تحديد مستضدات الأيمريّة الستيداويّة ذات القدرة الاستمناعية في لقاح البيوض المتكيسة الصُوَاتَة لدى الأرانب

ط.ب. أسامة الوهيب * أ.د. محمد محسن قطرنجي** أ.د. محمود قويدر***

(الإيداع: 29 تموز 2021 ، القبول: 7 آيلول 2021)

الملخص:

أظهرت نتائج الدراسة إمكانية تحديد أهم المستضدّات ذات القدرة الاستمناعية في لقاح البيوض المتكيّسة المتبوغة الصُواتة والمسؤولة عن تكوين الأضداد بعد جرعة التحدي، بدءاً من البيوض المتكيّسة المعزولة من الكبد وتبويغها وتنقيتها وتعريضها للأمواج فائقة الصوت، و باستخدام تقنية التبصيم المناعي حيث تم تحضين مصل الأرانب المجموع في اليوم 14 بعد التحدي مع البروتينات الناتجة عن صوتنة طور البيوض المتكيّسة المتبوغة للأيمريّة الستيداويّة.

وأظهرت النتائج تسع عصائب من المستضدّات ذات القدرة الاستمناعية والتي بلغت أوزانها الجزيئيّة (24-26-28-39-57-66-84-119-124) كيلو دالتون، ثلاث منها شديدة التلوين تبلغ أوزانها الجزيئيّة:(28 و26 و)24 كيلو دالتون. وكان أقوى هذه العصائب العصابة ذات الوزن الجزيئي 28 كيلو دالتون حيث ظهرت مباشرة بعد وضع ركيزة التفاعل وكانت الأكثر ثخانة.

الكلمات المفتاحية: الأيمريّة الستيداويّة، التبصيم المناعي، مستضدّات استمناعية، البيضة المتكيّسة المتبوغة.

* طالب دراسات عليا– اختصاص طفيليات –قسم الأحياء الدقيقة –كلية الطب البيطري –جامعة حماة

** أستاذ الطفيليات –قسم الأحياء الدقيقة –كلية الطب البيطري –جامعة حماة

*** أستاذ المناعة الطفيلية–قسم علم الحياة الحيوانية–كلية العلوم – جامعة دمشق

Determine Eimeria Stiedae Immunogenic Antigens in Sonicated Sporulated Oocyst Vaccine in Rabbits

Vet. Osama Alawaheeb* **Dr. Mohamad M. Katranji**** **Dr. Mahmoud Kweider*****

(Received: 28 July2021 ,Accepted: 7 September 2021)

Abstract:

The result of study showed the possibility of detection the most important immunogenic antigens from sonicated sporulated oocyst vaccine, which are responsible of antibody production after experimental infection.

After isolation and sporulation of oocysts from liver, then subjected to ultra-sonication using an Ultrasonic Homogenizer. Then applying Western Blotting technique (to detect the most important immunogenic antigens using collected serum from infected rabbits (day 14 post challeng) with protein extract of the sonicated sporulated oocyste, the results showed nine bands of antigens with immunogenic capacity, whose molecular weights reached (24-26-28-39-57-66-84-119-124) kDa. Three of them are highly colored and have molecular weights: (28, 26 and (24) kDa. The strongest of these was the 28 kDa band, which appeared immediately after application of the reaction substrate and was the thickest.

Keywords: Eimeria stiedae- Western Blot- Immunogenic Antigens- Sporulated oocyst

*: Postgraduate's student – Parasitology, Dept. of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Hama University

**: Professor in Parasitology, Dept. of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Hama University

***: Professor in Parasitology immunology, Dept. of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University

1-المقدمة Introduction:

الموجات فائِقُة الصَّوت Ultrsound waves هي موجات صوتية ذات ترددات أعلى من 20 كيلو هرتز، تتجاوز نطاق السمع البشري (Pollet and Ashokkumar, 2019). كل من الموجات فائِقُة الصَّوت والصوت المسموع هي موجات ميكانيكية على الرغم من أنها تعمل في نطاق ترددات مختلفة. وتحتاج الموجات الصوتية للانتشار إلى وسط مادي في حين أن المَوجاتٌ الكَهْرَطِيْسِيَّة، مثل الضوء المرئي والأشعة السينية وموجات الراديو، قادرة على الانتقال في الفراغ. يتم نقل الطاقة الصوتية من موقع إلى آخر بالاعتماد على الاهتزازات الميكانيكية ذهابًا وإيابًا للجزيئات المتوسطة. وأجهزة الموجات فائِقُة الصَّوت الحديثة قادرة على توليد نطاق تردد واسع يتراوح بين 20 كيلو هرتز وإلى عدة جيجا هرتز (Xing, 2016).

