دراسة نسجية لاستخدام الكلوبيولين المناعي النوعي IgG في علاج فروج اللحم نوع Ross 308 المخّمج تجريبياً بطفيلي *Eimeria maxima*

ثائر عبد القادر صالح الألوسي، سامي عوض الكبيسي، إبراهيم عبد النبي العاني،
هاجر عمار عبد اللطيف العاني ومبدر عواد عبد
كلية العلوم/ جامعة الأنبار

الخلاصة

عُزل الطفيلي *Eimeria maxima* محلياً من خلال اخذ منطقة الصائم واللفائفي من 1030عينة من مجازر ذبح الدجاج في مدينة الرمادي، وبعد تنقيتها وتبويغها خارج الجسم الحي شخصت من خلال شكل وحجم الطفيلي ومنطقة الإصابة، كما تم تأكيد تشخيص العينة في مختبر التشخيصات المرضية في كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد، حُصل على عتره التحدي من خلال تقوية العزلة وتكثيرها في دجاج فروج لحم نوع Ross 308 خمس مرات، تم تكسير الطفيلي بواسطة جهاز الموجات فوق الصوتية Sonicater واستخراج Sporocyst و Sporozoite، حقنت العترة الضارية Challenge Strain بعد ذلك في الأرانب Albino في مناطق مختلفة من الجسم بعد مزجها مع محلول Freund's incomplete oil adjuvant، أُستخلص الكلوبيولين المناعي IgG من مصل دم الأرانب بشكل يومي وتمت ديلزته وترحيل البروتين المستخلص الخام بواسطة تقنية الترحيل الكهربائي العمودي Electrophoresis مع بعض البروتينات القياسية، تم فصل IgG باستخدام تقنية كروماتوكرافيا العمود Column Chromatography المعبأ بهلام Sephacryl S300 HR بارتفاع 95 سم وقطر 1.6 سم وتقدير وزنه الجزيئي من خلال فصل صبغة Blue Dextran 2000 وسبعة بروتينات قياسية مختلفة الأوزان الجزيئية لعمل المنحنى القياسي، بعد ذلك اجري للعينة (IgG) مسح ضوئي Spectra Scanning لتحديد الطول ألموجي المناسب من خلال قياس أعلى قمة، إذ تم الحصول على أعلى قمة في الطول ألموجي 280 نانوميتر وبلغت 0.749، كما تم قياس تركيز IgG المستخرج بعد الفصل بالعمود بوساطة Spectrophotometer وعلى طول موجي 280 نانوميتر، إذ بلغ مستواه 5 ملغم/ مل، تم ترحيل IgG بواسطة Electrophoresis مع IgG القياسي للكشف عن حزمة الكاما كلوبيولين، اجري كشف الاليزا للـIgG لمعرفة تركيزه، تم حفظ عينة IgG بواسطة التجميد بدرجة – 4م^0، أظهرت النتائج وجود تغييرات نسيجية من خلال المقاطع الحاصلة في الخمج التجريبي بين المعاملات، وان أفضل وسيلة للعلاج كانت عن طريق إعطاء العلاج بالامبروليوم يليه طريقة الإعطاء بالفم مع مضاد الحموضة مقارنة السيطرة السالبة والموجبة ومع بقية المعاملات.

الكلمات المفتاحية: دراسة نسجية، الكلوبيولين المناعي، طفيلي *Eimeria maxima* ، فروج اللحم.

e-mail:Thaerparasit@yahoo.com, sami.alkubisy@yahoo.com

Histological Study of Specific IgG intake in the treatment of broiler chicks Ross 308 experimentally infected with *Eimeria maxima*

Th. A. S. Al-Alusi, S. A. Al-Kubisy, I. A. Alini, H. A. A. Alini and M. A. Abid
College of Science/ University of Anbar

Abstract

Eimeria maxima was Isolated locally by taking samples from Ileum and Jejunum area of 1050 of slaughted chickens in Ramadi city. After purification and sporulation in vivo, diagnosis was carried out depending on the shape and size of the parasite and the infected site. Diagnosis was also confirmed in Disease Diagnosis Laboratory in veterinary college/ Uni. Baghdad. Challenge strain was obtained by strengthening and increasing the isolate (five times) in Ross 308 type. Parasite was breaking by ultrasound Sonicater then Sporocyst and Sporozoite were extract, Challenge strain was injected in Albino Rabbet in different areas of the body after mixing with Freund solution's incomplete oil adjuvant. IgG was extracted from rabbet serum daily and was dialyzed. The extracted protein was then migrate by Electrophoresis with standard proteins. IgG was separated using Column Chromatography packaged with Sephacryl gel S300 HR height 95 cm and a diameter of 1.6 cm. Molecular weight was estimate by separating Blue Dextran 2000 dye. Seven proteins of different molecular weights were used to work the standard curve. IgG sample was Spectra Scanned to determine the appropriate wavelength for detection the highest peak measured. The highest peak wavelength was obtained at 280 nm (0.749). Extracted IgG concentration was measured by using the Spectrophotometer a wavelength of 280 nm. A concentration of 5 mg/ ml of IgG was ran using Electrophoresis along with standard IgG to detect Gamma globulin. ELISA was conducted for IgG to determine its concentration. IgG samples were stored at -4 °C. Results showed histological changes among samples compared to normal tissues. In addition, the best treatment found were using injections of Amprolium, then by inoculating Amprolium by mouth with anti acid compared to negative and positive controls.

Keywords: Histological, IgG, *Eimeria maxima*, broiler chicks Ross 308

المقدمة

نظراً للقيمة الغذائية الكبيرة لمنتجات الدواجن فقد ازداد الطلب الاستهلاكي عليها في جميع أنحاء العالم مما ولد ضرورة مُلحة تهدف نحو تحسين السلالات المستخدمة في التربية لغرض الارتقاء في إنتاجيتها إلى مستويات أفضل (1)، ولكن ضعف الاستجابة المناعية للسلالات الحديثة لفروج اللحم ودجاج البيض جعلها عرضة للأمراض والهلاكات المستمرة، وأصبحت مشكلة انتشار الأمراض وعلاجها واحدة من أهم المشاكل التي تعترض التوسع في تربية الدواجن (2، 3). يعد تكوين الجسم للكلوبيولينات المناعية Igs ضد معظم المستضدات Ags هو في الحقيقة وسيلة علاجية تنقذ الجسم مما قد تسببه تلك المستضدات من أمراض وأضرار (4)، وان استخلاص الأجسام المضادة المتخصصة ضد مستضد معين وحقنها في جسم آخر سوف يولد مناعة منفعلة متخصصة Passive immunization (5)، إن الأجسام المناعية ومن ضمنها IgG لها دور أساسي في حماية الجسم من المستضدات الدخيلة (6). داء الاكريات يعد من الأمراض المهمة التي تخمج الحيوانات كافة إذ تسببه أوالي أحادية الخلية تعود إلى صنف البوغيات Sporozoaida التابعة لشعبة معقدة الفم Apicomplexa (7)، وتتميز الأنواع التابعة لجنس الايميريا بالخصوصية العالية للمضيف والخصوصية العالية للعضو المصاب (8)، ولعدة سنوات خلت كانت الوسيلة الوحيدة للسيطرة على داء الاكريات في صناعة فروج اللحم هي بإضافة مضادات الاكريات إلى الأعلاف

