تحديد مستضدات الأيمريّة الستيداويّة (الحيوان البوغي، البيضة المتكيّسة) عند الأرانب

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

(الإيداع: 14 شباط 2018، القبول: 16 نيسان 2018)

الملخص:

أظهرت نتائج الدراسة إمكانية تحديد أهم المستضدّات من طوري الطفيلي(الحيوان البوغي، البيضة المتكيّسة المتبوغة) ذات القدرة الاستمناعية والمسؤولة عن تكوين الأضداد بعد الخمج التجريبي للأرانب، بدءاً من البيوض المتكيّسة المعزولة من الكبد وتبويغها وتنقيتها، وذلك باستخدام تقنية التبصيم المناعي حيث تم تحضين مصل الأرانب المجموع في اليوم 24 بعد الخمج مع البروتينات الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيّسة للأيمريّة الستيداويّة، وأظهرت النتائج سبع عصائب من المستضدّات ذات قدرة استمناعية لها والتي بلغت أوزانها الجزيئيّة (24.43- 26- 28.67- 34.19- 57- 124.74- 130) كيلو دالتون. في حين كانت نتائج التبصيم مع البروتينات الناتجة عن حلمهة طور الحيوان البوغي ثلاث عصائب شديدة التلوين كانت أوزانها الجزيئيّة (24.43- 26- 28.67) كيلو دالتون.

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

* 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 Antigens (Oocyste and Sporozoite) in Rabbits

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

(Received: 12 February 2018, Accepted: 12 April 2018)

Abstract:

The result of study showed the possibility of detection the most important immunogenic antigens from two stages of Eimeria steidea sporozoite and sporulated oocyste, which are responsible of antibody production after experimental infection.

After isolation and sporulation of oocysts from liver, then applying Western Blotting technique (to detect the most important immunogenic antigens from two stages of Eimeria steidea sporozoite and sporulated oocyste) using collected serum from infected rabbits (day 24 post infection) with protein extract of the sporulated oocyste and 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 the protine digestion of the sporozoites were (24.43, 26, 28.67) KDa.

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

---

* : 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- مقدمة Introduction:

تعد 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 بالأيميريّات 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 Eimeria (Schnieder and Tenter, 2006) Genus. وقد وصفت البيوض المتكيّسة للأيميريّة 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.

سُجلت 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). يعد نوع الأيمريّة الستيداويّة (E. Stiedae) العامل المسبب للشكل الكبدي للإصابة(Coudert *et al,* 1995)، وتتطفل ضمن الخلايا الظهارية للقنوات الصفراويّة مسببة تلف الكبد الحاد وخسائر اقتصادية كبيرة (Zerrin and Yesari, 2006)، وتشير الأبحاث إلى ندرة الدراسات حول الأيمريّة الستيداويّة في الكبد مثلما هو عند الأنواع الأخرى التي تصيب الأرانب، ويشار هنا إلى أنَّ الأيمريّة الستيداويّة هي أحد أكثر أنواع الأيمريّة إمراضية عند الأرانب مسببة إصابات شديدة (Hauptman *et al,* 2001؛ El-Akabawy *et al,* 2004)، وزيادة في معدل الوفيات لتصل نسبة النفوق إلى 100% (Darwish and Golemansky, 1991).

ينتقل الخمج بالأيمريّة بأنواعها الكبديَّة والمعويَّة عن طريق ابتلاع العلف والماء الملوثيين بالبيوض المتكيّسة المتبوغة (Oncel *et al,* 2011)، وتتعلق شدة الإصابة بالأيمريّة بجرعة البيوض المتكيّسة المأخوذة عن طريق الفم (Harcourt-Brown, 2002). وقد أظهر الفحص المجهري للبيوض المتكيّسة للأيمريّة الستيداويّة أنها مكونة من طبقتين داخلية وخارجية، تأخذ الشكل البيضي، ويتلون جدارها بلون أصفر وقرنفلي، تتراوح أبعادها بين 16-25 ميكرون عرضاً، و28-40 ميكرون طولاً، وذات نهاية مسطحة وبُويب، وتحتوي حبيبات لاقطبية وتحتوي على خلية واحدة تسمى بمولدة الأبواغ Sporont، بينما تضم البيوض المتكيّسة المتبوغة أربعة من الكيسات البوغيّة Sporocysts ويحتوي كل كيس بوغي حيوانيين بوغيين Sporozoites (khider *et al,* 2015 ; Gomez-Bautista *et al*,1987).

