تقدير الوزن الجزيئي للكلوبيولين المناعي النوعي IgY المستخلص والمنقى من صفار البيض وتقيم فعاليته ضد نوع الطفيلي *Eimeria tenella* في الدجاج

ثائر عبد القادر صالح[*]، شهاب احمد محمد[**] وتوفيق إبراهيم[***]

[*]كلية العلوم/ جامعة الأنبار

[**]كلية التربية/ جامعة تكريت

[***]كلية الطب البيطري/ جامعة تكريت

الخلاصة

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

Evaluation of molecular weight of the immunoglobulin IgY extraction and purification from egg yolk and against coccidial *Eimeria tenella* in chickens

Th. A. Salah[*], Sh. A. Aljebory[**] and T. A. Al-Aloosi[***]
[*]College of Science\ University of Anbar
[**]College of Education\ University of Tikerit
[***]College of Veterinary Medicine\ University of Tikerit

Abstract

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

المقدمة

أن كلمة المناعة (Immunity) تعني قدرة الجسم على حماية نفسه من المستضدات الغريبة، وتكوين الجسم للكلوبيولينات المناعية Igs ضد معظم المستضدات Ags الغازية هو في الحقيقة وسيلة علاجية تنقذ الجسم مما قد تسببه تلك المستضدات من أمراض وأضرار، وان استخلاص الأجسام المضادة المتخصصة ضد مستضد معين وحقنها في جسم آخر سوف يولد مناعة ضد نوع المستضد المراد الوقاية منه (التمنيع المنفعل Passive immunization)(1)، ولأن الكمية المنتجة من الكلوبيولينات المناعية في اللبأ تنتهي خلال أيام قليلة لذلك تم البحث عن بديل تكون فيه نسبة الكلوبيولينات المناعية عالية ومستمرة في العطاء لذلك تم التوجه إلى مح البيض

Egg Yolk، أن IgY الذي يتواجد في صفار البيض وبكميات كبيرة يكون له دور أساسي في حماية الجسم من المستضدات الدخيلة، ونظراً للقيمة الغذائية العالية لمنتجات الدواجن (اللحم والبيض) فقد ازداد الطلب الاستهلاكي عليها في جميع أنحاء العالم مما ولد ضرورة مُلحة تهدف نحو تحسين السلالات المستخدمة في التربية لغرض الارتقاء في إنتاجيتها إلى مستويات عالية(2)، ولكن ضعف الاستجابة المناعية للسلالات الحديثة لفروج اللحم ودجاج البيض جعلها عرضة للأمراض والهلاكات المستمرة، وأصبحت مشكلة انتشار الأمراض وعلاجها واحدة من أهم المشاكل التي تعترض التوسع في تربية الدواجن (3، 4)، ذكر الباحثان Tyzzer عام 1929 وJohnson عام 1938 وجود أكثر من نوع واحد يسبب داء الاكريات Coccidiosis بالدواجن، والعديد من الباحثين أكدوا بأن *E. necatrix*, *E. tenella* هما أكثر الأنواع خطراً وأمراضية في الدجاج (5)، داء الاكريات يعد من الأمراض المهمة التي تخمج الحيوانات كافة إذ تسببه أوالي أحادية الخلية تعود إلى صنف البوغيات Sporozoaida التابعة لشعبة معقدة الفم Apicomplexa (6، 7)، تتميز بيوض جنس *Eimeria* المبوغة Sporulated Oocysts بشكلها البيضوي Ovoid واحتوائها على أربع أكياس بوغية Sporocysts، يحوي كل كيس بوغي على زوج من البويغات Sporozoites، وتتميز الأنواع التابعة لجنس الايميريا بالخصوصية العالية للمضيف والخصوصية العالية للعضو المصاب (8)، ولعدة سنوات خلت كانت الوسيلة الوحيدة للسيطرة على داء الاكريات في صناعة فروج اللحم هي بإضافة مضادات الاكريات إلى الأعلاف Anticoccidial feed additives، إذ لها دور مهم في تطور تلك الصناعة التي بلغ إنتاجها السنوي بحدود 7.6 بليون فروجه لحم سنوياً، إلا أن بروز ظاهرة المقاومة لمضادات الاكريات من قبل طفيلي *Eimeria*، جعل المخاطرة تهيمن على الثبات الاقتصادي لصناعة الفروج (9)، ويبدو أن المحاولات التي تبديها الصناعات الدوائية لتطوير جيل جديد من مضادات الاكريات جعل من عملية التحدي لظاهرة المقاومة التي تبديها أنواع *Eimeria* تفرض على الباحثين جهوداً علمية كبيرة للبحث عن طرائق بديلة للسيطرة على داء الاكريات، وذلك بزيادة المعرفة عن سلوك الطفيلي والاستجابة المناعية فضلاً عن التحويرات الغذائية، وبالرغم من التطور الحاصل في الأدوية الوقائية والعلاجية تبقى السيطرة على المرض تكلف صناعة الدواجن مبالغ باهظة، وعند مراجعة سجلات الشركة العامة للبيطرة في العراق لعام 2000 لوحظ أن أعداد الأفراخ التي تصرف لها العلاجات يكون بشكل مستمر على عموم محافظات القطر، حيث تبين أن هناك كميات كبيرة جداً من الأدوية العلاجية والوقائية قد صرفت للعلاج، إذ بلغ أعداد الأفراخ المعالجة لعام 2000 بحدود 88,166,826 فرخاً(10)، يعتمد الأساس النظري لهذه التجربة على إن الأجسام المضادة والمتخصصة نوع IgY الموجودة في مصل دم الدجاج والمنتقلة إلى صفار البيض إذا احتفظت بفعاليتها داخل الجسم فإنها سوف تعادل في مفعولها كمية الطفيلي الداخلة إلى الجسم وبالتالي تمنع حدوث الخمج وكذلك التغلب عليه، لذلك هدفت الدراسة إلى استخلاص وتنقية وتقدير الوزن الجزيئي للكلوبيولين المناعي IgY من صفار البيض في الدجاج المُخمَّج بالطفيلي *Eimeria tenella* ومعالجة الدجاج المخمج بالطفيلي ومعرفة أفضل طريقة لإيصال العلاج من خلال إجراء القياسات الدمية والمصلية ومعرفة شدة الآفة العيانية.

المواد وطرائق العمل

- **تحضير العلف:** حضرت عليقه واحدة لجميع المعاملات طيلة فترة التجارب، إذ تم إعداد تركيب العليقة من قبل المختصين في مركز أعالي الفرات للأبحاث الزراعية/ المنطقة الغربية/ الفرع الثاني/عنه، واستخدم المركز البروتيني النباتي المستورد المسمى Preconex لأنه لا يحتوي على مضاد الاكريات كما في الجدول (1).

جدول (1) تركيب العليقة المستخدمة في الدراسة

المواد	النسبة المئوية%
ذرة صفراء	60
صويا	27
مركز بروتيني	10
حجر كلس	0.7
ملح	0.3
دهن نباتي	2
المجموع	100