Anticoccidial feed additives، إلا أن بروز ظاهرة المقاومة لمضادات الاكريات من قبل طفيلي *Eimeria* ، جعل المخاطرة تهيمن على الثبات الاقتصادي لصناعة الفروج (9)، ويبدو أن المحاولات التي تبديها الصناعات الدوائية لتطوير جيل جديد من مضادات الاكريات جعل من عملية التحدي لظاهرة المقاومة التي تبديها أنواع *Eimeria* تفرض على الباحثين جهوداً علمية كبيرة للبحث عن طرائق بديلة للسيطرة على داء الاكريات، وذلك بزيادة المعرفة عن سلوك الطفيلي والاستجابة المناعية والعوامل الوراثية فضلاً عن التحويرات الغذائية (3)، وبالرغم من التطور الحاصل في الأدوية الوقائية والعلاجية تبقى السيطرة على المرض تكلف صناعة الدواجن مبالغ باهظة (5، 10)، لذلك هدفت الدراسة الحالية إلى استخلاص وتنقية وتقدير الوزن الجزيئي للكلوبيولين المناعي النوعي IgG من دم الأرانب المخمجة تجريبياً بالطفيلي *Eimeria maxima* ومعالجة فروج اللحم Ross 308 بالكلوبيولين النوعي IgG والمخمج بالطفيلي ومعرفة أفضل طريقة لإيصال العلاج من خلال معرفة شدة الآفة العيانية والنسيجية في محاولة علاجية بديلة عن العلاجات الكيميائية.

المواد وطرائق العمل

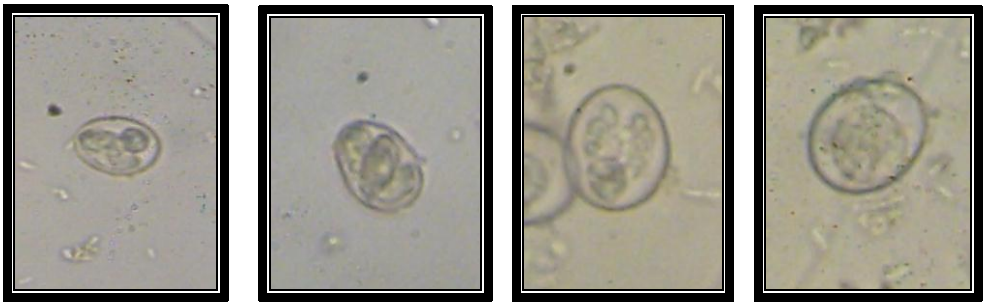
عزلت *E. maxima* محلياً من إحدى مجازر ذبح الدجاج في محافظة الانبار/ مدينة الرمادي من خلال اخذ منطقة وسط الأمعاء (الصائم واللفائفي) وفحصها للتأكد من إصابتها بداء الاكريات، كما تم تأكيد تشخيص العينة في مختبر التشخيصات المرضية في كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد، وقد تم تحضير أكياس البيض الناضجة للطفيلي في يوم الثلاثاء الموافق 5/1/ 2012 وحسب طريقة (11، 12، 13). كما نُقيت أكياس البيض للطفيلي وعُقمت اعتماداً على (13، 14، 15). وحسبت أعداد أكياس البيض اعتمادا على (16). وكثرت العزلة في المختبر وذلك بتخميجها لأفراخ فروج لحم Ross 308 وبتمريرات متعددة، إذ تم إدخال أكياس البيض الناضجة عن طريق الفم مباشرة إلى الحوصلة In Crop بعالق يحوي 5×10^4 كيس بيض مبوغ/ فرخ، وكان الهدف من ذلك هو التأكد من كون العزلة تنتمي *E. maxima* من خلال فحص منطقة وسط الأمعاء (الصائم واللفائفي)، زيادة ضراوة العزلة والحصول على عتره التحدي Challenge Strain، وتحضير جرع كافية من أكياس البيض المبوغة لاستعمالها في هذه الدراسة. كما شخصت العزلة من خلال الاعتماد على الفحص العياني للآفات وموقع التطفل والفحص ألمجهري لأكياس البيض من حيث الأشكال والأبعاد حسب (17، 18، 19)، وذلك باستخدام المجهر والعدسة العينية المدرجة Graduated Ocular Micrometer، كما تم تأكيد تشخيص العينة في مختبر التشخيصات المرضية في كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد. أُجريت الدراسة في إحدى قاعات البيت الحيواني في كلية العلوم/ جامعة الانبار بدءاً من يوم الأربعاء الموافق 2012/7/25 لغاية يوم الثلاثاء الموافق 2012/11/20 (87 يوماً)، حيث تركت الأرانب نوع Albino (عدد 10) حُرة في قاعة التربية، وقدم لها الماء والغذاء وبعض الفيتامينات والمواد المعدنية بصورة حرة. وبفترات إضاءة متفاوتة في اليوم الواحد. تم تخميج أرانب نوع Albino، إذ أخذ 10 أرانب وتم حقنها بالعترة الضارية للطفيلي (جرعة التحدي) بعد تكسير Oocyst للطفيلي بواسطة جهاز الموجات فوق الصوتية Sonicator (20)، حيث دُيلز المحلول الناتج بواسطة محلول دارئ فوسفاتي PBS=7.2 بعد تكسير الطفيلي للتخلص من بعض المحتويات الداخلية لأكياس البيض المتكسرة، بعدها أُضيفت المضادات الحيوية penicillin and streptomycin لتعقيم المحلول من الأحياء المجهرية. تم زرع جزء من المستخلص لغرض الكشف عن التلوث المايكروبي (Nutrient agar, McConkey agar)، وبذلك تم الحصول على المستخلص النهائي المعقم لغرض الحقن (21)، تم مزج المستخلص النهائي المعقم مع محلول فروند الناقص Freund's incomplete oil adjuvant بنسب متساوية وحقنت الأرانب بجرعات متتابعة وبأماكن مختلفة من الجسم وحسب طريقة(22). رسبت الكلوبيولينات المناعية IgG وIgM (المستخلصة من مصل دم الأرانب)