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).

تعد الأطوار اللاجنسية:Asexual stages antigens الأكثر أهميةً 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 عند الدجاج 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 غشائية لطور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا وبلغت أوزانها الجزيئيّة (23 -26 -40 -45 -68 - 82 -94 -105 -235) 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 – 13 – 38 – 51 – 63) كيلو دالتون، بروتينات الحيوانات البوغيّة المجمدة (13 – 39 – 77) كيلو دالتون، بروتينات البيوض المتكيّسة (13.9 – 15 – 38.8 – 53 – 73.5 – 167.8) كيلو دالتون. كما بينت دراسة سابقة وجود مستضد مشترك بين أطوار الحياة المختلفة (الحيوان البوغي والاقسومة والبيوض المتكيّسة الناضجة والكيسات بجميع مراحل نموها) لطفيلي الأيمريّة تينيلا وزنه الجزيئي 19 كيلو دالتون عند استخدامه أضداد أرانب ضد البروتين المأشوب للحيوان البوغي(sz-1) (Fetter *et al,* 2004). بينما توصلت دراسة أخرى الى مستضد وزنه الجزيئي 22 كيلودالتون لبروتينات الحيوان البوغي بالتبصيم المناعي(Karkhanis *et al,* 1991).

اهتم عدد من الدراسات بتحديد دور مستضدّات الأطوار الجنسية Sexual stages antigensفي تشكل المناعة تجاه طفيلي الأيمريّة، وتبين أن أهم المستضدّات عند طور العرسيات لطفيلي الأيمريّة ماكسيما هي المستضدّات ذات الوزن الجزيئي (56 و82) كيلو دالتون، التي تم تحديدها بعد الحضن مع امصال اخذت بعد 14 يوماً من الإصابة. بينما وجدت دراسة اخرى اجريت على طور العرسيات لطفيلي الأيمريّة ماكسيما، بعد الحضن مع أمصال عزلت بمرحلة متأخرة من الإصابة، عدداً أكبر من المستضدّات (35 -52 -58 -73 -85) كيلو دالتون. وأوضحت هذه الدراسات أهمية هذه المستضدّات للأطوار الجنسية وامكانية استخدامها كلقاحات لتساهم في الحد من انتشار المرض (Wallach *et al,* 1989; Mencher *et al,* 1989).

بينت الدراسات المناعية التي أجريت 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 أخرى سبع مستضدّات لبروتين البيوض المتكيّسة لطفيلي الأيمريّة تينيلا تفاعلت بقوة مع أمصال 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).

2- أهداف البحث: The Aims

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

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

3- مواد وطرائق البحث: Material and Methods

استُخدمت البيوض المتكيّسة المتبوغة sporulated oocysts النقيّة 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:

تربية (20) أرنباً من كلا الجنسين وبعمر 6-8 أسابيع وبوزن 500-1000 غ. 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 للأيمريّة ستيداويّة 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 El (AM-3 ACE) وبسرعة 1500 د/ دقيقة لمدة 10 دقائق لفصل البيوض المتكيّسة غير المتبوغة. وتم تبويغها عن طريق حضنها بمحلول 2.5%من ثاني كرومات البوتاسيوم بدرجة (25-27) 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 and Millard,1984). أخضعت بعدها لعملية التعقيم باستعمال محلول هيبوكلوريد الصوديوم Sodium hypochlorite المبرد 6% حيث اتُبِعت طريقة (Davis *et al,* 1973).