تقنية الموجات فائقة الصوت هي عبارة عن تقنية يتم من خلالها تعريض الجزيئات إلى نظام غير متساوي الحرارة وغير سام، والتي تم استكشافها في مختلف المجالات الكيميائية والبيو كيميائية (Shoda *et al.*, 2016; Uyama and Kobayashi, 2002). التأثير الرئيسي للموجات فائقة الصوت على الأنظمة السائلة هو التَكَهُفٌ cavitation، والذي يعتبر أهم تأثير للموجات فائقة الصوت، بالإضافة إلى توليد البؤر الساخنة، ونقل الكتلة الفعال، والجذور الحرة عالية التفاعل، وظواهر أخرى، مما يؤدي إلى تكثيف العمليات الفيزيائية والكيميائية. تم تطبيق الموجات فائقة الصوت في العديد من المجالات نظرًا لخاصية الأمان التي تتميز بها، حيث استُخدمت في خلط أو فصل أو استخلاص الأطعمة السائلة، وفي تفعيل أو تعطيل الإنزيمات، وفي استحلاب وتعديل وظائف البروتينات (Gogate and Kabadi, 2009; Gonçalves *et al.*, 2015).

تحفز الموجات فائقة الصوت الميكانيكِيَّة على إحداث تأثيرات كيميائية وميكانيكية صُواتة للبروتينات. تشمل هذه التأثيرات انكسار السلاسل أو تعديل المجموعات الجانبية للأحماض الأمينية. قد تؤدي التعديلات الميكانيكية من خلال التحريض الجزيئي المعزز إلى تعديل مؤقت أو دائم في هيكلية البروتين ثلاثية الأبعاد. نظرًا لأن الوظيفة البيولوجية للبروتينات تعتمد على الحفاظ على هذه البنية الهيكلية، فقد تؤدي كل من التأثيرات الكيميائية والميكانيكية الصُواتة على خصائصها. ومن الممكن أن يحافظ البروتين على هيكليته ووظائفه بعد التأثيرات الصواتة الطفيفة، ومع ذلك، فإن نقل الكتلة المحسّن من خلال التأثيرات الكيميائية والميكانيكية الصواتة قد يعرض البروتين إلى تشكل ثمالات داخلية كارهة للماء، مما يجعل بنية البروتين مشوهة لا رجعة فيها (Su and Cavaco-Paulo, 2021).

تتمتع تربية الأرانب بإمكانيات هائلة في البلدان النامية لتحسين سلامة وجودة الغذاء حيث تعتبر حيوانات منتجة جداً بسبب قصر مدة الحمل والخصوبة العالية (AbouLaila, 2020). وتعد الإصابة بالأيمريّة المسببة لداء الأكريات مرضاً طفيليّاً منتشراً يصيب الحيوانات عموما والأرانب مسبّباً تراجعاً خطيراً في النمو وفي معدّل الاستفادة من العلف (Abdel-Megeed *et al*., 2005) ويسبّب 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 (Tehrani *et al*., 2013). ويعد 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 الأيمريّةSuborder Eimeriina عائلة الأيمريّة Family Eimeriidae جنس الأيمريّة Genus Eimeria(Schnieder and Tenter, 2006). وقد وُصفت البيوض المتكيّسة للأيمريّة الستيداويّة في البداية من قبل عالم الأحياء الهولندي (Antoni Van Leeuwenhoek) في القنوات الصفراويّة عام 1674 (Donald *et al*., 2010)، والتي تسمى في وقتنا الحالي الأيمريّة الستيداويّة.

ذكرت بعض الأبحاث أن 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، ويعد 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 فتُعدّ حاملة للمرض (Coudert *et al*.,1995).

