

* دراسة التغيرات في بعض معايير صورة الدم الناجمة عن الإصابة التجريبية بطفيلي

Eimeria tenella في أفراخ الدجاج المحلي والأجنبي

خالد ثامر مطر الشيباني
قسم علوم الحياة/ كلية التربية

خيرى عبد الله داود العكيلي
فرع الأحياء المجهرية/ كلية الطب

جامعة القادسية

khbio7@gmail.com

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة للمدة من 2013/9/1 ولغاية 2014/9/1 ، بهدف التحري عن طفيلي *Eimeria tenella* في الدجاج المصاب طبيعياً به وعزلته من الحالات المصابة الواردة الى المستشفى البيطري والعيادات البيطرية من حقول تربية الدواجن حيث تم تشخيصها مبدئياً بواسطة المجهر الضوئي وتسجيل الحالات الموجبة ومن ثم تشخيصه جزيئياً بتقنية تفاعل السلسلة المتبلعمة الأعتيادي (Conventional- Chain Reaction Polymerase (PCR) وبعدها تم تقدير بعض المعايير الكيموحيوية لمصل الدم لأفراخ الدجاج المحلي والأجنبي بعد أحداث الإصابة التجريبية فيها بالطفيلي المعزول بعد تنويغها .

من خلال الدراسة الحالية تم فحص 315 حالة دجاج مريضة وقد بينت النتائج إصابة (186 من أصل 315) عينة براز ونسبة 59 % ، الدراسة التجريبية تضمنت إحداث الإصابة التجريبية للطفيلي وبنوعين من أفراخ الدجاج هما أفراخ دجاج الروز Ross الأجنبي وأفراخ الدجاج المحلي Local breed بعمر 21 يوماً بجرعة (5 x 10⁴) كيس بيض ناضج / طائر لطفيلي *E. tenella* ، حيث تم إصابة 30 فرخ دجاج من كل نوع على حدى كما وضعت مجموعتين من الأفراخ غير المصابة (سيطرة) لأجل المقارنة.

أظهرت نتائج معايير صورة الدم لأفراخ الدجاج الأجنبي الإصابة حصول إنخفاض معنوي ($P < 0.05$) في كل من مستوى تركيز هيموكلوبين الدم (5.94 ملغم / 100 مل) في الأسبوع الرابع للإصابة وحجم خلايا الدم المرصوص (18.47 %) في الأسبوع الخامس للإصابة والعدد الكلي لخلايا الدم الحمر (1.58 x 10⁶) في الأسبوع الرابع للإصابة ، كما أدت الإصابة أيضاً إلى وجود فرق معنوي في العدد الكلي لخلايا الدم البيض (30.19 x 10³) في الأسبوع السابع للإصابة مقارنة بأفراخ مجموعة السيطرة .

أما نتائج أفراخ الدجاج المحلي فقد أظهرت حصول انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في كل من مستوى تركيز هيموكلوبين الدم (7.13 ملغم / 100 مل) وحجم خلايا الدم المرصوص (21.26 %) في الأسبوع الخامس للإصابة والعدد الكلي لخلايا الدم الحمر (2.05 x 10⁶) في الأسبوع الرابع للإصابة بينما أظهر العدد الكلي لخلايا الدم البيض ارتفاعاً عالي المعنوية ($P < 0.05$) في الأسبوع السادس للإصابة إذ بلغ (30.63 x 10⁶) مقارنةً بأفراخ مجموعة السيطرة .

كلمات مفتاحية: الدجاج، الأيميريا تنلا، PCR ،معايير صورة الدم.

* بحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثاني.

المقدمة Introduction

ان التوسع الكبير والسريع في صناعة الدواجن قد واجه تحديات كبيرة اهمها هو تعرضها للاصابة بالعديد من الامراض الطفيلية المعدية التي تسببت بحدوث خسائر اقتصادية كبيرة جداً تقدر بملايين الدولارات سنوياً جراء هلاك اعداد كبيرة منها ، وقلة الانتاجية والمبالغ الكبيرة التي تصرف على الأدوية المستعملة للعلاج والوقاية ، ولعل اهم ابرز هذه الامراض هي داء الاكريات⁽¹⁾ الذي يمتاز بسرعة حدوثه وانتشاره بين قطعان الدجاج في أي مرحلة من مراحل حياته على مدار السنة في جميع أنحاء العالم⁽²⁾ وهو يتسبب بواسطة اوالي طفيلية تعود الى صنف البوغيات Sporozoa جنس اليميريا *Eimeria* الذي يتميز بالخصوصية العالية للمضيف والعضو الذي يتطفل عليه إذ يتطفل في القناة الهضمية للطيور الداجنة مسبباً لها أضراراً بالغة نتيجة لتكاثر الطفيلي في خلايا المضيف⁽³⁾ وهذا الضرر يتداخل مع هضم الغذاء وامتصاص العناصر الغذائية ويسبب أيضاً فقدان الدم والجفاف⁽⁴⁾ مما يؤدي الى حدوث خسائر اقتصادية كبيرة جداً لتأثيره المباشر على الحالة الصحية والانتاجية للدجاج المصاب فضلاً عن نسب الهلاكات العالية بين الأفراخ المصابة في القطيع⁽⁵⁾.