1- تحضير المُسْتَضدِ:

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

أ- الحيوانات البوغيّة:

تم استخلاص الحيونات البوغيّة من خلال عملية ميكانيكية وهضم إنزيمي للبيوض المتكيّسة المتبوغة والكيسات البوغيّة بطريقة (Tahir, 1998؛ الإدريس،2014). ثم تم الحصول على حيوانات بوغيّة نقية باستخدام احدى التقنيتين التالية:

- التثفيل باستعمال البركول Percoll Gradient Centrifugation:

تم استعمال البركولpercoll (ك ثافته1.13غم / مل)، خُفف إلى تركيز 90% وباستعمال X10 محلول للدارئة الفوسفاتية وذلك بإضافة 9 أجزاء من البركول إلى حجم من الدارئة الفوسفاتية (Khalafalla, 2009).

-عمود فصل التبادل الأيوني باستخدام مادة الدياسيليلوز-52 DE-52 anion exchange chromatography:

تم وزن 1 غ من الدياسليلوز ووضعت في بيشر حجم 100مل وخلطت جيدا" مع دارئة عمود الفصل (Riggs and Perryman, 1987).

ثم أُخذت الحيوانات البوغيّة النقية وثفلت لمدة دقيقة واحدة بسرعة 10000 د /دقيقة في أنابيب ابندروف. أُضيف الى الراسب دارئة الحلمهة Lysis buffer والتي تتكون من (Nonidet P40, 10Mm Tris-HCL , Aprotinen 0.1 U/ml %0.5 Triton X -100 ,1%) بدرجة (pH=7.4) وبمقدار 100ماكروليتر لكل 150 مليون حيوان بوغي وحفظت معها مدة 24 ساعة على هزاز دائري في درجة حرارة 4+ °م. ثُفلت بعدها العينة مدة 10 دقائق وبسرعة 10000 د/دقيقة (الإدريس،2014).

ب- البيوض المتكيّسة المتبوغة:

أُضيفت 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. ثم تمت عملية التكسير على الرجاّ Vortex مدة 20 دقيقة.

سُحب معلق العينة (أغلفة البيوض المتكيّسة، والكيسات البوغيّة، والحيوانات البوغيّة وبعض البيوض المتكيّسة السليمة) بماصة باستور الى زجاجة بحجم 10 مل وغسلت الكرات الزجاجية بأقل كمية ممكنة من الدارئة الفوسفاتية، ثم أخضعت العينة لعملية التجميد بدرجة (- 20) °م مدة 4-5 دقائق، ومن ثم اذابتها في حمام مائي بدرجة 45°م (كُررت العملية 3 مرات)، ثم تم إضافة دارئة الحلمهة كما موضح بالفقرة اعلاه، وثُفلت العينة مدة 10 دقائق وبسرعة 2500 د/دقيقة (الإدريس،2014).

تم معايرة البروتينات الناتجة عن الحلمهة في الفقرتين (أ - ب) بطريقة برادفورد(Bradford, 1976).

2-جمع عيناتِ 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 حيث أخضعت للتثفيل بسرعة (3500) د/دقيقة 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- الجانب المناعي:

أ- الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد SDS-PAGE

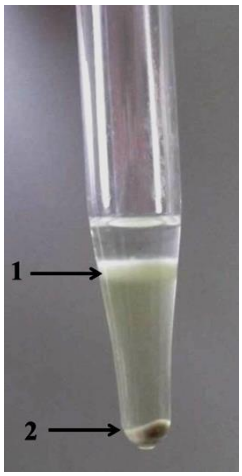
يعد الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد بوجود مركب سلفات دودوسيل الصوديوم SDS طريقة بسيطة لتوصيف البروتينات، ومقارنتها بعضها ببعض وذلك من خلال فصل مكونات مزيج من البروتينات، وتعيين كتلها الجزيئيّة النسبيّة وتحديد كميتها (Laemmli, 1970).

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 الأنزيمي الذي يعطي راسب ملون في موضع الارتباط بعد إضافة الركيزة الملائمة.