تتشكل المناعة ضد الأكريات نتيجة وجود المستضدات التي تختلف باختلاف الأطوار المتعددة التي يمر بها طفيلي الأيمرية في دورة حياته، وهي المستضدات اللاجنسية والجنسية، حيث تعد اللاجنسية الأهم في تشكل وتطور المناعة لدى الثوي المصاب، وبالأخص طور الحيوان البوغي الذي يعد الأكثر أهمية في تشكل المناعة (Brothers *et al*.,1988; Danforth and McAndrew, 1987)، إذ تم تحديد المستضدّات السطحية لهذا الطور عند الأيمريّة تينيلا عند الدجاج باستخدام تقانة التبصيم المناعي (Murray and Galuska 1986; Wisher, 1986). وباستخدام تقنية الرحلان ثنائي البعد {الذي يعتمد على فصل البروتينات على تدرج قيمة ال PH بالإضافة للوزن الجزيئي للبروتينات} (2-dimensional electrophoresis) لبروتينات طور الحيوانات البوغية لطفيلي الأيمرية الستيداوية المعرضة للأمواج فائقة الصوت تبين وجود 41 من العصائب البروتينية، وبعد إجراء التبصيم المناعي تم تحديد 23 من المستضدات ذات القدرة الاستمناعية (Song *et al.*,2017). كما بينت نتائج الرحلان الكهربائي والتبصيم المناعي للخلاصة البروتينية المحضرة من طور الحيوانات البوغية للأيمرية الستيداوية بطريقة الحلمهة وجود ثلاث من العصائب تراوحت أوزانها الجزيئية (24.43 و26 و28.67) كيلو دالتون (الوهيب وزملاؤه،2018). واهتمت دراسات أخرى بمستضدات الأطوار الأخرى، حيث بينت الدراسات المناعية التي أجريت على المستضدّات الخاصة بطور البيوض المتكيّسة وجود أربع من المستضدّات لطفيلي الأيمريّة تينيلا (Talebi, 1995). بينما وجدت دراسة أخرى بالتبصيم المناعي سبع مستضدّات لهذا الطور عند الأيمريّة تينيلا تفاعلت بقوة مع أمصال ممنعة بالحيوانات البوغيّة، وأظهرت هذه الدراسة أهمية المستضد البروتيني للبيوض المتكيّسة بانخفاض عدد البيوض المتكيّسة وشدة الضرر الأعوري (Murray and Glauska, 1986). وبينت دراسة (الوهيب وزملاؤه،2018) احدى عشر عصابة تراوحت أوزانها الجزيئية بين (19.21 و130) كيلو دالتون وأكثر هذه العصائب تلوناً بصبغة أزرق الكومازي (57 و49.40 و28.67 و26 و24.43) كيلو دالتون وذلك في الخلاصة البروتينية الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيسة للأيمرية الستيداوية، وبعد استخدام تقنية التبصيم المناعي تم الكشف عن المستضدات التي تحرض الجهاز المناعي على تشكيل أضداد نوعية، كانت أوزانها الجزيئية(130 و124.74 و57 و34.19 و28.67و26 و24.43) كيلو دالتون باستخدام مصل الأرانب المجموع في اليوم 24 بعد الخمج وتحضينها مع البروتينات الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيسة، كما توصلو إلى استنتاج وجود مستضدات مشتركة بين الطورين (البيوض المتكيسة والحيوانات البوغية) وهي المستضدات ذات الأوزان الجزيئية التالية: (24.43 و26 و28.67). وبينت دراسة الباحثين في عام 1988 وجود أربعة مستضدات لطور أقسومات طفيلي الأيمرية تينيلا، وأشارت هذه الدراسة إلى وجود اختلافات في المكونات المستضدية بين طور الحيوان البوغي وأجيال الأقسومات الأول والثاني، والى أهمية طوري الحيوان البوغي والجيل الاول من الأقسومات في تكوين وتشكيل مناعة وقائية (McDonald *et al*.,1988). كما تم تحديد خمس من المستضدّات لطور العرسيات عند الأيمريّة ماكسيما بعد حضنها مع أمصال عُزلت بمرحلة متأخرة من الإصابة. وأوضحت هذه الدراسات أهمية هذه المستضدّات لهذا الطور وامكانية استخدامها كلقاحات لتساهم في الحد من انتشار المرض (Wallach *et al*., 1989; Mencher *et al*., 1989). ونظراً لاختلاف البنية المستضدية لسلالات الأيمرية المعزولة من مناطق متباعدة جغرافياً والتي 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).

2-أهداف البحث The Aims:

أ-تحديد الكتلة الجزيئيّة النسبيّة لمستضدّات لقاح البيوض المتكيّسة المتبوّغة الصواتة باستعمال تقنية الرحلان الكهربائي.

ب-تحديد المستضدّات ذات القدرة الاستمناعيّة باستعمال تقنية التبصيم المناعي Western Blot، من خلال تمنيع أرانب بالخلاصة البروتينية الصُواتة لطور البيوض المتكيسة المتبوغة.