يعد داء الاكريات *Coccidiosis* من أخطر الأمراض الطفيلية التي تصيب الدواجن ، ليس في العراق فحسب وإنما في الوطن العربي والعالم أجمع ، بالرغم من التقدم العلمي الذي حصل في مجال الوقاية والعلاج من الأمراض بصورة عامه إلا إنه يبقى العدو الطفيلي الأول الذي يواجه صناعة الدواجن لما يسببه من مشاكل صحية تؤدي إلى خسائر اقتصادية فادحة تتمثل في ضياع الدخل وتكلفة العلاج والوقاية ومكافحة التلوث فضلاً عن الهلاكات العالية التي يسببها بين قطعان الدواجن وهذا يتطلب تربية قطعان جديدة خالية من المرض⁽⁶⁾ وهو شائع الحدوث في أفراخ الدجاج عادة في الأعمار الفتية الأكثر من اسبوعين وتصل ذروتها من الأسبوع الرابع وحتى العاشر مع توفر الظروف المناسبة له من رطوبة وقلة التهوية والتربية المكثفة فضلاً عن سوء الإدارة⁽⁷⁾.

يشمل داء الاكريات جميع الأمراض المتسببة عن الإصابة بالأنواع التابعة لجنس الـ *Eimeria*⁽⁸⁾ وهي أكثر تعقيداً من الجراثيم والفيروسات⁽⁹⁾ إذ انها طفيليات بوجية وحيدة الخلية تعود إلى عائلة *Eimeriidae* والتي تضم تسعة أنواع هي : *E. tenella* ، *E. acervulina* ، *E. maxima* ، *E. necatrix* ، *E. brunetti* ، *E. mitis* ، *E. mevati* ، *E. hagani* و *E. praecox*⁽¹⁰⁾ ⁽¹¹⁾ وهذه الأنواع تختلف في شدتها وضراوتها ، إذ تعد الأنواع الأربعة *E. tenella* ، *E. necatrix* ، *E. maxima* و *E. acervulina* أكثرها ضراوة لما تسببه من أضرار تحدث نسب هلاكات عالية في حقول الدواجن مقارنةً بباقي أنواع الـ *Eimeria* الأخرى⁽¹²⁾.

الأدوار المختلفة للطفيلي تغزو الخلايا الظهارية المبطنة لأمعاء الدواجن في أماكن مختلفة حسب النوع لأنها تمتاز بالخصوصية العالية للمضيف و العضو المصاب ، إذ إن النوع الذي يتطفل على مضيف معين فإنه لا يتطفل على مضيف آخر ، كما أن لها القدرة العالية على التطور في أماكن خاصة من القناة الهضمية دون غيرها⁽¹³⁾ كما تميزت هذه الطفيليات بخصوصية الاستجابة المناعية *Immuno response specific* ، إذ إن المناعة المتكونة ضد نوع معين لا تعطي مناعة ضد الأنواع الأخرى من هذا الجنس ، أي إختفاء المناعة المشتركة بين الأنواع⁽⁹⁾.

تعد أكياس البيض المتبوعة هي الطور المعدي للطير الداجنة حيث إن أكياس البيض لا تنمو ولا تتطور إلى الطور المعدي مالم تطرح مع البراز خارج جسم المضيف ، كما يجب أن تتوفر لها ظروف محيطية مناسبة لكي تتحول إلى الطور المعدي مثل الرطوبة و الحرارة والأوكسجين كما إن ارتفاع درجات الحرارة و انخفاض نسبة الرطوبة يؤدي بالنتيجة إلى قتل أكياس البيض⁽¹⁵⁾.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

تشخيص الطفيلي

تم اجراء استخلاص الحامض النووي DNA من عينات البراز المعزولة من حالات الدجاج المريضة الواردة وذلك بإستعمال عدة الاستخلاص الخاصة بالبراز *Stool Genomic DNA extraction kit* المجهزة من شركة Bioneer الكورية ، تم الكشف عن الحامض النووي الـ DNA المستخلص من عينات البراز وذلك من خلال إستخدام جهاز *Nanodrop spectrophotometer* الخاص بالكشف وقياس تركيز الاحماض النووية ، إذ يتم الكشف عن الحامض النووي من خلال تحديد تركيزه وقياس نقاوة الحامض النووي الـ DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين 280/260 nm ، كما تم تصميم البادئات الخاصة بالجين *ITS1* Internal transcribed spacer 1 المسؤول عن تشخيص طفيلي *Eimeria tenella* في عينات البراز وذلك بالاعتماد على طريقة (Hamidinejat et al., 2010) وأستعمله في فحص الـ PCR ، كما تم تجهيز البوداي من شركة

Bioneer الكورية ، بعدها تم تحضير مزيج التفاعل لسلسلة البلمرة باستعمال عدة الـ PCR المجهزة من شركة Bioneer الكورية وبعد وضع المزيج في أنابيب الـ PCR المجهزة مع العدة تم غلق الأنابيب ومزجت بعناية بجهاز المازج لمدة 10 ثوان ، بعد ذلك نقلت الى جهاز PCR Thermo Cycler لأجراء حالات الدورات الحرارية PCR Thermo Cycler Condition وبعد أنتهاء الوقت اللازم أجري الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بنسبة 1 % ومن ثم قراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة بواسطة جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV لتحديد النتائج الموجبة بمطابقتها مع الحامض النووي القياسي DNA Ladder .

