P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2013 ,(7), (2) :24-37 خاص بوقائع المؤتمر العلمي الثاني للعلوم الصرفة – جامعة الانبار ٢٠-٢٢/١١/٢٠١٢

استخلاص وتنقية وتقدير الوزن الجزيئي للكلوبيولين المناعي IgY المتخصص ضد نوع الطفيلي *Eimeria tenella* في الدجاج

ثائر عبد القادر صالح*شهاب احمد محمد ** توفيق إبراهيم الالوسي***

*جامعة الانبار – كلية العلوم

**جامعة تكريت – كلية التربية

***** جامعة تكريت ـ كلية الطب البيطري**

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠١٢/١١/٢٠
تاريخ القبول: ٢٠١٢/١١/٢٢
تاريخ النشر: 16 / ٠٢ / ٢٠١٤
DOI: 10.37652/juaps.2013.84867

الكلمات المفتاحية:

استخلاص،
تنقية،
تقدير الوزن الجزيئي،
IgY، Eimeria tenella،
الدجاج.

الخلاصة:

تم الحصول على عزلة محلية من الطفيلي *Eimeria tenella* من خلال اخذ منطقة الأعورين من ٨٥٠ 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 308خمس مرات، تم تكسير الطفيلي بواسطة جهاز الموجات فوق الصوتيةSonicater، حقنت العترة الضارية بعد ذلك في الدجاج البياض نوع Luhman في مناطق مختلفة من الجسم بعد مزجها مع محلول Freund's incomplete oil adjuvant، جمع 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 ٥٤٠ نانومتر حسب طريقة بايوريت إذ بلغ أعلى مستوى له ١٣٧.١٢٦٠٩ ملغم / بيضة، تم فصل IgY باستخدام تقنية كروماتوكرافيا العمود Column Chromatography المعبأ بهلام Sephacryl S300 HR بارتفاع ٩٥سم وقطر ١.٦سم 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 ضوئيScanningSpectra لتحديد الطول ألموجي المناسب من خلال قياس أعلى قمة، إذ تم الحصول على أعلى قمة في الطول ألموجي ٢٨٠ نانوميتر وبلغت ٠.٧٤٩، كما تم قياس تركيز IgY المستخرج بعد الفصل بالعمود بواسطة Spectrophotometer وعلى طول موجي ٢٨٠ نانوميتر،إذ بلغ أعلى مستوى له ١١٧.٦١٧٦٤ ملغم / بيضة، تم ترحيل IgY بواسطة Electrophoresis مع IgG القياسي للكشف عن حزمة الكاما كلوبيولين، اجري كشف التلازن عنIgY 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 صفر م˚.

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)، ولأن الكمية المنتجة من الكلوبيولينات المناعية قليلة في اللبأ وكذلك تنتهي خلال أيام قليلة لذلك تم البحث عن بديل تكون فيه نسبة الكلوبيولينات المناعية عالية ومستمرة في العطاء لذلك تم التوجه إلى مح البيض

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Science;
E-mail address:

Yolk Egg، أن IgY الذي يتواجد في صفار البيض وبكميات كبيرة يكون له دور أساسي في حماية الجسم من المستضدات الدخيلة، ونظراً للقيمة الغذائية العالية لمنتجات الدواجن(اللحم والبيض) فقد ازداد الطلب الاستهلاكي عليها في جميع أنحاء العالم مما ولد ضرورة 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 [4,3]،الباحثان Tyzzer عام ١٩٢٩ و Johnson عام ١٩٣٨ ذكرا 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 [8,7,6]، 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، 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 ٢٠٠٠ 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 ٢٠٠٠ بحدود ٨٨,١٦٦,٨٢٦ فرخاً [١٠]، لذلك هدفت الدراسة إلى استخلاص وتنقية وتقدير الوزن الجزيئي للكلوبيولين المناعي IgY من صفار البيض في الدجاج المُخَّمج بالطفيلي *Eimeria tenella* .

المواد وطرق العمل

تحضير العلف

حضرت عليقه واحدة لجميع المعاملات طيلة فترة التجارب، إذ تم إعداد تركيب العليقة من قبل المختصين في مركز أعالي الفرات للأبحاث الزراعية/المنطقة الغربية/الفرع الثاني/عانه،واستخدم المركز البروتيني النباتي المستورد المسمى Preconex لأنه لا يحتوي على مضاد الاكريات كما في الجدول (١) .

جدول(١) تركيب العليقة المستخدمة في الدراسة

المواد	النسبة المئوية%
ذرة صفراء	٦٠
صويا	٢٧
مركز بروتيني	١٠
حجر كلس	٠.٧
ملح	٠.٣
دهن نباتي	٢
المجموع	١٠٠

الايميريا تنيلا *Eimeria tenella*

تم استخدام عزلة محلية حديثة من الـ *E. tenella* التي تم الحصول عليها من إحدى مجازر ذبحالدجاج 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 ٢٠١٠، وتم تبويغها خارج الجسم الحي حسب[١١]، وإكمال العالق بالماء المقطر بين مدة وأخرى لكي لا يجف العالق الحاوي على الطفيلي [١٢] تم التأكد من نضوج أكياس البيض من خلال فحصها تحت المجهر [١٣] .

تنقية و تعقيم أكياس البيض

تم تنقية أكياس البيض للطفيلي وتعقيمها اعتماداً على ما جاء في [١٤,١٥، ١٦] .

حساب أكياس البيض

تم حساب وعد أكياس البيض الناضجة في المليلتر المكعب الواحد بعد تخفيف العينة ١٠٠ 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 × ١٠٠[١٧].