4- النتائج: RESULTS

تم تسجيل بدء اطراح البيوض المتكيسة في اليوم 18 بعد الخمج وقد بلغ الإطراح قمته في اليوم 22. بلغ عدد البيوض المتكيّسة المستحصلة حوالي 10^7 بيضة متكيسة لكل مل، استغرق تبويغها 5-7 أيام للحصول على أفضل نسبة تبوغ والتي بلغت 92%، مع ملاحظة بدء التبوغ من اليوم الثالث.



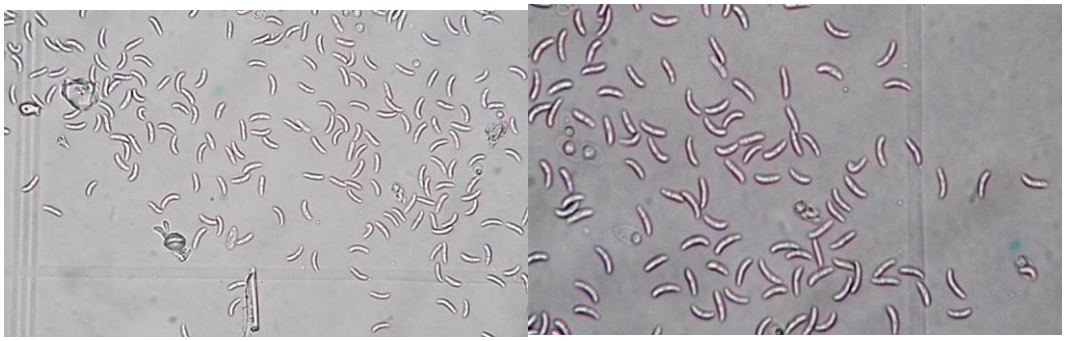
الشكل رقم (1): تنقية البيوض المتكيسة.

1- البيوض المتكيّسة النقية 2-راسب الشوائب

الشكل رقم (2): البيوض المتكيّسة بعد تعقيمها

سُجلّت نسبة الإخراج للحيوانات البوغيّة من الكيسات البوغيّة بحدود 50-60% وذلك بعد حضنها لمدة ساعة ونصف في محلول من الصفراء 5% والتربسين0.25%. تباينت نتائج عملية تنقية الحيوانات البوغيّة والتي ارتبطت بطريقة التنقية. حيث كانت التنقية الأفضل باستعمال البركول وبالسرعة 10000 g ولمدة 2 دقيقة بدرجة 25 م بينما تميّزت طريقة التنقية باستخدام

عمود الفصل بالحصول على عدد كبير من الحيوانات البوغيّة، لكنها كانت أقل نقاوة من استعمال طريقة التنقية بالبركول الشكل (3).



الشكل رقم (3): تنقية الحيوانات البوغيّة

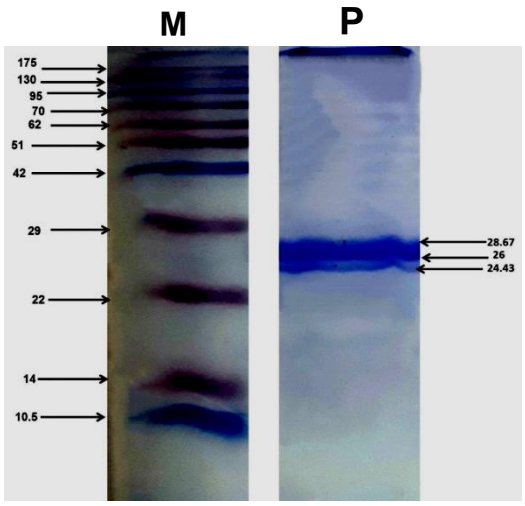
أ– البركول متدرج الميل ب– عمود الفصل

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 مكرولتر وحجم العيّنة 5 مل.