- **الايميريا *تنيلا* Eimeria tenella:** تم استخدام عزلة محلية حديثة من الـ *E. tenella* التي تم الحصول عليها من إحدى مجازر ذبح الدجاج في محافظة الانبار/ مدينة الرمادي من خلال اخذ منطقة الأعورين وفحصها للتأكد من إصابتها بداء الاكريات، كما تم تأكيد تشخيص العينة في المستشفى البيطري/ الرمادي، وقد تم تحضير أكياس البيض للطفيلي بإتباع ما يلي:
- **تحضير أكياس البيض الناضجة:** جمعت أكياس البيض من خلال اخذ الأعورين (مع محتوياتها) خلال شهر كانون الأول 2010، وتم وضعها في خلاط كهربائي Blender، ثم أُخذ الخليط ورشح بواسطة مصفاة (منخل) 50 مش/ سم^2، بعدها رشح بواسطة قطعة من قماش التول للتخلص من البقايا العالقة، ثم رُسب الخليط بواسطة الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق، غُسل الراسب بالماء المقطر ورُسب مرة أخرى (أعيدت الطريقة ثلاث مرات)، بعدها تم تطويف Floatation الراسب بواسطة محلول شيذر السكري أو المحلول الملحي المشبع Nacl (أعيدت عملية التطويف ثلاث مرات) وفي كل مره يوضع الراشح مع سابقه في قنينة نظيفة، اخُذ الراشح وخفف بالماء المقطر بنسبة 1 راشح: 10 ماء مقطر، ووضع الخليط الكلي مع كمية مساوية من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم بتركيز 2.5% لحفظ أكياس البيض، وضع العالق (الراشح) في دورق زجاجي نظيف ومعقم ووضع في حمام مائي هزاز Shaker Water Bath بدرجة حرارة 25–28 ^{o}م لمدة 72 ساعة وغطى الدورق بالورق الفضي Aluminum Foil المعقم المثقب الذي يسمح بدخول الأوكسجين الضروري لحدوث عملية التبويغ Sporulation (11)، وإكمال العالق بالماء المقطر بين مدة وأخرى لكي لا يجف العالق (12) تم التأكد من نضوج أكياس البيض من خلال فحصها تحت المجهر (13).
- **تنقية وتعقيم أكياس البيض:** تم تنقية أكياس البيض للطفيلي وتعقيمها اعتماداً على ما جاء في (14، 15، 16).
- **حساب أكياس البيض:** تم حساب وعد أكياس البيض الناضجة في المليلتر المكعب الواحد بعد تخفيف العينة 100 مرة بالماء المقطر، وحسبت بواسطة جهاز (شريحة) عد كريات الدم Haemocytometer وفي المربعات المخصصة لعد كريات الدم البيضاء للحصول على معدل الأكياس في المربع الواحد، حيث تم تقسيم العدد الكلي على أربعة ثم ضرب × 100 (17).
- **تكثير أكياس البيض:** تم تكثير العزلة في المختبر وذلك بتخميجها لأفراخ فروج لحم Ross 308 وبتمريرات متعددة كالآتي:- بعد تنقية العزلة تم تنشيط العترة النقية وتكثير أكياس البيض وذلك باستخدام 50 فرخاً ربيت في أقفاص حديدية ذات أرضية مشبكه في غرفة معزولة وقدم لها الماء والعلف الخالي من

مضادات الاكريات، وتم تخميجها باستخدام محقنه بلاستيكية Syringe سعة 3 مل، إذ تم إدخالها عن طريق الفم مباشرة إلى الحوصلة In Crop بعالق يحوي 5×10^4 كيس بيض مبوغ/ فرخ، بخمس تمريرات باستخدام 10 أفراخ لكل تمريره بأعمار 14، 21، 28، 30، 35 يوم على التوالي، ووضع إناء بلاستيكي ملحق بالقفص حاوي على محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم 2.5% تحت الأرضية المشبكة للقفص في اليوم الرابع والخامس والسادس والسابع والثامن وقتلت الأفراخ في اليوم التاسع من الخمج وتم تشريحها ، تم تحضير أكياس البيض وتبويغها خارج الجسم بعد جمعها لغرض التجريع مرة ثانية، وكذلك تم تجميع أفراخ التجربة الثانية بالطريقة المذكورة أعلاه، أما الهدف من ذلك كان:

1. التأكد من كون العزلة تنتمي للـ *E. tenella* من خلال فحص منطقة الأعورين.
2. زيادة ضراوة العزلة والحصول على عتره التحدي Challenge Strain.
3. تحضير جرع كافية من أكياس البيض المبوغة لاستخدامها في هذه الدراسة.

- **تشخيص أكياس البيض:** شخصت العزلة من خلال الاعتماد على الفحص العياني للآفات وموقع التطفل والفحص ألمجهري لأكياس البيض من حيث الأشكال والأبعاد حسب (18، 19، 20)، وذلك باستخدام المجهر والعدسة العينية المدرجة Graduated Ocular Micrometer، وللحصول على معامل المجهر استخدمت المعادلة التالية:

معامل المجهر = معدل قياس المسرح الدقيق/ معدل قراءات المقياس العيني * 100 مايكروميتر

الأبعاد الحقيقية لأكياس البيض= قياس أبعاد أكياس البيض بواسطة العدسة العينية المدرجة * معامل المجهر

كما تم تأكيد تشخيص العزلات في المستشفى البيطري/ الرمادي.

- **قياس اقل جرعة من أكياس البيض الناضجة لأحداث 50% نفوق في الأفراخ المخمجة LD50:** استخدمت طريقة الباحثين (21) في حساب اقل جرعة من أكياس البيض الناضجة لإحداث 50% نفوق في الأفراخ المخمجة وتمت كالآتي:

أ. تم توزيع 120 فرخ نوع Ross 308 بصورة عشوائية وبمكررين لكل مكرر 60 فرخاً إلى ستة مجاميع بحيث يكون نصيب كل مجموعة منها 10 أفراخ.

ب. تم تخميج الأفراخ بعمر 30 يوم حسب الجرعة التالية:

المجموعة الأولى 30000 كيس بيض مبوغ.

المجموعة الثانية 40000 كيس بيض مبوغ.

المجموعة الثالثة 50000 كيس بيض مبوغ.

المجموعة الرابعة 60000 كيس بيض مبوغ.

المجموعة الخامسة 70000 كيس بيض مبوغ.

المجموعة السادسة ماء مقطر (سيطرة).

ج. تسجيل الهلاك من بداية اليوم الخامس وحتى نهاية اليوم الثامن وكذلك فأن هذه الأكياس يستفاد منها في التجربة الأساسية.

- **تخميج الدجاج البياض:** أخذت 10 دجاجات بياضه نوع Lohmann وتم حقنها بالعترة الضارية للطفيلي (جرعة التحدي) بعد تكسير Oocyst للطفيلي بواسطة جهاز الموجات فوق الصوتية Sonicator إذ تم مزجها مع محلول فرويند الناقص Freund's incomplete oil adjuvant وبجرعات متتابعة حيث تم توزيع إعطاء الجرعة الأولى تحت الجلد وفي عضلة الصدر وعضلة الفخذ وعضلة الرقبة ومقدارها 5 ×

10^4 وبعد أسبوعين أعطيت الجرعة الثانية بمقدار 1× 10^4 أما الجرعة الثالثة فقد أعطيت بعد أسبوعين أيضاً وبمقدار 1× 10^3 والجرعة الرابعة بعد 20 يوم بمقدار 1× 10^3 لغرض الحصول على الجسم المضاد IgY لهذه العترة حيث تم جمع البيض منذ بداية إعطاء الجرعة الأولى إلى نهاية التجربة والتي استمرت 87 يوم(22، 23).

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

1. بعد كسر البيضة وضعت في مصفاة (منخل صغير 50 مش/ سم^2) لكي يتم التخلص من أح البيض، أُخذ المح وتم وضعه على ورقة ترشيح وتمت دحرجته للتخلص من اح البيضة بالكامل، ثُقب غشاء المح وسكب في أنبوب مدرج Tube 50 مل لمعرفة كمية المح (15 مللتر)، أُكمل الحجم إلى 45 مللتر بمحلول Phosphate Buffer Saline (PBS) ذات pH=7.2.
2. أُضيف 1.58غم من Polyethylene glycol 6000 (PEG)أي بنسبة 3.51% من كمية المحلول.
3. خُلط جيداً بواسطة جهاز المازج الهزاز Vortex لمدة 30 ثانية، ثم وضع في حاضنة هزازة Roller Incubator Mixer لمدة 10 دقائق حتى تغير لونه إلى الأصفر الفاتح، تم وضعه في جهاز الطرد المركزي المبرد Cooling Centrifuge بدرجة حرارة 4م^o وبسرعة 13000 دورة/ دقيقة ولمدة 20 دقيقة حتى فُصل إلى راسب وعالق.
4. أُخذ العالق ورُشح بواسطة ورقة ترشيح No.1، أُخذ الراشح بعدها وأُضيف له نسبة 8.5% من PEG ثم كررت الخطوة رقم (3).
5. أُخذ الراسب وأُضيف له 4 مللتر من محلول PBS (pH 7.2) ومُزج بواسطة جهاز المازج Vortex لمدة 30 ثانية مع استعمال عمود زجاجي بعد غسله وتعقيمه بواسطة الماء المقطر المعقم، أُكمل الحجم إلى 10 مللتر من محلول PBS وأُضيف له نسبة 12% من PEG ثم كررت الخطوة رقم (3).
6. أُضيف إلى الراسب 4 مللتر من PBS ومزج جيداً بواسطة Vortex، نُقى IgY بعد ذلك من الأملاح بواسطة عملية الديلزة Dialysis للمحلول المستحصل عليه، حيث أُخذ كيس الديلزة 80000– 100000 دالتون، وغُسل بشكل جيد بواسطة 1% حامض الخليك لمدة نصف ساعة بعدها غُسل بالماء المقطر لمدة نصف ساعة أيضاً، وضع المحلول في كيس الديلزة ووضع الكيس في بيكر يحتوي على كمية من PBS بحيث تغطي كيس الديلزة بالكامل، وتركت على جهاز الخلاط المغناطيسي Magnetic Stirrer بدرجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة، سُحب محلول IgY بعدها من كيس الديلزة (المديلز) وحُفظ في الثلاجة لحين الاستعمال(24، 25، 26، 27).