3-مواد وطرائق البحث Material and Methods:

استُخدمت البيوض المتكيّسة المتبوغة sporulated oocysts النقيّة لـ *Stiedae* .E 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 تربية عشرة أرانب من كلا الجنسين وبعمر 8-10 أسابيع وبوزن 800-1000 غ بهدف الإكثار. وُضعت الأرانب بحظيرة خاصة بحيوانات التجارب في كليّة الطب البيطري، بدرجة حرارة 15-20°م، وتم خمجها عن طريق الفم بجرعة قدرها ($5x10^4$) بيضة متكيّسة متبوغة لكلّ أرنب ولمرة واحدة (Abu-El-Ezz *et al*., 2012). تم ذبح أرانب التجربة في اليوم 24 بعد الخمج وقُطّعت أكبادها بواسطة جهاز مجانس العينات (Homogenizer, AISS EI AM-3 ACE) وبسرعة 1500 rpm لمدة 10 دقائق لفصل البيوض المتكيّسة غير المتبوغة. وتم تبويغها عن طريق حضنها بمحلول 2.5%من ثاني كرومات البوتاسيوم بدرجة (25-27 م°) لإتمام عملية التبويغ (Gibbons *et al*.,2001)، ثم تم تنقيتها بطريقة التعويم (flotation) باستعمال محلول ملحي مشبع (400غ من كلوريد الصوديوم +1 ليتر من الماء) (Rose *et al*.,1984). أُخضعت بعدها لعملية التعقيم باستعمال محلول هيبوكلوريد الصوديوم Sodium hypochlorite المبرد 6% حيث اتُبِعت طريقة (Davis *et al*. 1973).

3-1-تحضير البيوض المتكيّسة المتبوّغة الصُواتة Preparation of Sonicated Oocysts:

أُخذت البيوض المتكيّسة المتبوّغة المعقّمة وتم غسلها 3-4 مرات من ثاني كرومات البوتاسيوم بمحلول ملحي فيزيولوجي(PH=7.2) وتركيزها بنسبة 4000 بيضة متكيسة/مل بالتثفيل 2700 rpm لمدة 5 دقائق، وتم تعريضها للأمواج فائقة الصوت عند درجة 60 كيلو هرتز لخمس مرات لمدة دقيقة كل مرة في وعاء مغطى بماء معتدل البرودة (Akhtar *et al*., 1998). تم بعدها تثفيل المعلّق بسرعة 3000 rpm لمدة 30 ثانية وجُمع بعدها القسم الطافي وتعقيمه بمرشّح ميليبور(0.45ميكرون) (Fu and Lee, 1976). ومن ثم تم تحضير اللقاح المعطل من المُسْتَعْلَق المصوتن (المعَرّض للأَمْوَاجِ فائقة الصَّوْت) بمعالجته بـ 0.3٪ فورمالين (33٪ فورمالدهيد) لمدة 96 ساعة عند 37 درجة مئوية وتخزينه عند 4 درجات مئوية حتى الاستخدام (Kadhim and Hussien, 2015).

3-2-معايرة البروتينات بطريقة Bradford:

تعد معايرة البروتينات بطريقة Bradford من الطرق الدقيقة والسريعة جداً لتحديد كمية البروتينات في الخلاصات الخلوية، كما وتتطلب كميات قليلة من البروتين. تعتمد هذه الطريقة على استخدام صباغ أزرق الكومازي اللماع G-250 الذي يرتبط مع البروتين ويشكل معقد يمكن أن يتم الكشف عنه بمقياس الطيف الضوئي بطول موجة 595 نانومتر، حيث تتناسب شدة الامتصاص طرداً مع تركيز البروتينات في العينة (Bradford, 1976).

3-3-حيوانات التجربة:

استُخدم خلال التجربة 5 أرانب من كلا الجنسين وبعمر 4-8 أسابيع بوزن 500-1000 غرام، ووُضعت الأرانب بدرجةِ حرارةِ الغرفةِ العاديةِ 15-20°م في غرفة خاصة بحيوانات التجارب في كليّة الطب البيطري في جامعة حماة، وجُهّزَت

بمعالف ومشارب خاصة حيث قُدم لها العلف المحبّب الخالي من أي مادة مضادة للأيمرية، بالإضافة إلى الأعلاف الخضراء المتنوعة، ومياه شرب نظيفة. وقد تم التأكد تجريبياً من عدم وجود إصابة سابقة بأنواع الأيمِريَّة التي تصيب الأرانب من خلال فحص البراز بطريقة التعويم بشكل يومي ولمدة أسبوعين متتاليين قبل البدء بالتجربة (Abu-El-Ezz *et al*., 2012). ثم بعد ذلك تم حقنها بجرعة 25 ميكروغرام/للأرنب بمستضد البيوض المتكيّسة المتبوّغة الصُواتة تحت الجلد. خُمجت الأرانب في اليوم 20 بعد التلقيح بجرعة التحدي بمعدل 10^3 بيضة متكيسة متبوغة للأرنب الواحد (Al-Taee and Al-Zubaidi, 2017).