البادئ المستعمل للكشف عن طفيلي *E.tenella*

Primers	Sequence(5'-3')	Product size
<i>E.tenella</i>	F AGCAGGTAGTCGTCGGTGTT	409 bp
	R AGCAAAGTTCCAAGCAGCAT	

الأفراخ وإدارتها Birds and Management

تم إجراء التجارب في غرف البيت الحيواني التابع لكلية التربية في جامعة القادسية، أستعمل في التجارب أفراخ دجاج بعمر يوم واحد تعود الى نوعين هما المحلي Local والاجنبي سلالة روز Ross التركية ، إذ تم الحصول على النوعين من مفسس الديوانية (من تفقيس بيض مخصب)، وربيت كل الأفراخ على الفرشة من عمر يوم واحد ولحين انتهاء فترة التجربة (في نهاية الاسبوع السابع) وقد خضعت الأفراخ في كل المجاميع منذ اليوم الاول الى نفس الظروف البيئية من تغذية واضاءة والنظام الوقائي والصحي ، إستعملت نشارة الخشب كفرشة للأرضية وبسمك 5 سم قسمت الغرفة التي أبعادها (3 × 3) م² إلى أكتان أرضية Pens مقسمة بحواجز سلكية مشبكة وبأبعاد (1.5 × 1.5) م² وقسم كل كُن الى مكررين وجهزت الأكتان بمستلزمات التربية الأساسية مثل المناهل البلاستيكية المقلوقة وأواني العلف وبواقع منهل ومعلف لكل مكرر يتم رفعها تدريجياً مع تقدم عمر الطائر لكي تكون بمستوى صدره. أستخدم ماء الصنبور العادي وتم تغذية جميع طيور المعاملات على عليقة البادئ (من عمر يوم واحد إلى ثلاث أسابيع) والعليقة النهائية (من عمر أربعة أسابيع فأكثر)

تم الحصول على عينات طفيلي الإيميريا من الحالات المصابة الواردة الى المستشفى البيطري والعيادات البيطرية حيث تم إجراء الصفة التشريحية لها وفتح الأعورين للطائر بواسطة مقص حاد ، بعدها تم قشط الغشاء المخاطي المبطن لهما بواسطة شريحة زجاجية نظيفة ، أخذت منها نماذج لغرض التشخيص بتقنية الـ PCR ووضعت مواد القشط مع المحتويات والبراز الدموي المائي المتبقية في محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم Potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) بتركيز 2.5 %، بعد اتمام عملية تشخيص النوع *Eimeria tenella* تم ترشح العالق ومن ثم إجراء عملية التبيوغ حسب (16) بعدها تم غسل وتنقية وتعقيم الاكياس المتبوغ حسب (17) (18) بعدها تم حساب عدد اكياس البيض لجرعة التحدي Oocyst Count حسب (18) (19) .

الفحوصات المرضية الدمية Hematological Tests

تم جمع نماذج الدم من الوريد الجناحي Wing vein من الأفراخ المصابة بالاكياس الناضجة لطفيلي الإيميريا والأفراخ غير المصابة (مجموعة السيطرة) في نهاية كل اسبوع ابتداءً من الأسبوع الرابع والخامس والسادس باستعمال محاقن طبية سعة 3 مل ووضع في أنابيب حاوية على مانع التخثر EDTA لأجراء فحوصات صورة الدم مثل قياس تركيز هيموكلوبين الدم Hb وحجم خلايا الدم المرصوص PCV والعدد الكلي لخلايا الدم البيض WBC و RBC .

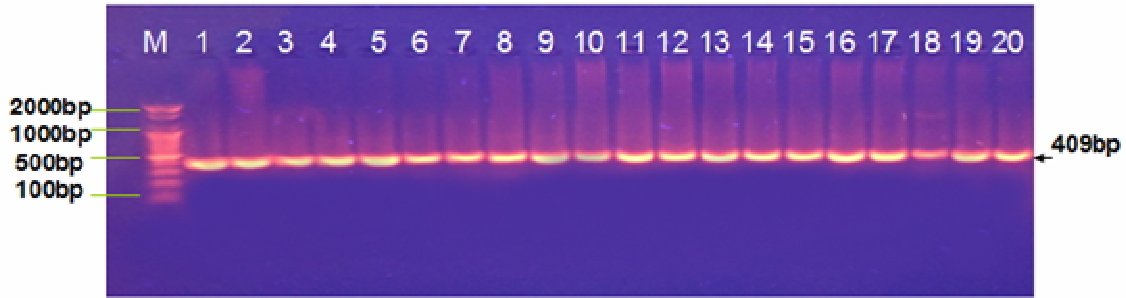
تم قياس تركيز هيموكلوبين الدم حسب (22) وحجم خلايا الدم المرصوص حسب (23) والعدد الكلي لخلايا الدم البيض حسب (24) و RBC حسب (25) .

النتائج Results

تشخيص الطفيلي

تم الحصول على نتائج التضخيم للجين (IST-1) بنجاح في 186 عينة براز موجبة من أصل 315 وبنسبة (59%) للنوع *E.tenella* فقد أظهر البادئ المستعمل حزم الأحجام المطلوبة بعد إجراء عملية الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز 1% ، إذ أظهر زوج البادئ (E.tpF - E.tpR) حزمة بحجم (409 bp) زوج قاعدي كما في الشكل (1).

