الكشف الجزيئي عن داء المقوسات في القمل *Menacanthus stramineus* المتطفل على الدجاج المصاب طبيعياً باستخدام فحص تفاعل البلمرة التسلسلي الاعتيادي

هادي مدلول حمزة الميالي فاطمة ابراهيم محمد الليباوي
جامعة القادسية/ كلية التربية/ قسم علوم الحياة
email:hadihamza519@yahoo.com
(الاستلام ٣٠ ايلول ٢٠١٣ ، القبول ٣ حزيران ٢٠١٤)

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى محاولة اثبات دورالقمل العاض *M.stramineus*في نقل طفيلي المقوسة الكوندية*T.gondii* الى الدجاج باستخدام طريقة تفاعل البلمرة المتسلسلPCR إذ جُمع ٣٠ طيراً من الدجاج المحلي البالغ *Gallus gallusdomesticus*بعمر أكبر من ٤ أشهر المصاب إصابة كثيفة بالقمل من الأسواق المحلية لمدينة الديوانية، وأخضعت جميع هذه العينات للفحص المصلي باستخدام اختبار تلازن اللاتكسLatex agglutination test الخاص بالكشف عن طفيلي المقوسة الكوندية*Toxoplasma gondii* الذي أظهر أن هناك ١٧ عينة مصابة بطفيلي المقوسة الكوندية وبنسبة56.66% وان أعلى نسبة في اصابة الطيور سجلت عند المعيار 1/80(41.17%) وأقل نسبة عند المعيار1/40 و1/640 إذ بلغت 5.88% لكليهما. أشارت نتائج التحليل الجزيئي لأنسجة القمل العاض من النوع *Menacanthus stramineus* باستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي PCR، حيث تم تضخيم الجين B1 عند الجزء ٣٩٩ زوج قاعدي الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية في ١٢ عينة من مجموع العينات المفحوصة والبالغة ٢٢ عينة وبنسبة 54.54% من خلال الدراسة نستنتج على وجود الطفيلي في القمل وقدرته على نقل الطفيلي ضمن أجزاء جسمه.

الكلمات المفتاحية: داء المقوسات، *Menacanthusstramineus*، تفاعل البلمرة، اختبار اللاتكس، الدجاج.

Molecular detection 0f Toxoplasmosis in biting lice *Menacanthus stramineus* on naturally infected chickens using polymerasechian reaction

Hadi M.AL-Mayali Fatima I.AL-Lebawi
Coll. of Education/Univ. of AL-Qadisyia
email:hadihamza519@yahoo.com

Abstract

The aim of the current study to try prove the role of biting lice *M.stramineus* to transfer *T.gondii* to chickens by using PCR Thirty local chickens(*Gallus gallus domesticus*) were collected at age greater than 4 months and infected with dense lice from markets of AL-Diwaniya city, All samples tested by serological test using Latex Agglutination Test to detects of *Toxolasma gondii* parasite, 17 samples were positive for *Toxoplasma gondii* parasite with percentage 56.66% and the highest proportion in the birds recorded at the standard 1/80 (41.17%) and the lowest proportion at standard 1/40, 1/640 reached (5.88%) for both.According to the results of molecular analysis of tissue of biting lice (*Menacanthus stramineus*) using conventional polymerase chain reaction (PCR) to the amplification of gene B1 at a fragment of 399bp of specific of *Toxoplasma gondii* parasite in 12 sample of the total samples tested, about 22 samples percentage 54.54% within the study we conclude presence of the parasite in lice and ability to transfer parasite within his body parts.

