافة لوجود بعض المشاكل والعقبات الأخرى التي تتعلق باستخدام مضادات الأيمريّات ، حيث أنها أصبحت مشكلة صحية عامة، وذلك لأن فترة الانتظار للعديد من هذه المركبات تبلغ حوالي أسبوع كامل(Kant *et al*.,2013)، وهي فترة طويلة نسبياً، الأمر الذي أثار القلق من وجود بقاء ثمالات هذه الأدوية في لحوم الأرانب مما يشكل خطراً على صحة المستهلك، بالإضافة إلى أنها قد تؤدي إلى تغيير في طعم هذه اللحوم والإقبال عليها(Peek and Landman,2011) .

بينما تتميز اللقاحات بأنها أقل ضرراً من مضادات الأيمريّات من الناحية الاقتصادية والصحية، وقد أُجريت العديد من الدراسات حول لقاحات الأيمريّات، إلا أن معظم هذه الدراسات كانت على الأنواع عند الطيور(Price and Barta,2010 ;Price,2012 ;Jenkins *et al*.,2013 ; Milbradt *et al*., 2014)، باستثناء بعض الدراسات المحدودة التي أُجريت على لقاحات الأيمريّات عند الأرانب بما فيها داء الأكرية الكبدية الذي تسببه الأيمريّة الستيداويّة(Abdel Megeed *et al*.,2005; Akpo *et al*.,2012).

ونظراً لاختلاف البنية المستضدية لسلالات الأيمريّة المعزولة من مناطق متباعدة جغرافياً التي تنعكس على الاختلاف في الاستجابة المناعية والقدرة على تأمين الحماية الفعالة ضد الإصابة. لذلك يفضل استخدام سلالات محلية للحصول على لقاحات فعالة تحقق نتائج جيدة للحماية من داء الأكريات (Anwar *et al*.,2008 ; Danforth,1998 ; Lee,1993 ;Fitz-Coy,1991).

عند حدوث الإصابة بداء الأكرية لابد من تطبيق إجراءات العزل للحيوانات المصابة التي تعاني من الإسهال، للحد من تلوث البيئة والوسط المحيط، وإعطاء جرعة من العلاجات الداعمة للحيوانات المصابة بالأيمريّات مثل المحاليل الملحية لتعويض الشوارد والكهارل، وتعطى المضادات الحيوية واسعة الطيف لمنع حدوث العدوى الجرثومية الثانوية في الغشاء المخاطي للأمعاء، وهو البؤرة الأولية لدخول الطفيلي(Smith and Sherman,2009). وقد استُخدِمَت على مدى السنوات الماضية العديد من مضادات الأيمريّة، للحد من تفشي المرض والتي أظهرت نتائج جيدة، وخاصة عند إعطائها في بداية حدوث العدوى(Darzi *et al*.,2003)، أما عند حدوث الإصابة الحادة فإن هذه المضادات ذات فعالية محدودة، حيث أنها تحد من تطور المرض لكنها لاتقطع تكرار العدوى، وتتمثل آلية عمل هذه المركبات بإعاقة تشكل الأعراس وإنتاج البيوض المتكيّسة، ولذلك فهي مفيدة للحيوانات التي تعاني من إصابة شديدة(Smith and Sherman,2009)، وتُعتبر الإجراءات الوقائية الإدارية والصحية والكيميائيّة مهمة جداً لمنع تفشي داء الأكرية(Iqbal *et al*.,2013).

-الفصل الثاني-

مواد البحث وطرائقه

Material and Methods

مواد البحث وطرائقه Material and Methods-

أُنجزت هذه الدارسة في مخابر كلية الطب البيطري (مخبر الطفيليات– مخبر الدراسات العليا والبحث العلمي) بجامعة حماة، وفي مخابر كلية العلوم بجامعة دمشق. واشتملت الطرائق المتبعة على الخطوات والتقنيات التالية:

أولاً: تحضير البيوض المتكيّسة لـ *E. Stiedae*:

استخدمت البيوض المتكيّسة المتبوّغة sporulated oocysts النقية لـ *E. Stiedae* المأخوذة من عزلة محليه محفوظة بمحلول 2.5% من ثاني كرومات البوتاسيوم بدرجة حرارة +4 °م (مخبر الطفيليات – كلية الطب البيطري– جامعة حماة)، تم بعدها :

1-: الخمج التجريبي :

تم تربية (25) أرنباً من كلا الجنسين وبعمر 6–8 أسابيع وبوزن 500–1000 غ . وضعت الأرانب بدرجة حرارة الغرفة العادية 15–20°م في غرفة خاصة بحيوانات التجارب في كليّة الطب البيطري، حيثُ تمَّ تقسيم الأرانب إلى ثلاث مجموعات، ووضعت داخل أقفاص معدنية ذات قاعدة مصنوعة من الشبك المعدني الذي يسمح بعزل الروث جانباً ضمن أواني معدنية موجودة أسفل كلّ قفص. جهزت الأقفاص بمعالف ومشارب خاصة لكلّ قفص من أجل تقديم العلف المحبب وماء الشرب للأرانب.

وقد تم التأكد تجريبياً من عدم وجود إصابة سابقة بالأيمريّة الستيداويّة وغيرها من أنواع الأيمريّة التي تصيب الأرانب من خلال فحص الروث بطريقة التعويم التركيزي بشكل يومي ولمدة أسبوعين متتاليين قبل البدء بالتجربة للتأكد من خلوها من البيوض المتكيّسة للآيميريات (Abu-El-Ezz *et al*., 2012).

وقد كانت المجموعات الثلاث التي قسمت إليها الحيوانات وفق مايلي :

المجموعةُ الأولى (مج1): شاهد سلبي (أرانب غير مخموجة) مكونة من خمس أرانب.

المجموعةُ الثانيةُ (مج2): شاهد مرضيّ مكونة من عشرة أرانب حيث خمجت الأرانب وتركت دون علاج.

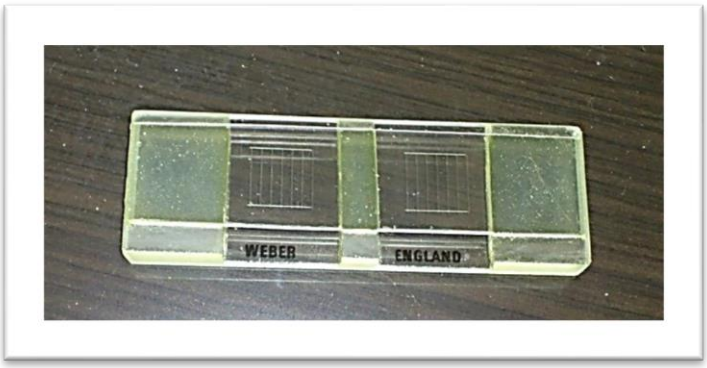
المجموعةُ الثالثةُ (مج3): مجموعة التثبيط المناعي مكونة من عشرة أرانب(مثبطة مناعياً ديكساميثازون فوسفات) بجرعة 0,5 ug/g باليوم لمدة 6 أيام (كاسوحة،2017).

بعد الانتهاء من تثبيط المجموعة الثالثة تم خمج المجموعات الثانية والثالثة بوقت واحد بجرعة خمج تجريبيّ قدرها ($5x10^4$) بيضة متكيّسة متبوّغة للأيميريّة ستيداوية لكلّ أرنب عن طريق الفم ولمرة واحدة (Abu-El-Ezz *et al*., 2012).

2- احصاء عدد البيوض المتكيّسة في البراز:

جمعت عينات البراز بشكل يومي من مناطق مختلفة من أرضية القفص لكلّ مجموعة (Cerioli *et al*., 2008)، لأجل الفحص الطفيلي وذلك اعتباراً من اليوم 14 بعد الخمج (Abu-El-Ezz *et al*., 2012)، وحتى نهاية التَّجربة في اليوم 24 بعد الخمج.

وضعت عينات البراز المأخوذة في أوعية بلاستيكية خاصة ذات غطاء محكم ثمَ وضعت في البراد بدرجة حرارة (4°م)، ريثما يتم فحصها لتحديد عدد البيوض المتكيّسة الموجودة في 1غرام من الروث **Oocyst per Gram** (OPG) باستخدام طريقة ماك ماستر Mc Master الموصوفة منْ قبل كل من (MAFF, 1986 ;Long *et al*., 1976). وفيما يلي شرح بسيط عن طريقة ماك ماستر لعدّ البيوض المتكيّسة في البراز:



الشكل (9): شريحةَ ماك ماستر التي تستخدم لعدّ البيوض المتكيّسة.(ونوس،2017)

- تم وزن 2 غ من البراز حيث وُضع البراز في وعاء بلاستيكي على الميزان.
- ثم أُضيف 28 مل من سائل التعويم (محلول ملحي مشبع) بوساطة السلندر المدرج، ثم حرّكت محتويات البيشر جيداً بوساطة العود الخشبي.
- بعدهَا تم تصفية المعلق البرازيِ بوساطة مصفاة أو قطعة مزدوجة من الشاش الطبي، ووُضع السائل المرتشح في وعاء بلاستيكيٍّ آخر.

– يحرّك السائل جيداً ثم تُؤخذ عينة من المزيج بوساطة ماصة باستور وتُملأ الحجرة الأولى لشريحة ماك ماستر، ثم تُؤخَذ العيّنة الثانية بنفس الطريقة وتوضع في الحجرة الثانية لشريحة ماك ماستر، بعدها تم الانتظار خمس دقائق حتَّى استقر السائل في حجرات العد، وحتى تطفو البيوض المتكيّسة على السطح وتترسب الشوائب في الأسفل.

– وُضع العداد على المجهر الضوئي وتم الفحص بالتكبير 10، ثم عُدَّ كامل البيوض المتكيّسة داخل المنطقة المحفورة في الحجرتين.

ويمكن حساب عدد البيوض المتكيّسة في الغرام على النحو التالي:

a. حساب عدد البيوض المتكيّسة داخل الشبكة في كل حجرة، وتجاهل البيوض خارج الساحات.
b. ضرب المجموع ب 50.

وهذا يعطي عدد البيوض المتكيّسة في كل غرام من البراز(O.P.G.) (Zajac and Conboy, 2012).

3- العزل والتبويغ :

قطّعت أكباد أرانب التجربة التي تم الحصول عليها بعد ذبحها في اليوم 24 بعد الخمج بواسطة جهاز مجانس العينات (Homogenizer, AISS EI AM-3 ACE) وبسرعة 1500دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق لفصل البيوض المتكيّسة غير المتبوّغة.

ثم رُشح المزيج لاستبعاد الأجزاء الكبيرة، والتخلص من السائل العائم بطريقة التثفيل بسرعة 2000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق.

أُضيف بعدها إلى الراسب محلول 2.5%من ثاني كرومات البوتاسيوم، ووضع المعلق في زجاجة سعة 400 مل وبدرجة حرارة 28°م .

تُركت بعدها العيّنة لمدة 5–7 أيام لإتمام عملية التبويغ وفحص المعلق يومياً لملاحظة تكون جسم ستيدي(Stida body) في البيوض المتكيّسة المتبوّغة تحت المجهر (Davis *et al*.,1973; Gibbons *et al*.,2001).

4- التنقية:

نُقيت البيوض المتكيّسة المتبوّغة بطريقة التعويم التركيزي(flotation) باستعمال محلول ملحي مشبع (400غ من كلوريد الصوديوم +1 ليتر من الماء) عن طريق :

- غسلت عينة البيوض المتكيّسة المتبوّغة من ثاني كرومات البوتاسيوم بالماء العادي بأنبوب حجم 100مل بالتثفيل لمدة 10 دقائق بسرعة 2500 د/دقيقة عدة مرات 3–5.
- أضيف المحلول الملحي المشبع (كثافته1.2) إلى الراسب بنسبة 20/1 ومزج جيداً، وأضيف بعدها بهدوء إلى المعلق(3) مل من الماء المقطر.
- ثفلت العيّنة بسرعة 980 g ولمدة 10 دقائق، وسحبت البيوض المتكيّسة النقية من الطبقة الواقعة بين الماء المقطر والملح بواسطة ماصة باستور(أعيدت العملية مرتين)(Rose *et al*, 1984).
- رسبت البيوض المتكيّسة المتبوّغة النقية بإضافة الماء المقطر بنسبة 10:1 في أنابيب اختبار حجم 15 مل وثفلت بسرعة 2500 g لمدة 2–3 دقائق.
- حفظت البيوض المتكيّسة النقية في الدارئة الفوسفاتية (pH=7.4) بدرجة 4°م مدةً لاتزيد عن 3 أسابيع لحين الاستعمال.

5– التعقيم والتخزين:

عُقّمت البيوض المتكيّسة المتبوّغة النقية باستعمال محلول هيبوكلوريد الصوديوم Sodium hypochlorite المبرد 6% اتبعت طريقة (Davis *et al*, 1973) مع بعض التعديل عليها اذ تم ذلك وفق التالي :

- رُسبت البيوض المتكيّسة المتبوّغة النقية وأُضيف إليها محلول التعقيم حجم /حجم في زجاجة حجم25 مل وتركت على حمام ثلجي لمدة 10 دقائق مع التحريك.
- وُزعت العيّنة على أنابيب اختبار معقمة حجم 10 مل وأضيف 2 مل ماء مقطر معقم اليها على الجدران.
- ثُفلت العيّنة بسرعة 1400 g مدة 5 دقائق.
- سُحبت البيوض المتكيّسة المعقمة بواسطة ماصة باستور من الطبقة الواقعة بين الكلور والماء المقطر. بينما احتوى الراسب على الفضلات غير المرغوبة.
- غسلت العيّنة (3–5) مرات بالماء المقطر المعقم للتخلص من الكلور.
- إما أن تحفظ البيوض المتكيّسة المتبوّغة المعقمة بالدارئة الفوسفاتية (pH=7.4) وبدرجة 4°م لليوم الثاني أو تُستخدم مباشرة".
- أُحصي عدد البيوض المتكيّسة باستخدام شريحة عدّ كريات الدم Haemocytometer في الحقول الخاصة بعدّ كريات الدم البيضاء.

ثانياً: تحضير المُسْتَضِد :

تم تحضير مستضدّات الـ E. Stiedae من البيوض المتكيّسة المتبوّغة، والحيوانات البوغيّة وذلك من خلال المراحل التالية :

أ- الحيوانات البوغيّة :

1- استخلاص الحيونات البوغيّة sporozoites:

تم استخلاص الحيونات البوغيّة Excystation of sporozoites من خلال عملية ميكانيكية وهضم أنزيمي للبيوض المتكيّسة المتبوّغة والكيسات البوغيّة بطريقة(Tahir, 1998; الإدريس،2014) مع بعض التعديل وذلك على النحو التالي:

- ثُفل معلق البيوض المتكيّسة المتبوّغة المعقمة والمحفوظة مع الدارئة الفوسفاتية في أنبوب مغطى بحجم 15مل بسرعة 980 g مدة 10 دقائق.
- أُزيل السائل الطافي، واخذ (0.9) مل من الراسب وأضيف إليه كمية مناسبة من الماء المقطر المعقم ، ونُقلت العيّنة إلى زجاجة ذات غطاء تحوي (3.3) غ من الكرات الزجاجية Glass beads (قطر 0.5 سم).
- حطمت البيوض المتكيّسة ميكانيكياً بوساطة الرج الشديد باستخدام جهاز Roto-Mixture (vortex) لمدة (10-15) دقيقة، وتم خلالها فحص قطرة من المعلق مجهرياً كل 30 ثانية للتأكد من تحطم البيوض المتكيّسة المتبوّغة، وأخيراً تم إيقاف العملية عند الحصول على الكيسات البوغيّة والحيوانات البوغيّة.
- بواسطة ماصة باستور، تم سحب المعلق ونقله إلى أنبوب سعة (10) مل، وغسل الكرات الزجاجية بالدارئة الفوسفاتية (pH=7.4).
- تثقيل العيّنة بسرعة 1400 g مدة 2-3 دقائق، والتخلص من السائل الطافي.
- أُضيف إلى الراسب محلول الإخراج المؤلف من (0.25% تربسينtrypsin و5%من العصارة الصّفْراويّة rabbit bile التي تم الحصول عليها من الحوصلة الصّفْراويّة من الأرانب، والمحفوظة في أنابيب ابندورف بالتجميد -20 لحين الاستعمال) وبمقدار حجم/حجم في الدارئة الفوسفاتية ويعدل ب هـ إلى (pH=7.4).

- وُضعت العيّنة في حمام مائي بدرجة حرارة39 °م لمدة ساعة تم خلالها الفحص المجهري لقطرات من العيّنة للتأكد من عملية الإخراج.

- غُسِل معلق الإخراج بمحلول الدارئة الفوسفاتية (pH=7.4) بالتثفيل بسرعة 980 g مدة 10 دقائق تعاد العملية 4 مرات. وقد احتوى الراسب على الحيوانات البوغيّة والكيسات البوغيّة والبيوض المتكيّسة غير المنكسرة وبقايا الأغلفة.

- تم حفظ الراسب بمحلول الدارئة الفوسفاتية بدرجة حرارة +4°م إلى اليوم الثاني أو استعمل مباشرة في تنقية الحيوانات البوغيّة.

2- تنقية الحيوانات البوغيّة:Sporozoites purification:

تم الحصول على حيوانات بوغية نقية باستخدام احدى التقنيتين التالية :

أ-التثفيل باستعمال البركول متدرج الميل Percoll Gradient Centrifugation

-تم استعمال البركول percoll (كثافته1.13غم / مل)، خفف إلى تركيز 90% وباستعمال X10 محلول للدارئة الفوسفاتية وذلك بإضافة 9 أجزاء من البركول إلى حجم من الدارئة الفوسفاتية.

-غسل معلق الحيوانات البوغيّة المستخرجة باستعمال الدارئة الفوسفاتية X1 وبسرعة 4500 دورة/دقيقة مدة 3 دقائق.

- أُعيد تعليق الراسب إلى 60% بركول(أي باضافة 6 مل بركول 90%+ 4مل من X1 الدارئة الفوسفاتية الحاوية على معلق الحيوانات البوغيّة) وثفلت العيّنة بسرعة g10000 ولمدة 2 دقيقة بدرجة 25 °م، إذ تترسب الحيوانات البوغيّة بالقاع بينما تكون الكيسات البوغيّة والبيوض المتكيّسة السليمة والأغلفة تقع بصورة رئيسية بالطبقات العليا (Khalafalla, 2009).

-جُمعت الحيوانات البوغيّة بواسطة ماصة باستور وبحذر من القاع وغُسلت من 2-3 مرات بالدارئة الفوسفاتية (pH=7.4) وعُدّت باستخدام شريحة عدّ كريات الدم Haemocytometer و حفظت بدرجة -20 °م لحين تحضير البروتين.

بَ- عمود فصل التبادل الأيوني باستخدام مادة الدياسليلوز -52 :

DE-52 anion exchange chromatography

المواد:

- صوف زجاجي Glass wool super fine extrafein 11µM

- مادة الدياسليلوز-52

DE-52 (Diethylaminoethyl Cellulose, Pre-Swollen Microgranular Anion Exchanger, Whatman International Ltd, Maidstone, England)

-دارئة الفوسفاتية لعمود الفصل:Phosphate buffer saline

Na_2HPO_4 /L	10,780 g
$NaH_2PO4.H_2O$ /L	0,62 g
Nacl / L	3,4 g
glucose	10,0 g

وتكون القوة الايونية ionic strength = 0.290

و pH = 8.0

وزن 1 غ من الدياسليلوز وتوضع في بيشر حجم 100مل وتخلط جيدا" مع دارئة عمود الفصل وتُترك مدة ساعة لتستقر ويزال الراشح وتعاد العملية 3 مرات بعدها يُترك إلى اليوم الثاني بدارئة عمود الفصل وبدرجة +4°م.

