

الجمهورية العربية السورية
جامعة حماة
كلية الطب البيطري
قسم الأحياء الدقيقة

تقييم بعض اللقاحات المحضرة من الأيمرية الستيداوية

في الاستجابة المناعية لدى الأرانب

رسالة مقدمة لنيل درجة الدكتوراه في العلوم الطبية البيطرية

اختصاص الطفيليات

لطالب الدراسات العليا

أسامة جمال الوهيب

ماجستير في علم الطفيليات

بإشراف

أ.د. محمود قويدر

(مشرفاً مشاركاً)

أستاذ المناعة الطفيلية

كلية العلوم-جامعة دمشق

أ.د. محمد محسن قطرنجي

(مشرفاً علمياً)

أستاذ علم الطفيليات

قسم الأحياء الدقيقة-كلية الطب البيطري

تصريح

أصـرح بـأن هـذا البـحث والموسـوم بعـنوان
(تقيـيم بعـض اللقـاحات المحـضرة من الأيمرية السـتيدأوية في الاستجابة المناعية لدى الأرانب)
لم يسبق أن قبل للحصول على أية شهادة ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

المرشح
أسامة جمال الوهيب

التاريخ / / 2022 م

Declaration

It is hereby declared that this work (**Evaluation of Some Vaccines Prepared from Eimeria stiedae on the Immune Response in Rabbits**) has not been accepted already for any degree, nor is being submitted concurrently for any other degree.

Candidate
Osama Jamal Alwheeb

Date / / 2022

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة هو نتيجة بحث قام به المرشح الطالب أسامة جمال الوهيب تحت إشراف الدكتور محمد محسن قطرنجي أستاذ الطفيليات في كلية الطب البيطري في جامعة حماة، والدكتور محمود قويدر أستاذ المناعة الطفيلية في كلية العلوم في جامعة دمشق، وأي رجوع إلى بحث آخر في هذا الموضوع موثق في النص.

المشرف العلمي	المشرف المشارك	المرشح
أ.د. محمد محسن قطرنجي	أ.د. محمود قويدر	أسامة الوهيب

التاريخ / / 2022

Certificate

It is hereby certified that the work described in this thesis is the result of own investigation **Osama Jamal Alwheeb** under supervision of the **Prof. Dr. Mohamad M. Katranji** in Department of Microbiology at Faculty Of Veterinary Medicine. Hama University and **Prof. Dr. Mahmoud Kweider** Faculty of Science. Damascus University. And any reference to other researcher work has been acknowledged in the paragraphs.

Prof. Dr. Mohamad M. Katranji

Prof. Dr. Mahmoud Kweider

Candidate Osama Jamal Alwheeb



الرقم :
التاريخ :
التصنيف :
الموضوع :

قرار لجنة الحكم والمناقشة

استناداً إلى قرار مجلس الشؤون العلمية رقم (١٨) المتخذ بالجلسة رقم (٢) للعام الدراسي ٢٠٢١/٢٠٢٢ المنعقدة بتاريخ ٥/ ربيع الأول ١٤٤٣ الموافق ٢٠٢١/١٠/١٢ القاضي بتشكيل لجنة الحكم والمناقشة لرسالة الدكتوراه للطالب أسامة الوهيب (المعيد الموفد لصالح جامعة حلب) بعنوان :

" تقييم بعض اللقاحات المحضرة من الأيبرية الستيداوية في الاستجابة المناعية لدى الأرناب "

وبعد عرض الرسالة وسردها ومناقشتها، اجتمعت لجنة الحكم والمناقشة بتاريخ ٢٠٢١/١١/١٥ وبعد المداولة قررت اللجنة ترشيح طالب الدراسات العليا أسامة الوهيب (المعيد الموفد لصالح جامعة حلب) لنيل درجة الدكتوراه في العلوم الطبية البيطرية - اختصاص (الطفيليات) بتقدير عام (جيد جداً) وبدرجة (٨١.٦) .
وتوصي اللجنة بصرف تكاليف طباعة الأطروحة على نفقة الجامعة نظراً للجهد الذي بذله الطالب والتكاليف التي تكبدها إضافة إلى تناوله موضوعاً حساساً من الناحية الاقتصادية في القطر.

التوقيع

أعضاء اللجنة :

أ. د. محمد علي العمادي
اختصاص أمراض الدواجن
كلية الطب البيطري- جامعة حماه

أ. د. عبد الكريم الخالد
اختصاص علم الطفيليات وأمراض الحيوان
كلية الطب البيطري- جامعة حماه

أ. د. محمد محسن قطنجي
اختصاص علم الطفيليات
كلية الطب البيطري- جامعة حماه

أ. د. عبد الكريم قليب اللوز
اختصاص أمراض سارية
كلية الطب البيطري- جامعة حماه

أ. د. فهيم عبد العزيز
اختصاص أمراض الدواجن
كلية العلوم - جامعة طرطوس

Syrian Arab Republic
Hama Universit
Faculty of Veterinary.-Medicine



الجمهورية العربية السورية
جامعة حماة
كلية الطب البيطري

هاتف : ٠٠٩٦٣٣٣ ٢٥٥٨٤٦٨٦٨٦ - فاكس : ٠٠٩٦٣٣٣ ٢٥١٠٥١٤ - بريد الكتروني : vet-med@net.sy

التصنيف :

الموضوع :

الرقم : ٢١١٢

التاريخ : ٢٠٢١ / ١٢ / ٧

الأستاذ الدكتور عميد كلية الطب البيطري

بعد الاطلاع على الأطروحة المعدلة من رسالة الدكتوراه المقدمة من قبل المرشح لنيل درجة الدكتوراه في العلوم الطبية البيطرية الطبيب البيطري طالب الدراسات العليا أسامة الوهيب (المعيد الموفد لصالح جامعة حلب) في قسم الأحياء الدقيقة اختصاص (الطفيليات) بعنوان :

" تقييم بعض اللقاحات المحضرة من الأييرية الستيداوية في الاستجابة المناعية لدى الأرناب "

نفيدكم بأن الأطروحة بشكلها الحالي قد استوفت التعديلات التي أشارت لها لجنة الحكم والمناقشة التي عقدت يوم الاثنين بتاريخ ٢٠٢١ / ١١ / ١٥ لمناقشة الرسالة، ونعتبر أن الرسالة بهذه الصورة جاهزة للطباعة بشكلها النهائي.

٢٠٢١ / /

يرجى الاطلاع

وتفضلوا بقبول فائق الاحترام والتقدير

رئيس اللجنة

أ.د محمد علي العمادي

عضو

أ.د عبد الكريم الخالد

عضو

أ.د محمد محسن قطرنجي

عضو

أ.د عبد الكريم قلب النور

عضو

أ.د فهيم عبد العزيز

رئيس الأحياء الدقيقة

الدكتور أشرف الصالح

مصدق عميد الكلية

الدكتور سامر إبراهيم

بطاقة حب و عرفان

لا يسعني في هذه اللحظات المليئة بالعواطف قبيل إنهاء رسالة الدكتوراه التي أقوم بتحضيرها إلا أن أخص بشكري الجزيل، وأن أعبر عن عميق امتناني لمن أخذ بيدي مع أول خطواتي على طريق البحث العلمي أستاذي الأستاذ الدكتور **محمد محسن قطرنجي** الذي كان خير مرشد وخير ناصح وتفضل مشكوراً بالإشراف على هذه الرسالة، فزودني بتوجيهاته وآرائه التي فتحت لي آفاق خوض بحر البحث العلمي، ووفر لي كل المستلزمات الممكنة ليرى عملي هذا النور متمنياً له دوام السعادة والتوفيق.

ويسعدني أن أتقدم بخالص الشكر والتقدير لنبع العلم والمعرفة والعطاء، الأستاذ الدكتور **محمود قويدر** المشرف المشارك الذي كانت لتوجيهاتها أعظم الأثر في صقل معارفي العلمية وفي إظهار هذا العمل العلمي بأبهى صورته كما وفر لي الكثير من الإمكانيات المخبرية وقدم كل مايلزم لإنجاز هذا العمل.

وكل الامتنان للأخ الغالي والشريك في العمل بمخبر الطفيليات الدكتور **مرشد كاسوحة** الذي كانت للمساته أثر بارز في إظهار نتائج هذه الرسالة بالشكل اللائق.

ولا يفوتني أن أرسل عبر هذه الوريقات تقديرية وشكري الجزيل لحامل الرسالة ومشاعل النور أستاذي الأستاذ الدكتور **عبدالكريم الخالد** الذي أحاطني أثناء تحضير هذا العمل بكل الدعم والمساعدة، وكل الشكر والامتنان لأساتذتي في قسم الأحياء الدقيقة الأستاذ الدكتور عميد الكلية **سامر ابراهيم** الذي لم يتوانى عن تقديم الدعم الممكن والتسهيلات لإنجاز هذا العمل والدكتور **أشرف الصالح** الأخ الأكبر والصديق الدائم الذي نلجأ إليه ونتعلم من خبرته ومشورته، والأستاذ الدكتور **ناجح هبرة** الذي لم يدخر جهداً في تقديم الدعم والعون، راجياً المولى العلي القدير أن يطيل عمرهم ويمد في أثرهم ويزيد في علمهم ليبقوا كما عهدتهم السراج الذي تلتف حوله طلبة العلم في كليتنا.

كما يسرني تقديم الشكر الكبير والتقدير لوالدتي ولأخوتي ولزوجتي على كل ما قدموه من دعم ونصائح وتحفيز للوصول إلى هذا النجاح بفضل من الله وعونه، وايضاً تقديم الشكر الجزيل إلى لجنة الحكم والمناقشة على مناقشة هذا العمل بحسب خبراتهم الكبيرة وملاحظاتهم الرائعة والجميلة ولجهودهم المبذولة في تحكيمها والنصائح القيمة المقدمة حتى ننجز هذا العمل.

كما أتقدم بالشكر والعرفان للأخ والصديق الدكتور نواف المبيض على ما قدمه من دعم ومساعدة ووقوفه بجانبني حتى أنجز هذا العمل في مخبر الطفيليات.

فهرس المحتويات

الصفحة	الموضوع
1	ملخص باللغة العربية
4	الفصل الأول- المقدمة
9	الفصل الثاني- سرد الأبحاث
10	1- وصف وتعريف
11	2- التبوغ
11	3- الفترة الظاهرة وقبل الظاهرة
12	4- انتقال الطفيلي للكبد
14	5- قابلية الإصابة
15	6- دورة الحياة
18	7- أنواع الأيمرية عند الأرناب
20	8- الأعراض الإكلينيكية
20	9- الإمرضية
22	10- التغيرات التشريحية المرضية
23	11- اجتياح الطفيلي لخلايا الثوي
24	12- التغيرات البيوكيميائية في مصل الدم
27	13- الاستجابة المناعية
31	14- البنية المستضدية للأطوار المختلفة لطفيلي الأيميرية
34	15- جرعة الخمج التجريبي
35	16- عدد الكيسات البيضية في الغرام الواحد من الزرق
35	17- الوقاية والعلاج
43	الفصل الثالث- مواد البحث وطرائقه
44	أولاً- تحضير البيوض المتكيسة لـ <i>E. Stiedae</i>
45	ثانياً- تحضير الحيوانات البوغية
48	ثالثاً- تحضير المُستَضدات:
51	رابعاً- اختبار التحدي والتمنيع في حيوانات التجربة
52	خامساً- المؤشرات والإجراءات المتبعة خلال التجربة

56	سادساً-الجانب المناعي
68	سابعاً-التحليل الإحصائي
69	الفصل الرابع-النتائج
95	الفصل الخامس-المناقشة
106	الفصل السادس- الاستنتاجات والتوصيات
109	الفصل السابع- المراجع
127	ملخص باللغة الانكليزية

فهرس الأشكال		
رقم الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
11	البيوض المتكيسة لطفيلي الأيمرية الستيداوية	1
18	مخطط دورة حياة أيمريات الأرناب	2
19	حجم وشكل البيوض المتكيسة لأنواع الأيميرية عند الأرناب	3
19	مكان التطفل لكل نوع من أنواع الأيميرية عند الأرناب	4
21	كبد أرنب مصاب بالأيمرية الستيداوية	5
23	البنية الشكلية للحيوان البوغي	6
24	آلية دخول الحيوان البوغي إلى خلايا المضيف	7
49	جهاز الأمواج فوق الصوتية	8
52	شريحة ماك ماستر التي تستخدم لعدّ البيوض المتكيسة	9
59	جهاز الرحلان الكهربائي العمودي للبروتينات Bio-Rad	10
61	العلاقة بين الأوزان الجزيئية للعصابات البروتينية مع حركتها النسبية RF	11
62	مراحل التبصيم المناعي	12
74	كبد سليم من مجموعة الشاهد السليبي	13
75	تضخم الكبد مع وجود عقيدات متنوعة متعددة بيضاء مصفرة	14
75	البيوض المتكيسة أثناء تبويغها	15
76	تنقية وتعقيم البيوض المتكيسة	16
76	البيوض المتكيسة المعقمة المعدة للتكسير	17
77	الكيسات البوغية بعد عملية التحطيم	18
77	الحيوانات البوغية بمحلول الإخراج	19
78	تنقية الحيوانات البوغية	20

79	الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة البيوض المتكيسة المتبوعة الصوتية	21
80	الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة الحيوان البوغي الصوتية	22
81	الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة البيوض المتكيسة غير المتبوعة الصوتية	23
82	الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة حلمة البيوض المتكيسة المتبوعة	24
83	الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة حلمة الحيوان البوغي	25
85	التبصيم المناعي لمستضدات البيوض المتكيسة المتبوعة الصوتية	26
86	التبصيم المناعي لمستضدات الحيوان البوغي الصوتية	27
87	التبصيم المناعي لمستضدات البيوض المتكيسة المتبوعة الناتجة عن الحلمة	28
88	التبصيم المناعي لمستضدات الحيوانات البوغية الناتجة عن الحلمة	29
94	أحد أطباق اختبار التراص اللامباشر	30

فهرس الجداول		
الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
41	بعض كابحات الأكريات والعلاج الفعال ضد أكريات الأرانب	1
51	يبين ملخص المجموعات المدروسة بالتجربة	2
56	المواد الداخلة في تركيب هلامة التركيز	3
57	المواد والكميات المطلوبة لتحضير 10 مل من هلامة الفصل	4
58	المكونات الداخلة في تركيب دائرة معالجة العينة واللازمة لتحضير 10 مل من الدائرة المركزة 5 مرات (5X)	5
58	مكونات دائرة الرحلان	6
59	مكونات أزرق الكومازي	7
59	المواد المكونة لمزيل اللون	8
63	المواد المكونة لدائرة النقل	9
63	المواد المكونة لدائرة التبصيم المناعي	10
65	مكونات الدائرة الفوسفاتية المتعادل	11
66	مكونات محلول السيفير	12
71	متوسط عدد البيوض المتكيسة في غرام من براز الأرانب (OPG)	13
72	مؤشر مقدار عدد البيوض المتكيسة خلال التجربة	14
73	النسبة المئوية للأمان خلال التجربة	15
84	بروتينات الخلاصات الخلوية لأطوار طفيلي الأيمرية الستيداوية	16
89	متوسط قيمة إنزيم (ALT)	17
90	متوسط قيمة الإنزيم (AST)	18
92	متوسط نشاط الإنزيم (ALP)	19
93	المتوسط الحسابي لمربع لوغارتيم مقلوب تمديد المصل لمستوى الأضداد	20

فهرس المخططات البيانية		
الصفحة	عنوان المخطط	رقم المخطط
71	متوسطات أعداد البيوض المتكيسة في غرام من براز الأرناب (OPG)	1
73	مؤشر عدد البيوض المتكيسة	2
74	النسبة المئوية للأمان	3
89	متوسط قيمة إنزيم (ALT) في مجموعات التجربة	4
91	متوسط قيمة إنزيم (AST) في مجموعات التجربة	5
92	متوسط قيمة إنزيم (ALP) في مجموعات التجربة	6
94	المتوسط الحسابي لمربع لوغارتيم مقلوب تمديد المصل لمستوى الأضداد	7

جدول الاختصارات Abbreviations table		
الاختصار	الاسم بالإنكليزي	الاسم بالعربي
ANOVA	Analysis Of Variation	تحليل التباين
ALP	Alkaline Phosphatase	إنزيم الفوسفاتاز القلويّة
ALT	Alanine Amino Transferase	إنزيم ناقلة أمين الألانين
AST	Alanine Amino Transferase	إنزيم ناقلة أمين الأسبارتات
APS	Ammonium per sulfate	فوق سلفات الأمونيوم
BCIP	-bromo-4-chloro-3-indolyl-5phosphate	برومو كلورو اندوليل فوسفات
BSA	Bovine serum albumin	ألبومين مصل البقر
CD4	Lymphocytes which express CD4 receptor	اللمفاويات التانية التي تعبر عن المستقبلة CD4
CD8	Lymphocytes which express CD8 receptor	اللمفاويات التانية التي تعبر عن المستقبلة CD8
CMI	Cellular Immunity	المناعة الخلوية
GGT	Gamma glutamyltransferase	ناقلة الغامّا-غلوتاميل
GOT	Glutamic-oxaloacetic transaminase	ناقلة أمين الغلوتاميك للأكسالوأسيتيك
GPT	Glutamic-pyruvic Transaminase	ناقلة أمين الغلوتاميك للبيروفك
IFN- γ	Gamma – interferon	انترفيرون غاما
IHA	Indirect haemagglutination test	اختبار التراص الدموي اللامباشر
IL	Interleukin	انترليوكين
NBT	Nitro blue tetrazolium	نترو بلو تترازوليوم
OPG	Oocyst per Gram	بيضة متكيسة في الغرام
PBS	Phosphat buffer saline	الدارنة الفوسفاتية
PH	Potential of hydrogen	باهاء (درجة الحموضة)

ppm	Parts per million	جُزءٌ بالمِليون
PP	Payers Patches	لطخ باير
PV	Parasitophorous Vacuole	الفجوة الطفيلية
RF	Relative mobility	التنقل النسبي
rpm	Round Per Minute	دورة بالدقيقة
SDS	Sodium dodecyl sulfate	سلفات دوديسيل الصوديوم
SR	Saculus Rotands	الكيس المستدير
SZs	Sporozoites	الحيوانات البوغية
TBS-T	Tween-Triss Buffer Saline	دارنة أملاح تويين الثلاثية
TEMED	Tetra methylene diamine	تيتراميثيل إيتيلين ديامين
TNF	Tumor necrosis factors	عامل النخر الورمي



صممت هذه الدراسة لتقييم كفاءة وفعالية لقاح الخلاصة البروتينية المحضرة من أطوار طفيلي الأيمرية السُتيدَاوِيَّة المختلفة (الحيوان البوغي، البيضة المتكيسة، والبيضة المتكيسة المتبوعة) بطريقة (التعريض للأَمْوَج فوق الصَّوتية)، وبطريقة الحملمة (دارئة الحملمة) ضد داء الأكريات الكبدي في الأرانب، في قسم الأحياء الدقيقة / كلية الطب البيطري / جامعة حماة.

حيث تم استخدام 40 أرنباً تم تقسيمها عشوائياً إلى ثمان مجموعات متساوية. حُقنت أرانب المجموعات من الثالثة حتى المجموعة الثامنة بجرعات متساوية من اللقاحات المحضرة بجرعة قدرها 25 ميكروغرام من الخلاصة البروتينية تحت الجلد، وتم اعتبار المجموعة الأولى (A) كشاهد سلبي والمجموعة الثانية (B) شاهد إيجابي. حيث لُقحت المجموعة الثالثة (C) ببروتينات البيوض المتكيسة غير المتبوعة الصَّوَاتة، والمجموعة الرابعة (E) ببروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة الصَّوَاتة، والمجموعة الخامسة (F) ببروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة المحلمة، والمجموعة السادسة (G) ببروتينات الحيوانات البوغية الصَّوَاتة، والمجموعة السابعة (H) ببروتينات الحيوانات البوغية المحلمة، والمجموعة الثامنة (I) ببروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة الصَّوَاتة والمحلمة، ومن ثم تم تجريب جميع المجموعات عدا المجموعة (A) بجرعة التحدي 1000 بيضة متكيسة متبوعة من الأيمرية السُتيدَاوِيَّة في اليوم 20 بعد التلقيح، بينما تم حقن المجموعة (A) (الشاهد السلبي) بالماء المقطر فقط.

أظهرت نتائج الدراسة إمكانية تحديد أهم مستضدات الأيمرية السُتيدَاوِيَّة من أطوار الطفيلي (الحيوان البوغي، البيضة المتكيسة، والبيضة المتكيسة المتبوعة) ذات القدرة الاستمناعية والمسؤولة عن تكوين الأضداد بعد الخمج التجريبي للأرانب، بدءاً من البيوض المتكيسة المعزولة من الكبد وتبويغها وتنقيتها والحصول على المستخلص البروتيني بعملية الصوتنة والحلمة.

كما أوضحت النتائج أنّ لقاح بروتينات الحيوانات البوغية أو البيوض المتكيسة المتبوعة يتمتع بصفات اللقاح الفعال، حيث أنها حققت نسبة مئوية للحماية تتراوح بين 88-91%، وساهمت في انخفاض عدد البيوض المتكيسة المطروحة. وتوصلت الدراسة الحالية الى الكشف عن عدد من المستضدات التي تمت ملاحظتها باستخدام تقانة التبصيم المناعي، منها عدد من المستضدات عند الحضان مع أمصال ملقحة ببروتينات الحيوانات البوغية الصَّوَاتة ذات الأوزان الجزيئية (24-26-28-66-119) كيلو دالتون. وعند الحضان مع أمصال ملقحة ببروتينات الحيوانات البوغية المحلمة تم الكشف عن المستضدات ذات الأوزان الجزيئية (24-26-28) كيلو دالتون، وفي حالة الحضان مع أمصال ملقحة ببروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة الصَّوَاتة ظهرت المستضدات (24-26-28-39-57-66-84-119-124) كيلو دالتون. أما

عند الحضان مع أمصال ملقحة ببروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة المحلمة تم الكشف عن المستضدات ذات الأوزان الجزيئية (124-119-57-28-26-24) كيلو دالتون. وأهم المستضدات المشتركة في الأمصال الممنعة بأنواع اللقاحات المحضرة من أطوار طفيلي الأيمرية السيتداوية بعد جرعة التحدي ذات الأوزان الجزيئية (24-26-28) كيلو دالتون وذلك لوجودها في الطورين ولثخانة عصائنها ولظهورها المباشر وقبل العصائب الأخرى عند إجراء اختبار التبصيم المناعي.

بينت النتائج قدرة اللقاح على إبقاء مستويات نشاط الإنزيمات الكبدية (ALT-AST-ALP) ضمن المستوى الطبيعي والحد من ارتفاع مستوى نشاطها، مما يدل على فعالية اللقاح في الحفاظ على سلامة الخلايا الكبدية من النخر والحد من الأذية الكبدية.

أدى استخدام لقاح بروتينات الحيوانات البوغية إلى تحفيز استجابة مناعية أعلى من لقاح بروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة، حيث كان متوسط عيار الأضداد الناتج عن لقاح بروتينات الحيوانات البوغية أعلى من متوسط عيار الأضداد الناتج عن لقاح بروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة دون وجود فروقات معنوية بينهما، مما يدل على كفاءة الطورين في تحفيز الاستجابة المناعية لتشكيل حماية فعالة ضد هذا الطفيلي.

تُبين هذه الدراسة أهمية لقاح بروتينات الحيوانات البوغية ولقاح بروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة في توليد استجابة مناعية فاعلة وتوصي بإجراء المزيد من الأبحاث على هذا اللقاح لإظهار أهميته التطبيقية في سورية، كبديل للأدوية والعلاجات المستوردة المستخدمة حالياً.



يؤدي الازدياد الهائل لعدد السكان في العالم إلى ارتفاع حاجة المجتمعات البشرية للمزيد من المنتجات واللحوم الحيوانية، وتعد لحوم الأرانب من المصادر الهامة في هذا المجال، ويمكن أن تقوم بدور رديف لمصادر اللحوم التقليدية كالدجاج والأغنام والأبقار. وتتمتع تربيتها بإمكانيات جيدة في البلدان النامية لتحسين سلامة وجودة الغذاء حيث تعتبر الأرانب حيوانات منتجة جداً بسبب قصر مدة الحمل والخصوبة العالية (AbouLaila, 2020).

يمكن أن تنتج أنثى الأرنب حوالي 80 كيلوغراماً من اللحوم سنوياً، أي 2900-3000% من وزنها من اللحم، ويعدّ لحم الأرانب ذو قيمة غذائية عالية وغض وخالي من الكوليسترول وغني بالكالسيوم والفيتامينات والمعادن. تعتبر الأرانب من الحيوانات العاشبة ولا تنافس البشر من أجل الطعام. ويصل إنتاج الأرانب في العالم إلى أكثر من مليون طن سنوياً، حيث وصل إنتاج مصر إلى 69600 طن (Goldammer and Mutch, 2001).

وكما هو معروف تعد الأرانب من الحيوانات المخبرية الهامة في دراسة الأمراض وإنتاج الكثير من اللقاحات والأمصال والمواد واللوازم المخبرية، بالإضافة لما سبق تربي الأرانب لأهداف اقتصادية متنوعة كإنتاج الفرو واللحم، فهي حيوانات فعالة في تحويل المصادر النباتية وبقايا المزروعات إلى بروتين حيواني عالي الجودة. وتختلف كثافة تربية الأرانب والاعتماد عليها من بلد لآخر فهي متقدمة ومتطورة في دول كالهند ومصر في حين مازالت مهملّة في العديد من البلدان الأخرى (Tripathi et al., 1995). إلا أن تربية الأرانب لا تزال تواجه العديد من المشكلات الصحية والمسببات المرضية المختلفة والتي تؤثر سلباً في إنتاجية هذه الحيوانات ولا سيما في حالات التربية المكثفة، إذ تعد عاملاً مساعداً يرفع من إمكانية انتقال الأخماج المختلفة إليها. وتشكل الأمراض الطفيلية جانباً رئيساً في هذا الإطار سواء الأوالي منها أو الديدان ومفصليات الأرجل. ويعد الخمج الطفيلي بالأيمرية السّتيدياوية *Eimeria stiedae* المسببة لداء الأكريات (Coccidiosis) في الأكباد من الإصابات الشائعة عند الأرانب والتي تسبب النفوق بنسب مرتفعة.

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

كانت الأُكْرِيات (الأيمرات) من بين أولى الطفيليات وحيدات الخلية التي رآها Antonie van Leeuwenhoek في عام 1674 عندما رأى "أجساماً" في صفراء أرنب (Levine, 1973)، والتي اعتقد (Dobell, 1922) أنها بيوض متكيسة للأيمرية السيتداوية، ومنذ ذلك الحين أصبحت الأدبيات التي تسجل وتوثق تطور معرفتنا حول طفيليات الأُكْرِيات للفقاريات بشكل عام، والأرانب على وجه الخصوص، منتشرة على نطاق واسع في مئات المجالات وعشرات اللغات. بدأت الدراسة "النشطة" لأكريات الأرانب بشكل جدي بعد عمل (Hake, 1839) الذي وصف لأول مرة علم الأمراض في الكبد والاثني عشر للأرانب المنزلية، على الرغم من اعتقاده أن البيوض المتكيسة التي رآها كانت "كريات قيحية" *pusglobules* مرتبطة بسرطان الكبد (Wenyon, 1926).

تتالت الأعمال والأبحاث بعد العالم Hake عن بيولوجيا الأكريات باستخدام الأرانب الأليفة، ولكن لسوء الحظ لم يفكر الباحثون الأوائل أبداً في التفريق بين الأنواع التي تصيب الكبد عن تلك التي تصيب الأمعاء، على افتراض أنها من نفس النوع، وأدى ذلك إلى العديد من التفسيرات الخاطئة. والنقطة الثانية في ذلك هو أن الأمر استغرق وقتاً طويلاً حتى يفهم الباحثون الأوائل أن المراحل الداخلية (الجنسية واللاجنسية) والخارجية (البيضة المتكيسة) (Oocyste) كانت جزءاً من دورة الحياة نفسها. والأمر الثالث، هو أنه تم إعطاء العديد من الأسماء العامة المختلفة للأكريات عندما تم الخلط بينها وبين البوغُ المخاطي *myxosporans* و *gregarines* والتي تضم المتكيسات العَصَلِيَّة *Psorospermium* والأُكْرِية *Coccidium* والكَيْسَانَة *Monocystis* (Duszynski and Couch, 2013).

وكان أول من اكتشف البيوض المتكيسة في الغشاء المخاطي لأمعاء الأرانب هو العالم Remak عام 1845 (Remak, 1858)، ولاحظ Kauffmann عام 1847 أن البيوض المتكيسة مقسمة إلى أربعة أكياس بوغية منفصلة عند حفظها في الماء (Duszynski and Couch, 2013). وبعد عقدين من الزمن، تحقق Stieda (1865) (Stieda, 1865) من ملاحظة Kauffmann ولاحظ أيضاً أن بنيتين ممدودتين (أي الحيوانات البوغية) تطورت داخل كل كيسة بوغية، كما تعرف Lindemann (Lindemann, 1865) على الطفيلي في الكبد وأطلق عليه اسم *Monocystis stiedae* الكَيْسَانَة السْتِيدَاوِيَّة، معتقداً أنه كان من القُطْعَانِيَّات.

بعد عقد من الزمن، أطلق Schneider اسم جنس الأيمرية على أكرية الفأر عام 1875، وبعد بضع سنوات أطلق Rivolta على أكرية الأرنب الأُكْرِية النَّاقِيَّة *coccidium cuniculi* عام 1878، و اقترح Leuckart اسم الأُكْرِية البِيضَاوِيَّة *Coccidium oviforme* لنفس الشكل الذي وجده في أمعاء

الأرانب عام 1879 (Duszynski and Couch, 2013). وفي عام 1884 أكد Balbiani بأن كل كيس بوغي ينتج اثنين من الحيوانات البوغية جنباً إلى جنب مع الجسم المُتَبَقِي الصغير (Balbiani, 1884). وفقاً لـ (Wenyon, 1926) كان (Pfeiffer, 1890; Pfeiffer, 1891) و (Pfeiffer, 1892) أول من أبلغ عن حدوث تكاثر داخلي في أمعاء الأرانب مما أدى إلى تطور وإنتاج البيوض المتكيسة. في عام 1897، كان Simond أول من أوضح افتراضات Koch عن طريق تجريب البيوض المتكيسة للأرانب الصغيرة التي نشأت منذ الولادة ومراقبة مراحل النقسّم المُتَوَسِّط (stages of merogony) (intermediate)، وفيما بعد وجد بأن البيوض المتكيسة المشكلة حديثاً تشبه تلك الأصلية التي تم تجريبها للأرانب (Simond, 1897). على الرغم من كل هذا العمل المبكر الهام، لم تكن تعتبر الأُكْرِيَّات ذات أهمية عملية حتى بداية القرن العشرين. وقد وصف (Pérard, 1924) و (Waworuntu, 1924) بعض مراحل تطور الأيمرية الثاقبة *E. perforans* والأيمرية السُتَيْدَاوِيَّة، كما أبلغ Pérard أيضاً عن أيمرية معوية جديدة أطلق عليها اسم *E. magna* (Pérard, 1924). وقبل هذه الأبحاث اعتبرت الدراسات أكريات الأرانب بأنها شكل أكبر من الأيمرية الثاقبة أو تم الخلط بينها وبين الأيمرية السُتَيْدَاوِيَّة (Waworuntu, 1924). وأبلغ (Waworuntu (1924) أخيراً عن نوع ثالث من البيوض المتكيسة التي قال إنها متوسطة الحجم بين *E. magna* و *E. stiedai*، والتي أطلق عليها (Kessel and Jankiewicz, 1931) فيما بعد *E. media*، وقاموا أيضاً بتسمية أنواع أخرى من الأيمرية المعوية والتي يتم تمييزها عن تلك الخاصة بـ *E. stiedai*.

بذل الباحثون جهداً كبيراً في دراسة داء الأكريات من حيث مسبباته، ودورة حياته، ووبائيته، وأشكال الإصابة به، وطرق الوقاية والمعالجة منه. وساعد على ذلك انتشاره الواسع في معظم دول العالم. إذ دخلت الأبحاث العلمية في النصف الثاني من القرن العشرين مرحلة متميزة وذلك باستعمال مضادات داء الأكريات للوقاية منه بفعالية قوية، وتحضير اللقاحات الخاصة والمناعة الناتجة عنها (Williams, 2002). وقد أدى استعمال مضادات داء الأكريات إلى التفكير بتحضير لقاحات حية، إذ بدأت في الخمسينات، واستمرت بالاستعمال لسنوات طويلة حتى دخول جيل جديد من اللقاحات المخففة إلى السوق في منتصف السبعينات (Williams, 2002) 1975، وحُصِرَت اللقاحات تجارياً من عترات ضعيفة وشديدة الأمراض، واحتوت على بيوض متكيسة لأنواع عديدة من الأيمرية (Dalloul and Lillehoj, 2005).

وقد تم في هذا العمل ولأول مرة في سورية دراسة فعالية اللقاحات (الصُّوَاتَة والمحملة) المحضرة من أطوار مختلفة (البيوض المتكيسة المتبوغة وغير المتبوغة، الحيوانات البوغية) من الأيمرية السُتَيْدَاوِيَّة

من عزلة محلية، وتم إحصاء البيوض المتكيسة في البراز الناتجة عن الخمج التجريبي بهذا الطفيلي يومياً، وذلك بهدف إعطاء صورة واضحة عن المرض وتقدير أهميته الحقلية في إعاقة رعاية وإنتاج الأرانب والتي باتت تعد من أهم مصادر البروتين الحيواني البديلة، ومن ثم محاولة وضع بعض المقترحات والتوصيات اللازمة للحد من انتشار العدوى الطفيلية وقطع دورة الحياة والحد من انتشار المرض مما يسهم في تحسين نظم ووسائل رعاية وإنتاج الأرانب. ونظراً لقلّة الدراسات حول هذا الطفيلي في سورية وجدنا أنه من الواجب إجراء هذه الدراسة التي ستشكل لبنة هامة لدراسات قادمة تساهم في الحد من تأثيرات هذا المرض الطفيلي، **ولذلك هدفت هذه الدراسة إلى:**

- تقييم كفاءة ستة أنواع من اللقاحات البروتينية المحضرة بطريقة التعريض للأموح فوق الصوتية ultrasonic waves وبطريقة الحلمة Lysis buffer من عزلة محلية سورية من الأيمرية السُتيدَاويَّة: من طور البيوض المتكيسة المتبوغة (المحلّمة، الصوتية)، ومن طور البيوض المتكيسة الصوتية، ومن الحيوانات البوغية (المحلّمة والصوتية)، ومن البيوض المتكيسة المتبوغة المحلّمة والصوتية معاً، واختبار فعالية كل منها على مستوى الاستجابة المناعية، بتطبيق الخطوات التالية:
- 1- تحضير اللقاحات الصوتية وغير الصوتية (المحلّمة) من البيوض المتكيسة المتبوغة وغير المتبوغة، والحيوانات البوغية باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية ودارئة الحلمة.
 - 2- دراسة المؤشرات التالية: متوسط عدد البيوض المتكيسة في غرام من البراز OPG -مؤشر عدد البيوض- وحساب النسبة المئوية للأمان.
 - 3- تحديد المستضدات الرئيسية في اللقاحات المستخدمة بتقانة التبصيم المناعي.
 - 4- قياس مستوى الإنزيمات الكبدية: إنزيم ناقلَةُ أمينِ الأَلائينِ Alanine Amino Transferase (ALT) وإنزيم ناقلَةُ أمينِ الأَسبَارَتَاتِ Aspartate Amino Tnsferase (AST) وإنزيم الفُسْفَاتازُ القَلَوِيَّةُ Alkaline Phosphatase (ALP) وذلك بالاعتماد على طريقة المقايسة اللونية الحركية.
 - 5- قياس عيار الأضداد باستخدام اختبار التراص الدموي اللامباشر Indirect haemagglutination .test



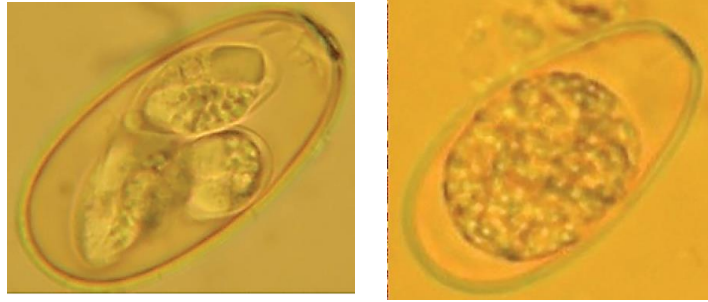
1- وصفٌ وتعريف Definition and Description:

تعد الإصابة بالأميرية المسببة لداء الأكريات مرضاً طفلياً منتشراً يصيب الأرانب كغيره من الحيوانات مسبباً تدهوراً خطيراً في النمو وفي معدّل الاستفادة من العلف (KN et al., 2005) ويسبب نسبة نفوق مرتفعة، وخسائر اقتصادية عند الإنتاج في المجتمعات التي تعاني من سوء تدبير مرافق الصّرف الصحي (Tehrani et al., 2013).

ويعدّ داء الأكريات مرضاً طفلياً تسببه أوالي Protozoa وحيدة المثنوى تسمى بالأميريات وتتبع لتحته شعبة معقدات القمة Subphylum Apicomplexa صنف الكوكسيديا Class Coccidia وبالتالي تحت صنف Subclass Coccidiasina فرتبة الأكريات الحقيقية Order Eucoccidiida وتحت رتبة الأيمرية Suborder Eimeriina عائلة الأيمرية Family Eimeriidae وبالتالي جنس الأيمرية Genus Eimeria (Tenter and Schnieder, 2006). وقد وصفت البيوض المتكيسة للأيمرية السنتيدأوية في البداية من قبل عالم الأحياء الهولندي (Antoni Van Leeuwenhoek) في القنوات الصفراوية عام 1674 (Duszynki et al., 2010)، والتي تسمى في وقتنا الحالي الأيمرية السنتيدأوية. سُجلت الإصابة بالأميرية عند الأرانب في جميع أنحاء العالم (Satyanarayana et al., 1982)، وبلغت نسبة الإصابة في سورية 4% في عام 1991، وتشير الأبحاث إلى ندرة الدراسات حول الأيمرية السنتيدأوية في الكبد كما هو الحال عند الأنواع الأخرى التي تصيب الأرانب، ويذكر هنا أنّ الأيمرية السنتيدأوية هي واحدة من أكثر أنواع الأيمرية إمراضيه عند الأرانب حيث تسبب ارتفاعاً في نسب النفوق لتصل إلى 100% (Darwish and Golemansky, 1991)، وتتطفل ضمن الخلايا الظهارية للقنوات الصفراوية مسببة تلف الكبد الحاد وخسائر اقتصادية كبيرة (Erdogmus and ErOksuz, 2006). ينتقل الخمج بالأميرية بنوعها الكبديّة والمعويّة عن طريق تناول البيوض المتكيسة المتبوّعة Sporulated oocysts مع العلف والماء الملوّثين بها (Oncel et al., 2011)، وتتعلق شدة الإصابة بالأميرية بحجم جرعة البيوض المتكيسة المأخوذة عن طريق الفم (Harcourt-Brown, 2002).

وحول توصيف الأيمرية السنتيدأوية فقد أظهر الفحص المجهرى للبيوض المتكيسة للأيمرية السنتيدأوية أنها تأخذ الشكل البيضي المتطاوّل إلى الإهليلجيّ مكونة من طبقتين داخلية وخارجية، جدارها أملس رقيق عديم اللون أو بلون أصفر بني أو بلون وردي فاتح، بشكل عام يعتبر جدارها مؤلف من طبقة واحدة لكن العالم Pellerdy قال بأنه توجد طبقة خارجية رقيقة والتي تنفصل أو تتمزق بسرعة، تتراوح أبعادها بين 17-25 ميكرون عرضاً، و31-42 ميكرون طولاً، وذات نهاية مسطحة وبُويب، وتحتوي

حبيبات لاقطبية وتحتوي على خلية واحدة تسمى بمولدة الأبواغ Sporont، بينما تضم البيوض المتكيسة المتبوعة أربعة من الكيسات البوغية Sporocysts تتراوح أبعادها 10×18 ميكرون ($8-10 \times 17-18$) ويضم كل كيس بوغي حيوانيين بوغيين Sporozoites (Duszynski and Couch, 2013).



الشكل (1) البيوض المتكيسة للأيمرية الستيداوية (Ütüik et al., 2015)

ب- متبوعة

أ- غير متبوعة

2- التبوغ Sporulation:

يتم تبوغ البيوض المتكيسة بين 10 - 35 درجة مئوية، لكن درجة الحرارة الأفضل هي بين 20 - 27 درجة مئوية والحد الأدنى للتبوغ هو 58 ساعة، ولكن بشكل عام يستغرق حوالي 3 أيام (Duszynski and Couch, 2013). كما وجد (Veterinärmedizin and Ayeni, 1969) أن التبوغ استغرق 48 ساعة على الأقل عند 28 درجة مئوية، مع تعريض البيوض المتكيسة للرج باستمرار، حيث أن معظم البيوض المتكيسة تتبوغ في غضون 2-4 أيام. كما أبلغ (Rysavy, 1954) أن البيوض المتكيسة تتبوغ في غضون 60-75 ساعة.

3- الفترة الظاهرة والفترة قبل الظاهرة Prepatent and patent periods:

ذكر (Smetana, 1933a) أن البيوض المتكيسة ظهرت لأول مرة في البراز بعد 3-4 أسابيع من الإصابة، بينما قال (Kotlan and Pellerdy, 1949) إن الدور السابق للظهور (الفترة قبل الظاهرة) prepatent period هي 17 يوماً، وهي المدة التي تم تأكيدها لاحقاً من قبل (Cheissin, 1967)، أو ما بين 14-16 يوماً وفق (Fitzgerald, 1970; Sanyal and Sharma, 1990). بينما تبلغ الفترة الظاهرة (patent period) وسطياً 24 يوماً (21-30) يوم (Carvalho, 1943). كما وجد (Abu-El-Ezz et al., 2012) في دراسة أجراها عن الخمج التجريبي بالأيمرية الستيداوية عند الأرانب أن البيوض المتكيسة للطفيلي تبدأ بالظهور في الروث في اليوم 16 بعد الخمج التجريبي، وتزداد يومياً ليصل عددها في البراز إلى أعلى مستوى له (276860 بيضة متكيسة/غ روث) في اليوم 22 بعد الخمج،

ثمَّ يبدأ عددها بالتراجع التدريجيّ ليصل باليوم 46 بعد الخَمَج إلى (1000 بيضة مُتكيّسة/غ روث)، في حين أنّها اختفت من الروث اعتباراً من اليوم 47 بعد الخَمَج وحتى نهاية التّجربة.

4- انتقال الطفيلي للكبد:

لم يتمّ تحديد الطريق الذي تصل به الحيوانات البوغية للأيمرية السيتداوية إلى الكبد من القناة المعوية عموماً، ولكن تمّ تقديم بعض القرائن من خلال عمل (Fitzgerald, 1970; Fitzgerald, 1972; Fitzgerald, 1974)، وأشار (Fitzgerald, 1970) إلى إمكانية انتقال الحيوانات البوغية من خلال الوَحيّدات وربما وصلت إلى الكبد عن طريق الدم. وأشار إلى أن سحب الدم من الأرانب المخدرة عن طريق وَخز القلب كان يحتوي على الحيوانات البوغية لمدة 7 أيام على الأقل. وفي وقت لاحق، لاحظ (Fitzgerald, 1972) أن *E. stiedai* تم نقلها عن طريق الوَخز في القلب إلى 76/59 (78 %) من الأرانب الخالية من الكوكسيديا والتي تلقت دمًا كاملاً أو كُرَيَاتِ حُمُرٍ أو كُرَيَاتِ بَيضاء من الأرانب المانحة التي تم تلقيحها فموياً باستخدام البيوض المنكيسة.

وأبلغ كل من (Fitzgerald, 1970; Pellérdy, 1969) أيضاً عن حدوث عدوى كبدية بـ *E. stiedai* بعد تلقيح الأرانب باستخدام الحيوانات البوغية للأيمرية السيتداوية Sporozoites of *E. stiedai* (SZs) المستخلصة مخبرياً عن طريق وريد الأذن، حيث تستقر SZs فوق نواة الخلية المضيفة في الخلايا الظهارية للقناة الصفراوية، ولكنها نادراً ما تغزو خلايا متن الكبد. ووفق (Cheissin, 1967) تم العثور على البيوض المنكيسة في العقد الليمفاوية وفي العقد المساريقية والمثانة وفي الممرات الأنفية للأرانب من قبل العالم Yakimoff عام 1931، كما أظهرت العديد من الأبحاث التجريبية للأرانب بهذا النوع أن المراحل الداخلية لا تتطور في الأمعاء (Cheissin, 1967).

لم تتم الإجابة تماماً على السؤال المتعلق بالطرق التي تنتقل بها الحيوانات البوغية من الأمعاء إلى الكبد، على الرغم من أن (Pellérdy and Dürr, 1970)، اللذان درسوا العدوى التجريبية في الأرانب الذين تتراوح أعمارهم بين 18 يوماً و 5 أسابيع، حيث وجدا الحيوانات البوغية خلال 24 ساعة في الغدد الليمفاوية المساريقية، كما تم الكشف عن الطفيلي في الكبد عن طريق المقاطع النسيجية ما بين 1-5 أيام بعد الخمج. ولاحظنا وجود الحيوانات البوغية في الجزء العلوي من الأمعاء، من دون رؤية المراحل الداخلية. كما قال (Smetana, 1933a, b) إن الحيوانات البوغية اخترقت الكبد من خلال مجرى الدم، وليس عبر القناة الصفراوية، مع وجود دليل واحد على أن المراحل الداخلية قد تطورت في كبد الأرانب حيث تم ربط القناة الصفراوية. عندما تم إدخال الحيوانات البوغية عن طريق الوريد، أصيب كبد الأرانب بالمراحل الداخلية وتم

العثور على الحيوانات البوغية في الأوعية الدموية للكبد بعد إدخال جرعات كبيرة من البيوض المتكيسة المتبوغة في الأمعاء ومع ذلك، لم يتم العثور على الحيوانات البوغية في الأوعية الليمفاوية، على ما يبدو استخدمت الحيوانات البوغية نظام الدم ليس فقط لاختراق الكبد، وكذلك في اختراق الكلى (Cheissin, 1967).