باستعمال كبريتات الامونيوم وحسب الطريقة الموصوفة من قبل (23) لترسيب الكلوبيولينات المناعية من المصل بنسبة إشباع من 30-70% وبالتدريج (من 0-30%، 30-50%، 50-70%). وتم ترحيله كهربائياً باستعمال طريقة (PAGE- SDS) PolyAcrylamide Gel Electrophoresis كما أوردها (24). وقيست الامتصاصية الضوئية على طول موجي 540 نانوميتر حسب طريقة بايوريت (25). كما فُصل ونُقي IgG من المصل بطريقة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني حيث اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (23)، تم وضع 25 غرام من المبادل ألايوني الجاف Diethylaminoethyl- Cellulose (DEAE-Cellulose) في دورق وأضيف له 137.5 مل من دارئ الفوسفات (pH=7.2). تم تعديل الرقم الهيدروجيني إلى 8.0 بعد إضافة الدارئ. ترك المبادل ليركد لمدة ساعة وسكب الرائق مع ما يحتويه من دقائق صغيرة. تم تهيئة العمود والذي كان بإبعاد 25 × 3 سم، مرر النموذج على سطح المبادل بهدوء، وغسل المبادل 100 مل من دارئ الفوسفات لإنزال البروتينات غير المرتبطة وجمعت الأجزاء المنفصلة بواقع 5 مل لكل 5 دقائق في الأنبوب. ومن ثم استردت بقية البروتينات المرتبطة بالمبادل باستخدام تدرج ملحي خطي من محلول كلوريد البوتاسيوم (0.1 و 0.2 و 0.3 و 0.4 و0.5 مولار) بالتتابع بدءاً من التركيز الأوطأ صعوداً نحو التركيز الأعلى. قدرت الامتصاصية للأجزاء المنفصلة وذلك بقياس امتصاص الضوء لكل جزء تم جمعه عند طول موجي 280 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer، بعدها تم ترحيل عينة IgG بعد التنقية إذ استخدمت طريقة الهلام متعدد الاكرلمايد(PAGE- SDS) 24% PolyAcrylamide Gel Electrophoresis كما أوردها (26) المحورة باستخدام جهاز الهجرة الكهربائية العمودي الذي جهزته شركة Pharmacia السويدية، لترحيل كلوبيولينات المناعة ومتابعة تنقيتها، وتم تصبيغها بصبغة Coomassei Brilliant Blue R-250 مع إضافة مادة Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)، ورحلت معها عينة قياسية للـ IgG، ثم تم تجُفيد العينة باستخدام جهاز Lypholizer حسب طريقة (27). حضرت عليقه واحدة لجميع المعاملات طيلة فترة التجارب، إذ تم إعداد تركيب العليقة من قبل المختصين في مركز أعالي الفرات للأبحاث الزراعية/ المنطقة الغربية/ الفرع الثاني/عنه، واستخدم المركز البروتيني النباتي المستورد المسمى Preconex لأنه لا يحتوي على مضاد الاكريات تم إعطاء محلول IgG (تركيز 5 ملغم/ مل) بطرق مختلفة. وصممت التجربة باستخدام 150 فرخ فروج لحم نوع (Ross 308) للتجربة، إذ أُخذت الأفراخ بعمر اليوم الأول ورُبيت إلى أن ذُبحت بعمر 49 يوم، واستخدمت فيها عشرة معاملات لكل معاملة 15 فرخاً مقسمه إلى خمس مكررات، لكل مكرر 3 أفراخ، وبدء إعطاء العترة الضارية من الطفيلي بعمر 28 يوم وإعطاء العلاجات بطرق مختلفة للأفراخ بعمر 29 يوم، حيث تم إعطاء العترة الضارية عن طريق التجريع داخل الحوصلة وإعطاء العلاج بعد يوم من إعطاء العترة الضارية، وكانت المعاملات كما يلي: المعاملة الأولى: ماء مقطر (سيطرة سالبة). المعاملة الثانية: العترة الضارية فقط (سيطرة موجبة). المعاملة الثالثة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgG عن طريق الكبسولة داخل الفم. المعاملة الرابعة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgG عن طريق التجريع بالحوصلة بعد إعطاء معادلة حموضة. المعاملة الخامسة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgG عن طريق الحقن بالغشاء البريتوني. المعاملة السادسة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgG عن طريق الحقن بعضلة الفخذ والصدر والرقبة. المعاملة السابعة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgG عن طريق الحقن داخل الصفار فوق منطقة السرة. المعاملة الثامنة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgG تحت الجلد بالقرب من عضلة الفخذ والصدر والرقبة. المعاملة التاسعة: إعطاء الكلوبيولين المناعي IgG عن طريق الحقن داخل الوريد الجناحي. المعاملة العاشرة: إعطاء العلاج الكيميائي الامبروليوم عن طريق ماء الشرب. كما تم تلقيح الأفراخ بكافة اللقاحات المطلوبة (بعمر 2 يوم اعطيت لقاح نيوكاسل عترة لاسوتا + التهاب الشعب الهوائية المعدي IB (عن طريق الرش الخشن)،

بعمر 9 يوم نيوكاسل عترة لاسوتا (عن طريق الرش الخشن وماء الشرب)، بعمر 14 يوم كمبورو عترة لوكارد (عن طريق ماء الشرب)، بعمر 17 يوم التهاب الشعب الهوائية المعدي IB (عن طريق الرش الخشن وماء الشرب)، بعمر 19 يوم كمبورو عترة لوكارد (عن طريق ماء الشرب)، وأخيراً لقاح نيوكاسل عترة لاسوتا (عن طريق الرش) بعمر 23 يوم. وقيست شدة الآفة العيانية المرضية حسب طريقة (28). بعدها أخذت المقاطع النسيجية من منطقة الصائم واللفائفي واتبعت معها خطوات التثبيت Fixation، الغسل Washing، سحب الماء (الانكاز) Dehydration، الترويق Clearing، التشريب Infiltration، الطمر Embedding، التقطيع Sectioning، التصبيغ Staining وتم التلوين بملونة الهيماتوكسلين والايوسين Hematoxylin and Eosin Staining(29، 30). اجري التحليل الإحصائي باستعمال برنامج SAS الجاهز الإصدار 9.1 واختبرت الفروقات المعنوية باستعمال اختبار Duncan متعدد الحدود عند مستوى معنوية 0.05 (31).