تكثير أكياس البيض

تم تكثير العزلة في المختبر وذلك بتخميجها لأفراخ فروج لحم Ross 308وبتمريرات متعددة كما ذكر في [١١,١٢,١٣,١٤,١٥] .

تشخيص أكياس البيض

شخصت العزلة من خلال الاعتماد على الفحص العياني للآفات وموقع التطفل والفحص ألمجهري لأكياس البيض من حيث الأشكال والأبعاد حسب [١٨، ١٩، ٢٠]،باستخدام Graduated Ocular Micrometer، وللحصول على معامل المجهر استخدمت المعادلة التالية :

معامل المجهر = معدل قياس المسرح الدقيق / معدل قراءات المقياس العيني * ١٠٠ 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 ٥٠% نفوق في الأفراخ المخمجة LD50

استخدمت طريقة الباحثين [٢١] في حساب اقل جرعة من أكياس البيض الناضجة لإحداث ٥٠% نفوق في الأفراخ المخمجة .

تخميج الدجاج البياض

أخذت ١٠ دجاجات بياضه نوع Luhman وتم حقنها بالعترة الضارية للطفيلي (جرعة التحدي) بعد تكسير Oocyst للطفيلي بواسطة جهاز الموجات فوق الصوتية Sonicator إذ تم مزجها مع Freund's incomplete oil adjuvantوبجرعات متتابعة حيث تم توزيع إعطاء الجرعة الأولى تحت الجلد وفي عضلة الصدر وعضلة الفخذ وعضلة الرقبة ومقدارها ٥ X ١٠^{٤}وبعد أسبوعين أعطيت الجرعة الثانية بمقدار X١ ١٠^{٤}أما الجرعة الثالثة فقد أعطيت بعد أسبوعين أيضاً وبمقدار X١ ١٠^{٣}والجرعة الرابعة بعد ٢٠ يوم بمقدار X١ ١٠^{٣}لغرض الحصول على الجسم المضاد IgY لهذه العترة حيث تم جمع البيض منذ بداية إعطاء الجرعة الأولى إلى نهاية التجربة والتي استمرت ٨٧ يوم[٢٢، ٢٣]

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

استخدمت طريقة [٢٤، ٢٥، ٢٦، ٢٧] في ترسيب وديلزة محلول IgY من صفار البيض .

الترحيل الكهربائي العمودي للبروتينات الخام بهلام متعدد الاكريلامايد Electrophoresis

استخدمت طريقة PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) كما أوردها [٢٨]، لترحيل البروتينات ومتابعة تنقيتها .

قياس الامتصاصية الضوئية بجهاز Spectrophotometer

تم قياس الامتصاصية الضوئية على طول موجي ٥٤٠ 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 * ٧٠ [٢٩] .

فصل وتنقية IgY بالترشيح الهلامي Gel Filtration باستخدام هلام Sephacryl- S- 300- HR

(١): تحضير هلام Sephacryl S 300 HR

حضر هلام Sephacryl S 300 HR وفقا لتعليمات الشركة المجهزة(Pharmacia Fine Chemicals) وكذلك [٣٠، ٣١] بواسطة رج العلبة المحتوية على Sephacryl S 300 HR لحين المزج الجيد، تم اخذ ١٢٥ مل من المزيج وأجريت عملية إزالة الغازات (Degassing) باستعمال مضخة تحت التفريغ Pump لمدة ساعتين وعبأ في العمود بصورة مائلة وعلى جوانب العمود الداخلية ليعطي هلاماً بأبعاد (١.٦× ٩٥) سم وأجريت غسل العمود بمحلول الدارئ PBS وأجريت عملية الموازنة والاسترداد بسرعة جريان مقدارها ١٨ مل / ساعة وبمعدل ٣ مل لكل جزء مفصول Fraction .

(٢)تقدير حجم الفراغ للعمود

قدر حجم الفراغ (Void Volume (Vo للعمود باستعمال المحلول المحضر من الدكستران الأزرق، مرر ٥ مللتر من هذا المحلول خلال العمود بشكل تدريجي على جدار العمود الداخلي بالقرب من سطح الهلام واسترد محلول الدكستران الأزرق بمحلول الدارئ PBS بجمع ٣ مللتر /أنبوبو بسرعة ثابتة قدرها ١٨ مللتر /ساعة بعد تشكيل جهاز Peristaltic pump وتنظيمه لسحب ٣ مل كل ١٠ دقيقة في أنابيب خاصة Tubes موضوعة في جهاز جامع النماذج Fraction Collector والذي تمت برمجته على التحرك كل ١٠ دقيقة حركة واحدة ، ثم قيس الامتصاص الضوئي في جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer للأجزاء المنفصلة عند طول موجي قدره ٦٠٠ نانو ميتر ، و قدر حجم الفراغ للعمود من حساب مجموع حجوم الأجزاء المنفصلة عند إمرار محلول الدكستران الأزرق من أول جزء إلى الجزء الذي يمثل اعلى امتصاص لقمة الدكستران الأزرق.

(٣) تقدير حجم الاسترداد

قدر حجم الاسترداد (Elution Volume (Ve لسبعة بروتينات قياسية معلومة الوزن الجزيئي و ذلك بإضافة و استرداد كل بروتين على حدة وبالظروف نفسهاالاسترداد الدكستران الازرق، كما قدر حجم الاسترداد لبروتينات المناعة المفصولةبالطريقة نفسها أعلاه، ثم قيست الامتصاصية الضوئية على طول موجي ٢٨٠ نانومتر لكل جزء من الأجزاء المنفصلة بغية تحديد حجم الاسترداد لكل بروتين قياسي ، رسم المنحنى القياسي للعلاقة بين حجم الاسترداد/ حجم الفراغ (Vo /Ve) ولوغاريتم الأوزان الجزيئية ،و قدر الوزن الجزيئي لبروتين المناعة IgY المفصول من مقارنة قيمة (Ve/ Vo) مع المنحنى القياسي.