قام (Owen, 1970) بدمج الأرناب المانحة بـ $2-4 \times 10^6$ من البيوض المتكيسة المتبوغة ودرس مسار هجرة SZs بعد اختراق ظهارة الاثني عشر، عن طريق جمع عينات من العقدة الليمفاوية ونقي العظم والكبد والعقدة الليمفاوية الإبطية خلال 12 و 24 و 48 ساعة بعد الخمج، تم قام بمجانسة هذه الأنسجة وحقنها عن طريق الوريد في أرناب متلقية خالية من المسببات المرضية Specific Pathogen Free (SPF) عمرها 8 أسابيع. بناءً على شدة تأثير الكبد وإنتاج البيوض المتكيسة، خلص إلى وجود SZs قابلة للحياة موجودة في العقدة الليمفاوية المساريقية خلال 12 ساعة بعد الخمج، وفي نقي العظم خلال 24 ساعة من الخمج، وفي الكبد والغلالة الشَّهْبَاء (buffy coat) خلال 48 ساعة بعد الخمج في الأرناب المانحة. عندما تم حقن SZs التم تم استخلاصها مخبرياً في أوردة الأذن، فإنها انتقلت عبر مجرى الدم إلى الغدد الليمفاوية المساريقية والكبد، كما يدخل البعض منها الوحيدات وتنتقل بداخلها إلى الكبد، لكن معظمها يبقى حراً من دون خلايا مضيئة أثناء مرورها عبر مجرى الدم (Slater, 1969).

أبلغ (Durr, 1971) عن وجود نشاط إشعاعي في جميع أعضاء الفئران والأرناب التي تم تجريعها بحيوانات بوغية موسومة، لكنه لم يجد دليلاً مباشراً على وجودها الفعلي في هذه الأعضاء. في وقت لاحق وجد (Dürr, 1972) SZs في الكبد، والعقد الليمفاوية المساريقية، ونقي عظم الفخذ والساق في الأرناب التي كان قد خمجها بالبيوض المتكيسة. كما وجدها في نقي العظم فقط في البلاعم في المسحات الطازجة. وخلص إلى أن SZs تمر عبر جدار الأمعاء وتذهب إلى العُقْدُ الْمَسَارِيْقِيَّةِ عبر اللَّمْف وتوزع عبر الجسم عن طريق القناة الصدرية. واعتبر أن الكبد عضو ترشيح لـ SZs. في السابق أُعتقد أن SZs تم نقلها مباشرة إلى الكبد عن طريق الدم البابي (Fitzgerald, 1970; Pellérdy and Dürr, 1970; Slater, 1969; Smetana, 1933b) وجد (Horton, 1967) أن E. stiedai هاجرت إلى الكبد عبر الأوعية الليمفاوية. وبعد ذبح الأرناب المخموجة، وجد SZs في الصفيحة المخصصة للإثنا عَشْرِي بـ 5-8 ساعات بعد الخمج، ثم في الغدد الليمفاوية المساريقية، وكانت إما حرة أو داخل الوحيدات على حد سواء وذلك بعد الخمج بـ 12-84 ساعة، ولم يجدها في الدم البابي الإثنا عَشْرِي واعتقد بأنها هاجرت من الإثنا عَشْرِي إلى العقد الليمفاوية المساريقية،

ربما في الوحيدات المفعية. ومما زاد الأمر تعقيداً مسألة ما يحدث للحيوانات البوغية عند دخولها إلى أمعاء الأرانب وخروجها من الكيسات البوغية، حيث نقل (Fitzgerald, 1974) الطفيلي إلى الأرانب الفتية الخالية من الأكريات عن طريق الحقن بوخز القلب بدم القلب أو الكريات الحمر أو الكريات البيضاء التي تم الحصول عليها عن طريق وخز القلب من الأرانب المانحة التي تم تلقيحها تجريبياً بالبيوض المتكيسة المتبوعة قبل 27 يوماً، حيث تم إصابة 59 من الأرانب الـ 76 بنسبة (77%) التي تم حقنها بهذه الطريقة أي أن الأشكال المعدية كانت موجودة في الدم لتلك الفترة.

5- قابلية الإصابة:

أشارت أغلب الأبحاث والدراسات إلى وجود علاقة قوية بين الإصابة بالأميرية وعمر الثوي، حيث تقل نسبة الإصابة مع ازدياد عمر الثوي (Wang and Tsai, 1991). تعد الحيوانات الفتية أكثر حساسية للإصابة بالأميرية، بينما تكون الحيوانات البالغة المصابة حاملة للخم فقط (Abed and Yakoob, 2013)، كذلك أثبت (Al-Mathal, 2008) أن أعلى نسبة إصابة بالأميرية السيتداوية عند الأرانب تحدث بعمر (1-2 شهر)، وأكد الأخير أيضاً على عدم وجود فروق معنوية في نسبة الإصابة ما بين الذكور والإناث. تحدث الإصابة بالأميرية بنوعها المعوية والكبدية بشكل رئيس في الأرانب اليافعة الصغيرة (المفطومة حديثاً)، ولا تتأثر نسبة الإصابة بالعرق أو الجنس (Al-Mathal, 2010; Papeschi et al., 2013; Tehrani et al., 2013).

تؤدي إصابة الأرانب الصغيرة بالأميرية السيتداوية إلى إصابة كبدية شديدة تنتهي بالموت، بينما تصبح الأرانب البالغة المصابة حاملة للمرض فقط دون ظهور أعراض (Al-Naimi et al., 2012)، ويعود ارتفاع قابلية الإصابة بالأميرية السيتداوية عند الأرانب الصغيرة إلى ضعف المناعة ونقص التغذية وسوء الوضع الصحي (Erdogmus and ErOksuz, 2006). وأظهرت الدراسات الوبائية المتعلقة بانتشار داء الأكرية في كل من أستراليا، نيوزيلاندا وبريطانيا أن الإصابة كانت أشد عند صغار الأرانب والتي لا تكون مناعتها متطورة ضد الإصابات والأمراض (Oppelt et al., 2010).

في دراسة أجريت في أحد مزارع إنتاج الأرانب في أستراليا وجد فيها أن داء الأكرية أدى لحدوث النفوق عند الأرانب بنسبة 8-10 % خلال عامين متتاليين (Oppelt et al., 2010)، وأشار (Hobbs et al., 1999) إلى أن الإصابة بداء الأكرية لم تُظهر معدل نفوق هام عند الأرانب البرية، وفي تجربة قام بها (Henning et al., 2008) في إحدى مزارع إنتاج الأرانب في نيوزيلاندا تبين أن نسبة النفوق بين أرانب المزرعة وصلت إلى 1% عند عمر فوق 3 سنوات، والأرانب المصابة بالأميرية السيتداوية

أظهرت زيادة في وزن الكبد بنسبة 5.6 % مقارنة مع السليمة نتيجة التوذم الحاصل في الكبد وزيادة كمية الدم الواردة للمنطقة الالتهابية (Lello et al., 2005).

تُعد الإصابة المختلطة بالأميريات شائعة الحدوث بشكل عام، فمن الممكن أن تصاب الأرناب بعدة أنواع من الأميريات المعوية معاً (Toula and Ramadan, 1998). وبحسب دراسة قام بها (Levine, 1985)، بلغت نسبة إصابة الأرناب بجمع مختلط بالأميريات 86% في حالات الأكريات التي تمت دراستها عند الأرناب. يعزى اختلاف معدل انتشار داء الأكرية عند الأرناب إلى العديد من العوامل وأهمها المنطقة الجغرافية، والاختلاف في البيئة الزراعية، والظروف البيئية والمناخية المحيطة (Harcourt-Brown, 2002).

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

إن الإصابة بداء الأكرية تحدث نتيجة مجموعة من التفاعلات المعقدة بين الطفيلي والثوي المضيف، بالإضافة لوجود بعض الظروف البيئية المحيطة (Hashemnia et al., 2014)، وتعد الحيوانات المصابة مصدراً طبيعياً لتلوث البيئة المحيطة وحدث الخمج عند الأرناب السليمة وخاصة الفتية منها (Lima, 2004)، وتختلف درجة تلوث البيئة حسب طبيعة الرعاية عادة، حيث يصبح الخطر أكبر في حال الرعاية المكثفة، وتلعب الظروف البيئية المحيطة كالرطوبة ودرجة الحرارة، دوراً مهماً في تبوغ البيوض المتكيسة في الوسط الخارجي وبالتالي زيادة خطر الإصابة (Darzi et al., 2007; Lima, 2004; Ruiz et al., 2006).

6- دورة الحياة Life Cycle:

تكون مباشرة ولا تحتاج إلى ثوي متوسط، وتضم دورة حياتها تكاثراً لا جنسياً تتبعه مرحلة تكاثر جنسي ومرحلة التبوغ، وتصاب (يحدث الخمج) الأرناب بتناول البيوض المتكيسة المتبوغة Sporulated oocysts مع العلف والماء الملوّثين بها (Mwangi, 2010). ويدخل الطور الخامج بعد ابتلاعه إلى داخل جسم الثوي، ويحدث تحللاً في جدار البيوض المتكيسة وتخرج كَيْسَات الأَبُوغ (Sporocysts) منها،

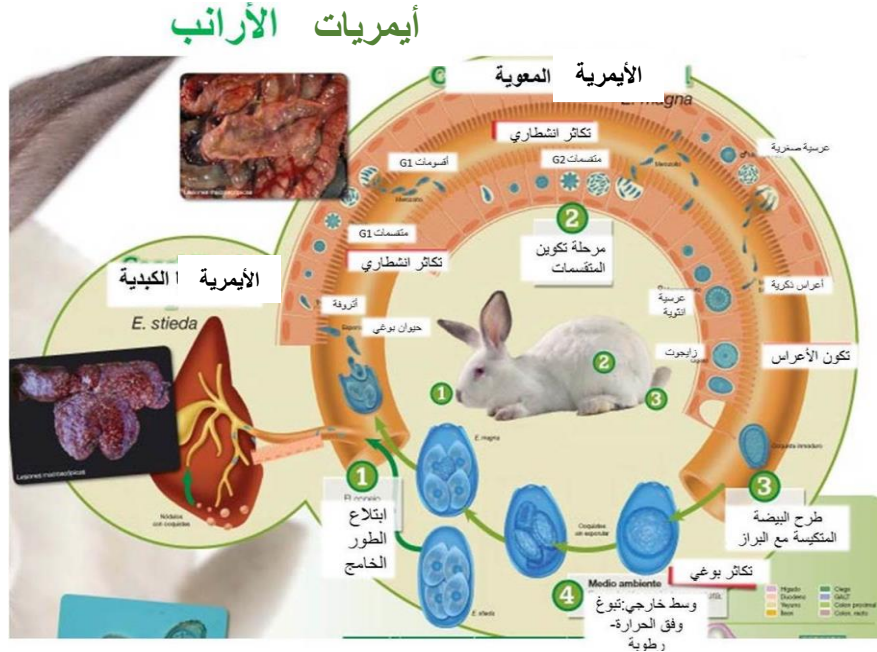
لتحرر الحيوانات البوغية (Sporozoites) منها بتأثير أنزيم الأمعاء الترسين، وتأثير الصفراء وتوفر CO₂، إذ تعمل الصفراء على تنشيط حركة الحيوانات البوغية داخل الكيسات البوغية، بينما يحدث الترسين تغيرات على جدار كيسة الأبواغ، وبالنهاية تخرج الحيوانات البوغية منها لتصبح حرة في تجويف الأمعاء (Harcourt-Brown, 2002).

تتحرر معظم SZs من كَيْسَاتِ الأبْوَاعِ بعد 5 ساعات في الإثْناعْشِرِيَّ وتبدأ في اختراق الغشاء المخاطي، وعند وصولها إلى الغشاء القاعدي، تتم بلعْمَتها ونقلها داخل الوحيدات عبر الأوعية اللِمفاوِيَّةِ المساريقيَّةِ إلى العقد اللِمفاوِيَّةِ، بعد ذلك تصل SZs إلى جيوب العقد اللِمفاوِيَّةِ داخل الوحيدات اللِمفاوِيَّةِ بعد 5-6 ساعات. تغادر SZs الوحيدات وتدخل الدم الباطني، الذي يحملها إلى الكبد أو بدلاً من ذلك، ربما يتم نقلها بشكل سلبي بواسطة الوحيدات إلى الكبد حيث تغادرها وتدخل الخلايا الظهارية الصَّفْراوِيَّةِ (Horton, 1967). بمجرد دخول SZs الخلايا الظهارية لَعْنَةِ الصَّفْراءِ، حوالي اليوم الثالث بعد الخمج، وتصبح أوسع في النهاية الأمامية وأضيق في النهاية الخلفية، وتقيس أبعادها حوالي 8-13 × 3-5 ميكرون، حيث تمثل الجيل الأول من المتقسمات، والمحتوية على 5-7 أُقسُومَاتِ أبعادها 7.5 × 1.5 ميكرون، تدخل أُقسُومَاتِ الجيل الأول خلايا ظهارية جديدة لَعْنَةِ الصَّفْراءِ، بشكل عام على جانب لَمْعَةُ نِوَاةِ الخلية المضيفة، وتشكل الجيل الثاني من المتقسمات، بنفس حجم متقسمات الجيل الأول، والتي تحتوي على 5-8 أُقسُومَاتِ نَحِيْلَةٍ بحلول اليوم الرابع بعد الخمج. بينما يتشكل الجيل الثالث من المتقسمات في الفجوة الحاملة للطفيلي parasitophorous vacuole والتي تُنتج 10-20 من الأقسومات النحيلة التي تكون منحنية قليلاً، وقياسها 8 × 0.75 ميكرون، وتتوضع جنباً إلى جنب مثل عنقود الموز (Smetana, 1933a; Tyzzer, 1902). بعد ذلك تدخل أقسومات الجيل الثالث إلى خلايا جديدة لإنتاج الجيل الرابع من المتقسمات والتي تقيس 16 × 10 ميكرون، مستلقية في الفجوة الحاملة للطفيلي بالقرب من نواة الخلية المضيفة، أو على جانبها اللُْمْعِيَّ. حيث تتشكل في اليوم الثامن بعد الخمج والتي تحتوي 20-30 من الأقسومات النحيلة، المنحنية قليلاً أبعادها 6-8 × 0.5-0.75 ميكرون، والتي تقع في دائرة حول بقايا التلُّونُ الْمُظْلَمِ (Owen, 1970; Pellérdy and Dürr, 1970). بحلول اليوم 11 بعد الخمج، وتم العثور على الجيل الخامس من المتقسمات في الفجوة الحاملة للطفيلي، أبعادها حوالي 17-20 × 14 ميكرون، وتنتج 30-40 من الأقسومات النحيلة، كل منها ~ 8-9 × 1-1.5 ميكرون، والتي تتوضع عَشْوَائِيًّا في متقسماتها حول الجِسْمِ الْمُتَنَبِّ الإِهْلِيَجِيَّ. وقد تم تصنيف كل هذه الأجيال الخمسة اللاجنسية

على أنها من النمط Type B (Pellérdy and Dürr, 1970). كما قاموا أيضًا بتحديد المتقسمات والأقسومات من النمط A التي تطورت كما يبدو بالتزامن مع تلك التي صنّفوها على أنها من النمط B. تشبه متقسمات الجيل الأول من النمط A متقسمات الجيل الأول من النمط B. كما شوهدت متقسمات الجيل الثاني من النمط A في الفجوة الناقلة للطفيلي في اليوم 4-6، واحتوت على اثنين فقط من الأقسومات المنجلية الشكل $\sim 6 \times 2$ ميكرون. كما لوحظت متقسمات الجيل الثالث من النوع A في الفجوات $\sim 9-12$ ميكرون، مع $5-7$ أقسومات، كل منها $\sim 8 \times 1.5-2$ ميكرون، والتي تماثل متقسمات الجيل الثاني من النمط B (موجودة في اليوم الرابع بعد الخمج)، لكنها كانت أكثر سمنة وأكثر قتامة ومتجانسة بشكل أكثر. كما تم العثور على متقسمات الجيل الرابع من النمط A في الفجوات في اليوم العاشر بعد الخمج والتي تقيس 9×13.5 ميكرون، وكان لكل منها $3-4$ أقسومات ممتلئة 9×2 ميكرون (Duszynski and Couch, 2013). وفي اليوم 12 بعد الخمج وُجدت متقسمات الجيل الخامس من النمط A في الفجوات الطفيلية $\sim 12-13 \times 8-9$ ميكرون، والمحتوية $5-8$ أقسومات ممتلئة الجسم $10 \times 2.5-3$ ميكرون ولديها عدة أنوية صغيرة. وفي اليوم 15 بعد الخمج شوهدت متقسمات الجيل السادس في الفجوات الطفيلية حوالي 20×12 ميكرون، كل منها يحتوي على 15 أقسومه، والتي بدت مثل تلك الموجودة في الجيل السابق من النمط A (Pellérdy and Dürr, 1970).

يبدأ التكاثر الجنسي عندما تتحول وتتمايز أعداد كبيرة من أقسومات الجيل الثاني داخل الخلايا الظهارية إلى طور العرسيات الكبيرة (Macrogametocytes) دائرية الشكل التي تظهر على حوافها حبيبات باستر الزرقاء، ونواتها كبيرة مركزية التوضع، ويحصل لها انقسام اختزالي لتعطي في النهاية عروساً كبيرة واحدة. بينما يتحول عدد قليل من الأقسومات إلى عرسيات صغيرة (Microgametocytes)، وتتشكل الأعراس الصغيرة بعد حدوث انقسام اختزالي للعرسيات الصغيرة لتعطي عدداً كبيراً من الأعراس الصغيرة التي تتصف بشكلها الانسيابي، وطرفها الأمامي المدبب، وباحتوائها على سوطين صغيرين يساعدها على الحركة باحثة عن العروس الكبيرة. فإذا ما نجحت في إخصابها تتشكل الزايجوت zygote ويتم ذلك داخل الخلايا الظهارية لقناة الصفراء، بعدها تتمدد حبيبات باستر الزرقاء وتلتحم مكونة جداراً ثابتاً للزايجوت وتدعى عندئذ بالبيضة المتكيسة. وتتفجر بعدها الخلايا المصابة ليتم طرح هذه البيوض عبر القنوات الصفراوية مع الصفراء ومنها إلى الأمعاء لتطرح مع البراز إلى الوسط الخارجي (Lacey, 2016). تصل البيوض المتكيسة غير المتبوغة مع البراز إلى الوسط الخارجي، وهي محتوية على مولدة الأبواغ Sporont، وعند توفر الظروف البيئية الخارجية من حرارة ورطوبة وأوكسجين، يبدأ انقسام وتطور

مولدة الأبواغ إلى أربع أرومات بوجية Sporoplasts منفصلة. تتحول بعدها إلى أربع كيسات بوجية عن طريق تشكل حيوانين بوعيين في كل كيسة بوجية. وعند اكتمال نمو الحيوانات البوجية تتحول إلى بيوض متكيسة متبوعة قادرة على إحداث الخمج وتستغرق مدة التبوغ في الوسط الخارجي عادة ثلاثة أيام، وهي ترتبط بعوامل الوسط الخارجي من حرارة ورطوبة وتوفر الأوكسجين (مرحلة التبوغ) (Allen and Fetterer, 2002; Duszynski and Couch, 2013).

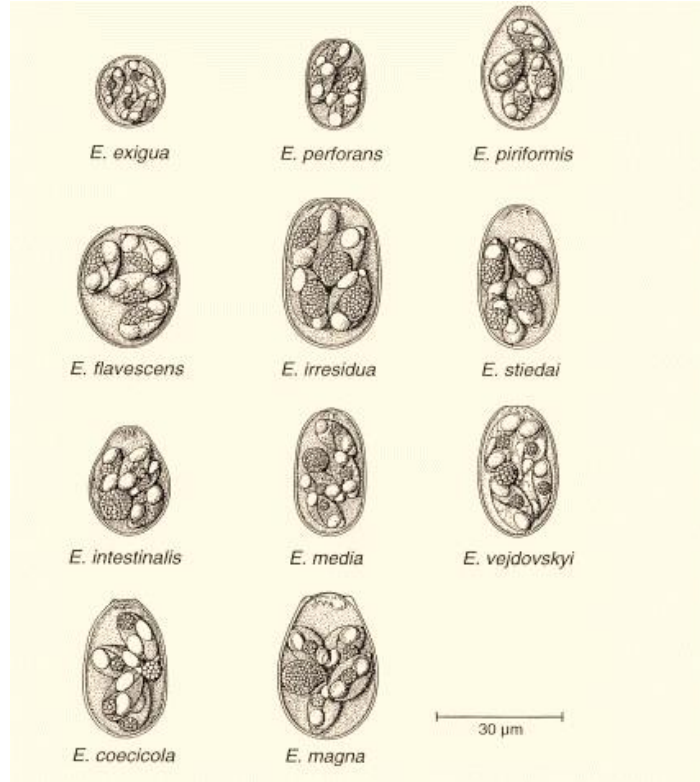


الشكل (2): مخطط دورة حياة أيمريات الأرانب

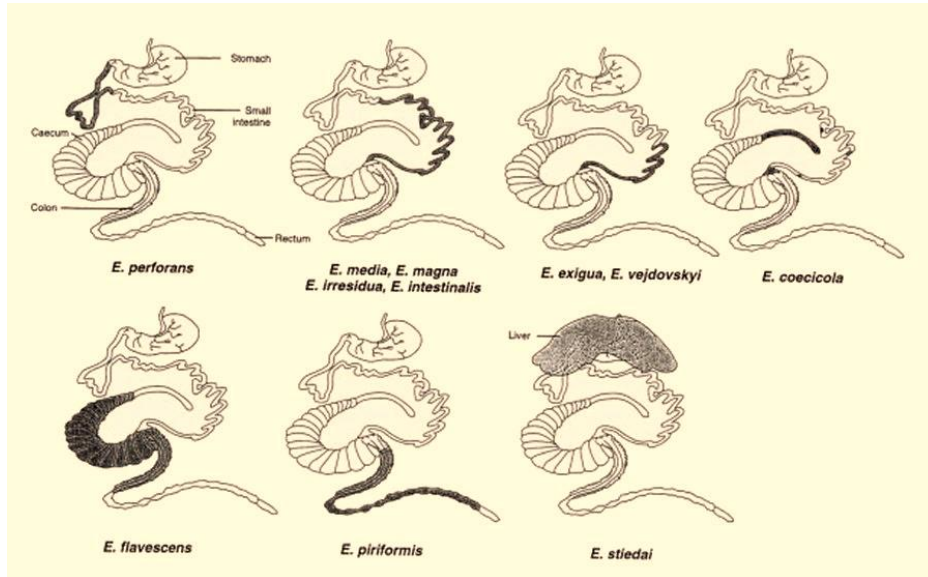
<http://www.infoexoticos.com/coccidiosis-en-conejos>

7- أنواع الأيمرية عند الأرانب:

يوجد أكثر من 30 نوع من الأكريات (الأيمريات) الموصوفة عند الأرانب lagomorphs، والأنواع الأكثر شيوعاً عند الأرانب الداجنة هي: *E. magna*، *E. media*، *E. exigua*، *E. piriformis*، *E. stiedai*، *E. perforans*، *E. irresidua*، *E. intestinalis*، *E. flavescens*، *E. vejovskyi*، *E. coecicola*، والتي تتطفل في الأمعاء الدقيقة باستثناء *E. piriformis* التي تصيب الأعور والقولون و *E. stiedai* التي تغزو الكبد والقنوات الصفراوية. أما الأنواع المعوية الأكثر إضرابه فهي *E. intestinalis* و *E. flavescens* التي تسبب تحزب ظهارة الأمعاء مما يؤدي إلى الإسهال والهزال (Taylor et al., 2015). وعادة ما تصاب أمعاء الأرانب بأخماج متزامنة بعدة أنواع من الأيمرية المعوية (Norton et al., 1979).



الشكل (3): يوضح حجم وشكل البيوض المتكيسة لأنواع الأيمرية عند الأرانب (Taylor et al., 2015)



الشكل (4): يوضح مكان التطفل لكل نوع من أنواع الأيمرية عند الأرانب (Taylor et al., 2015)

8- الأعراض الإكلينيكية:

تبدو على الأرناب المصابة بالأميرية السُتيدَاوِيَّة علامات الضعف، فقدان الشهية، الإسهال المائي البني أو الإمساك والهزال وخشونة الشعر واليرقان والحبس وانتفاخ وتدلي البطن، وعند جس البطن يلاحظ تضخم الكبد، وينتهي المرض بالموت (Połozowski, 1993; Soulsby, 1986).

تؤدي الإصابة الشديدة إلى فقدان مبكر للأرناب، كما تكون الأرناب المصابة بالأميرية معرضة للإصابة بأمراض أخرى، كما تؤدي إلى انخفاض معنوي في كل من معدّل الزيادة الوزنيّة واستقلاب الفيتامينات الذوّابة بالدهون، وهضم الدّهون وإنتاج الطّاقة (Ringler and Newcomer, 2014). يحدث الإسهال والهزال وخشونة الشعر بسبب إصابة الأمعاء بالبداية وذلك قبل نفوذ الحيوانات البوغية (sporozoites) إلى الغشاء المخاطيّ للأمعاء الدقيقة ومرورها عبر النظام البابي الكبدي إلى القنوات الصفراوية في الكبد لبدء الشكل الكبديّ (Al-Naimi et al., 2012).

9- الإمراضية Pathogenesis:

ترتبط الإمراضية بنوع وفوعة طفيلي الأميرية، وقدرته على التكاثر، وعدد أجيال المتقسمات، وتعدّ مرحلة التكاثر اللاجنسي (تكوين المتقسمات) هي المسؤولة الرئيسة عن إحداث التغيرات المرضية في الأنسجة المصابة. يؤدي التكاثر اللاجنسي المتكرر إلى حدوث تلف وتخرب الخلايا الظهارية المصابة، وتسبب الأنواع التي تتطور في الطبقة تحت الظهارية أضراراً أكبر من الأنواع المتطفلة في الخلايا الظهارية. فضلاً عن ذلك تساهم عوامل أخرى في إحداث الإمراضية، مثل عدد البيوض المتكيسة المتبوغة التي يتناولها الثوي، وعمر الثوي، وحالته الصحية، والمناعة، والإصابة بالكائنات الحية الدقيقة الممرضة الأخرى (Tabarés et al., 2004).

تكون كل من الآفات العيانية والمجهريّة واضحة المعالم محددة بشكل جيد، فالكبد هو العضو المتضرر الأكبر من هذا الطفيلي، فيلاحظ وجود عقيدات بيضاء متعددة البؤر على سطحه التي يتراوح حجمها بين 0.1-2 سم (Schoeb et al., 2007). كما يمكن مشاهدة تضخم الكبد والمرارة والقنوات الصفراوية عند تشريح الأرناب (Pritt et al., 2012)، ولوحظ وجود نضح مخاطي أخضر داكن داخل لمعة الأمعاء (Wang and Tsai, 1991)، يؤدي فرط التنسج والتضخم الكيسي لظاهرة القنوات الصفراوية إلى ظهور العقيدات البيضاء على سطح الكبد (Ringler and Newcomer, 2014).



الشكل (5): كبد أرنب مصاب بالأميرية السنتيدايوية (Taylor et al., 2015)

ويمكن البرهان على وجود الطفيلي بمراحل متعددة من دورة حياته من خلال ظهور البيوض المتكيسة في لمعة القناة الصفراوية واجراء مقاطع نسيجية تُظهر ارتشاح الخلايا الالتهابية (الخلايا البلازمية مع امكانية وجود الخلايا البالعة والعدلة) حول القناة، ويمكن أن يؤدي تضخم القناة الصفراوية إلى تمزق وتورم حبيبي وتليف، هذا التليف يزداد مع تكرار الإصابة (Ringler and Newcomer, 2014; Schoeb et al., 2007)، وعادة لا تتأثر الأعضاء الأخرى بالأميرية السنتيدايوية إلا أنه من الممكن أن تمهد لإصابتها بأخماج جرثومية ثانوية (Pritt et al., 2012). تؤدي هجرة البيوض المتكيسة عبر الاثنا عشري إلى الكبد عن طريق المجرى الدموي أو اللمفاوي وخمجها لخلايا ظهارة القنوات الصفراوية إلى تفاعلات التهابية مترافقة مع يرقان انسدادى لطرح البيوض المتكيسة في القنوات الصفراوية مؤديا لظهور الأعراض المرضية (Omata et al., 2001).

ووفقاً للإمراضيه والأنواع المسؤولة عن داء الأكرية تم تصنيف الأيمريات إلى أربعة أنواع:

- ذات إمراضيه ضعيفة: مثل (*E. Vejdoveeskyi*، *E. Perforans*، *E. Exigua*).
- ذات إمراضيه متوسطة: مثل (*E. Irresidua*)، (*E. Media*).
- ذات إمراضيه شديدة: مثل (*E. Flavescens*)، (*E. Intestinalis*).
- ممرضة تبعاً لجرعة العدوى: وتضم (*E. Stiedae*)، وتعتبر هذه الصفة مميزة للأميرية السنتيدايوية عن الأنواع الأخرى للأيمريات والتي تتطفل في الأمعاء (Coudert et al., 1995; Taylor et al., 2007).

10- التغيرات التشريحية المرضية Pathological changes:

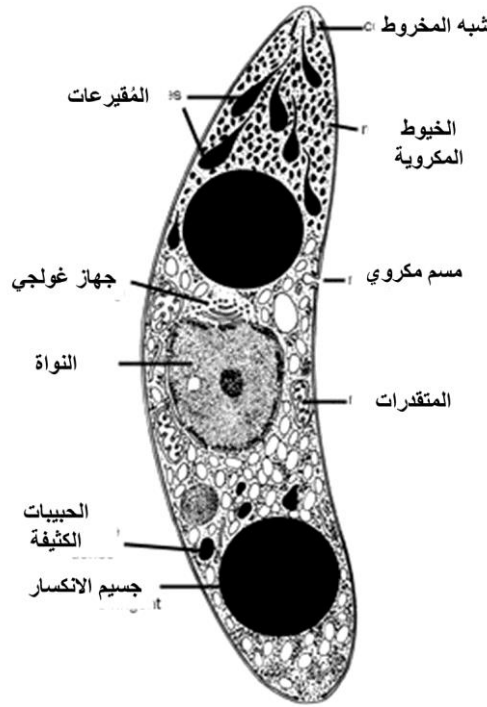
أ- التغيرات العيانية Macroscopic changes: أشارت العديد من الدراسات إلى أن التغيرات المرضية الناتجة عن الإصابة بالأميرية السُتيدَاوِيَّة عند الأرنب تتركز في الكبد والأمعاء، وتتجلى بحدوث انتفاخ في الأمعاء الدقيقة وامتلائها بمواد خضراء رمادية شبه صلبة، بالإضافة إلى احتواء القولون أعلافاً غير مهضومة. أما في الكبد تتمثل التغيرات المرضية بوجود عقيدات بيضاء مصفرة ذات قطر 1-3 مم منتشرة في متن الكبد ومرتفعة عن سطح النسيج السليم المجاور، إضافة إلى احتقان شديد في نسيج الكبد السليم المحيط بهذه العقيدات، وكذلك يحدث تضخم في القناة الصفراوية (Al-Rukibat et al., 2001). وفي دراسة مماثلة أجريت على الأيمرية السُتيدَاوِيَّة وبعد إجراء الصفة التشريحية شوهد تضخم الكبد، ووجود عقيدات صفراء مختلفة الأشكال والأحجام على سطح الكبد تحتوي بداخلها البيوض المتكيسة ضمن مواد دهنية، بالإضافة إلى توسع وتضخم القنوات الصفراوية (Gomez-Bautista et al., 1987).

ب- التغيرات المجهرية Microscopic changes:

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

11- اجتياح الطفيلي لخلايا الثوي :Invasion of host cells

تمتاز الأشكال المتحركة لمعقدات القمة لجميع أنواع الأيمرية بقابليتها على مهاجمة واختراق خلايا الثوي، يتميز الحيوان البوغي بأنه متحرك وله القابلية على غزو الأنسجة، وتركيبه الدقيق مكوّن من جليدة pellicle وشبه مخروط Conoid والحلقة القطبية Polar ring والمُقيِّرات Rhoptries والخيوط المَكروية Micronemes والحبيبات الكثيفة Dense granule، وأشارت دراسة (Dubremetz et al., 1998) إلى أهمية هذه الأجزاء (المُقيِّرات والخيوط المَكروية والحبيبات الكثيفة) المتواجدة بكل الأشكال المتحركة لطفيليات معقدة القمة، في عملية مهاجمة وغزو خلايا الثوي. وتقوم بهذه العملية بواسطة المعقد القمي (شبه المخروط conoid والحلقة القطبية polar ring والمُقيِّرات rhoptries والخيوط المَكروية micronemes والحبيبات الكثيفة dense granule) (Carruthers and Sibley, 1997).

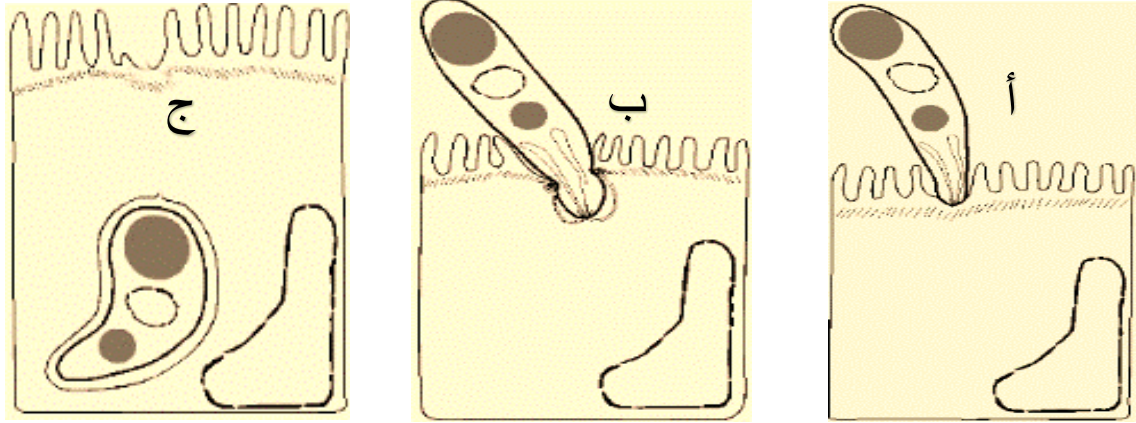


الشكل (6): البنية الشكلية للحيوان البوغي

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

تغزو هذه الأشكال المتحركة خلايا الثوي بنشاط ولا يوجد دور للثوي بهذه العملية (Sibley et al., 1998). وبعد التعرف الأولي بين الأشكال المتحركة وخلايا الثوي تبدأ عملية الاختراق عن طريق الاتصال بين قمة الأشكال المتحركة وسطح الخلية، ويبدأ بالتحرك إلى داخل الفجوة الطفيلية Parasitophorous vacuole (PV) النامية، والمرحلة الأخيرة يكون داخل الخلية محاط بفجوة (PV) (الشكل 8-ج) حيث

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



الشكل (7) آلية دخول الحيوان البوغي إلى خلايا المضيف (الإدريس، 2014)

أ-التصاق الحيوان البوغي بالخلايا الظهارية للأمعاء
ب-تلاشي هيكل الخلية وبداية تكون جيب سيتوبلازمي لتكوين (PV)
ج-دخول الحيوان البوغي داخل خلية المضيف ضمن (PV)

تهاجم الأشكال المتحركة لأنواع الأيمرية خلايا معينة يحتوي غشاؤها على سطح خاص يسهل عملية الالتصاق والدخول داخل خلية الثديي (Lillehoj and Trout, 1996)، ويفضل الطفيلي اختيار الخلايا التي تسمح له بالتكاثر والبقاء بشكل مثالي. فيلاحظ امتلاك الحيوان البوغي للأوالي ثملات غالاكتوز- D-galactose على سطحه، وتمتلك خلايا الثديي مستقبلات خاصة للتعرف على هذه الكربوهيدرات، ويؤدي التآزر بين هذه الثملات ومستقبلاتها إلى الارتباط بسطح الخلايا ثم دخول الطفيلي إلى خلية الثديي (Baba et al., 1996). تحمل الأقسومات والعرسيات الصغيرة جزيئات شبيهة بالفبرونيكتين like-fibronectin التي تساهم في عملية التعرف والاختراق لخلايا الثديي، وتمتلك الأقسومات مستقبلات للإنترين integrin والتي قد تلعب دوراً في التآزر بين الطفيلي وخلايا الثديي (Lopez-Bernad et al., 1996).

12- التغيرات البيوكيميائية في مصل الدم:

من أبرز التغيرات البيوكيميائية المرافقة للمرض هي ازدياد نشاط الإنزيمات (ALT, AST, ALP) من أبرز التغيرات البيوكيميائية المرافقة للمرض هي ازدياد نشاط الإنزيمات (ALT, AST, ALP) و GGT في مصل الدم (Joyner et al., 1983)، ويُعزى سبب ارتفاع نشاط الإنزيمين (ALT, AST) إلى الأذية التي يحدثها الطفيلي في الخلايا الكبدية، كما

يعودُ سببُ ارتفاع نشاط الإنزيمين (ALP، GGT) إلى الركود الصفراويّ الحاصل في القنوات الصفراوية (Hanada et al., 2003; Sanyal and Sharma, 1990).

يُرمز لإنزيم الأسبارتات الناقل لزمرة الأمين بـ (AST،GOT) Glutamic Oxaloacetic Transaminase، ولإنزيم الألانين الناقل لزمرة الأمين بـ (ALT،GPT) Glutamic Pyruvic Transaminase، ويعمل هذان الإنزيمان على نقل مجموعة الأمين من الأحماض الأمينية إلى الأحماض الكيتونية وبالعكس. يتواجد هذان الإنزيمان بشكلٍ رئيسيٍّ في سيتوبلازم الخلايا الكبدية (Sparkes and Gruffydd-Jones, 1993)، ويتواجد إنزيم (AST) أيضاً في القلب والعضلات الهيكلية والكليتين والطحال وخلايا الدم، ويوجد في أعضاءٍ متعددةٍ من الجسم كنتاجٍ لتحفيز نقل مجموعة الأمين (Lehninger, 1975)، ويتميّز نصفُ عمر إنزيم (ALT) عند الأرناب بأنه قصيرٌ جداً (5 ساعاتٍ فقط) وذلك عند مقارنته مع الكلاب (45-60 ساعة) (Meredith and Rayment, 2000)، تُطلق الإنزيمات الكبدية عادةً في الدوران بسبب تلف خلايا الكبد المتشكّل من النخر أو ضرر الأغشية الخلوية الكبدية، وبالتالي يعدّ قياس هذه الإنزيمات في مصلِ الدّم مؤشراً للحالة الصحية للكبد، يرتبط ارتفاع نشاط إنزيمات (ALT، AST) المتواجدة في الهيولى عادةً والتي تحدث بعد إعطاء الأدوية السامة للكبد، مع التحرر الزائد للإنزيمات من خلايا الكبد التالفة. ومن المعروف أنّ زيادة نشاط الإنزيمين ALT و AST في مصلِ الدّم يعكس بشكلٍ مباشرٍ نفاذيةً خطيرةً أو تمزقاً خلويًا (Jin et al., 2012; Kim et al., 2009). غالباً ما تترافق الزيادة في ناقلات الأمين مع الأمراض الكبدية مثل تسمّم الكبد والتهاب الكبد ونخر الكبد الحادّ وتشمّع الكبد، وغالباً ما تظهر الزيادة في نشاط الإنزيم AST في فقر الدّم الانحلاليّ، واحتشاء عضلة القلب واعتلال الكبد الصفراويّ (Mayne, 1996). ويعدّ قياس نشاط الإنزيمات مؤشراً يسمح بتحديد درجة الآفات النسيجية أو الخلوية، إذ يؤدي فقدان سلامة الأغشية الخلوية إلى خروج الإنزيمات إلى الوسط الخارج خلويّ (Silva et al., 2007).

يتمّ تكوينُ الإنزيم (ALT) في خلايا الكبد فقط، لذلك تعتبر زيادته مؤشراً هاماً لأذية الخلايا الكبدية، في حين يتكوّن الإنزيم (AST) في خلايا الكبد والقلب والعضلات، ويزدادُ نشاطه عند أذية الكبد أو القلب أو العضلات الهيكلية (Hillyer and Quesenberry, 1997). لذلك يعدّ الإنزيم الكبدية ALT أكثر نوعيةً من الإنزيم AST في تشخيص الأذية الكبدية (Harper, 1973).

- إنزيم الفوسفاتاز القلوية (ALP) Alkaline Phosphatase: هو إنزيم يحفز تميّه أملاح أسترات الفوسفات في الوسط القلويّ، وتوجد نسبةً كبيرةً منه في مصلِ الدم ويأتي من النسيجين العظمي والكبدية،

ومن الكلية والأمعاء والمشيمة والكريات البيض (McComb et al., 1979)، وهناك وظائف عدة له، فهو يسهم في عملية تكون العظام، وأية زيادة في مستوى إنزيم ALP في بلازما الدم تعكس الزيادة في مستواه في الهيكل العظمي والأمعاء والكلية، إذ تزداد نسبته بشكل واضح في أثناء النمو، أما في الأنسجة التي لا يحدث فيها تعظم؛ فوظيفته تتحدد في عملية انتقال المواد الغذائية عبر الأغشية الظهارية الطلائية، وذلك بسبب تمركز الإنزيم على السطح الامتصاصي للأمعاء الدقيقة (Glickman et al., 1970)، كما أن له دوراً مهماً في نقل الكالسيوم والفوسفور من الدم إلى العظم وبالعكس (الحسني، 2000)، ويسهم في تفكيك الروابط الفوسفاتية وهي عملية مهمة لإنتاج الطاقة (الهالي وزملاؤه، 2000). يأتي القسم الأكبر من هذا الإنزيم في بلازما الدم من النسيج العظمي والكبد، وتترافق الزيادة في نشاط هذا الإنزيم مع زيادة عنصر الكالسيوم في مصل الدم، فقد أكد (Whitehead et al., 1990) وجود ارتباط معنوي بين تركيز الكالسيوم وإنزيم ALP في مصل الدم، بينما اقترحت بعض الدراسات أن زيادته ناتجة عن أذية الخلايا الكبدية والتليف الكبد، وخلل في عمل القناة الصفراوية (Panda et al., 2006).

تؤدي الآفات في نسيج الكبد التي تسببها الأيضية السيتداوية إلى اضطراب وظائف الكبد، مما يؤدي إلى نقصان في البروتين الشحمي ألفا، والجلوكوز والبروتينات، بالإضافة إلى زيادة تركيز البليروبين في مصل الدم (Al-Mathal, 2008). كذلك لوحظ ارتفاع مستوى الغلوبولين والبروتين الكلي بينما ينخفض مستوى ألبومين الدم في حالة الإصابة بالأيضية السيتداوية (Gomez-Bautista et al., 1986). وقد أكد الباحث (Lineburg, 1987) عند إجرائه لخمج تجريبي بالأيضية السيتداوية حدوث تغيرات في بروتينات مصل الدم (زيادة في ألفا وبيتا غلوبولين)، بينما بقي مستوى البروتين الكلي والجلوكوز في مصل دم الأرانب المصابة دون تغيير تقريباً.

أكد (Çam et al., 2008) في دراسته للإصابة التجريبية بالأيضية السيتداوية عند الأرانب حدوث تغيرات في بعض المعايير البيوكيميائية في مصل الدم في اليوم 24 بعد الخمج التجريبي والتي شملت:

- ارتفاع نشاط الإنزيم (AST) إلى (134.81) IU/L بالمقارنة مع الشاهد السليبي (36.31) IU/L.
- ارتفاع نشاط الإنزيم (ALT) إلى (121.73) IU/L بالمقارنة مع الشاهد (39.22) IU/L.
- ارتفاع غير معنوي في نشاط الإنزيم (ALP) إلى (415.01) IU/L بالمقارنة مع الشاهد (412.03) IU/L.

- انخفاض تركيز الألبومين إلى (28.83) g/dl بالمقارنة مع الشاهد (33.40) g/dl.
- ارتفاع في تركيز الغلوبولين إلى (30.48) g/dl بالمقارنة مع الشاهد (23.78) g/dl.

- ارتفاع بسيط غير معنوي في البروتين الكلي (59.30) g/dl مقارنة مع الشاهد (57.18) g/dl.
- كذلك حدث انخفاض في تركيز غلوكوزِ مصلِ الدم (88.83) مقارنة مع الشاهد (96.76) mg/dl.

13- الاستجابة المناعية Immune response:

تتأثر الاستجابة المناعية بعوامل تتعلق بالثوي، كتركيبه الوراثي وعمره ومدى استجابته للعامل الممرض، وعوامل تتعلق بالطيفي كنوعه ومرحلة تطوره فضلاً عن عدد الطفيليات في جرعة التلقيح أو الإصابة (Rose, 1987). تتنوع الاستجابة المناعية لطيفي الأيمرية بسبب دورة حياته المعقدة التي تتضمن أشكال داخل خلوية وخارج خلوية وأطوار جنسية ولاجنسية (Lillehoj et al., 2004)، وتعد الحيوانات البوغية محفزاً جيداً للاستجابة المناعية نتيجة لاختراقها الخلايا الظهارية وتوضعها في الصفيحة الأساسية وهي الطبقة الغنية بالخلايا للمفاوية والشعيرات الدموية (Jeurissen et al., 1996).