النتائج والمناقشة

شُخص الطفيلي اعتماداً على شكل وحجم كيس البيض وموقع التطفل وقد وجد بأن حجم الطفيلي بلغ 30،7 مايكرون طول x 20،4 مايكرون عرض وهذا يطابق ما ذكره (32). أكدت الدراسة أيضاً أن هناك 213 عينة موجبة (مصابة) و817 عينة سالبة (غير مصابة) من مجموع العينات 1030، أي أن نسبة الخمج المئوية بلغت 26.796% من مجموع العينات المأخوذة.



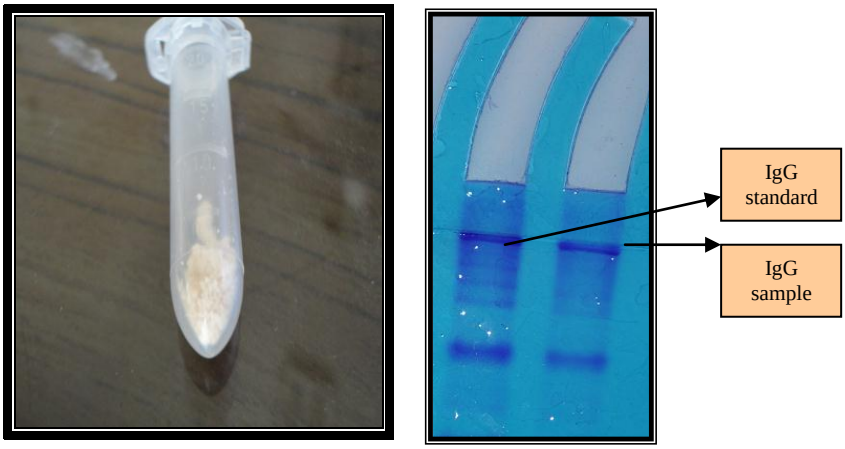
صورة (1) توضح شكل وحجم أكياس بيض Oocysts طفيلي *E. maxima* (سيطرة موجبة)

استعملت أكياس بيض *Eimeria maxima* بعد تحطيمها لأنها مستضدات جيدة لتحفيز استجابة مناعية عالية (33)، مما يحفز إطلاق الكلوبيولينات المناعية immunoglobulin's (34)، كذلك تمت ملاحظة التأثيرات المرضية الواضحة في منطقة الإصابة ويعود سبب ذلك إلى أن الطفيلي يهاجم خلايا الطبقة الطلائية المبطنة لمنطقة الإصابة ويتكاثر في داخلها مما يقلل من كفاءة عملها (35، 36).

صورة (2) المنطقة المصابة في احد أفراخ التجربة المخمجة بالنوع *E. maxima* (سيطرة موجبة)

استخرجت البويغات Sporozoites من الأكياس البوغية Sporocystes بعد تحطيم أكياس البيض Oocyst بواسطة جهاز الموجات فوق الصوتية Ultrasonicator. خلال تحضير أكياس بيض الطفيلي إذ لم تصل درجة المحلول إلى 20مْ عند وضع قطب جهاز Ultrasonicator، فقد ذكر (37) إن وصول حرارة المحلول (محلول المستضد) إلى أكثر من 20 مْ ربما قد يؤدي إلى مسخ وتغيير في طبيعة البروتينات من الناحية الكيميائية. لذلك وضعت العينة في الثلج أثناء العمل (38). كما زُرع جزء من راسب المستخلص بعد تعقيمه لغرض الكشف عن التلوث المايكروبي، وقد تبين عدم وجود تلوث مايكروبي في العينة. إذ اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما ذكره (39) من أن إضافة البنسلين penicillin يعقم المحلول ويخلصه جزئياً من التلوث المايكروبي، وان زرع جزء من المستخلص يساعد في الكشف عن التلوث المايكروبي (40). أن حقن الأرانب بمحلول المستضد بعد مزجه مع محلول فرويند الناقص (بشكل مستحلب) وبجرعات متناقصة من المستضد وترك فواصل زمنية طويلة نسبياً سوف يوفر الفرصة للحصول على أضداد ذات ألفة مرتفعة لان محلول فرويند الناقص يُمتص بصورة تدريجية من قبل الجسم، وعند مزج المستضد مع محلول فرويند بشكله الناقص سوف يحفز مناعة الخلايا في الجسم بصورة مستمرة وبالتالي يحفز إطلاق الكلوبيولينات المناعية (IgG, IgM) في الدم ضد هذه العترة (41). كما قُدر الوزن الجزيئي للـ IgG المعزول بعد تنقيته بواسطة عمود المبادل الأيوني الجاف وقياس الامتصاصية الضوئية على طول موجي 280 نانوميتر، وقد تبين إن وزنه الجزيئي يبلغ 160 kDa.

تمت متابعة تنقية عينة IgG من مصل دم الأرانب إذ رُحلت العينة كهربائياً مع عينة IgG قياسية وقد تطابقت العينتان (عينة IgG المنقاة والقياسية) وهذا مطابق لما ذكره (42) من أن الوزن الجزيئي للـ IgG يبلغ 150-160 kDa. بعدها جُفدت العينة للحفاظ عليها بشكل أفضل لحين العمل بها. الصورة (3). تم قياس تركيز البروتين الكلي في دم الأرانب على طول موجي 600 نانوميتر حسب طريقة بايوريت وقد بلغ 19 ملغم/ مل، وبعدها تم قياس تركيز IgG بعد تنقيته بالعمود على طول موجي 280 نانوميتر وقد بلغ 5 ملغم/ مل، وقد أشار(43) بان كمية البروتين في دم الأرانب تبلغ تقريباً 25 ملغم/ مل بعد تنقيتها بواسطة HPLC.