Key words: Toxoplasmosis, *Menacanthus stramineus*, PCR, LAT, chickens

المقدمة

تعمل الطفيليات الخارجية كنواقل للعديد من المسببات المرضية كالبكتريا والفايروسات اذ تكون مضائف وسطية للعديد من الديدان الشريطية والخيطية(1)، يعتبر قمل جسم الدجاج *Menacanthusstramineus* مخزنا وناقلا للمسببات

المرضية كمرض كوليرا الطيور والتيفوئيد والمقوسات Toxoplasmosis(2)، كما عزل فايروس التهاب دماغ الخيل من *M.stramineus* وعزل الكلاميدياchlamydia of ornithosis (مرض ينتقل من الطير الى الانسان) من قمل *Menopon gallinae* على الدجاج والديك الرومي (3)، كما ان القمل العاض يمكن ان ينقل الجراثيم مثل *Pasteurella multocida* و*Salmonella gallinarium* و*Escherichia coli* و*Streptococcus sp.* (4).كما ينقل قمل *Trinoton anserinum* دودة القلب Heart worm الى البط والاوز(6,5) بينما يكون قمل الكلاب *Trichodectes* مضيف وسطي لبعض الديدان الشريطية Tape worm(7)، فضلا عن دور القمل العاض في نقل الديدان الخيطية Nematodes الى الطيور المائية .

المواد وطرائق العمل

جُمع (٣٠) طيراً من الدجاج المحلي البالغ *Gallus gallus domesticus* بعمر أكبر من ٤ أشهر من الأسواق المحلية لمدينة الديوانية بعد التأكد من إصابتها إصابة كثيفة بالقمل العاض لغرض التحري عن طفيلي المقوسة الكوندية في مصولها باستخدام اختبار اللاتكس وكذلك جمع عينات القمل *M.stramineus* إذ شخصت نماذج القمل بالاعتماد على عدة مفاتيح تصنيفية معدة من قبل باحثين منهم(10,9,8) لغرض التحري عن الطفيلي نفسه في انسجتها بطريقة اختبار تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR) من خلال تحديد وجود احد الجينات التشخيصية الخاصة بالطفيلي في انسجة القمل لدراسة إمكانية كون القمل ناقل للطفيلي في الدواجن من خلال تحديد وجود هذا الجين. سحبت عينات الدم من الدجاج المصاب طبيعياً بالقمل العاض من المنطقة الواقعة تحت الجناح بواسطة سرنجة معقمة حجم $5cm^3$ (11) بمعدل ٣-٥ مل من الدم ثم وضعت في انابيب معقمة وبعد فصل المصل وضعت في انابيب خاصة معقمة وحفظت في-٢٠مْ لحين اجراء فحص تلازن اللاتكسLatex Agglutination Test الخاص بداء المقوسات والمتكون من مصل السيطرة الموجب المتكون من مصل الانسان المخفف مضافاً اليه الاجسام المضادة IgGللأرانب ومصل السيطرة السالب ويتكون من مصل الانسان المخفف بدون الاجسام المضادة فضلاً عن كاشف بشكل جزيئات معلقة من البولي أسترين المغطاة بالمستضدات الذائبة لطفيلي المقوسة الكوندية وبحسب الطريقة الموصوفة من قبل(12).استخلصت المادة الوراثية DNA من عينات القمل وذلك باستعمال عدةGenomic DNA Extraction kit والمجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية ونظرا لعدم وجود دراسات سابقة حول استخلاص DNA من عينات القمل فقد تم اعتماد طريقة(13) التي اعتمدها لاستخلاص DNA من حشرات ذبابة الرمل للتحري عن طفيلي اللشمانيا وقد استعملت بادئات *Toxoplasma gondii* مع تسلسلها النيوكليوتيدي والمجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية وذلك باستعمال تقنية تفاعل البلمرة التسلسليPCR. لغرض التحري عن الجين B1gene بناتج 399bp وزن جزيئي الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية.