كما بينت نتائج الدراسة الجزيئية أن طريقة أستخلاص الـ DNA المستعملة في هذه الدراسة هي طريقة ناجحة وجيدة للحصول على تركيز ونقاوة مناسبة لأستعمال الـ DNA الناتج كقالب Templet في تقنية الـ PCR من خلال الأستخلاص المباشر للـ DNA من عينات البراز المأخوذة من الحالات الواردة لغرض تشخيص طفيلي *E.tenella*.



الشكل (1): الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز 1% ، لنواتج تقنية PCR لجين ITS1 الخاص بطفيلي *E.tenella* ، حيث يمثل M الدليل الحجمي لنواتج PCR (bp2000 - 100) DNA ladder ، والعينات (1- 20) تمثل النتائج الموجبة للجين المتضخم (409 bp).

فحوصات صورة الدم

تركيز هيموكلوبين الدم : بينت النتائج الموضحة في الجدول (1) أن افراخ مجاميع السيطرة السليمة للدراسة الحالية قد حققت تفوقاً معنوياً بمستوى ($P < 0.05$) في مستويات تركيز هيموكلوبين الدم وعلى مدار كل اسابيع الدراسة مقارنة بمجاميع الأفراخ المصابة بطفيلي *E.tenella* التي حققت ادنى المستويات في تركيز هيموكلوبين الدم خصوصاً في الاسبوع الرابع من العمر وبفارق معنوي ملحوظ عما سجل في مجاميع افراخ دجاج السيطرة السليمة ، إذ احرزت افراخ الدجاج الاجنبي المصابة اقل القيم (5.94 و 6.10 ملغم/100مل دم) ، تلتها افراخ الدجاج المحلي المصاب بنفس النوع وهي (7.55 و 7.13 ملغم/100مل دم) في الأسابيع الرابع والخامس من العمر على التوالي في التجربة الأولى من الدراسة الحالية .

حجم خلايا الدم المرصوفة : اشارت النتائج المذكورة في الجدول (2) الى وجود فروقاً معنوية بمستوى ($P < 0.05$) في النسبة المئوية لحجم خلايا الدم المرصوفة بين الافراخ المصابة بطفيلي الايميريا وأفراخ مجاميع السيطرة السليمة ، إذ سجلت الأفراخ المصابة ادنى النسب المئوية عند مقارنتها بأفراخ مجاميع السيطرة السليمة التي احرزت قيماً اعلى ، إذ ان افراخ مجاميع السيطرة السليمة للدجاج المحلي قد احرزت نسباً مئوية اعلى في حجم خلايا الدم المرصوفة وبفارق معنوي عن افراخ مجاميع السيطرة السليمة لدجاج الازنبي في بعض أسابيع الدراسة . أما مجاميع الافراخ المصابة فقد سجلت اوطى النسب المئوية في حجم خلايا الدم المرصوفة مقارنة بمجاميع السيطرة السليمة وهذا دليل على حصول اصابة طفيلية شديدة بهذا النوع بين افراخها ، وخصوصاً أفراخ الدجاج الاجنبي فقد أظهرت نتائجها وجود هبوط واضح وشديد في النسب المئوية لحجم خلايا الدم المرصوفة أدنى القيم 18.7% و 18.4% في الأسابيع الرابع والخامس من العمر على التوالي كانت من نصيب افراخ مجموعة دجاج الازنبي المصابة تلتها بالنسب أفراخ الدجاج المحلي المصابة بنفس النوع إذ بلغت أقل نسبة 21.56% في الأسبوع الخامس من العمر.

جدول (1) : معدلات مستوى تركيز هيموكلوبين الدم لأفراخ مجاميع دجاج الروز الاجنبي والمحلي خلال اسابيع الدراسة . (ملغم/100مل دم)

نوع الدجاج	المجموعة	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس	الاسبوع السابع
الاجنبي	سيطرة	11.06±0.64 C b	12.24±0.72 B a	12.33±0.55 B a	13.48±0.52 A a
	مصابة	5.94±0.38 B d	6.10±0.39 B c	7.40±0.45 A b	7.57±0.57 A b
المحلي	سيطرة	12.44±0.46 B a	12.19±0.38 B a	12.56±0.65 B a	13.32±0.42 A a
	مصابة	7.55±0.38 B c	7.13±0.31 B b	7.79±0.30 AB b	8.08±0.28 A b

جدول (2) : معدلات النسب المئوية لحجم خلايا الدم الحمر المرصوصة لأفراخ مجاميع دجاج الروز الاجنبي والمحلي خلال اسابيع الدراسة . (%)

نوع الدجاج	المجموعة	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس	الاسبوع السابع
الاجنبي	سيطرة	30.31±0.90 C a	30.76±0.53 C b	31.61±0.43 B a	32.12±0.67 A a
	مصابة	18.70±0.63 C c	18.47±0.68 C d	19.76±0.55 B c	22.15±0.94 A c
المحلي	سيطرة	30.82±0.60 C a	31.74±1.01 B a	31.42±0.80 B a	32.61±0.68 A a
	مصابة	22.36±0.82 B b	21.56±1.82 C c	22.43±1.15 B b	25.12±1.51 A b

العدد الكلي لخلايا الدم البيض : تشير النتائج في الجدول (3) الى وجود فروقاً معنوية بمستوى ($P < 0.05$) في معدل العدد الكلي لخلايا الدم البيض بين افراخ مجاميع السيطرة السليمة و المصابة ، حيث كانت اعلى القيم من نصيب مجاميع الافراخ المصابة في حين قد احرزت مجاميع السيطرة السليمة اقل قيم العدد الكلي لخلايا الدم البيض خلال الدراسة الحالية ،وقد ظهرت فروقاً احصائية مهمة جداً بين افراخ مجموعتي الدجاج المحلي والاجنبي المصابة بالانوع *E.tenella* في معدل العدد الكلي لخلايا الدم البيض، إذ سجلت أفراخ الدجاج المحلي من الاسبوع الرابع الى السادس (29.81 و 30.16 و 30.63 ألف خلية / ملم³ دم) على التوالي ، في حين قد سجلت افراخ مجموعة دجاج الروز

الاجنبي المصابة بنفس النوع اعلاه اقل من هذه القيم إذ بلغت (25.82 و 29.42 و 29.87 ألف خلية / ملم³ دم) لنفس الاسبوع وعلى التوالي.