3-4-عينات الدم Blood Samples:

جُمعت العينات الدمويَّة من أرانب التجربة في اليوم 14 بعد جرعة التحدي، وتمت عملية السحب من القلب مباشرة بعد إجراء التَّعقيم لمكان سحب الدم حيث أخضعت للتثفيل بسرعة(3500) rpm لمدة(5) دقائق (Hrubec *et al*., 2004) للحصول على المصل الرائق الذي تم حفظه في أنابيب ابندروف المحكمة الإغلاق سعتها 1.5 مل، وحفظت في المجمدة بدرجة حرارة (-20)° م لحين إجراء اختبار التبصيم المناعي.

3-5-الجانب المناعي:

أ-الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد SDS-PAGE:

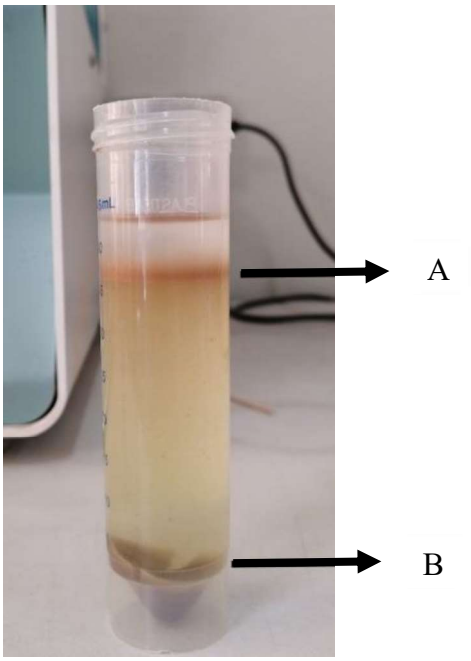
يعد الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد بوجود مركب سلفات دودوسيل الصوديوم SDS طريقة بسيطة لتوصيف البروتينات، ومقارنتها بعضها ببعض وذلك من خلال فصل مكونات مزيج من البروتينات، وتعيين كتلها الجزيئيّة النسبيّة وتحديد كميتها (Laemmli, 1970).

ب-التبصيم المناعي Western blot:

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 الضد النوعي لهذا البروتين. أولاً تفصل 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 الإنزيمي الذي يعطي راسب ملون في موضع الارتباط بعد إضافة الركيزة الملائمة.

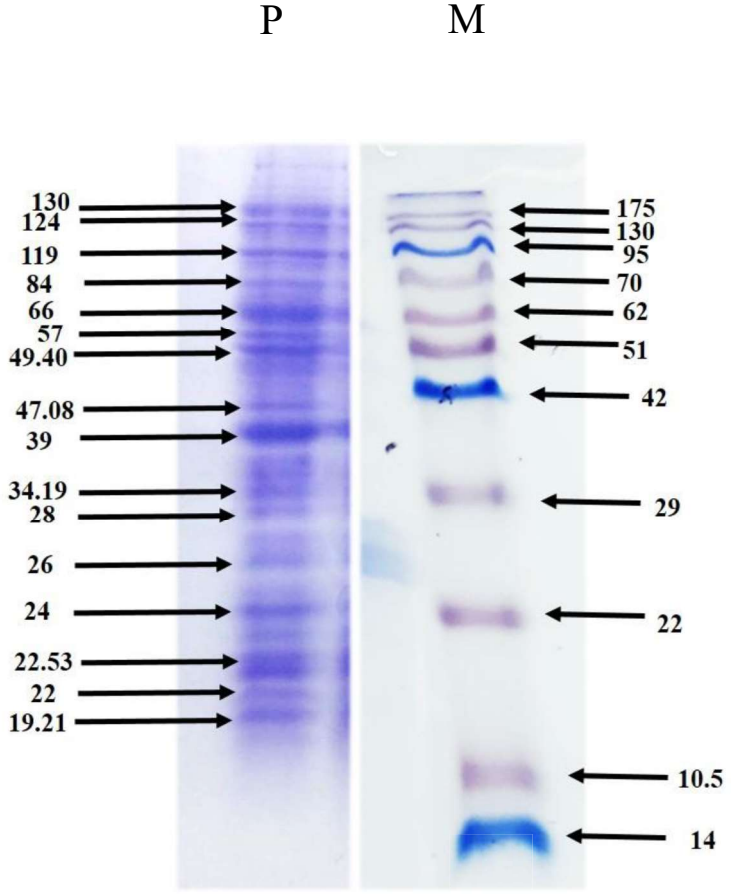
4-النتائج والمناقشة Result and Discussion:

تم تسجيل بدء اطراح البيوض المتكيسة في اليوم 17 بعد الخمج واتفقت بذلك مع (Barriga and Arnoni,1979)، بينما كانت متقاربة مع نتائج (Abdel-Mageed *et al*.,2005; Катранджи,1988) بأن إطراح البيوض المتكيسة بدأ في اليوم 16 بعد إحداث الخمج التجريبي وقد يعود ذلك إلى محتوى الجرعة الخامجة أو عوامل تتعلق بالنوع والمقاومة والعمر (Barriga and Arnoni,1979). وبلغ الإطراح قمته في اليوم 22 بعد الخمج وذلك في الأرانب التي استخدمت لإكثار الطفيلي واتفقت الدراسة مع (Kutkat *et al*.,1998؛ المحمد،2017). بلغ عدد البيوض المتكيّسة المستحصلة حوالي 10^9 بيضة متكيسة لكل مل، استغرق تبويغها 4-7 أيام للحصول على أفضل نسبة تبوغ والتي بلغت 93%، مع ملاحظة بدء التبوغ من اليوم الثالث واتفقت بذلك مع (المحمد،2017) وكانت هذه النتيجة متقاربة مع (Катранджи,1988) حيث بلغت نسبة التبوغ في نفس المحلول 97%. كما بلغ تركيز البروتين في عينة البيوض المتكيّسة المتبوّغة الصواتة لكل (10^7) 86 مكروغرام / 50 مكرولتر وحجم العيّنة 5 مل.



الشكل رقم (1): تنقية البيوض المتكيسة. A- البيوض المتكيسة النقية. B- راسب الشوائب

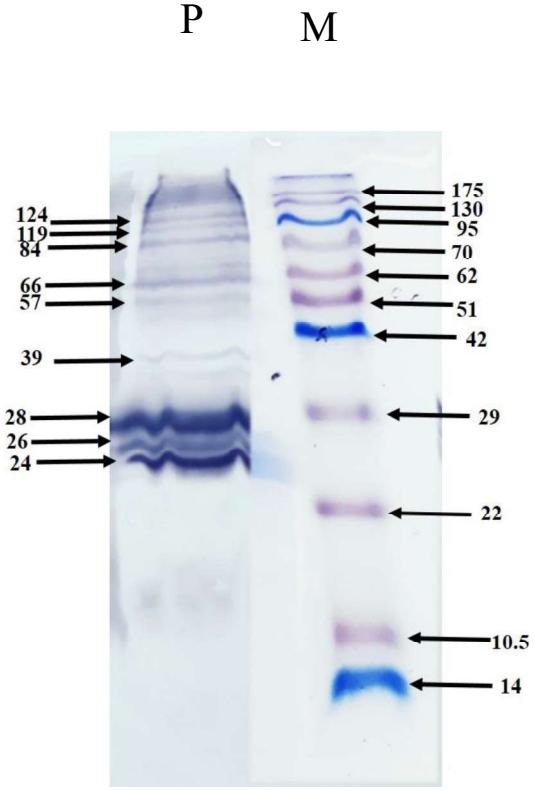
تم التعرف على المكونات البروتينيّة للقاح البيوض المتكيّسة المتبوغة الصواتة، إذ بينت نتائج الرحلان الكهربائي وجود 16 عصابة تراوحت أوزانها الجزيئيّة بين (19.21 و130) كيلو دالتون وأكثر هذه العصائب تلوناً بصبغة أزرق الكومازي (130-66-39-28-26-24-22.53) كيلو دالتون، وعُدَّت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور، لأن باقي العصائب كانت أقل تلوناً. وكانت هذه النتائج متقاربة مع دراسة (الوهيب وزملاؤه،2018) حيث بينت نتائجهم وجود احدى عشر عصابة تراوحت أوزانها الجزيئية بين (19.21 و130) كيلو دالتون وأكثر هذه العصائب تلوناً بصبغة أزرق الكومازي (57 و49.40 و28.67 و26 و24.43) كيلو دالتون وذلك في الخلاصة البروتينية الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيسة ، في حين تم الحصول على 13 عصابة شديدة التلون بصبغة أزرق الكومازي وكانت الأوزان الجزيئيّة لها (26 و28 و45 و50 و60 و68 و 80و82 و88 و94 و105و175 و235) كيلو دالتون بعد إجراء الرحلان الكهربائي لخلاصة بروتينات البيوض المتكيّسة لطفيلي الأيمريّة تينيلا المحضرة بطريقة الحلمهة(Murray and Glauska,1986)، وتباينت نتائج هذه الدراسة مع دراسة أخرى للرحلان الكهربائي الثنائي البعد لبروتينات الحيوانات البوغية الصواتة للأيمرية الستيداوية حيث تم الحصول على 41 عصابة (Song *et al*.,2017). إن الاختلافات الناتجة بالأوزان الجزيئيّة بين هذه الدراسة وغيرها من الدراسات قد تعود الى التباينات التقنية البسيطة المتعلقة بهذه الحجوم والهلامة 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، وذلك عن طريق استعمال جهاز مجانس العينات tissue homogenizer لتحضير البيوض المتكيّسة، بينما استخدمنا عملية الصوتنة باستخدام جهاز الذبذبات فائقة الصوت Sonication لتحضير بروتينات البيوض المتكيسة.