تم تهيئة عمود الفصل بتثبيت المحقن الطبي الزجاجي (حجم 10 مل) بوضع شاقولي على الحامل ووُضعت السدادة (جهاز اعطاء وريدي) للتحكم بسرعة نزول الدارئة الفوسفاتية، يتم التخلص من الراشح على الديا سليلوز ويصب بعدها في داخل المحقنة مع ملاحظة عدم تكون فقاعة ويكون ارتفاعه تقريبا (2 سم) تفتح السدادة بسرعة متوسطة ويترك الديا سليلوز ليستقر وتم الغسل بإضافة 20 مل من دارئة عمود الفصل ويجب عدم ترك الديا سليلوز يجف.

غُسلت عينة الحيوانات البوغيّة المستخرجة بدارئة عمود الفصل بسرعة 3500 g ولمرتين، يُؤخذ الراسب ويُحل في 20 مل بدارئة عمود الفصل (يكون عدد الحيوانات البوغيّة $10x5^{6}$ / مل) ، تصب العيّنة في عمود الفصل المتعادل ويُسمح لها بالنزول خلاله الى مستوى 1مل من الدياسليلوز.

غسل بعدها عمود الفصل بمقدار 50مل بدارئة عمود الفصل (اثناء انزال العيّنة خلطت الطبقة العليا من الديا سليلوز بعود خشبي لمنع انسداده) تُغسل بعدها الحيوانات البوغيّة المنقات بالدارئة الفوسفاتية pH=7.6 وتعد باستخدام شريحة عدّ كريات الدم Haemocytometer وتحفظ بدرجة -20°م ، لحين تحضير البروتين (Riggs and Perryman, 1987).

3- تحضير مستضدّات الحيوانات البوغيّة:

–أُخذت الحيوانات البوغيّة النقية وثُفلت مدة دقيقة واحدة بسرعة 10000 د /الدقيقة في انابيب ابندورف.

–أُضيف الى الراسب دارئة الحلمهة Lysis buffer تتكون من (0.5%Nonidet P40, 10Mm Tris-HCL , Aprotinen 0.1 U/ml ,1% Triton X -100) بدرجة (pH=7.4) وبمقدار 100ماكروليتر لكل 150 مليون حيوان بوغي وحفظ معها مدة 24 ساعة على هزاز دائري في درجة حرارة +4 °م.

– ثُفلت العيّنة مدة 10 دقائق وبسرعة 10000 د /الدقيقة (الإدريس،2014).

– أُخذ السائل الطافي الحاوي على الخلاصة البروتينيّة وتم قياس تركيز البروتين باستعمال طريقة برادفورد(Bradford)، وتم تقسيم العيّنة بأنابيب ابندورف وحفظت بدرجة –20°م لحين الاستعمال.

ب– تحضير مستضدّات البيوض المتكيّسة المتبوّغة :

– أُتبعَت الخطوات نفسها المتبعة اعلاه من (اكثار الطفيلي – تنقية بالملح– تعقيم بالكلور).

– أضيفت كمية قليلة من الدارئة الفوسفاتية PBS (pH=7.6) الى 4x 10^7 من البيوض المتكيّسة في زجاجة حجمية تحوي 3.3غم من الكرات الزجاجية.

– تمت عملية التكسير على الرجاّج Vortex مدة 20 دقيقة.

– سُحِبَ معلق العيّنة (أغلفة البيوض المتكيّسة ، والكيسات البوغيّة، والحيوانات البوغيّة وبعض البيوض المتكيّسة السليمة) بماصة باستور الى زجاجة بحجم 10 مل وغُسلت الكرات الزجاجية بأقل كمية ممكنة من الدارئة الفوسفاتية.

– تجميد واذابة العيّنة: تتم عملية التجميد بالمجمدة –20 °م مدة 4–5 دقائق ومن ثم اذابتها في حمام مائي بدرجة 45°م. (تكرر العملية 3 مرات) .

– إضافة دارئة الحلمهة Lysis buffer كما موضح بالفقره أعلاه.

– ثُفلت العيّنة مدة 10 دقائق وبسرعة 2500 د/دقيقة (الإدريس،2014).

– أخذ السائل الطافي الحاوي على الخلاصة البروتينيّة الكاملة للبيوض المتكيّسة المتبوّغة وقيس تركيز البروتين باستعمال طريقة برادفورد(Bradford)، وقُسّمت العيّنة في أنابيب ابندورف وحُفظت بدرجة–20 °م لحين الاستعمال.

ج: معايرة البروتينات بطريقة Bradford:

تعد معايرة البروتينات بهذه الطريقة من الطرائق الدقيقة والسريعة جدا لتقدير كمية البروتينات من الخلاصات الخلويه، كما وتتطلب كميات قليلة من البروتينات.

-مبدأ الطريقة:

أساس هذه الطريقة هو استعمال صباغ أزرق الكومازي اللماع G-250 الذي يرتبط مع البروتين ويكون معقداً يمكن أن يتم الكشف عنه بمقياس الطيف الضوئي وبطول موجي 595 نانومتر (Bradford, 1976)، اذ تتناسب شدة الامتصاصية طردا مع تركيز البروتينات في العيّنة.

-طريقة العمل:

- تم تحضير أنبوبين ابندورف من كاشف برادفورد بتركيز 0 و 20 ميكروغرام /ميلي ليتر.
- تم معايرة البروتينات في العينات المراد قياس تركيز البروتين فيها (خلاصة بروتين البيضة المتكيّسة و خلاصة بروتين الحيوان البوغي) بوضع 50 ميكروليتر من البروتين+ 50 ميكروليتر من محلول الدارئة الفوسفاتية PBS + 900 مكروليتر من الكاشف (برادفورد) الممدد والجاهز للاستخدام ,BIO BASIC (Canada) Bradford reagent 1X.
- حضنت الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة مدة عشر دقائق، بعدها تقاس الكثافة الضوئية بمقياس الطيف الضوئي(spectrophotometer (PG IL-T70, UK وطول موجة 595 نانومتر.

ثالثاً: جمع عينات الدم Collection Blood Samples:

جُمعت العينات الدمويَّة من أرانب التجربة في اليوم 24 للتجربة، وتمت عملية السحب من القلب مباشرة بعد إجراء التَّعقيم لمكان سحب الدم.

- استُعمل لسحب عينات الدم محاقن سعة(3 أو5) مل، وتراوحت كمية الدم المأخوذة بين(2-5) مل دم، والتي تمّ تفريغها في أنابيب معقمة غير حاوية على مانع تخثر.

- وُضعتْ الأنابيب بشكل مائل قدر الإمكان في درجة حرارة الغرفة من أجل زيادة فصل المصل.

- ثم تم نقلها إلى مخبر الطفيليات في كلّية الطب البيطري بوساطة حافظة مبردة، حيث أخضعت للتثفيل بسرعة(3500) د/الدقيقة لمدة(5) دقائق(Hrubec *et al*., 2004) للحصول على المصل الرائق الذي تم حفظه في أنابيب ابندروف (Eppendroph) المحكمة الإغلاق سعتها 1.5 مل ، وحفظت في المجمدة بدرجة حرارة (-20)°م لحين إجراء اختبار التبصيم المناعي.

رابعاً: الجانب المناعي:

أ- الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد SDS-PAGE

:(sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electophoresis)

– المبدأ:

يعد الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد بوجود مركب سلفات دودوسيل الصوديوم SDS طريقة بسيطة لتوصيف البروتينات، ومقارنتها بعضها ببعض وذلك من خلال فصل مكونات مزيج من البروتينات، وتعيين كتلها الجزيئيّة النسبية وتحديد كميتها(Laemmli, 1970). إنَّ عمل سلفات دوديسيل الصوديوم هو فصل البروتينات بعضها عن بعض كما تقوم بفصلها عن اللبيدات التي يمكن أن تكون مرتبطة بها. فضلاً عن ذلك تقوم بفصل البروتين إلى السلاسل عديدة الببتيد المكونة له وتُزوّد هذه السلاسل شحنة سالبة متناسبة مع أوزانها الجزيئيّة. وبتمرير تيار كهربائي تهاجر هذه السلاسل عديدة الببيتيد المشحونة بشحنة سالبة من القطب السالب إلى القطب الموجب لجهاز الرحلان الكهربائي حسب كتلها الجزيئيّة النسبية.

–المواد المستخدمة في الرحلان الكهربائي:

1. هلامة تركيز العينات البروتينيّة staching gel :

حُضّر 5 مل من هلامة التركيز 5 % المكونة من محلول Acrylamide/bis-acrylamid، ودارئة Tris –HCl pH 6.8، ومحلول سلفات دودوسيل الصوديوم SDS، وفوق سلفات الأمونيوم Ammonium persulfate (APS)، ومحلول تترااميتيل إتيلين دياميد Titramethylethylenediamide TEMED، وذلك بأخذ الحجوم الواردة في (الجدول1).

الجدول(1) المواد الداخلة في تركيب هلامة التركيز

المحلول الأولي	التركيز النهائي	الحجوم اللازمة
Acrylamide-bisacrylamide 30%	5 %	0.833 ml
Tris/HCl (pH =6.8) 1M	0.125 M	0.625 ml
SDS 10%	0.1 %	0.05 ml
APS 10%	0.1 %	0.05 ml
TEMED 1X	0.1 %	10µl
ماء مقطر	كمية تكفي لتحضير 5 مل	3.432 ml

2. هلامة الفصل Resolving gel 15%:

تم تحضير 10 مل من هلامة الفصل 15 % المكونة من محلول Acrylamide/bis–acrylamid، ودارئة Tis–HCl pH 8.8، ومحلول SDS، وفوق سلفات الأمونيوم Ammonium

persulfate، ومحلول تترامیتیل إتیلین دیامایید TEMED. حضرت الهلامة وفقاً للتراكيز الواردة في (الجدول2)

الجدول(2) المواد و الكميات المطلوبة لتحضير 10 مل من هلامة الفصل

المحلول الأولي	التركيز النهائي	الحجوم اللازمة
Acrylamide-bisacrylamide 30%	15 %	5 ml
Tris/HCl (pH =8.8) 1M	375 mM	3.75 ml
SDS 10%	0.1 %	0.1 ml
APS 10%	0.1 %	0.1 ml
TEMED 1X	0.05 %	5 µl
ماء مقطر	كمية تكفي لتحضير 10 مل	1.05 ml

3. دارئة معالجة العينات Samples buffer:

تتكون دارئة معالجة العيّنة من محلول Tis–HCl pH 6.8، ومحلول SDS، والغليسيرول، وبيتا ميركابتو إيتانول β–Mercaproethanol، وأزرق بروموفينول Bromophenol blue حسب (الجدول): تم إضافة دارئة معالجة العيّنة إلى العينات بتركيز نهائي قدره 1X وسخّن المزيج مدة 3 دقائق على الدرجة 95 °م، إذ ضمن هذه الشروط يقوم SDS بالارتباط بالسلاسل البيبتيدية ويفصلها بعضها عن بعض وعن اللبيدات. كما يقوم بتغيير بنيتها ثلاثية الأبعاد، محولاً إياها إلى سلاسل خطيّة، يشحنها بشحنة سالبة عالية. في حين يقوم بيتا ميركابتو ايتانول بتحطيم الروابط ثنائيّة الكبريت بين وضمن السلاسل عديدة البيبتيد.

الجدول(3) المكونات الداخلة في تركيب دارئة معالجة العيّنة واللازمة لتحضير 10 مل من الدارئة المركزة 5 مرات (5X)

المحلول الأولي	التركيز النهائي	الحجوم اللازمة
Tris/HCl(pH=6.8) 1M	16 Mm	0.16 ml
Glycerol	25 %	2.5 ml
SDS	10 %	1 g
β -Mercaptoethanol	5 %	0.5 ml
Bromophenol blue	0.01 %	0.001 g
ماء مقطر Dh2O	كمية تكفي لتحضير 10 مل	6.84 ml

4. دارئة الرحلان الكهربائي Electrophoresis buffer:

تم تحضير 1 ليتر من دارئة الرحلان المكونة من Tris، وSDS، غليسيرول وفقاً للتراكيز النهائية المبينة في (الجدول4) :

الجدول(4) مكونات دارئة الرحلان

المواد	التركيز النهائي	الكمية اللازمة لتحضير 1ليتر
Tris base	25 Mm	3.0285 g
Glycine	192 Mm	14.41 g
SDS	0.1 %	1 g

5. **واسم الأوزان الجزيئيّة Molecular weight markers**:

استخدم واسم أوزان جزيئيّة معيارية من شركة (Vivantis PR0602, Malaysia)، لحساب الأوزان الجزيئيّة للبروتينات بالعينات بعد ترحيلها. ويتكون هذا الواسم من مزيج من احدى عشر بروتينات مأشبة معيارية ملونة مسبقاً تتراوح أوزانها الجزيئيّة بين 10 و175 كيلودالتون.

6. محلول التلوين Staining solution:

يتألف الملون من أزرق الكومازي الملون النوعي للبروتينات، ويتم تحضيره تبعاً للكميات الواردة في (الجدول5):

الجدول(5) مكونات أزرق الكومازي

المواد	الكمية اللازمة
أزرق الكومازي اللماع Coomassie brilliant blue R-250	50 g
كحول ميتيلي	120 ml
حمض الخل الثلجي	200ml
ماء مقطر dH2O	80 ml

7. مزيل اللون Destaining solution:

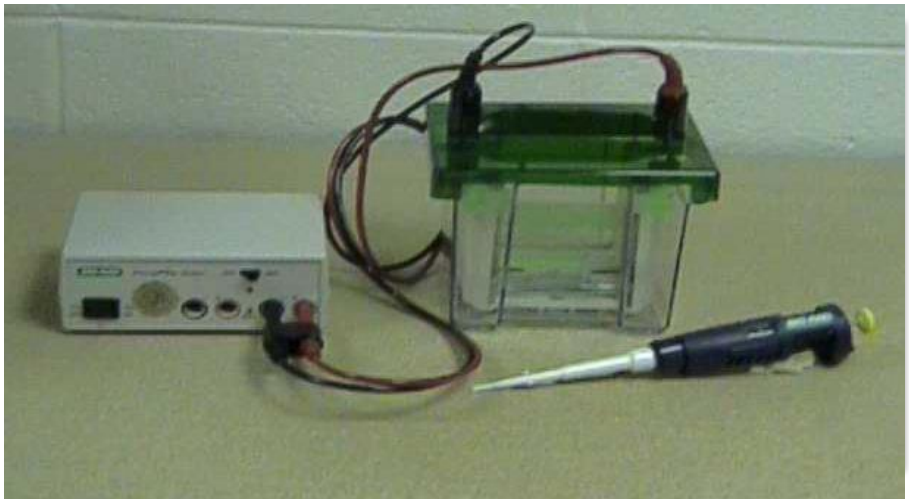
يزيل هذا المحلول الارتباط غير النوعي للملون، ويتم تحضيره حسب (الجدول6):

الجدول(6) المواد المكونة لمزيل اللون

المواد	التركيز النهائي
كحول ميتيلي	30%
حمض الخل الثلجي	10%

- طريقة العمل:

تم استخدام جهاز الرحلان العمودي من شركة (Bio-Rad, USA) (الشكل 10)



الشكل (10). جهاز Bio-Rad للرحلان الكهربائي العمودي للبروتينات

1- تُمسح الصفائح، التي تبلغ أبعادها (10.1× 8.3cm , 10.1× 7.3cm) وسماكتها 0.75 ملم، بشكل جيد بالكحول ثم تترك لتجف ثم يتم تركيبها تمهيداً لصب الهلام.

2- يُحضر 10 مل من هلامة الفصل و 5 مل من هلامة التركيز في انبوبين منفصلين، إذ تُوضع جميع المكونات، ويُترك TEMED ليُضاف مباشرة قبل الصب لمنع بلمرة الهلامة في الأنابيب.

3- تُصب هلامة الفصل، باستخدام ممص مدرج، بين الصفائح الزجاجية. ويُترك حوالي 1سم تحت قمة الصفائح لصب هلامة التركيز. يُضاف فوقها محلول SDS بتركيز 1% فوق هلامة الفصل لتسوية السطح.

4- تُترك الهلامة مدة تتراوح بين 15 -30 دقيقة حتى تتبلمر ثم نتخلص من محلول SDS الموجود على السطح.

5- تُصب هلامة التركيز فوق هلامة الفصل، وتُوضع الأمشاط التي تتكون من عشرة أسنان لتشكيل الآبار اللازمة لوضع العينات البروتينيّة مع الانتباه لعدم تشكل فقاعات هوائية.

6- بعد بلمرة هلامة التركيز، تُنزع الأمشاط بهدوء مع الانتباه لعدم تخريب الآبار. وتُوضع الصفائح بعد ذلك داخل جهاز الرحلان، وتُغمر بدارئة الرحلان.

7- يُحقن واسم الأوزان الجزيئيّة المعيارية والعينات (بعد اضافة دارئة معالجة العينات لها) بتركيز (50 مكروغرام) في الآبار المخصصة بوساطة محقنة هاملتون.

8- يُوصل جهاز الرحلان بمزود الطاقة Power supply، عند 120 فولط ويُنتظر حتى وصول صباغ أزرق بروموفينول الموجود في العينات إلى نهاية الهلامة.

9- بعد انتهاء عملية الرحلان، تُفك الصفائح وتوضع الهلامة مباشرة في ملون أزرق الكومازي، وتُترك من ساعتين إلى ليلة كاملة بدرجة حرارة الغرفة.

10- تُغسل الهلامة بمزيل اللون عدة مرات حتى تظهر العصائب بشكل واضح. وتُوضع الهلامة في النهاية في الماء المقطر.

11- تُصور الهلامة و تُوثق.

12- تُحسب الأوزان الجزيئيّة للعصائب البروتينيّة المختلفة بالمقارنة مع واسمات الأوزان الجزيئيّة المعيارية.

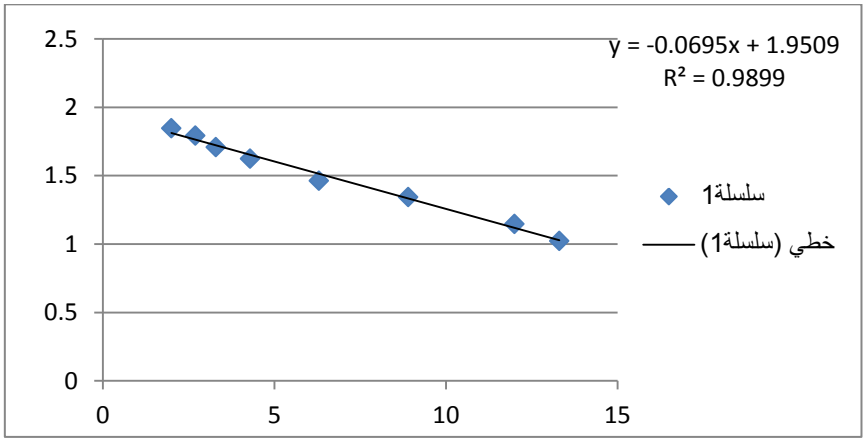
-حساب الأوزان الجزيئيّة:

تُقاس مسافة الرحلان التي تمثل المسافة التي قطعها اللون الأزرق من بداية الهلامة إلى نهايتها، ثم تحسب المسافة التي قطّعتها كل عصابة من عصابات الواسم المستخدم عن بداية الرحلان، ونقوم بحساب الحركة النسبية RF على وفق العلاقة:

RF = مسافة هجرة العصابة للواسم/المسافة الكلية للرحلان

ويتم رسم المنحني البياني للعلاقة بين الحركة النسبية والأوزان الجزيئيّة كما هو مبين في (الشكل11) فتبين وجود علاقة ارتباط قوية إذ بلغت قيمة r^2 **=0.9899** . وبين الحاسب الآلي أن معادلة الخط البياني هي : **y= -0.0695x+1.9509**

باستخدام المعادلة الناتجة تُحسب الأوزان الجزيئيّة للعصابات البروتينيّة المختلفة و ذلك بعد حساب الحركة النسبية لكل عصابة.