تتصف أنواع الأيمرية بأنها طفيليات نوعية للثوي وللعضو وللخلية، ويتشكل عندها مناعة مكتسبة بعد تعرضها لخمج متكرر بأعداد قليلة من البيوض المتكيسة المتبوعة، وتكون هذه المناعة خلوية بشكل أساسي مع وجود استجابة مناعية خلطية محدودة، وهي متخصصة لنوع الأيمرية التي أدت الى تشكلها، ويمكن أن تلاحظ مناعة تصالبية ضعيفة بين الأنواع، بينما تكون متطابقة تقريباً تجاه ذراري النوع الواحد مع وجود بعض الاختلافات (Dalloul and Lillehoj, 2006; Peek and Landman, 2011).

تلعب الاستجابة المناعية الموضعية في الأمعاء دوراً هاماً في المناعة تجاه الإصابة بداء الأكريات بصورة أكثر فعالية من الاستجابة المناعية الجهازية عند الأرانب، وتشمل الأنسجة للمفاوية المعوية كل من الزائدة الدودية Appendix، والكيس المستدير Rotundus Sacculus (SR)، لطح باير Peyer's patches (PP)، والكريات البيضاء في الصفيحة المخصصة للأمعاء lamina propria leukocytes. تلعب الزائدة الدودية والتي تحتوي على اللمفاويات البائية والأضداد دوراً هاماً في عمل المناعة الجهازية عند الأرانب، ويختلف الجهاز المناعي لدى الأرانب عن الثدييات الأخرى من حيث البنية والوظيفة (Mage, 1998)، ولذلك تعتبر الزائدة الدودية بمثابة نسيج لمفاوي Lymphoid tissue (Sehgal et al., 1998). ويعتبر الكيس المستدير مكون آخر من الأنسجة للمفاوية المتعلقة بالأمعاء عند الأرانب ويقع في نهاية الأمعاء الدقيقة وعند مدخل الأعور، وهو يماثل ويشابه الزائدة الدودية من حيث البنية، وتعتبر معظم الأعضاء للمفاوية عند الأرانب متشابهة من حيث المنشأ الجنيني والتطور (Mage, 1998). بالرغم من أن رد الفعل المناعي الناتج عن الإصابة بداء الأكريات عند الأرانب لم يُدرس

على نطاق واسع باستخدام التقنيات المناعية، إلا أن بعض الدراسات استُخدمت مؤشر طرح البيوض المتكيسة بعد الإصابة بالأميريات كمعيار يمكن الاعتماد عليه (Comporti, 1993).

في دراسة أجريت حول الأميريّات المعويّة *E. intestinalis*، أدت الإصابة بها إلى رد فعل مناعي كبير، حيث أظهرت الدراسة بأن تلقيح الأرانب بست بيوض متكيسة أدى إلى خفض إطراح البيوض المتكيسة مع البراز بنسبة 60% بعد خمج جديد، وفي تجربة أخرى تضمنت تلقيح الأرانب بحوالي 600 بيضة متكيسة أو أكثر، أدى إلى توقف طرح البيوض المتكيسة مع البراز تماماً بعد خمج جديد آخر (Comporti, 1993). وفي دراسة تجريبية وُجِدَ بأنّ رد الفعل المناعي الناتج عن الإصابة بالنوع *E. flavescens* والنوع *E. piriformes* على التوالي كان ضعيفاً، وذلك اعتماداً على عدد البيوض المتكيسة المطروحة مع البراز بعد إحداث العدوى التجريبية عند الأرانب (Norton et al., 1979). وفي دراسات تجريبية أخرى قام بها (Duszyński et al., 2010)، على كل من الأنواع *E. magna*، *E. media*، *E. irresidua* على التوالي، أثبتوا من خلال دراساتهم بأنّ هذه الأنواع متوسطة الاستجابة المناعيّة.

أظهرت بعض الدراسات التجريبية التي تم فيها تحصين الأرانب باستخدام لقاح من البيوض المتكيسة المتبوعة بالصواتة للأميرية السيتداوية أنها حمت من ظهور الأعراض مع فروق معنوية واضحة في اطراح البيوض المتكيسة بالمقارنة مع الأرانب غير الملقحة (Al-Tae and Salih, 2014; Al-Tae and Al-Zubaidi, 2017)، كما أكدت العديد من الدراسات التي توصلت لاستنتاجات مماثلة ضد الأميرية تنيلا عند الدجاج (Akhtar et al., 1998). حيث أظهرت نتائج هذه الدراسات حدوث انخفاض كبير في أعداد البيوض المتكيسة المطروحة مع البراز بعد تحصين الأرانب بلقاح محضر من البيوض المتكيسة الصوّاتة (المعرضة للأمواج فائقة الصوت)، حيث سجل إطراح البيوض المتكيسة في اليوم 17 بعد جرعة التحدي بمتوسط 310 بيضة متكيسة/غرام براز حيث ازداد تدريجياً ليبلغ قمة الاطراح في اليوم 26 بعد جرعة التحدي بمتوسط 5137 لينخفض في اليوم 56 بمتوسط 116 بيضة متكيسة /غرام براز أما عند الأرانب غير الملقحة سجّل إطراح البيوض المتكيسة في اليوم 17 بعد جرعة التحدي بمتوسط 2296 بيضة/غرام براز حيث ازداد تدريجياً ليبلغ قمة الاطراح في اليوم 26 بعد جرعة التحدي بمتوسط 44658 لينخفض في اليوم 56 بمتوسط 32392 بيضة متكيسة /غرام براز (Al-Tae and Al-Zubaidi, 2017)، أما في دراسة على لقاح البيوض المتكيسة المتبوعة بالصواتة ضد أميريا الدجاج سجّل إطراح البيوض المتكيسة في اليوم 10 بعد جرعة التحدي بمتوسط 100-200 بيضة/غرام زرق حيث ازداد تدريجياً ليبلغ قمة الاطراح في اليوم 16 بعد جرعة التحدي بمتوسط 650-

900 لينخفض في اليوم 20 بمتوسط 200-400 بيضة متكيسة /غرام زرق، أما عند الدجاج غير الملحق سَجَل إطراح البيوض المتكيسة في اليوم 7 بعد جرعة التحدي بمتوسط 800000-900000 بيضة متكيسة/غرام زرق حيث ازداد تدريجياً ليبلغ قمة الاطراح في اليوم 16 بعد جرعة التحدي بمتوسط 1200000 لينخفض في اليوم 20 بمتوسط 900000 بيضة متكيسة /غرام (Bahrami and Bahrami, 2006). ويعتمد اللقاح الفعال على إعطاء الحيوان المستضد المناسب من حيث الخصائص، وخاصة طبيعته البروتينية والمناعية (Levinson, 2014)، حيث تتم صوتته البروتينات لجعلها أكثر ثباتيةً واستقراراً تجاه العوامل الخارجية (Stefani and Dobson, 2003)، ويجب أن تحتوي هذه البروتينات على حَوَاتِم مستضدية Epitope (تدعى أيضاً بالمحددات المستضدية؛ والحائِمة المستضدية هي جزء من المستضد الذي يرتبط بمستقبل المستضد النوعي على سطح الخلايا البائية B cell)، تحفز الاستجابة المناعية التي تحمي الأرناب من العدوى.

أشارت بعض الدراسات التجريبية التي اعتمدت على لقاح البيوض المتكيسة المتبوعة الصَوَاتَة بالمقارنة مع لقاح البيوض المتكيسة غير الصواتة إلى ارتفاع متوسط عيار الأضداد المقاس باختبار التراص الدموي اللامباشر Indirect haemagglutination test، حيث أظهرت دراسة (AL-Taee and AL-Zubaidi, 2017) على لقاح البيوض المتكيسة المتبوعة للأيمرية المتداوية ازدياد متوسط عيار الأضداد بعد 14 يوم من التلقيح وقمة الأضداد في اليوم 28 وحافظ على معدل جيد في اليوم 70. كما بينت دراسة تجريبية على اللقاح الصوات من البيوض المتكيسة المتبوعة من الأيمرية البقرية بالمقارنة مع اللقاح غير الصوات وجود فروق معنوية واضحة من خلال قياس عيار الأضداد باختبار IHA حيث سَجَل عيار الأضداد الأعلى (512) في اليوم 35 بمجموعة الدراسة الملقحة باللقاح الصوات أما عند مجموعة الدراسة باللقاح غير الصوات فقد بلغ (362) (Sultana et al., 2014). وفي دراسة أجراها (Bahrami and Bahrami, 2006) على لقاح صَوَات ضد أيمرية الدجاج (بيوض متكيسة متبوعة) أظهرت النتائج بأن اللقاح الصوات أعطى حماية بنسبة 100% بينما كانت النسبة 33% باللقاح غير الصوات، وتراوحت نسبة عيار الأضداد من 1:7 إلى 1:7012 في أمصال مجموعة الدراسة الملقحة باللقاح الصوات بينما تراوحت من 1:2 إلى 1:64 في أمصال مجموعة الدراسة الملقحة باللقاح غير الصوات. وأظهرت دراسة تجريبية أن اللقاحات المحضرة من بروتينات (البيوض المتكيسة المتبوعة، الحيوانات البوغية) والحيوانات البوغية المجمدة للأيمرية تنيلا لها القدرة على حماية الدجاج ضد الإصابة بداء الأكريات، بالإضافة إلى تناقص أعداد البيوض المتكيسة المطروحة لكل غرام من الزرق بمجموعات

الدراسة الملقحة ولا سيما بالفلاح البروتيني للحيوانات البوغية وانخفاض مؤشر مقدار عدد البيوض المتكيسة بالمقارنة مع المجموعة غير الملقحة (Al-Idreesi et al., 2013a).

ولقد عُرِفَ أن المناعة ضد الكائنات الحية الدقيقة الداخل خلوية بما فيها الأيمريات هي من نوع المناعة الخلوية Cellular immunity (Levinson, 2014)، ويمكن اعتبار المناعة الخلوية استجابة مناعية تكيفية (Pakandl, 2013)، وليس من السهل بمكان تقييم هذه الاستجابة، بينما يمكن قياس عيار الأضداد الناتجة عن الإصابة بالأيمريات، والتي يمكن أن تعطي مؤشراً عن الاستجابة المناعية، وبالتالي يمكن أن تغيد في تقييم فعالية اللقاحات.

عند الإصابة بداء الأكريّة تتشكل مناعة عند الثوي، وهذه المناعة تكون نوعية لنوع الأيمرية الذي يصيب هذا الثوي (Darzi et al., 2007)، وعند حدوث الإصابة بالأيمريات يتحفز كل من العامل (CD4+) للمفاويات التائية التي تعبر عن المستقبلة CD4+ (Lymphocytes which express CD4) receptor) والعامل (CD8+)، والمفاويات التائية (Sühwold et al., 2010)، بالإضافة إلى المناعة الخلوية التي تحفز إنتاج الانترفيرون غاما (Gamma – interferon (IFN- γ)) (Taubert et al., 2008). يعد إفراز غاما (IFN- γ) مقياساً لمقدار الاستجابة المناعية الخلوية التائية تجاه مستضدات الأكريات (Martin et al., 1994). ويعمل على إعاقة تطور الطفيلي في المراحل الأولى من الخمج (Jenkins et al., 1993).

أوضحت دراسات تجريبية في الزجاج أن الانترفيرون غاما يحفز البالعات الكبيرة والكريات البيضاء مُنغَايِرَةً الحُبَيْبَات (heterophilic leukocytes) على إنتاج الوسائط الأوكسجينية الفعالة التي تعمل على قتل الحيوان البوغي لطفيلي الأيمرية (Ovington et al., 1995). تشترك جميع أنواع الأيمريات بصفة واحدة وهي أن الاستجابة المناعية الخلوية لا تحمي من الخمج المتجدد بالأيمرية بشكل تام، وبالتالي فإن الخمج الأولي بالأيمرية لها دور هام في إحداث رد فعل التهابي يحمي الثوي (Darzi et al., 2007).

تتطور داخل جسم الثوي عند الإصابة بالأيمرية سلسلة معقدة من التفاعلات والتي تهدف إلى منع تخريب ونخر الأنسجة والقضاء على العامل المسبب، والعمل على بدء عملية ترميم للأنسجة وعودتها إلى وضعها الطبيعي (Baumann and Gauldie, 1994)، وخلال هذه المرحلة يتم إفراز بعض المواد الوسيطة من البلاعم النسيجية، وحيدات النوى، كالسيتوكينات، عامل نخر الورم Tumor necrosis factors (TNF)، والمحفزات IL-1 و IL-2 وهي المحفزات الرئيسية لتخليق بروتينات الدم في المرحلة الحادة (Bilate, 2007). يمكن تصنيف هذه البروتينات بأنها إما إيجابية (التي تزداد بوجود الالتهابات)

مثل السيروبلازمين Ceruloplasmin، ومولد الفبرين Fibrinogen وبروتين C التفاعلي C-reactive protein، ضد التريسين antitrypsin والهابتوغلوبين haptoglobin، أو بروتينات سلبية (التي لا تزداد بوجود الالتهابات) فتضم كل من ما قبل الألبومين (Pre- Albumin)، الألبومين Albumin والترانسفيرين Transferin (Kaneko et al., 2008).

تقتضى بعض الدراسات أن الأضداد تعيق تطور العرسيات gametocyte والزيجوت (البيوض المخصبة- اللاقحة) zygote الى طور البيضة المتكيسة، وقد يعود سبب ذلك الى تأثير الأضداد في بروتينات الجدار، و تصلب جدار البيوض المتكيسة (Wallach, 2010)، أو بسبب ارتباطها بمستقبلات سطحية موجودة على العرسيات الكبيرة macrogametocytes و من ثم منع نمو العرسيات أو تثبيط عملية اخصابها (Wallach et al., 1992). تقوم الأضداد بتأثيرات مختلفة على جميع أطوار الأيمرية كالتراص Agglutination، والتحلل lysis، ومعادلة Neutralization مستضدات الأطوار المختلفة، كما تؤدي الى حدوث تغيرات شكلية عندما تكون على تماس مع الطفيلي كما يمكن للخلايا المحببة (الحامضية ومُتغايِرة الحبيبات) بالاشتراك مع الضد IgG أن تقوم بدور في التخلص من الطفيلي (Ayaz et al., 2008).

أظهرت بعض الدراسات أن الحيوانات المصابة بالأيمرية السُتيدَاوِيَّة بعد إجراء التحاليل زيادة في عدد الكريات البيضاء وخاصة العدلات Neutrophilia ووحيدات النوى Monocytosis، وذلك في اليوم 28 بعد العدوى، ولوحظت زيادة بسيطة في أعداد كل من اللمفاويات lymphocyte، الحمضات Eosinophil والقعدات Basophil، طول فترة التجربة التي قام بها (Çam et al., 2008). ظهرت زيادة كبيرة في أعداد الكريات البيضاء وخاصة العدلات في الأيام 16-24 بعد العدوى، أما اللمفاويات فقد لوحظت بوضوح بعد اليوم 24 بعد العدوى، كما أظهرت الدراسة انخفاض كل من الهيماتوكريت وخضاب الدم بشكل واضح في اليوم 24 بعد العدوى (Çam et al., 2008).

14- البنية المستضدية للأطوار المختلفة لطفيلي الأيمرية Antigenic structure for Eimeria parasite:

تختلف المستضدات باختلاف الأطوار المتعددة التي يمر فيها طفيلي الأيمرية في دورة حياته:

أ- مستضدات الأطوار اللاجنسية A sexual stages antigens:

تعد الأطوار اللاجنسية الأكثر أهمية في تشكل المناعة ضد الأكریات وبالأخص طور الحيوان البوغوي (Brothers et al., 1988; Danforth and McAndrew, 1987). لذلك اهتمت عدة دراسات

بهذه الأطوار، إذ تم تحديد عدد من المستضدات السطحية لطور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمرية الرهيفة *E.tenella* باستخدام تقانة التبرصيم المناعي وكانت أوزانها الجزيئية (14-18 و 32-37 و 42-54 و 67-73 و 96-113) كيلو دالتون (Wisher, 1986). بينما أظهرت دراسة أخرى تسعة مستضدات غشائية لطور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمرية الرهيفة *E.tenella* وبلغت أوزانها الجزيئية (23 و 26 و 40 و 45 و 68 و 82 و 94 و 105 و 235) كيلو دالتون (Murray and Galuska, 1986). في حين كانت أهم المستضدات التي تم ملاحظتها خلال الدراسة التي أجراها (Al-Idreesi et al., 2013b) باستخدام تقنية التبرصيم المناعي على طفيلي الأيمرية الرهيفة هي: بروتينات الحيوانات البوغية (8 و 13 و 38 و 51 و 63) كيلو دالتون، بروتينات الحيوانات البوغية المجمدة (13 و 39 و 77) كيلو دالتون، بروتينات البويض المتكيسة (13.9 و 15 و 38.8 و 53 و 73.5 و 167.8) كيلو دالتون. في حين أوضحت دراسة أخرى دور بعض المستضدات الغشائية في اجتياح طفيلي الأيمرية الرهيفة للطبقة الظهارية للأعورين هما (37 و 45) كيلو دالتون (Augustine and Danforth, 1985). وباستخدام طريقة الترسيب المناعي للمستضدات الغشائية لطور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمرية الرهيفة، تبين وجود 5 من المستضدات ذات الأوزان الجزيئية (10 و 18 و 21 و 26 و 47) كيلو دالتون (Lillehoj and Trout, 1993). 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 التبرصيم المناعي تم تحديد 23 من المستضدات ذات القدرة الاستمناعية (Song et al., 2017). كما بينت نتائج الرحلان الكهربائي والتبرصيم المناعي للخلاصة البروتينية المحضرة من طور الحيوانات البوغية للأيمرية الستيداوية بطريقة الحلمة وجود ثلاث من العصائب تراوحت أوزانها الجزيئية (24.43 و 26 و 28.67) كيلو دالتون (الوهيب وزملاؤه، 2018).

وباستخدام طرائق أخرى لعزل المستضدات بطريقة التعليم بالأيودين المشع I¹²⁵-labeled وطريقة التعليم بالمثيونين methionine-labeled تم تسجيل عدد كبير من المستضدات في طفيلي الأيمرية اسيرفيولاينا والأيمرية الرهيفة إذ كان لكل نوع حدود 32-45 من مستضدات سطحية وداخلية وتتراوح أوزانها الجزيئية (9-350) كيلودالتون (Jenkins and Dame, 1987). وهناك مستضدات ذات أهمية كبيرة تقع في الاجسام النيرة refractile body للحيوان البوغي وتبلغ أوزانها الجزيئية (21-28) كيلو دالتون (Danforth and Augustine, 1989)، وتعد هذه المستضدات محفوظة بالأيمرية وتلعب دوراً

مهماً في التطور اللاجنسي للطفيلي (Augustine et al., 1988). كما بينت دراسة سابقة وجود مستضد مشترك بين أطوار الحياة المختلفة (الحيوان البوغي والأقسومة والبيوض المتكيسة الناضجة والكيسات بجميع مراحل نموها) لطفيلي الأيمرية الرهيفة وزنه الجزيئي 19 كيلو دالتون عند استخدامه اضداد دجاج ضد البروتين المأشوب للحيوان البوغي (sz-1) (Fetterer et al., 2004). بينما توصلت دراسة اخرى الى مستضد وزنه الجزيئي 22 كيلو دالتون لبروتينات الحيوان البوغي للأيمرية تنيلا بالتبصيم المناعي (Karkhanis et al., 1991).

أشارت إحدى الدراسات الى وجود مستضدات مشتركة بين طوري الحيوان البوغي والبيوض المتكيسة لطفيلي الأيمرية الرهيفة، وتراوحت أوزانها الجزيئية من 20 الى 30 كيلو دالتون (Karkhanis et al., 1991). اهتم العديد من الباحثين بدراسة مستضدات من أجزاء المعقد القمي للحيوان البوغي لطفيلي الأيمرية الرهيفة لأهميته في آليات غزو الطفيلي لخلايا الثدي، وتمتلك المقيرات rhoptries مستضدات معقدة، عرف منها ستة مستضدات أوزانها الجزيئية (118 و122 و124 و132 و180 و220) كيلو دالتون (Kawazoe et al., 1992)، وأشارت دراسة اخرى لوجود ثلاثة مستضدات في المقيرات rhoptries العائدة لطفيلي *E. nieschulzi*، أوزانها الجزيئية (63 و150 و200) كيلو دالتون (Dubremetz et al., 1998). ويحتوي الخيط المكروي microneme عند الحيوان البوغي للأيمرية الرهيفة على عدة مستضدات أوزانها الجزيئية (24 و54 و94 و96 و100 و110) كيلو دالتون (Kawazoe et al., 1992).

وبينت دراسة (McDonald et al., 1988) وجود أربعة مستضدات لطور أقسومات طفيلي الأيمرية الرهيفة تراوحت أوزانها الجزيئية (20-26 و61-71) كيلو دالتون، 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.

ب- مستضدات الأطوار الجنسية **Sexual stages antigens**:

اهتم عدد من الدراسات بتحديد دور مستضدات الأطوار الجنسية في تشكل المناعة تجاه طفيلي الأيمرية، وتبين أن أهم المستضدات عند طور العرسيات لطفيلي الأيمرية العظمى *Eimeria maxima* هي المستضدات ذات الوزن الجزيئي (56 و82) كيلو دالتون، التي تم تحديدها بعد الحضان مع امصال اخذت بعد 14 يوماً من الإصابة. بينما وجدت دراسة اخرى أجريت على طور العرسيات لطفيلي الأيمرية العظمى، بعد الحضان مع أمصال عزلت بمرحلة متأخرة من الإصابة، عدداً أكبر من المستضدات (35)

و52 و58 و73 و85) كيلو دالتون. وأوضحت هذه الدراسات أهمية هذه المستضدات للأطوار الجنسية وإمكانية استخدامها كلقاحات لتساهم في الحد من انتشار المرض (Mencher et al., 1989; Wallach et al., 1989).

بينت الدراسات المناعية التي أجريت على المستضدات الخاصة بطور البيوض المتكيسة لطفيلي الأيُمريَّة الرهيفَّة وجود عدد من المستضدات بلغت أوزانها الجزيئية (14 و20 و22 و45) كيلو دالتون (Talebi, 1995). بينما وجدت دراسة أخرى 7 مستضدات لبروتين البيوض المتكيسة للأيُمريَّة الرهيفَّة تفاعلت بقوة مع أمصال ممنعة بالحيوانات البوغية بالتبصيم المناعي بلغت أوزانها الجزيئية (26 و45 و64 و71 و94 و105 و235) كيلو دالتون وأظهرت هذه الدراسة أهمية المستضد البروتيني للبيوض المتكيسة بانخفاض عدد البيوض المتكيسة المطروحة وشدة الضرر الأعوري (Murray and Galuska, 1986). وبينت دراسة (الوهيب وزملاؤه، 2018) إحدى عشر عصابة تراوحت أوزانها الجزيئية بين (19.21 و130) كيلو دالتون وأكثر هذه العصابات تلوناً بصبغة أزرق الكومازي (57 و49.40 و28.67 و26 و24.43) كيلو دالتون وذلك في الخلاصة البروتينية الناتجة عن حلمة طور البيوض المتكيسة للأيمرية السيتداوية، 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 و28.67 و26 و24.43) كيلو دالتون باستخدام مصل الأرناب المجموع في اليوم 24 بعد الخمج وتحضينها مع البروتينات الناتجة عن حلمة طور البيوض المتكيسة، كما توصلوا إلى استنتاج وجود مستضدات مشتركة بين الطورين (البيوض المتكيسة والحيوانات البوغية) وهي المستضدات ذات الأوزان الجزيئية التالية: (24.43 و26 و28.67).

15- جرعة الخمج التجريبي:

حددت جرعة الخمج للأرناب من البيوض المتكيسة للأيمرية السيتداوية اللازمة لإحداث المرض تجريبياً في دراسات سابقة، ولكنها لم تكن متماثلةً، وقد وجد الباحثان (Barriga and Arnoni, 1979) أنَّ شدة الإصابة تتعلّق بعدد البيوض المتكيسة في جرعة التحدي، حيث أدى إعطاء 50 ألف بيضة متكيسة للأرناب الواحد كجرعة تحدي إلى إصابة شديدة ونسبة نفوق عالية وصلت إلى 80% في اليوم 50 بعد الخمج التجريبي، وإنَّ إعطاء 40 ألف بيضة متكيسة للأرناب الواحد تؤدي إلى إصابة أقل شدة من السابقة وبلغت نسبة النفوق 40% في اليوم 50 بعد الخمج التجريبي، بينما كانت نسبة النفوق 0% عند إعطاء 20 ألف بيضة متكيسة كجرعة تحدي مع حدوث إصابة خفيفة.

كما أكد الباحثان (Percy and Barthold, 2013) ارتفاع شدة الإصابة ونسبة النفوق في الأرناب الصغيرة المخموجة تجريبياً بالأيمرية السنتيدأوية مع ازدياد جرعة الخمج التجريبي، حيث بلغت نسبة النفوق (80%) عند إعطاء (100000) بيضة متكيّسة للأرناب. من ناحية أخرى وجد كل من (Abu-El-Ezz et al., 2012; Balbaa et al., 2012) أن إعطاء (50000) بيضة متكيّسة متبوعة للأرناب كافية لإحداث المرض، في حين وجد (Abed and Yakoob, 2013) أن إعطاء (40000) بيضة متكيّسة متبوعة للأرناب تكفي لإحداث المرض، وفي أحدث دراسة للخمج التجريبي بالأيمرية السنتيدأوية أجريت من قبل (Ali, 2015)، تم إعطاء (10000) بيضة متكيّسة متبوعة للأرناب لإحداث الخمج التجريبي.

16- عدد الكيسات البيضوية المطروحة في الغرام الواحد من الزرق (O.P.G.) كمؤشر لتقييم شدة الإصابة:

تستعمل طريقة تعداد البيوض المتكيّسة المطروحة في الغرام الواحد من البراز في التجارب والدراسات التي تهدف إلى تقييم فعالية اللقاحات ومضادات الأكريات، ويعطي هذا المعيار قياسات دقيقة حول شدة الإصابة الحاصلة وتطورها في اليوم الذي تجمع فيه عينات البراز. يستفاد من الـ (O.P.G.) أيضاً في معرفة نسبة الحماية percent protection التي يوفرها لقاح أو دواء يتم اختباره أو دراسته (Williams and Catchpole, 2000).

17- الوقاية والعلاج Prevention and treatment:

تُعتبر الأيمرية السنتيدأوية من مسببات الأمراض الفتاكة لدى الأرناب، والتي تؤدي إلى ارتفاع معدل الإصابة والنفوق (Kvičerová et al., 2008). تعتمد السيطرة على داء الأكرية على تحسين الإجراءات الصحية، بالإضافة لعلاج الحيوانات المصابة، والوقاية الكيميائية باستخدام بعض مضادات الأكريات (Ruiz et al., 2006). هناك العديد من الإجراءات الوقائية التي يجب أخذها بعين الاعتبار للحد من تفشي داء الأكرية، حيث أن انخفاض مستوى النظافة، ارتفاع الرطوبة، ارتفاع نسبة الأمونيا وغاز ثاني أكسيد الكربون كل هذا يؤدي إلى ارتفاع معدل تبوغ البيوض المتكيّسة للأيمرية السنتيدأوية، وبالتالي زيادة الأطوار المُعدية للطفيلي (Smith and Sherman, 2009)، لذلك يجب الحفاظ على بيئة نظيفة للحيوان، وتقليل كثافة التربية، وتقديم الأعلاف والمياه النظيفة، مما يقلل من نسبة العدوى عن طريق ابتلاع البيوض المتكيّسة المتبوعة (Lima, 2004). إن البيوض المتكيّسة مقاومة للعوامل البيئية الخارجية، وتزداد مقاومتها بعد حدوث التبوغ (Smith and Sherman, 2009)، لكنها يمكن أن تضعف وتقل أعدادها بتأثير الجفاف،

أشعة الشمس، الحرارة وبعض المطهرات ذات التراكيز العالية مثل هيبوكلوريد الصوديوم أو الكريسلول (Lima, 2004).

ترتكز القاعدة الأساسية لآليات تأثير مضادات الأكريات على الاختلافات الجوهرية في مسالك الأيض Metabolism بين طفيلي الأيمرية وخلايا الثوي (Shane, 2005). واعتمدت أولى العلاجات (قبل عام 1936) على استخدام الفحم الحيواني وسلفات المغنيزيوم والخل وزيت الخروع كمضاد للأكريات (Horton-Smith and Long, 1959)، وفي عام 1936 لوحظ أن الكبريت Sulphur كان فعالاً في خفض شدة الإصابة بداء الأكريات والحد من تكون الآفات المرضية شريطة أن يعطى قبل حصول الإصابة. وتعتبر الأدوية الوقائية والعلاجية ضد داء الأكريات أهم وأقدم طرائق السيطرة على هذا المرض الطفيلي، التي مازالت تستخدم إلى يومنا هذا، وذلك من خلال إما إضافتها إلى العلف بصورة مستمرة أو إضافتها إلى الماء خلال فترة زمنية محددة (Adams, 2001).

أ- التحكم المناعي بداء الأكريات IMMUNOLOGICAL CONTROL:

لا توجد لقاحات حتى الآن لحماية الأرانب من الأكريات، ولكن العمل التجريبي في العديد من الحيوانات الأخرى (الماشية والدواجن) يُظهر أنه يمكن تحصينها بجرعات منخفضة من البيوض المتكيسة الحية أو المؤهنة Attenuated أو كَيْسَات الأَبْوَاغ Sporocysts. في الواقع، تلعب المناعة عادة دوراً رئيساً في السيطرة على داء الأكريات، وقد يحفز عدد قليل من البيوض المتكيسة تشكيل مناعة قوية، على سبيل المثال، تلقيح الدجاج بالبيوض المتكيسة من الأيمرية العُظْمَى لأيام متتابعة لفترة أسبوع واحد تعطي مناعة أقوى بعدة مرات من تلك الملقحة بجرعة واحدة من البيوض المتكيسة (Reid, 1975).

تتوسع الأبحاث الحالية حول تطوير المكافحة الاتقائية المناعية لأنواع الأيمرية في الأرانب بصورة عامة عن تلك التي يتم إجراؤها على أنواع الأكريات الأخرى، وخاصة في الدجاج. اللقاحات الحاوية على ذراري مُفَوَّعة virulent strains من أنواع الأيمرية هي لقاحات بالفعل يتم استخدامها ضد داء الأكريات في الدجاج على سبيل المثال لقاحات (Immucox ، Coccivac) هذه الأنواع هي لقاحات حية مُتَعَدِّدَة النِّكَافُؤ. على الرغم من أنها توفر حماية فعالة، إلا أنها تقود لخطر إثارة أعراض أو تفشي المرض. لقاح آخر حديث للدجاج (Paracox) يُستخدم فيه ذُرِّيَّة مُبَكَّرَة precocious strain حيث يتم اتباع نهج مماثل في تطوير لقاح حي مُوَهَّن باستخدام ذراري مُبَكَّرَة لأنواع الأيمرية التي تتطفل على الأرانب التجارية (Akpo et al., 2012). تعتبر هذه الذراري مُسْتَمَنَعَة بقوة وتسبب تغيرات مرضية قليلة جداً لأنها تمر بدورة أو دورتين من الأطوار التقسيمية للتكاثر أقل من ذراري النَمَطُ البَرِّي. لا يؤدي استخدام هذه اللقاحات

إلى مناعة عقيمة، ولكنها تقل بشكل كبير من التغيرات المرضية والمَرَض (Duszynski and Couch, 2013). على سبيل المثال استخدم (Akpo et al., 2012) أرانب عمرها 35 يوماً تم تحصينها بمزيج من الذراري المبكرة من *E. magna* و *E. media* ، وبعد 3 أسابيع من تلقيح التحدي، لم يتم تسجيل حالة إسهال في مجموعة الأرانب الملقحة مقابل مجموعة الأرانب غير الملقحة التي أصيبت بالإسهال. بالإضافة إلى ذلك، كانت أعداد البيوض المتكيسة المطروحة من الأرانب الملقحة أقل بشكل ملحوظ من أعداد البيوض المتكيسة المطروحة في مجموعة الحيوانات الشاهد، مما يؤكد التحفيز المناعي الجيد بواسطة الذراري المبكرة. قد تكون الذراري الموهنة المبكرة من الأيمرية مفيدة كلقاحات لعدة سنوات قادمة، ولكن على المدى الطويل، يبدو لقاح الوحيدات التي تنتجها تقنية الدنا المأشوب Recombinant DNA أكثر فعالية مع استمرار محاولات تطوير لقاحات مأشوبة ضد أكريات الدواجن. من المحتمل أن تتكون اللقاحات إما من مستضدات أكريات مُنقاة تم الحصول عليها من كائن دقيق مأشوب مناسب و مخصص للحقن، أو بدلاً من ذلك كائنات حية دقيقة أثناء عملية التسخن المتماثل، ستقوم بتخليق وإطلاق مستضدات الأكريات داخل النويّ (Bhat et al., 1996; Ellis and Tomley, 1991). مازال تطوير لقاح الوحيدات المعدل وراثياً باستخدام البروتين المأشوب للائقاء المناعي من أكريات الأرانب في أطواره التمهيدية باستخدام البروتين المأشوب للائقاء المناعي من أكريات الأرانب في أطواره التمهيدية (Duszynski and Couch, 2013).

ب- أدوية داء الأكريات المعوية والكبدية:

وُجد أن بعض السلفوناميدات **sulfonamides** مفيدة في الوقاية من داء الأكريات إذا تم إعطاؤها باستمرار في العلف أو مياه الشرب. وتضم سلفاديازين **sulfadiazine**، سلفاميرازين **sulfamerazine**، سلفاميثازين **sulfamethazine**، سلفاكوينوكسالين **sulfaquinoxaline**، وسكسينيل سلفاثيازول **succinylsulfathiazole** (Levine, 1973).

يستخدم هيدروكلوريد روبينيدين **Robenidine hydrochloride** بشكل منهجي إلى حد ما في العديد من البلدان، فهو فعال في مكافحة داء الأكريات عند الأرانب (Coudert and Provot, 1988). تستخدم بعض المضادات الحيوية حاملة الأيون الآن على نطاق واسع كمضادات للأكريات في صناعة الدواجن، ولكن ثبت أن معظمها سام للأرانب. كان (Coudert and Provot, 1988) من بين الأوائل الذين درسوا لآزالوسيد **Lasalocid** (حامل الأيون) في الأرانب لتحديد مستوى سميته وفعاليتها في الوقاية من عدوى أنواع الأيمرية في الأرانب. اعتمدوا على زيادة الوزن اليومية كعامل سام لهم وذكروا أن اللازالوسيد كان له تأثير كابح للنمو اختفى بعد أسبوعين بأقل جرعة تم تناولها (25 ppm)، لكنه استمر عند أعلى

جرعة (ppm125). كانت فعالية مضاد الأكريات من اللازولوسيد مختلفة تمامًا بالنسبة لنوعي الأيمرية موضوع الدراسة، حيث كان فعال للغاية ضد *E. flavescens* بمجرد إعطاء ppm25، من ناحية أخرى، كانت الفعالية ضد *E. intestinalis* معتدلة فقط عند جرعة 75 ppm. يتحكم هيدروكلوريد روبينيدين تمامًا في المرض عند جرعة 90 ppm، وفقًا لتقييم زيادة الوزن والوفيات، بينما بقي إطراح البيوض المتكيسة لل *E. intestinalis* في براز الأرانب دون تغيير.

استخدم (Niedzwiadek et al., 1990) مجموعتين من 400 أرنب (200 أرنب بكل مجموعة)

كلهم (100%) مصابون بداء الأكريات. تم تغذية المجموعة التجريبية على علف محبب مع ساليوميسين **salinomycin** بجرعة 20 ppm. وذكروا أن هذا الدواء فعال للغاية وكان مفيدًا في التخلص تمامًا من داء الأكريات بالإضافة إلى القضاء عليه فعليًا، حيث كان متوسط وزن الجسم للأرانب في مجموعة العلاج أثقل ب 225 جرامًا من المجموعة غير المعالجة.

كما درس (Coudert, 1990) فعالية ديكلازوريل **DiClazuril** في أرانب الفطام المصابة بجرعات عالية من *E. flavescens* و *E. intestinalis* ووجد بأن جرعة 0.25 ppm في العلف المحبب فعالة في التحكم بإطراح البيوض المتكيسة لل *E. intestinalis*، بينما تطلب الأمر جرعة 1.0 ppm لتحقيق نتائج مماثلة مع *E. flavescens* وأشاروا إلى أن ديكلازوريل مقبول بشكل جيد من قبل الأرانب ولا يمكن ملاحظة تأثير كبت النمو إلا بجرعة أكثر ب 30 مرة من الجرعة الموصى بها.

أعطى (Połozowski, 1993) الأرانب لمدة 5 أسابيع كل مما يلي: لأزولوسيد (Avatec)، **salinomycin (Sacox)**، **monensin**، **robenidine (Cycostat)**، **maduramycin (Cygro)**، **(Elancoban)**، **methylbenzoate + clopidol (Lerbek)** و **narasin (Monteban)**. ووجد أنه تم الحصول على أفضل النتائج في السيطرة على داء الأكريات باستخدام **salinomycin** بجرعات 25 و 35 و 50 ppm و **maduramycin** بجرعات 2 و 3 ppm. وكان **clopidol + methylbenzoate** فعال بنفس القدر بجرعة 216.7 ppm، بينما لأزولوسيد ظهرت فعاليته بجرعة 90 و 125 ppm، و **monensin** عند 20 ppm. كان **Robendine** فعالاً للغاية ضد الأكرية المعوية عند 66 ppm، وهو جيد التحمل من قبل الأرانب، لكن استخدامه الوقائي المنتظم على مدار العشرين عامًا الماضية زاد من المقاومة لبعض الأنواع تجاه هذا المركب على سبيل المثال (*E. magna*، *E. media*) (van Praag, 2011). كان **Narasin** و **maduramycin** بجرعة (4.5 ppm) سامين للأرانب. في التجارب الميدانية تم الإبلاغ من قبل (Połozowski, 1993) عن ساليوميسين **salinomycin** بجرعة

(25 ppm)، و مادوراميسين maduramycin بجرعة (1.5 ppm)، ومونينسين monensin بجرعة (20 ppm) بأنها كانت فعالة للغاية.

بالنسبة لداء الأكريات الكبدية، فإن العلاج الدوائي صعب ومن الأفضل إعطاء كايح الأكريات coccidiostats لجميع الأرناب المشتبه في إصابتها بـ *E. stiedai* لمدة لا تقل عن 5-6 أيام ثم تكرر بعد 5 أيام (van Praag, 2011). يعتبر التولترازوريل Toltrazuril دواءً فعالاً في مرحلتي الأعراس والمتقدمات للأيمرية، حيث يستخدم في العلاج بجرعة 25 ppm في ماء الشرب لمدة يومين ويعاد بعد 5 أيام في حال الضرورة (Karaer, 2001; Lindansay and Blagburn, 1995; Singla et al., 2000). وقد أشار (Peeters and Geeroms, 1986) إلى أن إعطاء جرعة 25 ppm من التولترازوريل في ماء الشرب بالأيام (10،11،17،18) بعد الخمج التجريبي بالأيمرية السنتيدأوية، يؤدي إلى منع ظهور الأعراض الإكلينيكية، وهو فعال جداً في تقليل إنتاج البيوض المتكيسة عند الأرناب، بينما لم يتأثر تبوغ البيوض المتكيسة المطروحة. كما أفاد أيضاً (Peeters and Geeroms, 1986) بأن Toltrazuril الذي تم إعطاؤه خلال وقت متأخر من مرحلة التقسّم أو التوالّد التعرّسيّ سمح بتطوير مناعة ضد الإصابة مرة أخرى مع كل نوع متماثل. هذا وقد سُجّلت نتائج مشابهة للنتائج السابقة من قبل الباحثين (Balbaa et al., 2012; Mathis et al., 2004) حيث استخدموا التولترازوريل (2.5%) لعلاج الأيمرية السنتيدأوية عند الأرناب المخموجة تجريبياً من خلال حله بماء الشرب بمعدل (3مل/ل) لمدة 8 ساعات/اليوم لمدة يومين متعاقبين. وفي دراسة أجراها الباحثون (Singla et al., 2000) وجدوا أن إعطاء التولترازوريل بجرعة 25 ppm في ماء الشرب لمدة يومين للأرناب المصابة بالأيمرية يقلل من إطراح البيوض المتكيسة في البراز ويؤدّي إلى اختفائها تماماً من براز الأرناب بعد ستة أيام من العلاج، كما يقلل من الأعراض المرافقة للإصابة، كما تؤدّي المعالجة به إلى منع حدوث النفوق، وفسر ذلك بتأثير التولترازوريل المثبط والقاتل لجميع مراحل تطور الطفيلي. ووجد (Çam et al., 2008) أن إعطاء جرعة مفردة 50 ppm من التولترازوريل في ماء الشرب للأرناب المخموجة تجريبياً بالأيمرية السنتيدأوية كان فعالاً في علاجها. وقد أشار (Reynaud et al., 1999) إلى أن التجريع الفموي للتولترازوريل بجرعة مفردة 7 ملغ/كغ هو فعال للتخلص من الأيمرية السنتيدأوية.

ومن ناحية أخرى استخدم كل من (Abdel Maged et al., 2013; Ghanem et al., 2009) التولترازوريل في علاج الخمج التجريبي بالأيمرية المعوية عند الأرناب، حيث استخدموا التولترازوريل بجرعة (20 ملغ/كغ) يومياً لمدة أسبوعين، وذلك اعتباراً من اليوم 14 بعد الخمج التجريبي، ووجدوا في دراستهم

لبعض المعايير البيوكيميائية مثل الإنزيمات (AST, ALT, ALP) والألبومين والبروتين الكلي والبيليروبين الكلي وغيرها، أن هذه القيم استمرت بالانخفاض طوال فترة العلاج، إلا أنها اتجهت نحو القيم الطبيعية بعد أسبوعين من انتهاء المعالجة وأصبح عندها برز الأرناب المعالجة خالياً من البيوض المتكيسة للأيمرية السيتداوية.

وقد بينت دراسة أجراها (Çam et al., 2008) أن المجموعة المصابة بالأيمرية السيتداوية والمعالجة بالتولترازوريل لم تُظهر أعراضاً إكلينيكية مع نقصان معنوي في متوسط عدد البيوض المتكيسة المطروحة في البراز مما يشير إلى فعالية هذا الدواء في علاج الأيمرية، بالإضافة إلى تقارب القيم الدموية والبيوكيميائية للأرناب المعالجة من القيم الطبيعية، ولوحظ التأثير الإيجابي للدواء أيضاً في الفحص العياني والدراسة النسيجية المرضية، حيث لم تُشاهد آفات خطيرة واضحة في خلايا متن الكبد (Parenchymal liver cells والقنوات الصفراوية، باستثناء وجود عدد قليل من الطفيليات في بعض المقاطع العرضية من الكبد في هذه المجموعة، بالإضافة إلى أن التصوير بتخطيط الصدى (Ultrasonography) للأرناب المعالجة كان مشابهاً للأرناب في مجموعة الشاهد الطبيعية، كذلك اكتشف الباحثون أن البيانات التي حصلوا عليها من الأرناب المعالجة بالتولترازوريل والإيفرمكتين كانت مشابهة لقيم المجموعة المعالجة بالتولترازوريل لوحده، مما يشير إلى أن العلاج المشترك بين التولترازوريل والإيفرمكتين لم يُقدم أي فائدة إضافية. كما أشاروا إلى أن تجريب الأرناب غير المصابة بالتولترازوريل (50 ppm) في ماء الشرب لم يؤدي إلى ظهور أي تأثيرات جانبية فيما يتعلق بالفحص بتخطيط الصدى والقيم الدموية والبيوكيميائية، والأعراض النسيجية المرضية. كما أن **Robendine** جيد التحمل من قبل الأرناب وهو فعال للغاية ضد العديد من الأكريات المعوية (على الرغم من أن مقاومة الأدوية تستمر في التطور في بعض الأيمرية)، لكنه كان ذو فعالية ضعيفة بالنسبة للأيمرية السيتداوية فقط (Połozowski, 1993).