العدد الكلي لخلايا الدم الأحمر: أظهرت النتائج المبينة في الجدول (4) وجود فروقاً معنوية بمستوى ($P < 0.05$) في العدد الكلي لخلايا الدم الأحمر بين افراخ مجاميع السيطرة السليمة والمصابة بطفيلي *E.tenella* ، فقد سجلت ادنى القيم من قبل افراخ المجاميع المصابة مقارنة بافراخ مجاميع السيطرة التي احرزت اعلى القيم في العدد الكلي لخلايا الدم الأحمر ، فقد سجلت افراخ مجموعة دجاج الروز الاجنبي المصاب بال نوع *E.tenella* ادنى القيم خلال الاسبوع من الرابع الى السادس من العمر (1.58 و 1.75 و 1.92 مليون خلية / ملم³ دم) على التوالي ، تلتها افراخ الدجاج المحلي لنفس الاسبوع اعلاه (2.05 و 2.14 و 2.08 مليون خلية / ملم³ دم) على التوالي .

جدول (3) : معدلات العدد الكلي لخلايا الدم البيض لأفراخ مجاميع دجاج الروز الاجنبي والمحلي خلال اسابيع الدراسة . ($10^3 \times$ ملم³ دم)

نوع الدجاج	المجموعة	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس	الاسبوع السابع
الاجنبي	سيطرة	19.55±1.50 d C	20.64±1.21 B d	21.45±1.18 A d	21.93±0.91 A b
	مصابة	25.82±0.46 C b	29.42±0.66 AB b	29.87±0.24 A b	30.19±0.95 A a
المحلي	سيطرة	21.08±1.29 B c	21.23±0.88 B c	22.09±0.48 A c	22.17±0.48 A b
	مصابة	29.81±0.77 B a	30.16±0.47 AB a	30.63±0.38 AB a	30.47±0.93 A a

جدول (4) : معدلات العدد الكلي لخلايا الدم الأحمر لأفراخ مجاميع دجاج الروز الاجنبي والمحلي خلال اسابيع الدراسة . ($10^6 \times$ ملم³ دم)

نوع الدجاج	المجموعة	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس	الاسبوع السابع
الاجنبي	سيطرة	2.59±0.39 C b	2.88±0.19 B b	3.00±0.16 B b	3.31±0.37 A b
	مصابة	1.58±0.02 D c	1.75±0.12 C d	1.92±0.05 B d	2.17±0.19 A d
المحلي	سيطرة	2.90±0.21 C a	3.37±0.31 B a	3.27±0.11 B a	3.72±0.12 A a
	مصابة	2.05±0.12 B d	2.14±0.32 B c	2.08±0.14 B c	2.38±0.33 A c

المناقشة Discussion

تشخيص الطفيلي *E.tenella*

أشارت نتائج استخدام تقنية الـ PCR للكشف عن الجين IST1 الخاص بطفيلي *E.tenella* في 315 عينة براز لدجاج مريض ، تضمنت تشخيص النوع *E.tenella* بنسبة 59% (186 عينة براز موجبة) ، أن نسبة تواجد الجين IST1 المسجلة في الدراسة الحالية هي أعلى من النسبة المسجلة في الدجاج المحلي الإيراني من قبل⁽²⁶⁾ والبالغة 31.5% في مدينة خوزستان الإيرانية بأستعمال نفس الجين المستهدف فضلاً عن عن تشخيص خمسة أنواع من طفيلي الـ إيميريا هي *E.tenella* ، *E.maxima* ، *E.acervulina* ، *E.mitis* و *E.necatrix* بنسب 31% ، 24.6% ، 23% ، 12.7% و 8.73% على التوالي . وأقل من النسبة التي أشار إليها⁽²⁷⁾ والتي بلغت 64% لـ 128 عينة براز موجبة من مجموع 200 عينة مفحوصة في مدينة شيراز الإيرانية ومشخصاً أربعة أنواع لطفيلي الـ إيميريا ممرضة للدواجن هي *E.tenella* ، *E.acervulina* ، *E.necatrix* و *E.maxima* بنسب 24% ، 18% ، 12% و 10% على التوالي وقد يعزى سبب الاختلاف في النسب المسجلة بالدراسة الحالية والدراسات الأخرى الى اختلاف عدد العينات المفحوصة وظروف التجربة واختلاف الظروف المناخية لكون أكياس بيض هذه الطفيليات تحتاج الى رطوبة ودرجة حرارة لضمان حصول عملية التبوغ ومن ثم حصول الإصابة .