البادئ Primer		تتابع الأحماض Sequence	حجم الناتج qPCR product size	الشفرة GenBank Code no.
Toxoplasma gondii B1 gene	F	GAACCACCAAAAATCGGAGA	399bp	AF179871.1
	R	GATCCTTTTGCACGGTTGTT		

وقد حضر مزيج التفاعل لسلسلة البلمرة باستعمال عدة AccuPower® PCR pre Mix المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية وبحسب تعليمات الشركة تم وضع المزيج في انابيب PCR والمجهزة في العدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة واضيفت المكونات الاخرى لمزيج التفاعل(primers,3µL/DNA,5µL/PCRwater,12µL) ثم تغلق الانابيب وتمزج بواسطة المازج وتنقل الانابيب لجهاز PCR Thermocycler لأجراء مراحل الدورات الحرارية لتضخيم DNA وفق البرنامج الآتي:

الخطوة الأولى: المسخ Denaturation بدرجة حرارة95مْ. الخطوة الثانية: الالتحام Annealing بدرجة حرارة٥٥مْ الخطوة الثالثة: الاطالة Extension بدرجة حرارة 72مْ وقد تم تضخيم DNA بـ ٣٠ دورة بعد ذلك اجري الترحيل الكهربائي لنواتج التضخيم على هلام الاكاروز بنسبة 1.5 % وبعد اكتمال عملية الترحيل يفحص الهلام الحاوي على ناتج PCR باستخدام جهاز الاشعة فوق البنفسجية UVtransluminator لتحديد النتائج الموجبة للعينات والمطابقة مع سلم القياس DNA ladder.

النتائج

١-الكشف المناعي

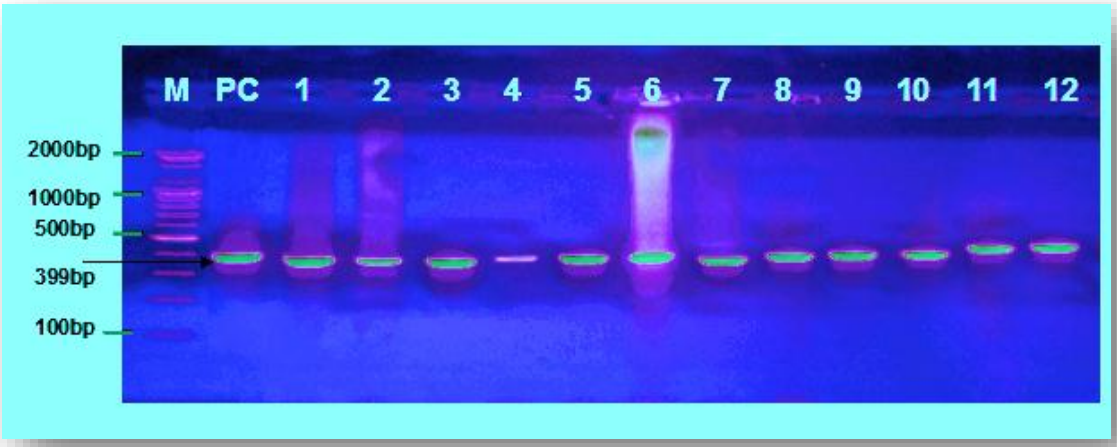
اظهرت نتائج الفحص المناعي للكشف عن داء المقوسات في مصل طيور الدجاج المفحوصة والمصابة طبيعيا بالقمل وجود17حالة اصابه موجبه بالطفيلي وبنسبه 56.66% من مجموع الطيور المفحوصة والبالغ عددها 30 طيراً حيث ظهرت اجسام الضد وبمعيارية مختلفة تراوحت ما بين 1/20 و1/640 وظهرت أعلى نسبة معياريه لأجسام الضد عند المعيارية (41.17%) 1/80وأقل نسبة عند المعيارية 1/40و1/640 حيث بلغت (5.88%) لكليهما. (جدول١).

الجدول(١) يبين نسب ومعيارية أجسام الضد لطفيلي المقوسة الكونديه*Toxoplasma gondii*في مصول الدجاج المفحوص المصاب طبيعيا بالقمل بأستخدام فحص اللاتكس.