الجدول رقم (1): بعض كابحات الأكريات والعلاج الفعال ضد أكريات الأرانب (Duszynski and Couch,)
(2013)

Drug trade name (generic name or chemical group)	Treatment regime/dosage in feed or water/time	References
Amprolium	9.6% in drinking water (0.5 ml/500 ml)	Quesenberry & Carpenter, 2010
	100 mg/kg body wt from 0 to 30 DPI	Dubey et al., 1989
Baycox (toltrazuril)	2.5–5 mg/kg, 2 times @ 5 d intervals	van Praag, 2011
Baycox (toltrazuril [Bay Vi 9142])	10–15 ppm, drinking water, continuously	Peeters & Geeroms, 1986
Bio-Cox (salinomycine)	??	van Praag, 2011
Clinicox (diclazuril)	??	van Praag, 2011
Coban (monensin, ionophore)	50 ppm	Coudert & Nouzilly, 1981
Coban (narasin, ionophore)	20, 25, 40, 60 ppm	Coudert & Nouzilly, 1981; Polozowski, 1993
Coyden (clopidon, meti-chlorpindol, 25%)	200 ppm	Coudert & Nouzilly, 1981; Peeters et al., 1982
Clopidol + methylbenzoate	216.7 ppm	Polozowski, 1993
Decox (decoqinate)	100–160 ppm	Coudert, 1972, 1979b, 1981; Coudert & Nouzilly, 1981
Diclazuril	0.25 ppm in feed	Coudert, 1990
Emtryl (dimetridazole)	250 ppm in water	Coudert & Nouzilly, 1981
Formosulfathiazole	750 ppm	Coudert, 1979b, 1981
Lasalocid (avatec, ionophore)	25–125 ppm	Coudert & Provôt, 1988; Polozowski, 1993
Lerbek (clopidol + methyl-benzoate)	216.7 ppm	Polozowski, 1993; Joyner et al., 1983
Lerbek (metichlorpindol, 25%; methylbenzoate, 1.67%)	200 ppm	Coudert, 1979b; Coudert & Nouzilly, 1981
Maduramycin	2, 3 ppm	Polozowski, 1993
Monensin	20 ppm	Polozowski, 1993

Pancoxin (amprolium 20%; ethopabat, 1%; sulfa-quinoxaline, 12%; pyri-methamine, 1%)	200 ppm	Coudert & Nouzilly, 1981
Ponazuril	20 mg/kg 1×/d	Quesenberry & Carpenter, 2010
Robenidine	16.4–33–50 ppm	Coudert, 1979a; Licois & Coudert, 1980, Polozowski, 1993 (nine intestinal eimerians)
	66 ppm	
	100 ppm	Coudert, 1979b, 1981
Ridzol (ronidazol)	30 ppm	Coudert & Nouzilly, 1981
Sacox (salinomycin, ionophore)	25–35–50 ppm	Coudert & Nouzilly, 1981; Polozowski, 1993
	1–2 mg/kg body wt	Dubey et al., 1989
Sodium sulfaquinolaxine	3.5 g/3.785 l, 3 wk	Levine, 1973b (p. 236)
	1 g/l water	van Praag, 2011
Statyl (methylbenzoate, 20%)	20 ppm	Coudert & Nouzilly, 1981
Stenorol (halofuginone)	1–3 ppm	Coudert & Nouzilly, 1981
	0.22 mg/kg body wt	Dubey et al., 1989
Sulfamethazine	128 mg/kg for 1–3 d	Gološin & Tešić, 1963; Gološin et al., 1963
Sulfadimethoxine	0.5–0.7 g/l water	van Praag, 2011
	75 mg/kg/d for 7d	Quesenberry & Carpenter, 2010
	15 mg/kg per os every 12 hr for 10d	
Sulfaquinolaxine	1 g/l drinking water	van Praag, 2011
Sulfadimethoxine-diaveridine (3:1)	3:1/100 g feed, 3 d 100 ml/l water, 8 d	Dürr & Lammler, 1970
Sulfadimerazine	2 g/l water	van Praag, 2011
	0.02% in water, 7 d	Quesenberry & Carpenter, 2010
Toltrazuril (Bay Vi 9142)	7–10 mg/kg 1×/d for 7 d	Quesenberry & Carpenter, 2010
	10–15 ppm in water for 5 wk	Peeters & Geeroms, 1986
	2.5–5.0 mg/kg, 2×, repeat after 5 d	van Praag, 2011
Trimethoprim-sulfamethoxazole	30 mg/kg each 12 hr for 10 d	Quesenberry & Carpenter, 2010
Whitsyn 10 (Sulfa-quinolaxine, 8.33%; pyrimethamine, 0.85%)	80–100 ppm	Coudert & Nouzilly, 1981
Zoalene® (coccidine A, zoamix)	125 or 250 ppm	Rommel et al., 1981

الفصل الثالث
مواد البحث وطرائقه
Materials and Methods

أنجزت الدراسة في مخابر كلية الطب البيطري (مخبر الطفيليات- مخبر الدراسات العليا والبحث العلمي) بجامعة حماة، وفي مخابر كلية العلوم بجامعة دمشق ومركز الليشمانيا في دمشق، خلال الفترة الزمنية من شهر حزيران 2019 م لغاية شهر آذار 2021 م. واشتملت الطرائق المتبعة على الخطوات والتقنيات التالية:

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

استُخدمت البيوض المتكيسة المتبوعة sporulated oocysts النقية لـ *E. stiedae* المأخوذة من عزلة محليه محفوظة بمحلول 2.5% من ثاني كرومات البوتاسيوم بدرجة حرارة +4 م° (مخبر الطفيليات -كلية الطب البيطري-جامعة حماة)، أخضعت بعدها إلى:

1- إكثار الطفيلي:

تم تربية عشرة أرانب من كلا الجنسين وبِعمر 6-8 أسابيع وبوزن 500-1000 غ. وضعت الأرانب في غرفة خاصة بحيوانات التجارب في كلية الطب البيطري، قدمت لها مادة علفية خالية من أي مادة مضادة للأيمرية، بعدها عُلقَت البيوض المتكيسة المتبوعة بالماء العادي ثم حُجمت الأرانب بجرعة قدرها $(10^4 \times 5)$ بيضة متكيسة متبوعة لكل أرنب عن طريق الفم ولمرة واحدة، ولتحقيق هذا الهدف استعملت محاقن طبية سعة 3 مل ثبت عليها أنبوبة خاصة للتجريب. دُبجت بعدها الأرانب في اليوم 23 من الخمج التجريبي وتم جمع الأكياد وتفريغ محتوى الصفراء لجمع البيوض المتكيسة النقية داخلها ومن ثم تبويغها بمحلول ثاني كرومات البوتاسيوم، أما الأكياد فقد خضعت لعملية العزل والتبويغ (Abu-El-Ezz et al., 2012).

2- العزل والتبويغ:

قُطعت أكباد الأرانب التي تم الحصول عليها بواسطة جهاز مجانس العينات Homogenizer, AISS EI AM-3 ACE وبسرعة rpm1500 لمدة 10 دقائق لفصل البيوض المتكيسة غير المتبوعة. ثم رشح المزيج لاستبعاد الأجزاء الكبيرة، ووضع الراشح بعدها بزجاجة سعة 1000 مل تحتوي على 400 مل محلول 2.5% من ثاني كرومات البوتاسيوم، وبدرجة حرارة 28 م° مع تزويد العينة بالأكسجين. تركت بعدها العينة لمدة 5-7 أيام لإتمام عملية التبويغ وفحص المعلق يومياً لملاحظة تكون جسم ستيدا (*Stida* body) في البيوض المتكيسة المتبوعة تحت المجهر (Rose, 1987).

3- التنقية:

- نقيت البيوض المتكيسة المتبوعة بطريقة التعويم (flotation) باستعمال محلول ملحي مشبع (400 غ من كلوريد الصوديوم +1 لتر من الماء) عن طريق:
- غسل عينة البيوض المتكيسة المتبوعة من ثاني كرومات البوتاسيوم بالماء العادي بأنبوب حجم 100 مل بالثقل لمدة 10 دقائق بسرعة rpm 2500 3-5 مرات.
 - إضافة المحلول الملحي المشبع (كثافته 1.2) إلى الراسب بنسبة 20/1 ومزج جيداً، وأضيف بعدها بهدوء إلى المعلق (3) مل من الماء المقطر.
 - تثقل العينة بسرعة rpm 1500 ولمدة 10 دقائق، وبواسطة ماصة باستور تم سحب البيوض المتكيسة النقية من الطبقة الواقعة بين الماء المقطر والملح (أعيدت العملية مرتين) (Rose et al., 1984).
 - ثم ترسيب البيوض المتكيسة المتبوعة النقية بإضافة الماء المقطر بنسبة 10:1 في أنابيب اختبار حجم 15 مل وثقلت بسرعة rpm 2500 لمدة 2-3 دقائق.
 - حُفظت البيوض المتكيسة النقية في الدارئة الفوسفاتية (pH=7.4) بدرجة 4م مدةً لا تزيد عن 3 أسابيع لحين الاستعمال.

4- التعقيم والتخزين:

- عُقدت البيوض المتكيسة المتبوعة النقية باستعمال محلول هيبوكلوريد الصوديوم Sodium hypochlorite المبرد 6% اتبعت طريقة (Davis, 1973) مع بعض التعديل عليها اذ تم خلالها :
- ترسيب البيوض المتكيسة المتبوعة النقية وأضيف إليها محلول التعقيم حجم /حجم في زجاجة حجم 25 مل وثركت في حمام ثلجي لمدة 10 دقائق مع التحريك.
 - توزيع العينة على أنابيب اختبار معقمة حجم 10 مل وأضيف 2 مل ماء مقطر معقم إليها على الجدران.
 - تثقل العينة بسرعة rpm 2500 مدة 5 دقائق.
 - سحب البيوض المتكيسة المعقمة بواسطة ماصة باستور من الطبقة الواقعة بين الكلور والماء المقطر. بينما احتوى الراسب على الفضلات غير المرغوبة.
 - غسل العينة (3-5) مرات بالماء المقطر المعقم للتخلص من الكلور.
 - تم حفظ البيوض المتكيسة المتبوعة المعقمة بالدارئة الفوسفاتية (pH=7.4)، لحين استخدامها في الدراسة بعد إحصاء عددها باستخدام شريحة عدّ كريات الدم Haemocytometer في التقسيمات الخاصة بعدّ كريات الدم البيضاء

ثانياً-تحضير الحيوانات البوغية:

- 1- استخلاص الحيوانات البوغية sporozoites:** تم استخلاص الحيوانات البوغية of sporozoites من خلال عملية ميكانيكية وهضم إنزيمي للبيوض المتكيسة المتبوعة والكيسات البوغية Excystation بطريقة (Al-Idreesi et al., 2013c; Tahir, 1998) مع بعض التعديل على النحو التالي:
- تم تنقيت معلق البيوض المتكيسة المتبوعة المعقمة والمحفوظة مع الدارئة الفوسفاتية في أنبوب مغطى بحجم 15 مل بسرعة rpm1500 مدة 10 دقائق.
 - أُزيل السائل الطافي، وأخذ (0.9) مل من الراسب وأضيف إليه كمية مناسبة من الماء المقطر المعقم، ونقل العينة إلى زجاجة ذات غطاء تحوي (3.3) غ من الكرات الزجاجية Glass beads قطر 0.5 سم.
 - حُطمت البيوض المتكيسة ميكانيكياً بواسطة الرج الشديد باستخدام جهاز (Roto-Mixture vortex) لمدة (10-15) دقيقة، وتم خلالها فحص قطرة من المعلق مجهرياً كل 30 ثانية للتأكد من تحطم البيوض المتكيسة المتبوعة، وأخيراً تم إيقاف العملية عند الحصول على الكيسات البوغية والحيوانات البوغية.
 - تم سحب المعلق بواسطة ماصة باستور، ونُقل إلى أنبوب سعة (10) مل، وغُسلت الكرات الزجاجية بالدارئة الفوسفاتية (pH=7.4).
 - نُقلت العينة بسرعة rpm 2500 مدة 2-3 دقائق، والتخلص من السائل الطافي.
 - تم إضافة محلول الإخراج المؤلف من (0.25% ترپسين trypsin و5% من العصارة الصفراوية rabbit bile التي تم الحصول عليها من الحوصلة الصفراوية من الأرانب، والمحفوظة في أنابيب ابندورف بالتجميد -20 لحين الاستعمال) إلى الراسب وبمقدار حجم/حجم في الدارئة الفوسفاتية ويعدل ب ها إلى (pH=7.4).
 - وُضعت العينة في حمام مائي بدرجة حرارة 39 م لمدة 1-2 ساعة تم خلالها الفحص المجهرى لقطرات من العينة للتأكد من عملية الإخراج.
 - غُسل معلق الإخراج بمحلول الدارئة الفوسفاتية (pH=7.4) بالنتفيل بسرعة rpm1500 مدة 10 دقائق أُعيدت العملية 4 مرات. وقد احتوى الراسب على الحيوانات البوغية والكيسات البوغية والبيوض المتكيسة غير المنكسرة وبقايا الأغلفة.
 - تم حفظ الراسب بمحلول الدارئة الفوسفاتية بدرجة حرارة +4م إلى اليوم الثاني أو استعمل مباشرة في تنقية الحيوانات البوغية.

2 - تنقية الحيوانات البوغية Sporozoites purification:

تم الحصول على حيوانات بوغية نقية باستخدام احدى التقنيتين التاليتين:

أ- التثفيل باستعمال البركول متدرج الميل Percoll Gradient Centrifugation:

- تم استعمال البركول percoll (كثافته 1.13غم / مل)، خفف إلى تركيز 90% وباستعمال X10 محلول للدارئة الفوسفاتية وذلك بإضافة 9 أجزاء من البركول إلى حجم من الدارئة الفوسفاتية.

- غُسلَ معلق الحيوانات البوغية المستخرجة باستعمال الدارئة الفوسفاتية X1 وبسرعة 4500 rpm مدة 3 دقائق.

- أُعيد تعليق الراسب إلى 60% بركول (أي بإضافة 6 مل بركول 90% + 4مل من X1 الدارئة الفوسفاتية الحاوية على معلق الحيوانات البوغية) وثقلت العينة بسرعة 15000 rpm ولمدة 2 دقيقة بدرجة 25°م، إذ ترسبت الحيوانات البوغية بالقاع بينما تكون الكيسات البوغية والبيوض المتكيسة السليمة والأغلفة توضع بصورة رئيسية بالطبقات العليا (Khalafalla, 2009).

- جُمعت الحيوانات البوغية بواسطة ماصة باستور وبحذر من القاع وغسلت من 2-3 مرات بالدارئة الفوسفاتية (pH=7.4) وعدت باستخدام شريحة عدّ كريات الدم Haemocytometer وحفظت بدرجة -20°م لحين تحضير البروتين.

ب- عمود فصل التبادل الأيوني باستخدام مادة الدياسليلوز-52**:E-52 anion exchange chromatography**

المواد:

- صوف زجاجي Glass wool super fine extrafein 11µM

- مادة الدياسليلوز-52

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

- دارئة الفوسفاتية لعمود الفصل Phosphate buffer saline:

10,780 g Na₂HPO₄ /L0,62 g NaH₂PO₄.H₂O /L

3,4 g Nacl / L

10,0 g glucose

وتكون القوة الأيونية ionic strength = 0,290

وpH = 8,0

تم وزن 1 غ من الدياسليلوز ووضعت في بيشر حجم 100 مل وخلطت جيداً مع دائرة عمود الفصل وتركت مدة ساعة لتستقر وأزيل الراشح وأعيدت العملية 3 مرات بعدها يترك إلى اليوم الثاني بدائرة عمود الفصل وبدرجة +4°م. تم تهيئة عمود الفصل بتهيئة المحقن الطبي الزجاجي (حجم 10 مل) بوضع شاقولي على الحامل ووضعت السدادة (جهاز اعطاء وريدي) للتحكم بسرعة نزول الدائرة الفوسفاتية، تم التخلص من الراشح على الدياسليلوز ويصب بعدها في داخل المحقنة مع ملاحظة عدم تكون فقاعة ويكون ارتفاعه تقريباً (2 سم) تفتح السدادة بسرعة متوسطة ويترك الدياسليلوز ليستقر وتم الغسل بإضافة 20 مل من دائرة عمود الفصل ويجب عدم ترك الدياسليلوز يجف.

غسلت عينة الحيوانات البوغية المستخرجة بدائرة عمود الفصل بسرعة rpm4500 ولمرتين، أخذ الراسب وُخِلَّ في 20 مل بدائرة عمود الفصل (حيث كان عدد الحيوانات البوغية $10 \times 5 \times 10^6$ / مل)، صبت العينة في عمود الفصل المتعادل وسمح لها بالنزول خلاله الى مستوى 1 مل من الدياسليلوز. غُسل بعدها عمود الفصل بمقدار 50 مل بدائرة عمود الفصل (اثناء إنزال العينة خُلطت الطبقة العليا من الدياسليلوز بعود خشبي لمنع انسدادها)، غُسلت بعدها الحيوانات البوغية المنقات بالدائرة الفوسفاتية pH=7.6 وتم احصائها باستخدام شريحة عدّ كريات الدم Haemocytometer وحفظت بدرجة -20°م، لحين تحضير البروتين (Riggs and Perryman, 1987).

ثالثاً- تحضير المُسْتَضدات:

1- تحضير المُسْتَضدات الصُّوَّاتية:

تم تحضير المستضدات الصُّوَّاتية من البيوض المتكيسة المتبوغة وغير المتبوغة، والحيوانات البوغية وذلك من خلال المراحل التالية:

أ- البيوض المتكيسة المتبوغة:

أُخذت البيوض المتكيسة المتبوغة المعقمة وتم غسلها 3-4 مرات من ثاني كرومات البوتاسيوم بمحلول ملحي فيزيولوجي (PH=7.2) وتركيزها بنسبة 4000 بيضة متكيسة/مل بالتثليل rpm 2700 لمدة 5 دقائق، وتم تعريضها للأمواج فوق الصوتية عند درجة 60 كيلو هرتز لخمس مرات لمدة دقيقة كل مرة في وعاء مغطى بماء معتدل البرودة (Akhtar et al., 1998). تم بعدها تثليل المعلق بسرعة 3000 rpm لمدة 30 ثانية وُجِع بعدها القسم الطافي وتم تعقيمه بمرشح ميليبور (0.45 ميكرون) (Fu and Lee, 1976). ومن ثم تم تحضير اللقاح المعطل بالفورمالين من المُسْتَعْلَق المصوتن (المعرّض للأمواج

الصوتية) 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).



الشكل (8): جهاز الأمواج فوق الصوتية، مركز الليشمانيا دمشق، المصدر: الباحث

ب- البيوض المتكيسة غير المتبوعة:

تم اتباع الخطوات السابقة المتبعة في تحضير المُسْتَضدات الصوتية للبيوض المتكيسة المتبوعة.

ج- الحيوانات البوغية:

أُخذت الحيوانات البوغية المحفوظة وتم تركيزها بنسبة 10^9 /مل ثم غُسلت 3 مرات بمحلول PBS

ومن ثم تمت المتابعة كما تم ذكره آنفاً.

2- تحضير المستضدات غير الصوتية:

أ-الحيوانات البوغية:

– أُخذت الحيوانات البوغية النقية وثُقلت مدة دقيقة واحدة بسرعة 10000 rpm في انابيب ابندورف.

– أُضيف الى الراسب دائرة الحلمهة Lysis buffer والتي تتكون من (0.5%Nonidet P40, 10Mm)

100 -1% Triton X , 0.1 U/ml Aprotinen , Tris-HCL) بدرجة (pH=7.4) وبمقدار

100ماكروليتر لكل 150 مليون حيوان بوغي وحُفظت معها مدة 24 ساعة على هزاز دائري في درجة

حرارة +4 م°.

– ثُقلت العينة مدة 10 دقائق وبسرعة 10000 rpm (Al-Idreesi et al., 2013b).

- أخذ السائل الطافي الحاوي على الخلاصة البروتينية وتم قياس تركيز البروتين باستعمال طريقة برادفورد (Bradford)، وتم تقسيم العينة بأنابيب ابندورف وحُفظت بدرجة -20°م لحين الاستعمال.

ب- البيوض المتكيسة المتبوعة:

- أُتبعَت الخطوات نفسها المتبعة أعلاه من (اكتار الطفيلي - تنقية بالملح-تعقيم بالكور).
- أُضيفت كمية قليلة من الدارئة الفوسفاتية PBS (pH=7.6) الى 10×4 من البيوض المتكيسة في زجاجة حجمية تحوي 3.3غم من الكرات الزجاجية.

- تمت عملية التكسير على الرجّاج Vortex مدة 20 دقيقة.

- سُحب معلق العينة (أغلفة البيوض المتكيسة، والكيسات البوغية، والحيوانات البوغية وبعض البيوض المتكيسة السليمة) بماصة باستور الى زجاجة بحجم 10 مل وغسلت الكرات الزجاجية بأقل كمية ممكنة من الدارئة الفوسفاتية.

- تجميد وإذابة العينة: تمت عملية التجميد بالمجمدة -20°م مدة 4-5 دقائق ومن ثم اذابتها في حمام مائي بدرجة 45°م. (تكرر العملية 3 مرات).

- أُضيفت دارئة الحلمهة Lysis buffer كما موضح بالفقرة أعلاه.

- نُقلت العينة مدة 10 دقائق وبسرعة rpm 2500 (Al-Idreesi et al., 2013b).

- أخذ السائل الطافي الحاوي على الخلاصة البروتينية الكاملة للبيوض المتكيسة المتبوعة وقيس تركيز البروتين باستعمال طريقة برادفورد (Bradford)، وقُسمت العينة في أنابيب ابندورف وحُفظت بدرجة -20°م لحين الاستعمال.

- معايرة البروتينات بطريقة Bradford:

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

- مبدأ الطريقة:

المبدأ الأساس لهذه الطريقة هو استعمال صباغ أزرق الكومازي اللماع G-250 الذي يرتبط مع البروتين ويكون معقداً ويمكن أن يتم الكشف عنه بمقياس الطيف الضوئي وبطول موجي 595 نانومتر (Bradford, 1976)، اذ تتناسب شدة الامتصاصية طردا مع تركيز البروتينات في العينة.
- تم تحضير أنبوبين ابندورف من كاشف برادفورد بتركيز 0 و 20 ميكروغرام /ميلي ليتر.

- تم معايرة البروتينات في العينات المراد قياس تركيز البروتين فيها: خلاصة بروتين البيوض المتكيسة المتبوعة (الصواتة والملمهة)، وخلاصة بروتين الحيوانات البوغية (الصواتة والملمهة)، وخلاصة بروتين البيوض المتكيسة غير المتبوعة الصواتة، وذلك بوضع 50 ميكروليتر من البروتين + 50 ميكروليتر من محلول الدائرة الفوسفاتية PBS + 900 ميكروليتر من الكاشف (برادفورد) الممدد والجهاز للاستخدام Bradford reagent 1X (BIO BASIC, Canada).

- حُضنت الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة مدة عشر دقائق، بعدها قيست الكثافة الضوئية بمقياس الطيف الضوئي (spectrophotometer (PG IL-T70, UK) بطول موجة 595 نانومتر.

رابعاً-اختبار التحدي والتمنيع في حيوانات التجربة:

استُخدم خلال التجربة 40 أرنباً من كلا الجنسين وبِعمر 4-8 أسابيع بوزن 500-1000 غرام، ووُضعت الأرانب بدرجة حرارة الغرفة العادية 15-20°م في غرفة خاصة بحيوانات التجارب في كلية الطب البيطري في جامعة حماة، وجُهزت الغرفة بمعالف ومشارب خاصة حيث قُدم العلف المحبب الخالي من أي مادة مضادة للأيمرية، بالإضافة إلى الأعلاف الخضراء المتنوعة، ومياه شرب نظيفة. وقد تم التأكد تجريبياً من عدم وجود إصابة سابقة بالأيمرية السنتداوية وغيرها من أنواع الأيمرية التي تصيب الأرانب من خلال فحص الروث بطريقة التعويم بشكل يومي ولمدة أسبوعين متتاليين قبل البدء بالتجربة للتأكد من خلوها من البيوض المتكيسة للأيمريات (Abu-El-Ezz et al., 2012).

تم تقسيم الأرانب إلى ثمان مجموعات كل مجموعة مؤلفة من 5 أرانب وفق الجدول التالي:

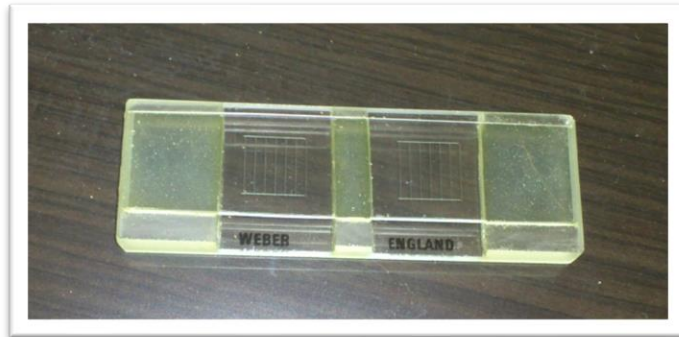
جدول(2): يبين ملخص المجموعات المدروسة بالتجربة

المجموعات	عيار المستضد	نوع المجموعة
A	--	شاهد سلبي
B	25 ميكروغرام PBS تحت الجلد	شاهد إيجابي
C	25 ميكروغرام تحت الجلد	ملقحة ببروتينات البيوض المتكيسة غير المتبوعة الصواتة
E	25 ميكروغرام تحت الجلد	ملقحة ببروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة الصواتة
F	25 ميكروغرام تحت الجلد	ملقحة ببروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة الملمهة
G	25 ميكروغرام تحت الجلد	ملقحة ببروتينات الحيوانات البوغية الصواتة
H	25 ميكروغرام تحت الجلد	ملقحة ببروتينات الحيوانات البوغية الملمهة
I	12.5 ميكروغرام صواتة+ 12.5 ميكروغرام حلمة تحت الجلد	ملقحة ببروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة الصواتة والملمهة

- خُمجت كل أرناب المجموعات B,C,E,F,G,H,I في اليوم 20 بعد التحصين بجرعة التحدي بمعدل 10^3 بيضة متكيسة متبوعة للأرنب الواحد، بينما تم حقن المجموعة (A) (الشاهد السلبي) بالماء المقطر فقط (AL-Tae and AL-Zubaidi, 2017).

خامساً- المؤشرات والاجراءات المتبعة خلال التجربة:

1- حساب متوسط عدد البيوض المتكيسة المفرزة بغرام واحد من البراز OPG: بعد جرعة التحدي لتقييم فعالية اللقاحات المدروسة، حيث تم الفحص في اليوم 17-20-23-26-29-32 من اعطاء جرعة التحدي (AL-Tae and AL-Zubaidi,2017)، إذ جُمعت عينات البراز من كل مجموعة على حدة ووضعت عينات البراز المأخوذة في أوعية بلاستيكية خاصة ذات غطاءٍ محكمٍ ثم وضعت في البراد بدرجة حرارة (4م°)، ريثماً يتم فحصها بطريقة التعويم لتحديد عدد البيوض المتكيسة الموجودة في 1غرام من الروث (OPG) باستخدام طريقة ماك ماستر Mc Master الموصوفة من قبل كل من (Long et al., 1976) و (MAFF, 1986). وفيما يلي شرحٌ بسيطٌ عن طريقة ماك ماستر لعدّ البيوض المتكيسة في البراز: الأدوات المطلوبة لإجراء العدّ: بيشر بلاستيكي (عدد 2) - ميزان - مصفاة - سيلندر مدرج - عود خشبيّ للتحريك - ماصة باستور مع إجابة مطاوية - سائل التعويم - عداد ماك ماستر - المجهر.



الشكل (9): شريحة ماك ماستر التي تُستخدم لعدّ البيوض المتكيسة. المصدر: الباحث

طريقة العمل:

تم وزن 2غ من البراز حيث يوضع البراز في وعاء بلاستيكي على الميزان ثم وُضع 28 مل من سائل التعويم المختار (محلول ملحي مشبع) بوساطة السلندر المدرج، ثم حركت محتويات البيشر جيداً بوساطة العود الخشبي، بعدها تم تصفية المعلق البرازي بوساطة مصفاة أو قطعة مزدوجة من الشاش الطبي، ووضع السائل المرشح في وعاء بلاستيكي آخر، ثم حرك السائل جيداً ثم أخذ عينة من المزيج بوساطة ماصة باستور وملأت الحجره الأولى لشريحة مك ماستر، ثم أخذت العينة الثانية بنفس الطريقة

ووضع في الحجرة الثانية لشريحة ماك ماستر، بعدها تم الانتظار خمس دقائق حتى استقر السائل في حجرات العدّ، وحتّى طفت البيوض المتكيسة على السطح وترسبت الشوائب في الأسفل، ثم وضع العداد على المجهر الضوئي وتم الفحص بالتكبير 10، ثم تم عدّ كامل البيوض المتكيسة داخل المنطقة المحفورة في الحجرتين. ويمكن حساب عدد البيوض المتكيسة في الغرام على النحو التالي:

حساب عدد البيوض المتكيسة داخل الشبكة في كلّ حجرة، وتجاهل البيوض خارج الساحات. وضرب المجموع بـ 50. وهذا يُعطي عدد البيوض المتكيسة في كلّ غرام من البراز (O.P.G.) (Zajac and Conboy, 2012).

2- حساب مؤشر مقدار عدد البيوض المتكيسة Oocyst score لكل مجموعة بعد جرعة التحدي

= متوسط عدد البيوض المتكيسة في غرام (O.P.G.) لليوم 17-20-23-26-29-32 بالمجموعة الملقحة بعد جرعة التحدي / متوسط عدد البيوض المتكيسة في غرام (O.P.G.) لليوم 17-20-23-26-29-32 للمجموعة غير الملقحة ومجرعة بجرعة التحدي (شاهد ايجابي) (Kodama et al., 2006).

وباتباع التقسيمات التالية: 0 الى 1% = 0 ، 1.1 الى 25% = 5+ ، 26 الى 50% = 10+ ، 51 الى 75% = 20+ ، 67 الى 100% = 40+.

3- حساب النسبة المئوية للأمان Percentage of protection لكل مجموعة بعد جرعة التحدي = (متوسط عدد البيوض المتكيسة في مجموعة الشاهد الايجابي - متوسط عدد البيوض المتكيسة للمجموعة الملقحة) / متوسط عدد البيوض المتكيسة في مجموعة الشاهد الايجابي x 100 (Li et al., 2012).

4- عينات الدم Blood Samples:

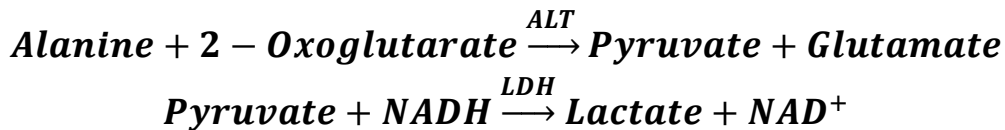
جُمعت العيناتُ الدمويّةُ من الأرانب في مجموعات التّجربة في (اليوم 14، اليوم 28، اليوم 42) للتّجربة بعد التحصين (AL-Tae and AL-Zubaidi, 2017). وتمتّ عملية السّحب من القلب مباشرةً بعد إجراء التّعقيم لمكان سحب الدم، وقد استعمل لسحب عينات الدم محاقن سعة (3 أو 5) مل، وكانت كمية الدم المأخوذة تتراوح بين (2-5) مل دم، وبعد أخذ عينة الدم تمّ تفرغ العينات في أنابيب معقمة غير حاوية على مانع تخثر من أجل الاختبارات التي تتطلب المصل، وهي قياس مستوى الإنزيمات [AST, ALT, ALP]، وإجراء اختبار التراص الدموي اللامباشر، واختبار التبصيم المناعي. وبعد وضع العينات الدمويّة في الأنابيب وُضعت الأنابيب بشكلٍ مائلٍ قدر الإمكان في درجة حرارة الغرفة من أجل زيادة فصل المصل، ومن ثمّ تمّ نقلها إلى مخبر الطفيليات في كلية الطب البيطري بوساطة حافظة مبردة، وبعد وصولها إلى المخبر تمّ تثقيفها بسرعة (3500 rpm لمدة 5 دقائق) (Hrubec et al., 2002).

للحصول على المصل الرائق الذي تم حفظه في أنابيب ابندورف المحكمة الإغلاق سعتها 1.5 مل، سُجِّلت عليها البيانات المطلوبة، وحُفظت في المجمدة بدرجة حرارة (-20)°م لحين إجراء الفحوص عليها.

5- قياس مستوى الإنزيمات الكبدية [AST,ALT,ALP]:

أ- قياس نشاط إنزيم ناقلة أمين الألانين (Alanine Aminotransferase) (ALT):

اعتمدت المقايسة اللونية الحركية التي تعتمد المبدأ الآتي: يقوم إنزيم الألانين الناقل لزمرة الأمين (ALT أو GPT) بتحفيز نقل مجموعة الأمين -NH₂ من الحمض الأميني الألانين (Alanine) إلى مركب 2-Oxoglutarate، مُشكلاً البيروفات (Pyruvate) والجلوتامات (Glutamate)، وتتحول الجلوتامات بدورها إلى اللاكتات (Lactate) وفق ما يوضح التفاعل الكيميائي الآتي:



ويعتمد مبدأ الكشف عن نشاط إنزيم ALT، بناءً على معدل الانخفاض الحاصل في تركيز المرافق الإنزيمي (النيكوتين أميد أدنين ثنائي نكلوتيد الهيدروجين) NADH، الذي يتم في وسط قلوي (PH=7.3) حيث إن تركيز الإنزيم يتناسب مع معدل انخفاض تركيز المرافق الإنزيمي حسب طريقة Gella وزملاؤه، وتم ذلك من خلال قياس الكثافة الضوئية على طول الموجة 340 نانومتر (Gella et al., 1985)، باستخدام عتيدة تحليل جاهزة (Kit) المصنعة من قبل شركة (Fortress)، بتسجيل الامتصاص البدئي initial absorbance ثم بعد كل دقيقة لمدة 3 دقائق متتالية.

ويعتمد قياس نشاط الإنزيم على العلاقة الآتية:

$$U/L = A/min \frac{Vt \times 10^6}{\sum x l \times VS}$$

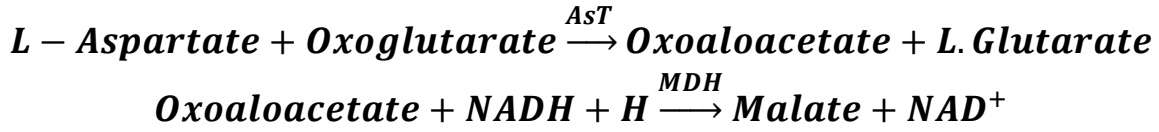
A/min : معدل الامتصاصية لـ NADH في الدقيقة. Vt : حجم التفاعل الكلي.

$\sum x l$: امتصاصية الـ NADH. VS : حجم العينة.

ب- قياس نشاط إنزيم ناقلة أمين الأسبارتات (Aspartate Aminotransferase) (AST):

يقوم (AST أو GOT)، بنقل زمرة الأمين -NH₂ من الأسبارتات إلى الأوكسوجلوتارات oxoglutarate، مُشكلاً الأوكسالوأسيتات oxaloacetate والجلوتارات Glutarate، إذ ترجع الأوكسالوأسيتات بوجود المرافق الإنزيمي (NADH) النيكوتين أميد ثنائي نكلوتيد الهيدروجين، وبوساطة

الإنزيم MDH، معطيةً المالات وتميم الإنزيم NAD (نيكوتين أميد أدنين نيكلويد)، وذلك وفق التفاعل الكيميائي التالي الموضح أدناه:



ويعتمد مبدأ الكشف عن نشاط إنزيم (AST) باستخدام المقايسة اللونية الحركية على قياس معدل انخفاض (NADH) الذي يُستهلك في هذا التحويل، ويتناسب هذا الاستهلاك بشكل مباشر مع نشاط الإنزيم في العينة حسب طريقة (Gella et al., 1985)، إذ يُجرى الاختبار باستخدام عتيدة تحليل جاهزة (Kit) المُصنعة من قبل شركة (Human)، وتقرأ الكثافة الضوئية (OD) على طول الموجة 334 نانومتر ودرجة الحرارة 30 م°، إذ تُقرأ الكثافة الضوئية كل دقيقة لمدة 3 دقائق متتالية، فيعطى تركيز الإنزيم بالعلاقة

$$\text{U/L} = \Delta \text{O.D./min} \times F$$

$$\Delta \text{O.D} = \text{متوسط امتصاصية NADH في الدقيقة.}$$

$$F : \text{عامل ثابت} = 1780.$$

ج- قياس نشاط إنزيم الفوسفاتاز القلوية (ALP) (Alkaline Phosphatase):
مبدأ المعايرة:

إضافة المصل الحاوي للإنزيم إلى محلولٍ يحوي ركيزة الإنزيم (أحد أسترات الفوسفات) في وسطٍ قلوي تؤمنه الدائرة (فوسفات ثنائية الصوديوم) مع حضانة بدرجة 37 م°. تكون الركيزة عادةً غير ملونة، ولكن بعد قيام الإنزيم بعمله يتحرر الفوسفات من الركيزة التي تتحول إلى مركبٍ آخر (الفينول) يأخذ لوناً أزرق عند اتحاده بالكاشف المظهر للون، وبعدها يُمكن قياس شدة اللون بمقياس الطيف الضوئي، وتكون شدته متناسبة مع تركيزه، ومن ثم مع نشاط عمل الإنزيم المتناسب مع تركيزه.

طريقة المعايرة:

يجري الاختبار حسب طريقة (Gella et al., 1985)، باستخدام عتيدة تحليلٍ جاهزة (Kit) المُصنعة من قبل شركة (Human)، وتقرأ الكثافة الضوئية (OD) على طول الموجة 405 نانومتر ودرجة الحرارة 37 م°، إذ تُقرأ الكثافة الضوئية كل دقيقة لمدة 3 دقائق؛ فيعطى تركيز الإنزيم بالعلاقة

$$\text{U/L} = \Delta \text{O.D./min} \times F$$

$$\Delta \text{O.D} = \text{معدل امتصاصية NADH في الدقيقة.}$$

$$F : \text{عامل ثابت} = 1780.$$

سادساً- الجانب المناعي:

أ- الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide
:(SDS-PAGE) gel electrophoresis

- المبدأ:

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

- المواد المستخدمة في الرحلان الكهربائي:

1. هلامة تركيز العينات البروتينية staching gel:

حُضِرَ 5 مل من هلامة التركيز 5 % المكونة من محلول Acrylamide/bis-acrylamid، ودارئة Tris -HCl pH 6.8، ومحلول سلفات دودوسيل الصوديوم SDS، وفوق سلفات الأمونيوم (APS) Ammonium persulfate، ومحلول تتراميتيل إيتلين دياميد Titramethylethylenediamide TEMED، وذلك بأخذ الحجم الواردة في (الجدول3).

الجدول رقم (3): المواد الداخلة في تركيب هلامة التركيز

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

2. هلامة الفصل 15% Resolving gel:

تم تحضير 10 مل من هلامة الفصل 15 % المكونة من محلول Acrylamide/bis- acrylamid، ودارئة Tis-HCl pH 8.8، ومحلول SDS، وفوق سلفات الأمونيوم Ammonium persulfate، ومحلول تتراميتيل إيتيلين ديامايد TEMED. وحضرت الهلامة وفقاً للتركيز الواردة في (الجدول4).

الجدول رقم (4): المواد والكميات المطلوبة لتحضير 10 مل من هلامة الفصل

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

3. دارئة معالجة العينات Samples buffer:

تتكون دارئة معالجة العينة من محلول Tis-HCl pH 6.8، ومحلول SDS، والغليسيرول، وبيتا ميركابتو إيتانول β-Mercaptoethanol، وأزرق بروموفينول Bromophenol blue حسب (الجدول 4)، تم إضافة دارئة معالجة العينة إلى العينات بتركيز نهائي قدره 1X وسخن المزيج مدة 3 دقائق على الدرجة 95 °م، إذ ضمن هذه الشروط يقوم SDS بالارتباط بالسلاسل البيبتيدية ويفصلها بعضها عن بعض وعن اللبيدات. كما يقوم بتغيير بنيتها ثلاثية الأبعاد، محولاً إياها إلى سلاسل خطية، يشحنها بشحنة سالبة عالية. في حين يقوم بيتا ميركابتو إيتانول بتحطيم الروابط ثنائية الكبريت بين وضمن السلاسل عديدة البيبتيد.

الجدول رقم (5): المكونات الداخلة في تركيب دائرة معالجة العينة واللازمة لتحضير 10 مل من الدائرة المركزة 5 مرات (5X)

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

4. دائرة الرحلان الكهربائي Electrophoresis buffer:

تم تحضير 1 لتر من دائرة الرحلان المكونة من Tris، و SDS، و غليسيرول وفقاً للتركيز النهائية المبينة في (الجدول رقم 6):

الجدول رقم (6): مكونات دائرة الرحلان

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

5. واسم الأوزان الجزيئية Molecular weight markers:

استخدم واسم أوزان جزيئية معيارية من شركة (Vivantis PR0602, Malaysia)، لحساب الأوزان الجزيئية للبروتينات بالعينات بعد ترجيلها. ويتكون هذا الواسم من مزيج من احدى عشر بروتينات مألوفة معيارية ملونة مسبقاً تتراوح أوزانها الجزيئية بين 10 و 175 كيلودالتون.

6. محلول التلوين Staining solution:

يتألف الملون من أزرق الكومازي الملون النوعي للبروتينات، وتم تحضيره تبعاً للكميات الواردة في (الجدول رقم 7).

الجدول رقم (7): مكونات أزرق الكومازي

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

7. مزيل اللون Destaining solution:

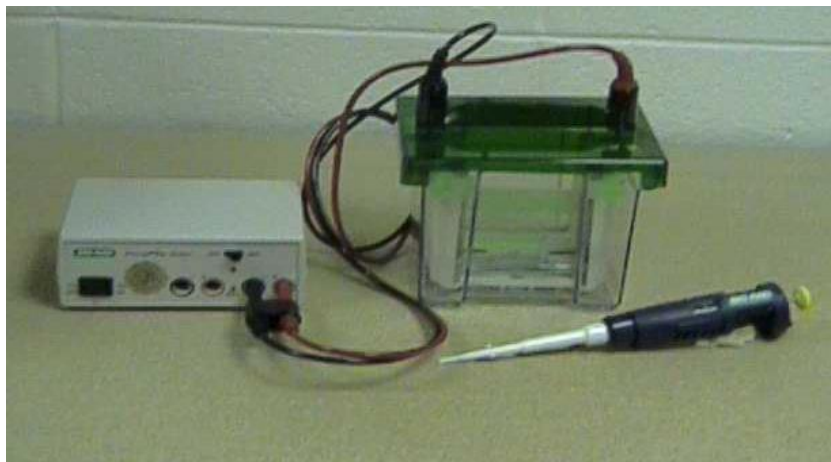
يزيل هذا المحلول الارتباط غير النوعي للون، وتم تحضيره حسب (الجدول رقم 8):

الجدول رقم (8): المواد المكونة لمزيل اللون

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

- طريقة العمل:

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



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

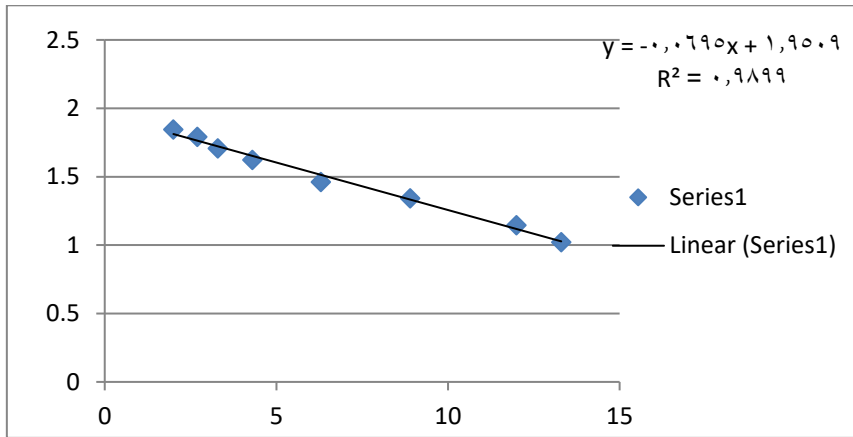
- 1- مُسحت الصفائح، التي تبلغ أبعادها (10.1× 8.3cm , 10.1× 7.3cm) وسماكتها 0.75 ملم، بشكل جيد بالكحول ثم تُركت لتجف ثم تم تركيبها تمهيداً لصب الهلام.
 - 2- حُضِر 10 مل من هلامة الفصل و5 مل من هلامة التركيز في أنبوبين منفصلين، إذ وُضعت جميع المكونات، وتُرك TEMED ليضاف مباشرة قبل الصب لمنع بلمرة الهلامة في الأنابيب.
 - 3- صُبت هلامة الفصل، باستخدام مصص مدرج، بين الصفائح الزجاجية. وتُرك حوالي 1 سم تحت قمة الصفائح لصب هلامة التركيز. أُضيف فوقها محلول SDS بتركيز 1% فوق هلامة الفصل لتسوية السطح.
 - 4- تُركت الهلامة مدة تتراوح بين 15-30 دقيقة حتى تتبلر ثم تم التخلص من محلول SDS الموجود على السطح.
 - 5- تم صب هلامة التركيز فوق هلامة الفصل، ووُضعت الأمشاط التي تتكون من عشرة أسنان لتشكيل الآبار اللازمة لوضع العينات البروتينية مع الانتباه لعدم تشكل فقاعات هوائية.
 - 6- بعد بلمرة هلامة التركيز، نرعت الأمشاط بهدوء مع الانتباه لعدم تخريب الآبار. ووضعت الصفائح بعد ذلك داخل جهاز الرحلان، وغمرت بدائرة الرحلان.
 - 7- تم حقن واسم الأوزان الجزيئية المعيارية والعينات (بعد اضافة دائرة معالجة العينات لها) بتركيز (50 ميكروغرام) في الآبار المخصصة بوساطة محقنة هاملتون.
 - 8- وُصل جهاز الرحلان بمزود الطاقة Power supply، عند 120 فولط وينتظر حتى وصول صباغ أزرق بروموفينول الموجود في العينات إلى نهاية الهلامة.
 - 9- بعد انتهاء عملية الرحلان، تم فك الصفائح ووضعت الهلامة مباشرة في ملون أزرق الكومازي، وتُركت من ساعتين إلى ليلة كاملة بدرجة حرارة الغرفة.
 - 10- غُسلت الهلامة بمزيل اللون عدة مرات حتى ظهرت العصابات بشكل واضح. ووضعت الهلامة في النهاية في الماء المقطر.
 - 11- صُورت الهلامة ووثقت.
 - 12- تم حساب الأوزان الجزيئية للعصابات البروتينية المختلفة بالمقارنة مع واسمات الأوزان الجزيئية المعيارية.
- حساب الأوزان الجزيئية: تم قياس مسافة الرحلان التي تمثل المسافة التي قطعها اللون الأزرق من بداية الهلامة إلى نهايتها، ثم القيام بحساب المسافة التي قطعها كل عصابة من عصابات الواسم المستخدم عن بداية الرحلان، وحساب الحركة النسبية RF على وفق العلاقة:

RF = مسافة هجرة العصابة للواسم/المسافة الكلية للرحلان

وتم رسم المنحني البياني للعلاقة بين الحركة النسبية والأوزان الجزيئية كما هو مبين في (الشكل رقم 11) فتبين وجود علاقة ارتباط قوية إذ بلغت قيمة $r^2 = 0.9899$. وبين الحاسب الآلي أن معادلة الخط البياني هي:

$$y = -0.0695x + 1.9509$$

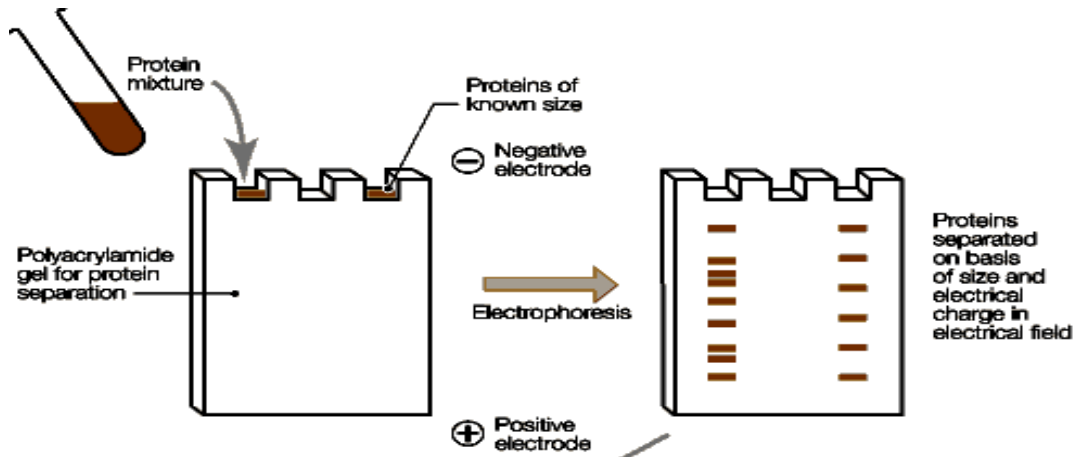
باستخدام المعادلة الناتجة حُسبت الأوزان الجزيئية للعصابات البروتينية المختلفة وذلك بعد حساب الحركة النسبية لكل عصابة.