صورة (3) عينة IgG المعزولة والمنقاة بعد الترحيل والتجفيد

لوحظ وجود فروق معنوية في نسبة الخمج بين معاملات إعطاء العلاجات مقارنة مع السيطرة الموجبة التي أعطيت فيها جرعة التحدي فقط، كذلك هنالك فروق معنوية واضحة بين السيطرة الموجبة والسيطرة السالبة التي لم تعطى لها أي معاملة، فقد تبين أن طريقة إعطاء العلاج عن طريق الفم مع معادل حموضة قد خفضت وبشكل ملحوظ عدد أكياس البيض المطروحة خلال حصول الخمج مقارنة مع معاملة السيطرة الموجبة، وهذا يطابق ما ذكره (6) فقد بين أن إعطاء IgG عن طريق الفم كانت أفضل المعاملات وأن إعطاء IgG خلال الفم ينقل

المناعة السالبة Passive immunity إلى الطير ويعطيه حماية كاملة ضد الخمج، وان إعطاء المناعة السالبة (المنفعلة) سوف تؤازر المناعة الفاعلة في الجسم مما يقوي من مناعة الطير ويساعده في التخلص من الإصابة (44، 45). تبين إن أعلى نسبة مطروحة من أعداد أكياس البيض مع البراز كانت في السيطرة الموجبة (اليوم العشرون بعد المعاملة)، إذ أكد (46) إن الإصابة بداء الاكريات (أنواع الايميريا الممرضة) تؤدي إلى خفض نسبة ارتفاع الزغابات مقارنة مع سمك الطبقة المخاطية بشكل كبير في ألاثني عشري والصائم واللفائفي والأعورين مما يؤدى إلى انخفاض كفاءة امتصاص الأحماض الامينية في الأفراخ المصابة مقارنة بغير المصابة ولاحظوا حدوث زيادة في تركيز البروتين الكلي في بلازما الطيور غير المصابة بعد 1.5 – 2.5 ساعة بينما تأخر ارتفاع تركيز البروتين الكلي في بلازما الطيور المصابة إلى 26 ساعة وأشاروا إلى أن بطئ ارتفاع بروتين البلازما بعد الإصابة بالايميريا يعد دليلا على حالة سوء الامتصاص والذي يؤدي إلى تموت القناة الهضمية مما يؤدي إلى زيادة الأحماض الامينية المطروحة في الفضلات، وهذا يشير أما إلى سوء امتصاص الأحماض الامينية او نضوح الأحماض الامينية إلى القناة الهضمية نتيجة النزف في الأمعاء كذلك نتيجة قصر الزغابات مع قلة عمق الجزء الغدي للأنسجة مؤديا إلى قلة نسبة طول الزغابات مقارنة بسمك النسيج المخاطي وهذه التغيرات تتزامن مع وقت وموقع فعالية الطفيلي ويظهر كأساس للتدمير الفسلجي، بينما كانت اقل نسبة لأكياس البيض في معاملة إعطاء IgG عن طريق الفم مع مضاد حموضة (الجدول 1)، وربما يكون السبب في تقليل نسبة أكياس البيض المطروحة إلى طريقة إعطاء العلاج حيث إن إعطاء العلاج بالفم مع معادل الحموضة ربما تكون اقرب نقطة إلى منطقة الإصابة وأفضل مكان لدخول العلاج ووصوله في الوقت المناسب إلى المنطقة المصابة وبالتالي يحصل التفاعل بين الضد والمستضد لتكوين معقد (انتجين – كلوبيولين نوعي) ويشغل مكان المعينات المستضدية على سطح الطفيلي فيساعد على إيقاف نمو الطفيلي داخل خلايا المضيف نتيجة عدم ارتباطه مع الخلايا الطلائية للمضيف أو يُبطأ من استمراريته في إصابة خلايا جديدة أو يجعله كعلامة Marker للخلايا الملتهمة الكبيرة Macrophage (3، 4)، أو ربما يكون السبب في أن IgG يعتبر مكمل غذائي Dietary supplement في منح الحصانة السلبية Conferring passive immunity ضد *E. maxima* ومؤازرة الجهاز المناعي وتطوير آلية الدفاع في الجسم (47). لقد أشار (48) أن العلاج بالكلوبيولينات المناعية باستطاعتها التقليل من شدة المرض والتخلص منه تدريجياً وحصول المناعة للحيوان المصاب بسبب العمل ألتآزري بين المناعة المتحررة في الجسم مع المناعة المنفعلة المعطاة عن طريق العلاج، مما يساهم في تحسن حالة الجسم، وهذا ربما يكون السبب في ما حصل في معاملة إعطاء IgG عن طريق الفم (المعاملة الثالثة والرابعة). أما (49) فقد أوضح بان الكلوبيولينات المناعية عند دخولها إلى الجسم بالمناعة السالبة (فموياً) فإنها سوف تقوم بمعادلة المستضدات النوعية وتمنع الإصابة بالمرض لأنها سوف تبقى محتفظة بفعاليتها (من 39–41 %) لمدة 8 ساعات داخل الجسم حتى عند هضمها بواسطة إنزيم Pepsin, trypsin and chymotrpsin وبذلك سوف يبقى الجسم في حالته الطبيعية مع زيادة بسيطة في نسبة خلايا الدم البيضاء، وان أفضل رقم هيدروجيني هو 5 لكي تعمل الكلوبيولينات المناعية بشكل كامل داخل الجسم وترتبط بالمستضد النوعي. وان الكلوبيولينات المناعية تنخفض فعاليتها من 91% إلى 63% خلال الساعة الأولى من دخولها إلى الجسم وبعد هضمها بإنزيم Pepsin وتحللها مائياً Hydrolysis. لاحظ (50) عند قيامهم بدراسة ايض الطاقة والبروتين لفروج اللحم المصاب بأنواع من الايميريا إلى ان كفاءة الاستفادة من الطاقة المتأيضة (Efficiency of utilization of ME) للطيور المصابة تبلغ 0.43 خلال أول ثمانية أيام بعد إصابة التحدي وبلغت 0.52 في مجموعة الطيور غير المصابة وهذا يساعد الجهاز المناعي في زيادة كفاءته الدفاعية ضد الأجسام الغريبة، أو قد يعود السبب إلى أن عملية الحفاظ على الأغشية المخاطية لجدار