الشكل رقم (2): الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة البيوض المتكيّسة المتبوغة الصواتة.
M، تمثل الأوزان الجزيئيّة للواسمات المعيارية. P، الخلاصة البروتينية لطور البيوض المتكيّسة. تشير الأسهم الى العصائب الرئيسة والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئيّة بالكيلو دالتون

استُعملت تقانة التبصيم المناعي للكشف عن المستضدّات التي تحرض الجهاز المناعي على تشكيل أضداد نوعية، وأظهرت نتائج التبصيم المناعي تسع عصائب كانت أوزانها الجزيئية (24–26–28–39–57–66–84–119–124) كيلو دالتون، ثلاث منها شديدة التلوين تبلغ أوزانها الجزيئيّة:(28 و26 و 24) كيلو دالتون باستخدام مصل الأرانب المجموع في اليوم 14 بعد جرعة التحدي وتحضينها مع البروتينات الناتجة عن صوتنة البيوض المتكيّسة المتبوغة، وكان أقوى هذه العصائب العصابة ذات الوزن الجزيئي 28 كيلو دالتون حيث ظهرت مباشرة بعد وضع ركيزة التفاعل وكانت الأكثر ثخانة. وكانت هذه النتائج متقاربة مع نتائج دراسة (الوهيب وزملاؤه،2018) من حيث ظهور ثلاث عصائب شديدة التلوين بلغت أوزانها الجزيئيّة: (24.43 و26 و28.67) كيلو دالتون بعد الحصول على سبع عصائب بتقنية التبصيم المناعي باستخدام مصل الأرانب المجموع في اليوم 24 بعد الخمج وتحضينها مع البروتينات الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيسة. كما أظهرت دراسة (Song *et al*.,2017) 23مستضد لطور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة الستيداوية بتقانة التبصيم المناعي بعد إجراء الرحلان ثنائي البعد. وجدت دراسات أخرى تسع مستضدّات في طور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا باستخدام تقانة التبصيم المناعي تراوحت أوزانها الجزيئيّة بين (14و235) كيلو دالتون(Murray and ;Wisher, 1986

Glauska,1986). وفي دراسة قام بها (الإدريس، 2014) تبين وجود 14 من المستضدات الاستمناعية لخلاصة طور البيوض المتكيسة المحضرة بالحلمهة تراوحت أوزانها الجزيئيّة بين (13.9و167.8) كيلو دالتون. قد يعود سبب الاختلاف بين نتائج الدراسة الحالية وغيرها من الدراسات الاخرى وبين الدراسات الأخرى للأيمريّة تنيللا أن هناك تبايناً بعملية الإذابة 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 and Fetterer,2002).



الشكل (3). التبصيم المناعي لمستضدّات البيوض المتكيّسة لطفيلي الأيمريّة الستيداويّة. (P) مصل الأرانب باليوم 14 بعد التحدي. (M)، واسم الأوزان الجزيئيّة. تشير الأسهم الى العصائب الرئيسة والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئيّة بالكيلو دالتون.

5-الاستنتاجات Conclusions:

توصلنا من خلال الدراسة التي أجريناها على لقاح البيوض المتكيسة الصواتة لطفيلي الأيمرية الستيداوية المعزولة في سوريا إلى النتائج التالية:

أ-**تحديد** الكتلة الجزيئيّة النسبيّة لمستضدّات لقاح البيوض المتكيّسة المتبوّغة الصواتة باستعمال تقنية الرحلان الكهربائي SDS-PAGE.

ب-**تحديد** تسع من المستضدّات ذات القدرة الاستمناعيّة باستعمال تقنية التبصيم المناعي باستخدام مصل أرانب منعت مسبقاً بالخلاصة البروتينية الصُواتة الخاصة بهذا الطور كانت أوزانها الجزيئية (24-26-28-39-57-66-84-119-124) كيلو دالتون.

ج-تحديد المستضدات الأكثر تعبيراً في هذا الطور وهي العصائب الأكثر ثخانة والأكثر تلوناً ذات الأوزان الجزيئية (28 و26 و 24)كيلو دالتون.