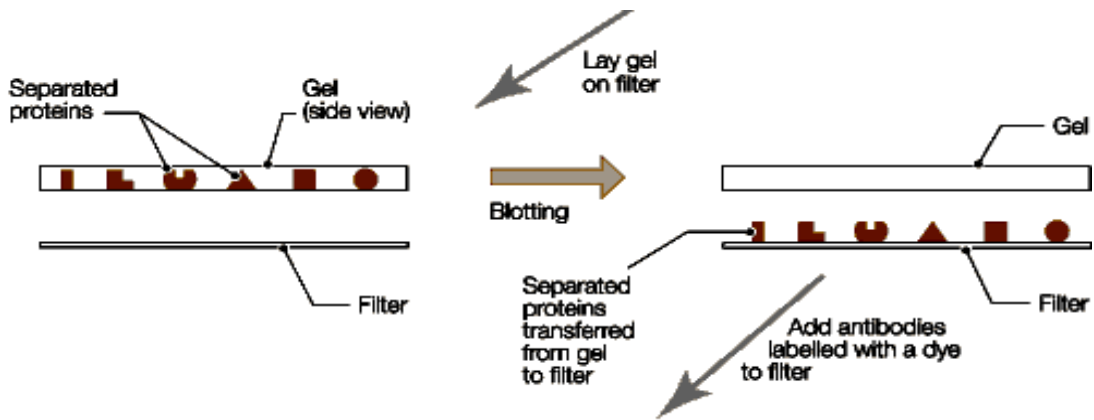
الشكل رقم (11): العلاقة بين الأوزان الجزيئية للعصابات البروتينية مع حركتها النسبية RF

ب-التبصيم المناعي Western blot

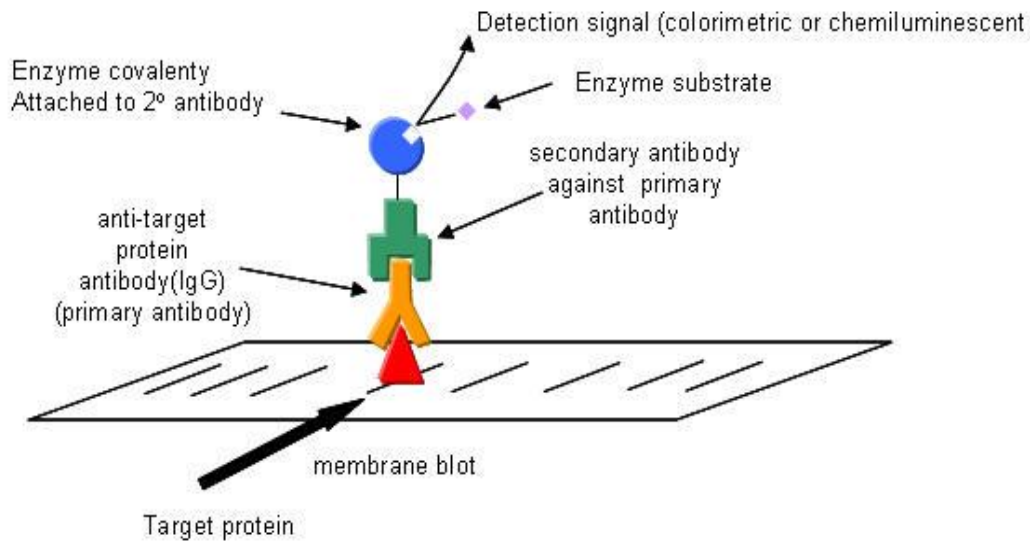
تم استخدام هذه التقنية لتحديد هوية البروتينات وذلك بالاعتماد على قدرتها على الارتباط مع أضداد نوعية ويمكن بهذه الطريقة أن نتحرى عن بروتين ما ضمن مزيج من البروتينات باستعمال الضد النوعي لهذا البروتين. أولاً فُصلت البروتينات بالرحلان الكهربائي بعدها نُقلت إلى غشاء النتروسيلولوز وحُضن الغشاء مع أضداد أولية نوعية ضد البروتين الهدف. ثم أُضيف أضداد ثانوية موسومة بأنزيمات مثل انزيم Alkaline Phosphatase، ثم حدث التفاعل الإنزيمي الذي أعطى راسب ملون في موضع الارتباط بعد إضافة الركيزة الملائمة (الشكل رقم 12).



A



B



C

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

- المحاليل المستخدمة في التصميم المناعي:

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

حُضِرَ 1 لتر من دائرة النقل المكونة من Tris -HCl (pH 8.1-8.4)، وجليسين Glycine، والكحول الميتيلي. تم تحضير الدائرة على وفق التراكيز الواردة في (الجدول 9) وتم إكمال الحجم حتى 1 لتر بإضافة الماء المقطر.

الجدول رقم (9): المواد المكونة لدائرة النقل

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

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

حُضِرَ 1 لتر من دائرة التصميم المكونة من Tris -HCL (pH 7.5)، و NaCl و Tween-20. تم تحضير الدائرة على وفق التراكيز الواردة في (الجدول 10) وتم إكمال الحجم حتى 1 لتر بإضافة الماء المقطر.

الجدول رقم (10): المواد المكونة لدائرة التصميم المناعي

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

3. دائرة الركيزة Substrate buffer:

تم استخدام الدائرة الخاصة للأنزيم المستعمل بالتجربة وهي نترولوتتزازوليوم NBT وبرمو كلورو اندوليل فوسفات BCIP تضاف بمقدار 5 مل.

- بعد إنتهاء عملية الرحلان الكهربائي للخلاصة البروتينية لطيفلي الأيمريَّة السَّتيداويَّة، وفصل البروتينات على هلامة الأكريلاميد، أُخذت هلامة الرحلان من دون تلويئها، ونُقلت البروتينات إلى غشاء النتروسيللوز

(قطر مساماته $0.4\mu\text{m}$) بواسطة جهاز التبصيم الرطب (Bio-Rad , USA) الذي يحوي دائرة النقل وبتطبيق تيار كهربائي شدته 250 ميلي أمبير لمدة ساعة ونصف بدرجة حرارة 4 مئوية.

- بعد نقل البروتينات، غُسلَ غشاء النتروسيللوز بالماء المقطر مرتين، كل مرة مدة خمس دقائق، لإزالة بقايا الهلام وبقايا عناصر دائرة النقل، وتم التأكد من نقل البروتينات إلى الغشاء بتلوين الهلام بعد عملية النقل بأزرق الكومازي ثم إزالة اللون عنها فإذا بقيت الهلام شفاقة فذلك دليل على نجاح عملية النقل وانتقال البروتينات إلى غشاء النتروسيللوز .

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

- قُصَّ الغشاء الى شرائط ووضع في أطباق كل على حده وحُضِنَ الغشاء مع الأمصال الحاوية على الأضداد الأولية للأرانب والممدد بنسبة 1:1000 في دائرة TBS-T لمدة ساعة كاملة بدرجة حرارة الغرفة على هزاز دائري.

- ثم حُضِنَ الغشاء مع الأضداد الثانوية الموسومة بالألكالين فوسفاتاز (Immuno Pure Goat Anti-Rabbit IgG, Thermo scientific, USA) والموجهة ضد أضداد الأرانب، وذلك بعد تمديدها بنسبة 1:5000 في محلول TBS-T مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة و على هزاز دائري.

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

- ثم حُضِنَ الغشاء مع ركيزة الإنزيم في 10 مل من دائرة الركيزة Substrate buffer مع التحريك بلطف باستخدام هزازة دائرية حتى ظهور العصابات التي تدل على المستضدات الهدف (15-20) دقيقة التي حفزت تشكل الأضداد عند الأرنب.

- لإيقاف التفاعل غُسلَ الغشاء بالماء المقطر بلطف مرتين لمدة دقيقتين.

ج- تحديد عيار الأضداد:

من خلال إجراء اختبار التراص الدموي اللامباشر Indirect haemagglutination test (Akhtar et al.,1998): حيث تم تحسيس الكريات الحمراء الغنمية مع غلوتارألدهيد والمستضد (المصوّت والمحلّمه) وفق طريقة (Tokuda and Warrington, 1970).

1- أدوات ومواد الاختبار:

- طبق خاص باختبار منع التراص الدموي، مؤلف من 8 صفوف، كل صف مؤلف من 12 حفرة، أي $96=12 \times 8$ حفرة نوع U.
- ممصات ذات عيارات متغايرة. - حوجلة وببشر نظيف ومعقم.
- محلول الدارئة الفوسفاتية Phosphate Buffer Solution الأس الهيدروجيني $pH=7.2$.
- معلق كريات الدم الحمر الغنمية 1.5%.
- محلول حافظ ومانع تخثر لكريات الدم الحمراء Alsever's Solution.
- محلول غلوتارألدهيد تركيز 25%.
- المستضد المحضر بالصوتتة والحلمة.

2- تحضير الدارئة الفوسفاتية المتعادلة (PBS) Phosphate Buffer Solution:

تم تحضير المحلول من المواد الموضحة بالجدول رقم (11):

الجدول رقم (11): مكونات الدارئة الفوسفاتية المتعادل

المواد	الكميات مقدرة ب غ
كلور الصوديوم النقي Na cl	8
كلور البوتاسيوم Kcl	0.2
فوسفات الصوديوم المائية $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0.57
فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية KH_2HPO_4	0.26
ماء مقطر	1000 مل

ثم وُضع المحلول في الصاد الموصل (الأتوغلاف) تحت درجة حرارة 121°C لمدة 15 دقيقة، ثم بعد ذلك تُرك ليبرد، وحُفظ في البراد بدرجة حرارة 4°C بحوجلة مغلقة ومعقمة (Beard et al., 1975).

3- تحضير محلول السيفر الحافظ للكريات الحمر Prepare Alsever solution protector red blood cells:

تم تحضير محلول السيفر حسب الكميات الآتية الموضحة بالجدول رقم (12):

الجدول رقم (12): مكونات محلول السيفير

الكميات مقدرة ب غ	المواد
4.18	كلور الصوديوم النقي Na cl
18.66	غلوكوز Glucose
8	سترات الصوديوم Sodium Citrate
0.55	حمض الستريك Citric acid
1000 مل	ماء مقطر

بعد ذلك وُضعت هذه الكميات في حوجلة زجاجية، ثم تم تعقيمها في الأتوغلاف بدرجة حرارة 110م لمدة 10 دقائق، وبعد إخراج المحلول من الأتوغلاف، وُزع السائل على عيوات خاصة حسب الحاجة، وتم مراعاة أنّ تكون درجة حموضته pH=6، وحُفظ في البراد لحين الاستعمال (Beard et al., 1975).

4- تحضير كريات الدم الحمر المغسولة:

جُمعت عينات دم من الأغنام بإضافة المحلول الحافظ للكريات الحمر بنسبة 1 حجم محلول إلى 1 حجم دم. أُضيف إلى الدم المجموع حجم مماثل من محلول الدارئة الفوسفاتية المتعادل (PBS)، وتم إجراء مزج بسيط، ثم تم التثليل بسرعات منخفضة تلافياً لتحلل كريات الدم الحمر بسرعة 1500-2000 rpm لمدة خمس دقائق، لفصل كريات الدم الحمر عن بقية مكونات الدم. استُبعد السائل الطافي، ثم غُسلت كريات الدم الحمر المترسبة في أسفل الأنبوب وذلك بتعليقها في 50 حجم من محلول الدارئة الفوسفاتية المتعادل (PBS)، ومُزجت بلطف ثم ثقلت، وأعيدت العملية السابقة ثلاث مرات للحصول على كريات الدم الحمر المغسولة. يمكن حفظ هذه الكريات بتعليقها بتركيز 5% من محلول السيفير، ووضعها في البراد بدرجة حرارة 4م، بحيث يمكن استعمالها بمدة (3-5) أيام ولاستعمال كريات الدم الحمر في الاختبار حُضر منها محلول 1.5% في محلول الدارئة الفوسفاتية المتعادل (PBS) (Beard et al., 1975).

5- تحسيس الكريات الحمر Sensitization of erythrocytes:

وتم ذلك عن طريق مزج المستضد مع معلق الكريات الحمر بنسبة 2 حجم مستضد إلى 1 حجم معلق الكريات الحمر في محلول الدارئة الفوسفاتية المتعادل (PBS)، ثم أُضيف 1 حجم من غلوتارألدهيد بنسبة 1%. هُزَّ المزيج كل 15 دقيقة خلال فترة التحضين لمدة ساعة ضمن درجة حرارة الغرفة (25م). ثم تم غسل الكريات الحمر المُحسَّسة مرتين بمحلول PBS، ثم تثليلها بسرعة 1000 rpm لمدة 10 دقائق.

ثم تم إعادة تعليق الكريات الحمر ب 20 حجم من محلول PBS بعد إزالة السائل الطافي لتصبح بتركيز 0.5% (Tokuda and Warrington, 1970).

6- معايرة المستضد (الصوات والمعلمه):

- وُضع 50 ميكرو لتر من محلول PBS في جميع الحفر عدا الحفرة الأولى.
- ثم وضع 50 ميكرو لتر من المستضد في الحفرة الأولى والثانية.
- تم التمديد بنقل 50 ميكرو لتر من كل حفرة إلى التي تليها، بدءاً من الحفرة 2، وصولاً إلى الحفرة 11، ورمي الباقي المأخوذ من الحفرة 11.
- ثم وضع 50 ميكرو لتر من محلول الكريات الحمر المُحَسَّسة 0.5% في جميع الحفر.
- تم الرج قليلاً والتحصين لمدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة (22-25) م.
- حُدّد أعلى تمديد للمستضد حدث فيه تراص تام للكريات الحمر المحسنة بنسبة 100%، وتلك الحفرة تكون نقطة النهاية، وكان فيها أقل تركيز من المستضد أحدث تراصاً دموياً، وهذا التمديد يسمى: الوحدة التراصية الأولى 1HAU.

- حُسِبَ التمديد المطلوب للحصول على أربع وحدات مستضدية راصة 4HAU وحدة مستضد ممدد.

7- إجراء الاختبار:

- وُضع في كل حفرة من حفر طبق الاختبار كمية 25 ميكرو لتر من محلول التمديد PBS.
- وُضع 25 ميكرو لتر من المصل المطلوب فحصه في الحفر للعمود رقم 1.
- تم القيام بعمل سلسلة تمديدات للمصل، وذلك بنقل 25 ميكرو لتر من المصل من الحفر من العمود رقم 1 إلى الحفر للعمود رقم 2، وهكذا حتى العمود رقم 11، ثم استبعد منه 25 ميكرو لتر، ومن ثم نكون قد حصلنا على تراكيز للمصل تبدأ من 2/1 وتنتهي ب 2048/1.
- وُضع 25 ميكرو لتر من المستضد المحتوي على التركيز (المعيار) في كل الحفر ما عدا حفر العمود رقم 12، ونمزج جيداً بلطف في الأطباق.
- وُضع 50 ميكرو لتر معلق كريات الدم الحمر المحسنة بتركيز 0.5%، وتم خلطها جيداً وبلطف، وبقيت حفر العمود 12 شاهد (حاو PBS وكريات دم حمراء محسنة فقط) (Epizootics, 2008).
- تُرك طبق الاختبار لمدة 45-60 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.

- قُرأت النتيجة وحُدد معيار التمديد وكان المعيار هو أعلى تمديد للمصل أحدث منعاً كاملاً للتراص. في النتيجة الإيجابية ترسبت الكريات الحمر المحسنة بقاع الحفر مثل الزر، بينما العينات السلبية شكلت طبقة رقيقة من الخلايا كانت عائمة على سطح الحفر.

وتم حساب معايير المتوسط اللوغاريتمي (LMT) Logarithm mean titres لتركيز الأضداد في كل حفرة من حفر الاختبار من خلال حساب مربع لوغاريتم مقلوب تمديد المصل، وذلك في كل حفرة من الحفر التي حدث فيها تراص (Brugh Jr, 1978)، مثال: التمديد 40/1 مقلوبه هو 40، لوغاريتم المقلوب (لغ40=1.6)، مربع لوغاريتم المقلوب $2.56=1.6^2$.

سابعاً-التحليل الإحصائي:

إنَّ النتائج التي تم الحصول عليها، تم إدخالها على الحاسوب في جداول الكترونية (EXCELL)، وحُلِّلت باستخدام برنامج التحليل الإحصائي (Statistix-version20/ Analytical Software)، واستخدام اختبار التباين الأحادي (ANOVA) لتحديد الفروق المعنوية بين قيم المُعطيات المدروسة وقي الشاهد، ولتحليل النتائج التي حصلنا عليها، تم الحصول على المتوسط الحسابي Mean والانحراف المعياري للمتوسط (SD) Standard Divison of Mean. واختبار معنوية الفروقات بين المُعاملات فقد استخدم اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan's multiple rang Test)، وتم احتساب الفرق معنوياً عند مستوى احتمال $(P \leq 0.05)$.



أظهرت نتائج الدراسة إمكانية تحديد أهم مستضدات الأيمريّة السّيتداويّة من أطوار الطفيلي (الحيوان البوغي، البيضة المتكيسة، والبيضة المتكيسة المتبوعة) ذات القدرة الاستمناعية والمسؤولة عن تكوين الأضداد بعد الخمج التجريبي للأرناب، بدءاً من البيوض المتكيسة المعزولة من الكبد وتبويغها وتنقيتها والحصول على المستخلص البروتيني بعملية الصوتنة والحلمهة.

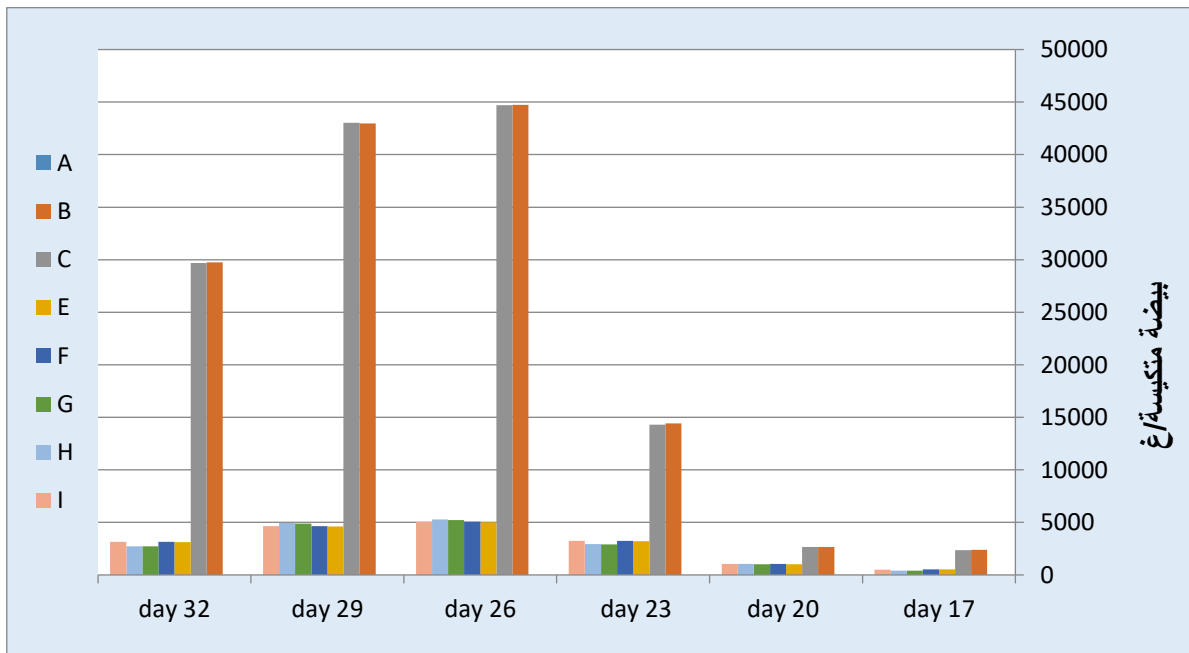
1- نتائج حساب متوسط عدد البيوض المتكيسة المطروحة خلال مرحلة التجربة:

بيّنت نتائج الدراسة عدم وجود طرح للبيوض المتكيسة في براز الأرناب في مجموعة الشاهد السلبّي (المجموعة A) حتى نهاية التجربة، بينما سجّل أول طرح للبيوض المتكيسة في براز أرناب المجموعات الأخرى في (اليوم 17) بعد جرعة التحدي، وأظهرت نتائج التعداد الكمي للبيوض المتكيسة المطروحة في 1 غرام من البراز باستخدام طريقة ماك ماستر في اليوم (17 و20 و23 و26 و29 و32) تزايداً في متوسط عددها ولاسيما في مجموعة الشاهد الإيجابي (المجموعة B) والمجموعة الملقحة بالبيوض المتكيسة غير المتبوعة (المجموعة C) مع وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) ليصل إلى أعلى مستوى له في اليوم 26 بعد جرعة التحدي، إذ بلغ (44746.1 و44689.1) على التوالي، ليتراجع العدد بعدها في (اليوم 32) حتى نهاية التجربة. كما أشارت النتائج إلى تناقص بمتوسط عدد البيوض المتكيسة المطروحة لكل غرام من البراز في المجموعات E,F,G,H,I مع وجود فروقات معنوية واضحة ($P \leq 0.05$) مع تقدم الوقت مقارنة مع المجموعتين (B,C)، مع عدم وجود فروق معنوية بين المجموعات الملقحة بالبيوض المتكيسة المتبوعة والحيوانات البوغية (E,F,G,H,I). وقد كان هذا الاختلاف أكثر وضوحاً في المجموعتين (B,C) حيث كان متوسط OPG أعلى 9 مرات على الأقل من متوسط OPG في المجموعات (E,F,G,H,I).

الجدول رقم (13): يبين متوسط عدد البويض المتكيسة في 1غرام من براز الأرناب (OPG) خلال التجربة

متوسط عدد البويض المتكيسة						المجموعات
اليوم 32	اليوم 29	اليوم 26	اليوم 23	اليوم 20	اليوم 17	
-	-	-	-	-	-	A
29753.8±1017.7	42960.6±813.9	44746.1±1936.4	14425.1±315.4	2676.3±157.5	2384.3±188.4	B
29688.3±992.7	43020.6±789.9	44689.1±1948.4	14298.9±333.4	2658.9±177.5	2355.6±166.4	C
a 3114.9±262.5	a 4610.9±218.6	5021.1 a ±231.5	a 3203.2±179.9	a 1010.7±72.7	a 520.4±58.8	E
3155.2 a ±232.5	a 4644.2±211.6	5060.3 a ±222.5	a 3244.5±166.9	a 1045.2±59.7	a 544.1±75.8	F
a 2721.5±221.5	4900.5 a ±236.4	5225.7 a ±218.1	2917.6 a ±189.7	a 1023.8±113.1	a 398.7±41.6	G
2735.8 a ±231.5	a 4961.1±213.4	a 5271.3±225.1	2947.6 a ±175.7	1039.5 a ±124.1	a 413.3±39.6	H
a 3134.9±245.5	a 4629.5±222.6	5047.4 a ±210.5	3229.2 a ±152.9	a 1033.7±88.7	a 513.7±55.8	I

a تدل على وجود فرق معنوي عند المقارنة ما بين مجموعة الشاهد الإيجابي (المجموعة B) والمجموعة الثالثة (المجموعة C) وبين المجموعات الأخرى حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P \leq 0.05$.



المخطط رقم (1): يبين متوسطات أعداد البويض المتكيسة في 1غرام من براز الأرناب (OPG) خلال فترات جمع البراز

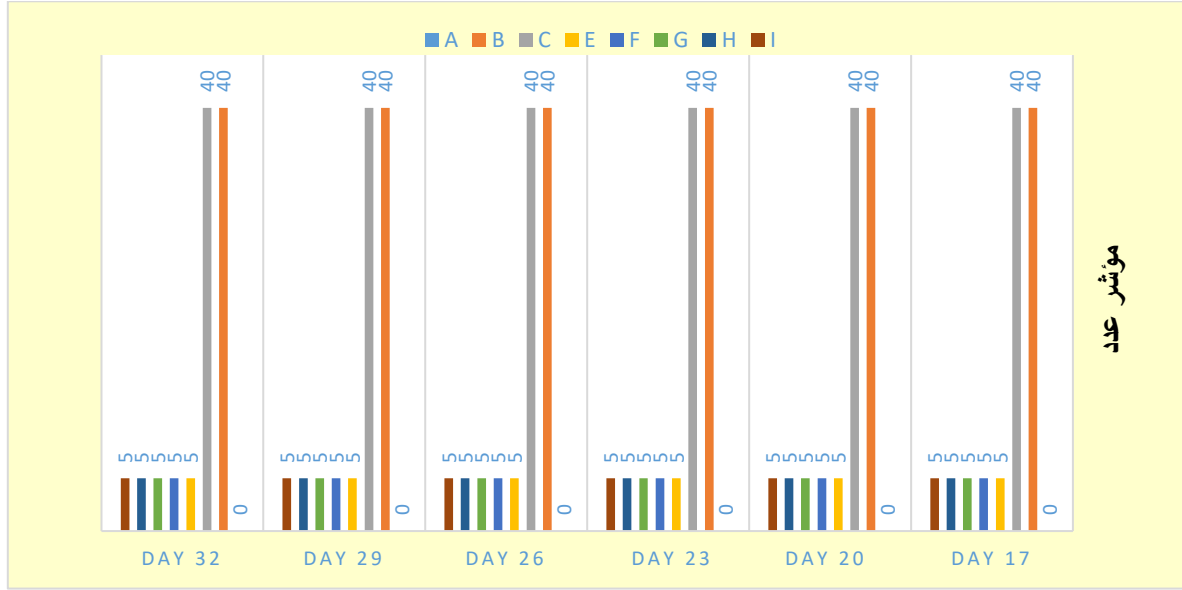
2- مؤشر مقدار عدد البيوض المتكيسة Oocyst score لمجموعات الدراسة بعد جرعة التحدي:

سجل مؤشر مقدار عدد البيوض المتكيسة للمجموعات الملقحة مؤشراً أقل لعدد البيوض المتكيسة بالمجموعة (E) و (F) و (I) الملقحة بلقاح البروتيني للبيوض المتكيسة المتبوعة، وكذلك في المجموعة (G) و (H) الملقحة باللقاح البروتيني للحيوانات البوغية، بينما كان أعلى من ذلك في مجموعة الشاهد الإيجابي (B) والمجموعة الملقحة بلقاح البيوض المتكيسة غير المتبوعة (C). ووجود فروق معنوية (P ≤ 0.05) في قيمة هذا المؤشر بين المجموعات (E,F,G,H,I) والمجموعتين B,C في اليوم 17 والذي استمر حتى اليوم 32 بعد جرعة التحدي، بينما لم تكن هنالك فروقات معنوية في مؤشر مقدار عدد البيوض المتكيسة بين المجموعات E,F,G,H,I.

الجدول رقم (14): يبين مؤشر عدد البيوض المتكيسة خلال التجربة

مؤشر عدد البيوض المتكيسة						المجموعات
اليوم 32	اليوم 29	اليوم 26	اليوم 23	اليوم 20	اليوم 17	
-	-	-	-	-	-	A
40	40	40	40	40	40	B
40	40	40	40	40	40	C
5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	E
5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	F
5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	G
5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	H
5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	I

a تدل على وجود فرق معنوي عند المقارنة ما بين مجموعة الشاهد الإيجابي (المجموعة B) والمجموعة الثالثة (المجموعة C) وبين المجموعات الأخرى حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P \leq 0.05$.



المخطط رقم 2: مؤشر عدد البيوض المتكيسة لكل مجموعة بعد جرعة التحدي

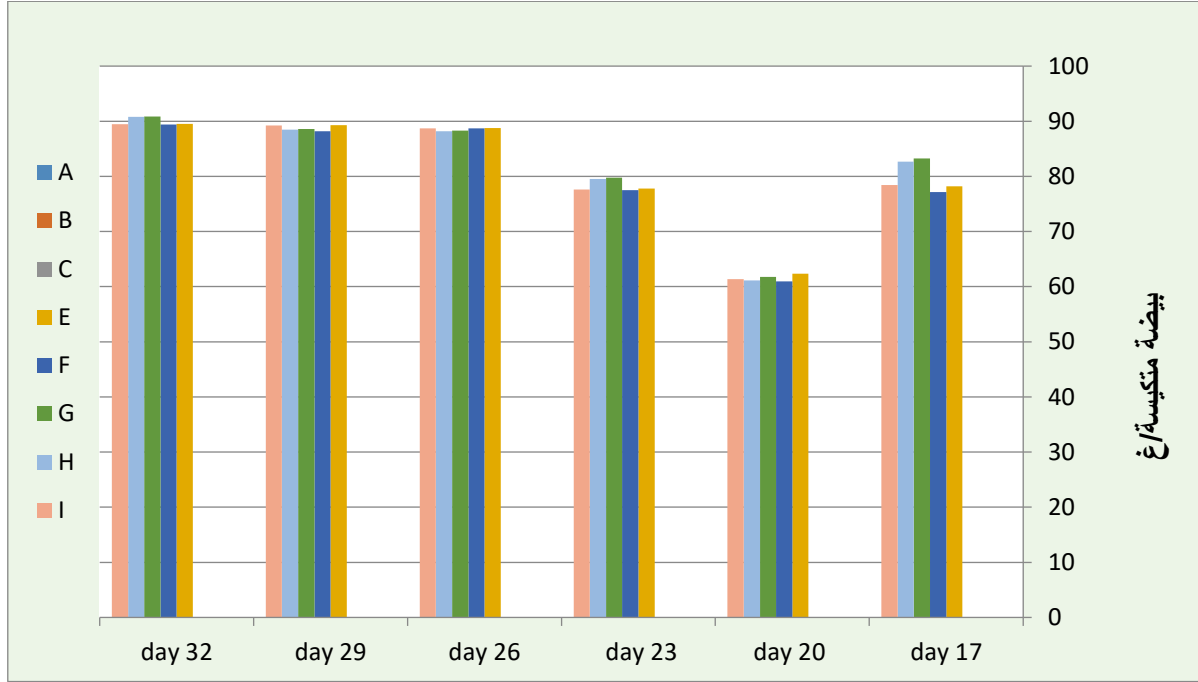
3- النسبة المئوية للأمان Percentage of protection لكل مجموعة بعد التحدي:

سجلت المجموعتان (G) و (H) الملقحتان باللقاح البروتيني للحيوانات البوغية نسبة مئوية للأمان أفضل من المجموعات الأخرى، تلتها المجموعات (E) و (F) و (I) الملقحة باللقاح البروتيني للبيوض المتكيسة المتبوعة، بينما لم توفر المجموعة (C) الملقحة باللقاح البروتيني للبيوض المتكيسة غير المتبوعة وكذلك مجموعة الشاهد الإيجابي (B) أي حماية.

الجدول رقم 15: النسبة المئوية للأمان للمجموعات الناتجة من استعمال لقاح الأيمريّة الأستيدائيّة

النسبة المئوية للأمان						المجموعات
اليوم 32	اليوم 29	اليوم 26	اليوم 23	اليوم 20	اليوم 17	
-	-	-	-	-	-	A
0	0	0	0	0	0	B
0	0	0	0	0	0	C
89.53 a	89.26 a	88.77 a	a 77.79	62.23 a	a 78.17	E
89.39 a	88.18 a	88.69 a	a 77.50	60.94 a	a 77.17	F
a 90.85	a 88.59	88.32a	a 79.77	a 61.74	83.27 a	G
90.80a	88.45a	88.21a	a 79.56	a 61.15	82.66a	H
89.46 a	89.22 a	88.72 a	a 77.61	61.37 a	a 78.45	I

a تدل على وجود فرق معنوي عند المقارنة ما بين مجموعة الشاهد الإيجابي (المجموعة B) والمجموعة الثالثة (المجموعة C) وبين المجموعات الأخرى حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P \leq 0.05$.



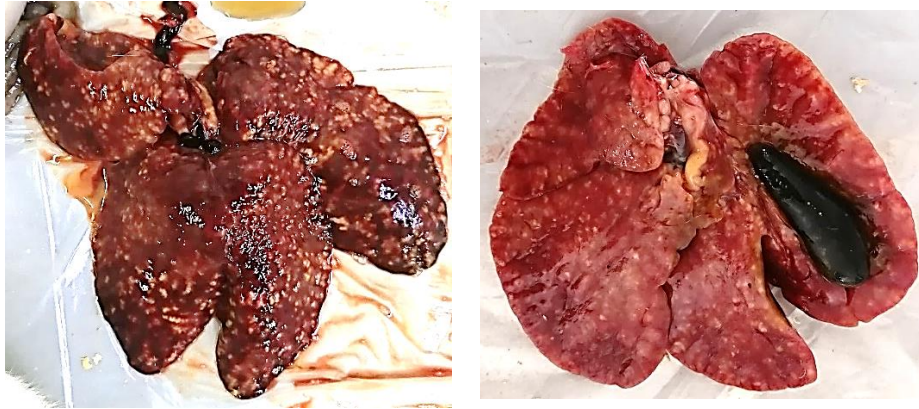
المخطط رقم 3: النسبة المئوية للأمان للمجموعات الناتجة من استعمال لقاح الأيبرية السيتداوية

4- نتائج دراسة التغيرات المرضية في أكباد الأرنب في نهاية التجربة:

بدأت أكباد الأرنب عند مجموعة الشاهد السليبي (A) والمجموعات الملقحة في نهاية التجربة طبيعية، بينما ظهرت آفات شاملة في مجموعة الأرنب المصابة بالأيبرية السيتداوية (B,C)، لوحظت التغيرات المرضية الأولية الواضحة في الأمعاء الدقيقة والكبد. كانت الأمعاء الدقيقة متضخمة وممتلئة بمواد غذائية نصف صلبة بلون رمادي مخضر. لوحظ وجود حبيبات طعام غير مهضومة في المعي. كما حدث تضخم بالكبد مع وجود عقيدات متنوعة متعددة بيضاء مصفرة ذات قطر يتراوح بين 1-2.5 ميليمتر مرتفعة قليلاً ومنفصلة، تتجه نحو الالتحام مع بعضها على السطح الحشوي للكبد بالمقارنة مع أكباد الأرنب الشاهدة.



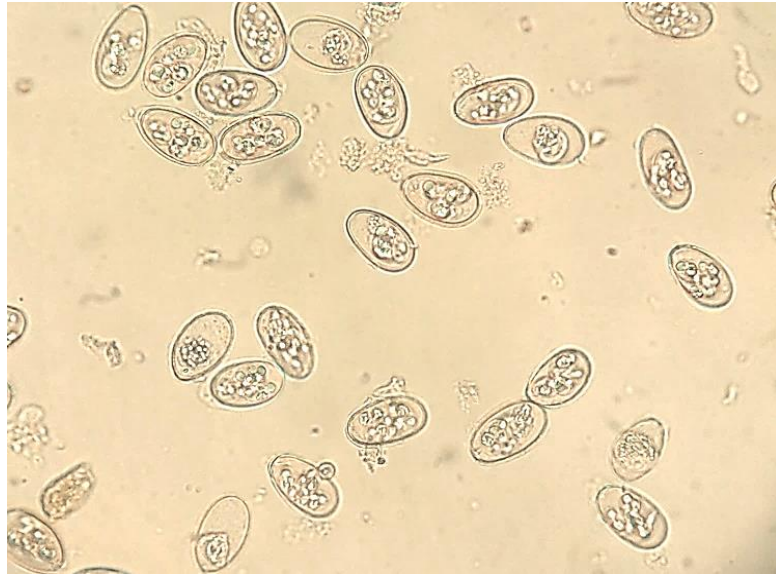
الشكل رقم (13): كبد سليم من مجموعة الشاهد السلب



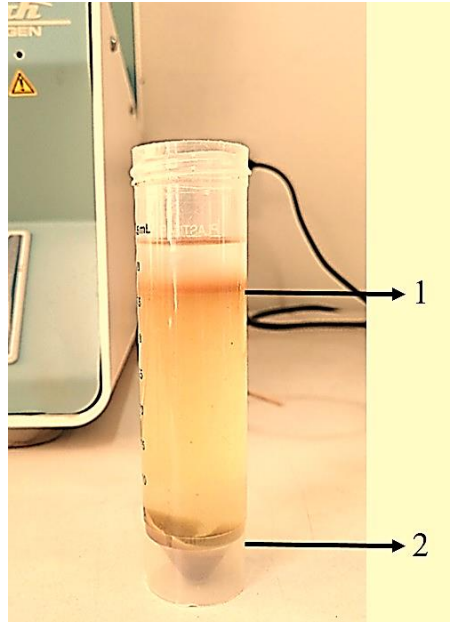
الشكل رقم (14): تضخم الكبد مع وجود عقيدات متنوعة متعددة بيضاء مصفرة في المجموعة (B,C)

5- نتائج عزل البيوض المتكيسة وتبويغها وتنقيتها:

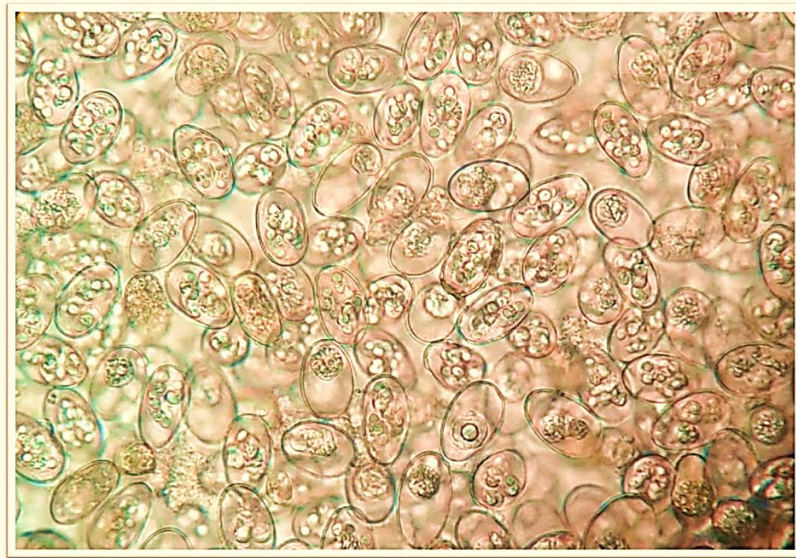
بلغ عدد البيوض المتكيسة المستخلصة من عملية الإكثار هذه حوالي 10^9 بيضة متكيسة لكل مل. وبعد تبويغها بمحلول ثاني كرومات البوتاسيوم 2.5% الذي استغرق 5-7 أيام للحصول على أفضل نسبة تبوغ والتي بلغت 93% الشكل رقم (15)، مع ملاحظة بدء التبوغ من اليوم الثالث، ثم تم عزلها وتنقيتها بنجاح بالمحلول الملحي المشبع حيث فصلت الشوائب بالراسب بينما شكلت البيوض المتكيسة طبقة نقية بين طبقة الملح والماء المقطر، ثم تم تعقيمها باستخدام هيبوكلوريد الصوديوم وغسلها 4-5 مرات بالماء المقطر المعقم كما هو موضح بالشكل رقم (16).



الشكل رقم (15): البيوض المتكيسة أثناء تبويغها X800

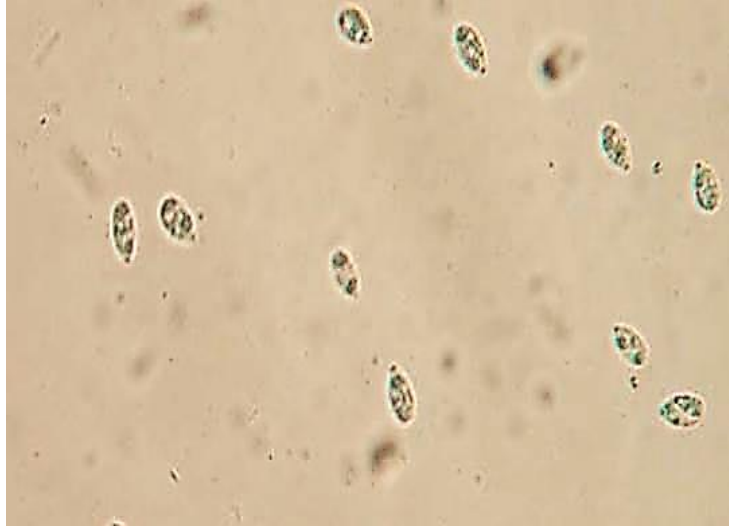


الشكل رقم (16): تنقية البيوض المتكيسة
1-بيوض متكيسة نقية. 2- راسب الشوائب



الشكل رقم (17): البيوض المتكيسة المعقمة المعدة للتكبير 400X

6- نتائج تحضير وتنقية المستضدات: تم تحطيم البيوض المتكيسة المتبوغة بالكرات الزجاجية خلال 10 دقائق تقريباً، وقد أظهرت الدراسة انخفاضاً في عملية تحطيمها مقارنة بالبيوض المتكيسة القديمة بالعمر، إضافة إلى أن الاستمرار بعملية التحطيم لفترات طويلة أدى إلى تحطيم الكيسات البوغية وخروج الحيوانات البوغية (الشكل رقم 18).



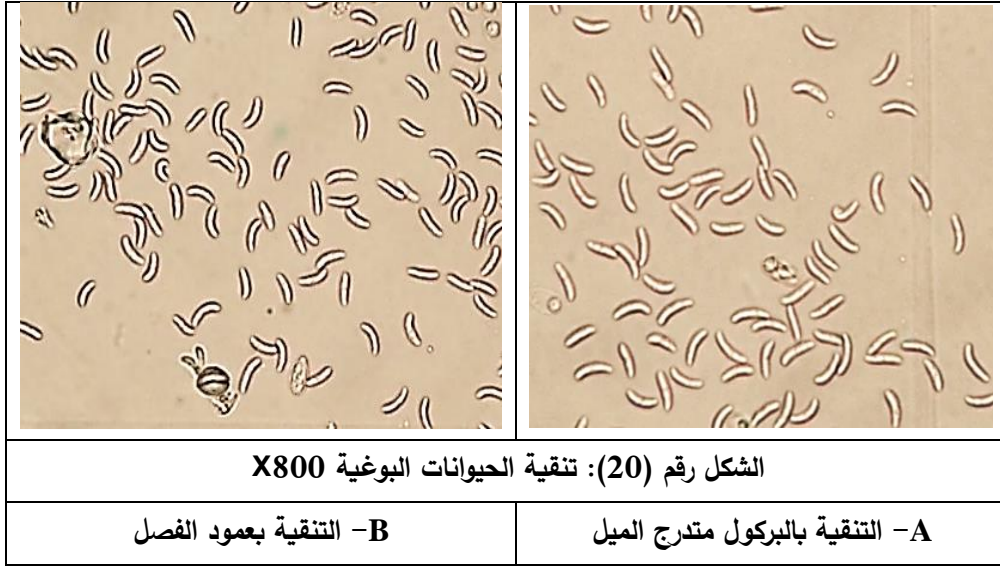
الشكل رقم (18): الكيسات البوغية بعد عملية التحطيم X800

سُجِّلَت نسبة الإخراج للحيوانات البوغية من الكيسات البوغية بحدود 55-65% وذلك بعد حضنها لمدة ساعة ونصف، وقد أظهرت النتائج تأخر وانخفاض في نسبة الحصول عليها عند استخدام البيوض المتكيسة التي يزيد عمرها عن ثلاثة أشهر (الشكل رقم 19).



الشكل رقم (19): الحيوانات البوغية بمحلول الإخراج X400

وقد ارتبط عدد الحيوانات البوغية ونقاوتها بطريقة التنقية. حيث تم الحصول على نتائج أفضل باستعمال البركول متدرج الميل وبالسرعـة 10000 rpm ولمدة 2 دقيقة بدرجة 25 م، بينما تميزت طريقة التنقية باستخدام عمود الفصل بالحصول على عدد كبير من الحيوانات البوغية، لكنها كانت أقل نقاوة من استعمال طريقة التنقية بالبركول متدرج الميل.