– فصل مكونات الخلاصات البروتينيّة بالرحلان الكهربائي SDS–PAGE:

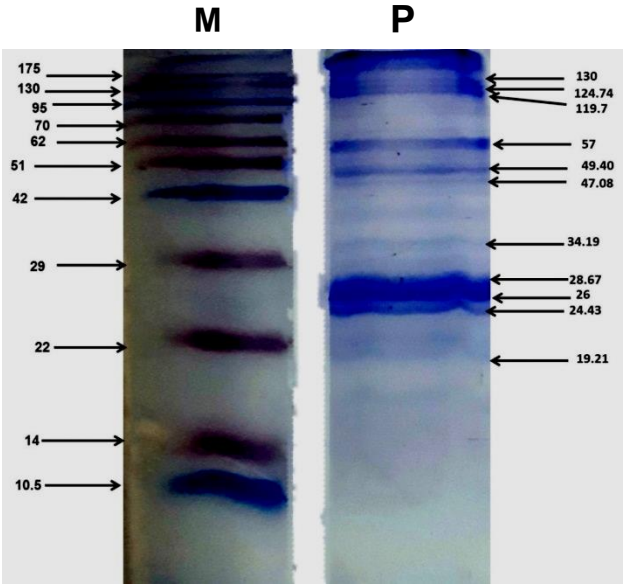
تم تحديد الأوزان الجزيئيّة لجميع العصائب بالمقارنة مع واسمات الأوزان الجزيئيّة المعيارية، وتبين وجود اختلاف في عدد العصائب البروتينيّة وفي ثخانتها.

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي للخلاصة المحضرة من حلمهة طور الحيوانات البوغيّة وجود حوالي ثلاثة 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 (4).



الشكل رقم (4): الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة طور الحيوان البوغي.
M، تمثل الأوزان الجزيئيّة للواسمات المعيارية. P، الخلاصة الخلوية لطور الحيوان البوغي
تشير الأسهم الى العصائب الرئيسة والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئيّة بالكيلو دالتون

بينما لوحظ في الخلاصة الطفيلية الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيّسة 11 عصابة تراوحت أوزانها الجزيئيّة بين (19.21، 130) كيلو دالتون، وتميزت خمسة عصائب منها بكونها شديدة التلون بلغت أوزانها الجزيئيّة (24.43 و26 و28.67 و49.4 و57) كيلو دالتون، واعتبرت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور من حياة الطفيلي، الشكل (5).

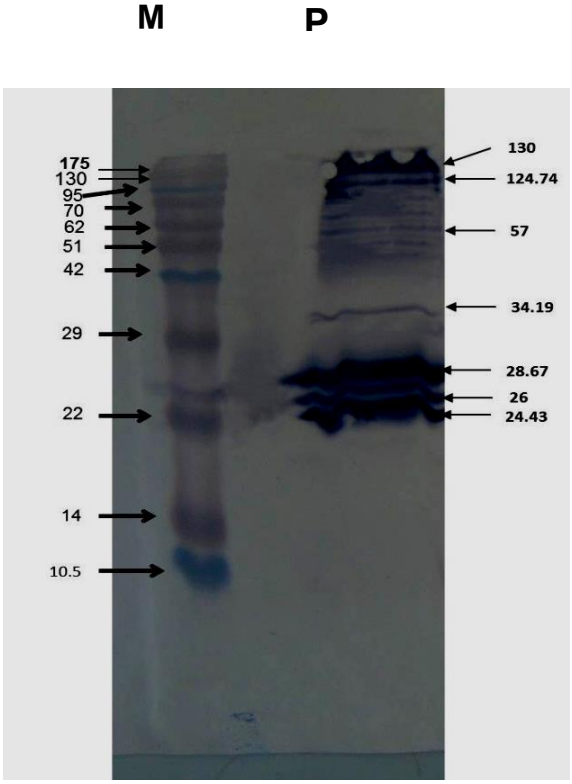


الشكل رقم (5). الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة البيوض المتكيّسة.