الأمعاء بسبب إعطاء العلاج في الوقت المناسب او وصولة بطريقة مناسبة قد يعمل في الحفاظ على الغدد الفارزة للهرمونات المعوية والتي تعد من اكبر الغدد الصماء في الجسم وهذه الهرمونات لها دور كبير في انتظام حركة الأمعاء وفعالية الإنزيمات الهاضمة والذي ينعكس إيجابيا على الأداء الإنتاجي. بين كثير من الباحثين بان العلاج بالكلوبيولينات المناعية تكون غير ضارة من الناحية الصحية وكذلك فان الطفيليات أو البكتريا أو الفايروسات لم يثُبت أنها قد طورت مقاومة ضد هذا العلاج (51، 52)، إن استخدام إستراتيجية التمنيع المنفعل (المناعة السالبة Passive Immunity) باستخدام المناعة المفرطة Hyper immunity للأجسام المناعية والمفرزة ضد نوعية الطفيلي *Eimeria* تعتبر واحدة من الطرق الجيدة للسيطرة على داء الاكريات بدون إلحاق ضرر بالجسم إضافة إلى عدم ظهور صفة المقاومة من قبل الطفيلي لنوعية العلاج (4، 5، 6، 44، 45، 51). أما بالنسبة للتغيرات النسجية للمنطقة المصابة (الصائم واللفائفي) ففي المعاملة الثانية (سيطرة موجبة) والتي خمّجت بالطفيلي أظهرت توسف في الخلايا الظهارية وحدوث النخر وبالتالي انفصالها عن الطبقة المخاطية وسقوطها في تجويف الأمعاء (اللفائفي)، وهذا يتفق مع (53، 54) في ان ظهور الآفات النسجية ما هو إلا استجابة التهابية للجراثيم والطفيلي التي تتموضع في ظهارة الأمعاء فتعمل على تحفيز الجذب الكيميائي للخلايا البلعمية إلى موقع الخمج، فضلاً عن أن تحفيز الخلايا البلعمية نتيجة المسببات المرضية تساهم في تحرير الخمائر الحالة للنسيج مما يسبب حدوث النخر التجلطي (19). صورة (4).

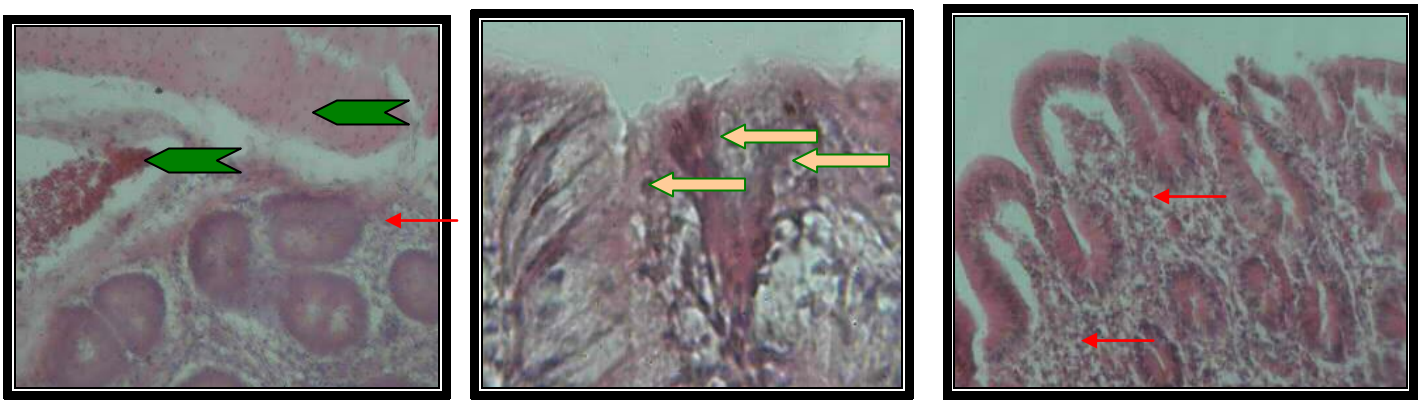
جدول (1) يوضح العدد الكلي لـ Oocysts المطروحة مع الذرق (غم/مل)

المعاملات	أيام التجربة بعد إعطاء جرعة الطفيلي وإعطاء العلاجات						
	الأول	الخامس	العاشر	الخامس عشر	العشرون	المتوسط العام	شدة الآفة
سيطرة سالبة	0 A	0 B	0 B	0 C	0 D	0 A	0
سيطرة موجبة	0 A	2404.8 A	17233.6 A	48870 A	80404.1 A	29118.27 B	4+
معادل حموضة	0 A	0 B	1917 B	4000 BC	1601 CD	1892.55 A	1+
حقن بالصفار	0 A	308 B	3587 B	7988 BC	6033 CD	3977.05 A	1+
حقن بالبريتون	0 A	300 B	4010 B	8055 BC	7610 CD	4401.3 A	1+
العلاج بالكبسولة	0 A	450 B	3459 B	10918 B	23530 BC	7610.95 A	2+
حقن تحت الجلد	0 A	1033.3 C	9720.7 C	32405 B	45906 BC	17500.21 C	3+
حقن بالعضلة والفخذ والرقبة	0 A	1017.1 C	8880 C	29991 B	44867 B	16345.96 C	3+
حقن بالوريد	0 A	430 B	3050 B	10001 B	21003 BC	7031.35 A	2+
إعطاء الاميروليوم	0 A	0 B	2000 B	2177 BC	401 CD	1259.85 A	1+
مستوى المعنوية	غ م	0.057	0.011	0.01	0.01	0.000	

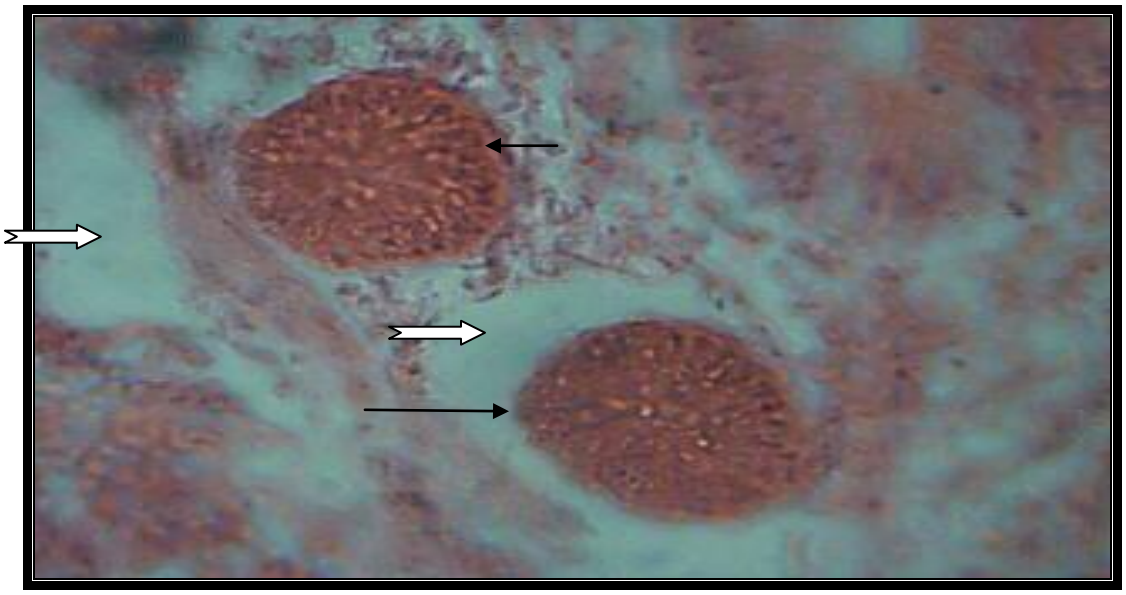
*الأحرف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية والأحرف المختلفة تعني وجود فروق معنوية