- **الترحيل الكهربائي العمودي للبروتينات الخام بهلام متعدد الاكريلامايد Electrophoresis:** استخدمت طريقة PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (PAGE– SDS) كما أوردها (28). باستخدام جهاز الهجرة الكهربائية العمودي الذي جهزته شركة Pharmacia السويدية ، لترحيل البروتينات ومتابعة تنقيتها.
- **قياس الامتصاصية الضوئية بجهاز Spectrophotometer:** تم قياس الامتصاصية الضوئية على طول موجي 540 نانوميتر لاستخراج التركيز الكلي للبروتين (IgY) الخام حسب طريقة بايوريت باستخدام المحاليل المحضرة من قبل شركة Linear Chemicals , S.L. حيث طبقت المعادلة: التركيز mg/ml = امتصاصية العينة/ امتصاصية المحلول القياسي * 70 (29).
- **فصل وتنقية IgY بالترشيح الهلامي Gel Filtration باستخدام هلام Sephacryl- S- 300- HR:**

- **المواد والمحاليل المستخدمة:** حضر محلول الدارئ PBS ومحلول الدكستران الأزرق Blue Dextran 2000 ومحاليل البروتينات القياسية معلومة الوزن الجزيئي وفقاً للشركة المجهزة (Fine Chemicals Pharmacia).
- **تحضير هلام Sephacryl S 300 HR:** حضر هلام Sephacryl S 300 HR وفقا لتعليمات الشركة المجهزة (Pharmacia Fine Chemicals) وكذلك (30، 31، 32، 33).
- **تقدير حجم الفراغ للعمود:** قدر حجم الفراغ (Vo) Void Volume للعمود باستعمال المحلول المحضر من الدكستران الأزرق، مرر 5 مللتر من هذا المحلول خلال العمود بشكل تدريجي على جدار العمود الداخلي بالقرب من سطح الهلام واسترد محلول الدكستران الأزرق بمحلول الدارئ PBS بجمع 3 مللتر/ أنبوب وبسرعة ثابتة قدرها 18 مللتر/ ساعة بعد تشكيل جهاز Peristaltic pump وتنظيمه لسحب 3 مل كل 10 دقيقة في أنابيب خاصة Tubes موضوعة في جهاز جامع النماذج Fraction Collector والذي تمت برمجته على التحرك كل 10 دقيقة حركة واحدة، ثم قيس الامتصاص الضوئي في جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer للأجزاء المنفصلة عند طول موجي قدره 600 نانو ميتر، وقدر حجم الفراغ للعمود من حساب مجموع حجوم الأجزاء المنفصلة عند إمرار محلول الدكستران الأزرق من أول جزء إلى الجزء الذي يمثل اعلى امتصاص لقمة الدكستران الأزرق.
- **تقدير حجم الاسترداد:** قدر حجم الاسترداد (Ve) Elution Volume لسبعة بروتينات قياسية معلومة الوزن الجزيئي وذلك بإضافة واسترداد كل بروتين على حدة وبالظروف نفسها لاسترداد الدكستران الأزرق، كما قدر حجم الاسترداد لبروتينات المناعة المفصولة بالطريقة نفسها أعلاه، ثم قيست الامتصاصية الضوئية على طول موجي 280 نانومتر لكل جزء من الأجزاء المنفصلة بغية تحديد حجم الاسترداد لكل بروتين قياسي، رسم المنحنى القياسي للعلاقة بين حجم الاسترداد/ حجم الفراغ (Ve /Vo) ولوغاريتم الأوزان الجزيئية، وقدر الوزن الجزيئي لبروتين المناعة IgY المفصول من مقارنة قيمة (Vo/ Ve) مع المنحنى القياسي.

جدول (2) البروتينات القياسية المستعملة في اختبار الترشيح الهلامي

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

- **الترحيل الكهربائي العمودي لكلوبيولينات المناعة بهلام متعدد الاكريلامايد:** استخدمت طريقة PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (PAGE- SDS) لترحيل كلوبيولينات المناعة كما أوردها(28)، باستخدام جهاز الهجرة الكهربائية العمودي الذي جهزته شركة Pharmacia السويدية.
- **المسح الضوئي Spectra لمحلول IgY:** تم إجراء المسح الضوئي Spectra لعينة IgY بواسطة جهاز Spectrophotometer لمعرفة أعلى قمة يصلها وفي أي طول موجي لكي يتم قياس الامتصاصية الضوئية لعينة IgY على نفس الطول ألموجي حيث إن أعلى قمة يصلها تمثل أفضل طول موجي يمكن من خلاله قياس امتصاصية العينة واستخراج تركيزها.

- **قياس الامتصاصية الضوئية بجهاز Spectrophotometer وتقدير كمية IgY الكلي بعد التنقية في العينة:** تم قياس الامتصاصية الضوئية للنموذج (العينة IgY) على طول موجي 280 نانوميتر Optical Density of 280 nm (OD_{280}) بعد إذابة العينة (IgY) بمحلول PBS ذات رقم هيدروجيني 7.2، تم تصفير ومعايرة الجهاز بواسطة محلول PBS، بعدها تم قياس امتصاصية العينات منذ بداية جمع البيض ولحد نهاية التجربة، وتم استخراج تركيز العينات المقاسة وفقاً لقانون Lambert – Beer Law بمعامل اختلاف 1.36 للـ IgY (30)، حيث تم تطبيق المعادلة أدناه لغرض استخراج تركيز IgY في العينة(31):

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

- **اختبار الانتشار المناعي المزدوج (طريقة اوكترلوني) Double immunodiffusion Ouchterlony test واختبار الانتشار المناعي المفرد (طريقة مانسيني) Single radial immunodiffusion:** استخدم اختبار الانتشار المناعي المزدوج واختبار الانتشار المناعي المفرد كما جاء في(34).
- **إعطاء IgY للدجاج:** تم إعطاء محلول IgY بطرق مختلفة وبتركيز 1/ 4 (29).

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

المعاملة الأولى: ماء مقطر (سيطرة سالبة).
المعاملة الثانية: العترة الضارية فقط (سيطرة موجبة).
المعاملة الثالثة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY عن طريق الكبسولة داخل الفم.
المعاملة الرابعة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY عن طريق التجريع بالحوصلة بعد إعطاء معادلة حموضة.
المعاملة الخامسة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY عن طريق الحقن بالغشاء البريتوني.
المعاملة السادسة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY عن طريق الحقن بعضلة الفخذ والصدر والرقبة.
المعاملة السابعة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY عن طريق الحقن داخل الصفار فوق منطقة السرة.
المعاملة الثامنة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY تحت الجلد بالقرب من عضلة الفخذ والصدر والرقبة.
المعاملة التاسعة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgY عن طريق الحقن داخل الوريد الجناحي.

- **القياسات الدمية والمصلية:** تم قياس السكر والكالسيوم والدهون المختلفة والبروتين الكلي والالبومين حسب كتات شركة Linear Chemicals، يتبعها قياس اختبارات الدم الكاملة فكانت على طرق البحثين (35، 36)، أما بالنسبة لقياسات أنزيمات الكبد GOT, GPT, ALP فكانت على جهاز Reflotron في مستشفى النسائية والتوليد في مدينة الرمادي.
- **تلقيحات الأفراخ:** لقحت الأفراخ بكافة اللقاحات المطلوبة وكالاتي:

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

- **التحليل الإحصائي:** اجري التحليل الإحصائي باتجاه واحد حسب ما جاء في برنامج SAS الجاهز الإصدار 9.1 (37).