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

– دراسة القدرة الاستمناعية لمكونات الخلاصات البروتينيّة بتقانة التبصيم المناعي:

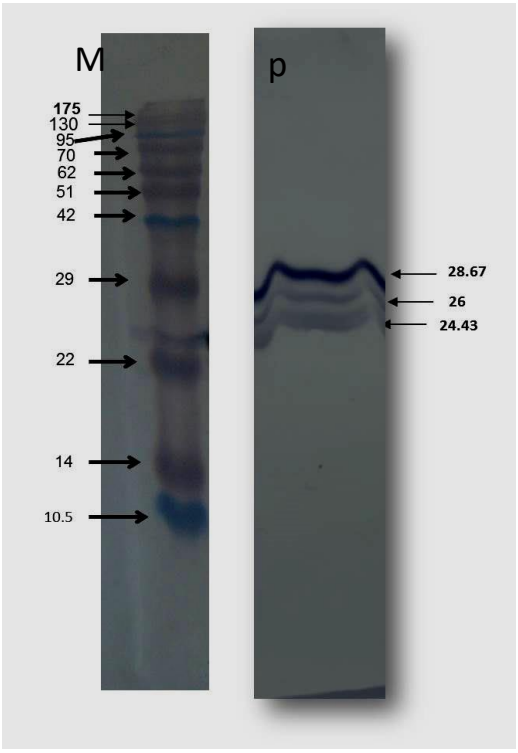
لقد كشفت نتائج التبصيم المناعي باستخدام مصل الأرانب المجموعة في اليوم 24 بعد الخمج وتحضينها مع البروتينات الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيّسة عن عدد من المستضدّات ذات القدرة الاستمناعية والتي بلغت أوزانها الجزيئيّة (24.43 و26 و28.67و34.19 و57و124.74 و130)كيلو دالتون. شكل (6)



الشكل رقم (6): التبصيم المناعي لمستضدّات البيوض المتكيّسة لطفيلي الأيمريّة الستيداويّة.

(P) مصل الأرانب باليوم 24 بعد الخمج. (M)، واسم الأوزان الجزيئيّة. تشير الأسهم الى العصائب الرئيسة والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئيّة بالكيلو دالتون.

بينما ظهرت ثلاث عصائب شديدة التلوين بلغت 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. شكل (7)



الشكل رقم (7): التبصيم المناعي لمستضدّات الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة الستيداويّة.

(P) مصل الأرانب باليوم 24 بعد الخمج. (M)، واسم الأوزان الجزيئيّة تشير الأسهم الى العصائب الرئيسة والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئيّة بالكيلو دالتون.

5-المناقشة: DISCUSSION

تمحورت دراستنا حول طورين رئيسين من دورة حياة الأيمريّة الستيداويّة وهما الطور الخامج، البيوض المتكيّسة المتبوغة، والطور الغازي للخلايا الظهارية للقنوات الصفراويّة وهي الحيوانات البوغيّة.

وأظهرت النتائج بدء إطراح البيوض المتكيّسة في برازِ الأرانبِ المصابةِ في هذهِ التَّجربة في اليومِ 18 بعد إحداث الخمج التّجريبيّ واتفقت بذلك مع (Barriga and Arnoni,1981)، بينما أظهرت نتائج (Abdel-Mageed and Abu-El Ezz,2005; Катранджи,1988) أن 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,1981). كما أظهرت النتائج أن أعلى مستوى للبيوض كان في اليوم 22 بعد الخمج واتفقت الدراسة مع (Kutkat *et al*,,1998؛ المحمد،2017).