جدول (2) : البروتينات القياسية المستعملة في اختبار الترشيح الهلامي.

البروتين القياسي		الوزن الجزيئي (دالتون)
رايبونيوكليز	Ribonuclease	١٣٧٠٠
كيموتربسين أي	Chymotrypsinogen A	٢٥٠٠٠
البومين مصل البيض	Ova Albumin	٤٣٠٠٠
الفوسفاتيز الحامضي	Acid phosphatase	٥٥٠٠٠
البومين مصل البقر	Bovine Serum Albumin	٦٧٠٠٠

الكلوبيولين ج	IgG	١٦٠٠٠٠
الكلوبيولين ام	IgM	٩٠٠٠٠٠

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 الضوئيSpectra لعينة IgY بواسطة جهاز Spectrophotometerلمعرفة 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 Spectrophotometerوتقدير كمية IgY الكلي بعد التنقية

تم قياس الامتصاصية الضوئية للنموذج (العينة IgY) على طول موجي ٢٨٠ نانوميتر (Optical Density of 280 nm (OD_{280}) بعد إذابة العينة (IgY) بمحلول PBS ذات رقم هيدروجيني ٧.٢، 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 ١.٣٦ للـ IgY [30]، حيث تم تطبيق المعادلة أدناه لغرض استخراج تركيز IgY في العينة [٣١] :

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

اختبار الانتشار المناعي المزدوج (طريقة اوكتارلوني) Double immunodiffusion Ouchterlony test و اختبار الانتشار المناعي المفرد (طريقة مانسيني) Single radial immunodiffusion

اتبعت طريقة [٣٤] في عمل هذا الاختبار من حيث التلازن .

النتائج والمناقشة

جمعت العينات والبالغة ٨٥٠ عينة براز وفُحصت تحت المجهر من خلال استخدام طريقة الترسيب وطرق التطويف بمحلول 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[٣٥،٣٦ ، 37]، كذلك أجري غسل وتنقية لأكياس البيض بواسطة هايبوكلورات الصوديوم بنسبة ٦% (القاصر)، وقد ظهرت طبقة طافية من أكياس بيض الطفيلي، الجدول (٣) والشكل (١) . كما أكدت الدراسة أن هناك ٣٦٦ عينة موجبة (مصابة) و ٤٨٤ عينة سالبة (غير مصابة) من مجموع العينات، أي أن نسبة الخمج المئوية بلغت ٤٣,٠٥٩% من مجموع العينات المأخوذة، جدول (٤).

جدول (٣) يوضح الطريقة الأفضل في الكشف عن الطفيلي *E. tenella*

عدد العينات المفحوصة	طريقة التطويف بمحلول شيذر السكري	طريقة التطويف بالمحلول الملحي المشبع	طريقة الترسيب
٨٥٠ عينة	٣٦٦عينة موجبة ٤٨٤ عينة سالبة	٣٦٠عينة موجبة ٤٩٠ عينة سالبة	٣٥١عينة موجبة ٤٩٩ عينة سالبة

شكل (١) تبين انفصال طبقة بشكل حزمة تحتوي على أكياس بيض طفيلي *Eimeria tenella*

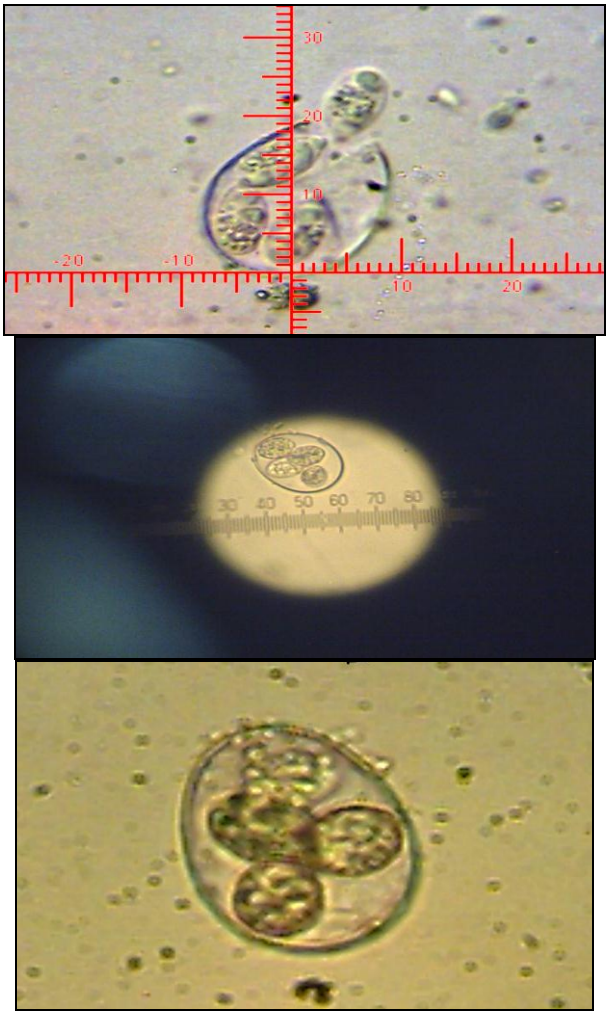
جدول (٤) يوضح نسبة الخمج وعدد العينات المفحوصة

عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الخمجة	عدد غير الخمجة	نسبة الخمج المئوية %
٨٥٠ عينة	٣٦٦عينة	٤٨٤عينة	٤٣,٠٥٩%

شُخص الطفيلي اعتماداً على شكل وحجم كيس البيض وموقع التطفل (الأعورين)، وقد كان حجم الطفيلي يتراوح بين ١٨-١٩ X ٢٢-٢٣ مايكروميتر وهذا يطابق ما ذكره [٣٨]، كما تم تأكيد تشخيص العينة من قبل المستشفى البيطري / الرمادي، الجدول(٥) والشكل(٢).