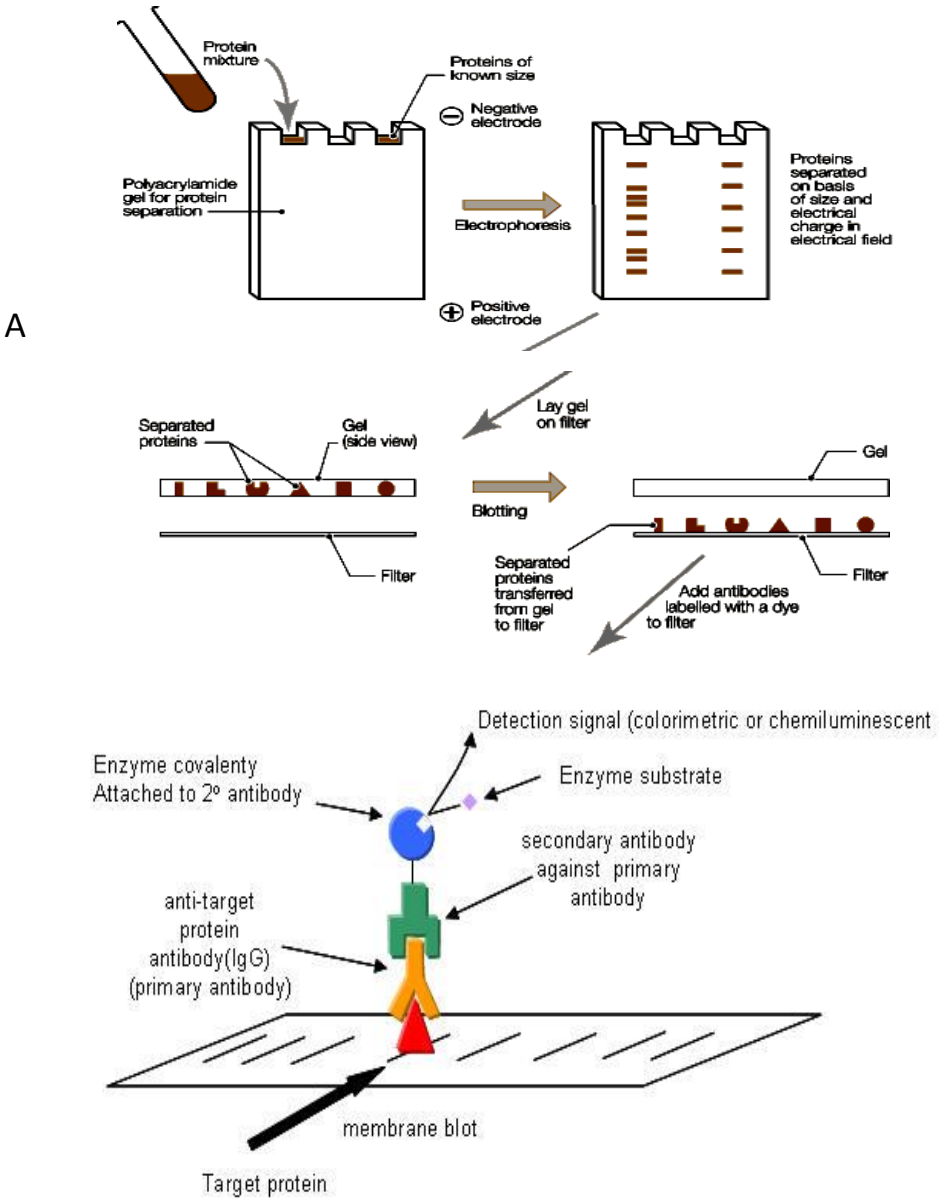


الشكل(11) العلاقة بين الأوزان الجزيئيّة للعصابات البروتينة مع حرّكتها النسبية RF

ب-التبصيم المناعي Western blot

- المبدأ

تم استخدام هذه التقانة لتحديد هويّة البروتينات وذلك بالاعتماد على قدرتها على الارتباط مع أضداد نوعية ويمكن بهذه الطريقة أن نتحرى عن بروتين ما ضمن مزيج من البروتينات باستعمال الضدّ النوعي لهذا البروتين. أولاً تفصل البروتينات بالرحلان الكهربائي بعدها تنقل إلى غشاء النتروسيللوز ويحضن الغشاء مع أضداد أولية نوعية ضد البروتين الهدف. ثانيا تضاف أضداد ثانوية تكون موسومة بأنزيمات مثل انزيم الفوسفاتيز القلوي، ويحدث التفاعل الأنزيمي الذي يعطي راسب ملون في موضع الارتباط بعد إضافة الركيزة الملائمة (الشكل12).



الشكل(12). مراحل التبصيم المناعي: فصل البروتينات بتقنية SDS-PAGE،على هلامة عديد الأكريلاميد (A) ثم نقلها إلى غشاء النتروسيللوز (B) حيث يتم اضافة الأضداد الأولية ثم الأضداد الثانوية الموسومة بأنزيم، لتظهر البروتينات الهدف بعد اضافة الركيزة المناسبة (C).

<u>– المحاليل المستخدمة في التبصيم المناعي:</u>

1. دارئة النقل Transfer buffer pH= 8.1-8.4:

حُضّر 1 ليتر من دارئة النقل المكونة من (Tris –HCl (pH 8.1-8.4، وغليسين Glycine، والكحول الميتيلي. تم تحضير الدارئة على وفق التراكيز الواردة في (الجدول 7) وتم إكمال الحجم حتى 1 ليتر بإضافة الماء المقطر.

الجدول(7) المواد المكونة لدارئة النقل

المواد	التركيز النهائي	الكميات اللازمة لتحضير 1 ليتر
Tris base	25 mM	3.0 28 g
Glycine	192 mM	14.41 g
كحول ميتيلي	20 %	200 ml

2. دارئة التبصيم المناعي (PH=7.5) Tris Buffer Saline -Tween TBS-T:

حُضّر 1 ليتر من دارئة التبصيم المكونة من (Tris –HCL(pH 7.5، و NaCl و Tween-20. تم تحضير الدارئة على وفق التراكيز الواردة في (الجدول 8) وتم إكمال الحجم حتى 1 ليتر بإضافة الماء المقطر.

الجدول (8) المواد المكونة لدارئة التبصيم المناعي

المواد	التركيز النهائي	الكميات اللازمة لتحضير 1 ليتر
Tis –HCl pH 7.5	10 mM	1.2114g
NaCl	154 mM	8.99 g
Tween-20	0.1%	1 ml

3. دارئة الركيزة Substrate buffer:

تم استخدام الدارئة الخاصة للأنزيم المستعمل بالتجربة وهي نتروبلوتترازوليوم NBT و برمو كلورو اندوليل فوسفات BCIP تضاف بمقدار 5 مل.

<u>– طريقة العمل:</u>

– بعد انتهاء عملية الرحلان الكهربائي للخلاصة البروتينة لطفيلي الأيمريّة الستيداويّة، وفصل البروتينات على هلامة الأكريلاميد، تُؤخذ هلامة الرحلان من دون تلوينها، وتُنقل البروتينات إلى غشاء النتروسيللوز (قطر مساماته 0.4µm) بواسطة جهاز التبصيم الرطب (Bio-Rad , USA) الذي يحوي دارئة النقل وبتطبيق تيار كهربائي شدته 250 ميلي أمبير لمدة ساعة ونصف بدرجة حرارة 4 مئوية.

– بعد نقل البروتينات، يُغسل غشاء النتروسيللوز بالماء المقطر مرتين، كل مرة مدة خمس دقائق، لإزالة بقايا الهلام و بقايا عناصر دارئة النقل، ويتم التأكد من نقل البروتينات إلى الغشاء بتلوين الهلامة بعد عملية النقل بأزرق الكومازي ثم إزالة اللون عنها فاذا بقيت الهلامة شفافة فذلك دليل على نجاح عملية النقل وانتقال البروتينات إلى غشاء النتروسيللوز.

– يُغمر الغشاء بدارئة الإشباع Blocking solution التي تتكون من 3 % من ألبومين مصل البقر BSA المنحل في دارئةTBS-T، لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة أو طوال الليل بالدرجة +4 مئوية على هزاز دائري، وذلك لإشباع المواقع غير النوعية على الغشاء.

– يُقص الغشاء الى شرائط ويوضع في أطباق كل على حده ويحضن الغشاء مع الأمصال الحاوية على الأضداد الأولية للأرانب و الممدد بنسبة 1: 1000 في دارئة TBS-T لمدة ساعة كاملة بدرجة حرارة الغرفة على هزاز دائري.

– يُحضن الغشـــاء مع الأضـــداد الثانـــــوية الموســـــومة بالألكالين فوسفاتاز (Immuno Pure Goat Anti-Rabbit IgG,Thermo scientific,USA والموجهة ضد أضداد الأرانب، وذلك بعد تمديدها بنسبة 5000:1 في محلول TBS-T مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة و على هزاز دائري.

– تُفصل جميع المراحل السابقة بغسل الغشاء 3 مرات بدارئة (pH=7.5) TBS-T للتخلص من المواد غير المرتبطة.

– يُحضن الغشاء مع ركيزة الأنزيم في 10 مل من دارئة الركيزة Substrate buffer مع التحريك بلطف باستخدام هزازة دائرية حتى ظهور العصائب التي تدل على المستضدّات الهدف(15–20) دقيقة التي حفزت تشكل الأضداد عند الأرنب المخموج.

– لإيقاف التفاعل يُغسل الغشاء بالماء المقطر بلطف مرتين لمدة دقيقتين.

ج–التحليل الإحصائيStatistical analysis :

اسْتُعمل برنامج SPSS النسخة 20 (SPSS statistical package, version 20 for Windows) لمعالجة البيانات إحصائياً وتحليلها ورسم المنحنيات البيانية.

تم اعتماد اختبار تحليل التباين وحيد الاتجاه one way Analysis of Variance (ANOVA) لدراسة متوسط عدد البيوض المتكيّسة في غرام من البراز بالمقارنة مع الشاهد الايجابي. واعتُبرت القيمة $P< 0.05$ كقيمة يعتد بها إحصائياً وبمستوى ثقة 99%.

-الفصل الثالث-

النتائج

Results

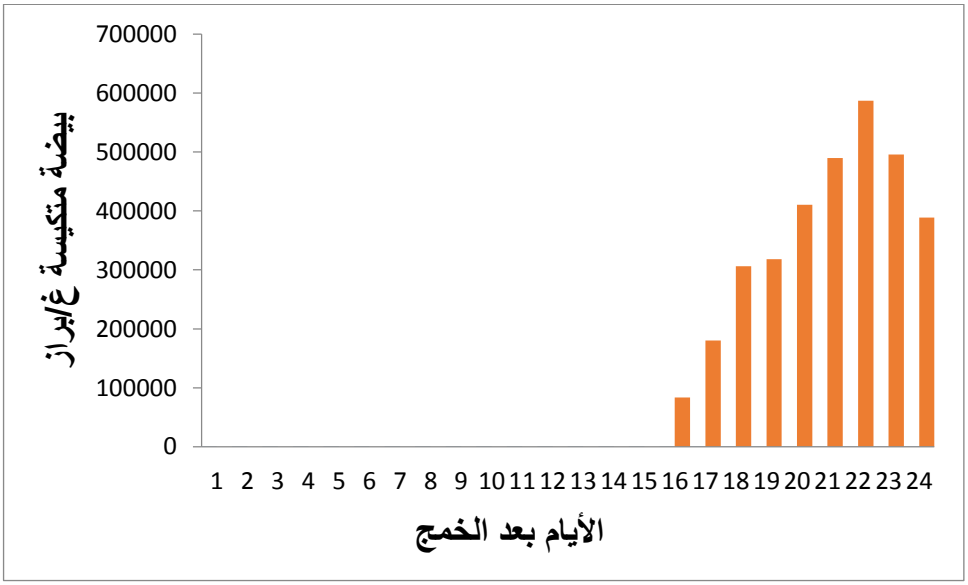
النتائج Results-

أظهرت نتائج الدراسة إمكانية تحديد وتحضير أهم المستضدّات من طوري الطفيلي(الحيوان البوغي، البيضة المتكيّسة) ذات القدرة الاستمناعية والمسؤولة عن تكوين الأضداد بعد الخمج التجريبي للأرانب، بدءاً من البيوض المتكيّسة المعزولة من الكبد وتبويغها وتنقيتها.

1- نتائج احصاء عدد البيوض المتكيّسة المطروحة خلال مرحلة التجربة:

لدى دارسة إخماجية الأيمريّة الستيداويّة المعزولة لأرانب بعمر 6-8 أسابيع والتي قسمت لثلاث مجموعات، مجموعة شاهد سلبي ومجموعة ثُبّطت مناعياً وأخرى سليمة، أظهرت النتائج عدم طرح للبيوض المتكيّسة في براز الأرانب عند مجموعة الشاهد السلبي(مج1) حتى نهاية التجربة، بينما أظهرت النتائج إصابة كل الحيوانات بالطفيلي وطرحه مع برازها في المجموعتين الثانية والثالثة ، إلا أنه تفاوتت الأعداد المطروحة بشكل كبير وواضح بين المجموعتين.

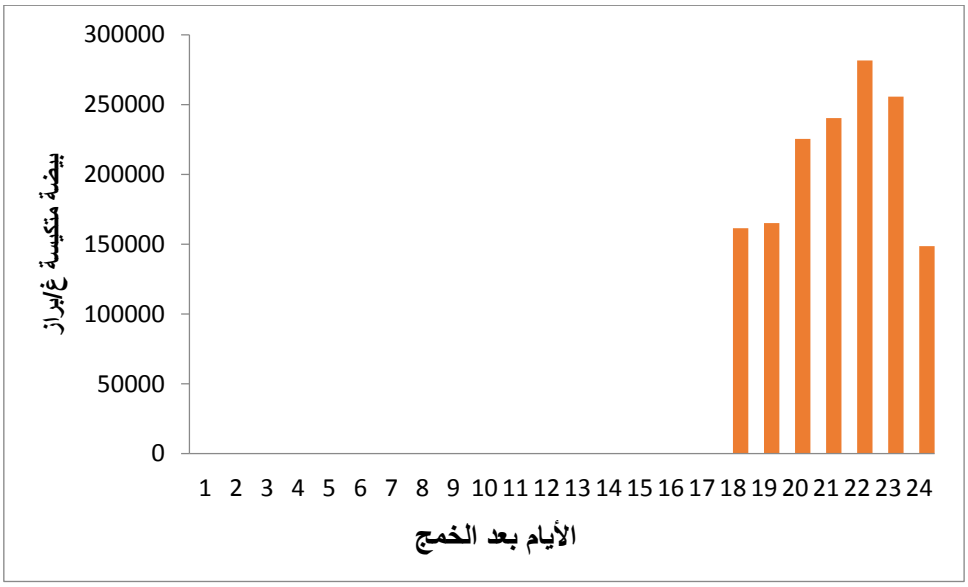
ومن خلال الدراسة سُجّل بدء إطراح البيوض المتكيّسة وعند كل الحيوانات في المجموعة المثبطة مناعياً في اليوم 16 بعد الخمج وبمتوسط قدره 83460 بيضة متكيسة/غ براز (OPG= Oocyst per gram)، وقد بلغ الإطراح قمته في اليوم 22 بعد الخمج بمتوسط (586800) ليتراجع العدد بعدها بشكل كبير في اليوم 24 بعد الخمج بمتوسط (388720) (الشكل 13).



الشكل (13) : متوسطات أعداد البيوض المتكيّسة المطروحة في غرام البراز عند الأرانب المثبطة مناعياً.

أما في مجموعة الأرانب غير المثبطة مناعياً فقد كان اليوم 18 بعد الخمج هو الأول الذي لوحظ فيه وجود البيوض المتكيّسة في البراز المجموع وبمتوسط (161500) وبلغ إطراح البيوض المتكيّسة قمته

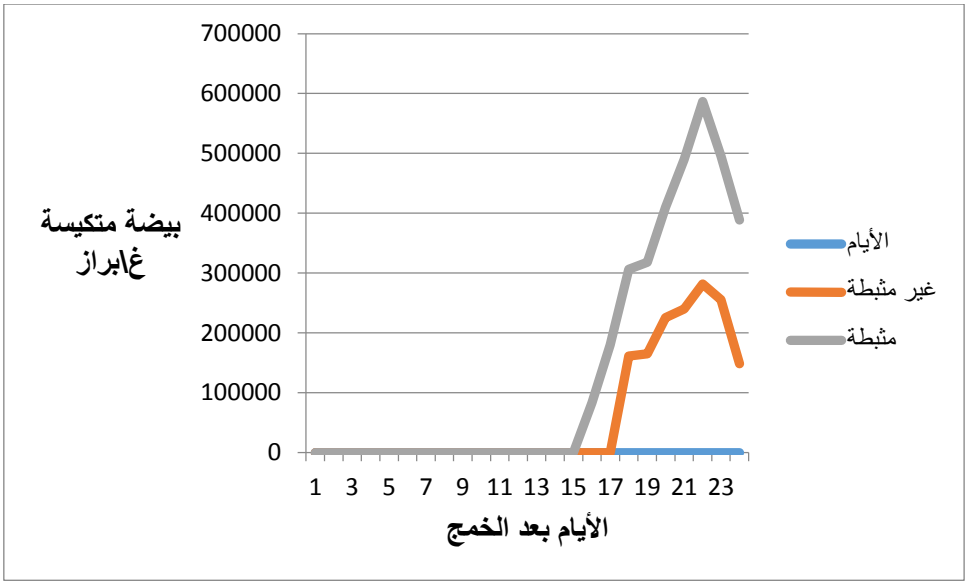
في اليوم 22 وبمتوسط (281530)، ليتراجع العدد بعدها بشكل واضح في اليوم 24 بعد الخمج وبمتوسط (148500) (الشكل 14).



الشكل (14) متوسطات أعداد البيوض المتكيّسة المطروحة في غرام البراز عند الأرانب غير المثبطة مناعياً.

الجدول رقم (9) متوسطات أعدد البيوض المتكيّسة المطروحة في غرام البراز الأرانب (OPG) خلال أيام التجربة عند الأرانب المثبطة وغير المثبطة مناعيا:

الأيام بعد الخمج	متوسطات ال OPG عند الأرانب غير المثبطة مناعيا	متوسطات ال OPG عند الأرانب المثبطة مناعيا
14	0	0
15	0	0
16	0	83460
17	0	180120
18	161500	306400
19	165200	318260
20	225430	410340
21	240220	489890
22	281530	586800
23	255710	495670
24	148500	388720



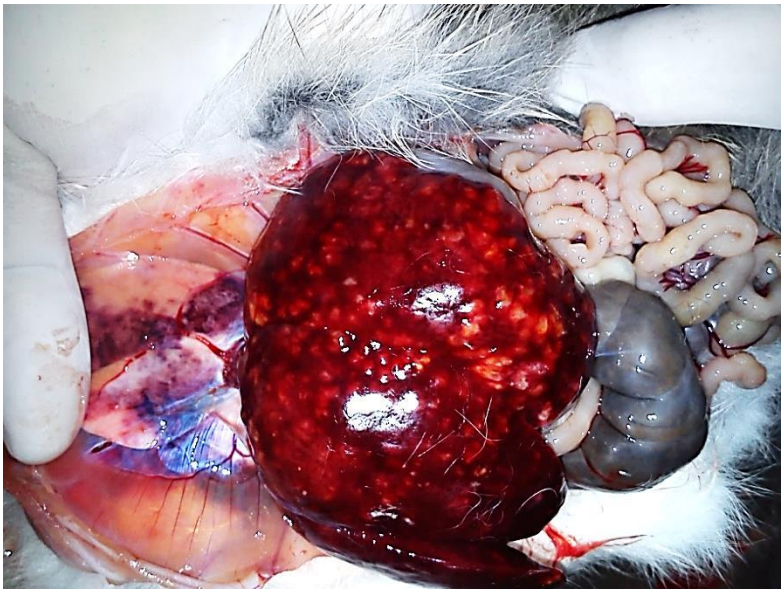
الشكل (15) متوسطات أعداد البيوض المتكيّسة المطروحة في غرام عند الأرانب المثبطة وغير مثبطة مناعياً.

أظهرت نتائج المقارنة الاحصائية للمتوسطات اليومية بين المجموعتين الثانية والثالثة على وجود فروق معنوية عند **P< 0.05**.