كذلك بينت النتائج أيضاً أن طريقة استخلاص الـ DNA المستعملة في الدراسة الحالية كانت ناجحة وجيدة جداً في الحصول على تركيز ونقاوة مناسبة لأستعمال الـ DNA كقالب Templet في تقنية الـ PCR كما أن نجاح الـ بادئ المتخصص المستعمل في كشف وتضخيم الـ DNA للنوع *E.tenella* قد يعود الى حقيقة أن الـ بادئ المستعمل قد صمم بشكل خاص ودقيق لأستهداف الجين IST1 ، لذلك فقد أظهرت النتائج أن التضاعف الذي تم الحصول عليه بأستعمال هذا الجين ذو خصوصية عالية جداً في تشخيص طفيلي الـ *Eimeria* وهذا ما توصل إليه⁽²⁸⁾ الذي أكد على أهمية طرق استخلاص الـ DNA من العينات المفحوصة في الحصول على النتائج المطلوبة ، في حين أكد الباحثين⁽²⁹⁾ (30) على أن كسر أغلفة أكياس البيض مهم جداً لضمان نجاح عملية الاستخلاص وهذا يتطلب زيادة في عدد ساعات التجميد لأكياس البيض أو اتباع طرق أخرى كالحضن في الفينول الساخن .

الدراسة التجريبية Experimental Study

فحوصات صورة الدم (WBC - RBC – PCV – Hb)

تعد صورة الدم من أهم مؤشرات التأثيرات المرضية للإصابة الطفيلية ، فقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية أن لطفيلي *E.tenella* تأثيراً كبيراً على معدلات معايير صورة الدم مسبباً حصول انخفاض عالي المعنوية ($P<0.05$) في قيم تركيز الهيموكلوبين وحجم خلايا الدم المرصوصة والعدد الكلي لخلايا الدم الأحمر خصوصاً في إفراخ مجموعة دجاج الروز الأجني المصاب إذ أعطت أقل القيم مقارنة بإفراخ الدجاج المحلي المصابة وهذه النتيجة جاءت مقارنة لما وجدته⁽³¹⁾ (32) .

أن هذا الانخفاض في معدلات قيم صورة الدم هي إحدى التأثيرات المهمة الناجمة عن الإصابة بداء الاكريات وقد يعزى ذلك الى عدة اسباب أهمها فقدان كميات كبيرة من الدم بسبب النزف الدموي الحاصل في بطانة الاغورين نتيجة لنمو وتطور المفلوقات في الطبقة القاعدية للاغورين وبالتالي حصول نقص شديد في الاوكسجين والغذاء فينتقل الطفيلي وينتشر نحو الاوعية الدموية للحصول على الغذاء والاكسجين الكافي للنمو والتضاعف وبالتالي حصول تلف كبير وتمزق في هذه الاوعية الدموية فيحصل النزف الدموي وفقدان كميات كبيرة من الدم والسوائل الجسمية ، فضلاً عن فقدان الشهية وقلة تناول العلف والماء وتسبب الطفيلي بحصول تلف واضطراب كبير في عمل القناة الهضمية مما يسبب انخفاض القابلية على الهضم والامتصاص وعدم الاستفادة من المواد الغذائية وهذا ما انعكس سلباً على صحة الافراخ المصابة وحصول نقص في الحديد ومن ثم اصابتها بفقر الدم Anemia إذ أن ضعف الحالة الصحية الذي كان واضحاً على الافراخ المصابة مما أدى الى حصول انخفاض شديد في تركيز هيموكلوبين الدم وحجم خلايا الدم المرصوصة والعدد الكلي لخلايا الدم الأحمر ، اما⁽³³⁾ فقد عزى هذا الانخفاض في قيم معايير صورة الدم الى قلة معدل العمليات الايضية جراء الإصابة بطفيلي *E.tenella* .

اما بالنسبة للعدد الكلي لخلايا الدم البيض فقد أظهرت نتائج التحليل الأحصائي حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في معدلاتها في دم الافراخ المصابة بطفيلي *E.tenella* مقارنة مع أفراخ السيطرة السليمة وقد أتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه كل من⁽³⁴⁾ الذين أكدوا أن الإصابة الطفيلية غالباً ما يصاحبها ارتفاعاً في العدد الكلي لخلايا الدم البيض ، أن ارتفاع معدلات العدد الكلي لخلايا الدم البيض في دم الافراخ المصابة بطفيلي *E.tenella* مقارنة بغير

المصابة قد يمثل استجابة طبيعية بسبب دخول اكياس بيض طفيلي الـ *Eimeria* الى داخل خلايا الامعاء مما أدى الى زيادة اعداد خلايا الدم البيض كرد فعل من الجسم والتي تعد كخلايا دفاعية .
 ان ظهور ارتفاعاً عالي المعنوية ($P<0.05$) في قيم معدلات العدد الكلي لخلايا الدم البيض لصالح افراخ الدجاج المحلي المصابة مقارنة بأفراخ الدجاج الاجنبي في التجريبتين الاولى والثانية قد يعود الى زيادة مقاومة افراخ الدجاج المحلي وهذا يتفق مع ما اشار اليه كل من ⁽³⁵⁾ مع تقدم الافراخ المصابة بالعمر فقد ابدت بعضها تحسناً ملحوظاً في حالتها الصحية وبشكل تدريجي وهذا ما انعكس بشكل إيجابي على قيم صورة الدم وهذا قد يعود الى اخذ أكياس البيض من الفرشة باستمرار و تسببها في تقوية الجهاز المناعي للافراخ المصابة ، في حين أن ⁽³⁶⁾ فقد عزى ذلك الى الفيتامينات المعطاة مع النظام الصحي والوقائي الذي أتبع خلال تربية الأفراخ وحصول الترميم لبعض الأضرار التي حصلت في ظاهرة القناة الهضمية .