جدول(٥)يوضح تشخيص أكياس بيض Oocysts للطفيلي *Eimeria tenella*

نوع العزلة	قياس كيس البيض	شكل كيس البيض	الصورة التوضيحية
E. tenella	العرض: ١٨-١٩ مايكروميتر الطول: ٢٢-٢٣ مايكرومتر	بيضوي Ovoid	



شكل (٢) عملية خروج Sporocyst من Oocyst 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 [٣٩]، 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 [٣٨]، وفي هذه الدراسة تم اختيار كمية مناسبة من أكياس بيض الطفيلي لاستخدامها في التجربة وبتأثير ٥٠% نفوق في الأفراخ المعاملة LD 50 لاستخراج كمية مناسبة من الـ IgY لغرض العلاج، إذ تم اخذ ١٢٠ فرخاً بعمر ٣٠ يوم لإجراء التجربة كما في الجدول (٦) والشكل(٣) .

جدول (٦) قياس أقل جرعة من Sporolated Oocysts لإحداث ٥٠% 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	٢٠	٢	١٤ يوم	٣*١٠^٤كيس بيضة	٤	في اليوم التاسع	%٢٠
المجموعة الثانية	٢٠	٢	١٤ يوم	٤*١٠^٤كيس بيضة	٦	في اليوم الثامن	%٣٠
المجموعة الثالثة	٢٠	٢	١٤ يوم	٥*١٠^٤كيس بيضة	١٠	في اليوم السادس	%٥٠
المجموعة الرابعة	٢٠	٢	١٤ يوم	٦*١٠^٤كيس بيضة	١٣	في اليوم الرابع	%٦٥
المجموعة الخامسة	٢٠	٢	١٤ يوم	٧*١٠^٤كيس بيضة	١٦	في اليوم الرابع	%٨٠
المجموعة السادسة	٢٠	٢	١٤ يوم	ماء مقطر (سيطرة)	صفر	------	صفر%

شكل (٣) نفوق بعض أفراخ التجربة وظهور علامات المرض من تهدل الأجنحة والانزواء والإسهال

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[٤١]، الجدول(٧) والشكل(٤).

شكل (٤) تبين الأعورين المصابة في احد أفراخ التجربة المخمج بالنوع *Eimeria tenella*

جدول (٧) يوضح التمريرات المتعددة للعزلة المنقاة في أفراخ فروج اللحم للحصول على العترة الضارية .

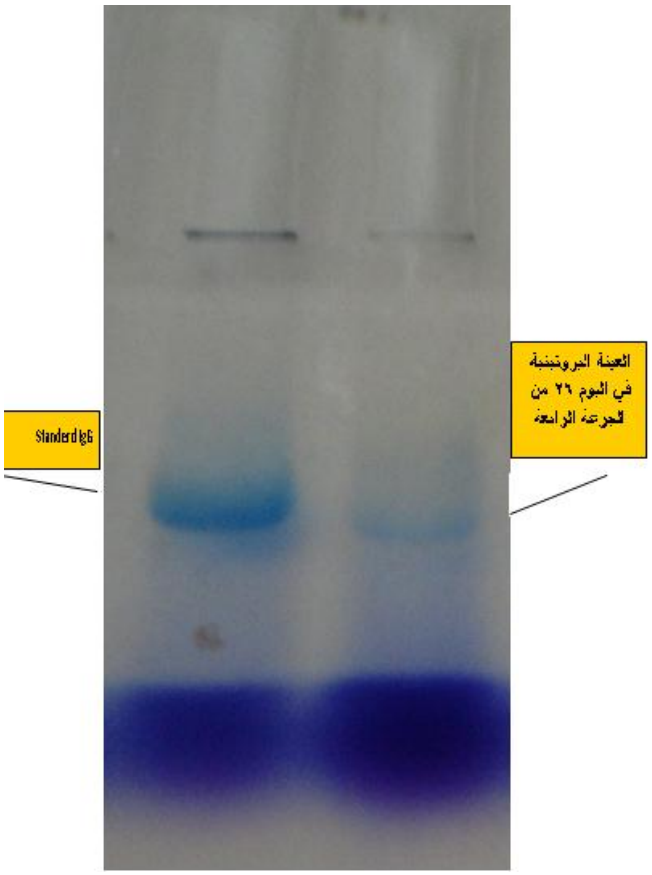
عدد التمريرات للتجربة	عدد الأفراخ الداخلة في التجربة	عمر الأفراخ الداخلة في التجربة	وقت ظهور العلامات السريرية	معدل الهلاكات في المعاملة	نسبة الهلاكات المئوية	اليوم الذي حصلت فيه الهلاكات
التمريرة الأولى	١٠	١٤ يوم	في اليوم الرابع	٥	%٥٠	في اليوم السادس
التمريرة الثانية	١٠	٢١ يوم	في اليوم الرابع	٥	%٥٠	في اليوم السادس
التمريرة الثالثة	١٠	٢٨ يوم	في اليوم الرابع	٥	%٥٠	في اليوم السادس
التمريرة الرابعة	١٠	٣٠ يوم	في اليوم الرابع	٦	%٦٠	في اليوم الخامس
التمريرة الخامسة	١٠	٣٥ يوم	في اليوم الثالث	٧	%٧٠	في اليوم الرابع

تم حقن الدجاج البياض نوع *Luhman* تحت الجلد وفي عضلة الصدر وعضلة الفخذ وعضلة الرقبة بعد مزجه مع محلول فرويند الناقص وبجرعات متناقصة من المستضد وتركت فواصل زمنية طويلة نسبياً لغرض الحصول على أضداد ذات ألفة مرتفعة [٤٢]،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 [43a , 43 b]، الجدول (٨).