2- جمع أكباد الأرانب:

بدت أكباد الأرانب عند مجموعة الشَّاهد السلبيّ (مج1) في نهاية التَّجربة طبيعية، بينما ظهرت آفات شاملة في مجموعة الأرانبِ المصابة بالأيمريّة الستيداويّة (مج2ومج3)، لوحظت التغيرات المرضية الأولية الواضحة في الأمعاء الدقيقة والكبد. كانت الأمعاء الدقيقة متضخمة وممتلئة بمواد غذائيّة نصف صلبة بلون رمادي مخضر. لوحظ وجود حبيبات طعام غير مهضومة في المعي. كما حدث تضخم بالكبد مع وجود عقيدات متنوعة متعددة بيضاء مصفرَّة ذات قطر يتراوح بين 1-2.5 ميليمتر مرتفعة قليلاً، تتجه نحو الالتحام مع بعضها على السطح الحشويّ للكبد بالمقارنة مع أكباد الأرانب الشَاهدة.

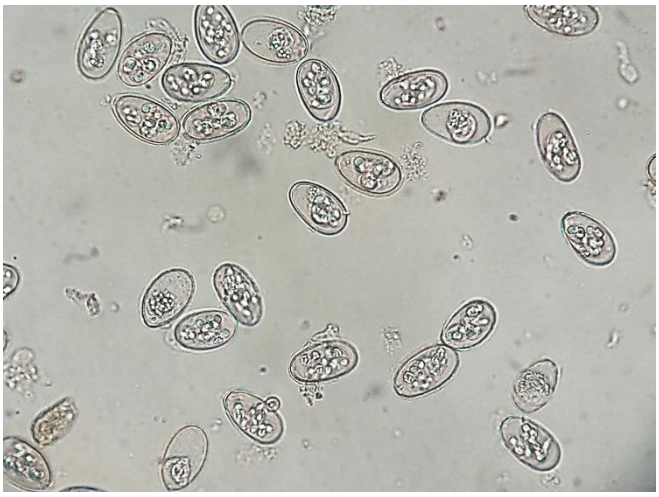
الشكل (16) كبد سليم من مجموعة الشاهد السلبي



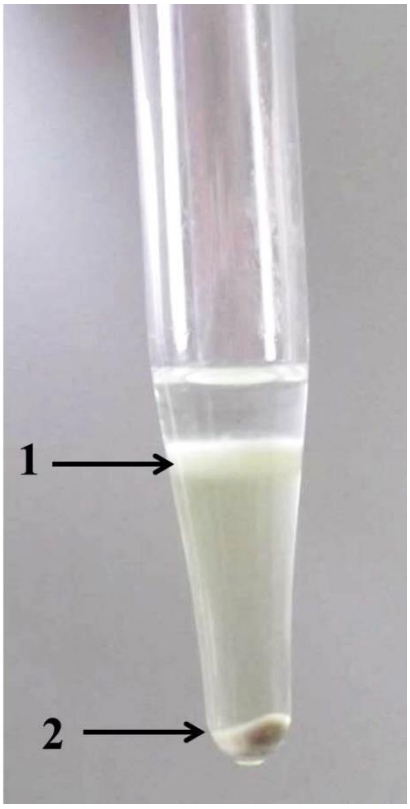
الشكل (17): تضخم الكبد مع وجود عقيدات متنوعة متعددة بيضاء مصفرَّة في مجموعة الشَّاهد المرضي

3-عزل البيوض المتكيّسة وتبويغها وتنقيتها :

بلغ عدد البيوض المتكيّسة المستحصلة من عملية الإكثار هذه حوالي 10^7 بيضة متكيسة لكل مل. ونسبة التبوغ 92% الشكل(18)، مع ملاحظة بدء التبوغ من اليوم الثالث، ثم تم عزلها وتنقيتها بنجاح بالمحلول الملحي المشبع حيث فصلت الشوائب بالراسب بينما شكلت البيوض المتكيّسة طبقة نقية بين طبقة الملح والماء المقطر كما هو موضح بالشكل رقم (19).

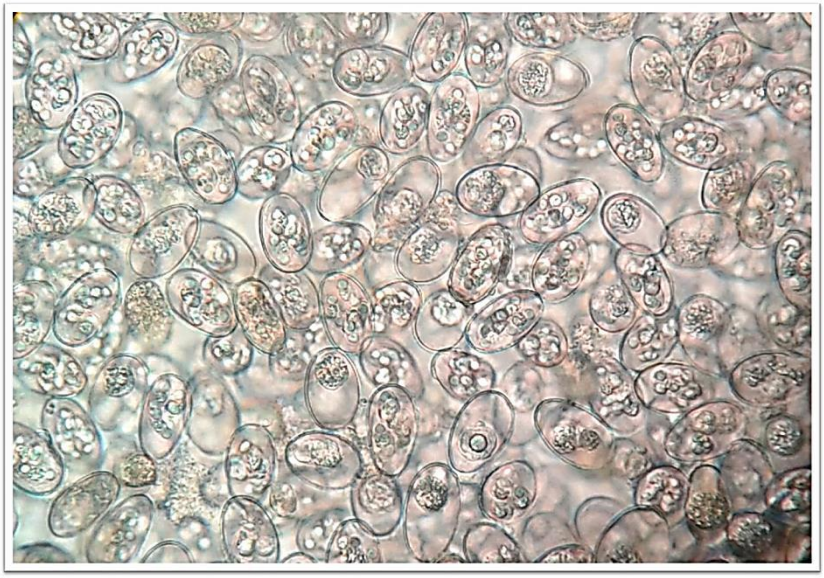


الشكل(18) البيوض المتكيّسة أثناء تبويغها 800X



الشكل(19) تنقية البيوض المتكيّسة.1- طبقة البيوض المتكيّسة النقية 2-راسب الشوائب

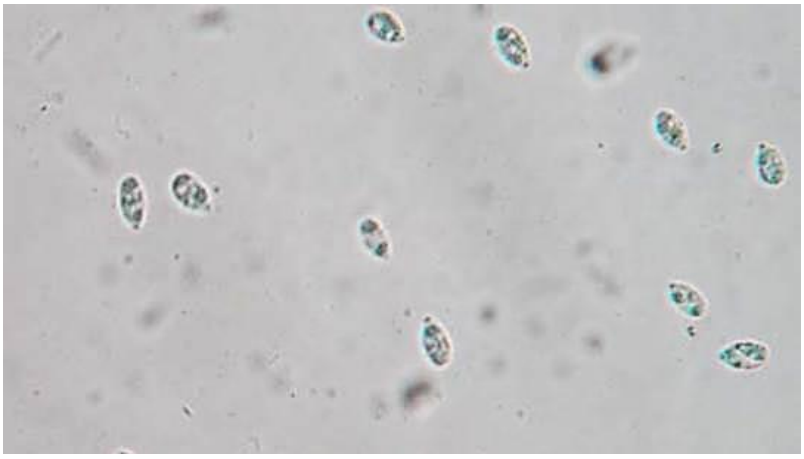
الشكل(20) البيوض المتكيّسة بعد تعقيمها



الشكل(21) البيوض المتكيّسة المعقمة المعدة للتكسير 800X

4- تحضير مستضدّات الأيمريّة :

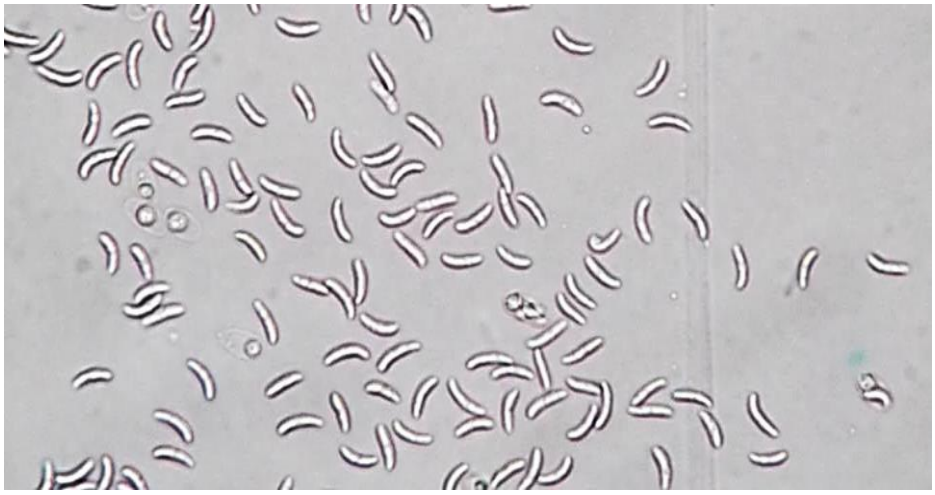
سُجلّت نسبة الإخراج للحيوانات البوغيّة من الكيسات البوغيّة بحدود 50-60% وذلك بعد حضنها لمدة ساعة، وقد أظهرت النتائج تأخر وانخفاض في نسبة الحصول عليها عند استخدام البيوض المتكيّسة التي يزيد عمرها عن ثلاثة اشهر الشكل (23).



الشكل(22) الكيسات البوغيّة بعد عملية التحطيم 800X

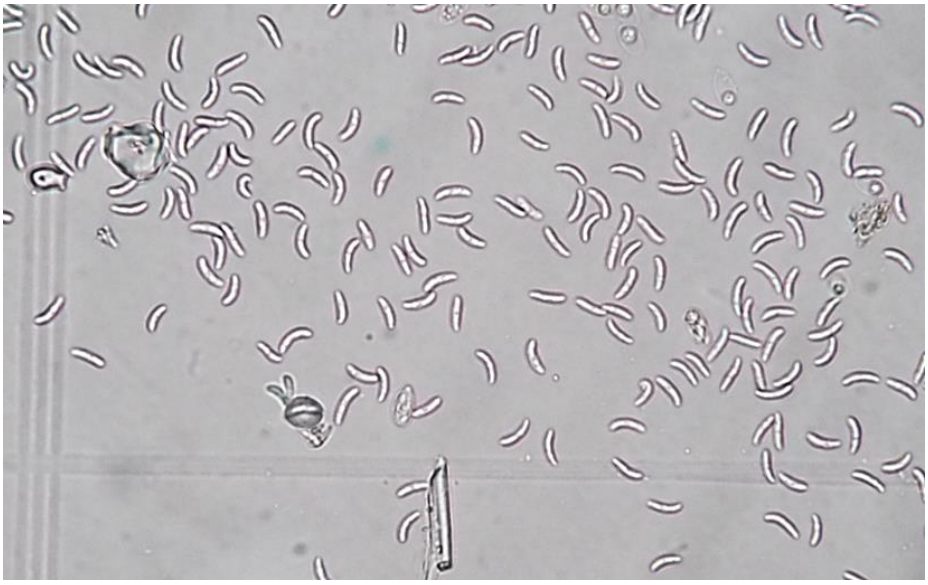
الشكل(23) الحيوانات البوغيّة بمحلول الإخراج X400

تباينت نتائج عملية تنقية الحيوانات البوغيّة حسب الطريقة المستخدمة. حيث كانت التنقية الأفضل باستعمال البركول متدرج الميل وبالسرعة 10000 g ولمدة 2 دقيقة بدرجة 25 م.



الشكل(24) الحيوانات البوغيّة بالتنقية بالبركولX400

بينما تميّزت طريقة التنقية باستخدام عمود الفصل بالحصول على عدد كبير من الحيوانات البوغيّة، لكنها كانت أقل نقاوة من استعمال طريقة التنقية بالبركول متدرّج الميل.



الشكل(25) الحيوانات البوغيّة بالتنقية بعمود الفصل x400

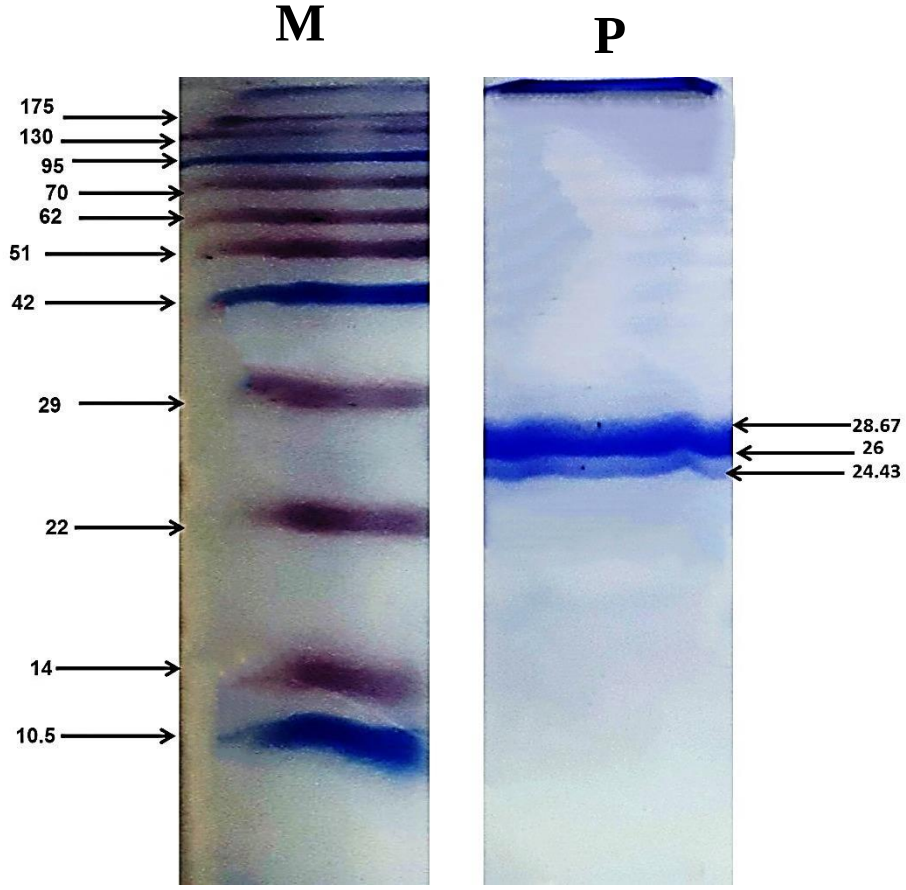
5- <u>تحضير الخلاصات البروتينيّة للحيوانات البوغيّة والبيوض المتكيّسة</u>:

كانت تراكيز البروتينات في خلاصة البروتين للحيوانات البوغيّة (10^7) تحتوي على مقدار 98 مكروغرام / 50 مكرولتر وحجم العيّنة 3.5 مل . بينما بلغ تركيز البروتين في عينة البيوض المتكيّسة المتبوّغة (10^7) تحتوي على مقدار 86 مكروغرام / 50 مكروليتر وحجم العيّنة 5 مل.

6- فصل مكونات الخلاصات البروتينيّة بالرحلان الكهربائي SDS-PAGE:

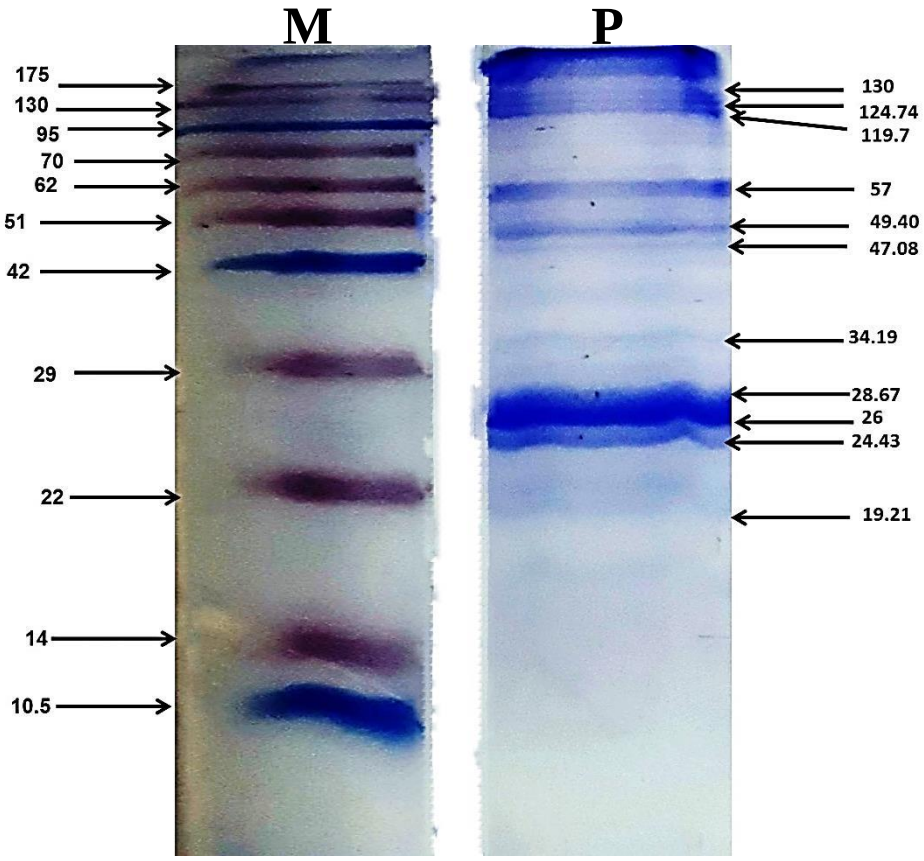
تم تحديد الأوزان الجزيئيّة لجميع العصائب بالمقارنة مع واسمات الأوزان الجزيئيّة المعيارية، وتبين وجود اختلاف في عدد العصائب البروتينيّة وفي ثخانتها.

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي للخلاصة البروتينيّة المحضرة من حلمهة طور الحيوانات البوغيّة وجود حوالي 3 عصائب، وتميزت هذه العصائب بكونها شديدة التلون بصبغة أزرق كومازي وبلغت أوزانها الجزيئيّة (24.43- 26- 28.67) كيلو دالتون، واعتبرت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور من حياة الطفيلي الشكل (26).



الشكل (26) الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة طور الحيوان البوغي.
M، تمثل الأوزان الجزيئيّة للواسمات المعيارية. P، الخلاصة الخلوية لطور الحيوان البوغي
تشير الخطوط الى العصائب الرئيسة والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئيّة بالكيلو دالتون

بينما لوحظ في الخلاصة البروتينيّة الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيّسة حوالي 11 عصابة تراوحت أوزانها الجزيئيّة بين (19.21 - 130) كيلو دالتون، وتميزت خمسة عصائب منها بكونها شديدة التلون بلغت أوزانها الجزيئيّة (24.43 -26 -28.67 -49.4 -57) كيلو دالتون، واعتبرت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور من حياة الطفيلي، الشكل(27) .