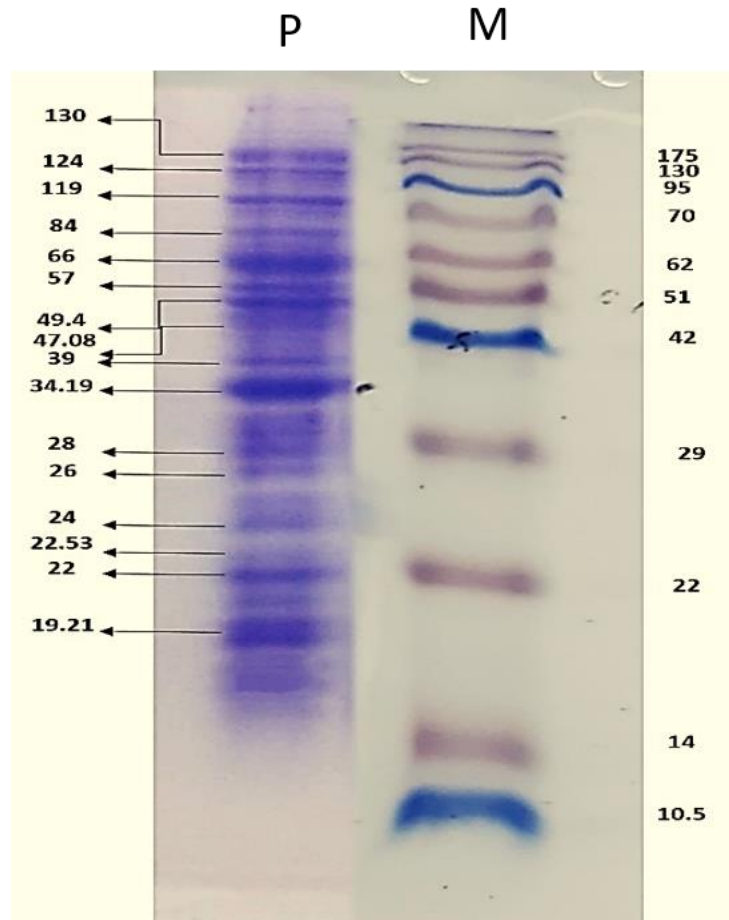


تم تحضير الخلاصات البروتينية من الحيوانات البوغية والبيوض المتكيسة وذلك باستخدام دائرة حل تحتوي المذيب العضوي Np40، استمرت عملية الحل ليلة كاملة عند الدرجة +4 مئوية، وتم التخلص من البقايا الخلوية بعملية النبد، كما تم تحضير الخلاصات البروتينية للأطوار ذاتها بالتعريض للأمواج فوق الصوتية عند درجة 60 كيلو هرتز لخمس مرات لمدة دقيقة كل مرة، وجمع القسم الطافي بعد عملية التثليل، ومن ثم معايرة البروتينات في السائل الطافي باستعمال طريقة برادفورد وبالاعتماد على تركيز معلوم من BSA.

تباينت تراكيز البروتينات المستخلصة من أطوار الطفيلي المختلفة باختلاف تقنية الحصول عليها، حيث بلغ تركيز البروتين المستخلص من (10^9) حيوان بوغي محمله 98 مكغ / 50 ميكرو لتر، بينما وصل تركيزه في خلاصة البروتين للحيوانات البوغية الصوتية 51.03 مكغ/10 ميكرو لتر. في حين بلغ تركيز البروتين المستخلص من (10^9) بيضة متكيسة متبوعة محمله 86 مكروغرام / 50 ماكرو لتر، وكان تركيزه في عينة البيوض المتكيسة المتبوعة وغير المتبوعة الصوتية 58.40 مكغ/10 ميكرو لتر.

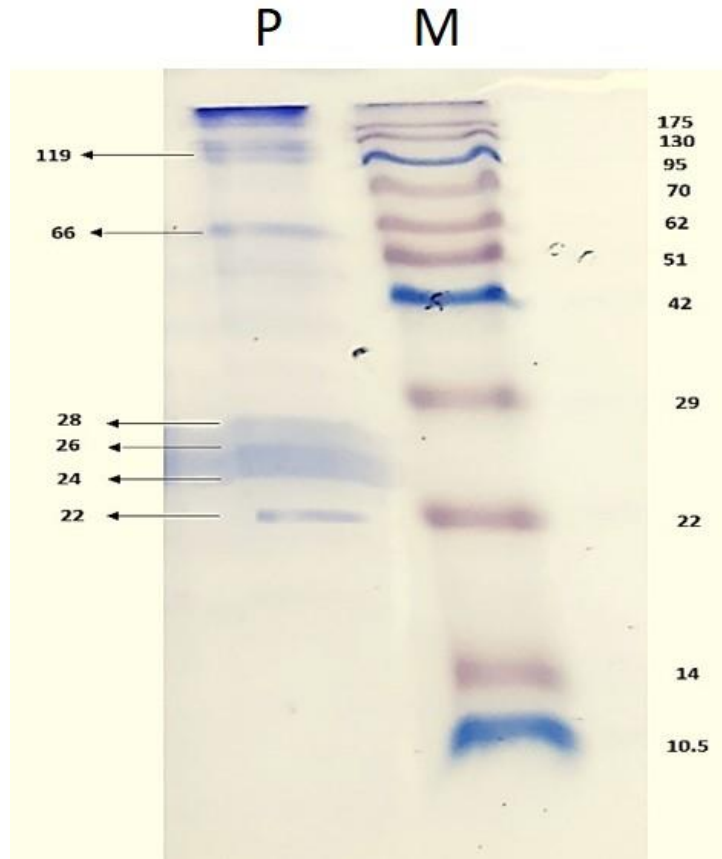
7- نتائج فصل وتحديد الأوزان الجزيئية للخلاصات البروتينية بالرحلان الكهربائي SDS-PAGE:

تم تحديد الأوزان الجزيئية لجميع العصابات بالمقارنة مع واسمات الأوزان الجزيئية المعيارية، وتبين وجود اختلاف في عدد العصابات البروتينية وفي ثخانتها. أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي للخلاصة المحضرة من صوتة طور البيوض المتكيسة المتبوعة وجود 16 عصابة تراوحت أوزانها الجزيئية بين (19.21 و 130) كيلو دالتون وأكثر هذه العصابات تلوناً بصبغة أزرق الكومازي (130-66-49.4-34.19-28-26-24-22) كيلو دالتون، وعُدَّت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور، لأن باقي العصابات كانت أقل تلوناً (الشكل رقم 21).



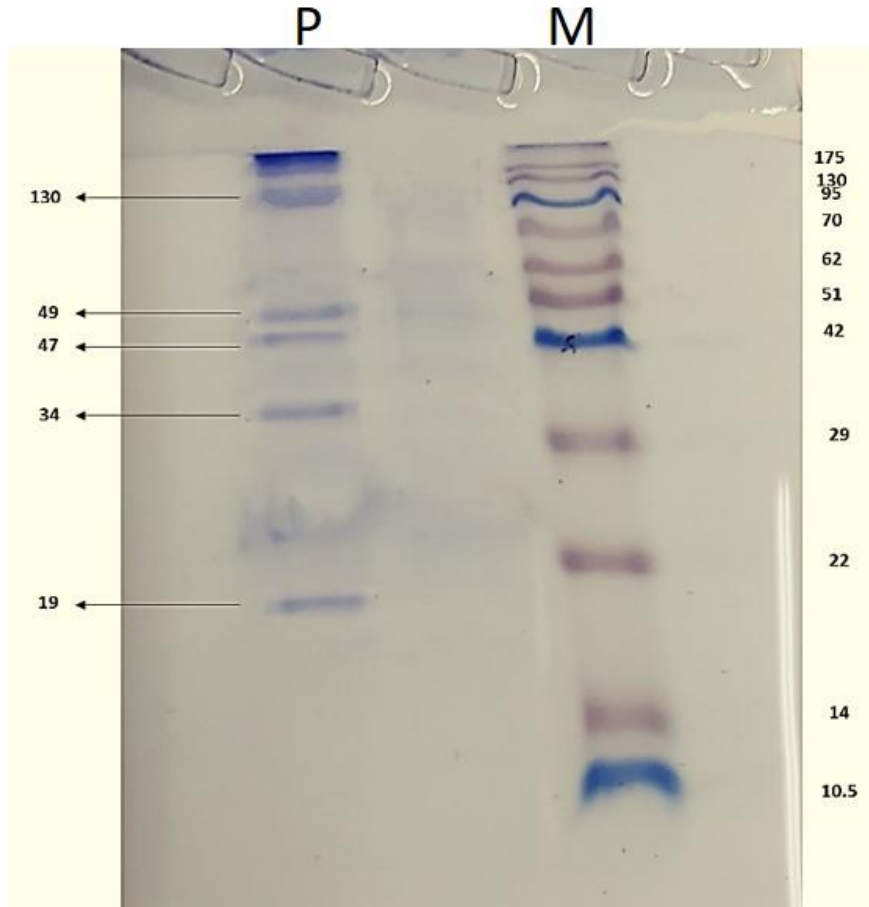
الشكل رقم (21): الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة البيوض المتكيسة المتبوعة الصوتية. M، تمثل الأوزان الجزيئية للواسمات المعيارية. P، الخلاصة البروتينية لطور البيوض المتكيسة المتبوعة الصوتية. تشير الأسهم الى العصابات الرئيسية والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئية بالكيلو دالتون

بينما لوحظ في الخلاصة الطفيلية الناتجة عن صوتنة طور الحيوانات البوغية وجود حوالي 6 عصابات، وبلغت أوزانها الجزيئية (22-24-26-28-66-119) كيلو دالتون، واعتبرت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً من هذا الطور لحياة الطفيلي (الشكل رقم 22).



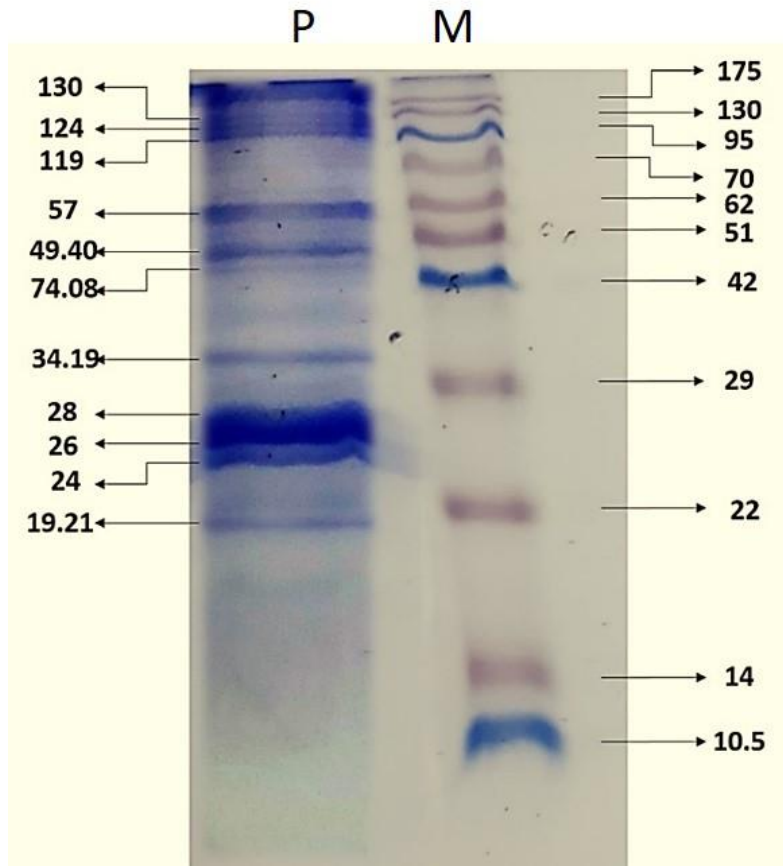
الشكل رقم (22): الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة الحيوان البوغي الصوتية. M، تمثل الأوزان الجزيئية للواسمات المعيارية. P، الخلاصة البروتينية لصوتنة الحيوان البوغي. تشير الأسهم الى العصائب الرئيسية والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئية بالكيلو دالتون

في حين أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي للخلاصة المحضرة من صوتنة طور البيوض المتكيسة غير المتبوغة وجود 5 عصائب تراوحت أوزانها الجزيئية (19-34-47-49-130) كيلو دالتون، وعُدَّت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور (الشكل رقم 23).



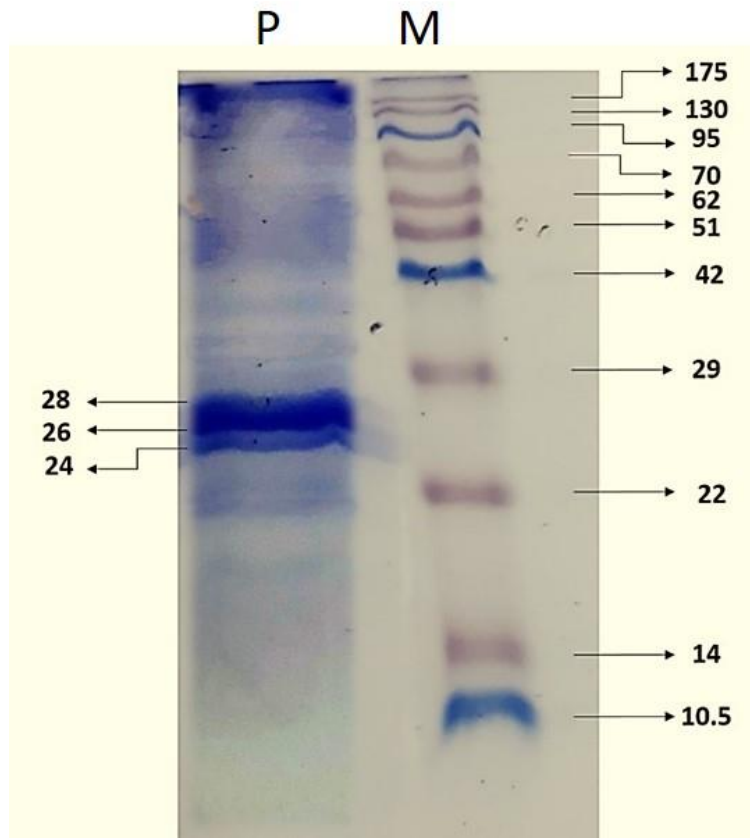
الشكل رقم (23): الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة البيوض المتكيسة غير المتبوغة الصواتة. M، تمثل الأوزان الجزيئية للواسمات المعيارية. P، الخلاصة البروتينية لصوتنة البيوض المتكيسة غير المتبوغة. تشير الأسهم الى العصائب الرئيسية والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئية بالكيلو دالتون

كما أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي للخلاصة المحضرة من حلمهة طور البيوض المتكيسة المتبوغة وجود 11 عصابة تراوحت أوزانها الجزيئية بين (19.21 و 130) كيلو دالتون وأكثر هذه العصائب تلوناً بصبغة أزرق الكومازي (130-119-57-49.4-34.19-28-26-24) كيلو دالتون، وعُدَّت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور، لأن باقي العصائب كانت أقل تلوناً (الشكل رقم 24).



الشكل رقم (24): الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة حلمة البيوض المتكيسة المتبوعة. M، تمثل الأوزان الجزيئية للواسمات المعيارية. P، الخلاصة البروتينية لحلمة البيوض المتكيسة المتبوعة. تشير الأسهم الى العصائب الرئيسية والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئية بالكيلو دالتون

بينما لوحظ في الخلاصة الطفيلية الناتجة عن حلمة طور الحيوانات البوغية وجود حوالي 3 عصائب، وبلغت أوزانها الجزيئية (28-26-24) كيلو دالتون، واعتبرت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور من حياة الطفيلي (الشكل رقم 25).



الشكل رقم (25): الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد لخلاصة لحمية الحيوانات البوغية. M، تمثل الأوزان الجزيئية للواسمات المعيارية. P، الخلاصة البروتينية لحمية الحيوانات البوغية. تشير الأسهم الى العصابات الرئيسية والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئية بالكيلو دالتون

ولدى مقارنة النتائج التي حصلنا عليها بالرحلان الكهربائي للخلاصات البروتينية لطوري الطفيلي، تبين وجود عدد من المستضدات المشتركة وهي البروتينات ذات الأوزان الجزيئية: (22-24-26-28-66-119) كيلو دالتون. (الجدول رقم16)

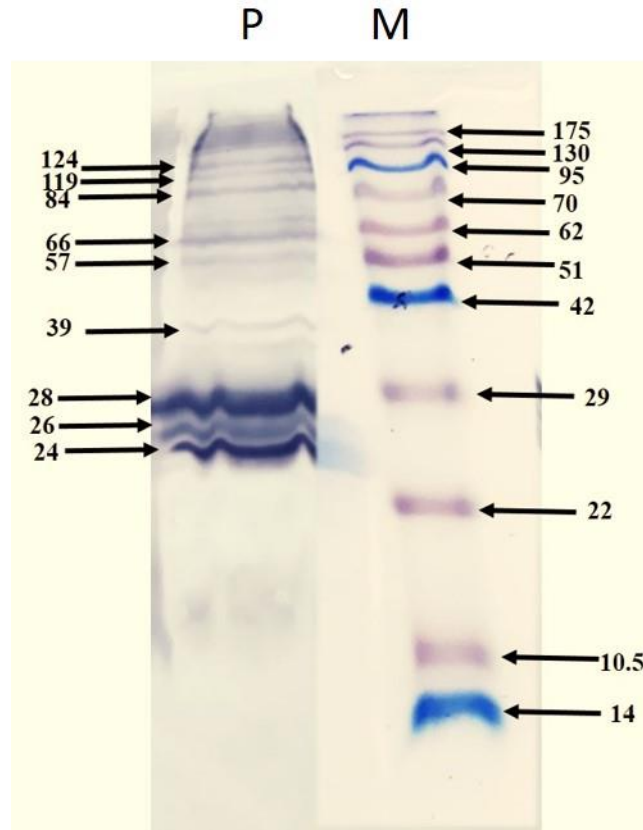
الجدول رقم (16): بروتينات الخلاصات الخلوية لأطوار طفيلي الأيمرية السُتيدَاوِيَّة

بروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة	بروتينات البيوض المتكيسة غير المتبوعة	بروتينات الحيوانات البوغية	بروتينات مشتركة بين الأطوار
19.21 KDa	19 KDa	22 KDa	22 KDa
22 KDa	34 KDa	24 KDa	24 KDa
22.53 KDa	47 KDa	26 KDa	26 KDa
24 KDa	49 KDa	28 KDa	28 KDa
26 KDa	130 KDa	66 KDa	66 KDa
28 KDa		119 KDa	119 KDa
34.19 KDa			
39 KDa			
47.08 KDa			
49.40 KDa			
57 KDa			
66 KDa			
84 KDa			
119 KDa			
124 KDa			
130 KDa			

8-دراسة القدرة الاستمناعية لمكونات الخلاصات البروتينية بتقانة التبصيم المناعي:

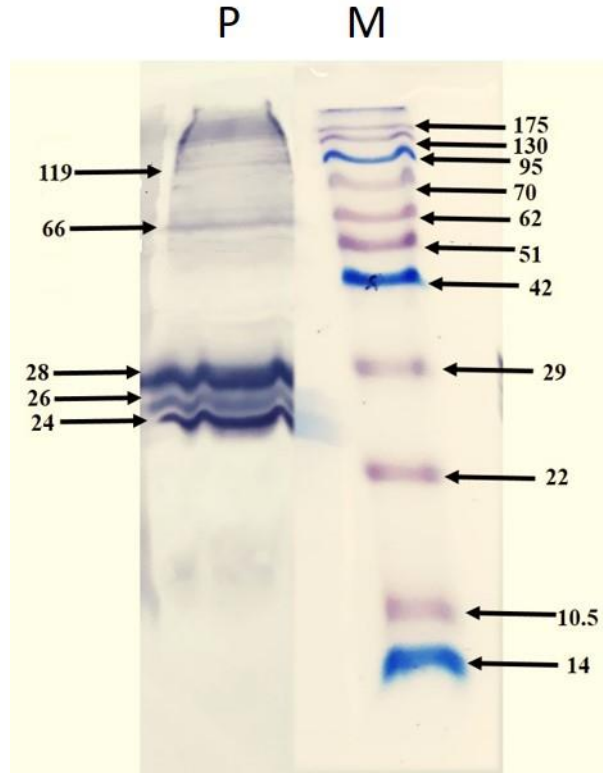
لتحديد المستضدات ذات الفعالية الاستمناعية بالخلاصات البروتينية الناتجة عن حلّ الطفيلي في طوري البيوض المتكيسة غير المتبوعة والمتبوعة والحيوانات البوغية، استعملت تقنية التبصيم المناعي أو ما يعرف بتبصيم ويستيرن للكشف عن المستضدات التي تحرض الجهاز المناعي على تشكيل أضداد نوعية في أمصالها. من أجل ذلك تم فصل المكونات البروتينية للخلاصات البروتينية المحضرة من أطوار الأيمرية، ثم نقلت البروتينات من هلامات عديد الأكريلاميد إلى أغشية من النتروسيللوز، وحضنت مع مصّل الأرانب المخموجة تجريبياً والتي تم الحصول عليها في اليوم 14 بعد الخمج لتحديد أي من هذه المستضدات يظهر أولاً.

كشفت نتائج التبصيم المناعي باستخدام مصّل الأرانب المجموعة في اليوم 14 بعد الخمج وتحضيرها مع البروتينات الناتجة عن صوتة طور البيوض المتكيسة المتبوعة عن عدد من المستضدات ذات القدرة الاستمناعية والتي بلغت أوزانها الجزيئية (24-26-28-39-57-66-84-119-124) كيلو دالتون. الشكل رقم (26)



الشكل رقم (26): التبصيم المناعي لمستضدات البيوض المتكيسة المتبوغة الصوتية. (P) مصم الأرانب باليوم 14 بعد التحدي. (M)، واسم الأوزان الجزيئية. تشير الأسهم الى العصاب الرئيسية والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئية بالكيلو دالتون.

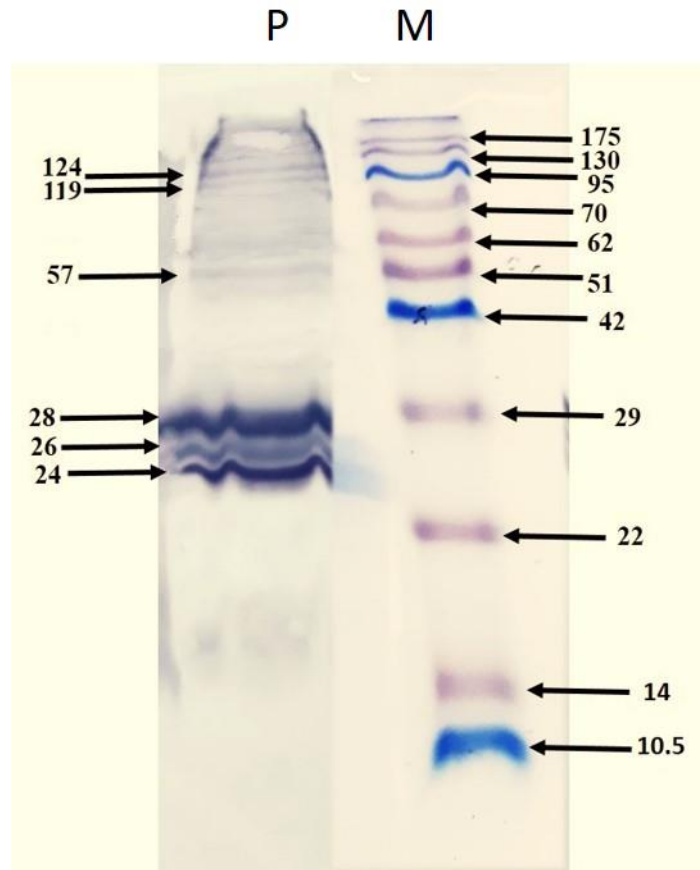
بينما ظهرت خمس عصاب شديدة التلوين تبلغ أوزانها الجزيئية: (24، 26، 28، 66، 119) كيلو دالتون من استخدام مصم الأرانب المجموعة في اليوم 14 بعد الخمج وتحضيرها مع البروتينات الناتجة عن صوتنة طور الحيوان البوعي. الشكل رقم (27)



الشكل رقم (27): التبصيم المناعي لمستضدات الحيوانات البوغية الصوتة. (P) مصل الأرناب باليوم 14 بعد الخمج. (M)،
واسم الأوزان الجزيئية تشير الأسهم الى العصابات الرئيسية والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئية بالكيلو دالتون.

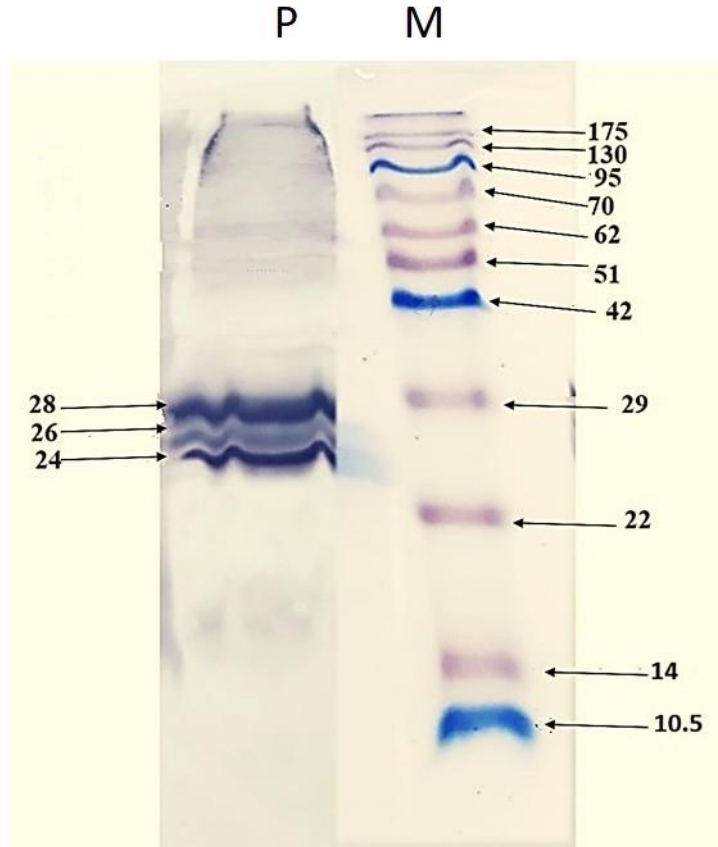
في حين لم تكشف نتائج التبصيم المناعي عن وجود أي عصابة باستخدام مصل الأرناب المجموعة في اليوم 14 بعد الخمج وتحضينها مع البروتينات الناتجة عن صوتة طور البيوض المتكيسة غير المتبوغة، مما يدل على عدم وجود أي مستضد ذو قدرة استمناعية في هذا الطور.

كما أوضحت نتائج التبصيم المناعي باستخدام مصل الأرناب المجموعة في اليوم 14 بعد الخمج وتحضينها مع البروتينات الناتجة عن حمهة طور البيوض المتكيسة المتبوغة عن عدد من المستضدات ذات القدرة الاستمناعية والتي بلغت أوزانها الجزيئية (24-26-28-57-119-124) كيلو دالتون. الشكل رقم (28)



الشكل رقم (28): التبصيم المناعي لمستضدات حملة البيوض المتكيسة المتبوعة. (P) مصّل الأرانب باليوم 14 بعد الخمج. (M) واسم الأوزان الجزيئية تشير الأسهم الى العصابات الرئيسية والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزيئية بالكيلو دالتون.

بينما ظهرت ثلاث عصابات شديدة التلوين تبلغ أوزانها الجزيئية: (24، 26، 28) كيلو دالتون من استخدام مصّل الأرانب المجموعة في اليوم 14 بعد الخمج وتحضيرها مع البروتينات الناتجة عن حملة طور الحيوان البوغي. الشكل رقم (29)



الشكل رقم (29): التبرع المناعي لمستضدات حمىة الحيوانات البوغية. (P) مصم الأرانب باليوم 14 بعد الخمج. (M) واسم الأوزان الجزئية تشير الأسهم الى العصائب الرئيسة والأرقام التي بجوارها إلى أوزانها الجزئية بالكيلو دالتون.

9- قياس متوسط نشاط الإنزيمات (ALT-AST-ALP) في مجموعات التجربة:

يعد قياس نشاط الإنزيمات مؤشراً يسمح بتحديد درجة الآفات النسيجية أو الخلوية، إذ يؤدي فقدان سلامة الأغشية الخلوية إلى خروج الإنزيمات إلى الوسط الخارج خلوي (Silva et al., 2007). تُطلق الإنزيمات الكبدية عادةً بسبب تلف خلايا الكبد الناجم عن التخر أو ضرر الأغشية الخلوية الكبدية، وبالتالي يعدّ قياس هذه الإنزيمات في مصم الدم مؤشراً للحالة الصحية للكبد.

- متوسط قيمة إنزيم ال ALT:

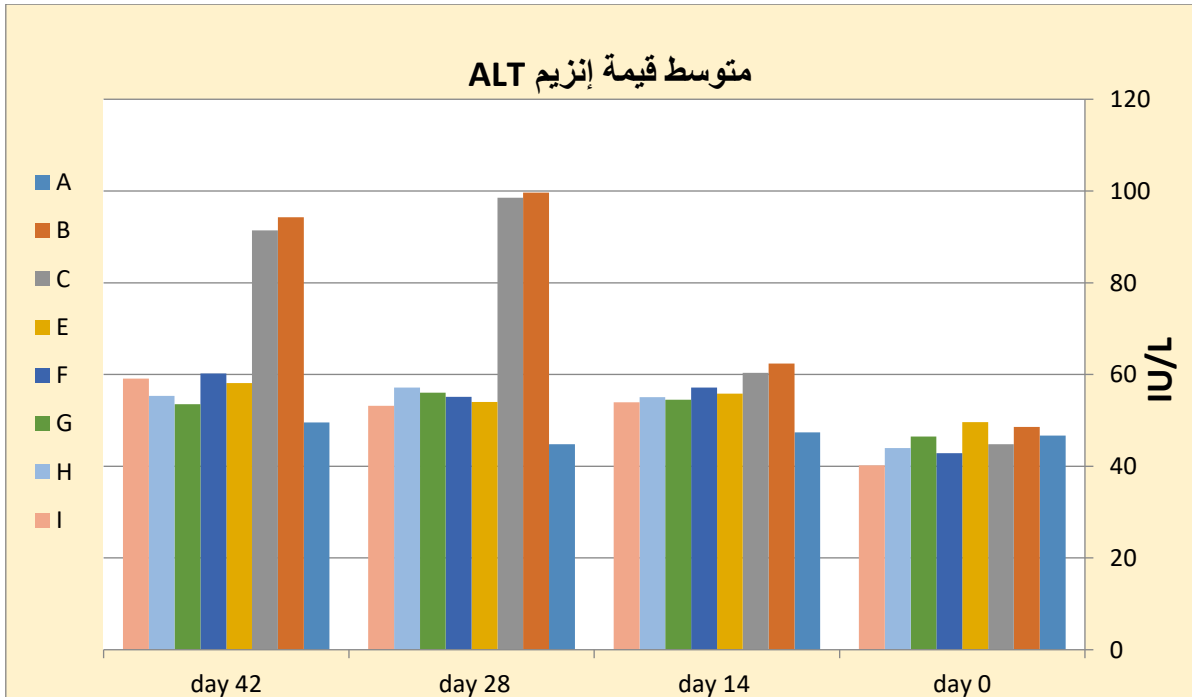
تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن متوسط قيمة إنزيم الكبد (ALT) عند مجموعة الشاهد السلبى كانت ضمن مجال القيم الطبيعية، بينما ارتفع متوسط قيمة الإنزيم في مجموعة الشاهد الإيجابى (المجموعة B) و المجموعة C بشكلٍ معنوي (P≤0.05) مقارنة مع مجموعة الشاهد السلبى (المجموعة A) ومع المجموعات الملقحة بعد الأسبوع الثاني من جرعة التحدي الجدول رقم (17)، وبلغ الارتفاع أشده في اليوم 28 (IU/L 99.66).

الجدول رقم (17): متوسط قيمة إنزيم (ALT) في مجموعات التَّجربة خلال فترات التجربة

المعيار الدموي المدروس إنزيم ناقلة أمين الألانين (Alanine Aminotransferase) (ALT) مقدراً بوحدة دولية/ لتر (IU/L)				
مجالات القيم المرجعية: (19-73) (Archetti et al., 2008)				
فترة التجربة period				المجموعات
الأولى (اليوم 0)	الثانية (اليوم 14)	الثالثة (اليوم 28)	الرابعة (اليوم 42)	
SD ± X	SD ± X	SD ± X	SD ± X	
1.64± 46.72	2.54± ^a 47.40	4.16 ± ^a 44.80	6.59 ± ^a 49.54	A
1.05 ± 48.55	7.33 ± ^b 62.41	3.86 ± ^b 99.66	4.07 ± ^b 94.30	B
1.01 ± 44.77	9.33 ± ^b 60.33	5.03 ± 98.55 ^b	4.88 ± ^b 91.44	C
2.23 ± 49.61	3.12 ± ^a 55.82	5.16 ± ^a 54.04	6.23 ± ^a 58.14	E
2.14 ± 42.88	4.02 ± ^a 57.15	4.09 ± ^a 55.12	7.23 ± ^a 60.25	F
2.43 ± 46.47	1.60 ± ^a 54.52	1.77 ± ^a 56.02	0.44 ± ^a 53.50	G
2.61 ± 43.93	1.44 ± ^a 55.09	2.50 ± ^a 57.17	1.11 ± ^a 55.33	H
2.02 ± 40.22	2.92 ± ^a 53.97	6.88 ± ^a 53.21	8.11 ± ^a 59.14	I

a تدل على وجود فرق معنوي عند المقارنة ما بين مجموعة الشاهد الإيجابي (المجموعة B) والمجموعة الثالثة (المجموعة C) وبين المجموعات الأخرى حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P \leq 0.05$.

b تدل على وجود فرق معنوي عند المقارنة ما بين مجموعة الشاهد السلبي (المجموعة A) والمجموعات الأخرى حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P \leq 0.05$.



المخطط رقم 4: متوسط قيمة إنزيم (ALT) في مجموعات التَّجربة خلال فترات التجربة

- متوسط قيمة إنزيم ال AST:

تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن متوسط قيمة إنزيم الكبد (AST) عند مجموعة الشاهد السليبي كانت ضمن مجال القيم الطبيعيّة، بينما ارتفع متوسط قيمة الإنزيم السابق في مجموعة الشاهد الإيجابي (المجموعة B) والمجموعة C بشكلٍ معنويّ ($P < 0.05$) مقارنة مع مجموعة الشاهد السليبي (المجموعة A) ومع المجموعات الملقحة بعد الأسبوع الثاني من جرعة التحدي الجدول رقم (18)، وبلغ الارتفاع أشده في اليوم 42 (102.71 IU/L).

الجدول رقم (18): متوسط قيمة الإنزيم (AST) في مجموعات التّجربة خلال فترات التجربة

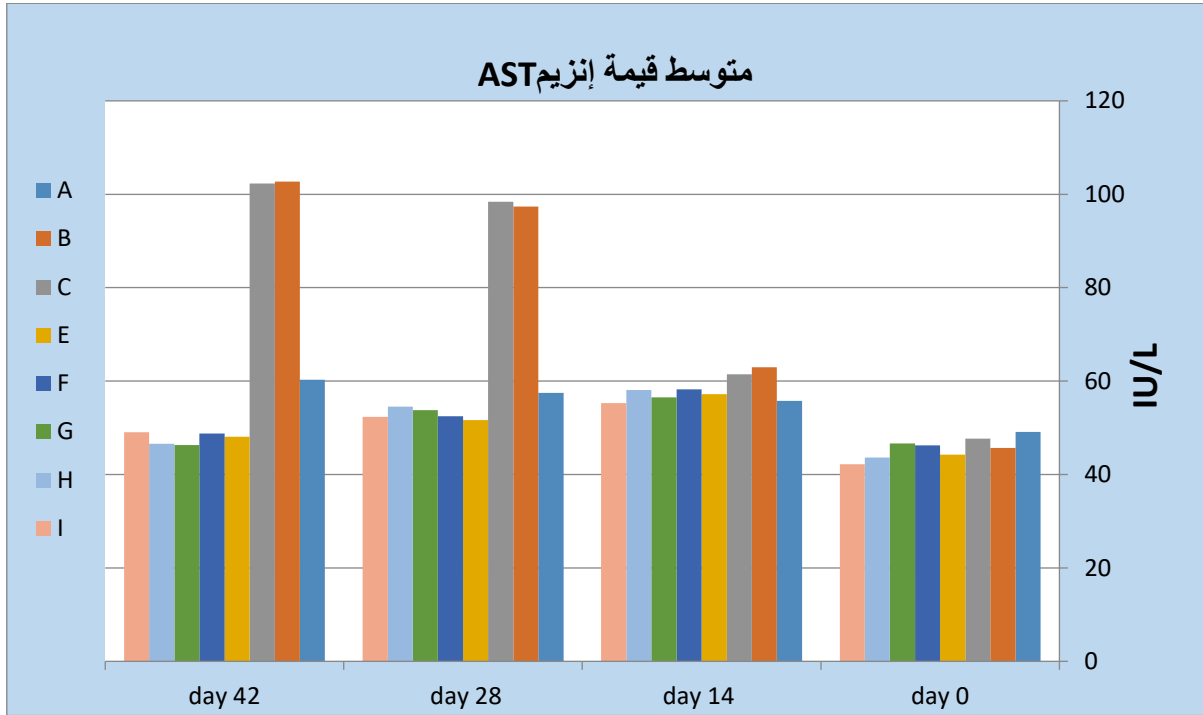
المعيار الدموي المدروس إنزيم ناقلة أمين الأسبارتات (Aspartate Aminotransferase) (AST) مقدرًا بوحدة دولية/ لتر (IU/L)				
مجالات القيم المرجعية: (17-98) (Archetti et al., 2008)				
فترة التجربة period				المجموعات
الأولى (اليوم 0)	الثانية (اليوم 14)	الثالثة (اليوم 28)	الرابعة (اليوم 42)	
SD ± X	SD ± X	SD ± X	SD ± X	
5.95 ± 49.15	7.10 ± 55.76 ^a	5.90 ± 57.45	4.51 ± 60.31 ^a	A
5.62 ± 45.66	8.05 ± 62.93	3.45 ± 97.38 ^b	7.11 ± 102.71 ^b	B
5.18 ± 47.66	9.05 ± 61.44	3.71 ± 98.38 ^b	6.97 ± 102.33 ^b	C
8.1 ± 44.23	4.71 ± 57.18 ^a	31.82 ± 51.68 ^a	25.8 ± 48.08 ^a	E
8.8 ± 46.23	5.71 ± 58.22 ^a	33.20 ± 52.50 ^a	24.91 ± 48.77 ^a	F
5.95 ± 46.67	7.10 ± 56.53 ^a	5.90 ± 53.80 ^a	4.51 ± 46.29 ^a	G
5.33 ± 43.67	8.10 ± 58.07 ^a	6.01 ± 54.55 ^a	5.02 ± 46.55 ^a	H
7.4 ± 42.23	5.31 ± 55.27 ^a	32.62 ± 52.33 ^a	26.09 ± 49.08 ^a	I

a تدل على وجود فرق معنوي عند المقارنة ما بين مجموعة الشاهد الإيجابي (المجموعة B) والمجموعة الثالثة

(المجموعة C) وبين المجموعات الأخرى حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P \leq 0.05$.

b تدل على وجود فرق معنوي عند المقارنة ما بين مجموعة الشاهد السليبي (المجموعة A) والمجموعات الأخرى حيث

اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P \leq 0.05$.



المخطط رقم 5: متوسط قيمة إنزيم (AST) في مجموعات التجربة خلال فترات التجربة

- متوسط قيمة إنزيم ال ALP:

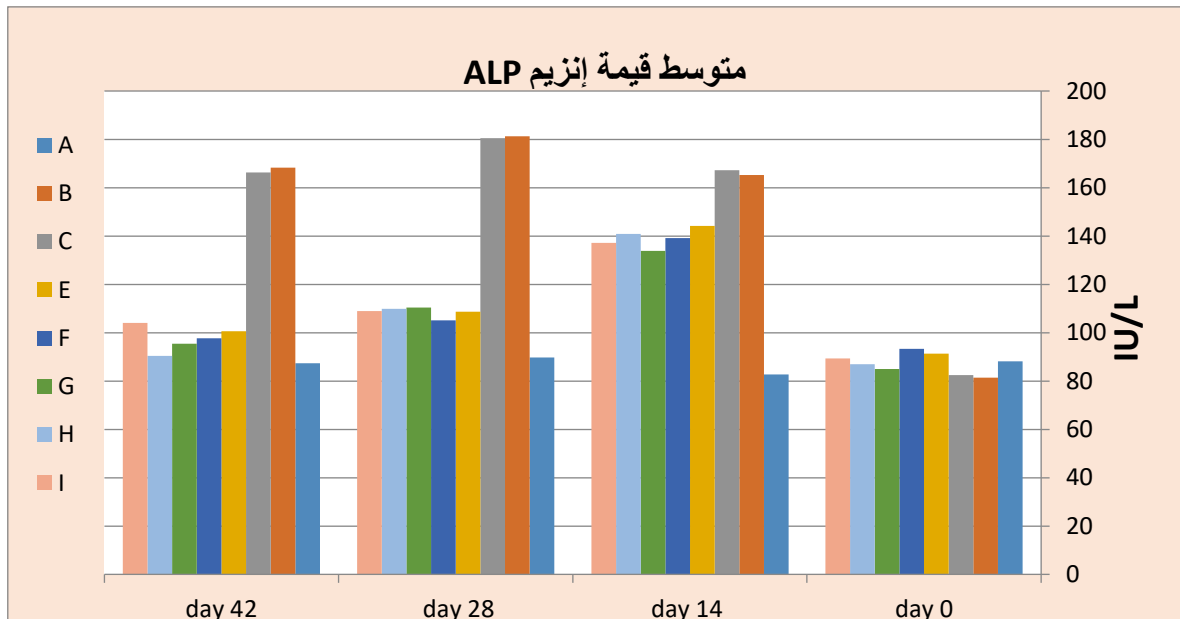
تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن متوسط قيمة إنزيم الكبد (ALP) عند مجموعة الشاهد السلبية كانت ضمن مجال القيم الطبيعية، بينما ارتفع متوسط قيمة الإنزيم السابق في مجموعة الشاهد الإيجابي (المجموعة B) والمجموعة C بشكلٍ معنويٍّ ($P < 0.05$) مقارنة مع مجموعة الشاهد السلبية (المجموعة A) ومع المجموعات الملقحة بعد الأسبوع الثاني من جرعة التحدي الجدول رقم (19)، وبلغ الارتفاع أشده في اليوم 28 (IU/L 181.26). كما يوضح المخطط رقم (6)

الجدول رقم (19): متوسط نشاط الإنزيم (ALP) في مجموعات التجريبية خلال فترات التجربة

المعيار الدموي المدروس إنزيم الفوسفاتاز القلوية (ALP) Alkaline Phosphatase مقدرًا بوحدة دولية / ليتر (IU/L)				
مجالات القيم المرجعية: (Hillyer et al., 1997) (96-10)				
فترة التجربة period				المجموعات
الأولى (اليوم 0)	الثانية (اليوم 14)	الثالثة (اليوم 28)	الرابعة (اليوم 42)	
SD ± X	SD ± X	SD ± X	SD ± X	
10.06 ± 88.17	9.31 ± 82.74 ^a	9.83 ± 89.74	8.80 ± 87.41 ^a	A
7.73 ± 81.46	9.43 ± 165.21 ^b	5.12 ± 181.26 ^b	9.81 ± 168.28 ^b	B
8.73 ± 82.46	9.22 ± 167.21 ^b	5.66 ± 180.44 ^b	8.55 ± 166.28 ^b	C
9.34 ± 91.31	8.91 ± 144.21 ^{a b}	7.34 ± 108.62 ^a	11.61 ± 100.63 ^a	E
8.34 ± 93.31	8.45 ± 139.21 ^{a b}	7.03 ± 105.12 ^a	10.55 ± 97.63 ^a	F
6.24 ± 84.96	7.16 ± 133.90 ^{a b}	8.63 ± 110.45 ^a	5.86 ± 95.40 ^a	G
5.24 ± 86.96	7.89 ± 140.90 ^{a b}	8.01 ± 109.88 ^a	6.09 ± 90.40 ^a	H
7.34 ± 89.31	7.91 ± 137.21 ^{a b}	8.84 ± 108.99 ^a	9.21 ± 104.01 ^a	I

a تدل على وجود فرق معنوي عند المقارنة ما بين مجموعة الشاهد الإيجابي (المجموعة B) والمجموعة الثالثة (المجموعة C) وبين المجموعات الملقحة حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P \leq 0.05$.

b تدل على وجود فرق معنوي عند المقارنة ما بين مجموعة الشاهد السلبي (المجموعة A) والمجموعات الأخرى حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P \leq 0.05$.



المخطط رقم 6: متوسط قيمة إنزيم (ALP) في مجموعات التجريبية خلال فترات التجربة

10- نتائج قياس عيار الأضداد عند الأرانب الملقحة في اختبار التراص الدموي اللامباشر:

بينت نتائج الاختبار (الجدول رقم 20) أن متوسط مستوى عيار الأضداد في اليوم 14 بعد التلقيح قد وصل في المجموعة G إلى (532.7) وفي المجموعة H إلى (489.2) مع وجود فروقات معنوية بشكلٍ معنوي ($P < 0.05$) مقارنة مع المجموعات الأخرى، كما أوضحت النتائج استمرار ارتفاع متوسط عيار الأضداد في المجموعات الملقحة ليصل إلى أعلى قيمة في اليوم 28 بعد التلقيح، ليبدأ متوسط عيار الأضداد بالانخفاض في اليوم 42 بعد التلقيح مع استمرار وجود فروقات معنوية بين المجموعات الملقحة بالحيوانات البوغية (G,H) والمجموعات (E,F,I) دون وجود فروقات معنوية بين تلك المجموعات فيما بينها. ولوحظ من خلال نتائج هذا الاختبار وجود فروقات معنوية واضحة بين المجموعات الملقحة مقارنة مع مجموعة الشاهد الإيجابي (B) والمجموعة الثالثة (C). من ناحية أخرى لم يتم ملاحظة الكثير من الاختلاف في متوسط عيار الأضداد عن القيمة الأولية في المجموعتين (B,C) باستثناء الارتفاع المعتدل في اليوم 28 بعد جرعة التحدي.