جدول (٨) 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
١٠ دجاجة	٥*١٠^٤كيس بيضة	أسبوعين	جمعت وأهملت البيوض بعد قياس تركيز البروتين الكلي و IgY فيها
	١*١٠^٤كيس بيضة	أسبوعين	جمعت وأهملت البيوض بعد قياس تركيز البروتين الكلي و IgY فيها
	١*١٠^٣كيس بيضة	٢٠ يوم	تم جمع البيض في اليوم الثالث بعد الجرعة [٤٣]
	١*١٠^٣كيس بيضة	٤٠ يوم	تم جمع البيض في اليوم الأول بعد الجرعة

تم عزل Crude IgY من صفار البيض باستخدام PEG – 6000 وتمت ديلزته للتخلص من الأملاح، بعدها تم قياس الامتصاص الضوئي على طول موجي ٥٤٠ نانوميتر حسب طريقة بايوريت للكشف عن وجود العينة البروتينية وتركيزها وكذلك لمعرفة مدى ارتفاع مستوى الأضداد في العينة إذ أعطت أعلى تركيز في اليوم ٢٦ من الجرعة الرابعة وبلغت ١٣٧.١٢٦٠٩ ملغم/ بيضة، تم كذلك ترحيل العينات كهربائياً مع بعض البروتينات القياسية لفصل بروتينات المناعة وتقدير الوزن الجزيئي للبروتينات في العينة كما في الشكل (٥).



شكل (٥) يوضح ترحيل عينات Crude IgY مع IgG , IgM Standard باستخدام جهاز الهجرة الكهربائية العمودي

جرى بعد ذلك تنقية العينة البروتينية باستخدام Sephacryl S 300 HR Gel Filtration، إذ تم تقدير الحجم الفراغي للعينة Void

Volume (Vo) باستخدام صبغة Blue Dextran 2000 ذات الوزن الجزيئي ٢٠٠٠٠٠٠دالتون، إذ تم قياس الامتصاصية الضوئية على طول موجي ٦٠٠ نانوميتر، وتم استرداد العينات البروتينية القياسية بسرعة جريان بلغت ١٨ / ساعة وبمعدل ٣ مل جزء مفصول/ ١٠ دقيقة، وتم قياس الامتصاصية الضوئية للبروتينات القياسية على طول موجي ٢٨٠ 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 [٣١] كما في الجدول (٩) والشكل (٦)، ان كل بيضة ممنعة بمرض معين تعطي كمية من IgY مقدارها حوالي ٦٠-١٥٠ملغم مجفف من مح البيض البالغ تقريباً ١٥ مللتر[٤٤]، وقد ذكر [43a , 43b] ان الوزن الجزيئي للـ IgY يبلغ من ١٧٠٠٠٠-١٨٠٠٠٠ دالتون، أما[٤٥] فقد ذكر بان الوزن الجزيئي للـ IgY يبلغ تقريباً ١٧٨٠٠٠ دالتون

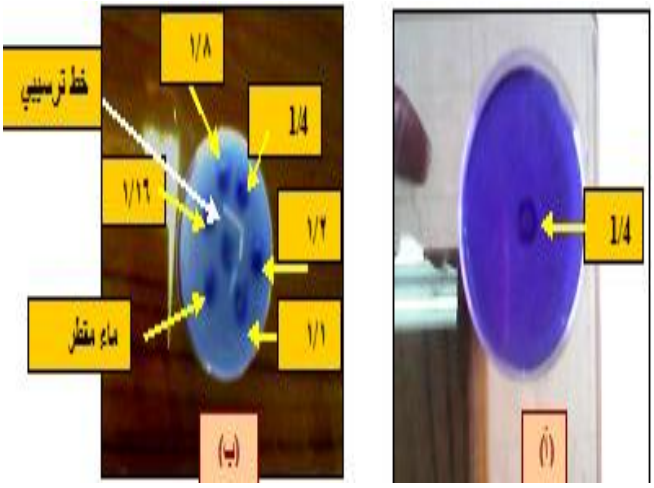
ثم جرى بعد ذلك مسح آلي Spectra للIgY المفصول باستخدام جهاز المطياف الضوئي لمعرفة أعلى قمة امتصاص نستطيع من خلالها قياس تركيز الـ IgY المعزول كما في الشكل (٧) .