الشكل (27) . الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة البيوض المتكيّسة.
M، تمثل الأوزان الجزيئيّة للواسمات المعيارية. P، الخلاصة الخلوية لطور البيوض المتكيّسة. تشير الأسهم الى العصائب الرئيسة والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئيّة بالكيلو دالتون

ولدى مقارنة النتائج التي حصلنا عليها بالرحلان الكهربائي للخلاصات البروتينيّة لطوري الحيوانات البوغيه والبيوض المتكيسة، تبين وجود عدد من المستضدّات المشتركة وهي البروتينات ذات الأوزان الجزيئيّة: (24.43– 26– 28.67) كيلو دالتون. جدول (10)

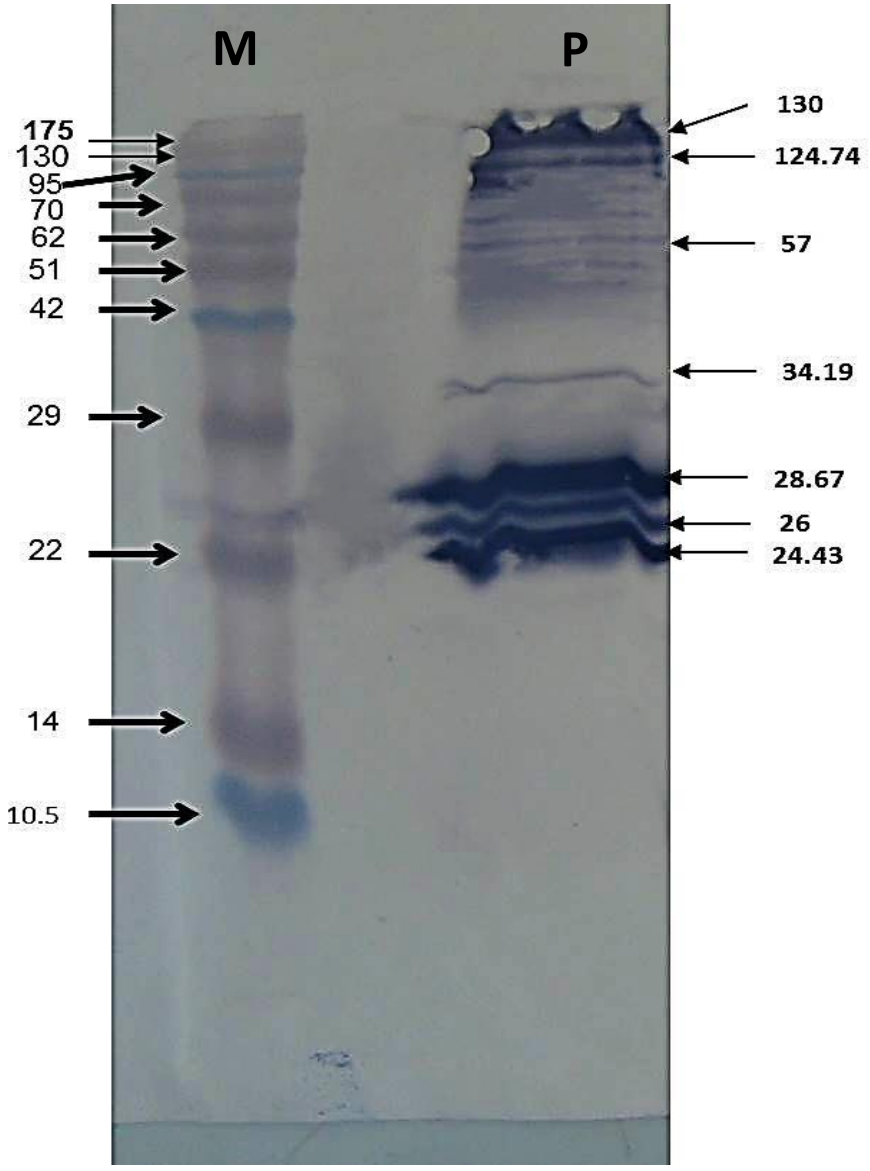
جدول(10) مقارنة البروتينات في الخلاصات الخلوية في الطورين
(البيوض المتكيّسة والحيوانات البوغيّة) لطفيلي الأيمريّة الستيداويّة

بروتينات البيوض المتكيّسة	بروتينات مشتركة بين الطورين	بروتينات الحيوانات البوغيّة
19.21 KDa	24.43 KDa	24.43 KDa
24.43 KDa	26 Kda	26 Kda
26 KDa	28.67 Kda	28.67 Kda
28.67 KDa		
34.19 KDa		
47.08Kda		
49.4 KDa		
57 KDa		
119.7 KDa		
124.74KDa		
130 KDa		

7- دراسة القدرة الاستمناعية لمكونات الخلاصات البروتينيّة بتقانة التبصيم المناعي:

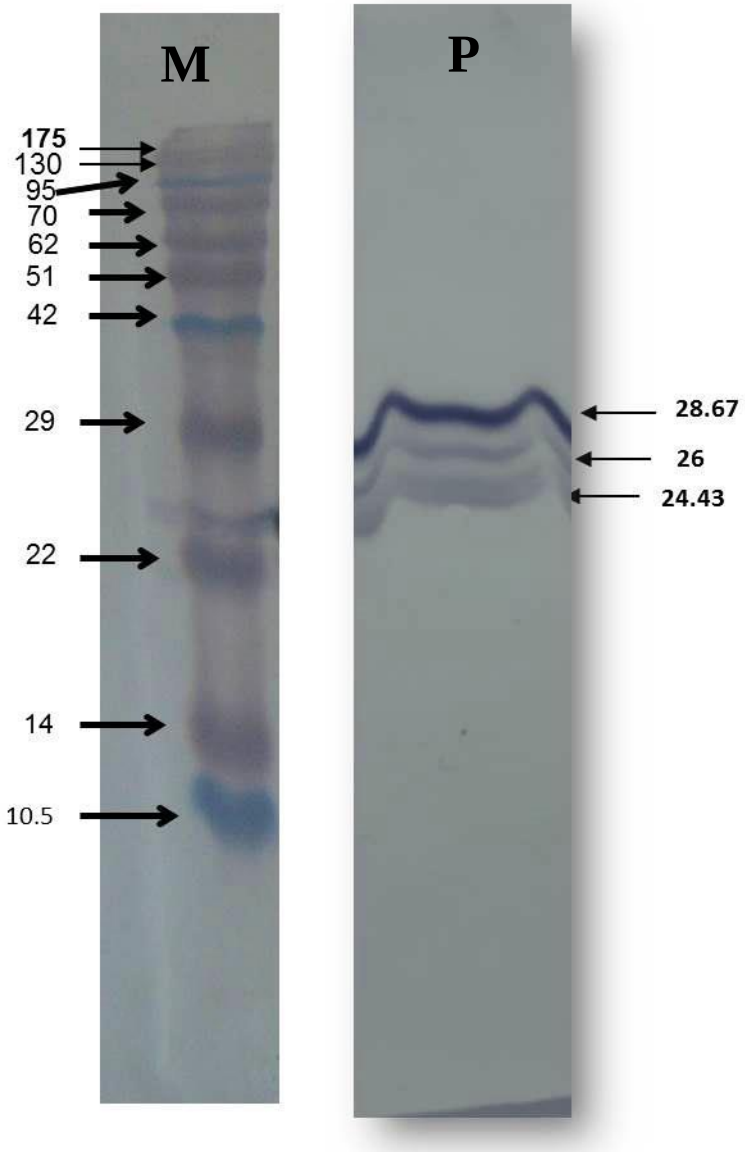
كشفت نتائج التبصيم المناعي باستخدام مصل الأرانب المجموعة في اليوم 24 بعد الخمج وتحضينها مع البروتينات الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيّسة عن عدد من المستضدّات ذات القدرة الاستمناعية والتي بلغت أوزانها الجزيئيّة (24.43-26-28.67-34.19-57-124.74-130) كيلو دالتون.

كما لوحظ عند وضع الركيزة ظهور العصائب ذات الأوزان الجزيئيّة(24.43، 26، 28.67) كيلو دالتون بسرعة وبوقت واحد خلال الدقيقة الأولى من التفاعل مما يدل على أنها تمثل البروتينات السائدة وبعد دقيقتين ظهرت العصائب الأخرى. الشكل (28)



الشكل (28). التبصيم المناعي لمستضدّات البيوض المتكيّسة لطفيلي الأيمريّة الستيداويّة. (P) مصل الأرانب باليوم 24 بعد الخمج. (M)، واسم الأوزان الجزيئيّة تشير الأسهم الى العصائب الرئيسة و الأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئيّة بالكيلو دالتون.

بينما ظهرت ثلاث عصائب شديدة التلوين تبلغ أوزانها الجزيئيّة: (24.43، 26، 28.67) كيلو دالتون من استخدام مصل الأرانب المجموعة في اليوم 24 بعد الخمج وتحضينها مع البروتينات الناتجة عن حلمهة طور الحيوان البوغي. الشكل (29)



الشكل (29). التبصيم المناعي لمستضدّات الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة الستيداويّة. (P) مصل الأرانب باليوم 24 بعد الخمج. (M)، واسم الأوزان الجزيئيّة تشير الأسهم الى العصائب الرئيسة و الأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئيّة بالكيلو دالتون.

-الفصل الرابع-

المناقشة

Discussion

Discussion المناقشة-

تعدُ الأيمريّة الستيداويّة إحدى أكثرِ أنواعِ الأيمريّة إمراضيةً فِي الأرانبِ مسببةً إصابةً شديدةً وزيادةً فِي معدلِ الوفياتِ (EL-Akabawy *et al*., 2004; Hauptman *et al*., 2001) حيث تتطفلُ ضمنَ الخلايَا الظهاريةِ للقناةِ الصّفْراويّة مسببةً تلفَ الكبدِ الحادِّ وخسائرَ اقتصاديةً كبيرةً (Zerrin and Yesari, 2006)، وتشيرُ الأبحاثُ إلى ندرةِ الدراساتِ حولَ الأيمريّة الستيداويّة، لذلكَ هدفتْ هذهِ الدراسةُ إلى تحديد المستضدّات ذات الفعالية الاستمناعية في كل من طوري البيضة المتكيّسة والحيوان البوغي من عزلة محلية.

يعد طور الحيوانات البوغيّة هو الطور الغازي للخلايا الظهارية, ومن المعروف أن هنالك تماس بين المستضدّات السطحية لهذا الطور مع الخلايا الظهارية للمضيف وهي جزيئات مهمة لالتصاق الحيوانات البوغيّة بمستقبلات غشائية على الخلايا الظهارية, وهذه الآلية ضرورية لتحقيق عملية اجتياح الخلايا (Martin *et al*., 1997). لذا تركزت معظم الدراسات المناعية على اختيار طور الحيوان البوغي لتحضير اللقاح (Brothers *et al*., 1988; Danforth and McAndrew, 1987).

تمحورت دراستنا حول طورين رئيسين من دورة حياة الأيمريّة الستيداويّة وهما الطور الخامج، البيوض المتكيّسة المتبوّغة, والطور الغازي للخلايا الظهارية للقنوات الصّفْراويّة وهو الحيوانات البوغيّة.

أظهرت الدراسة نجاح عملية عزل واكثار البيوض المتكيّسة من الكبد وتبويغها، مع ملاحظة أنّ عملية الاكثار عند أرانب المجموعة الثالثة المثبطة مناعياً كانت أكثر جدوى نتيجة لطرح عدد أكبر من البيوض المتكيّسة.

أظهرت النتائج بدء إطراح البيوض المتكيّسة في براز أرانب المجموعة الثانية في اليومِ 18 بعد إحداث الخمج التّجريبيّ، وقد توافق ذلك مع (Barriga and Arnoni,1981)، بينما أظهرت نتائج كل من (Abdel-Megeed and Abu-El Ezz,2005;kutkat*et al*.,1998 ;Катранджи,1988; المحمد،2017; ونوس،2017) بدء إطراح البيوض المتكيّسة في اليومِ16 بعد إحداث الخمج التّجريبيّ، وقد يعود ذلك إلى محتوى الجرعة الخامجة أو العمر(Barriga and Arnoni,1981)، رغم أن ذلك يعد متقارباَ عملياً.

وأظهرت دراستنا ازدياد عدد البيوض المتكيّسة في البرازِ بشكلٍ يومي ليصلَ إلى أعلى مستوى لهُ في اليومِ 22 بعدَ الخَمج في كلٍّ من المجموعتين الثانية والثالثة، كما في نتائج (kutkat *et al*.,1998 ;المحمد،2017)، في حين وجدَ كلٌّ من (Lammler and Hein, 1981;

Abu- Akkada *et al*.,2010) أنَّ أعلى عددٍ من البيوض المتكيّسة في الرَّوثِ يظهرُ مابين اليومِ17 و 22 بعد الخَمج، بينما كان عند (ونوس،2017) في اليوم 20 وعند (Abdel-Mageed *et al*., 2005) في اليوم 21، ويمكنُ تفسيرُ هذا الاختلاف تبعاً لاختلافِ جرعةِ الخَمج بالأيمريّة وعمرِ الحيوانِ أو وجود عوامل إجهاد مرافقة للتجربة (Abu-El-Ezz *et al*., 2012)، تيعد ذلك متقارباً من الناحية العملية.

بلغَ أعلى عدد للبيوض المتكيّسة في البرازِ عند (مج2) في هذهِ الدّراسةِ (281530) OPG ، حيث كانت النتائج مشابهة لدراسة (Nadia *et al*.,2012)، وكان العددُ متقارباً مع نتائجِ (Abu-El-Ezz *et al*., 2012) حيث بلغَ أعلى عددٍ للبيوض المتكيّسة في البرازِ(276860) ، وكذلك مع نتائج (المحمد،2017) الذي وجد في دراسته أعلى عدد للبيوض المتكيّسة في البراز(288321)، ومع نتائجِ (Abdel-Megeed and Abu-El Ezz, 2005) الذي وجدَ في دراستِه أنَّ أعلى عددٍ للبيوض المتكيّسة في البرازِ (251750) ، في حين أنَّهُ كان أعلى ممَّا وجدَه (kutkat *et al*., 1998) الذي وجدَ أنَّ أعلى عددٍ للبيوض المتكيّسة في البرازِ (50300) ، بينما كانَ العددُ أقلَّ ممَّا أثبتَه (Cam *et al*., 2006) (1121000)، ويمكنُ تفسيرُ هذا الاختلاف في عددِ البيوض المتكيّسة المطروحةِ تبعاً لاختلافِ جرعةِ الخَمج بالأيمريّة وعمرِ الحيوانِ أو وجود عوامل إجهاد مرافقة للتجربة ووزن الحيوان نفسه(Abu-El-Ezz *et al*., 2012).

كما أظهرت نتائج هذه الدراسة بدأ إطراح البيوض المتكيّسة في برازِ أرانبِ المجموعة الثالثة المثبطة مناعياً في اليومِ 16 بعد إحداث الخمج التّجريبيّ، وبلغَ أعلى عدد للبيوض المتكيّسة في البرازِ(586800). حيث تشير بعض الدراسات الى أنَّ الاستجابة المناعية تجاه الأكريات هي استجابة مناعية خلوية الوساطة لكون الطفيلي داخل خلوي (Bhogal *et al*., 1989; Martin *et al*.,1994), كما وجد (Billingham *et al* .,1951) أن مركبات القشرانيات السكرية تقوم بكبت كل من المناعة الخلطية والمناعة الخلويّة في حيوانات التجربة وهذا مايفسر سبب زيادة طرح عدد البيوض المتكيّسة في المجموعة الثالثة المثبطة مناعياًعن المجموعة الثانية غير المثبطة مناعياً.

تم عزل البيوض المتكيّسة لطفيلي الأيمريّة الستيداويّة من أكباد الأرانب عن باقي الفضلات بالطريقة التي استخدمها (Dalloul *et al*., 2003) والتي تم تطبيقها على الأيمريّة تنيلا، وكانت عملية عزلها اسهل من بقية أنواع الأيمريّة واتفقنا بذلك مع Tomely (1997). ثم أخضعت بعدها لعملية التبويغ بثاني كرومات البوتاسيوم، حيث تم الحصول على تبوغ بنسبة 92% خلال (5–7) أيام بدرجة 25–28مْ واتفقت مع (المحمد،2017)، وكانت متقاربة مع (Катранджи,1988) حيث بلغت نسبة

التبوغ في نفس المحلول 97% خلال (11) يوماً، في حين استغرق التبوغ عند (ونوس،2017) ثلاثة أيام، وقد يعود تفسير ذلك بسبب الاختلاف في درجة حرارة التحضين أو عمر البيوض المتكيّسة.

تم تنقية البيوض المتكيّسة المتبوّغة بطريقة التعويم باستعمال محلول ملح الطعام المشبع وتعقيمها بمحلول هيبوكلوريد الصوديوم(الإدريس،2014)، أخضعت بعدها للتحطيم حيث تم الحصول على أعداد كبيرة من الكيسات البوغيّة نتيجة تحطيم البيوض المتكيّسة حديثة التبوغ باستعمال الكرات الزجاجية مقارنة بالبيوض المتكيّسة القديمة التي يزيد عمرها عن 3 اشهر بسبب زيادة قساوة جدارها مع مرور الوقت ومن ثم صعوبة تحطيمها، وقد اتفقت نتائجنا مع (Abi Ghanem,2006; الإدريس،2014). تراوحت مدة التحطيم الميكانيكي مع الكرات الزجاجية للبيوض المتكيسة المتبوغة 10–15 دقيقة واتفقت بذلك مع (Катранджи,1988)، بينما بلغت 3 دقائق للبيوض المتكيّسة المتبوغة للأيميريّة تنيلا عند (الإدريس،2014).

تم اخراج الحيوانات البوغيّة من الكيسات البوغيّة باضافة التربسين0.25% والصفراء5% الى محلول الاخراج مما أدى الى ذوبان غطاء الكيسات البوغيّة وخروج الحيوانات البوغيّة منها, حيث تراوحت نسبة الإخراج 50–60%خلال ساعة. وتعد هذه الطريقة الأكثر استخداماً واتفقت مع (Dulski,1990 ; الإدريس،2014)، بينما بلغت 99–100% في محلول 1% تربسين و 20% محلول صفراء خلال 20 دقيقة عند (Катранджи,1988).

تختلف النسبة المئوية للإخراج بحسب عدة عوامل منها نوع أملاح الصفراء المستخدمة في التجربة فقد ذكر كل من Abi Ghanem (2006) و Patton and Brigman, (1979) أنَّ استخدام حامض Taurodeoxycholic بدلاً من أملاح الصفراء كان أفضل بعملية الإخراج للحيوانات البوغيّة. كما أن استخدام chymotrypsin أعطى نتائج أفضل من استخدام trypsin (Wang and Stotish, 1975). كما يُعتبر عمر البيوض المتكيّسة عاملاً مهماً جداً في التأثير على النسبة المئوية للإخراج فكلما كانت البيوض المتكيّسة قديمة كانت نسبة الإخراج قليلة (Abi-Ghanem,2006; Ruff *et al.*, 1981). وأشار(Dulski and Turner,1988) الى حدوث تحلل للحيوانات البوغيّة التي تم اخراجها من البيوض المتكيّسة بعمر أكثر من شهر, وبينت دراستنا الحالية نتائج مماثلة عند استخدام بيوض متكيسة قديمة للإخراج (بعمر اكثر من شهر).

تم الحصول على حيوانات بوغيّة نقية باستخدام التثفيل باستعمال البركول وعمود فصل التبادل الأيوني باستخدام مادة الدياسيليلوز–52، حيث كانت التنقية الأفضل باستعمال البركول متدرج الميل وبالسرعة 10000 g ولمدة 2 دقيقة بدرجة 25 م واتفقت بذلك مع (Dulski and Turner,1988; الإدريس،2014) وهذا ماأكده (Dulski and Turner, 1988) أنّ عملية التنقية للحيوانات البوغية باستخدام عمود

الفصل التبادل الآيوني تكون أقل كفاءة بسبب انسداد عمود الفصل عند تمرير أعداد كبيرة للتنقية، كما أنّ درجة نقاوتها أقل مقارنة مع البركول المتدرج الميلّ وأعداد الحيوانات البوغية كانت أقل. وقد يعود سبب حصولنا على أعداد أكبر من الحيوانات البوغية بطريقة عمود الفصل التبادل الآيوني هو اتباعنا طريقة (Riggs and Perryman, 1987) باستخدام عود خشبي لخلط الطبقة العليا من الدياسليلوز لمنع انسداده.

بينت النتائج سلامة التجربة من الخمج الخارجي بأي نوع من الأيمريّة من خلال الفحص الدوري اليومي للبراز. بالإضافة الى عدم وجود أي علامة مرضية لوجود أي إصابة مرضية أخرى. إذ تم اتباع قواعد الأمن الحيوي بدقة للمحافظة على سلامة التجربة, وهذا يدل على أن البيئة التي تم فيها تربية الأرانب هي بيئة نظيفة وان حظيرة الرعاية معقمة بالمعقمات اللازمة ولاسيما بخار الامونيا. وهذا يتفق مع ما أشار إليه (1980) Ryley الذي لاحظ انه بالإمكان القضاء على البيوض المتكيّسة من خلال استعمال بخار الامونيا او بروميد المثيل او ثنائي سلفايد الكربون إذ تستطيع هذه الغازات اختراق جدار كيس البيض.