6-التوصيات Recommendations

آخذين بعين الاعتبار النتائج التي حصلنا عليها بالدراسة التي أجريناها على سلالة محلية من الأيمرية الستيداوية فإننا نوصي بأن يتم في الدراسات اللاحقة العمل على:

أ-عزل واستفراد المستضدّات الأكثر استمناعية والتي تم الكشف عنها بتقانة التبصيم المناعي في هذه الدراسة.

ب-تحليل الاستجابة المناعية خلوية الوساطة تجاه كلٍّ من هذه المستضدات بهدف التعرف على المستضد الذي يمكن أن يوجه استجابة مناعية من النمط Th1.

ج-تحديد الجينات المرمزة لهذه المستضدات المسيطرة مناعياً على المستوى خلوي الوساطة من النمط Th1 بهدف استفراد هذه الجينات ليتم بعدها إنتاج هذه المستضدات بالشكل المأشب.

7-المراجع References:

- المراجع العربية:

1-الإدريس، سهير (2014): تقييم اللقاحات المحضرة من الأيمريّة تِنلا Eimeria tenella على الكفاءة الإنتاجية والاستجابة المناعية عند دجاج اللحم Broiler. أطروحة دكتوراه، 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-الوهيب، أسامة-قطرنجي، محمد محسن-قويدر، محمود (2018): تحديد مستضدات الأيمرية الستيداوية (الحيوان البوغي، البيضة المتكيسة) عند الأرانب. مجلة جامعة حماة، المجلد الأول، العدد 4، ص 28-43.

-المراجع الأجنبية:

1- 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.

2- **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.

3- **AbouLaila, M.R., (2020).** Eimeria stiedae: Infection rate and molecular characterization by nested PCR in rabbits from Minoufiya Governorate, Egypt. Egyptian Veterinary Medical Society of Parasitology Journal (EVMSPJ) 16, 34-49.

4- **Akhtar, M., Ayaz, S., Hayat, C., Ashfaque, M., (1998).** Immune response of sonicated coccidial oocyst in chickens. Pak J Biol Sci 1, 389-391.

5- **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.

6- **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.

7- **Al-Taee, M.N.K., Al-Zubaidi, M.T.S., 2017.** Protection against Eimeria stiedae in Rabbits by using sonicated sporulated oocyst vaccine. Journal of Entomology and Zoology Studies 5, 579-585.

8- **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.

9- **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.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).

10- **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.

11- **Coudert, P.; Licois, D. and Drouet-Viard, F. (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.

12- **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.

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

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

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

16- **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.

17- **Fu, H., Lee, Y., (1976).** Immunological studies on chemically attenuated oocysts of chicken caecal coccidisisi. Journal of Chinese Society of Veterinary Science 2, 51-55.

18- **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 UnitedNations.http://www.fao.org/AG/againfo/resources/ document/Parasitology/Indes/Index.htm

19- **Gogate, P. R., & Kabadi, A. M. (2009).** A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. Biochemical Engineering Journal, 44(1), 60-72.

20- **Gonçalves, I., Silva, C., Cavaco-Paulo, A., (2015).** Ultrasound enhanced laccase applications. Green Chemistry 17, 1362-1374

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

22- **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.

23- **Kadhim, L.I., Hussien, A.M., (2015).** Resistance to cecal coccidiosis following sonicated oocysts immunization of Eimeri tenella in broilers. Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences 6.

24- **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.

25- **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.

26- **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.

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

28- **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.

29- **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.

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

31- **Pollet, B.G., Ashokkumar, M., (2019).** Fundamental and applied aspects of ultrasonics and sonochemistry, In: Introduction to Ultrasound, Sonochemistry and Sonoelectrochemistry. Springer, pp. 1-19

32- **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.

33- **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.

34- **Shoda, S.-i., Uyama, H., Kadokawa, J.-i., Kimura, S., Kobayashi, S., (2016).** Enzymes as green catalysts for precision macromolecular synthesis. Chemical reviews 116, 2307-2413.

35- **Song, H., Dong, R., Qiu, B., Jing, J., Zhu, S., Liu, C., & Shao, Y. (2017).** Potential vaccine targets against rabbit coccidiosis by immunoproteomic analysis. *The Korean journal of parasitology*, *55*(1), 15.

36- **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.

37- **Su, J., Cavaco-Paulo, A., (2021).** Effect of ultrasound on protein functionality. Ultrasonics Sonochemistry, 105653.

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

39- **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.

40- **Uyama, H., & Kobayashi, S. (2002).** Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 19, 117-127.

41- **Xing, J., (2016).** Design of Low-intensity Pulsed Ultrasound Device, Intensity Sensor and Its Application to Enhance Vaccine Production

42- **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.

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