جدول (٦) يوضح أعلى امتصاصية للعينات المفصولة بحجم ٣مل 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 ٣مل	تطبيق المعادلة Ve/Vo واستخراج ناتجها
Blue Dextran 2000	٢٠٠٠٠٠٠		٦	٣٣	٩٩ مل
IgM	٩٠٠٠٠٠	5.954243	٣٩	١١٧ مل	1.1818182
IgYالمفصول	القيمة التقديرية لل IgY من ١٦٨٠٠٠ -١٨٠٠٠٠	٥.٢٥٠٤٢٠	٨٩	٢٦٧ مل	2.6969697
IgG	١٦٠٠٠٠	5.20412	٩٢	٢٧٦ مل	2.787879
Bovine Serum Albumin	٦٧٠٠٠	4.82607	١٠٣	٣٠٩ مل	3.1212125
Acid Phosphatase	٥٥٠٠٠	4.74037	١١٠	٣٣٠ مل	3.3333334
Albumin Egg	٤٣٠٠٠	4.6335	١١٨	٣٥٤ مل	3.575758
Chemotrypsinogen A	٢٥٠٠٠	4.3979	١٣١	٣٩٣ مل	3.969697
Ribonuclease	١٣٧٠٠	4.1367	١٤٩	٤٤٧ مل	4.515152

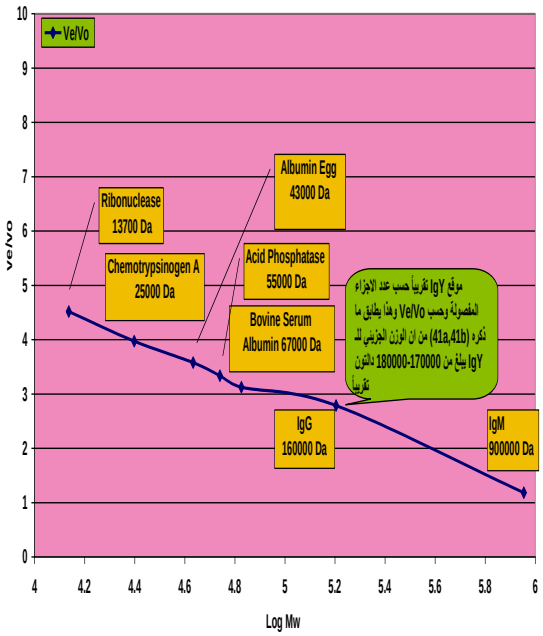
وان كان موجوداً مع مستضدات أخرى[٣٤]، ومن الشكل (٨) نلاحظ وجود هالة حول الحفرة (أ) ووجود الخطوط الترسيبية (ب)، حيث تبين إن التخفيف ١/٤ من IgY هو أفضل كمية (جرعة) لعلاج الإصابة بالعترة الضارية بتركيز ٥٠٠٠٠ كيس بيض مبوغ .

كما تم ترحيل العينة المفصولة من IgYبواسطة جهاز الهجرة الكهربائية العمودي وقد تبين ان هناك تقارب مع حزمة IgG القياسية التي يكون وزنها الجزيئي ١٦٠٠٠٠ دالتون، وهذا يطابق مع ما ذكره [٤٥] كما في الشكل(٩).

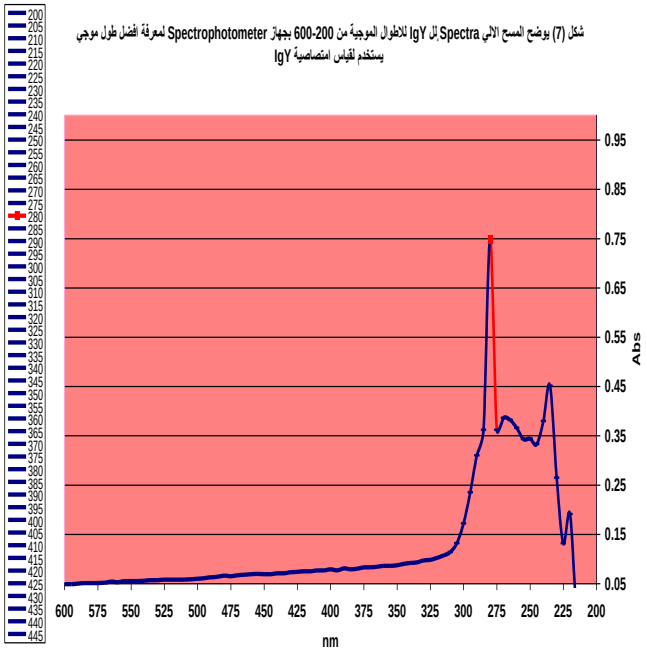


شكل (٨) توضح تلازن العترة الضارية مع مستخلص IgY بطريقتي الانتشار (أ) الانتشار المناعي المفرد (ب) الانتشار المناعي المزدوج.

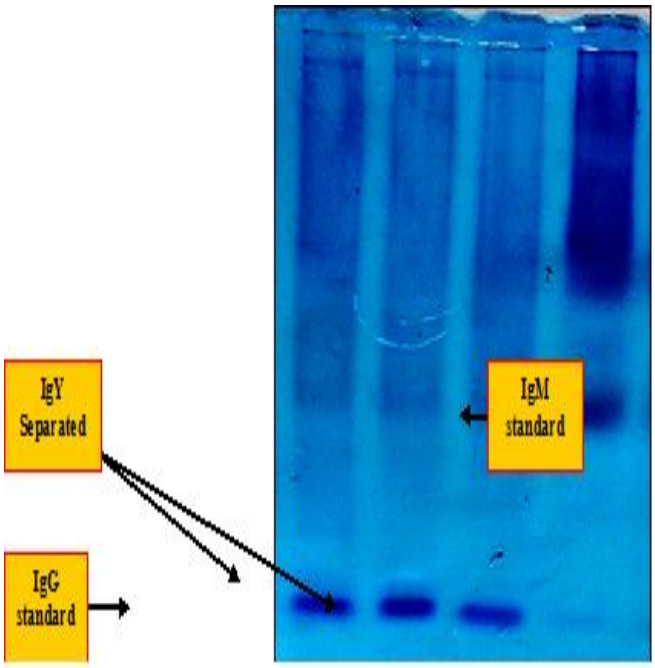
شكل (6) يوضح المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لـ IgY المفصول بتقنية الترشيح الهلامي