النتائج والمناقشة

أن الأجسام المناعية لصفار البيض تمثل احد أهم البدائل التي تتمتع بقدرة عالية على منع العديد من المسببات المرضية وكذلك فأن وفرته في صفار البيض وتخصصه ضد نوعية المرض وسهولة الحصول عليه وعدم سميته أثناء العلاج جميعها خصائص تميز استخدام هذا العلاج (38)، أشارت دراسة البحث الحالية إلى الاستخلاص والتنقية والكشف عن IgY وعن تخصصه ضد داء الاكريات نوع *Eimeria tenella* بسبب خطورتها الكبيرة إذ تعتبر من اخطر أنواع الكوكسيديا التي تصيب الدواجن والتي تسبب هلاكات عالية جداً تصل من 5–50 % وربما تصل إلى 100% عند التباطؤ في علاجها (39)، جمعت العينات والبالغة 850 عينة براز وفُحصت تحت المجهر من خلال استخدام طريقة الترسيب وطرق التطويف بالمحلول السكري المشبع (محلول شيذر السكري) والمحلول الملحي المشبع Nacl، وقد أكدت النتائج أن محلول شيذر السكري كان الأكفأ في إظهار تشخيص عينة طفيلي *Eimeria tenella* يليها طريقة التطويف بالمحلول الملحي المشبع Nacl ثم طريقة الترسيب Sedimentation، وربما يعود سبب تفوق كفاءة المحلول السكري إلى شدة كثافة ولزوجة المحلول مما يجعله يرفع اكبر كمية موجودة من عزلة الطفيلي إلى الأعلى (40)، كذلك أجري غسل وتنقية لأكياس البيض بواسطة هايبوكلورات الصوديوم بنسبة 6% (القاصر)، وقد ظهرت طبقة طافية من أكياس بيض الطفيلي، الجدول (3) والشكل (1).

جدول (3) يوضح الطريقة الأفضل في الكشف عن الطفيلي *E. tenella*

عدد العينات المفحوصة	طريقة التطويف بمحلول شيذر السكري	طريقة التطويف بالمحلول الملحي المشبع	طريقة الترسيب
850 عينة	366 عينة موجبة 484 عينة سالبة	360 عينة موجبة 490 عينة سالبة	351 عينة موجبة 499 عينة سالبة



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

كما أكدت الدراسة أن هناك 366 عينة موجبة (مصابة) و484 عينة سالبة (غير مصابة) من مجموع العينات، أي أن نسبة الخمج المئوية بلغت 43.059% من مجموع العينات المأخوذة كما في جدول (4).

جدول (4) يوضح نسبة الخمج وعدد العينات المفحوصة

عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الخمجة	عدد العينات غير الخمجة	نسبة الخمج المئوية %
850 عينة	366 عينة	484 عينة	%43.058

شُخص الطفيلي اعتماداً على شكل وحجم كيس البيض وموقع التطفل (الأعورين)، وقد كان حجم الطفيلي يتراوح بين 18–19 X 22–23 مايكروميتر وهذا يطابق ما ذكره (40)، الجدول(5) والشكل(2).

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

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





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

استعملت أكياس بيض *Eimeria tenella* الحية لأنها مستضدات جيدة لتحفيز استجابة مناعية عالية وكذلك استعملت في الجرعة الرابعة أكياس البيض المتكسرة بواسطة جهاز الموجات فوق الصوتية Sonicator لتحرير Sporocyst و Sporozoite من Oocyst لغرض تجهيز مناعة خاصة ضد جميع أطوار الطفيلي المصيبة والمتكاثرة داخل خلايا الطبقة الطلائية في منطقة اعوري القناة الهضمية في الدجاج (41)، وعند مزجها مع محلول فروند بشكله الناقص Freund's Incomplete Adjuvant Form (IFA or FIA) سوف يحفز مناعة الخلايا في الجسم وبالتالي يحفز إطلاق الكلوبيولينات المناعية immunoglobulin's (40)، وفي هذه الدراسة تم اختيار كمية مناسبة من أكياس بيض الطفيلي لاستخدامها في التجربة وبتأثير 50% نفوق في الأفراخ المعاملة LD 50 لاستخراج كمية مناسبة من الـ IgY لغرض العلاج، إذ تم اخذ 120 فرخاً بعمر 30 يوم لإجراء التجربة كما في الجدول (6) والشكل(3).





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

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

مجاميع التجربة	أفراخ التجربة	عدد المكررات	زمن التجربة	جرعة الطفيلي	عدد الهلاكات	اليوم الذي حصلت فيه الهلاكات	نسبة الهلاكات المئوية
المجموعة الأولى	20	2	14 يوم	10^4*3كيس بيضة	4	في اليوم التاسع	%20
المجموعة الثانية	20	2	14 يوم	10^4*4كيس بيضة	6	في اليوم الثامن	%30
المجموعة الثالثة	20	2	14 يوم	10^4*5كيس بيضة	10	في اليوم السادس	%50
المجموعة الرابعة	20	2	14 يوم	10^4*6كيس بيضة	13	في اليوم الرابع	%65
المجموعة الخامسة	20	2	14 يوم	10^4*7كيس بيضة	16	في اليوم الرابع	%80
المجموعة السادسة	20	2	14 يوم	ماء مقطر (سيطرة)	صفر	------	صفر%

تمت تنقية العزلة بالتمريرات المتعددة لغرض الحصول على عزلة التحدي ، كذلك تمت ملاحظة التأثيرات المرضية الواضحة في منطقة الإصابة ويعود سبب ذلك إلى أن الطفيلي يهاجم خلايا الطبقة الطلائية المبطنة لمنطقة الأعورين ويتكاثر في داخلها مما يقلل من كفاءة عملها (42)، الجدول (7) والشكل (4).

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

عدد التمريرات للتجربة	عدد الأفراخ الداخلة في التجربة	عمر الأفراخ الداخلة في التجربة	وقت ظهور العلامات السريرية	معدل الهلاكات في المعاملة	نسبة الهلاكات المئوية	اليوم الذي حصلت فيه الهلاكات
التمريرة الأولى	10	14 يوم	في اليوم الرابع	5	%50	في اليوم السادس
التمريرة الثانية	10	21 يوم	في اليوم الرابع	5	%50	في اليوم السادس
التمريرة الثالثة	10	28 يوم	في اليوم الرابع	5	%50	في اليوم السادس
التمريرة الرابعة	10	30 يوم	في اليوم الرابع	6	%60	في اليوم الخامس
التمريرة الخامسة	10	35 يوم	في اليوم الثالث	7	%70	في اليوم الرابع



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

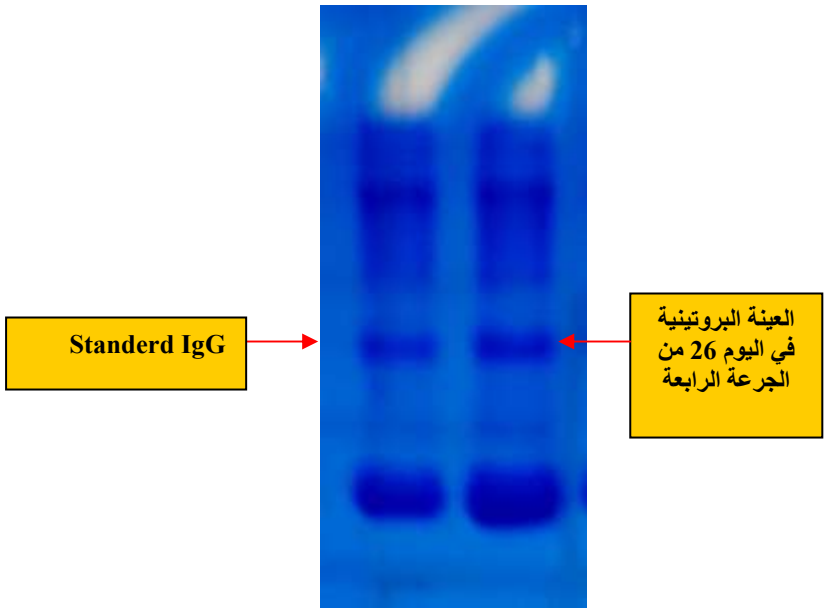
تم حقن الدجاج البياض نوع Lohmann تحت الجلد وفي عضلة الصدر وعضلة الفخذ وعضلة الرقبة بعد مزجه مع محلول فرويند الناقص وبجرعات متناقصة من المستضد وتركت فواصل زمنية طويلة نسبياً لغرض الحصول على أضداد ذات ألفة مرتفعة (43، 44)، إن صفار البيض يحتوى على IgY فقط من الكلوبيولينات المناعية ولذلك فان طريقة الحصول عليه تكون أكثر سهولة من الحصول على IgG من مصل الحيوانات الثديية، كما إن استخدام الطريقة التقليدية لذبح الحيوان للحصول على IgG المتخصص من الدم تكون أصعب

وأكثر كلفة من الحصول على IgY من خلال جمع البيض من الدجاج المحصن بدون ذبح الحيوان (45، 46)، الجدول (8).