تم التعرف على المكونات البروتينيّة لخلاصات البيوض المتكيّسة والحيوانات البوغيّة، وقد لوحظ وجود اختلاف في عدد العصائب البروتينيّة وفي ثخانتها. إذ بينت نتائج الرحلان الكهربائي للخلاصة المحضرة من طور الحيوانات البوغيّة وجود حوالي 3 من العصائب تراوحت أوزانها الجزيئيّة (24.43 و26 و28.67) وعُدَّت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور من حياة الطفيلي. بينما توصلت دراسة أخرى عند استخدام الرحلان الكهربائي لخلاصة طور الحيوانات البوغيّة لطفيلي الأيمريّة تينيلا لتحديد أوزانها الجزيئيّة وجود 10 من العصائب (23، 28، 45، 50، 60، 82، 94، 105، 175، 235) كيلودالتون (Murray and Glauska,1986). في حين أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي للخلاصة المحضرة من طور الحيوانات البوغيّة للأيميريّة تنيلا عند الإدريس (2014) وجود حوالي 11 من العصائب تراوحت أوزانها الجزيئيّة بين 10.9 و 155 كيلو دالتون (10.9، 11.6، 13.9، 25.9، 37.5، 51.1، 77، 100، 107، 113، 155) كيلو دالتون.

لوحظ في الخلاصة الطفيليّة الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيّسة حوالي 11 عصابة تراوحت اوزانها الجزيئيّة بين (19.21 و 130) كيلو دالتون وأكثر هذه العصائب تلوناً بصبغة أزرق الكومازي (57 و 49.40 و28.67 و26 و24.43) كيلو دالتون، وعُدَّت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور، لأن باقي العصائب أقل تلوناً. وبدراسة أخرى للرحلان الكهربائي لبروتينات البيوض المتكيّسة لطفيلي الأيمريّة تينيلا تم الحصول على 13 عُصابة شديدة التلون بصبغة أزرق كومازي وكانت الأوزان الجزيئيّة لها(26، و28، و45، و50، و60، و68، و 80 ، و82، و88، و94، و105،

و175، و235) كيلو دالتون(Murray and Glauska,1986). على حين سجلت دراسة مماثلة على نفس طور بروتينات البيوض المتكيّسة لطفيلي الأيمريّة تنيلا 11 عصابة فقط ذات أوزان جزيئيّة (14، 20، 22، 24، 36، 45، 48، 58، 66، 84، 116) كيلودالتون (Talebi, 1995). كما بينت نتائج (الإدريس،2014) على نفس الطور للأيميريّة تنيلا حوالي 21 عصابة تراوحت أوزانها الجزيئيّة (9.6 و 174.5) كيلو دالتون وأكثر هذه العصائب تلوناً بصبغة أزرق كومازي (9.6- 10.9- 12.3- 13.9- 27.5- 33.2- 41.1- 42.5- 65.4- 83.9- 113.8- 129- 165.3) كيلو دالتون.

إن الاختلافات الناتجة بالأوزان الجزيئيّة بين الدراسات لطفيلي الأيمريّة تنيلا قد تعود الى الاختلافات التقنية البسيطة المتعلقة بهذه الحجوم و الهلامة المحضرة (Karim *et al.*,1996). بينما ذكر(Stotish *et al.*,1978) أن هناك تغاير بسيط بالوزن الجزيئي لمتعددة الببتيدات بسبب التكسير العشوائي للأجزاء الصغيرة منها اثناء الاذابة، لذلك استخدم كل من (Murray and Glauska,1986) طريقة مختلفة بتحضير البروتينات، عن طريق استعمال جهاز مجانس العينات tissue homogenizer لتحضير البيوض المتكيّسة، بينما استخدما عملية التجميد والإذابة والتكسير باستخدام جهاز الذبذبات فوق الصوتيّة sonicated لتحضير بروتينات الحيوانات البوغيّة.

وعند مقارنة النتائج التي حصلنا عليها بالرحلان الكهربائي للخلاصات البروتينيّة لطوري الطفيلي المدروسين، تبين وجود عدد من البروتينات المشتركة ذات الأوزان الجزيئيّة: (24.43 و26 و28.67) كيلو دالتون.

استعملت تقانة التبصيم المناعي للكشف عن المستضدّات التي تحرض الجهاز المناعي على تشكيل أضداد نوعية, وأظهرت نتائج التبصيم المناعي عدد من العصائب في طور البيوض المتكيّسة المتبوغة أوزانها الجزيئيّة (130 و124.74 و57 و34.19 و28.67و26 و24.43) كيلو دالتون. بينما ظهرت ثلاث عصائب شديدة التلوين في طور الحيوان البوغي تبلغ أوزانها الجزيئيّة (28.67 و 26 و 24.43) كيلو دالتون، وكان أقوى هذه العصائب العصابة ذات الوزن الجزيئي 28.67 كيلودالتون حيث ظهرت مباشرة بعد وضع ركيزة التفاعل وكانت الأكثر ثخانة.

وجدت احدى الدراسات التي استخدمت تقانة التبصيم المناعي تسعة مستضدّات في طور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا وكانت اوزانها الجزيئيّة (14 و18 و23 و37 و42 و54 و 67 و73 و113) كيلو دالتون (Wisher, 1986).

أظهرت نتائج (Murray and Glauska,1986) 9 مستضدّات غشائية لطور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا وبلغت أوزانها الجزيئيّة (23، 26، 40، 45، 68، 82، 94، 105، 235) كيلو دالتون. في حين أوضحت دراسة أخرى دور بعض المستضدّات الغشائية في اجتياح طفيلي الأيمريّة

تينيلا للطبقة الظهارية للأعورين هما (37 و45) كيلو دالتون (Augustian and Danforth, 1985). بينما أظهرت نتائج دراسة(Brothers et al.,1988) اهمية المستضد الغشائي 25كيلو دالتون للحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا، الذي يتألف من مستضدين8 و17 كيلو دالتون مرتبطين بواسطة رابطة ثنائية الكبريت, ودوره الفعال في اجتياح الخلايا الظهارية للأعورين. وباستخدام طريقة الترسيب المناعي للمستضدّات الغشائية لطور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا, تبين وجود 5 من المستضدّات ذات الأوزان الجزيئيّة (10، 18، 21، 26، 47) كيلو دالتون(Lillehoj and Trout,1993).

وباستخدام طرائق اخرى لعزل المستضدّات بطريقة التعليم بالآيودين المشع I^{125}-labeled و طريقة التعليم بالمثيونين methionine-labeled تم تسجيل عدد كبير من المستضدّات في طفيلي الأيمريّة اسيرفيولاينا والأيمريّة تينيلا إذ كان لكل نوع بحدود 32–45 من مستضدّات سطحية وداخلية وتتراوح اوزانها الجزيئيّة (9–350) كيلودالتون (Jenkins and Dame, 1987). وهناك مستضدّات ذات أهمية كبيرة تقع في الأجسام النيرة refractile body للحيوان البوغي وتبلغ اوزانها الجزيئيّة (21–28) كيلودالتون (Danforth and Augustine, 1989), وتعد هذه المستضدّات محفوظة بالأيمريّة وتلعب دوراً مهماً في التطور اللاجنسي للطفيلي (Augustine *et al.*, 1988). كما بينت دراسة سابقة وجود مستضد مشترك بين اطوار الحياة المختلفة (الحيوان البوغي والاقسومة والبيوض المتكيّسة الناضجة والكيسات بجميع مراحل نموها) لطفيلي الأيمريّة تينيلا وزنه الجزيئي 19 كيلو دالتون عند استـــخدامه اضـــداد ارانب ضد البروتين المأشـــوب للحيوان البوغي(sz-1) (Fetter *et al.*,2004). بينما توصلت دراسة اخرى الى مستضد وزنه الجزيئي 22 كيلو دالتون لبروتينات الحيوان البوغي للأيميريّة تنيلا بالتبصيم المناعي (Karkhanis *et al.*, 1991). و هذه النتيجة متقاربة مع الدراسة الحالية بالحصول على المستضد ذو الوزن الجزيئي 24.43 كيلو دالتون.

قد يعود سبب الاختلاف بين نتائج الدراسة الحالية والدراسات الاخرى من جهة وبين الدراسات الأخرى للأيميريّة تنيلا من جهة أخرى أن هناك تبايناً بعملية الاذابة للبروتينات تنتج عنها أوزان جزيئيّة مختلفة (Stotish *et al.*,1978)أو بنتيجة الاختلافات التقنية البسيطة المتعلقة بالرحلان الكهربائي(Karim *et al.*, 1996). وكذلك لاختلاف البنية المستضدية بين سلالات الأيمريّة المعزولة من مناطق متغايرة جغرافياً(Allen andFetterer,2002).

-الفصل الخامس-

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

1-الاستنتاجات Conclusions:

تم التوصل من خلال نتائج هذا العمل ومناقشتها إلى عدد من الاستنتاجات الأساسية والرئيسة التي يمكن بيانها فيما يلي:

1- أن الأرانب المثبطة مناعيا بسلفات الديكساميثازون كانت الأفضل من حيث قدرة الأيمريّة الستيداويّة المعزولة محليا في هذه الدراسة على التكاثر فيها، وذلك مقارنة مع الأرانب غير مثبطة مناعيا.

2- تؤمن طريقة استعمال البركول لتنقية الحيوانات البوغيّة نقاوة أعلى مما هو عليه الحال من طريقة عمود الفصل مع أن مردودها أقل من الناحية الكمية.

3- إمكانية تحديد أهم البروتينات التي يعبر عنها في طوري الحيوان البوغي والبيوض المتكيسة باستخدام تقنية الرحلان الكهربائي SDS-PAGE.

4- إمكانية تعيين أهم مستضدّات طوري الطفيلي (الحيوانات البوغية والبيوض المتكيسة) بوساطة تقنية التبصيم المناعي.

5- تحديد المستضدّات المشتركة بن طوري الأيمريّة الستيداويّة المدروسين والتي بلغت أوزانها الجزيئيّة(24.43، 26، 28.67) كيلو دالتون، والتي يمكن أن تلعب دورا في الاخماجية.

6- إنّ أهم المستضدّات التي تم ملاحظتها خلال الدراسة الحالية باستخدام تقنية التبصيم المناعي هي:

أ- بروتينات الحيوانات البوغيّة ذات الأوزان الجزيئية: (24.43، 26، 28.67) كيلو دالتون.

ب- بروتينات البيضة المتكيّسة ذات الأوزان الجزيئية: (24.43، 26، 28.67، 34.19، 57، 124.74، 130) كيلو دالتون.

2- التوصيات Recommendations:

آخذين بعين الاعتبار النتائج التي حصلنا عليه بالدراسة التي أجريناها على ذرية محلية من الأيمريّة الستيداويّة فإنه يوصى بأن يتم في دراسات لاحقة العمل على :

1- عزل واستفراد المستضدّات الأكثر استمناعية المشتركة بين الطورين(الحيوان البوغي، البيضة المتكيّسة المتبوّغة) وكذلك طور المتقسمات وبالتالي الأقاسيم (الأقسومات).

2- عزل واستفراد المستضدّات الخاصة بكل طور والتي تم الكشف عنها بتقانة التبصيم المناعي في هذه الدراسة.

3- تحليل الاستجابة المناعية خلوية الوساطة تجاه كل من هذه المستضدّات بهدف التعرف على المستضد الذي يمكن أن يوجه استجابة مناعية من النمط Th1.

4- دراسة دور كل من هذه المستضدّات بشكل منفرد في توليد آليات مناعية وقائية تجاه الخمج.

5- تحديد الجينات المرمزة لهذه المستضدّات المسيطرة مناعيا على المستوى خلوي الوساطة من النمط Th1 بهدف استفراد هذه الجينات ليتم بعدها إنتاج هذه المستضدّات بالشكل المأشب.

-الفصل السادس-

ملخص باللغة العربية

Arabic Abstract

ملخص باللغة العربية: Arabic Abstract-

هدفت هذه الدراسة إلى تحديد أهم المستضدّات ذات القدرة الاستمناعية والمسؤولة عن تكوين الأضداد بعد الخمج التجريبي بالأيمريّة الستيداويّة، ومقارنة عملية إكثار الطفيلي بين مجموعتين من الأرانب إحداهما مثبطة مناعياً وأخرى غير المثبطة.

استخدم لهذه الدراسة 25 أرنباً بعمر 6-8 أسابيع من كلا الجنسين، تم تقسيمها إلى ثلاث مجموعات: (مجموعة أولى): 5 أرانب شاهد سليم، (مجموعة ثانية): 10 أرانب غير مثبطة مناعياً، (مجموعة ثالثة): 10 أرانب مثبطة مناعياً بالديكساميثازون فوسفات. تم إحداث الخمج التجريبي للمجموعتين الثانية والثالثة بالأيمريّة الستيداويّة بمعدل 5×10^4 بيضة متكيسة متبوّغة/ للأرنب الواحد، بينما بقيت المجموعة الأولى دون خمج (شاهد)، بهدف دراسة تأثير القشرانيات السكرية على تكاثر الطفيلي من خلال إحصاء البيوض المتكيّسة في براز أرانب المجموعتين. جمعت عينات البراز يومياً ابتداءً من اليوم 14 من اعطاء جرعة الخمج وحتى نهاية فترة التجربة. وتم احصاء البيوض المتكيّسة باستخدام تقنية ماك ماستر. كما جمعت عينات دموية من القلب مباشرة قبل ذبحها في اليوم 24.

سُجل بدء اطراح البيوض المتكيّسة مع البراز في المجموعة الثانية ابتداء من اليوم 18 بعد الخمج، بينما بدأ اطراحها في المجموعة الثالثة في اليوم 16 بعد الخمج، وبدأ عددها يزداد بشكلٍ يومي في المجموعتين الثانية والثالثة ليصلَ إلى أعلى مستوى لهُ في اليوم 22 بعدَ الخَمج، ثم بدأ بالتناقص تدريجياً حتى نهاية التجربة، وأظهرت النتائج تكاثر الطفيلي في المجموعتين الثانية والثالثة، وكانت أعداد البيوض المتكيّسة في براز مجموعة الأرانب المثبطة مناعياً أكبر، وبفرق معنوي $p<0.05$ مقارنة مع المجموعة الثانية.

تم تحديد أهم المستضدّات الاستمناعية انطلاقاً من عزل وتبويغ البيوض المتكيّسة حيث بلغت نسبة تبوغها 92% خلال 5-7 أيام، ومن ثم تنقيتها، وتم تحضير المستضد من طوري الطفيلي (الحيوان البوغي، البيضة المتكيّسة المتبوّغة)، وتحديد الأوزان الجزيئة لمستضدّات طور البيضة المتكيّسة المتبوّغة ومستضدّات الحيوانات البوغيّة باستخدام تقنية الرحلان الكهربائي على هلامة الأكريلاميدSDS-PAGE، حيث كشفت نتائج الرحلان الكهربائي عن 11 عصابة في الخلاصة البروتينيّة الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيّسة تراوحت أوزانها الجزيئيّة بين (19.21 و130) كيلو دالتون، وثلاث عصابات في الخلاصة البروتينيّة الناتجة عن حلمهة طور الحيوانات البوغيّة بلغت أوزانها الجزيئيّة (24.43- 26-28.67) كيلودالتون.

أظهرت نتائج التبصيم المناعي في الدراسة الحالية باستخدام مصل الأرانب المجموع في اليوم 24 بعد الخمج، وتحضينها مع البروتينات الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيّسة، عن عدد من المستضدّات ذات القدرة الاستمناعية والتي بلغت أوزانها الجزيئيّة(24.43- 26- 28.67- 34.19- 57- 124.74- 130) كيلو دالتون. في حين كانت نتائج التبصيم المناعي مع البروتينات الناتجة عن حلمهة طور الحيوانات البوغيات ثلاث عصائب شديدة التلوين بلغت أوزانها الجزيئيّة(24.43- 26- 28.67) كيلو دالتون.

-الفصل السابع-

المراجع

References

المراجع: References–

1– الإدريس، سهير (2014): تقييم اللقاحات المحضرة من الأيمريّة تِنلا Eimeria tenella على الكفاءة الإنتاجية والإستجابة المناعية عند دجاج اللحم Broiler. أطروحة دكتوراة، كلية العلوم، جامعة دمشق، الجمهورية العربية السورية.

2– المحمد، فادي (2017): التغيرات التشريحية المرضية الناتجة عن العدوى التجريبية بالأيمريّة الستيداويّة عند الأرانب. أطروحة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، الجمهورية العربية السورية.

3– كاسوحة، مرشد (2017): عزل أنواع البوغيات الخفية وتنميطها جينياً باستخدام تقنية تعدد أشكال أطوال الشُدَف المُقتطَعة. أطروحة دكتوراة، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، الجمهورية العربية السورية.

4– ونوس، ماري (2017): دراسة تأثير عصارة ثمرة قثاء الحمار على أنزيمات الكبد وبعض المعايير البيوكيميائيّة في دم الأرانب المصابة بالأيمريّات ستيدي. أطروحة دكتوراة، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، الجمهورية العربية السورية.

5- Abdel-Mageed, k.N.; Abu El-Ezz, N.M. and Abdel Rahman, E.H. (2005): Protective effect of Eimeria stiedae corporantigen against hepatic coccidiosis in rabbits. J. Egypt. Soc. Parasitol., 35(2): 581-595.

6- Abed, H. H. and Yakoob, A.Y.(2013): Study the protective and therapeutic effects of crude garlic on mortality, oocysts output and hepatic lesion in experimental infection with Eimeria Stiedea in domestic rabbits. Bas. J. Vet. Res., 12(2): 314-331 .

7- Abi Ghanem, D.A. (2006): Phage display selection of recombinant antibodies derived from a chicken immune library against cryopreserved Eimeria tenella sporozoites. In partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy.

8- Abu-Akkada, S.S.; Oda, S.S. and Ashmawy, K.I. (2010). Garlic and hepatic coccidiosis: prophylaxis or treatment?. Trop. Anim. Health Prod., 42: 1337-1343.

9- Abu-El-Ezz, N.M.T.; Abdel Megeed, K.N.; Mahdy, O.A. and Hassan, S.E. (2012): ELISA Assessment in the Diagnosis of Hepatic Coccidiosis in Experimentally Infected Rabbits. Global Veterinaria 9 (5): 517-523.

10- Adams, H.R. (2001): Veterinary pharmacology and therapeutics. 8th ed., Iowa State Press. pp: 998-1011.

11- Akhtar, M., Ayaz, M.M., Hayat, C.S and Ashfaque, M.(1998): Immune response of sonicated coccidial oocyst in chicken . Pakistan J. Biological Sci., 1: 389-391.

12- Akpo, Y., Kopdekon, M. T., Diago,Y., Licois, D. and Youssao, I. A. (2012): Vaccination of rabbits against coccidiosis using precocious lines of Eimeria magna and Eimeria media in Benin.Vet.Parasitol.,184:73-76.

13- AL- Naimi R. A.S.; Khalaf, O. H.; Tano, S. Y. and Al- Taee, E. H. (2012): Pathological study of Hepatic coccidiosis in naturally infected rabbits. AL-Qadisiya Journal of Vet.Med.Sci. Vol./11 No./1.

14- Ali, R. K.; Al-Naimi, R. S.; Abed, H. H. and Al-Tace, E. H. (2015): The therapeutic effect of Nigella sativa L. seeds oil on experimentally infected rabbits with hepatic coccidiosis. The Iraqi Journal of Veterinary Medicine, 39(1): 16 -22.

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

16- Al-Mathal, E.M. (2008): Hepatic Coccidiosis of the Domestic Rabbit. World Journal of Zoology 3 (1): 30-35.

17- Al-Mathal, E.M.(2010): Efficacy of Commiphora molmol against hepatic coccidiosis (Eimeria stiedae) in the domestic rabbit. Journal of Food, Agriculture and Environment, Vol.8 (3and 4): 1072-1080.

18- Anwar, M.I.; Akhtar, M.; Hussain, I.; Hag, A.U.; Muhammad, F.; Hafeez, A.; Mahmood, M.S. and Bashir, S. (2008). Field evaluation of Eimeria tenella (local isolates) gametocyte vaccine and its comparative efficacy with imported live vaccine, Liva Cox. Parasitol. Res.104: 135-143.