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



بعدها جرى قياس امتصاصية IgY المنقى لمعرفة تركيزه في العينة المفصولة وعلى طول موجي ٢٨٠ نانوميتر وحسب نتيجة المسح الآلي، إذ بلغ تركيزه ١١٧.٦١٧٦٤٧١ ملغم / بيضة في العينة رقم ٢٦ من الجرعة الرابعة، تم الكشف بعدها عن IgY بطريقة التلازن مع العترة الضارية بطريقة الانتشار المناعي المفرد والمزدوج لان هذه الاختبارات الكمية تكون دقيقة لتقدير تركيز وفعالية مستضد معين حتى



شكل (٩) يوضح ترحيل حزمة IgY المنقى بواسطة الترشيح الهلامي مع IgG , IgM Standard لتقدير الوزن الجزيئي للعينة .

المصادر

1- Keri Marshall, N.D. (2004). Therapeutic Applications of Whey ProteinA Altern. Med. Rev.,9(2):136-156).

2- Havenstein , G.B., P.R. Ferket , and B.T. Larson ,(1994). Growth , livability and feed , conversion of 1975 vs. 1991. broiler fed typical 1957 and 1991broiler diets poultry Sci. 73:1785-1794 .

3- Qureshi , M.A. , and K. E. Anderson ,. (1995) . Comparison of immunologic functions of random bred verus present day SCWL. Laying hen strains . poultry science association . 48th . annualmeeting. Abs.No.176 4-El.Behairy, A.M. (2005): Immuno-characterization on some Eimeria spp. Infectingchicken in Egypt. M.V.Sc. Thesis Fac. Of vet. Med.,CairoUniversity.5- Kheysin, Y.M. (1972). Life cycles of coccidia of domestic animals. University Parck Press, Baltimore, London, Tokyo. 3th Ed

6- Crurrent, W. L.; Upton, S. J. and Long, P. L. (1990). Taxonomy and life cycles. In:Long, P. L. (ed). Coccidiosis of man and domestic animals. BocaRaton, Florida. CRC Press. pp. 1-16

7- Trees, A. J. (1990). Parasitic diseases. In: Jordan, F. I. W. (ed).Poultry Diseases. 3rd ed. English language book. Society, Bailliere, Tindall, pp.226-233.

8- Shiotan, N.; Baba, E.; Fukata, T.; Arakawa, A. and Nakanishi, T. (1992). Distribution of oocysts Sporocysts of Eimeria tenella andEimeria maxima in the digestive tract of chicken. Vet. Parasitol.,41:17-22.

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

١٠- الصفار، ربى احمد شوقي عبد الوهاب (٢٠٠١). الكفاءة التمنيعية لطفيلي الاكرياتاالمضعفة بأشعة كاما في دجاج اللحم، رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري جامعة بغداد، العراق.

11-Bowman, D.D. and Lynn, R.C. (1995) George's Parasitology forveterinarians, Philadelphia, London, Toronto, Tokyo. WB Sanders Company.2th Ed . pp297

12-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.

13-Ibrahim, A.L.; Arafa, E.A. and Msahlabe, A .A. (1997). Study onpathogenicity and immunoginicity of irradiated sporulatedintestinal Eimeria oocysts in chickens. Ass. Vet. Med. J. 37:133-140.

14-Jeffers, T. K. (1978). Eimeria tenella sensitivity of recent field isolants to monensin. Avian Dis., 22: 157-161.

15-Davis, L.R. (1973). Techniques. In: The Coccidia. Ed. by:Hammond, D.H. and Long, P.L. Baltimore.

Butter worth,London,University Park Press.Pp.411-458.

16-Jorgensen, W.K.; Stewart, N.P.; Jeston, P.J.; Molloy, J.B.; Blight, G.W. andDalgliesh, R.J. (1997). Isolation and pathogenicity ofAustralian strains ofEimeria praecox and Eimeria mitisAnimal Research Institute, Moorooka;Queensland, 4105. Pp10-18. 17-Al-Attar, M.A. (1981). Factors effecting the pathogenesis Eimeria necatrix infections in chicken. PhD. Thesis University of Guelph. Canada.

18-Calnek, B.W.; Barnes, H.J.; Beard, C.W.; McDougald, L.R. and Saif, Y.M.(1997). Disease of poultry. 10th ed. Mosby, Wolf. pp.865-878. 19-Edagar,S.A.(1992):Field diagnosis of coccidiosis in chickens. Agri- Bio Corporation.

20-Amer,M.M.; Awaad, M.H.H; El-Khateeb,R.M.; Abu-Elezz,N.M.;Said,S.A ; Ghetas, M.M. and Kutkat, M.A :(2010). Isolation andIdentification of Eimeria from Field coccidiosis in chickens. Journal of Amrican science. (2010); 6(10).

21-Morehouse, N. F. and Baron, R. R. (1970). Coccidiosis: Evaluation ofcoccidiostats by mortality, weight gains and fecal scores. Exp. Parasitology 28:25-29.