المصادر References

- 1- De Gussem, M. (2007). Coccidiosis in poultry: Review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health. in Proc. 16th Eur. Symp. on Poult. Nutr. World's PoultryScience Association, Beekbergen, the Netherlands., p 253-261.
- 2- Farooq M.;Durrani F.R.;Waheedullah W.;Sajjad A.;Sohail A. and Asghar A.(1999).Prevalence of Coccidiosis in Broilers in the Subtropical Environment , ARS Parasite Biology , Beltsville , Md .
- 3- Augustine, P. C. (2001). Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of genus *Eimeria*. J. Parasitol., 31(1): 1-8.
- 4- Julie, D. H. (1999). Coccidiosis in Poultry. Clemson University livestock Health Programs POB 102406, Columbia, SC 29224 (803) 788-2260. Scientific article. jhelm@clemson. edu www.clemson. Edu/LPH.
- 5- Shirzad, M. R., S.; Seifi, H. R.; Gheisari, B. A.; Hachesoo, H.; Habibi, and Bujmehrani H. (2011). Prevalence and risk factors for subclinical coccidiosis in broiler chicken farms in Mazandaran Province, Iran. Trop. Anim. Health Prod., 43: 1601-1640.
- 6- Jadhav, B. N.; Nikam, S. V. ; Bhamre, S. N. and Jaid, E. L. (2011). Study of *E. necatrix* in broiler chicken from Aurangabad District of Maharashtra state India. Intern. Multidis. Res. J., 1:p11-12.
- 7- Nematollahi A, G.; Moghaddam, H. and Farshbaf P. R. (2009). Prevalence of *Eimeria* species among broiler chicks in Tabriz (Northwest of Iran). Mun. Ent. Zool., 4: p53-58.
- 8- Fetterer, R. H. and Allen. P. C. (2001). *E. tenella* Infection in Chickens: Effect on Plasma and Muscle 3-Methylhistidine Poult. Sci., 80:p1549-1553.
- 9- Carmichael, I. and Melb, D. V. (1998). Coccidiosis, Chief Vet. Parasitologist, South Australia.
- 10- Nematollahi, A.; Moghaddam, G. h. and Niyazpour, F. (2008). Prevalence of *Eimeria* sp. among broiler chicks in Tabriz (Northwest of Iran). Res. J. Poult. Sci. 2 (3):p 72-74.

- 11- Mc Dougald, L. R. (2003). Coccidiosis in :Disease of poultry.11 Th Ed. Edited by Saif, Y.M. Iowa State Press., p 973-990 .
- 12- Gupta, A. R. and Agrawal, P. (2010). Coccidiosis in poultry. A review . Technical Articles List., p 10. Engromix. Com.
- 13- Haug, A.; Thebo, P. and Mattsson, J.G. (2007). A simplified protocol for molecular identification of *Eimeria* species in field samples. Vet. Parasitol., 147:p 35- 45.
- 14- Conway, D. P. and McKenzie, M. E. (2007). Poultry coccidiosis diagnostic and testing procedures third edition. Blackwell publishing professional avenue, Ames, Iowa 50014 USA 2121., p 1-162.
- 15- Ryley, J.F.; Meade, R.; Judith H. H. and Thelma, E. R. (1976): Methods in coccidiosis research: separation of oocyst from faeces. Parasitol., 73: p 311-326.
- 16- Barwick, W. M.; Stevenson, G. T.; Johnson, R. V.; Casores, D. R. and Hymas, T. A. (1970). Coccidiosis evaluation of techniques for battery testing of field collected *Eimeria* Oocysts . Exp. Parasitol., 28:p37-41.
- 17- Jorgensen, W. K. ;Stewart, N. P. ;Jeston, P. J. ; Molloy, J. B. ;Blight, G. W. and Dalgliesh, R. J. (1997). Isolation and pathogenicity of Australian strain of *E. praecox* and *E. mitis* Animal Research Institue , Moorooka; Queensland., 4105: p 10-18.
- 18- AL-Attar, M. A. (1981). Factors Affecting the pathogenesis of *E.necatrix* infections in chicken. Thesis Ph.D. Dissertation.University of Guelph. Canada.
- 19- زكريا، إحسان كوركيس و الطائي، أحلام فتحي و عبد الله، دنيا عبد الرزاق.(2010). دراسة التغيرات النسيجية في الأعورين للإصابة التجريبية بجرثومة السالمونيلا وطفيلي الایمیریا تنیلا في أفراخ فروج اللحم. مجلة علوم الرفادين. (4) 21 :- 27 40
- 20- Allen, P. C., Danforth H. D., and Levander O. A.(1997). Interaction of Dietary Flaxseed with Coccidia Infections in Chickens. Poultry Sci., 76:p 822–827.
- 21- Coles, E.H. (1980). Veterinary Clinical Pathology. 3^{ed} ed. W. B. Sanders. Co. Philadelphia., p 190-192.
- 22- Hillman, R. S. and Ault, K.A. (2002). Haematology in Clinical Practice. 3rd ed., McGraw-Hill Co, New York.
- 23- Dacie, J.V. and Lewis, S.M. (1984). Practical Haematology. 6th ed., Edinburgh, Churchill Livingstone., p 40-55.26- Tokushima , R. ; B.sulistiyanto, ; Takahashi K. and Akiba, R. (2003).Insulin-glucose interactions characterized in newly hatched broiler chicks . British poultry sci., 44:p 776- 751.
- 24- Hall, R. and Malia, R.G. (1984) .Medical laboratory haematology, Butterworth and CO. publishers Ltd . London .