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

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

تم عزل Crude IgY من صفار البيض باستخدام PEG – 6000 وتمت دليزته للتخلص من الأملاح، بعدها تم قياس الامتصاص الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر حسب طريقة بايوريت للكشف عن وجود العينة البروتينية وتركيزها وكذلك لمعرفة مدى ارتفاع مستوى الأضداد في العينة إذ أعطت أعلى تركيز في اليوم 26 من الجرعة الرابعة وبلغت 137.12609 ملغم/ بيضة، تم كذلك ترحيل العينات كهربائياً مع بعض البروتينات القياسية لفصل بروتينات المناعة وتقدير الوزن الجزيئي للبروتينات في العينة كما في الشكل (5).



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

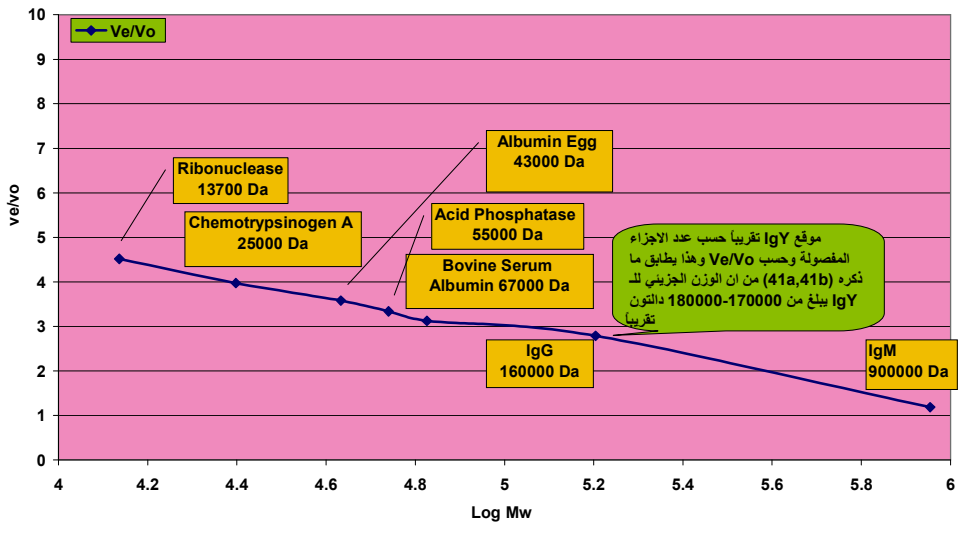
جرى بعد ذلك تنقية العينة البروتينية باستخدام تقنية العمود Column Chromatography باستخدام Sephacryl S 300 HR Gel Filtration بعد إزالة الغازات وتعبئة العمود بواقع 125 مل من الهلام على طول العمود 95 سم وعرض 1.6 سم، إذ تم تقدير الحجم الفراغي للعينة Void Volume (Vo) باستخدام صبغة Blue Dextran 2000 ذات الوزن الجزيئي 1000000 دالتون، إذ تم قياس الامتصاصية الضوئية على طول موجي 600 نانوميتر، وتم استرداد (حجم الاسترداد Elution Volume Ve) العينات البروتينية القياسية بسرعة جريان بلغت 18/ ساعة وبمعدل 3 مل جزء مفصول/ 10 دقيقة، وتم قياس الامتصاصية الضوئية

للبروتينات القياسية على طول موجي 280 نانوميتر، وقدر الحجم الفراغي للعمود من حساب مجموع حجوم الأجزاء المنفصلة عند إمرار محلول الدكستران الأزرق من أول جزء إلى الجزء الذي يمثل أعلى امتصاص لقمة الدكستران الأزرق، تم رسم المنحنى القياسي للعلاقة بين حجم الاسترداد/ الحجم الفراغي (Ve/Vo) ولوغارتم الأوزان الجزيئية، قدر الوزن الجزيئي بعدها للـ IgY من مقارنة قيمة (Ve/Vo) مع المنحنى القياسي للبروتينات القياسية (31) كما في الجدول (9) والشكل (6)، ان كل بيضة ممنعة بمرض معين تعطي كمية من IgY مقدارها حوالي 60–150 ملغم مجفف من مح البيض البالغ تقريباً 15 مللتر (44)، وقد ذكر (45، 46) ان الوزن الجزيئي للـ IgY يبلغ من 170000–180000 دالتون، وقدر (47) الوزن الجزيئي للـIgY تقريباً 178000 دالتون.

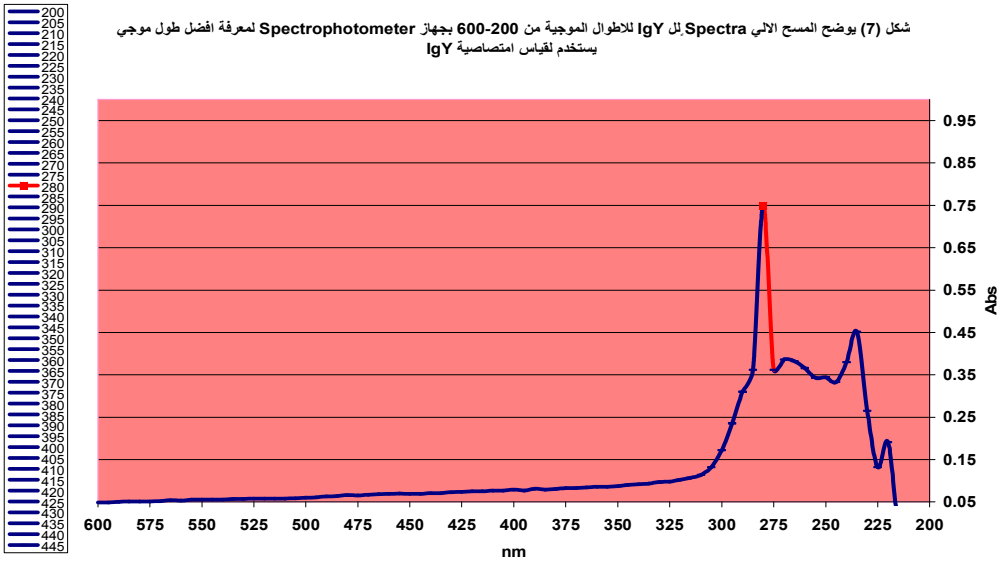
جدول (6) يوضح أعلى امتصاصية للعينات المفصولة بحجم 3مل لكل جزء (tube) وتطبيق المعادلة (Ve/Vo) ولوغارتم الأوزان الجزيئية

العينة Sample	الوزن الجزيئي مقدرة بالدالتون Dalton	لوغاريتم الوزن الجزيئي للعينات القياسية Log Mw	أعلى امتصاصية في الجزء المفصول Fraction No.	مضروب في حجم العينة 3مل	تطبيق المعادلة Ve/Vo واستخراج ناتجها
Blue Dextran 2000	1000000	6	33	99 مل	Ve / Vo (99)
IgM	900000	5.954243	39	117 مل	1.1818182
IgY المفصول	القيمة التقديرية لل IgY من 168000–180000	5.250420	89	267 مل	2.6969697
IgG	160000	5.20412	92	276 مل	2.787879
Bovine Serum Albumin	67000	4.82607	103	309 مل	3.1212125
Acid Phosphatase	55000	4.74037	110	330 مل	3.3333334
Albumin Egg	43000	4.6335	118	354 مل	3.575758
Chemotrypsinogen A	25000	4.3979	131	393 مل	3.969697
Ribonuclease	13700	4.1367	149	447 مل	4.515152