العينات		المعيارية					
		1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
العدد المفحوص	العدد المصاب (%)	العدد الموجب (%)	العدد الموجب (%)	العدد الموجب (%)	العدد الموجب (%)	العدد الموجب (%)	العدد الموجب (%)
30	17(56.66)	3(17.64)	1(5.88)	7(41.17)	3(17.64)	2(11.67)	1(5.88)

٢-الكشف الجزيئي

تم الاعتماد على نتائج فحص اللاتكس الذي استخدم لتحديد اجسام الضد لطفيلي المقوسة الكوندية في مصول الدجاج المصاب طبيعياً بالقمل والتي أظهرت نتائج موجبه للفحص حيث تم جمع عينات القمل *Menacanthusstramineus* من الحالات الموجبة للدجاج وخاصة ذات المعيارية العالية للتحري عن الجين التشخيصي B1 ذو الوزن الجزيئي 399bp الخاص بطفيلي المقوسة الكونديه. أظهرت نتائج استخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي الاعتيادي في فحص 22 عينة قمل وجود 12عينه موجبه للفحص وبنسبة 54.54%حيث تم تسجيل تواجد الجين(B1(399bp الخاص بطفيلي المقوسة الكونديه في انسجة القمل المذكور مما يدل على تواجد الطفيلي فيها (شكل1).



الشكل(١): تمثل صوره الترحيل الكهربائي النهائي لعينات الحامض النووي DNA الموجبة فقط للقمل *M.stramineus*من الدجاج المحلي على هلام الاكاروز بتركيز (1.5%)تظهر نتائج فحص ال PCR ظهور الجين B1 gene الخاص بتشخيص طفيلي المقوسة الكونديه فيه. حيث يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و PC: DNA تمثل السيطرة الموجبة والعينات1-12 تمثل العينات الموجبة للفحص للجين B1 gene بناتج 399bp وزن جزيئي.

المناقشة

أشارت نتائج الكشف المناعي باستخدام اختبار تلازن اللاتكس، إلى ان اعلى معيارية للأجسام المضادة لطفيلي المقوسة الكوندية في مصول الدجاج المصاب طبيعياً بالقمل سجلت عند المعيار 1/80(41.17%) واقلها عند المعيارين1/40و1/640 إذ بلغت (5.88%) لكليهما. وهذه الدراسة تختلف عما سجل في الدراسات الاجنبية والعربية السابقة حيث ذكر كل من(16,18,15,20,19,14,17)، بأن اعلى معيارية للأجسام المضادة في مصول الدجاج المحلي وفروج اللحم كانت عند المعيار1/60(45.45%) و1/320(30.5%) و1/5 و1/10(٢٨% لكل معيار) و1/128(١٥%) و1/320(32.6%) و1/128(34.32%) و1/80(25.81%) على التوالي، في حين ذكر(16,15,18,20) بأن اقل معيارية لأجسام الضد في مصول الدجاج المحلي كانت عند المعيار 1/20(٥%) و1/20(٢%) و1/2(5.22%) و1/640(6.45%) على التوالي.تشير التراكيز العالية للأجسام المضادة في مصول الدجاج الى وجود الاصابات الحادة Acute infections بطفيلي المقوسة الكوندية والذي يدل على التعرض القريب للطفيلي في حين تدل التراكيز الواطئة للأجسام الى وجود الاصابات المزمنة Chronic Infections بالطفيلي وهذا يتفق مع ما ذكره (٢١). استخدمت تقنية تفاعل سلسلة البلمرة كطريقة تشخيصية لتأكيد نتائج الاختبارات المصلية التي تمثلت باختبار تلازن اللاتكس، لما تمتاز هذه التقنية من حساسية وخصوصية عاليتين عند استخدامها للكشف عن طفيلي المقوسة الكوندية في مختلف العينات البايلوجية(٢٢،٢٣). أشارت نتائج استخدام تفاعل سلسلة البلمرة الاعتيادي للكشف عن الجين (B1(399bp الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية في ٢٢ عينة قمل الى ان النسبة الكلية لوجود الجين B1 بلغت 54.54% (١٢ عينة موجبة) وتتفق هذه الدراسة مع دراسة (١٦) حيث سجلت اصابة (١٤ عينة دم) من الدجاج المحلي بالمقوسة الكوندية وبنسبة 17.5%

باستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي للكشف عن الجين (399bp) B1 في دمائها، اما في دراستنا الحالية فقد تم الكشف عن هذا الجين (399bp)B1 في انسجة القمل المعزول من الدجاج المصاب طبيعياً بالقمل وطفيلي المقوسة الكوندية وهذا يؤكد دور هذا القمل في نقل طفيلي المقوسة الكوندية الى الطيور السليمة من الطيور المصابة اثناء تغذيته على دمائها وهذا يتفق مع(٢٢) والذي اكد اصابة الفئران المختبرية وطيور الدجاج السليمة بالمقوسة الكوندية بعد حقنها بمسحوق من عينات القمل *M.stramineus* التي جمعت من طيور دجاج مصابة بالمقوسة الكوندية. كما تتفق ايضاً مع (٢) والذي اكد ان قمل *M.stramineus* هي مخزناً وناقلاً للمقوسة الكوندية.وقد يعود السبب في ظهور جين الطفيلي في انسجة عينات القمل الى كونه حاملاً او ناقلاً للطفيلي في اثناء تغذيته على طيور مصابة ومن ثم نقلها الى الطيور السليمة في اثناء عمليات التغذية على الدم مما يعطي مؤشرا واضحا على الارتفاع الكبير في حالات الإصابة بطفيلي المقوسة الكوندية الذي أشارت إليه الدراسات السابقة ومنها(28,15,25,27,26).

المصادر

١-Permin A, Hansen JW (1998) Epidemiology, diagnosis and control of poultry parasites FAO Animal Health Manuals 4. Rome:Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Pp.160

٢-Saxena AK, AgarwalGP,Chandra S, Singh OP (1985)Pathogenic involvement of Mallophaga. Zurangewandte Entomologie,99:294-300.

٣-Saif Y M, Barnes HJ, Glisson JR , Fadly AM, McDougal CR,Swagne DE (2003)Diseases of Poultry.11th ed. Iowa State Press,Black well publishing Co.

٤-Trivedi MC, Sharma S, Rawat B S,Saxena AK (1990)Haematophagus nature of ambluceranphthiraptera, MenacanthuscornutusSchommer, infesting poultry bird *Gallus domesticus*L.India.J. Appl. Ent., 110: 107-111

٥-Seegar WS,SchillerEL,Sladen WJL,TrpisM (1976)A Mallophaga, Triton anserium,asacyclo developmental vector for aheart worm parasite of water fowl.Science194:739-741.

٦-Cohen S, Greenwood MT, Fowler JA (1991) The louse *Trinotonanserium* (Amblycera: Phthiraptera) ; an intermediate host of *sarconemaeurycera* (Filariodea:Nematoda), a heartworm of swans.Med.Veter.Entomol.5:101-110.

٧-Kim KC,Emerson KC, Price R D (1973) Lice. In: R.J. Flynn(ed.) parasites of laboratory animals, pp.376-397 .Iowa State Univ. press,Ames.

٨-Barriga OO (1995) Veterinary Parasitology.Gerden Press, Columbus,Ohio,USA.

٩-Soulsby EJL (1982) Helminthes, Arthropods and Protozoa of Domestic Animal. 7th ed. Balliere, Tindall& Cassell,London.P.973.

١٠-Wall R, Shearer D (1997)Veterinary Entomology Arthropod Ecto- parasites of veterinary Importance .Chapman & Hall,p.151

١١-Strukie PD (1965) Avian physiology.Cornell.Ini.Press:75

١٢-JacobsL(1973)New knowledge of *Toxoplasma* and ToxoplasmosisIn:Advanced in parasitology Edited by.Dawes ,B.Academicpress. London and NewYork.11:631-670.

١٣-SaneiDehkordiA,RassiY,OshaghiM,AbaiMR,RafizadehS,Yag-hoobiMR, MohebaliM, Zarei Z MohtaramiF,Jafarzadeh B, Ranj- barkhahA, JavadianE (2011)Molecular Detection of*Leishmaniainfantum* in naturally infected*phlebotomusperfillewitranscaucasicus* in Bilesaver District,Northwestern Iran. Iran J. Arthropod-Borne Dis.: 5(1) 20-27.