- 25 - Hamidinejat H.; Seifiabad S. M.R.; Mayahi M.;and Pourmehdi B. M.(2010). Characterization of Eimeria Species in Commercial Broilers by PCR Based on ITS1 Regions of rDNA. Iranian J. Parasitol., 5(4) : p 48-54.
- 26- Hadipour, M. ; Olyaie, A.; Naderi, M.;Azad, F. and Nekouie, O. (2011). Prevalence of *Eimeria* species in scavenging native chickens, Shiraz, Iran,Aft. J. Microbiol.Res., 5: p 3296-3299.
- 27- Carvalho, F.S. ; Wenceslau, A.A.; Teixeira, M.and Albuquerque, G.R.(2011). Molecular diagnosis of Eimeria species affecting naturally infected Gallus gallus . Genetics and Molecular Research 10 (2): 996-1005.
- 28- Jinneman KC, Wetherington JH, Hill WE, Adams AM, Johnson JM, Tenge BJ, Dang NL, Manger RL, Wekell MM.(1998). Template preparation for PCR and RFLP of amplification products for the detection and identification of *Cyclospora sp.* and *Eimeria spp.* oocysts directly from raspberries. J. Food Protect.,61(11):p 1497-1503.
- 29- Zhao X., DuszynskiD.W.and Loker E.S.(2001). A simple method of DNAextraction for Eimeria species, J. Microbiol Methods., 44(2): 131-137.
- 30- Vegad ,J.L.(2007).A color atlas of poultry diseases to farmers and Poultry professionals .1st ed. IBCD. Indian .,p 121- 122.
- 31- الشمري، مجيد حميد عبود (2010). تقييم فعالية بعض المستخلصات النباتية في الأداء الإنتاج والفسلجي لفروج اللحم المخمخ بطفيلي *Eimeria tenella*. رسالة ماجستير، الكلية التقنية، المسيب، هيئة التعليم التقني. 117 ص.
- 32- Hirani, N. D.; Hasnani, J. J.; Dhami, A. J. and Khanna, K. (2007). Haemato-biochemical profile of broilers affected with coccidiosis . J.of Vet. Parasitol., 21(1):p1-2.
- 33- Irshaid,F.and Mansi,K.(2009).The effects of methanol extract derived from *Urtica pilulifera* leaves on some hematological and biochemical parameters of diabetic rats , Biological Sci. , 4 (6):p 675-682.
- 34- Al-Gawad,A.A. Mahdy,O.A. El-Massry,A.A.and Al-Aziz,S.A.(2012). Studies on Coccidia of Egyptian Balady Breed Chickens, Life Sci. J., 9(3) :568-576 .
- 35- Porter, S. B.; Ong, D. E. and Chytil, F. (1986). Vitamin A status effected chromatin structure. Int. J. Vita .Nutr. Res., 56:11.

*** A study of some blood picture parameters during experimental Infection with *Eimeria tenella* in local breeds and foreign of chicken**

Dawood, K. A.
Dept. Microbiology/ Medicine College
Al-Qadisiya University

AL-Shaibany, K. T.
Dept. Biolgy/College of Education
khbio7@gmail.com

Abstract:

The study conducted in Animal house of the department of Biology, College of Education, Al-Qadisiya University during the period from 1/9/2013 to 1/9/2014. The study diagnosed the parasite of *E. tenella* in naturally infected chickens in poultry farms. *E. tenella* was isolated from the infected cases in Vet. hospital and Vet. clinics. Then, the cases diagnosed initially in the laboratory direct examining stool by ordinary microscope and the positive cases were recorded and diagnosed by using the technique of Conventional Polymerase Chain Reaction (PCR). There are 315 cases of infected chicken which examined and the results showed that (186 out of 315) stool Samples, 59%, The experimental infection for each experiment was done in age 21 day with dosage of (5×10^4) grown oocysts/chicken for *E. tenella* in two types of chickens (Ross and local breed) Also, two groups of uninfected chickens (control) for the sake of comparison.

Hematological parameters in Ross chickens showed significant decrease ($p < 0.05$) in fourth week of infection), percentage of Packed cell volume (PCV) (18.47% in the fifth week of infection) and Red blood cell (RBC) count was (1.58×10^6 in the fourth week of infection). Also, the infection led to significant difference of white blood cell (WBC) count (30.19×10^3 in the seventh week of infection) comparison of uninfected chickens of the control group. While The hematological parameters in local breed showed significant decrease ($p < 0.05$) in Hb concentration and percentage of PCV (7.13mg/100ml, 21.26% respectively in the fifth week of infection), while the RBC count was (2.05×10^6 in the fourth week of infection and significant increased ($p < 0.05$) in WBC count was (30.63×10^6 the sixth week of infection) in comparison with the chickens of the control group.

Key words: Chicken, *Eimeria tenella*, PCR, Biochemical parameters.

*The research is apart of on Ph.D. Thesis in the case of the second research.