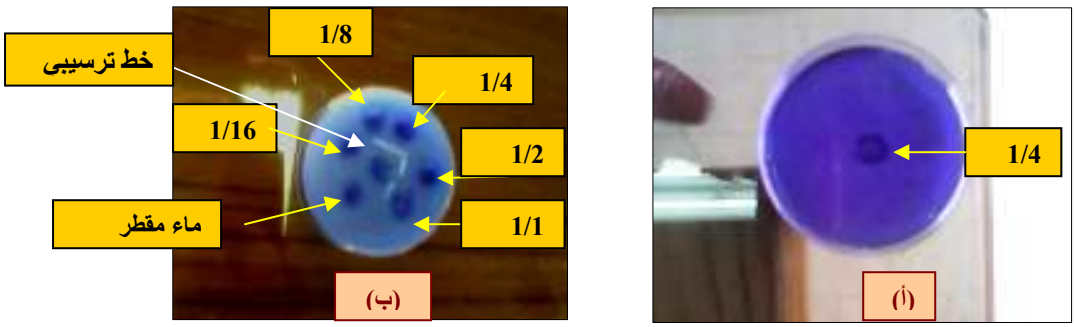
شكل (6) يوضح المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي للـ IgY المفصول بتقنية الترشيح الهلامي



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

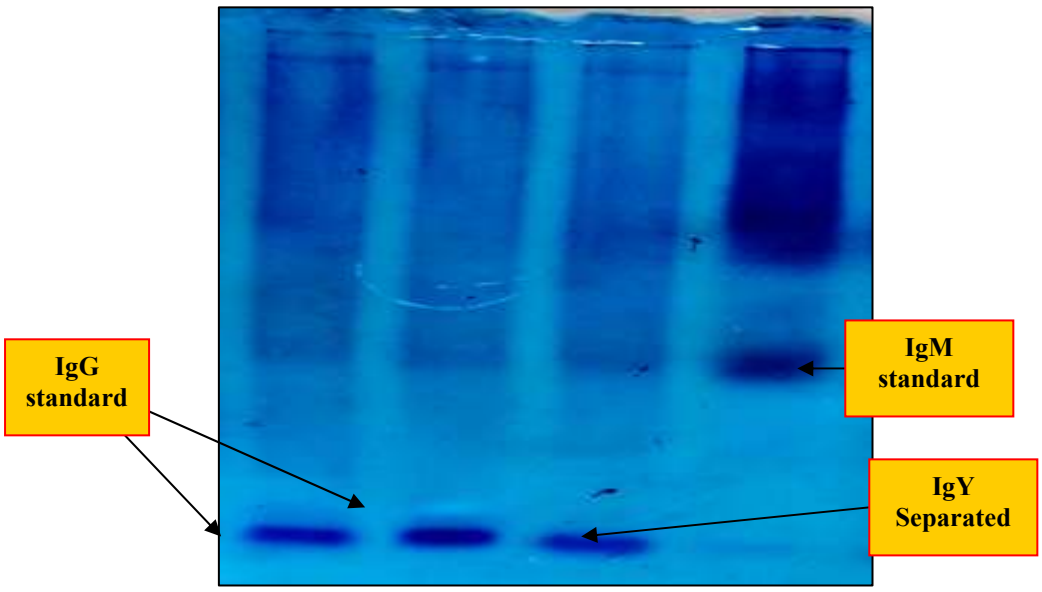


بعدها جرى قياس امتصاصية IgY المنقى لمعرفة تركيزه في العينة المفصولة وعلى طول مـــوجي 280 نانوميتر وحسب نتيجة المسح الآلي، إذ بلغ تركيزه 117.6176471 ملغم/ بيضة في العينة رقم 26 من الجرعة الرابعة، تم الكشف بعدها عن IgY بطريقة التلازن مع العترة الضارية بطريقـــة الانتشـــار المنـــاعي المفـــرد والمزدوج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



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

كما تم ترحيل العينة المفصولة من IgY بواسطة جهاز الهجرة الكهربائية العمودي وقـــد تبـــين ان هنـــاك تقارب مع حزمة IgG القياسية التي يكون وزنها الجزيئي 160000 دالتون، وهذا يطابق ما ذكره (48) كما في الشكل (9).



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

من الجدول (7) نلاحظ وجود فروق معنوية في نسبة الخمج بين معاملات إعطاء العلاجات مقارنة مع السيطرة الموجبة التي أعطي فيها جرعة التحدي فقط، كذلك هنالك فروق معنوية واضحة بين السيطرة الموجبة والسيطرة السالبة التي لم يعطى لها أي معاملة، فقد تبين أن أفضل طريقة لإعطاء العلاج كان عن طريق حقن الـ IgY في الغشاء البريتوني وفي صفار البيض الموجود في أعلى منطقة السرة داخل جسم الطير، حيث أن هاتين المعاملتين قد خفضت وبشكل ملحوظ عدد أكياس البيض المطروحة خلال حصول الخمج كما حدثت هلاكات في السيطرة الموجبة وهذا يطابق ما ذكره (49، 50) من أن إعطاء IgY خلال الغشاء البريتوني وصفار البيض ينقل المناعة السالبة Passive immunity إلى الطير ويعطيه حماية كاملة ضد الخمج بالكوكسيديا، حيث يؤازر المناعة الفاعلة في الجسم مما يقوي من مناعة الطير ويساعده في القضاء على الإصابة. يوضح الجدول (8) القياسات الدمية والمصلية ويبين الفروقات المعنوية أيضاً بين معاملة السيطرة الموجبة وبقية المعاملات مقارنة مع السيطرة السالبة، إذ وجد انخفاض ملحوظ في السكريات والكالسيوم في السيطرة الموجبة مقارنة مع السيطرة السالبة والمعاملات وكذلك ارتفاع مستوى الكلوبيولينات وخلايا الدم البيض والكوليسترول وTrichlesrides وALP وESR في السيطرة الموجبة مقارنة مع السيطرة السالبة والمعاملات وهذا يتفق مع (51) الذي ذكر أن هنالك تغيرات دمية ومصلية تظهر على الطير المصاب مع العلامات السريرية.

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

المعاملات	عدد أيام التجربة بعد إعطاء جرعة التحدي وإعطاء العلاجات																			
	الاول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس	السادس	السابع	الثامن	التاسع	العاشر	الحادي عشر	الثاني عشر	الثالث عشر	الرابع عشر	الخامس عشر	السادس عشر	السابع عشر	الثامن عشر	التاسع عشر	العشرون
سيطرة سالبة	0 A	0 A	0 A	0 A	0 B	0 B	0 C	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B	0 C	0 C	0 D	0 C	0 D	0 D
سيطرة موجبة	0 A	0 A	0 A	0 A	23466.7 A	30933.3 A	77866.7 A	97066.7 A	197333.3 A	242133.3 A	317866.6 A	342400 A	379733.3 A	410666.6 A	503466.6 A	551466.6 A	626133.3 A	704000 A	733066.6 A	786400 A
معادل حموضة	0 A	0 A	0 A	0 A	0 B	0 B	6133.3 BC	12133.3 B	19200 B	21333.3 B	28800 B	33066.7 B	37200 B	45700 B	52266.7 BC	53500 BC	58666.7 BCD	60800 BC	68266.7 BCD	75733.3 CD
حقن بالصفار	0 A	0 A	0 A	0 A	0 B	0 B	0 C	1956 B	2316 B	6656 B	9540 B	16620 B	21760 B	26880 B	29180 BC	32800 BC	34760 D	36980 BC	38580 CD	40080 CD
حقن بالبريتون	0 A	0 A	0 A	0 A	0 B	1066.7 B	3200 BC	9133.3 B	12300 B	15966.7 B	21333.3 B	25500 B	28800 B	32000 B	39466.7 BC	45866.7 BC	49800 CD	56666.7 BC	60666.7 BCD	67766.7 CD
العلاج بالكبسولة	0 A	0 A	0 A	0 A	2866.7 B	5600 B	11700 BC	18266.7 B	26833.3 B	34966.7 B	49333.3 B	59066.7 B	75266.7 B	85633.3 B	109900 B	126600 B	140200 BC	168833.3 B	183666.7 BC	198566.7 BC
حقن تحت الجلد	0 A	0 A	0 A	0 A	680 B	5146.7 B	10000 BC	14366.7 B	22133.3 B	28466.7 B	36333.3 B	47500 B	60200 B	81033.3 B	104433.3 B	125566.7 B	143600 BC	161133.3 B	190566.7 BC	204233.3 BC
حقن بالعضلة	0 A	0 A	0 A	0 A	0 B	6066.7 B	14000 B	16700 B	23100 B	28500 B	38866.7 B	53666.7 B	75633.3 B	93800 B	108466.7 B	126766.7 B	159900 B	177633.3 B	214500 B	266533.3 B
حقن بالورید	0 A	0 A	0 A	0 A	0 B	2933.3 B	6346.7 BC	9900 B	13866.7 B	22100 B	32833.3 B	52066.7 B	66400 B	83366.7 B	101533.3 B	122400 B	135933.3 BC	147533.3 B	159300 BCD	181100 BC
متوسط الخطأ القياسي	0	0	0	0	7403.2	10156.5	7391.3	12102.9	34783.5	29395.1	49052.5	56783.2	60771.3	61123.1	51690	56131.8	57328.8	80931.4	89556.7	96072.4
المتوسط العام	0	0	0	0	2614.1	5007.7	12507.7	17499.3	30834.8	39150.9	52380.6	62029	73500	84870.9	103371	116790.3	132790.3	148861.3	162032.3	178754.8
مستوى المعنوية	غ م	غ م	غ م	غ م	0.0117	0.0222	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