19- Al-Quraishy, S. (2012): Exogenous and endogenous stages of Eimeria perforans naturally infected domestic rabbit (Oryctolaguscuniculus) in Saudi Arabia: Light microscopic study. Saudi J. Biol. Sci., 19: 31–34.

20- Al-Rukibat, R. K.; Irizarry, K.; Lacey, K.R. and Kazacos, S. T.(2001): Impression smears of liver tissue from a rabbit .Vet. Clin. Path., 30:57-61.

21- Augustine, P.C. (2001): Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus Eimeria. Int. J. Parasitol. 31:1-8.

22- Augustine, P.C. and Danforth, H.D. (1985): Effects of hybridoma antibodies on invasion of cultured cells by sporozoites of Eimeria. Avian Dis. 29:1212-1223.

23- Augustine, P.C.; Danforth, H.D. and McAndrew, S.J. (1988): Monoclonal antibodies reveal antigenic differences in refractile bodies of avian Eimeria sporozoites. J. Parasitol. 74: 653-659.

24- Ayaz, M.M.; Akhtar, M.; Hussain, I.; Muhammad, F. and Haq, A.U. (2008): Immunoglobulin producing cells in chickens immunized with Eimeria tenella gametocyte antigen vaccines. Vet. Med. 53: 207-213.

25- Baba, E.; Uno, H.; Sadano, N.; Fukata, T.; Sasai, K. and Arakawa, A. (1996): Eimeria tenella: Role of carbohydrates on sporozoite at the penetration into cultured cells. Exp. Parasitol. 83: 67-72.

26- Balbaa, M; Abd El-Hady, N.; Taha, N. and El Ashry, E.H. (2012): Some heterocyclic thione derivatives exhibit anticoccidial activity by inhibiting glycosidases. Actabp. Vol. 59, No 4: 575–580.

27- Barriga O.O. (1997): The class Apicomplexa or Sporozoa. In: Veterinary Parasitology for Practioners. 2nd ed. Edina, Minn: Burgess International Group: 26.1-26.4.

28- Barriga, O.O. and Arnoni, J.U. (1979): E. stiedae weight, oocyst output and hepatic function of rabbits with graded infection. Exp. Parasitol. 48:407-414.

29-Barriga, O.O. and Arnoni ,V.J. (1981). Pathophysiology of hepatic coccidiosis in rabbits.Vet. Parasitol., 8: 201-210.

30- Baumann, H., Gauldie, J. (1994): The acute phase response. Immunology Today, v. 15, n. 2, p. 74-80.

31- Bhogal, B.S.; Jacobson, E.B.; Tse, H.Y.; Schmatz, D.M. and Ravino, O.J. (1989): Parasite exposure elicits a preferential T-cell response involved in protective immunity against Eimeria species in chickens primed by an internal-image anti-idiotypic antibody. Infect. Immun. 57: 2804-2810.

32- Billate, A. M. B. (2007): Inflamacao, citocinas, proteinas de fase agudae implicacoes terapeuticas. Temas de Reumatologia Clínica, v. 8, n. 2, p. 47-51.

33- Billingham, R. E., P. L. Krohn, and P. B. Medawar.(1951): Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. Br. Med. J.1: 1157.

34- Bowman, D.D.; Lynn, R.C. and Eberhard, M.L. (2003): Parasitology for Veterinarians, 8th ed. United Sates of America. pp. 251-269.

35- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

36- Brothers, V.M.; Kuhn, I.; Paul, L.S.; Gabe, J.D.; Andrews, W.H.; Sias, S.R.; McCaman, M.T.; Dragon, E.A. and Files, J.G. (1988). Characterization of surface antigen of Eimeria tenella sporozoites and synthesis from cloned cDNA in Escherichia coli. Mol. Biochem. Parasitol. 28: 235-247.

37- Byrnes, S.R.; Eaton, R. and Kogut, M. (1993): In vitro interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha production by macrophages from chickens infected with either Eimeria maxima or Eimeria tenellar. Int. J. Parasitol. 23: 639-645.

38- Cam, Y., Atasever, A., Erslan, G., Kibar, M., Atalay, O., Beyaz, L., Inci, A. and Liman, B.C., (2008): Eimeria stiedae: Experimental infection in rabbits and the effect of treatment with toltrazuril and ivermectin. Experimental Parasitology 119: 164–172.

39- Cam, Y., Cetin ,E., Ica, A., Atalay, O., Atalay 0, Cetin, N. (2006): Evaluation of some coagulative parameters in hepatic coccidiosis experimentally induced with E. stiedae in rabbits. J. vet. Med., 53: 201-212.

40- Carruthers, V.B. and Sibley, L.D. (1997): Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. Eur. J. Cell Biol. 73: 114-123.

41- Cerioli M, Brivio R, Grilli G, Tittarelli C, Marasciulo V, Lavazza A. (2008): Search for key health and welfare indicators for meat rabbit production and definition of a score method of evaluation. 9th World Rabbit Congress: Verona.

42- Chapman, H. D. (1998): Evaluation of the efficacy of anticoccidial drugs against Eimeria species in the fowl. Int. J. Parasitol. 28: 1141-1144.

43- Cheeke, P.R. (1987): Nutrition-disease interrelationships. In: Rabbit Feeding and Nutrition. Orlando, Fla: Academic Press; 1987:176- 200.

44- Comporti, M., (1993): Lipid peroxidation, biopathological significance.Molecular Aspects of Medicine, 14: 199-207.

45- Coudert P., d. Licois, f. Drouet-Viard, F. Provot. (1995): Eimeria species and strains of rabbits. Biotechnology: guidelines on techniques in coccidiosis research, Part. I: Eimeria and Isospora. Office for official publications of the European communities: Luxembourg; p. 52_73 .

46- Coudert P., d. Licois, f. Drouet-Viard, F. Provot.(2000): Enfermedades del conejo. Tomo II. 219-234.

47- Cowan, D.P. (1983): Aspects of the behavioural ecology of a population of the European wild rabbit Oryctolagus cuniculus, in southern England. Dissertation, University of London.

48- Dalloul, R.A.; Lillehoj, H.S.; Shellem, T.A. and Doerr, J.A. (2003). Intestinal immunomodulation by vitamin A deficiency and lactobacillus-based probiotic Eimeria acervulina-infected broiler chickens. Avian Dis. 47: 1313-1320.

49- Dalloul R.A. and Lillehoj H.S. (2006): Poultry coccidiosis: Recent advancements in control measures and vaccines developments. Expert Rev. Vaccines., 5: 143-163.

50- Danforth, H.D. and Augustine, P.C. (1989): Eimeria tenella: used of momoclonal antibody in determining the intracellular fate of the refractile body organelles and the effect on in vitro development. Exp. Parasitol. 68: 1-7.

51- Danforth, H.D. and McAndrew, S.J. (1987): Hybridoma antibody characterization of stage-specific and stage-cross-reactive antigens of Eimeria tenella. J. Parasitol. 73: 985-992.

52- Darwish, A.I. and V. Golemansky, (1991): Coccidian Parasites (Coccidia: Eimeriidae) of domestic rabbits (Oryctolagus cuniculus L.) in Syria. Acta Protozool., 31: 209-216.

53- Darzi, M.M., Shahardar, R.A., Pandit, B.A. (2003): Pathological changes and local defense reaction occurring in spontaneous hepatic coccidiosis. Veterinarski Arhiv. 77:167_169.

54- Davis, L.R.; Hammond, D.M. and Long, P.L. (1973): The coccidian, Baltimore: Univ. Park Press. 411-458.

55- Danforth, H.D. (1998). Use of live Oocyst vaccines in the control of avian coccidiosis: Experimental studies and field trials. Int. J. Parasitol. 28: 1099-1109.

56- Donald, W.D., Steve, J.U., Lee, C. (2010): Taxonomic summary of genera within the Eimeride. University of New Mexico. Retrieved (8).

57- Dubremetz, J.F.; Ferreira, E. and Dissous, C. (1989). Isolation and partial characterization of rhoptries and micronemes from Eimeria nieschulzi zoites (sporozoa, coccidia). Parasitol. Res. 75: 449-454.

58- Dubremetz, J.F.; Garcia-Reguet, N.; Conseil, V. and Fourmaux, M.N. (1998): Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa Int. J. Parasitol.28:1007-1013.

59- Dulski, P. and Turner, M. (1988): The purification of sporocysts and sporozoites from Eimeria tenella oocysts using Percoll density gradients. Avian. Dis. 32: 235-239.

60- Dulski, P.M. (1990): Eimeria tenella: incomplete excystation in the presence of EDTA in a taurodeoxycholate-based medium. J. Protozool. 37: 524-528.

61- EL-Akabawy, L. M.; Zayna, K. A.; Tantawy, A. A. and Omar, R. E. M. (2004): Anticoccidial efficacy of propolis and Toltrazuril against Eimeria stiedae in Newzealand White rabbits. zag. Vet. J., 32(1):122-145.

62- Erdogmus, Z.S. and Y. Eroksuz, (2006): DS hepatic coccidiosis in Angora rabbits. J. Anim. Vet. Advan., 5 (6): 462-463.

63- Ferguson, D.J.P.; Belli, S.I.; Smith, N.C. and Wallach, M.G. (2003): The development of the macrogamete and oocyst wall in Eimeria maxima: Immuno-light and electron microscopy. Int. J. Parasitol. 33: 1329-1340.

64- Fetter, R.H.; Miska, K.B.; Jenkins M.C. and Barfield, R.C. (2004): A conserved 19-KDa Eimeria tenella antigen is a profilin-like protein. J. Parasitol. 90: 1321-1328.

65- Fitz-Coy, S.H. (1991). Antigenic Variation among strains of E. maxima and E. tenella of the chicken. Avian Dis. 36: 40-43.

66- Gardiner GH, Fayer R, Dubey JP. (1998): Apicomplexa. In: An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues. 2nd ed. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology: 20-30.

67- Gibbons, L.M.; Jacobs, D.E.; Fox, M.T. and Hansen, J. (2001): The RVC/FAO Guide to veterinary diagnostic parasitology part 1 Ruminants: fecal examination for helminth parasites. Food and Agricultural Organization of the United Nations. http://www.fao.org/AG/againfo/resources/ document/Parasitology/Indes/Index.htm.

68- Gomez-Bautista, M., Rojo-Vazquez, F.A., Alunda, J.M. (1987): The effect of host's age on the pathology of Eimeria stiedae infection in rabbits Vet. Parasitol., 24: 47-57.

69- Harcourt–Brown, F. (2002): Rabbit Medicine. Reed Educational and Professional Publishing Ltd,Oxford,UK.P 249-291.

70- Hashemnia, M., Khodakaram-Tafti, A., Razavi, S.M., Nazifi, S. (2014): Hematological and serum biochemical analyses in experimental caprine coccidiosis. J Parasit Dis., 38(1):116-23.

71- Hauptman, K.; Tichy, F. and Knotek, Z. (2001): Clinical diagnostics of hepathopathies in small mammals: Evaluation of importance of individualmethods. Acta Vet. Brno.70: 297-311.

72- Henning, J.P., Feiffer, D.U., Davies, P.R. (2008): Mortality patterns over 3 years in a sparse population of wild rabbits (Oryctolagus cuniculus) in New Zealand, with an emphasis on rabbit haemorrhagic disease (RHD). Eur J Wildl Res., 54:619–626.

73- Hobbs, R.P., L.E. Twigg, A.D. Elliot and A.G.Wheeler, (1999): Factors influencing the fecal egg and oocyst count of parasites of wild European rabbits Oryctolagus cuniculus (L.) in southern western Australia. J. Parasitol., 85 (5): 796-802.

74-Horton-smith, C. and Long, P.L. (1959): The effect of different anticoccidial agent on the intestinal coccidiosis of fowl. J. Comp. Pathol. 69: 192-207.

75- Hortvikova, M. and Bedrnak, P. (2002): The sporulation of oocysts of fowl's coccidia and possibilities to influence this process, department of Protozodogy, 254 49, Jilove u Prahy, Gzech Republic.

76- Hrubec, T. C.; Whichard, J. M.; Larsen, C. T. and Pierson, F. W. (2004): Plasma versus serum: specific differences in biochemical analyte values. J. Avian. Med. Sur., 16: 101-105.

77- Hungu, C.W., Gathumbi, P.K., Maingi, N., Ng'ang'a, C.J. (2013): Production characteristics and constraints of rabbit farming inCentral, Nairobi and Rift-valley provinces in Kenya. Livestock Res Rural Dev., 25:1-12.

78- Iqbal ,A., Tariq, K.A., Wazir, V.S., Singh, R. (2013): Antiparasitic efficacy of Artemisia absinthium, toltrazuril and amprolium against intestinal coccidiosis in goats. J Parasit Dis, 37(1):88-93.

79- Jenkins, M. C., Parker, C.O., Brien, C., Persyn, J., Barlow, D., Miska, K. and Fetterer, R. (2013): Protecting chickens against coccidiosis in floor pens by administrating Eimeria oocysts using gel beads and spray vaccination. Avian Dis., 57: 622-626.

80- Jenkins, M.C. and Dame, J.B. (1987): Identification of immunodominat surface antigens of Eimeria acervulina sporozoites and merozoites. Mol. Biochem. Parasitol. 25: 155-164.

81- Jenkins, M.C.; Seferian, P.G.; Augustine, P.C. and Danforth, H.D. (1993): Protective immunity against coccidiosis elicited by radiation-attenuated Eimeria maxima sporozoites that are incapable of asexual development. Avian Dis. 37: 74-82.

82- Jeurissen, S.H.; Janse, E.M.; Vermeulen, A.N. and Vervelde, L. (1996): Eimeria tenella infection in chickens: aspects of host-parasite: interaction. Vet. Immunol. Immunopathol. 54: 231-238.

83- Jordan, F.T.D. and Pattison, M. (1977): Poult. Dis., 4th ed., Norwech, England. 34: 260-276.

84- Joyner, L.P., Catchpole, J. and Berret, S. (1983): Eimeriastiedae in rabbits. The demonstration of responses to chemotherapy. Research in Veterinary Science 34, 64-67.

85- Karaer, Z. (2001): Evciltavsanlarda coccidiosis. In: Dincer, S. (Ed), Coccidiosis. Turkiye Parazitoloji Dernegi Yayin, no. 17. META Basim, Bornova-Izmir, pp. 269-278.

86- Катранджи, М. М. (1988): Культивирование Eemeria stiedae в клетках клеточной культуры и эмбрионах и быстрая оценка химических веществ. докторской диссертации ,Специальность (паразиты), 149 p., Ленинградский ветеринарный институт,PCCC.

87- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., Bruss, M. L.(2008): Clinical biochemistry of domestic animals. 6th ed. Burlington: Academic Press.

88- Kant, V., Singh, P., Verma, P. K., Bais, I., Parmar, M. S., Gopal, A. and Gupta, V. (2013): Anticoccidial drugs used in the poultry: an overview. Sci. Int., 1: 261-265.

89- Karim, M.J.; Basak S.C. and Tress A.J. (1996): Characterization and immunoprotective properties of a monoclonal antibody against the major oocyst wall protein of Eimeria tenella. Infect. Immun. 64: 1227-1232.

90- Karkhanis, Y.D.; Nollstadt, K.A.; Bhogal, B.S.; Ravino, O.; Pellegrino, R.; Crane, M.S.; Murray P.K. and Turner, M.J. (1991): Purification and characterization of a protective antigen from Eimeria tenella. Infect. Immun. 59: 983-989.

91- Kawazoe, U.; Tomley, F.M. and Frazier, J.A. (1992): Fractionation and antigenic characterization of organelles of Eimeria tenella sporozoites. Parasitol. 104: 1-9.

92- Khalafalla, R.E. (2009): Evaluation of inhibition of Eimeria tenella sporozoites by antibody fragments expressed in pea. In partial fulfillment of requirements for the degree of a doctor medicine veterinarian. Faculty of Vet. Medic. University of Leipzig. p: 110.

93- Khider, A.T.; Al-Rubaie, H.M.A. and Khalil, F.J.(2015): Prevalence of coccidiosis in local breed rabbits (Oryctolagus cuniculus) in Baghdad province. AL-Qadisiya Journal of Vet. Med. Sci. Vol. 14, No 1: 15-21.

94- Kraus, A.L., Weisbroth, S.H., Flatt, R.E. and Brewer, N. (1984): Biology and diseases of rabbits. In: laboratory animal medicine Fox, J.G. (ed.), Pp: 270-240, Academic Press, Orlando, USA.

95- Kutkat, M.A.; Zayed, A.A. and Abu-El-Ezz, N.M.T (1998): A trial for immunization of rabbit against hepatic coccidiosis. Zagazig Vet. J., 26: 70-77.

96- Kvicerova, J., Pakandl, M. and Hypsa, V. (2008): Prophylactic relationship among Eimeria spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits, evolutionary significance of biological and morphological features. Parasitol., 135: 443-452.

97- Lacey, J. (2016): "Fall 2000 Newsletter - Final Diagnosis - Hepatic coccidiosis". Indiana Animal Disease Diagnostic Laboratory. Retrieved 27 June.

98- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

99- Lammler, G. and Hein, B. (1981): Efficacy of salinomycin in preventing hepatic coccidiosis in rabbits. Berliner and Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 93: 449-534.

100- Lawn, A.M. and Rose, M.E. (1982): Mucosal transport of Eimeria tenella in the cecum of the chicken. J. Parasitol. 68: 1117-1123.

101- Laxer, M.A.; Healey, M.C. and Youssef, N.N. (1987): Production of monoclonal antibodies specific for Eimeria tenella microgametocytes. J. Parasitol. 73: 611-616.

102- Lee, E.H. (1993). Immune variants in live coccidiosis vaccines. In: J. R. Barta and M. A. Fernando (eds), Proc. 6th Intern. Coccidiosis Conf., Univ. Guelph, Guelph, Canada, pp: 118-121.

103- Lello, J., Boag, B., Hudson, P.J. (2005): The effect of single and concomitant pathogenic infections on the condition and fecundity of the wild rabbit (Oryctolagus cuniculus). Int J Parasit., 35:1509–1515.

104- Levine, N.D. (1982): Taxonomy and life cycle of coccidian. In: The biology of the coccidia. Long, P.L. (ed.), University Park Press, MD, USA 1-33

cited by: Dalloul R.A. and Lillehoj H.S. (2006): Poultry coccidiosis: Recent advancements in control measures and vaccines developments. Expert Rev. Vaccines., 5: 143-163.

105- Levine, N.D. (1985): Apicomplexa. The Coccidia proper. In: Veterinary Protozoology. Ames, Iowa: Iowa State University Press., 130-138, 178, 221-222.

106- Levine, P. P. (1939): The effect of sulfanilamide on the course of experimental avian coccidiosis. Cornell Vet 29:309–20. Cited by: Conway, D.P. and McKenzie, M.E. (2007): Poultry coccidiosis diagnosis and testing procedures, 3rd ed. Pfizer, Inc., New York, N.Y. p: 168.

107- Levinson, W. (2012): Review of Medical Microbiology and Immunology. 12th ed. McGraw-Hill, New York, pp: 463-554.

108- Licois, D., Coudert, P., Drouet-Viard, F., Boivin, M. (1994): Eime¬ria media: selection and characterization of a precocious line. Parasitol. Res., 80: 48–52.

109- Lillehoj, H.S. and Trout, J.M. (1993): Coccidia: Areview of recent advances on immunity and vaccine development. Avian. Pathol. 22:3-31.

110- Lillehoj, H.S. and Trout, J.M. (1996): Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to Eimeria parasites. Clin. Microbiol. Rev. 9: 349-360.

111- Lillehoj, H.S.; Min, W. and Dalloul, R.A. (2004): Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to Eimeria. Poultry Sci. 83:611-623.

112- Lima, J.D. (2004): Coccidiose dos ruminantes domésticos. Rev Bras Parasitol. Vet 13(suplemento 1)., 9-13.