الجدول رقم (20): يوضح المتوسط الحسابي لمربع لوغاريتم مقلوب تمديد المصل لمستوى الأضداد في مجموعات

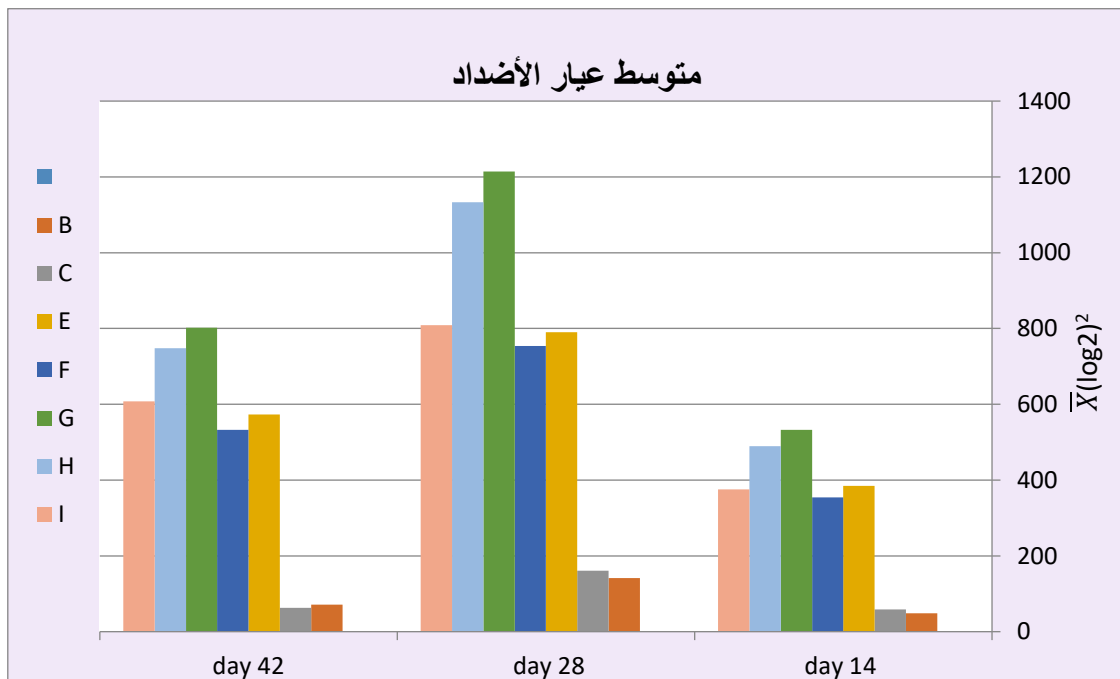
التجربة (المتوسط الحسابي $(\log 2)\bar{X} \pm$ الانحراف المعياري (SD))

اليوم عند سحب الدم			المجموعات
42	28	14	
$(\log 2)^2 \pm SD\bar{X}$	$(\log 2)^2 \pm SD\bar{X}$	$(\log 2)^2 \pm SD\bar{X}$	
$71.7^a \pm 8.1$	$141.8^a \pm 10.2$	$48.55^a \pm 4.9$	B
$62.7^a \pm 8.1$	$160.8^a \pm 9.2$	$58.33^a \pm 6.5$	C
$573.1^{ab} \pm 70.7$	$789.8^{abc} \pm 75.2$	$384.6^{ab} \pm 42.7$	E
$532.7^{ab} \pm 88.1$	$753.4^{abc} \pm 65.8$	$354.2^{ab} \pm 33.4$	F
$801.8^b \pm 77.8$	$1214.5^b \pm 55.8$	$532.7^b \pm 35.6$	G
$747.7^b \pm 35.6$	$1133.1^b \pm 52.3$	$489.2^b \pm 25.4$	H
$607.5^{ab} \pm 50.2$	$809.1^{abc} \pm 55.1$	$375.4^{ab} \pm 53.9$	I

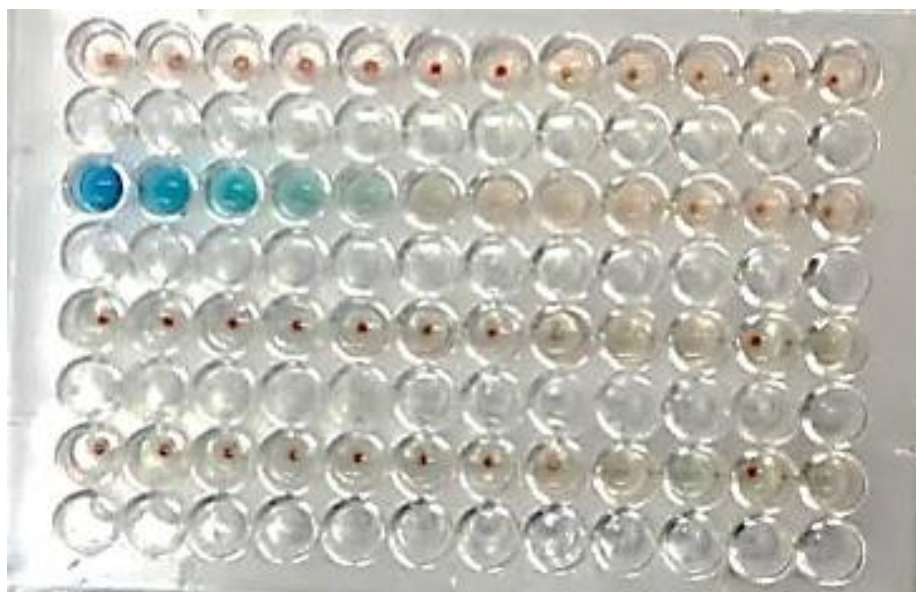
a تدل على وجود فرق معنوي عند المقارنة ما بين المجموعة (G,H) والمجموعات الأخرى حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P \leq 0.05$.

b تدل على وجود فرق معنوي عند المقارنة ما بين المجموعة (B,C) والمجموعات الأخرى حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P \leq 0.05$.

c تدل على وجود فرق معنوي عند المقارنة ما بين المجموعة (G,H) والمجموعات (E,F,I) حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى الاحتمالية $P \leq 0.05$.



المخطط رقم 7: المتوسط الحسابي لمربع لوغارتيم مقلوب تمديد المصل لمستوى الأضداد في مجموعات التجربة



الشكل رقم (30): يوضح أحد أطباق اختبار التراص اللامباشر



يعد داء الأكريات الكبدي في الأرانب من أهم الأمراض التي تهدد صناعة إنتاج الأرانب. حيث ظهرت الأعراض السريرية على الأرانب المصابة تقريبًا في جميع الدراسات السابقة على الأكريات الكبدية في الأرانب (Abu-Akkada et al., 2010; Al-Naimi et al., 2012; Pakandl, 2013). وتكون بعض هذه الأعراض مثل الخمول وفقدان الشهية تكون عامة لجميع الأمراض المعدية، ومع ذلك، فإن انتفاخ البطن واليرقان هما مؤشران على عدوى الكبد التي لا تقتصر على الأكريات الكبدية. وبالتالي، من الصعب تشخيص هذا المرض اعتمادًا كليًا على العلامات السريرية.

يعد طور الحيوانات البوغية هو الطور الغازي للخلايا الظهارية، ومن المعروف ان هنالك تماس بين المستضدات السطحية لهذا الطور مع الخلايا الظهارية للمضيف وهي جزيئات مهمة لالتصاق الحيوانات البوغية بمستقبلات غشائية على الخلايا الظهارية، وهذه الآلية ضرورية لتحقيق عملية اجتياح الخلايا (Martin et al., 1994). لذا تركزت معظم الدراسات المناعية على اختيار طور الحيوان البوغي لتحضير اللقاح (Brothers et al., 1988; Danforth and McAndrew, 1987).

تمحورت دراستنا حول طريقتين للحصول على الخلاصة البروتينية (الحممة والأمواج فوق الصوتية) من أطوار طفيلي الأيمرية السّتيداوية *Eimeria stiedae*، واستخدام هذه الخلاصات كلقاح ضد داء الأكريات الكبدي عند الأرانب وتقييمها كلقاح فعال في الحماية من هذا الداء. كما تركزت الدراسة على طورين رئيسين من دورة حياة الأيمرية السّتيداوية وهما الطور الخامج البيوض المتكيسة المتبوغة، والطور الغازي للخلايا الظهارية للقنوات الصفراوية وهو الحيوانات البوغية.

أظهرت الدراسة نجاح عملية إكثار البيوض المتكيسة وتبويغها عن طريق الخمج التجريبي لأرانب بعمر (6-8) أسابيع، بجرعة $(10^4 \times 5)$ فمويًا ولمرة واحدة واتفقت بذلك مع (Abu-El-Ezz et al., 2012; Balbaa et al., 2012).

تم عزل البيوض المتكيسة لطفيلي الأيمرية السّتيداوية من كبد وصفراء الأرانب بطريقة (Dalloul et al., 2003) التي تم تطبيقها على الأيمرية الرّهيفة *Eimeria tenella*، وكانت عملية عزلها أسهل من بقية أنواع الأيمرية واتفقت بذلك مع (Tomley, 1997; Катранджи, 1988). ثم أخضعت بعدها لعملية التبويغ بثاني كرومات البوتاسيوم، حيث تم الحصول على تبوغ بنسبة 93% خلال (5-7) أيام واتفقت مع (المحمد، 2017; الوهيب، 2018)، في حين استغرق التبوغ عند (ونوس، 2017) ثلاثة أيام وقد يكون بسبب الاختلاف في ذلك هو درجة حرارة الحضان أو عمر البيوض المتكيسة.

تم تنقية البيوض المتكيسة المتبوغة وغير المتبوغة بطريقة التعويم باستعمال محلول ملح الطعام المشبع وتعقيمها بمحلول هيبوكلوريد الصوديوم (الإدريس، 2014)، أخضعت بعدها للتطهير حيث تم الحصول على أعداد كبيرة من الكيسات البوغية نتيجة تحطيم البيوض المتكيسة حديثة التبوغ باستعمال الكرات الزجاجية مقارنة بالبيوض المتكيسة القديمة التي يزيد عمرها عن 3 اشهر بسبب زيادة قساوة جدارها مع مرور الوقت ومن ثم صعوبة تحطيمها واتفقت نتائجنا مع (Abi Ghanem, 2010) و(الإدريس، 2014).

تم استخراج الحيوانات البوغية من الكيسات البوغية بإضافة الترسيب والصفراء الى محلول الاخراج مما أدى الى ذوبان غطاء الكيسات البوغية وخروج الحيوانات البوغية منها، حيث تراوحت نسبة الاستخراج 55-65%. وتعد هذه الطريقة الأكثر استخداماً (Dulski, 1990).

تختلف النسبة المئوية للاستخراج بالاعتماد على عدة عوامل منها نوع أملاح الصفراء المستخدمة في التجربة فقد ذكر كل من (Abi Ghanem, 2010; Patton and Brigman, 1979) أنّ استخدام حامض Taurodeoxycholic بدلاً من أملاح الصفراء كان أفضل بعملية الاستخراج للحيوانات البوغية. كما أن استخدام chymotrypsin أعطى نتائج أفضل من استخدام trypsin (Wang and Stotish, 1975). كما يُعتبر عمر البيوض المتكيسة عاملاً مهماً جداً في التأثير على النسبة المئوية للاستخراج فكلما كانت البيوض المتكيسة قديمة كانت نسبة الاستخراج قليلة (Abi Ghanem, 2010). وأشار (Dulski and Turner, 1988) إلى حدوث تحلل للحيوانات البوغية التي تم استخراجها من البيوض المتكيسة بعمر أكثر من شهر، وبينت دراستنا الحالية نتائج مماثلة عند استخدام بيوض متكيسة قديمة للاستخراج (بعمر أكثر من شهر).

أظهرت النتائج أن اتباع طريقة التنقية من قبل (Khalafalla, 2009) افضل من طريقة (Tahir, 1998) عند استخدام البركول متدرج الميل والسبب في ذلك هو تأثير شكل الحيوانات البوغية، فضلاً عن أن درجة نقاوتها كانت أقل، ذكر (Dulski and Turner, 1988) عند استخدامه طريقة التنقية بالبركول أنّ تقليل سرعة التنفيل أدى الى الحصول على أعداد أكبر من الحيوانات البوغية المنقاة، كما أكد على أنّ طريقة التنقية بالبركول متدرج الميل كانت سهلة ومكنت من الحصول على عدد كبير من الحيوانات البوغية المنقاة.

كما تمت عملية التنقية بوساطة عمود فصل التبادل الأيوني باستعمال مادة الدياسيليلوز DE-52 (Riggs and Perryman, 1987)، وتم الحصول على أعداد كبيرة من الحيوانات البوغية المنقاة إلا أنّ

درجة نقاوتها أقل من نقاوة الحيوانات البوغية التي حصلنا عليها باستخدام البركول متدرج الميل وهذا ما اتفق مع (الإدريس، 2014) الذي أجرى دراسته على الأيمريّة الرهيّفة، وعلى ما أكده (Dulski and Turner, 1988) أن عملية التنقية للحيوانات البوغية باستخدام عمود الفصل تكون أقل كفاءة بسبب انسداد عمود الفصل عند تمرير أعداد كبيرة للتنقية، كما ان درجة نقاوتها أقل مقارنة مع البركول المتدرج الميل وأعداد الحيوانات البوغية كانت أقل. وقد يعود سبب حصولنا على أعداد أكبر من الحيوانات البوغية بطريقة عمود الفصل التبادل الأيوني هو اتباعنا طريقة (Riggs and Perryman, 1987) باستخدام عود خشبي لخلط الطبقة العليا من الدياسليلوز لمنع انسداده.

بينت النتائج سلامة التجربة من الخمج الخارجي بأي نوع من الأيمريّة من خلال الفحص الدوري اليومي للبراز. بالإضافة الى عدم وجود أي علامة مرضية لوجود أي إصابة مرضية أخرى. إذ تم اتباع قواعد الأمن الحيوي بدقة للمحافظة على سلامة التجربة، وهذا يدل على أن البيئة التي تم فيها رعاية الأرانب هي بيئة نظيفة وأن حظيرة الرعاية معقمة بالمعتمات اللازمة ولاسيما بخار الأمونيا. وهذا يتفق مع ما أشار إليه (Ryley, 1980) الذي لاحظ أنه بالإمكان القضاء على البيوض المتكيسة من خلال استعمال بخار الأمونيا او بروميد المثل او ثنائي سلفايد الكربون إذ تستطيع هذه الغازات اختراق جدار البيضة المتكيسة. بينت نتائج الدراسة عدم وجود طرح للبيوض المتكيسة في براز الأرانب في مجموعة الشاهد السلبي (المجموعة A) حتى نهاية التجربة، بينما سُجّل أول طرح للبيوض المتكيسة في براز أرانب المجموعات الأخرى في (اليوم 17) بعد جرعة التحدي، واتفقت بذلك مع (Katrاندجي, 1988)، وكانت هذه النتيجة متقاربة من (Barriga and Arnoni, 1979) حيث أظهرت نتائجهم بدء طرح البيوض المتكيسة في اليوم 18 بعد الخمج، وكذلك مع كل من (kutkat et al., 1998 ; Abdel-Megeed and Abu-El Ezz, 2005) حيث بدأ طرح البيوض في اليوم 16 بعد الخمج، وقد يعود ذلك إلى اختلاف الجرعة الخامجة أو عوامل تتعلق بالنوع والمقاومة والعمر (Barriga and Arnoni, 1979)، أو وجود عوامل إجهاد مرافقة للتجربة ووزن الحيوان نفسه (Abu-El-Ezz et al., 2012).

استمر طرح البيوض المتكيسة بكميات كبيرة في مجموعة الشاهد الإيجابي (B) والمجموعة C ليصل إلى أعلى مستوى له في اليوم 26 بعد التحدي ليتراجع العدد بعدها في (اليوم 32) وتوافقت هذه النتيجة مع العديد من الدراسات (Al-Tae and Salih, 2014; Al-Tae and Al-Zubaidi, 2017).

تتناقصت أعداد البيوض المتكيسة المطروحة لكل غرام من البراز بالمجموعات الملقحة ولاسيما المجموعتين الملقحتان باللقاح البروتيني للحيوان البوغي (H و G) مع وجود فروقات معنوية واضحة في

متوسط عدد البيوض المتكيسة (OPG) مع تقدم الوقت مقارنة مع المجموعتين (C و B)، كان هذا الاختلاف أكثر وضوحًا في المجموعتين (C و B) حيث كان متوسط OPG أعلى بـ 9 مرات على الأقل من متوسط OPG في المجموعات الملقحة بالبيوض المتكيسة المتبوعة والحيوانات البوغية (E,F,I,G,H). بالإضافة إلى انخفاض مؤشر مقدار عدد البيوض المتكيسة لتلك المجموعات (E,F,I,G,H) بالمقارنة مع المجموعتين (C و B)، واتفقت هذه النتائج مع ما جاء في دراسة (Akhtar et al., 1998) التي بينت بوجود انخفاض في طرح البيوض المتكيسة بعد التلقيح بالبيوض المتكيسة المتبوعة الصواتة. وقد يفسر الانخفاض في عدد البيوض المتكيسة بالأرانب الممنعة إلى تطور استجابة مناعية فاعلة. إن الاستجابة المناعية الخلطية الناتجة عن الخمج بالأيمريات ليست عديمة الجدوى على الإطلاق، ومن المفترض أن يكون للأضداد من نوع IgA دور في مقاومة مثل هذه العدوى، نظرًا لوجود حماية واضحة في المجموعات الملقحة ممثلة من خلال تقليل طرح البيوض المتكيسة، يمكن افتراض وجود نسبة عالية نسبيًا من IgA في مصل الأرانب الملقحة، على الرغم من أنه لا يمكن تقدير كل نمط إسيوي (isotype) للأضداد على حدة (Al-Tae and Salih, 2014).

بلغ عدد البيوض المتكيسة المستخلصة 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 (Katrاندجي، 1988) حيث بلغت نسبة التبوغ 97%.

حققت بروتينات الحيوانات البوغية نسبة مئوية للأمان 91% أفضل من المجموعات الأخرى، بينما وصلت هذه النسبة إلى 88% عند استخدام البيوض المتكيسة المتبوعة وانخفضت النسبة إلى 0% في حالة استخدام بروتينات البيوض المتكيسة غير المتبوعة. تعارضت النتائج الحالية مع نتائج (Badawy and Aggour, 2006) التي استخدم فيها بروتين الحيوانات البوغية للأيمرية الرهيفة كلقاح فوصلت نسبة الحماية إلى 66.7%. بينما سجلت دراسات أخرى مقدار النسبة المئوية للحماية إلى (60 - 77.3) % عند استخدامهم بروتينات مأشوبة للحيوانات البوغية والأقسام merozoits لطفيلي الأيمرية الرهيفة (Subramanian et al., 2008; Xu and Li, 2011). في حين تقاربت نتائج هذه الدراسة مع دراسة (الإدريس، 2014) حيث حققت بروتينات الحيوانات البوغية نسبة مئوية للأمان 99%، بينما وصلت هذه النسبة إلى 96% عند استخدام الحيوانات البوغية المجمدة. وتوصلت الدراسة الحالية أن لقاح بروتين الحيوانات البوغية حقق نسبة حماية عالية وقد يعود سبب ذلك إلى استخدام جميع بروتينات الحيوانات

البوغية وليس جزء منها، مما أدى الى الحصول على جميع المستضدات الخارجية والداخلية لطور المستخدم وبالنتيجة توليد استجابة مناعية قوية.

تم التعرف على المكونات البروتينية لخلاصات البيوض المتكيسة (المتبوعة وغير المتبوعة) والحيوانات البوغية، وقد لوحظ وجود اختلاف في عدد العصائب البروتينية وفي ثخانتها. إذ بينت نتائج الرحلان الكهربائي للخلاصة المحضرة من صوتنة طور الحيوانات البوغية وجود حوالي 6 عصائب، وبلغت أوزانها الجزيئية (22-24-26-28-66-119) كيلو دالتون، واعتبرت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور من حياة الطفيلي، بينما لوحظ في الخلاصة الطفيلية الناتجة عن حلمة طور الحيوانات البوغية وجود حوالي 3 عصائب، وبلغت أوزانها الجزيئية (24-26-28) كيلو دالتون. وتباينت نتائج هذه الدراسة مع دراسة أخرى تم فيها استخدام الرحلان الكهربائي الثنائي البعد لبروتينات الحيوانات البوغية الصوتنة للأيمرية السّتيديويّة حيث كانت 41 عصابة عند الباحثين (Song et al., 2017). في حين كانت هذه النتائج متقاربة مع دراسة (الوهيب وزملاؤه، 2018) حيث بينت نتائجهم وجود ثلاث عصائب تراوحت أوزانها الجزيئية (24.43 و 26 و 28.67) كيلو دالتون، وذلك في الخلاصة البروتينية الناتجة عن حلمة طور الحيوانات البوغية. بينما توصلت دراسة أخرى عند استخدام الرحلان الكهربائي لخلاصة طور الحيوانات البوغية لطفيلي الأيمريّة الرّهيفّة لتحديد أوزانها الجزيئية وجود عشرة عصائب تراوحت أوزانها الجزيئية بين (23 و 235) كيلو دالتون (Murray and Glauska, 1986)، في حين بلغت احدى عشر عصابة في دراسة (الإدريس، 2014).

لوحظ في الخلاصة الطفيلية الناتجة عن صوتنة طور البيوض المتكيسة المتبوعة وجود 16 عصابة تراوحت أوزانها الجزيئية بين (19.21 و 130) كيلو دالتون وأكثر هذه العصائب تلوناً بصبغة أزرق الكومازي (130-66-49.4-34.19-28-24-22) كيلو دالتون، وعُدّت بذلك البروتينات الأكثر تعبيراً في هذا الطور، لأن باقي العصائب كانت أقل تلوناً. في حين أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي للخلاصة المحضرة من صوتنة طور البيوض المتكيسة غير المتبوعة وجود 5 عصائب تراوحت أوزانها الجزيئية (19-34-47-49-130) كيلو دالتون. كما أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي للخلاصة المحضرة من حلمة طور البيوض المتكيسة المتبوعة وجود 11 عصابة تراوحت أوزانها الجزيئية بين (19.21 و 130) كيلو دالتون. في حين تم الحصول على 13 عصابة شديدة التلون بصبغة أزرق الكومازي وكانت الأوزان الجزيئية لها (26 و 28 و 45 و 50 و 60 و 68 و 80 و 82 و 88 و 94 و 105 و 175 و 235) كيلو دالتون بعد إجراء الرحلان الكهربائي لخلاصة بروتينات البيوض المتكيسة لطفيلي الأيمريّة الرّهيفّة المحضرة بطريقة

الحملة (Murray and Glauska, 1986). وسجلت دراسة مماثلة على نفس الطور لبروتينات البيوض المتكيسة 11 عصابة فقط ذات أوزان جزيئية (14، و20، و22، و24، و36، و45، و48، و58، و66، و84، و116) كيلودالتون (Talebi, 1995). إن الاختلافات الناتجة بالأوزان الجزيئية بين هذه الدراسة وغيرها من الدراسات قد تعود الى التباينات التقنية البسيطة المتعلقة بهذه الحجم 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 أثناء الإذابة، لذلك استخدم كل من (Murray and Glauska, 1986) طريقة مختلفة لتحضير البروتينات، وذلك عن طريق استعمال جهاز مجانس العينات tissue homogenizer لتحضير البيوض المتكيسة، بينما تم استخدام عملية الصوتنة Sonication والحملة لتحضير البروتينات في هذا العمل.

إنّ التمتع باللقاحات الحية او بوساطة المستضدات المستقرة من أطوار الأيمرية بشكل خاص تنتج أضعافاً لها القدرة على التخلص من الطفيلي سواء كان داخل الجسم او في الزجاج (Wallach, 2010). وذكرت احدى الدراسات ارتفاع IgM بكميات كبيرة بعد الجرعة الأولى من اللقاح، بينما يفرز الضدّ IgY بعد التعرض اللاحق كاستجابة للمستضد وأنّ الاستجابة الثانية تكون أسرع وأقوى (Lillehoj and Trout, 1993). توصل باحث آخر إلى النتيجة نفسها بارتفاع الأضداد نوع IgM في بداية التعرض للإصابة بالأيمرية الرهيفة قبل إنتاج الأضداد IgA و IgY، وأن الأضداد IgM و IgY الموجودة في المصل تصل الى قمتها باليوم الثالث عشر والسابع عشر من الإصابة بطفيلي الأيمرية الرهيفة (Trees et al., 1985). كما بينت دراسة أخرى باستخدام المستضد البروتيني للحيوان البوغي كلقاح، ارتفاعاً في مستوى الضدّ IgY باليوم 16 وتصل قمتها باليوم 40 من عمر الدجاج (Badawy and Aggour, 2006).

استعملت تقانة التبصيم المناعي للكشف عن المستضدات التي تحرض الجهاز المناعي على تشكيل أضداد نوعية، وأظهرت نتائج التبصيم المناعي عدد من العصابات أوزانها الجزيئية (24، 26، 28، 119، 66) كيلو دالتون عند استخدام مصول الأرانب الملقحة بالمستضد البروتيني للحيوان البوغي الصوت، في حين ظهرت ثلاث عصابات أوزانها الجزيئية (24، 26، 28) كيلو دالتون عند استخدام مصول الأرانب الملقحة بالمستضد البروتيني للحيوان البوغي المحلمه، وكان أقوى هذه العصابات العصابة ذات الوزن الجزيئي 28 كيلو دالتون حيث ظهرت مباشرة بعد وضع ركيزة التفاعل وكانت الأكثر ثخانة، كما لوحظ أنّ عدد المستضدات أقل من عدد المستضدات في حالة استخدام لقاح بروتينات الحيوانات البوغيّة الصوتية،

ويمكن تفسير ذلك بتحفيز الموجات فوق الصوتية الميكانيكية على إحداث تأثيرات كيميائية وميكانيكية صوّاتة للبروتينات، تشمل هذه التأثيرات انكسار السلاسل أو تعديل المجموعات الجانبية للأحماض الأمينية، وقد تؤدي التعديلات الميكانيكية من خلال التحريض الجزيئي المعزز إلى تعديل مؤقت أو دائم في هيكلية البروتين ثلاثية الأبعاد (Su and Cavaco-Paulo, 2021). كما وجدت المستضدات ذات الأوزان الجزيئية (24، 26، 28) كيلو دالتون بشكل واضح في كلا اللقاحين (لقاح بروتينات الحيوانات البوغية الصوّاتة والمملحة) مما يؤكد على أهميتها في تحفيز الاستجابة المناعية.

وجدت إحدى الدراسات التي استخدمت تقانة التبصيم المناعي 23 مستضداً في طور الحيوان البوغي لطفيلي الأيمريّة السّتيديويّة بعد إجراء الرحلان ثنائي البعد (Song et al., 2017). وهذه النتائج كانت متقاربة مع نتائج دراسة (الوهيب وزملاؤه، 2018) من حيث ظهور ثلاث عصابات شديدة التلوين بلغت أوزانها الجزيئية: (24.43 و 26 و 28.67) كيلو دالتون بعد إجراء التبصيم المناعي للخلصة البروتينية المحضرة من حلمة الحيوانات البوغية. وفي دراسة على طفيلي الأيمريّة الرّهيفة تم تحديد تسعة مستضدات ذات قدرة استمناعية بتقنية التبصيم المناعي في طور الحيوان البوغي (Wisher, 1986).

بينت دراسة أمصال الأرناب الملقحة بالمستضد البروتيني الصوت للبيوض المتكيسة المتبوغة كلقاح تسع من المستضدات ذات القدرة الاستمناعية بعد جرعة التحدي تراوحت أوزانها الجزيئية بين (24-124) كيلو دالتون. في حين ظهرت ستة من المستضدات ذات القدرة الاستمناعية والتي بلغت أوزانها الجزيئية (24-26-28-57-119-124) كيلو دالتون من أمصال الأرناب الملقحة بالمستضد البروتيني المحضر بطريقة الحلمة للبيوض المتكيسة المتبوغة. وكانت النتائج متقاربة مع النتائج التي توصل إليها (الوهيب وزملاؤه، 2018) حيث تم تحديد سبع مستضدات باستخدام مصال الأرناب المجموعة في اليوم 14 بعد الخمج وتحضينها مع البروتينات الناتجة عن حلمة طور البيوض المتكيسة المتبوغة والتي بلغت أوزانها الجزيئية (24.43-26-28.67-34.19-57-124.74-130) كيلو دالتون. وفي دراسة قام بها (الإدريس، 2014) تبين وجود 14 من المستضدات الاستمناعية لخلصة طور البيوض المتكيسة المحضرة بالحلمة تراوحت أوزانها الجزيئية بين (13.9 و 167.8) كيلو دالتون. قد يعود سبب الاختلاف بين نتائج الدراسة الحالية وغيرها من الدراسات وبين الدراسات الأخرى للأيمرية الرّهيفة أن هناك تبايناً بعملية الإذابة للبروتينات تنتج عنها أوزان جزيئية مختلفة (Stotish et al., 1978)، أو بسبب التأثيرات الكيميائية والميكانيكية الصوّاتة على خصائص البروتينات وقد يعرضها إلى تشكل ثمالات داخلية كارهة للماء، مما يجعل بنية البروتين مشوهة لا رجعة فيها (Su and Cavaco-Paulo, 2021)، أو بنتيجة الاختلافات

التقنية البسيطة المتعلقة بالرحلان الكهربائي (Karim et al., 1996). وكذلك لاختلاف البنية المستضدية بين سلالات الأيمرية المعزولة من مناطق متغايرة جغرافياً (Allen and Fetterer, 2002). في حين لم تكشف نتائج التصميم المناعي عن وجود أي مستضد باستخدام أمصال الأرناب الملقحة بالمستضد البروتيني الصوت للبيوض المتكيسة غير المتبوغة، مما يدل على عدم وجود أي مستضد ذو قدرة استمناعية في هذا الطور، وهذا ما يفسر عدم تأمين أي حماية للأرناب الملقحة بهذا اللقاح.

تعد إنزيمات الكبد (ALT, AST) مؤشراً مهماً في تشخيص سمية الكبد وتضرر خلاياه حيث تُطلق هذه الإنزيمات عادةً بسبب تلف خلايا الكبد الناجم عن النخر أو ضرر الأغشية الخلوية الكبدية (Silva et al., 2007)، وقد أشارت النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة حدوث ارتفاع متوسط نشاط الإنزيمين السابقين في مجموعة الشاهد الإيجابي المجموعة (B) والمجموعة (C) بشكلٍ معنويٍّ ($P \leq 0.05$) مقارنة مع مجموعة الشاهد السلبي المجموعة (A) ومع المجموعات الملقحة بعد الأسبوع الثاني من جرعة التحدي، وبلغ الارتفاع أشده في اليوم 28 لإنزيم ALT (IU/L 99.66) وفي اليوم 42 لإنزيم AST (IU/L 102.71) وقد توافقت هذه النتائج مع ما أشار إليه (San Martin-Nunezm et al., 1988) الذين أكدوا أن أبرز التغيرات البيوكيميائية المرافقة للإصابة بالأيمرية السيتداوية هي ارتفاع نشاط الإنزيمات AST و ALT، وهذا ما أكدته أيضاً (Erdogmus and ErOksuz, 2006)، حيث يؤدي الضغط الناجم عن التكاثر المفرط للقنوات الصفراوية إلى حدوث ضررٍ في نسيج الكبد وتلف الخلايا الكبدية، وبالتالي خروج الإنزيمات الكبدية إلى الوسط الخارج خلويٍّ حسب ما أكدته الباحثون (Singla et al., 2000; Al-Mathal, 2008). كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية حدوث درجة طفيفة من إصابة الكبد في المجموعات الملقحة (E,F,G,H,I) بدأت في اليوم 14 بعد جرعة التحدي، وعادت مستويات الإنزيمات إلى قيمها الطبيعية في اليوم 42 دون وجود فروقات معنوية بين هذه المجموعات، بينما استمرت الزيادات المعنوية في المجموعة (B,C) حتى نهاية التجربة واتفق ذلك مع ما توصل إليه (Al-Tae and Al-Zubaidi, 2017).

أما إنزيم ALP (Alkaline Phosphatase) فهو إنزيم يحفز تميئه أملاح أسترات الفوسفات في الوسط القلوي، وتوجد نسبة كبيرة منه في مصل الدم ويأتي من النسيج العظمي والكبدية، ومن الكلية والأمعاء والمشيمة والكريات البيض (McComb et al., 1979). أظهرت نتائج هذه الدراسة وجود ارتفاع معنوي في متوسط قيمة الإنزيم في مجموعة الشاهد الإيجابي المجموعة (B) والمجموعة (C) بشكلٍ معنويٍّ ($P \leq 0.05$) مقارنة مع مجموعة الشاهد السلبي المجموعة (A) ومع المجموعات الملقحة (E,F,G,H,I).

بعد الأسبوع الثاني من جرعة التحدي، وبلغ الارتفاع أشده في اليوم 28 (IU/L 181.26)، ويشير المستوى العالي لهذا الإنزيم إلى ركود صفراوي في القنوات الصفراوية (Udem et al., 2010)، حيث يتواجد أعلى نشاط لهذا الإنزيم في أغشية القنوات الصفراوية (Lorenz et al., 2009)، وينتج الركود الصفراوي عن انسداد القنوات الصفراوية بسبب فرط تنسج ظهارة القنوات الصفراوية الناتج عن تكاثر طفيلي الأيمرية السنتداوية بداخلها (Nishio et al., 2000)، حيث يعتبر إنزيم الفوسفاتاز القلوي أحد أهم الواسمات الإنزيمية (enzymatic markers) للركود الصفراوي في التشخيص السريري للحيوانات الصغيرة (Sparkes and Gruffydd-Jones, 1993). وعاد مستوى الإنزيم إلى قيمه الطبيعية في اليوم 42 دون وجود فروقات معنوية بين المجموعات الملقحة (E,F,G,H,I)، بينما استمرت الزيادة المعنوية في المجموعة (B,C) حتى نهاية التجربة واتفق ذلك مع ما توصل إليه (Al-Tae and Al-Zubaidi, 2017). يشير الارتفاع المفرط لقيم ALT و AST و ALP خاصة في المجموعة (B) والمجموعة (C) إلى اليرقان الانسدادي الذي ينتج عن تضخم القناة الصفراوية المصحوب بتضيق لمعة هذه القنوات وفي النهاية انسداد القنوات بشكل جزئي وهذا ما اتفق مع (Fyffe and Wilson, 2010).

بينت نتائج اختبار التراص الدموي اللامباشر أن متوسط مستوى عيار الأضداد في اليوم 14 بعد التلقيح قد وصل في المجموعة G إلى (532.7) وفي المجموعة H إلى (489.2) مع وجود فروقات معنوية بشكل معنوي ($P \leq 0.05$) مقارنة مع المجموعات الأخرى، كما أوضحت النتائج استمرار ارتفاع متوسط عيار الأضداد في المجموعات الملقحة ليصل إلى أعلى قيمة في اليوم 28 بعد التلقيح، ليبدأ متوسط عيار الأضداد بالانخفاض في اليوم 42 بعد التلقيح مع استمرار وجود فروقات معنوية بين المجموعات الملقحة بالحيوانات البوغية (G,H) والمجموعات (E,F,I) دون وجود فروقات معنوية بين تلك المجموعات فيما بينها. ولوحظ من خلال نتائج هذا الاختبار وجود فروقات معنوية واضحة بين المجموعات الملقحة مقارنة مع مجموعة الشاهد الإيجابي (B) والمجموعة الثالثة (C)، ويمكن تفسير ذلك بتحفيز الطبيعة البروتينية للمستضد المستخدم في اللقاح الاستجابة المناعية المعتمدة على الخلايا التائية. حيث يتم التعرف على المستضد البروتيني بواسطة المفاويات التائية المساعدة التي بدورها تقوم بتنشيط الخلايا البائية، وتكوين الأضداد التي تنتجها الخلايا البلازمية من أنماط إسوية مختلفة بما فيها IgA. بالإضافة إلى ذلك، فإن هذه الأضداد ذات ألفة أكبر للمستضد مقارنة بالاستجابة المناعية غير المعتمدة على الخلايا التائية والتي تحدث عندما تكون طبيعة المستضد عديد السكاريد (Parija, 2012).

وقد تكون المستويات المنخفضة نسبياً من عيار الأضداد في المجموعة الثانية (B) حتى بعد جرعة التحدي مرتبطة بطريقة إعطاء المستضد، حيث أن جرعة التحدي تم إعطاؤها عن طريق الفم في حين تم إعطاء اللقاح تحت الجلد. وكانت مستويات عيار الأضداد منخفضة في المجموعة الثالثة (C) أيضاً، ومن الممكن تفسير ذلك بعدم وجود مستضدات استمناعية أو وجود حواتم مستضدية تُحفز الاستجابة المناعية، كما أوضحت نتائج التبصيم المناعي للخلاصة البروتينية الناتجة عن صوتة البيوض المتكيسة غير المتبوغة التي لقحت بها هذه المجموعة.

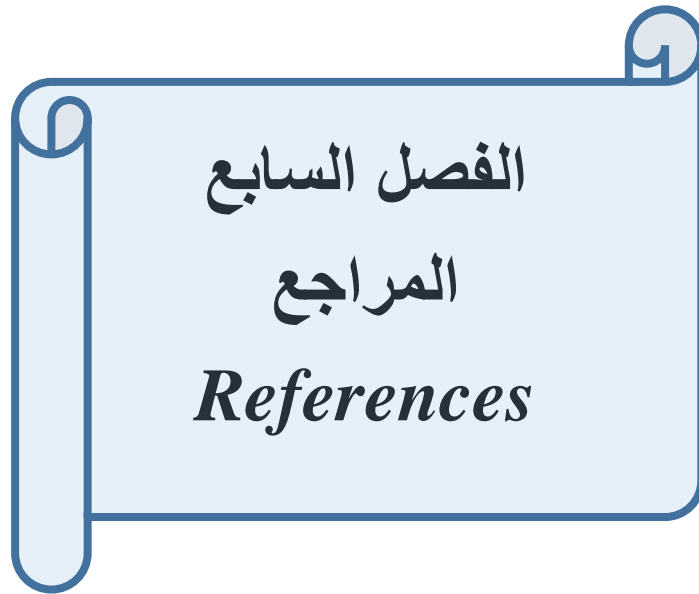
الفصل السادس
الاستنتاجات والتوصيات
Conclusions and Recommendations

❖ - الاستنتاجات Conclusions:

- خلصت الدراسة الحالية التي أجريناها على لقاح طفيلي الأيمرية الستيداوية المعزولة في سوريا والمحضر بطريقتي (الحلمة والصوتة) من أطوار الطفيلي المختلفة إلى النتائج التالية:
- 1- توفر اللقاحات المحضرة من البيوض المتكيسة المتبوعة والحيوانات البوغية للأيمرية الستيداوية بطريقتي (الحلمة والصوتة) الحماية من الإصابة بداء الأكريات الكبدي عند الأرناب.
 - 2- لا توفر لقاحات الخلاصة البروتينية للبيوض المتكيسة غير المتبوعة الحماية اللازمة من داء الأكريات الكبدي عند الأرناب.
 - 3- تعدّ اللقاحات المحضرة آمنة ولا تسبب تأثيرات جانبية كفرط التحسس و التَحْمُل.
 - 4- تؤمن طريقة استعمال البركول لتنقية الحيوانات البوغية نقاوة أعلى منها في حال استعمال عمود الفصل مع أن مردودها أقل من الناحية الكمية.
 - 5- يمكن استخدام تقنية الرحلان الكهربائي SDS-PAGE لتحديد بروتينات الأطوار المختلفة للأيمرية الستيداوية.
 - 6- تحديد أهم المستضدات التي تم ملاحظتها خلال الدراسة الحالية باستخدام تقنية التبصيم المناعي هي:
 - أ- بروتينات الحيوانات البوغية: (22-24-26-28-66-119) كيلو دالتون
 - ب- بروتينات البيوض المتكيسة المتبوعة: (24-26-28-39-57-66-84-119-124) كيلو دالتون.
 - 7- أهم المستضدات المشتركة في الأمصال الممنعة بأنواع اللقاحات المحضرة من أطوار طفيلي الأيمرية الستيداوية بعد التحدي (22-24-26-28-66-119) كيلو دالتون.
 - 8- قدرة اللقاح على إبقاء مستويات نشاط الإنزيمات الكبدية (ALT-AST-ALP) ضمن المستوى الطبيعي والحد من ارتفاع مستوى نشاطها.
 - 9- يحفّز لقاح بروتينات الحيوانات البوغية الاستجابة المناعية ويولد معيار (عيار) مرتفع من الأضداد.

❖ - التوصيات Recommendations :

- أخذين بعين الاعتبار النتائج التي حصلنا عليها بالدراسة التي أجريناها على لقاحات من سلالة محلية من الأيمرية الستيداوية فإننا نوصي بما يلي:
- 1- إعطاء لقاح الحيوانات البوغية أو لقاح البيوض المتكيسة المتبوغة حقلياً بجرعة قدرها 25 ميكروغرام تحت الجلد وبعمر 2-4 أسابيع.
 - 2- عزل واستفرد المستضدات الأكثر استمناعية والتي تم الكشف عنها بتقانة التبصيم المناعي في هذه الدراسة.
 - 3- استفرد المستضدات المشتركة بين أطوار طفيلي الأيمرية الستيداوية (22-24-26-28-66-119).
 - 4- دراسة الاستجابة المناعية لكل من هذه المستضدات على حدة أو مجتمعة، لتحديد المستضدات التي تحقق الاستجابة المناعية المطلوبة.
 - 5- تحديد واستفرد الجينات المرمة لهذه المستضدات المسيطرة مناعياً على المستوى خلوي الوسطة من النمط Th1 لاستخدامها في إنتاج هذه المستضدات المؤشبة.



- 1- الإدريس، سهير (2014): تقييم اللقاحات المحضرة من الأيمرية يتلا *Eimeria tenella* على الكفاءة الإنتاجية والاستجابة المناعية عند دجاج اللحم Broiler. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة دمشق، الجمهورية العربية السورية.
- 2- الحسني، ضياء حسن (2000). فيزيولوجيا الطيور الداجنة، دار الكتب للطباعة والنشر، بغداد، العراق.
- 3- المحمد، فادي (2017): التغيرات التشريحية المرضية الناتجة عن العدوى التجريبية بالأيمرية الستيدائية عند الأرانب. أطروحة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، الجمهورية العربية السورية.
- 4- الهلالي، خليل وخالد السعودي ومهند الركابي (2000): استخلاص وتنقية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي من الدجاج المحلي ودراسة بعض خواصه الكيميوحيوية، مجلة الزراعة العراقية، 5(4):23-31 ص.
- 5- الوهيب، أسامة-قطرنجي، محمد محسن-قويدر، محمود (2018): تحديد مستضدات الأيمرية الستيدائية (الحيوان البوغي، البيضة المنكيسة) عند الأرانب. مجلة جامعة حماة، المجلد الأول، العدد 4، ص 28-43.
- 6- الوهيب، أسامة (2018): الكشف عن مستضدات الأيمرية الستيدائية عند الأرانب. أطروحة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، الجمهورية العربية السورية.
- 7- ونوس، ماري (2017): دراسة تأثير عصارة ثمرة قثاء الحمار على أنزيمات الكبد وبعض المعايير البيوكيميائية في دم الأرانب المصابة بالكوكسيديا ستيدي. أطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، الجمهورية العربية السورية.
- 8- Abdel-Megeed, K.N. and Abu El-Ezz, N.M.T (2005). Control of Hepatic coccidiosis in rabbits using *Calendula micrantha officinalis* and *Peganum harmala* extracts. *Egypt. J. Vet. Sci.*, 39: 34-45.
- 9- Abdel Maged, A., Ahmed, N.E., Ramadan, M., Elashrey, M., (2013). Biochemical effects of antiprotozoa on gastrointestinal tract enzymes and related hormones in rabbits. *Benha Veterinary Medical Journal* <http://bvmj. bu. edu. eg>, 12.
- 10 - Abed, H. H., & Yakoob, A. Y. (2013). Study of the protective and therapeutic effect of crude garlic on mortality, oocyst output and hepatic lesions in experimentally infection with *Eimeria stiedae* in domestic rabbits. *Bas. J. Vet. Res*, 12(2), 314-331.
- 11- Abi Ghanem, D.A., (2010). Phage display selection of recombinant antibodies derived from a chicken immune library against cryopreserved *Eimeria tenella* sporozoites. *Texas A & M University*.
- 12- 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.

- 13- Abu-Akkada, S. S., Oda, S. S., & Ashmawy, K. I. (2010).** Garlic and hepatic coccidiosis: prophylaxis or treatment?. *Tropical animal health and production*, 42(7), 1337-1343.
- 14- Abu-El-Ezz, N., Megeed, K., Mahdy, O., Hassan, S., (2012).** ELISA assessment in the diagnosis of hepatic coccidiosis in experimentally infected rabbits. *Global Veterinaria* 9, 517-523.
- 15- Adams, H. R. (2001).** *Veterinary pharmacology and therapeutics* (No. Ed. 8). Iowa state university press
- 16- Akhtar, M., Ayaz, S., Hayat, C., Ashfaq, M., (1998).** Immune response of sonicated Sci 1, 389-391 coccidial oocyst in chickens. *Pak J Biol.*
- 17- Akpo, Y., Kpodékon, M., Djago, Y., Licois, D., Youssao, I., (2012).** Vaccination of rabbits against coccidiosis using precocious lines of *Eimeria magna* and *Eimeria media* in Benin. *Veterinary parasitology* 184, 73-76.
- 18- Al-Idreesi, S. R., Kweider, M., & Katranji, M. M. (2013a).** Efficacy of *Eimeria tenella* (Oocyst and Sporozoite) proteins as vaccine in Broiler against coccidiosis. *International ..Journal of Poultry Science*, 12(3), 157-163
- 19- Al-Idreesi, S.R., Kweider, M., Katranji, M.M., (2013b).** Immune responses to *Eimeria tenella* sporozoite protein as vaccine to broiler against Coccidiosis. *International Journal of Poultry Science* 12, 582.
- 20- Al-Idreesi, S.R., Kweider, M., Katranji, M.M., (2013c).** Immunization of Broiler with dead sporozoites as vaccine against *Eimeria tenella* parasite. *International Journal of Poultry Science* 12, 280-288.
- 21- Al-Mathal, E.M.,(2008).** Hepatic coccidiosis of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus domesticus* L.) in Saudi Arabia. *World Journal of Zoology* 3, 30-35
- 22- Al-Mathal, E. M. (2010).** Efficacy of *Commiphora molmol* against hepatic coccidiosis (*Eimeria stiedae*) in the domestic rabbit. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8(3/4 part 2), 1072-1080.
- 23- Al-Naimi, R., Khalaf, O., Tano, S., Al-Tae, E., (2012).** Pathological study of hepatic in naturally infected rabbits. *Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine coccidiosis Sciences* 11, 63-69.
- 24- Al-Tae, M.N., Salih, M.T., (2014).** Evaluation of Sonicated Oocyst Vaccine in Protection Against Hepatic Coccidiosis in Rabbits. *International Journal* 2, 863-868.
- 25- Al-Tae, 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.