*** الأحرف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية، أما الأحرف المختلفة فتعني وجود فروق معنوية.**

جدول (8) يوضح القياسات الدمية والمصلية وبعض الايونات في المعاملات

المعاملات	Hb	PCV	MCHC	WBC	RBC *10⁴	Platelet	H/L	ESR	Total Protein	Albumin	Globulin	GPT	GOT	ALP	Cholesterol	HDL	LDL	Triglycerid	VLDL	Calcium	Glucose
سيطرة سالبة	10.88 A	34.67 A	31.39 AB	17200 C	347 A	34333.3 A	0.46086 AB	2.90 B	4.32 A	2.59 AB	1.73 AB	19.98 A	32.62 A	75.73 AB	120.37 A	98.76 A	23.03 B	52.67 A	10.53 A	9.43 A	193.67 AB
سيطرة موجبة	7.15 E	23.33 D	30.69 B	33800 A	220.6 E	22983.3 AB	0.9664 BC	13.00 A	6.43 B	2.40 B	4.03 C	19.06 A	29.43 A	180.92 A	170.78 A	61.25 A	109.52 A	76.67 A	15.33 A	8.12 D	117.33 C
معادل حموضة	9.33 BCD	30.00 BC	31.10 B	21666.7 BC	295.67 BCD	19483.3 B	0.8983 ABC	3.33 B	4.14 A	2.54 AB	1.60 A	19.30 A	32.54 A	67.28 AB	118.72 A	61.10 A	57.61 AB	49.67 A	9.93 A	8.84 ABCD	209.67 AB
حقن بالصفار	9.86 B	31.00 B	31.77 AB	20375 BC	300.75 BCD	30887.5 AB	0.5812 ABC	3.00 B	4.49 A	2.45 AB	2.04 AB	19.82 A	31.32 A	62.96 AB	111.83 A	63.77 A	48.05 AB	61.75 A	12.35 A	9.16 AB	220.25 A
حقن بالبريتون	9.55 BC	30.33 BC	31.49 AB	19366.7 BC	318.33 AB	25533.3 AB	0.47486 ABC	3.00 B	4.95 A	2.83 A	2.12 AB	19.003 A	32.08 A	57.39 AB	129.65 A	73.16 A	56.48 AB	52.67 A	10.53 A	9.37 A	184.33 AB
العلاج بالكبسولة	8.55 D	27.67 C	30.88 B	23300 B	266 D	19833.3 B	0.98621 C	6.67 B	4.83 A	2.49 AB	2.34 AB	19.64 A	30.47 A	113.01 AB	126.26 A	75.98 A	50.27 AB	49.33 A	9.86 A	8.54 BCD	178.33 AB
حقن تحت الجلد	9.83 B	31.00 B	31.73 AB	21933.3 BC	300.67 BCD	26600 AB	0.56047 ABC	4.67 B	4.67 A	2.62 AB	2.04 AB	20.63 A	32.01 A	59.53 AB	123.90 A	55.02 A	68.88 AB	38.67 A	7.73 A	8.99 ABC	192.33 AB
حقن بالعضلة	8.88 CD	28.67 BC	31.00 B	22066.7 BC	274 BCD	29833.3 AB	0.42668 A	5.67 B	5.04 A	2.30 B	2.74 B	20.18 A	29.48 A	50.38 B	130.73 A	62.96 A	67.77 AB	49.67 A	9.93 A	8.28 CD	167.0 B
حقن بالوريد	9.88 B	30.33 BC	32.61 A	21533.3 BC	311.66 ABC	24633.3 AB	0.47915 ABC	4.33 B	3.96 A	2.55 AB	1.41 A	20.84 A	33.59 A	140.46 AB	143.92 A	74.78 A	69.13 AB	76.00 A	15.20 A	9.15 AB	197.33 AB
القياسي المتوسط الخطأ	0.4527	1.5217	0.6890	2628.5	218921.8	6066.7	0.0599	2.0156	0.1621	0.2103	0.1659	1.3985	2.3988	64.923	32.633	25.447	33.153	26.152	5.2305	0.4047	26.058
العام المتوسط	9.3460	29.714	31.422	22289.2	2930357	26187.5	0.64586	5.0964	4.7550	2.5289	2.2261	19.830	31.501	88.785	130.01	69.436	60.728	56.535	11.307	8.8892	185.75
المعنوية مستوى	0.0001	0.0001	0.0739	0.0001	0.0001	0.0860	0.077	0.0001	0.005	0.2021	0.001	غ م	غ م	0.2306	غ م	غ م	0.2287	غ م	غ م	0.0055	0.0053

المصادر

1. Keri Marshall, N. D. 2004. Therapeutic Applications of Whey Protein Altern. Med. Rev.,9(2):136-156.
2. Havenstein, G. B.; Ferket, P. R. & Larson, B. T. 1994. Growth, livability and feed, conversion of 1975 vs. 1991. broiler fed typical 1957 and 1991 broiler diets Poultry Sci., 73:1785-1794.
3. Qureshi, M. A. & Anderson, K. E 1995. Comparison of immunologic functions of random bred verus present day SCWL. Laying hen strains. poultry science association. 48th. annual meeting. Abs.No.176.
4. El- Behairy, A. M. 2005. Immuno-characterization on some Eimeria spp. Infecting chicken in Egypt. M.V.Sc. Thesis Fac. of Vet. Med., Cairo University.
5. Kheysin, Y. M. 1972. Life cycles of coccidia of domestic animals. University Parck Press, Baltimore, London, Tokyo. 3th.
6. Crurrent, W. L.; Upton, S. J. & Long, P. L. 1990. Taxonomy and life cycles. In: Long, P. L. (ed). Coccidiosis of man and domestic animals. Boca Raton, Florida. CRC Press. PP. 1-16.
7. Trees, A. J. 1990. Parasitic diseases. In: Jordan, F. I. W. (ed). Poultry Diseases. 3rd ed. English language book. Society, Bailliere, Tindall, PP.226-233.
8. Shiotan, N.; Baba, E.; Fukata, T.; Arakawa, A. & Nakanishi, T. 1992. Distribution of oocysts Sporocysts of *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* in the digestive tract of chicken. Vet. Parasitol., 41:17-22.
9. Allen, P. C. & Fetterer, R. D. 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. Clin. Microbiol. Rev., 15: 58-65.
10. الصفار، ربى احمد شوقي عبد الوهاب. 2001. الكفاءة التمنيعية لطفيلي الاكريات المضعفة بأشعة كاما في دجاج اللحم، رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري، جامعة بغداد، العراق.
11. Edagar, S. A. 1955. Sporulation of oocysts at specific temperatures and notes on the prepatent period of several species of avian coccidiosis. J. Parasitol., 41:214-216.
12. Bowman, D. D. & Lynn, R. C. 1995. George's Parasitology for veterinarians, Philadelphia, London, Toronto, Tokyo. WB Sanders Company.2thEd. P.297.
13. Ibrahim, A. L.; Arafa, E. A. & Msahlabe, A. A. 1997. Study on pathogenicity and immunoginicity of irradiated sporulated intestinal *Eimeria* oocysts in chickens. Ass. Vet. Med. J., 37:133-140.
14. Jeffers, T. K. 1978. *Eimeria tenella* sensitivity of recent field isolants to monensin. Avian Dis., 22: 157-161.
15. Davis, L. R. 1973. Techniques. In: The Coccidia. Ed. by: Hammond, D. H. & Long, P. L. Baltimore. Butter worth, London,University Park Press.PP.411-458.
16. Jorgensen, W. K.; Stewart, N. P.; Jeston, P. J.; Molloy, J. B.; Blight, G. W. & Dalgliesh, R. J. 1997. Isolation and pathogenicity of Australian strains of *Eimeria praecox* and *Eimeria mitis* Animal Research Institute, Moorooka; Queensland, 4105. PP.10-18.
17. Al-Attar, M. A. 1981. Factors effecting the pathogenesis *Eimeria necatrix* infections in chicken. PhD. Thesis University of Guelph. Canada.
18. Calnek, B. W.; Barnes, H. J.; Beard, C. W.; McDougald, L. R. & Saif, Y. M. 1997. Disease of poultry. 10th ed. Mosby, Wolf. PP.865-878.
19. Edagar, S. A. 1992. Field diagnosis of coccidiosis in chickens. Agri-Bio Corporation.