٢٢-جواميرنهاد محمد علي عبد الله (١٩٩٦).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 bypolyethylene 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 ofIgY from yolk) . eds,68-85 , Sub protocol 5,Springer Lab. Manual

26- Javier, F. ; Brito-De,E.and Torrestiana,B.(2010). Purification of egg yolk immunoglobulin (IgY) by Ultrafiltation : Effect of pH , Ionic Strength, andMembrane Properties .J. of Agri. and Food Chem . 2010,58:187-193.

27- Diana , P.; Pablo, A.C.;Esteban , G.C.; Bjorn,B. and Rudiger ,S. (2011) . IgY Technology:Extraction of Chicken Antibodes fromEgg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipition . Journal of Visualized Experiments (jove) . 51:pp 1-5

28- Laemmli , U.K. (1970) . Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 . Nature ; 227 (15) , 680 - 685

29- Layne, E.(1957) . Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins (Spectrophotometric Determination of Total Protein-Biuret Method) . Methods in Enzymology. University of Central Arkansas 10: 447-455.

30 - Protocol for Biotinylation of IgY / Version 1.0 , (2011) . www. immunsystem. com.

31- Diana , P.; Pablo, A.C.;Esteban , G.C.; Bjorn,B. and Rudiger ,S. (2011) . IgYTechnology:Extraction of Chicken Antibodes fromEgg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipition . Journal of Visualized Experiments (jove) . 51:pp 1-5 .

32-Hang , M.C. et al. (1999). Productivity and some Properties of Immunoglobulin Specific against Streptococcus mutans Serotype c in Chicken Egg Yolk (IgY) . American Chemical Society . J.Agric.Food Chem. 47 ; 61-66 .

505, doi:10.1016/j.nbd. 2006. 08.016, PMID 17023164.

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

42- Kim , W.K and Patterson ,P.H. .(2003).Production of an egg yolk antibody specific to microbial uricase and its inhibitory effects on uricase activity .Poultry Science ,2003,82:1554-1558.

43-Lee, S. H. , Lillehoj ,H.S., Park , D.W. , Jang , S. I. Morales, A. , Garcia , D. , Lucio, E. , Larios, R. , Victoria , G. , Marrufo , D. Lillehoj , E. P. (2009 a) . Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodes against Eimeria tenellaand Eimeria maxima infections . Veterinary Parasitology . 163: 123- 126. 44-Lee ,S. H., Lillehoj, H. S., Park , D. W., Jang ,S. I., Morales, A.,Garcia , D., Lucio, E., Larios, R., Victoria ,G., Marrufo, D., andLillehoj, E. P.(2009 b) . Induction of passive immunity in broiler chickens against Eimeria acervulinaby hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y . Poultry Science 88:562–566 .

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

46- Michael , A. et al. (2010) . Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies . Indian Journal of Science and Technology . Vol.3 .No.4 ; pp 468-474 .

33- Amersham Biosciences . (2002) . Gel Filtration (principle and methods) .chapter two (chromatography) .pp 45-52

34- Johnston , A. and Thorpe , R. (1987). Immunochemistry inPractice . 2nd ed . Blackwell scientific publications , London , England.

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

٣٦- الشيخلي، فؤاد إبراهيم . (١٩٨٢) . أمراض الدواجن . مطبعة جامعة الموصل . نينوى . العراق .

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

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

39- Danforth, H.D. (1997). Use of live oocysts based vaccines in a vain coccidian control. In: Control of coccidiosis into next millennium.Ed by Shirley, M.W.; Tomley, F.M. and Freeman,B .M. Institute for animal health, Compton, New Burg Berks. Pp. 95-96.

40- Armentero MT, Levandis G, Nappi G, Bazzini E, Blandini F (2006), "Peripheral inflammation and neuroprotection: systemic pretreatment with complete Freund's adjuvant reduces 6-yyhydroxydopamine toxicity in a rodent model of Parkinson's disease", Neurobiol. Dis. 24 (3):492–

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2013 ,(7), (2) :24-37 خاص بوقائع المؤتمر العلمي الثاني للعلوم الصرفة – جامعة الانبار ٢٠-٢٢/١١/٢٠١٢

EXTRACTION, PURIFICATION AND ESTIMATE THE MOLECULAR WEIGHT OF IMMUNOGLOBULIN IGY AGAINST A SPECIALIST PARASITE EIMERIA TENELLA IN CHICKENS

THAER A. SALIHSHEHAB A. ALJEBORY TAWFIQ A. AL-ALOOSI

E.mail:

ABSTRACT

The isolation of a local parasite Eimeria tenella by taking the cecca of 850 samples from slaughterhouses chickens in the city of Ramadi, and after purification and In vitro Sporolated diagnosed through the shape and size of the parasite and the infection, as has been confirmed diagnosis of the sample in the veterinary hospital / Ramadi , he received the strain challenge by strengthening the isolation and written consent of Chicken type Ross 308 five times, has been cracking the parasite by an ultrasound Sonicater and extract Sporocyst and Sporozoite in fourth Dose , injected Challenge Strain then in laying hens Type Luhman in different areas after mixing with the solution of Freund's incomplete oil adjuvant, was then the collection of eggs from the first day of the first dose until the end of the fourth dose of the control sequence to increase immunoglobulin IgY in egg yolk, extracted immunoglobulin IgY from egg yolk on a daily basis and has Dialysis and the deportation of protein extract crude by Vertical Electrophoresis with some standard protein, and measuring the concentration of crude protein by means of a spectroscope optical Spectrophotometer at wavelength 540, depending on Bauritit reached its highest level137.12604 mg/egg , were separated IgY using Technology Column Chromatography packed gel Sephacryl S300 HR 95 cm high and 1.6 cm diameterand Determenation 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 level117.61764 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 0C .