*المقارنة بين الأعمدة المختلفة .

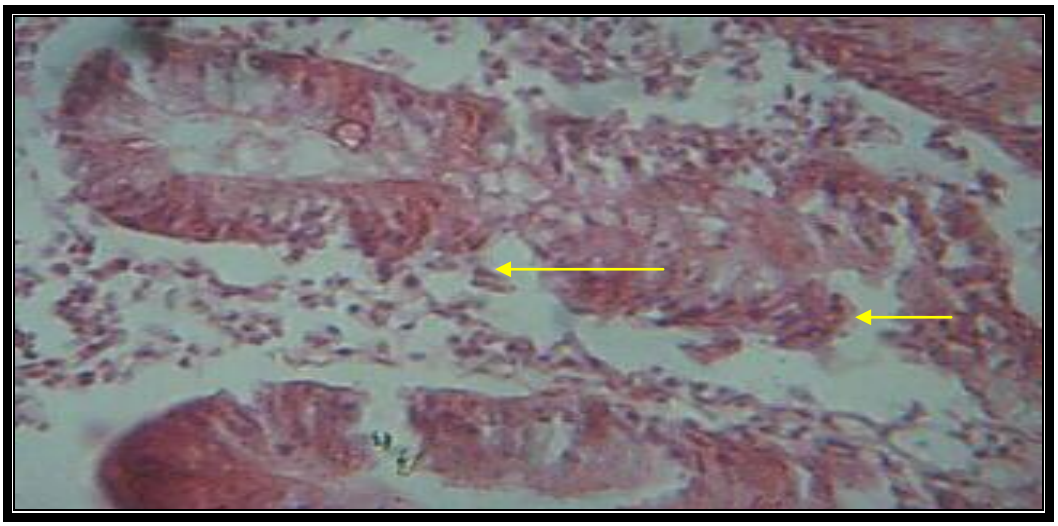
كما تميزت التغييرات النسيجية للأمعاء في أفراخ المجموعة الثانية والسادسة والسابعة والمعاملة الثامنة والتاسعة بوجود المراحل التطورية المختلفة للطفيلي إذ لوحظ وجود إعداد من المفلوقات الناضجة وغير الناضجة وكذلك في الطبقة المخاطية وتحت المخاطية مع ملاحظة إعداد كبيرة من الأمشاج والتي تمثل المراحل التطورية للطفيلي نتيجة غزو هذا الطفيلي لنسيج الأمعاء (الصائم واللفائفي) والذي يسبب تخريب الطبقات المخاطية وتحت المخاطية (55)، كما حصلت حالة التفجي Vacoulation، كما في الصور (5، 6، 7).



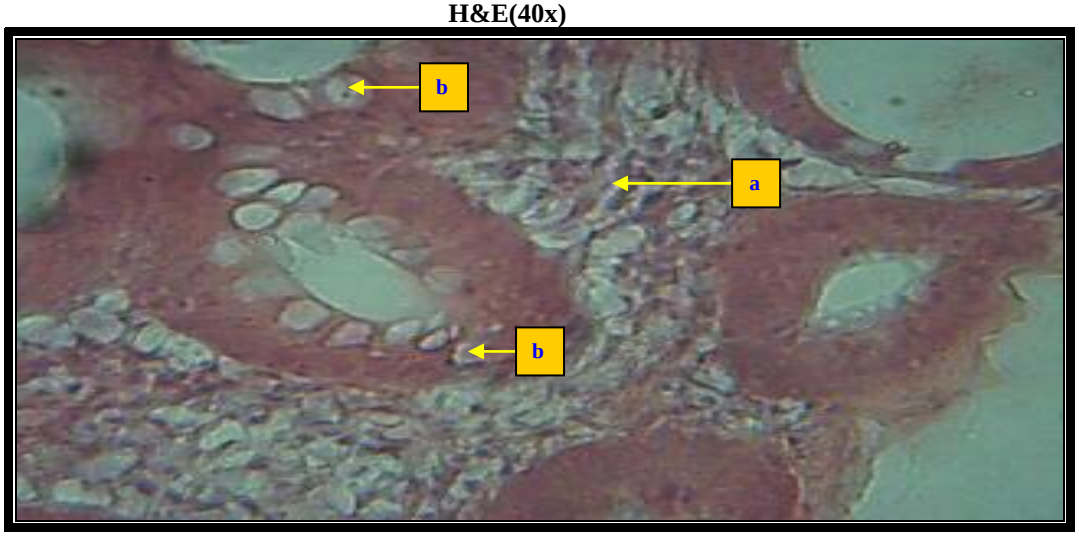
صورة (4) مقطع نسيجي للأمعاء (اللفائفي) (سيطرة موجبة) ( ) يلاحظ ارتشاح وانتشار الخلايا الالتهابية ( ) وحدوث توسف في الخلايا الظهارية وانفصالها ووجود النخر التجلطي، ( ) يلاحظ أكياس بيض الطفيلي داخل الطبقة الطلائية للأمعاء الصبغة H&E(40x)



صورة (5) ( ) مقطع نسيجي للأمعاء (اللفائفي) يلاحظ وجود الجيل الثاني من المفلوقات والأمشاج، ( ) حصول حاله التفجي في النسيج نتيجة الإصابة (المعاملات الثانية والسادسة والسابعة والثامنة والتاسعة)، الصبغة H&E(40x)