20. Amer, M. M.; Awaad, M. H. H; El-Khateeb, R. M.; Abu-Elezz, N. M.; Said, S. A; Ghetas, M. M. & Kutkat, M. A. 2010. Isolation and Identification of Eimeria from Field coccidiosis in chickens. J. Am. Sci., 6(10).
21. Morehouse, N. F. & Baron, R. R. 1970. Coccidiosis: Evaluation of coccidiostats by mortality, weight gains and fecal scores. Exp. Parasitol., 28:25-29.
22. جواميرنهاد محمد علي عبد الله. 1996. استخلاص ودراسة فعالية بروتينات المناعة من صفار بعض الطيور الداجنة. رسالة ماجستير– كلية الزراعة، جامعة بغداد.
23. Hansen, P.; Scoble, J. A.; Hanson, B. & Hoogenraad, N. J. 1998. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. J. Immunol. Meth., 215:1-7.
24. Polson, A. 1990. Isolation of IgY from the yolks of eggs by polyethylene glycol 6000 procedure. Immun Invest., 19:253-258.
25. Rodiger, S.; Michael, E. & Christian, S. 2000. Chicken egg yolk antibodies (Production and Application). Chapter 4 (Isolation of IgY from yolk). eds, 68-85, Sub protocol 5, Springer Lab. Manual.
26. Javier, F.; Brito-De, E. & Torrestiana, B. 2010. Purification of egg yolk immunoglobulin (IgY) by Ultrafiltation: Effect of pH, Ionic Strength, and Membrane Properties. J. of Agri. and Food Chem., 58:187-193.
27. Diana, P.; Pablo, A. C.; Esteban, G. C.; Bjorn, B. & Rudiger, S. 2011. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodes from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipition. J. Visualized Experiments. 51: 1-5.
28. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227 (15): 680 – 685.
29. Layne, E. 1957. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins (Spectrophotometric Determination of Total Protein-Biuret Method). Methods in Enzymology. University of Central Arkansas, 10: 447-455.
30. Protocol for Biotinylation of IgY/ Version 1.0. 2011. www. immunsystem. com.
31. Diana, P.; Pablo, A. C.; Esteban, G. C.; Bjorn, B. & Rudiger, S. 2011. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodes from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipition. J. Visualized Experiments. 51: 1-5.
32. Hang, M. C. 1999. Productivity and some Properties of Immunoglobulin Specific against Streptococcus mutans Serotype c in Chicken Egg Yolk (IgY). American Chemical Society. J. Agric. Food Chem., 47: 61-66.
33. Amersham Biosciences. 2002. Gel Filtration (principle and methods). Chapter two (chromatography). PP. 45-52.
34. Johnston, A. & Thorpe, R. 1987. Immunochemistry in Practice. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, London, England.
35. Archer, R. K. 1965. Hematological techniques for use on animals. Oxford: Blackwell Scientific Publication.
36. Natt, M. P. & Herick, C. A. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and the leucocytes of the chicken. Poult. Sci., 31:735-738.
37. SAS, 2004. SAS User's guide: statistical system, Inc. Cary, NC. USA.
38. Watts, A. M. & Kennedy, R. C. 1999. DNA vaccination strategies against infections disease. Int. J. of Parasitol., 29: 1149-1163.
39. الشيخلي، فؤاد إبراهيم. 1982. أمراض الدواجن. مطبعة جامعة الموصل. نينوى. العراق.
40. Bowman, D. D. & Lynn, R. C. 1995. Diagnostic parasitology in: Georgis parasitology for veterinarias 6th ed. Philadelphia, W.B. Sounders Company. P. 297.

41. Long, P. & Gruber, A. 2005. Proceedings of The IXth International Coccidiosis Conference. Chapter 1. Universidade de São Paulo (USP) – Brazil.
42. Danforth, H. D. 1997. Use of live oocysts based vaccines in a vain coccidian control. In: Control of coccidiosis into next millennium. Ed by Shirley, M. W.; Tomley, F. M. & Freeman, B. M. Institute for animal health, Compton, New Burg Berks. PP. 95-96.
43. Armentero, M. T.; Levandis, G.; Nappi, G.; Bazzini, E. & Blandini, F. 2006. Peripheral inflammation and neuroprotection: systemic pretreatment with complete Freund's adjuvant reduces 6-yyhydroxydopamine toxicity in a rodent model of Parkinson's disease. Neurobiol. Dis. 24 (3): 492-505.
44. Jenkins, M. C. 2004. Control of avian coccidiosis: drug & Vaccines. Miscellaneous publishing information Bulletine, Feed information. News Service, P.3.
45. Kim, W. K. & Patterson, P. H. 2003. Production of an egg yolk antibody specific to microbial uricase and its inhibitory effects on uricase activity. Poultry Sci., 82:1554-1558.
46. Lee, S. H.; Lillehoj, H. S.; Park, D. W.; Jang, S. I.; Morales, A.; Garcia, D.; Lucio, E.; Larios, R.; Victoria, G.; Marrufo, D. & Lillehoj, E. P. 2009. Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodes against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. Vet. Parasitol., 163: 123- 126.
47. Lee, S. H.; Lillehoj, H. S.; Park, D. W.; Jang, S. I.; Morales, A.; Garcia, D.; Lucio, E.; Larios, R.; Victoria, G.; Marrufo, D. & Lillehoj, E. P. 2009. Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. Poultry Sci., 88:562–566.
48. Mary, H. F. 1994. Why IgY? Chicken Polyclonal Antibody, An Appealing Alternative. Promega Notes Magazine Number 46: 11.
49. Michael, A. 2010. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. Indian J. Sci. and Technol., 3 (4): 468-474.
50. Hyun, S. L.; Sung, H. L. & Lucio, E. D. 2005. Hyperimmune Egg Yolk IgY Antibodies Against Eimeria Mediate Protective Immunity Against Avian Coccidiosis by Inhibiting Sporozoite Invasion and Reducing Proinflammatory Cytokine Response. Animal Parasitic Diseases Laboratory, Usda-ars, Beltsville.
51. Hyun, S. L. 2007. Gut immune responses and intervention strategies against *Eimeria* and *Salmonella* . United States Department of Agriculture. PP. 1-2.
52. Lillehoj, H. S.; Min, W. & R. A. Dalloul, R. A. 2004. Recent Progress on the Cytokine Regulation of Intestinal Immune Responses to *Eimeria*. College of Veterinary Medicine, University of Maryland. Poultry Sci., 83:611-623.