113- Long, P.L. (1978): The problem of coccidiosis: General Considerations. In: Avian coccidiosis, Ed. Long, P.L. and Rose, M.E. Brit. Poul. Sci. Ltd., Edinburgh. pp. 3-28.

114- Long, P.L.; Millard, B.J.; Joyner, L.P. and Norton, C.C. (1976): Aguide to a laboratory techniques used in the study and diagnosis of aviancoccidiosis .Folia Veterinaria Latina ,6,201-217.

115- Lopez-Bernad, F.; Del Cacho, E.; Gallego, M.; Quilez, J. and Sanchez-Acedo, C. (1996): Identification of a fibronectin-like molecule on Eimeria tenella. Parasitol. 113: 505-510.

116- MAFF. (1986): Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Manual of parasitological laboratory techniques. Reference book number 418. 3rd ed. London: ADAS, HMSO.

117- Mage, R.G. (1998): Diversification of rabbit VH genes by gene conversion-like hypermutation mechanisms. Immunol. Rev., 162: 49–54.

118- Mark A. Suckow, Karla A. Stevens and Ronald P. Wilson (Eds). (2012):The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents-Academic Press.

119- Martin, A.; Lillehoj, H.S.; Kaspers, B. and Bacon, L.D. (1994): Mitogen-induced lumphocyte proliferation and interferon production following coccidia infection. Avian Dis. 38: 262-268.

120- Martin, A.G.; Danforth, H.D.; Barta, J.R. and Fernando, M.A. (1997). Analysis of immunological cross-protection and sensitivities to anticoccidial drugs among five geographical and temporal strains of Eimeria maxima. Int. J. Parasitol. 27: 527-533.

121- Mathis, G.F. and McDougald, L. R. (1981): Experimental development of resistance of amprolium or dinitolmide in Eimeria acervulina and Its effect on Inhibition of sporulation of oocysts. J. Parasitol. 67(6): 956-957.

122- McAllister, T. and Upton, S.J. (1989). Coccidian parasites (apicomplexa: Eimeriidae) of Nerodia spp. (Serpents: Colupridae), with a description of a new species of Eimeria. J. Protozool. 36: 271-274.

123- McAllister, C. T., Duszynski, D. W., Fisher, R. N., and Austin, C. C. (2013): A new species of Eimeria Schneider, 1875. (Apicomplexa: Eimeriidae) from Carlia spp. (Sauria: Scincidae) from Papua New Guinea. Systematic Parasitology., 86: 53–57.

124- McDonald, V.; Wisher, M.H.; Rose, M.E. and Jeffers, T.K. (1988): Eimeria tenella: immunological diversity between asexual generations. Parasite Immunol.10:649-660.

125- McDougald, L.R. (2003): Coccidiosis. In diseases of poultry, 11thed. pp. 937-990. Edit. Saif, Y.M.J.; Barnes, Glisson, J.R.; Fadly, A.M.; Mcdougald L.R. and Swayne, D.H. Iowa State Press.

126- Meek, M.W.(1943): Coccidiosis in domestic rabbits. In: Diseases and Parasites of Rabbits and Their Control. 3rd ed. Montebello, Calif: Reliable Fur Industries., 79-115.

127- Mencher, D.; Pugatsch, T. and Wallach, M. (1989): Antigenic proteins of Eimeria maxima gametocytes: cell-free translation and detection with recovered chicken serum. Exp. Parasitol. 68: 40-48.

128- Milbardt, E. L., Mendes, A. A., Ferreira, J. G., Ameidapaz, I., Martins, M. B., Sanfelice, C.. Fernandes, B. C. and Okomato, A. S. (2014): Use of live oocysts vaccine in the control of turkey coccidiosis: effect on performance and intestinal morphology. J. Appl. Poultry Res., 23: 204-211.

129- Murray, P.K. and Galuska, S. (1986): Coccidiosis vaccine. European patent application. Pub. No.0167442A2.

130- Mwangi, W.G., Okumu, P., (2010): Prevelance and Intensity of coccidiosys in adult and weaning domestic rabbits under intensive system, Project report submitted to the university of Nairobi in partial fulfillment of bachelors degree in veterinary medicine (BVM).

131- Nadia, M.T., Abu-El-Ezz, Kadria, N., AbdEl Megeed., Olfat,A., Mahdy., Soad E. Hassan. (2012): ELISA Assessment in the Diagnosis of Hepatic Coccidiosis in Experimentally Infected Rabbits. Global Veterinaria. 9 (5): 517-523, 2012., ISSN 1992-6197.

132- Norton, C.C., Catchpole, J., Joyner, L.P. (1979): Redescriptions of Eimeria irresidua Kessel & Jankiewicz, 1931 and E. flavescens Marotel & Guilhon, 1941 from the domestic rabbit. Parasitology., 79: 231–248.

133- Omata, Y., Stake, M., Maeda, R., Saito, A., Shimazaki, K., Yamauchi,K., et al. (2001): Reduction of the infectivity of Toxoplasma gondii and Eimeria stiedai sporozites by treatment with bovine lactoferricin. Parasitology 63 (2), 187–190.

134- Oncel, T., Gulegen, E., Senlik. B., Bakirci, S. (2011): Intestinal coccidiosis in Angora rabbits (Oryctolagus cuniculus) caused by Eimeria intestinalis,

Emeria perforans ands Emeria coecicola. YYU Veteriner Fakutesi Dergisi., 22(1)27-29.

135- Oppelt, C., Starkloff, A., Rausch, P., Vonholst, D., Rodel, H.G. (2010): Major histocomatability complex variation and age-specific endoparasite load in subadult European rabbits. Mol Ecol., 19:4155–4157.

136- Ovington, K.S., Alleva, L.M. and Kerr, E.A. (1995): Cytokines and immunological control of Eimeria spp. Int. J. Parasitol. 25: 1331-1351.

137- Pakandl M, Hl_askov_a L, Popl_stein M, Chrom_a V, Vodi_cka T, Sal_at J, Mucksov_a J. (2008): Dependence of the immune response to coccidiosis on the age of rabbit suckling. Parasitol Res. 103:1265_1271.

138- Pakandl, M. (2009): Coccidia of rabbits. Folia Parasitologica., 56: 153-166.

139- Pakes SP, Gerrity LW. (1994): Protozoal diseases. In: Manning PJ, Ringler DH, Newcomer CE, eds. The Biology of the Laboratory Rabbit. 2nd ed. San Diego, Calif: Academic Press :205-229.

140- Papeschi C, Fichi G, Perrucci S.(2013): Oocyst excretion pattern of three intestinal Eimeria species in female rabbits. World Rabbit Sci. 21:77_83.

141- Patton, W.H. and Brigman, G.P. (1979): The use of sodium taurodeoxycholate for excystation of Eimeria tenella sporozoites. J. Parasitol. 65: 526-530.

142- Peek, H.W. and Landman, W.J. (2011): Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. Vet. Q. 31: 143-161.

143- Peeters, J.E. and Geeroms, R. (1986): Efficacy of toltrazuril against intestinal and hepatic coccidiosis in rabbits. Veterinary Parasitology 22,21-35.

144- Percy, D.H., Barthold, S.W. (1993): Rabbit. In: Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits. Ames, Iowa: Iowa State University Press., 179-224.

145- Polozowski, A. (1993): Coccidiosis of rabbits and its control. Wiadomosci Parazytologiczne 39, 13-28.

146- Price, K. and Barta, J. R. (2010): Immunological control of coccidiosis in poultry.SURG.,4:101-108.

147- Price, K. R. (2012): Use of live vaccines for coccidiosis control in replacement layer pullets. J. Appl. Poultry Res., 21: 679-692.

148- Prowse, S.J. and Pallister, J. (1989): Interferon release as a measure of the T-cell response to coccidial antigens in chickens. Avian. Pathol. 18: 619-630.

149- Riggs, M.W. and Perryman, L.E. (1987): Infectivity and neutralization of Cryptosporidium parvum sporozoites. Infect. Immun. 55: 2081-2087.

150- Rose, M.E. (1986): Immune response to Eimeria infection. In: Research in Avian Coccidiosis. Ed. By: McDoglad L.P Jouner and Long, P.L. University of Georgia, Athens. Ga. p. 449.

151- Rose, M.E., (1987): Immunity to Eimeria infection. Vet. Immunol. ImmunoPathol. 17: 333-343.

152- Rose, M.E.; Long, P.L. and Bradly, J.W. (1975): Immune response to infections with Coccidia in Chicken: gut hypersensitivity. Parasitol. 71: 357-368.

153- Rose, M.E.; Lawn, A.M. and Millard, B.J. (1984): The effect of immunity on the early events in the life-cycle of Eimeria tenella in the cecal mucosa of the chicken. Parasitol. 88: 199-210.

154- Ruff, M.D.; Doran, D.J. and Wilkins, G.C. (1981): Effect of aging on survival and pathogenicity of Eimeria acervulina and Eimeria tenella. Avian Dis. 25: 595-599.

155- Ruiz, A., Gonzalez, J.F., Rodriguez, E., Martin, S., Hernandez, Y.I., Almeida, R., Molina, J.M. (2006): Influence of climatic and management factors on Eimeria infections in goats from semi-arid zones. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 53(8):399-402.

156- Russell, D.G. (1983): Host cell invasion by Apicomplexa: an expression of the parasites contractile system. Parasitol. 87:199-209.

157- Ryley, J.F. (1980): Recent developments in coccidian biology; where do we go from here? Parasitol. 80: 189-209.

158- Satyanarayana, N.V.V.; Madhekar, D. and Rao, C.R.S. (1982): Observations on an outbreak of coccidiosis in rabbits and its treatment. Livestock-Adviser,7:1-57.

159- Schimidt, G.D. (1988): Subkingdom Protozoa. In: Marvin C. Meyer and O. Wilford Olsen's Essentials of Parasitology. 4th ed. Dubuque, Iowa: WC Brown: 21-23.

160- Schnieder, T. and Tenter, A.M. (2006): Erreger von Parasiten: Taxonomie, Systematik und allgemeine Merkmale. In: Schnieder, T. (ed). Veterinärmediziniche Parasitologie. 6. Aufl. Stuttgart: Parey Buchverlag. pp: 26-72.

161- Schoeb, T.R., Cartner, S.C., Baker, R.A., Gerrity, L.G.,(2007): Parasites Of rabbits. In: Baker, D.G. (Ed.), Flynn's Parasites of Laboratory Animals. Blackwell Publishing, Ames, pp. 451–500.

162- Sehgal, D., Schiaffella, E., Anderson, A.O., Mage, R.G., (1998): Analyses of single B cells by polymerase chain reaction reveal rearranged VH with germline sequences in spleens of immunized adult rabbits: implications for B cell repertoire maintenance and renewal. J. Immunol. 161: 5347–5356.

163- Shane, S.M. (2005): Antibiotic alternatives in turkey production. World Poult. 19: 14-15.

164- Sibley, L.D.; Hakansson, S. and Carruthers, V.B. (1998): Gliding motility: An efficient mechanism for cell penetration. Curr. Biol. 8: 12-14.

165- Singh, S. V. and Pachauri, S. P. (2002): Acute phase proteins in bovine mastitis. Indian Journal Animal Science, v. 72, n. 1, p. 20-22.

166- Smith, M.C. and Sherman, D.M. (2009): Goat Medicine.Second Edition. Wiley Blackwel Inc. USA., pp. 3–21.

167- Soulsby, E.J.L. (1982): Helminthes, Arthropods and Protozoa of Domestic animals, 7th Ed. Bailliere Tindall, London, UK., pp. 981-1028.

168- Soulsby, E.J.L. (1986): Helmints, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Seventh Edition. Bailliere-Tindall, London, pp. 809.

169- Stefani, M. and Dobson, C. M. (2003): Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. J. Mol. Med., 81: 678-699.

170- Stotish, R.L.; Wang C.C. and Meyenhofer M. (1978): Structure and composition of the oocyst wall of Eimeria tenella. J. Parasitol. 64: 1074-1081.

171- Suhwold, A., Hermosilla, C., Seeger, T., Zahner, H., Taubert, A. (2010): T cell reactions of Eimeria bovis primary and challenge-infected calves. Parasitol Res 106(3):595-605. doi:10.1007/s00436- 009-1705-5.

172- Tabares, E.; Ferguson, D.; Clark, J.; Soon, P.E.; Wan, K.L. and Tomley, F. (2004): Eimeria tenella sporozoites and merozoites differentially express glycosylphosphatidylinositol-anchored variant surface proteins. Mol. Biochem. Parasitol. 135: 123-132.

173- Tahir, M.J. (1998): Isolation and identification of dense granules of Eimeria tenella sporozoites. In partial fulfilment of requirements for the degree of master of science. The University of Guelph.

174- Talebi, A. (1995): Protein profiles of five avian Eimeria species. Avian Pathol. 24: 731-735.

175- Taubert, A., Hermosilla, C., Suhwold, A., Zahner, H. (2008): Antigen-induced cytokine production in lymphocytes of Eimeria bovis primary and challenge infected calves. Vet Immunopathol 126(3-4):309-20.

176- Taylor, M.A., Coop, R.L.,Wall, R.L. (2007): Vet. Parasitology. 3rd edition. Blackwell, Publishing Company USA., Pages:901.

177- Tehrani, A. A.; Yakhchali, M.; Beikzadeh, B. and Morvaridi, A. (2013): Prevalence of rabbit hepatic coccidiosis in North West of Iran. Archives of Razi Institute, 68(1): 65-69.

178- Tomley, F. (1997): Techniques for isolation and characterization of apical organelles from Eimeria tenella sporozoites. Methods. 13: 171-176.

179- Toula, F.H. and Ramadan, H.H., (1998): Studies on coccidian species of genus Eimeria from domestic rabbit (Oryctolagus cuniculus domesticus L). in Jeddah, Saudi Arabia. J. Egypt. Soc. Parasitol., 28: 691–698.

180- Tripathi R.S., Chandra D.E.V., Sharma M.L., (1995): Economics of Angora rabbit farming in hills. Ind . J . Anim. Sci.,65,678-683.

181- Trout, J.M. and Lillehoj, H.S. (1993): Evidence of a role for intestinal CD8+ lymphocytes and macrophage in transport Eimeria acervulina sporozoites.J.Parasitol.79:790-792.

182- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings. F.W., (1987): Phylum Protozoa. In: Veterinary Parasitology. New York: Churchill Livingstone., 218-220.

183- V´azquez, F., and V´azquez, R. (1990): Toltrazuril: a new anticoccidial drug against all species of coccidia. In proceedings of the 39th western poultry disease conference. Sacramento. Ca. 74–75.

184- van Praag, E., (2009): Protozoal enteritis: Coccidiosis. Retrieved on September 13, 2009.

185- Varga, I. (1982): Large scale management systems and parasite populations: coccidian in rabbits. Vet. Parasitol. 11, 69-84.

186- Vermeulen, A.N.; Schaap, D.C. and Schetters, T.P. (2001): Control of coccidiosis in chickens by vaccination. Vet. Parasitol. 100: 13-20.

187- Wallach, M. (2010): Role of antibody in immunity and control of chicken Coccidiosis. Review. Trends Parasitol. 26: 382-387.

188- Wallach, M.; Halabi, A.; Pillemer, G.; Sar-shalom, O.; Mencher, D.; Gilad, M.; Bendheim, U.; Danforth, H.D. and Augustine, P.C. (1992): Maternal immunization with gametocyte antigens as a means of providing protective immunity against Eimeria maxima in chickens. Infect. Immune. 60: 2036-2039.

189- Wallach, M.G.; Mencher, D.; Yarus, S.; Pillemer, G.; Halabi, A. and Pugatsch, T. (1989): Eimeria maxima: Identification of gametocyte protein antigens. Exp. Parasitol. 68: 49-56.

190- Wang, C.C. and Stotish, R.L. (1975): Pancreatic chymotrypsin as the essential enzyme for excystation of Eimeria tenella. J. Parasitol. 61: 923-927.

191- Wang, J.S. and Tasi, S.F. (1991): Prevalence and pathological study on rabbit hepatic coccidiosis in Taiwan. Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. Chin. B., 15 (4): 240-243.

192- Weinstein, P.D., Anderson, A.O., Mage, R.G. (1994): Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers :VH diversification by gene conversion-like and hypermutation mechanism. Immunity., 1: 647–659.

193- Wisher, M.H. (1986): Identification of the sporozoite antigens of Eimeria tenella.Mol.Biochem.Parasitol.21:7-15.

194- Yakhchali, M. and Tehrani, A. (2007): Eimeriidosis and Pathological Findings in New Zealand White Rabbits. Journal of Biological Sciences 7: 1488-1491.

195- Zajac, A.Z. and Conboy, G.A. (2012): Veterinary Clinical Parasitology 8th Edition, 8-11.

196- Zerrin, E. S. and Yesari, E. (2006): DS Hepatic Coccidiosis in Angora Rabbits. J. Ani., Vet. Adv., 5: 462-463.

197- Zhu, G.; Johnson, J.K. and McDougald, L.R. (1994): Peptides associated with monensin resistance in sporozoites of Eimeria tenella.
198- http://dora.missouri.edu/rabbits/hepatic-coccidia
199http://www.encyclopediaofarkansas.net/media/gallery/Document/Coccidia2_f.jpg
200- http://www.infoexoticos.com/coccidiosis-en-conejos.
201- http://eimeria.chez-alice.fr/structure.html.

Electrophoresis results showed 11 bands found in the protein extract of the sporulated oocysts and the molecular weights ranged from 19.21 KDa to 130KDa, On the other hand, three bands were found after the electrophoresis of the protein digestion of the sporozoites and the molecular weights were 24.43 KDa, 26 KDa, and 28.67KDa.

After applying Western Blotting technique using collected serum from immunocopetent infected rabbits (second group-day 24 post infection) the results revealed that the immunogenic antigens of sporulated oocysts were (24.43- 26- 28.67-34.19- 57- 124.74- 130) KDa, while those recovered from sporozoite were (24.43- 26- 28.67) KDa.

English Abstract:ملخص باللغة الإنكليزية –

This study aimed to detect the most important immunogenic antigens which are responsible of antibody production after experimental infection with *Eimeria steidea,* and to compare the propagation of *E. steidea* in two groups of rabbits, immunosuppressed group with unsuppressed group.

For knowing the effect of corticosteroids on propagation of *E. steidea* in rabbits through counting OPG (oocyst per gram), twenty-five rabbits aged 6-8 weeks of both gender had been divided into three groups, (first) 5 animals as untreated uninfected control group,(second) 10 animals as immunocompetent group and infected with *E.steidea*, and (third) 10 immunosuppressed animals by injection with Dexamethsone phosphate and infected with *E. steidea*.
The second and third groups were infected with 5×10^4 sporulated oocysts by oral inoculation to each animal while the first group remained without infection.

collection and examination of feces started at day 14 post infection and continued to the end of the experiment, that the number of OPG (oocyst per gram) was detected using McMaster method and blood sample was collected directly from the heart before animal slaughter on day 24 post infection .

First detection of oocyst was at day 18 in the second group, and at day 16 in the third group, then the oocysts numbers had increased daily in two groups till reached the peak at day 22, and the OPG started to decrease after this point.
Results revealed that the parasite propagated in both infected groups (second and third), and The number of OPG (oocysts per gram) was significantly higher in immunosuppressed group than the intact one ($p<0.05$) .

The most important immunogenic antigens were detected after isolation and sporulation of oocysts (percentage of sporulation was 92% after 5-7 days), then the sporulated oocysts purified and the antigens were processed and prepared from two stages of *E. steidea* included sporozoite and sporulated oocyst.
To find out the molecular weights of the antigens of both stages, the electrophoresis was carried out using SDS- Page (Polyacrylamide gel electrophoresis).

-الفصل الثامن-

ملخص باللغة الإنكليزية

English Abstract

Syrian Arab Republic
Hama University
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Microbiology

Detection of Eimeria Stiedae Antigens in Rabbits

Thesis Presented

For Master Degree in Vet. Med. Sci

- Parasitology -

Prepared by

Osama Jamal Al-Waheeb

D.V.M

Under The Supervision Of

Prof. Dr.

Mohamad M. Katranji

Prof. Dr.

Mahmoud Kweider

2018