١٤-الطائي، احلام فتحي محمود، عباس، نشوان عدنان ،محمد، واقد حسن ،جرجيس، بشار محمد،حسين ،يسرى يحيى(٢٠٠٥)الكشف عن اضداد مقوسات كوندي*T.gondii* في فروجاللحم في محافظة نينوى.مجلة طب دهوك .(٢): ٢٦٤ -٢٦٧.

١٥-داخل،محمد حبيب(٢٠١٢)دراسة بايلوجية جزئية ومناعية للإصابة بطفيلي المقوسةالكونـدية*Toxoplasma gondii* في الحمام البري والمنزلي والدجاج المحلي. رسالةماجستير . جامعةالقادسية.كلية التربية .١١٩ صفحة.

١٦-الخالدي،خديجة عبيس حمود(٢٠١٤) التحري عن طفيلي المقوسة الكوندية*Toxoplasmagondii* في الطيور الداجنة في منطقة الفرات الاوسط والقطط في محافظة الديوانية باستخدام التقنيات المصلية والجزيئية .اطروحة دكتوراه. جامعة القادسية .كلية التربية.١٦٨صفحة.

١٧-Lindasy DS, SmithPC,Blagurn BL(1994)Prevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from wild turkey in Alabam. J.Helmintholo.Soci.Washington.,61:115-117

١٨-AL-Khaled MJA (2012)Serological and Molecular study of Toxoplasmosis in Chickens and Ducks in some regions of middle Euphrates. Thesis Vet.Med. Uni. Baghdad .pp135.

١٩-Dubey JP, Edelhofer R, MarcetP,Vianna MC, Kwok OC, Lehmann T (2005c)Genetic and biologic

characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria.vet.parasitol.,133:299-306.

٢٠-Sedlak K, Literak I, VitulaF,Benak J (2010)High susceptibility of partridges (*Predixpredix*) to Toxplasmosis compared with other gallinaceaus birds. Avian Pathol.,(29): 563-569.

٢١-DubeyJP,JKLunney SK, Shen O CH, Kwok D AA shfordThulliez P (1996) Infectivity of low numbers of *Toxplasmagondii*oocysts to pigs.J. parasitol., 82: 438-443.

٢٢-Burg JL, Grover CM, pouletty P,Boothroyd J (1989)Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction .J. Clin. Microbiol., 27(8):1787-1792.

٢٣-Ho-Yen DO (1992) Clinical features .In D.O. Ho-Yen, and A.W.L.Joss (ed.), Human Toxoplasmosis. Oxford Medical publications,Oxford, United Kingdom, 56-78.

٢٤-Derylo A (1977)Studies on the Role of biting lice, *Eomenacanthusstramineus* (Nitzsch) in the transmission of Toxoplasmosis tochickens. Wiadimosciparasitologiczne .23(1-3):131-134

٢٥-الجبوري،سعديةعزيزعنه(٢٠١٠)الاصابات الطفيلية الداخلية والخارجية في الدجـــاج المنزلي *Gallus gallusdomesticus*(Linnaeus,1758).في مدينـة الديوانيـة.رسالة ماجستير، كلية التربية ،جامعة القادسية : ١١٦ صفحة.

26-DubeyJP, Graham DH, Blackston CR ,Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AMA, Nishi S M, ShenSK, Kwok O C, Hill E,Thulliezd P (2002)Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo Barazil. Int. J. parasito, 32:99-105

27-Asgari O, Farzaneh A, Kalantari M, Akrami, Mohajeri F, Moana M, Zarifi M, Esmaeilzadeh B and Motazedian MH (2006)Seroprevalence of free-ranging chickens toxoplasmosis in sub-urban regions of Shiraz , Iran. J. Poult .Sci. 5:262-264.

28-Zakaria EG (2011) Detection of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Different Meat Juices.Raf.J.Sci.,Vol.22,No.4pp17-25.