تم الحصول على نسبة تبوغ 92% خلال سبعة أيام في محلول 2.5% ثاني كرومات البوتاسيوم واتفقت بذلك مع (المحمد،2017) وكانت هذه النتيجة متقاربة من (Катранджи,1988) حيث بلغت نسبة التبوغ في نفس المحلول 97%. تراوحت مدة التحطيم الميكانيكي مع الكرات الزجاجية للبيوض المتكيسة المتبوغة 10-15 دقيقة واتفقت بذلك مع (Катранджи,1988)، بينما بينما بلغت 3 دقائق للبيوض المتكيّسة المتبوغة للأيميريّة تنيلا عند (الإدريس،2014) وقد يعود ذلك لسماكة جدار البيوض المتكيسة عند الأيمريّة الستيداوية أكثر من سماكة جدار البيوض المتكيسة للتنيلا. تم تسجيل نسبة الإخراج للحيوانات البوغيّة من الكيسات البوغيّة بحدود 50-60% واتفقت نتائج الدراسة بذلك مع (Dulski,1990؛ الإدريس،2014).

تم الحصول على حيوانات بوغيّة نقية باستخدام التثقيل باستعمال البركول متدرج الميل 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 ما أكده (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 اتباع طريقة (Riggs and Perryman, 1987) باستخدام عود خشبي لخلط الطبقة العليا من الدياسليلوز لمنع انسداده في هذه الدراسة.

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 –26 –28.67) 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 و28 و45 و50 و60 و82 و94 و105 و175 و235) 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 و155 كيلو دالتون (10.9 و11.6 و13.9 و25.9 و37.5 و51.1 و77 و100 و107 و113 و155) كيلو دالتون.

لوحظ في الخلاصة الطفيلية الناتجة عن حلمهة طور البيوض المتكيّسة المتبوغة حوالي 11 عصابة تراوحت أوزانها الجزيئيّة بين (19.21 و130) كيلو دالتون وأكثر هذه العصائب تلوناً بصبغة أزرق كومازي (57 و49.40 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 عصابة شديدة التلون بصبغة أزرق كومازي وكانت الأوزان الجزيئيّة لها (26 و28 و45 و50 و60 و68 و 80و82 و88 و94 و105و175 و235) كيلو دالتون (Murray and Glauska,1986).

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 استخدما عملية التجميد والإذابة والتكسير باستخدام جهاز الذبذبات فوق الصوتية sonicated لتحضير بروتينات الحيوانات البوغيّة.

وعند مقارنة النتائج التي تم الحصول 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 أوزانها الجزيئيّة (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

المتكيّسة. بينما ظهرت ثلاث عصائب شديدة التلوين تبلغ أوزانها الجزيئيّة:(28.67 و26 و 24.43) كيلو دالتون من استخدام مصل الأرانب المجموع في اليوم 24 بعد الخمج وتحضينها مع البروتينات الناتجة عن حلمهة طور الحيوان البوغي، 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 تسع مستضدّات في طور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا وكانت أوزانها الجزيئيّة (14 و18 و23 و37 و42 و54 و 67 و73 و113) كيلو دالتون (Wisher, 1986).

أظهرت نتائج (Murray and Glauska,1986) تسع مستضدّات غشائية لطور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة تينيلا وبلغت أوزانها الجزيئيّة (23 و26 و40 و45 و68 و82 و94 و105 و235) 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 الكهربائي1996) (Karim *et al*,. وكذلك لاختلاف البنية المستضدية بين سلالات الأيمريّة المعزولة من مناطق متغايرة جغرافياً (Allen and Fetterer,2002).

6- الاستنتاجات: Conclusions

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

2- 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.

7- التوصيات: Recommendations

1- عزل واستفراد المستضدّات الأكثر استمناعية المشتركة بين الطورين (الحيوان البوغي، البيضة المتكيّسة المتبوّغة).

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

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

المراجع العربية:

- 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.

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

References

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- **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.

4- **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.

5- **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).

6- **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.

7- **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.

8- **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.

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

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

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

12- **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.

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

14- 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.

15- 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.

16- 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

17- 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.

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

19- **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.

20- 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.

21- **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.

22- **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.

23- Катранджи, **M. M. (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.

24- **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.

25- **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.

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- **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.

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

30- **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.

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

33- 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.

32- **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.

34- 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.

35- **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.

36- **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.

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

38- **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.

39- 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.

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

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