- 26- Al-Rukibat, R.K., Irizarry, A.R., Lacey, J.K., Kazacos, K.R., Storandt, S.T., DeNicola, D.B., (2001).** Impression smear of liver tissue from a rabbit. *Veterinary Clinical Pathology* 30, 57-61.
- 27- Ali, R.K., (2015).** The therapeutic effect of *Nigella sativa* L. seeds oil on experimentally Iraqi Journal of Veterinary Medicine 39, 16-22 .infected rabbits with hepatic Coccidiosis.
- 28- Allen, P.C., Fetterer, R., (2002).** Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical microbiology reviews* 15, 58-65.
- 29- Archetti, I., Tittarelli, C., Cerioli, M., Brivio, R., Grilli, G., Lavazza, A., (2008).** Serum chemistry and hematology values in commercial rabbits: preliminary data from industrial farms in northern Italy. In: proceedings of the 9th World Rabbit Congress, pp. 10-13.
- 30- Augustine, P., Danforth, H., (1985).** Effects of hybridoma antibodies on invasion of cultured cells by sporozoites of *Eimeria*. *Avian diseases*, 1212-1223.
- 31- Augustine, P., Danforth, H., McAndrew, S., (1988).** Monoclonal antibodies reveal antigenic differences in refractile bodies of avian *Eimeria* sporozoites. *The Journal of parasitology*, 653-659.
- 32- Augustine, P.C., (2001).** Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasitology 31, 1-8 parasites of the genus *Eimeria*. *International journal for parasitology*.
- 33- Ayaz, M., Akhtar, M., Hussain, I., Muhammad, F., Haq, A., (2008).** Immunoglobulin producing cells in chickens immunized with *Eimeria tenella* gametocyte antigen vaccines. *Veterinarni Medicina-Praha-* 53, 207.
- 34- Baba, E., Uno, H., Sadano, N., Fukata, T., Sasai, K., & Arakawa, A. (1996).** *Eimeria tenella*: Role of carbohydrates on sporozoite at the penetration into cultured cells. *Experimental parasitology*, 83(1), 67-72.
- 35- Badawy, G., Aggour, M., (2006).** Immune responses in chickens against *Eimeria tenella* antigen. *Assiut. Vet. Med. J* 52, 178-186.
- 36- Bahrami, A., Bahrami, A., (2006).** Immune response of chicken to an experimental sonicated coccidia oocyst vaccine. *Archives of Razi Institute* 61, 48-53.
- 37- Balbaa, M., Abd El-Hady, N., Taha, N., El Sayed, H., (2012).** Some heterocyclic thione derivatives exhibit anticoccidial activity by inhibiting glycosidases. *Acta Biochimica Polonica* 59.
- 38- Balbiani, G., (1884).** Leçons sur les sporozoaires, par G. Balbiani... recueillies par le docteur J. Pelletan, revues par le professeur. O. Doin.

- 39- Barriga, O.O., Arnoni, J.V., (1979).** Eimeria stiedae: weight, oocyst output, and hepatic function of rabbits with graded infections. *Experimental parasitology* 48, 407-414.
- 40- Baumann, H., Gauldie, J., (1994).** The acute phase response. *Immunology today* 15, 74-80
- 41- Beard, C., Hopkins, S., Hammond, J., (1975).** Preparation of Newcastle disease virus hemagglutination-inhibition test antigen. *Avian diseases*, 692-699.
- 42- Bhat, T. K., Jithendran, K. P., & Kurade, N. P. (1996).** Rabbit coccidiosis and its control: a review.
- 43- Bilate, A.M., (2007).** Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de reumatologia clínica* 8, 47-51.
- 44- Bradford, M.M., (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254
- 45- Brothers, V.M., Kuhn, I., Paul, L.S., Gabe, J.D., Andrews, W.H., Sias, S.R., McCaman, M.T., Dragon, E.A., Files, J.G., (1988).** Characterization of a surface antigen of Eimeria tenella sporozoites and synthesis from a cloned cDNA in Escherichia coli. *Molecular and biochemical parasitology* 28, 235-247.
- 46- Brugh Jr, M., (1978).** A simple method for recording and analyzing serological data. *Avian Diseases*, 362-365.
- 47- Çam, Y., Atasever, A., Eraslan, G., Kibar, M., Atalay, Ö., Beyaz, L., ... & Liman, B. C. (2008).** Eimeria stiedae: experimental infection in rabbits and the effect of treatment with toltrazuril and ivermectin. *Experimental parasitology*, 119(1), 164-172.
- 48- Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1997).** Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. *European journal of cell biology*, 73(2), 114-123.
- 49- Carvalho, J. M. (1943).** The coccidia of wild rabbits of Iowa. *Iowa State College Journal of Science*, 18, 103-135.
- 50- Cheissin, E., (1967).** Zhiznennye Tsikly Koktsidii Domašnikh Zhivotnykh (in Russian; English translation by FK Plous and K. S. Todd Jr. Isdat Nauka, Leningrad, Russia.
- 51- Comporti, M., (1993).** Lipid peroxidation. Biopathological significance. *Molecular aspects of medicine* 14, 199-207.
- 52- Coudert, P., (1990).** Efficacite du Diclazuril contre deux coccidioses graves du lapin et tolerance (Effectiveness of Diclazuril against two severe coccidiosis of the rabbit and * tolerance). *Recherche Cunicole 5th Journees, Paris*. 8 p.

- 53- Coudert, P., Licois, D., Drouet-Viard, F., Eckert, J., Braun, R., Shirley, M., (1995).** Biotechnology. Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research. European Commission, Luxembourg, 52-73.
- 54- Coudert, P., Provot, F., (1988).** Lasalocid–Tolerance for the rabbit and activity against. In: 4-th World Rabbit Congress, Budapest, Hungary, pp. 418-427.
- 55- Dalloul, R.A., Lillehoj, H.S.,(2005).** Recent advances in immunomodulation and 8-1 ,vaccination strategies against coccidiosis. Avian diseases 49.
- 56- Dalloul, R.A., Lillehoj, H.S., (2006).** Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. Expert review of vaccines 5, 143-163.
- 57- Dalloul, R.A., Lillehoj, H.S., Shellem, T.A., Doerr, J.A., (2003).** Intestinal immunomodulation by vitamin A deficiency and lactobacillus-based probiotic in *Eimeria acervulina*–infected broiler chickens. Avian Diseases 47, 1313-1320.
- 58- Danforth, H., Augustine, P., (1989).** *Eimeria tenella*: use of a monoclonal antibody in fate of the refractile body organelles and the effect on in vitro determining the intracellular development. Experimental parasitology 68, 1-7.
- 59- Danforth, H.D., McAndrew, S.J., (1987).** Hybridoma antibody characterization of stage-specific and stage-cross-reactive antigens of *Eimeria tenella*. The Journal of parasitology, 985-992.
- 60- Darwish, A.I., Golemansky, V., (1991).** Coccidian parasites (*Coccidia*: *Eimeriidae*) of domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus domesticus* L.) in Syria. Acta Parasitologica 30, 209-215.
- 61- Darzi, M. M., Mir, M. S., Kamil, S. A., Nashiruddullah, N., & Munshi, Z. H. (2007).** Pathological changes and local defense reaction occurring in spontaneous hepatic coccidiosis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). World Rabbit Science, 15(1), 23-28.
- 62- Davis, L. R. (1973).** Techniques. In “The Coccidia”(DM Hammond and PL Long, eds.).
- 63- Dobell, C., (1922).** The discovery of the coccidia. Parasitology 14, 342-348.
- 64- Dubremetz, J., Garcia-Réguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M.N., (1998).** Invited review Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. International journal for parasitology 28, 1007-1013.
- 65- Dulski, P., Turner, M., (1988).** The purification of sporocysts and sporozoites from *Eimeria tenella* oocysts using Percoll density gradients. Avian diseases, 235-239.
- 66- Dulski, P. M. (1990).** *Eimeria tenella*: Incomplete Excystation in the Presence of EDTA in a Taurodeoxycholate-Based Medium. The Journal of protozoology, 37(6), 524-528.

- 67- Durr, U., (1971). Zur Excystation und Bewegung von Sporozoiten der Kokzidienart *Eimeria stiedai*. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 78, 17-21.
- 68- Dürr, U., (1972). Life cycle of *Eimeria stiedai*.
- 69- Duszynki, D.W., Upton, S.J., Lee, C., (2010). Taxonomic summary of genera within the (8) Eimeride. University of New Mexico. Retrieved.
- 70- Duszynski, D. W., & Couch, L. (2013). The biology and identification of the Coccidia (Apicomplexa) of rabbits of the world. Newnes.
- 71- Ellis, J., Tomley, F., (1991). Development of a genetically engineered vaccine against poultry coccidiosis. Parasitology Today 7, 344-346
- 72- Epizootics, I.O.o., (2008). OIE Quality Standard & Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. Office International Des Epizooties.
- 73- Erdogmus, Z., ErOksuz, Y., (2006). DS hepatic coccidiosis in Angora rabbits. Journal of Animal and Veterinary Advances.
- 74- Fetterer, R., Miska, K., Jenkins, M., Barfield, R., (2004). A conserved 19-kDa *Eimeria tenella* antigen is a profilin-like protein. Journal of Parasitology 90, 1321-1328.
- 75- Fitzgerald, P., (1970). New findings on the life cycle of *Eimeria stiedae*. Journal of 101-Parasitology 56, 100.
- 76- Fitzgerald, P., (1972). Transmission of *Eimeria stiedai* by blood transfusion. J Parasitol 58, 62.
- 77- FITZGERALD, P.R., (1974). Results of Blood Transfusions from Donor Rabbits protozoology Infected with *Eimeria stiedai* to Recipient Coccidia-free Rabbits. The Journal of 21, 336-338.
- 78- Fu, H., Lee, Y., (1976). Immunological studies on chemically attenuated oocysts of chicken caecal coccidiosis. Journal of Chinese Society of Veterinary Science 2, 51-55.
- 79- Fyffe, J., Wilson, K., (2010). Principles of clinical biochemistry. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology 7, 1-23.
- 80- Gella, F.J., Olivella, T., Pastor, M.C., Arenas, J., Moreno, R., Durban, R., Gomez, J.A., (1985). A simple procedure for the routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. Clinica chimica acta 153, 241-247.
- 81- Ghanem, M., Mohamed, A.D., Ramadan, M.Y., (2009). Clinical, biochemical and histopathological study on parasitic gastroenteritis associated with caprine coccidiosis: comparative effect of Toltrazuril and Propolis. Lucrări Științifice-Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară" Ion Ionescu de la Brad" Iași 52, 565-580.

- 82- Glickman, R., Alpers, D., Drumme, G., Isselbacher, K., (1970).** Increased lymph alkaline phosphatase after fat feeding: effects of medium chain triglycerides and inhibition of protein synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 201, 226-235.
- 83- Goldammer, J., Mutch, R., (2001).** Food and Agriculture Organization of the United Nations, Forest Resources Assessment Programme, Global Fire Assessment 1990–2000. Rome, Italy) Available at <http://www.fao.org/docrep/006/ad653e/ad653e02.htm> [Verified October 2007].
- 84- Gomez-Bautista, M., Garcia, M. V., & Rojo-Vazquez, F. A. (1986).** The levels of total protein and protein fractions in the serum of rabbits infected with *Eimeria stiedai*. *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 61(4), 393-400.
- 85- Gomez-Bautista, M., Rojo-Vazquez, F., Alunda, J., (1987).** The effect of the host's age on the pathology of *Eimeria stiedai* infection in rabbits. *Veterinary parasitology* 24, 47-57.
- 86- Hake, T.G., (1839).** A Treatise on Varicose Capillaries, as Constituting the Structure of Growths, Carcinoma of the Hepatic Ducts, and Developing the Law and Treatment of Morbid with an Account of a New Form of the Pus Globule, by Thomas Gordon Hake. Taylor and Walton.
- 87- Hanada, S., Omata, Y., Umemoto, Y., Kobayashi, Y., Furuoka, H., Matsui, T., Maeda, R., Saito, A., (2003).** Relationship between liver disorders and protection against *Eimeria stiedai* infection in rabbits immunized with soluble antigens from the bile of infected rabbits. *Veterinary parasitology* 111, 261-266.
- 88- Harcourt-Brown, F. (2002).** Textbook of Rabbit Medicine. Reed Education and (Professional Publishing Oxford).
- 89- Harper, H.A., (1973).** Review of physiological chemistry .14th ed. San Francisco, California, 545.
- 90- Hashemnia, M., Khodakaram-Tafti, A., Razavi, S.M., Nazifi, S., (2014).** Hematological and serum biochemical analyses in experimental caprine coccidiosis. *Journal of parasitic diseases* 38, 116-123.
- 91- Henning, J., Pfeiffer, D.U., Davies, P.R., Stevenson, M.A., Meers, J., (2008).** Mortality patterns over 3 years in a sparse population of wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in New haemorrhagic disease (RHD). *European Journal of Zealand, with an emphasis on rabbit Wildlife Research* 54, 619-626.
- 92- Hillyer, E.V., Quesenberry, K.E., Donnelly, T., (1997).** Biology, husbandry, and clinical techniques. Ferrets, rabbits, and rodents (EV Hillyer and KE Quesenberry, eds.). WB Company, Philadelphia, Pennsylvania, 243-287 Saunders.
- 93- Hillyer, E.V., Quesenberry, K.E., (1997).** Ferrets, rabbits, and rodents: clinical medicine and surgery. W.B. saunders and Co., Philadelphia, PA, 432pp.

- 94- Hobbs, R. P., Twigg, L. E., Elliot, A. D., & Wheeler, A. G. (1999).** Factors influencing the fecal egg and oocyst counts of parasites of wild European rabbits *Oryctolagus cuniculus* (L.) in Southern Western Australia. *The Journal of parasitology*, 796-802.
- 95- Horton-Smith, C., Long, P.L., (1959).** The effects of different anticoccidial agents on the intestinal coccidiosis of the fowl. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 69, 192-207.
- 96- Horton, R., (1967).** The route of migration of *Eimeria stiedae* (Lindemann, 1865) sporozoites between the duodenum and bile ducts of the rabbit. *Parasitology*, 57(1), 9-17 rabbit. *Parasitology* 57, 9-17.
- 97- Hrubec, T.C., Whichard, J.M., Larsen, C.T., Pierson, F.W., (2002).** Plasma versus serum: specific differences in biochemical analyte values. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 16, 101-105.
- 98- Jenkins, M.C., Dame, J.B., (1987).** Identification of immunodominant surface antigens of *Eimeria acervulina* sporozoites and merozoites. *Molecular and biochemical parasitology* 25, 155-164.
- 99- Jenkins, M.C., Seferian, P.G., Augustine, P.C., Danforth, H.D., (1993).** Protective immunity against coccidiosis elicited by radiation-attenuated *Eimeria maxima* sporozoites that are incapable of asexual development. *Avian Diseases*, 74-82.
- 100- Jeurissen, S., Janse, E., Vermeulen, A., Vervelde, L., (1996).** *Eimeria tenella* infections in chickens: aspects of host-parasite: interaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54, 231-238.
- 101- Jin, S.M., Kil, H.R., Park, K., Noh, C.I., (2012).** Gene expression in rat hearts following oral administration of a single hepatotoxic dose of acetaminophen. *Yonsei medical journal* 53, 1.
- 102- Joyner, L., Catchpole, J., Berrett, S., (1983).** *Eimeria stiedai* in rabbits: the demonstration of responses to chemotherapy. *Research in veterinary science* 34, 64-67.
- 103- Kadhim, L.I., Hussien, A.M., (2015).** Resistance to cecal coccidiosis following sonicated oocysts immunization of *Eimeria tenella* in broilers. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences* 6.
- 104- Kaneko, J., Harvey, J., Bruss, L. (2008).** *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th ed Burlington (MA: National Academy Press).
- 105- Karaer, Z., (2001).** Evcil Tavşanlarda (*Oryctolagus cuniculus*) Coccidiosis. Coccidiosis (Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, No. 17). *Meta Bas2Çm, zmir, Türkiye*, 269-278.
- 106- Karim, M., Basak, S.C., Trees, A.J., (1996).** Characterization and immunoprotective properties of a monoclonal antibody against the major oocyst wall protein of *Eimeria tenella*. *Infection and immunity* 64, 1227-1232.

- 107- Karkhanis, Y.D., Nollstadt, K.A., Bhogal, B.S., Ravino, O., Pellegrino, R., Crane, M., Murray, P., Turner, M., (1991).** Purification and characterization of a protective antigen from *Eimeria tenella*. *Infection and immunity* 59, 983-989.
- 108- Катранджи, М.М., (1988).** Культивирование *Eimeria stiedae* в клетках клеточной культуры и эмбрионах и быстрая оценка химических веществ. докторской диссертации, Специальность (паразиты), Ленинградский ветеринарный институт, СССР. 149 p.
- 109- Kawazoe, U., Tomley, F., Frazier, J., (1992).** Fractionation and antigenic characterization of organelles of *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitology* 104, 1-9.
- 110- Kessel, J. F., & Jankiewicz, A. (1931).** SPECIES DIFFERENTIATION OF THE COCCIDIA OF THE DOMESTIC RABBIT BASED ON A STUDY OF THE OÖCYSTS. *American Journal of Epidemiology*, 14(2), 304-324.
- 111- Khalafalla, R. E. B. I. (2009).** Evaluation of inhibition of *Eimeria tenella* sporozoites by antibody fragments expressed in pea.
- 112- Kim, S.J., Lee, M.Y., Kwon, D.Y., Kim, S.Y., Kim, Y.C., (2009).** Alteration in metabolism and toxicity of acetaminophen upon repeated administration in rats. *Journal of pharmacological sciences* 111, 175-181.
- 113- KN, A. M., NM, A. E., & Abdel-Rahman, E. H. (2005).** Protective effect of *Eimeria stiedae* coproantigen against hepatic coccidiosis in rabbits. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 35(2), 581-595.
- 114- Kodama, Y., Yokoyama, H., Nguyen, S. (2006).** Compositions against chicken coccidiosis (Google Patents).
- 115- Kotlan, A., Pellerdy, L., (1949).** A survey of the species of *Eimeria* occurring in the domestic rabbit. *Acta vet. hung* 1, 93-97.
- 116- Kutkat, M. A., Zayed, A. A., El Ezz, A., & Nadia, M. T. (1998).** A trial for immunization of rabbit against hepatic coccidiosis. *Zagazig Vet J*, 26, 70-77.
- 117- Kvičerová, J., Pakandl, M., Hypša, V., (2008).** Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp.(Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology* 135, 443-452.
- 118- Lacey, J., (2016).** "Fall 2000 Newsletter - Final Diagnosis - Hepatic coccidiosis". Indiana Animal Disease Diagnostic Laboratory Retrieved 27 June 2016.
- 119- Laemmli, U.K., (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227, 680-685.
- 120- Lehninger, A. L. (1975).** *Biochemistry*. Worth Publ. Inc., New York.

- 121- Lello, J., Boag, B., & Hudson, P. J. (2005).** The effect of single and concomitant pathogen infections on condition and fecundity of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *International Journal for Parasitology*, 35(14), 1509-1515.
- 122- Levine, N. D. (1973).** Historical aspects of research on coccidiosis. In *Proceedings of the symposium on coccidia and related organisms* (pp. 1-10).
- 123- Levine, N. D. (1985).** *Veterinary Protozoology*, Iowa State Univ. Press Ames Iowa.
- 124- Levinson, W. (2014).** *Review of medical microbiology and immunology*. McGraw-Hill Education.
- 125- Li, J., Zheng, J., Gong, P., Zhang, X., (2012).** Efficacy of *Eimeria tenella* rhomboid-like protein as a subunit vaccine in protective immunity against homologous challenge. *Parasitology research* 110, 1139-1145.
- 126- Lillehoj, H., Min, W., Dalloul, R., (2004).** Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. *Poultry Science* 83, 611-623.
- 127- Lillehoj, H.S., Trout, J.M., (1993).** Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathology* 22, 3-31.
- 128- Lillehoj, H.S., Trout, J.M., (1996).** Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clinical microbiology reviews* 9, 349-360.
- 129- Lima, J. D. (2004).** Coccidiose dos ruminantes domésticos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13(Supl 1), 9-13.
- 130- Lindansay, D., Blagburn, B., (1995).** Antiprotozoan drugs. Adams eds. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*.
- 131- Lindemann, K., (1865).** Weiteres über Gregarinen. *Bulletin de la Societe Imperiale de Naturalistes* 3, 381.
- 132- Lineburg, A., (1987).** *Eimeria stiedae* hematological and biochemical studies in the course of experimental invasion in rabbits. *Medycyna Weterynaryjna*, 564-567.
- 133- Long, P., Millard, B., Joyner, L., Norton, C., (1976).** A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Veterinaria Latina* 6, 201-217.
- 134- Lopez-Bernad, F., Del Cacho, E., Gallego, M., Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., (1996).** Identification of a fibronectin-like molecule on *Eimeria tenella*. *Parasitology* 113, 505-510.
- 135- Lorenz, M. D., Neer, T. M., & DeMars, P. (Eds.). (2009).** *Small animal medical diagnosis*. John Wiley & Sons.
- 136- MAFF, (1986).** Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Manual of parasitological laboratory techniques. Reference book number 418. , 3rd ed. London: ADAS, HMSO. Edition.

- 137- Mage, R.G., (1998).** Diversification of rabbit VH genes by gene-conversion-like and hypermutation mechanisms. *Immunological reviews* 162, 49-54.
- 138- Martin, A., Lillehoj, H., Kaspers, B., Bacon, L., (1994).** Mitogen-induced lymphocyte proliferation and interferon production following coccidia infection. *Avian diseases*, 262-268.
- 139- Mathis, G., Froyman, R., Kennedy, T., (2004).** Coccidiosis control by administering toltrazuril in the drinking water for a 2-day period. *Veterinary parasitology* 121, 1-9.
- 140- Mayne, P.(1996).** Clinical chemistry in diagnosis and treatment 6th edition. amold (London press).
- 141- McComb, R. B., Bowers, G. N., & Posen, S. (1979).** Alkaline Phosphatase plenum. New York.
- 142- McDonald, V., Wisher, M., Rose, M.E., Jeffers, T., (1988).** Eitneria tenella: immunological diversity between asexual generations. *Parasite immunology* 10, 649-660.
- 143- Mencher, D., Pugatsch, T., Wallach, M., (1989).** Antigenic proteins of Eimeria maxima gametocytes: cell-free translation and detection with recovered chicken serum. *Experimental parasitology* 68, 40-48.
- 144- Meredith, A., Rayment, L., (2000).** Liver disease in rabbits. In: *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, pp. 146-152.
- 145- Murray, P. K., & Galuska, S. (1986).** Coccidiosis vaccine. European patent application. Pub. No., 0, 167(442), A2.
- 146- Mwangi, G., (2010).** Prevalence and intensity of coccidiosis in adult and weaning domestic rabbits under intensive system. A Research Project. Faculty of Veterinary Medicine, University of Nairobi, Kangemi-Nairobi.
- 147- Niedzwiadek, S., Ramisz, A., Balicka, A., Bielanski, P., (1990).** Influence of salinomycin on the occurrence of coccidiosis in rabbits. *Roczniki Naukowe Zootechniki. Monografie i Rozprawy* (Poland).
- 148- Nishio, A., Keeffe, E.B., Ishibashi, H., Gershwin, E.M., (2000).** Diagnosis and 93treatment of primary biliary cirrhosis. *Medical Science Monitor* 6, RA181-RA1.
- 149- Norton, C., Catchpole, J., Joyner, L., (1979).** Redescriptions of Eimeria irresidua Kessel & Jankiewicz, 1931 and E. flavescens Marotel & Guilhon, 1941 from the domestic rabbit. *Parasitology* 79, 231-248.
- 150- Omata, Y., SATAKE, M., MAEDA, R., SAITO, A., SHIMAZAKI, K., UZUKA, Y., TANABE, S., SARASHINA, T., MIKAMI, T., YAMAUCHI, K., (200)1.** Reduction of the infectivity of Toxoplasma gondii and Eimeria stiedai sporozoites by treatment with bovine lactoferricin. *Journal of Veterinary Medical Science* 63, 187-190.

- 151- Oncel, T., Gulegen, E., Senlik, B., Bakirci, S., (2011).** Intestinal coccidiosis in angora rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) caused by *Eimeria intestinalis*, *Eimeria perforans* and *Eimeria coecicola*. *YYU Vet Fak Derg* 22, 27-29.
- 152- Oppelt, C., Starkloff, A., Rausch, P., Von Holst, D., & Rödel, H. G. (2010).** Major histocompatibility complex variation and age-specific endoparasite load in subadult European rabbits. *Molecular ecology*, 19(19), 4155-4167.
- 153- Ovington, K. S., Alleva, L. M., & Kerr, E. A. (1995).** Cytokines and immunological control of *Eimeria* spp. *International journal for parasitology*, 25(11), 1331-1351.
- 154- Owen, D., (1970).** Life cycle of *Eimeria stiedae*. *Nature* 227, 304-304.
- 155- Pakandl, M., (2013).** Coccidia of rabbit: a review. *Folia Parasitologica* 56, 153-166.
- 156- Panda, A. K., Rao, S. V. R., Raju, M. V., & Sharma, S. R. (2006).** Dietary supplementation of *Lactobacillus sporogenes* on performance and serum biochemico-lipid profile of broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*, 43(3), 235-240.
- 157- Papeschi, C., Fichi, G., Perrucci, S., (2013).** Oocyst excretion pattern of three intestinal *Eimeria* species in female rabbits. *World Rabbit Science* 21, 77-83.
- 158- Parija, S.C., (2012).** Textbook of Microbiology and Immunology. Reed Elsevier India Private., pp. 85-143.
- 159- Patton, W. H., & Brigman, G. P. (1979).** The use of sodium taurodeoxycholate for excystation of *Eimeria tenella* sporozoites. *The Journal of parasitology*, 526-530.
- 160- Peek, H., Landman, W., (2011).** Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Veterinary quarterly* 31, 143-161.
- 161- Peeters, J., Geeroms, R., (1986).** Efficacy of toltrazuril against intestinal and hepatic coccidiosis in rabbits. *Veterinary parasitology* 22, 21-35.
- 162- Pellérdy, L. (1969).** Attempts to alter the host specificity of eimeriae by parenteral infection experiments. *Brno Acta Univ Agr Fac Vet*.
- 163- Pellérdy, L., Dürr, U., (1970).** The endogenous developmental cycle of *Eimeria stiedai* (Lindemann, 1865) Kisskalt and Hartmann, 1907. *Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 20, 227-244.
- 164- Pérard, C., (1924).** Recherches sur les coccidies et les coccidioses du lapin. *Ann. Inst. Pasteur* 38, 953-976.
- 165- Percy, D.H., Barthold, S.W., (2013).** Pathology of laboratory rodents and rabbits. John Wiley & Sons.
- 166- Pfeiffer, L., (1890).** Zur Kenntniss der giftigen Wirkung der schwefligen Säure und ihrer Salze. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 27, 261-296.

- 167- Pfeiffer, L. (1891).** Die Protozoen als Krankheitserreger sowie, der Zellen-und zellenkern-Parasitismus derselben bei nichtbakteriellen Infektionskrankheiten des Menschen. Fischer.
- 168- Pfeiffer, R.F.W., (1892).** Beiträge zur Protozoen-Forschung: Die Coccidien-Krankheit der Kaninchen. August Hirschwald.
- 169- Polozowski, A., (1993).** Coccidiosis of rabbits and its control. *Wiadomosci parazytologiczne* 39, 13-28.
- 170- Pritt, S., Cohen, K., Sedlacek, H., (2012).** Parasitic diseases, In: *The laboratory rabbit, Guinea pig, hamster, and other rodents.* Elsevier, pp. 415-446.
- 171- Reid, W. M. (1975).** Progress in the control of coccidiosis with anticoccidials and planned immunization. *American journal of veterinary research*, 36(4 Pt 2), 593-596.
- 172- Remak, R., (1858).** Galvanotherapie der nerven-und muskelkrankheiten. Hirschwald.
- 173- Reynaud, M., Chauve, C., Gastellu, J., Gounel, J., (1999).** Administration of toltrazuril during experimental *Eimeria mulardi* coccidiosis in mule ducks: comparison of the efficacy of a single administration at two different endogenous stages. *Veterinary parasitology* 81, 265-274.
- 174- Riggs, M.W., Perryman, L., (1987).** Infectivity and neutralization of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infection and immunity* 55, 2081-2087.
- 175- Ringler, D.H., Newcomer, C.E., (2014).** The biology of the laboratory rabbit. Academic press.
- 176- Rose, M., (1987).** Immunity to *Eimeria* infections. *Veterinary immunology and immunopathology* 17, 333-343.
- 177- Rose, M. E., Lawn, A. M., & Millard, B. J. (1984).** The effect of immunity on the early events in the life-cycle of *Eimeria tenella* in the caecal mucosa of the chicken. *Parasitology*, 88(2), 199-210.
- 178- Ruiz, A., González, J., Rodríguez, E., Martín, S., Hernández, Y., Almeida, R., Molina, J., (2006).** Influence of Climatic and Management Factors on *Eimeria* Infections in Goats from Semi-arid Zones. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 53, 399-402.
- 179- Ryley, J.F., (1980).** Recent developments in coccidian biology; where do we go from here? *Parasitology* 80, 189-209.
- 180- Rysavy, B. (1954).** Prispěvek k poznání kokcidii našich i dovezených obratlovců. *Ceskoslovenska Parasitologie*, 1, 131-174.

- 181- San Martin-Nunez, B., Ordonez-Escudero, D., & Alunda, J. M. (1988).** Preventive treatment of rabbit coccidiosis with α -difluoromethylornithine. *Veterinary parasitology*, 30(1), 1-10.
- 182- Sanyal, P., Sharma, S., (1990).** Clinicopathology of hepatic coccidiosis in rabbits. *Indian Journal of Animal Sciences* 60, 924-928.
- 183- Satyanarayana, N., Madhekar, D., Subba Rao, C., (1982).** Observations on an outbreak of coccidiosis in rabbits and its treatment. *Livestock adviser*.
- 184- Schoeb, T.R., Cartner, S.C., Baker, R.A., Gerrity, L.G., (2007).** Parasites Of rabbits. In: Baker, D.G. (Ed.), *Flynn's Parasites of Laboratory Animals*. Blackwell Publishing, Ames. 451–500.
- 185- Sehgal, D., Schiaffella, E., Anderson, A. O., & Mage, R. G. (1998).** Analyses of single B cells by polymerase chain reaction reveal rearranged VH with germline sequences in spleens of immunized adult rabbits: implications for B cell repertoire maintenance and renewal. *The Journal of Immunology*, 161(10), 5347-5356.
- 186- Shane, S. (2005).** Antibiotic alternatives in turkey production. *World Poultry*, 21(5), 26-27.
- 187- Sibley, L.D., Håkansson, S., Carruthers, V.B., (1998).** Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Current Biology* 8, R12-R14.
- 188- Silva, P., Freitas Neto, O., Laurentiz, A., Junqueira, O.M., Fagliari, J.J., (2007).** Blood serum components and serum protein test of Hybro-PG broilers of different ages. *Brazilian Journal of Poultry Science* 9, 229-232.
- 189- Simond, P., (1897).** L'evolution des sporozoaires du genre coccidium. In: *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)*, pp. 545-581.
- 190- Singla, L., Juyal, P., Sandhu, B., (2000).** Pathology and therapy in naturally *Eimeria stiedae*-infected rabbits. *The Journal of Protozoology Research* 10, 185-191.
- 191- Slater, R.L., (1969).** Pathway and timing of invasion of sporozoites of *Eimeria stiedae*. *Journal of Parasitology (Suppl.)*, 53 (abstract 108).
- 192- Smetana, H. (1933a).** Coccidiosis of the liver of rabbits. *Arch. Path* 15, 175-192.
- 193- Smetana, H. (1933b).** Coccidiosis of the liver of rabbits: experimental study of the mode of infection of the liver by sporozoites. *Arch. Pathol*, 15, 330-339.
- 194- Smith, M.C., Sherman, D.M., (2009).** *Goat medicine*. John Wiley & Sons.
- 195- 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.

- 196- Soulsby, E., (1986).** Helminths, athropods and protozoa of domesticated animals seventh edition, English language Book Society. William Clowes Ltd. Beccles and London.
- 197- Sparkes, A., & Gruffydd-Jones, T. J. (1993).** Laboratory diagnostic aids. Wills, J., Wolf, A: Handbook of feline medicine. Pergamon Press, Oxford, 91-112.
- 198- Stefani, M., Dobson, C.M., (2003).** Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. Journal of molecular medicine 81, 678-699.
- 199- Stieda, L. (1865).** Ueber die Psorospermien der Kaninchenleber und ihre Entwicklung. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin, 32(1), 132-139.
- 200- Stotish, R. L., Wang, C. C., & Meyenhofer, M. (1978).** Structure and composition of the oocyst wall of *Eimeria tenella*. The Journal of parasitology, 1074-1081.
- 201- Su, J., Cavaco-Paulo, A., (2021).** Effect of ultrasound on protein functionality. Ultrasonics Sonochemistry, 105653.
- 202- Subramanian, B. M., Sriraman, R., Rao, N. H., Raghul, J., Thiagarajan, D., & Srinivasan, V. A. (2008).** Cloning, expression and evaluation of the efficacy of a recombinant *Eimeria tenella* sporozoite antigen in birds. Vaccine, 26(27-28), 3489-3496.
- 203- Sühwold, A., Hermosilla, C., Seeger, T., Zahner, H., & Taubert, A. (2010).** T cell reactions of *Eimeria bovis* primary-and challenge-infected calves. Parasitology research, 106(3), 595-605.
- 204- Sultana, R., Maqbool, A., Anjum, A. A., Ilyas, S. C., & Ahmad, M. S. (2014).** Control of coccidiosis in calves by vaccination. Journal of Bacteriology & Parasitology, 5(4), 1.
- 205- Tabarés, E., Ferguson, D., Clark, J., Soon, P.-E., Wan, K.-L., Tomley, F.,(2004).** *Eimeria tenella* sporozoites and merozoites differentially express glycosylphosphatidylinositol-anchored variant surface proteins. Molecular and biochemical parasitology 135, 123-132.
- 206- Tahir, M. J. (1998).** Isolation and characterization of dense granules of *Eimeria tenella* sporozoites (Doctoral dissertation).
- 207- Talebi, A. (1995).** Protein profiles of five avian *Eimeria* species. Avian Pathology, 24(4), 731-735.
- 208- Taubert, A., Hermosilla, C., Sühwold, A., Zahner, H.,(2008).** Antigen-induced cytokine production in lymphocytes of *Eimeria bovis* primary and challenge infected calves. Veterinary Immunology and Immunopathology 126, 309-320.
- 209- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2007).** Text book of veterinary parasitology 3rd edition Blackwell publishing Ltd.

- 210- Taylor, M., Coop, R., Wall, R., (2015).** Veterinary Parasitology, Forth Edition. Wiley-Blackwell; 4th edition (December 21, 2015), 1032 p.
- 211-Tehrani, A. A., Yakhchali, M., Beikzadeh, B., & Morvaridi, A. (2013).** Prevalence of rabbit hepatic coccidiosis in north west of Iran.
- 212- Tenter, A., Schnieder, T.,(2006).** Erreger von Parasitosen: Taxonomie, Systematik und allgemeine Merkmale. Veterinärmedizinische Parasitologie. Parey, Berlin, 26-73.
- 213- Tokuda, G., & Warrington, R. E. (1970).** Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus Antibodies: I. "Passive" Hemagglutination Test. Applied microbiology, 20(1), 35-39.
- 214- Tomley, F., (1997).** Techniques for Isolation and Characterization of Apical Organelles from *Eimeria tenella* Sporozoites. Methods 13, 171-176.
- 215- Toula, F.H., Ramadan, H.H., (1998).** Studies on coccidia species of genus *Eimeria* from domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus domesticus* L.) in Jeddah, Saudi Arabia. Journal of the Egyptian Society of Parasitology 28, 691-698.
- 216- Trees, A., Crozier, S., McKellar, S., Wachira, T., (1985).** Class-specific circulating antibodies in infections with *Eimeria tenella*. Veterinary parasitology 18, 349-357.
- 217- Tripathi, R., Dev, C., Sharma, M., (1995).** Economics of Angora rabbit farming in hills. Indian Journal of Animal Sciences (India).
- 218-Tyzzler, E. E. (1902).** Coccidium infection of the rabbit's liver. The Journal of medical research, 7(3), 235.
- 219- Udem, S., Obidoa, O., Asuzu, I., (2010).** Acute and chronic toxicity studies of *Erythrina senegalensis* DC stem bark extract in mice. Comparative Clinical Pathology 19, 275-282.
- 220-Ütük, A. E., Pişkin, F. Ç., Balkaya, İ., & Karakurum, M. Ç. (2015).** Molecular detection of *Eimeria stiedae* in an Angora rabbit. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 26(2), 41-44.
- 221- van Praag, E. (2011).**Protozoal enteritis: Coccidiosis.Protozoal_diseases.
- 222- Veterinärmedizin, F. & Ayeni, A. O. (1969).**Justus Liebig-Universität Giessen. Zur Frage Des Sauerstoffverbrauches Der Oocysten Von *Eimeria Stiedai* (Lindemann, 1865) Kisskalt and Hartmann, 1907 (Sporozoa, Coccidia) Waehrend Nd Nach Der Sporulation.(Thesis).
- 223- Wallach, M., (2010).** Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis. Trends in Parasitology 26, 382-387.
- 224- Wallach, M., Halabi, A., Pillemer, G., Sar-Shalom, O., Mencher, D., Gilad, M., Bendheim, U., Danforth, H., Augustine, P., (1992).** Maternal immunization with

gametocyte antigens as a means of providing protective immunity against *Eimeria maxima* in chickens. *Infection and Immunity* 60, 2036-2039.

225- Wallach, M.G., Mencher, D., Yarus, S., Pillemer, G., Halabi, A., Pugatsch, T., (1989). *Eimeria maxima*: identification of gametocyte protein antigens. *Experimental Parasitology* 68, 49-56.

226- Wang, C. C., & Stotish, R. L. (1975). Pancreatic chymotrypsin as the essential enzyme for excystation of *Eimeria tenella*. *The Journal of parasitology*, 923-927.

227- Wang, J., Tsai, S., (1991). Prevalence and pathological study on rabbit hepatic coccidiosis in Taiwan. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences* 15, 240-243.

228 - Waworuntu, F. K. (1924). Bijdrage tot de kennis van het konijnen-coccidium. [sn].

229- Wenyon, C. M. (1926). Protozoology. A manual for medical men, veterinarians and zoologists, vol. 2. *Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists, Vol. 2.*

230- Whitehead, C. C., Mitchell, M. A., & Njoku, P. C. (1990). Effects of ascorbic acid on egg yolk and shell precursors in heatstressed laying hens. In *Proceedings of the 2nd symposium on ascorbic acid in domestic animals, Kratause Ittingen, Switzerland* (pp. 262-269).

231- Williams, R. B. (2002). Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathology*, 31(4), 317-353.

232- Williams, R. B., & Catchpole, J. (2000). A new protocol for a challenge test to assess the efficacy of live anticoccidial vaccines for chickens. *Vaccine*, 18(13), 1178-1185.

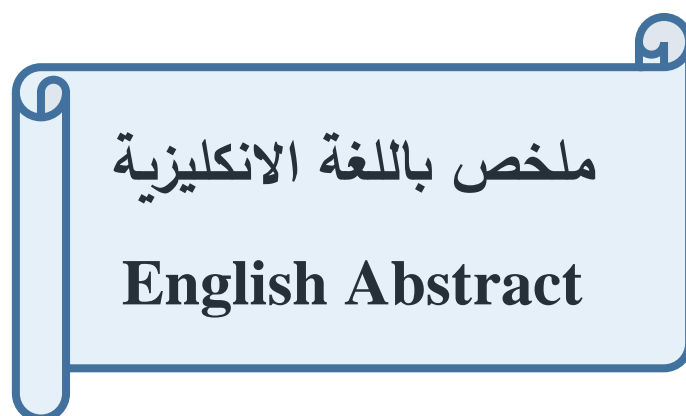
233- Wisher, M. H. (1986). Identification of the sporozoite antigens of *Eimeria tenella*. *Molecular and biochemical parasitology*, 21(1), 7-15.

234- Xu, L., & Li, X. (2011). Vaccination of chickens with DNA vaccine expressing *Eimeria tenella* MZ5-7 against coccidiosis. *Veterinary Parasitology*, 177(1-2), 6-12.

235- Zajac, A. M., & Conboy, G. A. (2012). *Veterinary Clinical Parasitology* 8th edition, American Association of veterinary parasitologists.

236- <http://www.infoexoticos.com/coccidiosis-en-conejos>.

237- <http://eimeria.chez-alice.fr/structure.html>.



This study was designed to evaluate the vaccine prepared from the *Eimeria stiedae* parasite of its different stages (sporozoites, sporulated oocysts , and non-sporulated oocysts) by obtaining protein extracts for each phase by sonication method (exposed to ultrasonic waves) and Lysis buffer In rabbits, in the Department of Microbiology / College of Veterinary Medicine / University of Hama.

The study was conducted on 40 rabbits, which were randomly divided into eight equal groups. Rabbits from groups three to eight were injected with equal doses of the prepared vaccines with a dose of 25 µg of subcutaneous protein extract, and group one (A) was considered as negative control and group two (B) as positive control. Whereas the third group (C) was inoculated with the sonicated proteins of non- sporulated oocysts, the fourth group (E) with the sonicated proteins of the sporulated oocysts, the fifth group (F) with the hydrolyzed proteins of the sporulated oocysts, and the sixth group (G) with the sonicated proteins of the sporozoites , seventh (H,) with proteins of hydrolyzed sporozoites, and the eighth group (I) with proteins of sonicated and hydrolyzed sporulated oocysts, then all groups except group (A) (Negative control) (with distilled water only) were dosed with a challenge dose of 1000 sporulated oocysts.

The results of the study showed the possibility of identifying the most important *Eimeria* immunogenic antigens from the parasite stages (sporozoites, sporulated oocysts , and non- sporulated oocysts) with immunogenic capacity and

responsible for the formation of antibodies after experimental infection of rabbits, starting with oocysts isolated from the liver, protein purification, and spontaneous acquisition of sound.

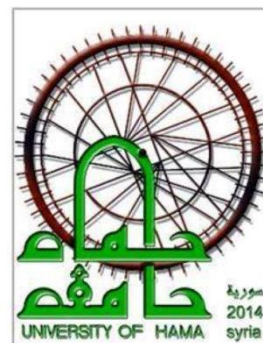
The results showed that the sporozoites or sporulated oocysts protein sonicated vaccine has the characteristics of an effective vaccine, as it gave a percentage of protection ranging between 88-91%, and contributed to a decrease in the number of shed Oocysts. The current study reached to the detection of a number of antigens that were observed using the western blot technology, including a number of antigens when incubated with sera vaccinated with the proteins of consonant sporozoites (24-26-28-66-119) kDa. When incubating with sera inoculated with hydrolyzed sporozoite proteins, antigens with a molecular weight of (24-26-28) kDa were detected, and in the case of incubation with sera inoculated with oocysts' proteins, antigens appeared (124-119-84-66-57- 39-28-26-24) kDa. When incubating with sera fertilized with hydrolyzed oocysts, antigens with molecular weights (124-119-57-28-26-24) were detected. The most important common antigens in the immunized sera with the types of vaccines prepared from the stages of the Eimeria steroid parasite after the challenge dose (24-26-28) kDa, due to their presence in the two phases, the thickness of their rings, their direct appearance, and before the other bands when performing the immune signature test.

The results also showed the ability of the vaccine to keep the levels of hepatic enzymes activity (ALT-AST-ALP) within the normal level and reduce the high level of their activity, which indicates the effectiveness of the vaccine in maintaining the integrity of hepatocytes from necrosis and limiting liver damage.

The results at the level of the immune response showed that using the sporozoites vaccine leads to stimulating a higher immune response than the sporozoites vaccine, where the average titer of antibodies resulting from the sporozoites vaccine was higher than the average titer of antibodies resulting from the sporotrich proteins vaccine without the presence of Significant differences between them, indicating the efficiency of the two phases in stimulating the immune response to form an effective protection against this parasite.

As a result, this study shows the importance of sporozoites and oocysts vaccines in generating an effective immune response and recommends conducting more research on this vaccine to show its practical importance in Syria, as an alternative to the currently used imported drugs and treatments.

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



Evaluation of Some Vaccines Prepared from *Eimeria stiedae* on the Immune Response in Rabbits

Thesis Submitted for Degree of Ph.D in Parasitology

By

Osama Jamal Al-Waheeb

Master Degree In Vet. Med. Sci

(Parasitology)

Under The Supervision Of

Prof. Dr.

Mohamad M. Katranji

Prof. Dr.

Mahmoud Kweider

2022