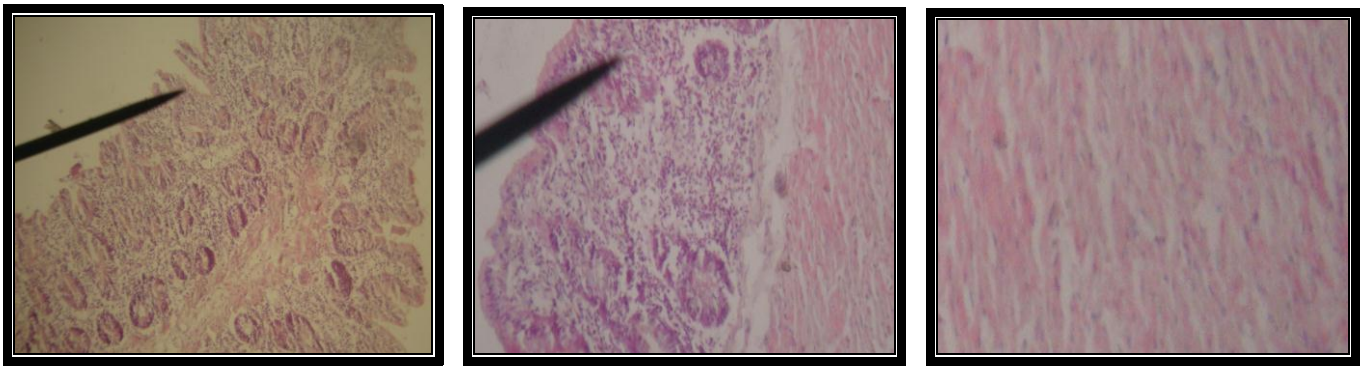
صورة (6) مقطع نسيجي للأمعاء (الصائم) يلاحظ وجود ارتشاح الخلايا الالتهابية مع تنخر النسيج (سيطرة موجبة)، الصبغة H&E(40x)



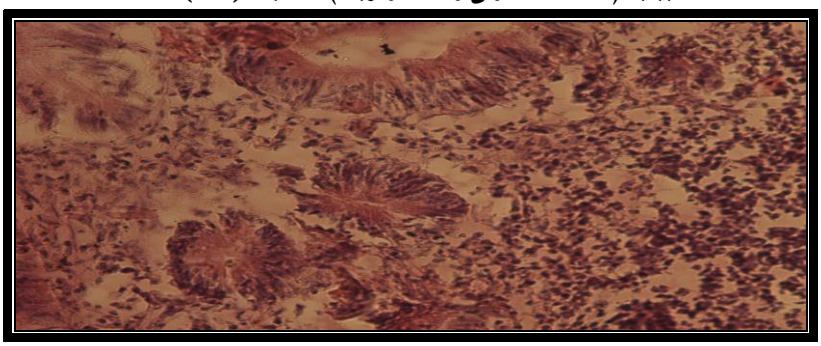
صورة (7) مقطع نسيجي للأمعاء (اللفائفي) يلاحظ وجود أعداد كبيرة من الأمشاج (a) وأكياس البيض (b) في الخلايا الظهارية لغدد ليبركن (المعاملات الثانية والسادسة والسابعة والثامنة والتاسعة)، الصبغة H&E(40x)

وعند إجراء التشريح وجدت شدة الآفة النسيجية بشكل واضح في الجزء العلوي من الأمعاء الدقيقة تمثلت بتثخن جدار الأمعاء مع وجود الدم المتخثر في محتوياته نتيجة التخديش المستمر في نسيج الأمعاء من قبل الطفيلي مما يتسبب في إحداث نزف يعقبه تخثر للدم مخلوط مع محتويات الأمعاء (اللفائفي) مع تثخن جدار الأمعاء، وكانت شدة الآفة +4 في المعاملة الثانية (سيطرة موجبة) و+3 معاملة الحقن بالعضلة (المعاملة الثامنة) و+3 معاملة الحقن تحت الجلد (السابعة) و+2 معاملة العلاج بالكبسولة (السادسة) و+2 معاملة الحقن بالوريد (التاسعة) في نهاية التجربة، هذا يتفق مع (53) حيث بين الباحثان ان *E. maxima* أحدثت عدة آفات نسيجية في اللفائفي تدرجت ما بين +1 إلى +4 . الجدول (1). لم تسجل أفراخ السيطرة السالبة وبعض المعاملات مثل معاملة إعطاء العلاج عن طريق الفم مع مضاد الحموضة ومعاملة العلاج بالامبروليوم أي تغييرات نسيجية واضحة في منطقة الأمعاء (اللفائفي والصائم) وان الارتشاح للخلايا اللمفية مع فرط التنسج في الطبقة المخاطية وتحت المخاطية في المعاملات الأخرى دليل على أن الخلايا اللمفية نوع T والمسؤولة عن المناعة الخلوية تؤثر بصورة مباشرة على البويغات داخل الخلايا الظهارية (56، 57) كذلك الخلايا اللمفاوية المساعدة بنوعيها Th1, Th2 تقوم

بإفراز المدورات اللمفية بعد تفاعلها مع المستضد الخاص Ag وهذه المدورات لها تأثير مباشر على تطور الطفيلي في المراحل الأولى للإصابة والسيطرة على إنتاج الأضداد (58) وأيضاً فان الخلايا الكاسية والخلايا أحادية النواة والمتغايرات لها تأثير مهم ضد البويغات الغازية للطبقة الظهارية وبذلك فان الاستجابة المناعية للخمج تعتمد على زيادة تركيز هذه الخلايا (59)، ظهرت العلامات السريرية ومنها الإسهال المدمم نتيجة لاختراق البويغات للنسيج الظهاري للأمعاء عند إكمال دورة حياة الطفيلي داخل الجسم، وهذا يتفق مع (60) حيث أوضح بان الأيميريا ماكسيما تصيب وسط الأمعاء ولكنها بصورة عامة أقل أمراضيةً من الأيميريا نيكاتركس، وفي الإصابات الشديدة فأنها تحدث التهاباً شديداً في الأمعاء مع وجود تثخن في جدار الأمعاء وتوسعها وتحرير الجذور الحرة المتمثلة بـ Nitric oxide (NO) and Superoxide anion (O_2-). كذلك أوضح (61) من أن محتويات الأمعاء قد تكون مدممه عند إصابتها بالأيميريا ماكسيما، حيث يتميز هذا النوع من الأيميريا والذي يصيب نفس المنطقة من الأمعاء وجود بويضات كبيرة في منطقة وسط الأمعاء وبهذا يمكن تفريقها عن الأيميريا نيكاتركس التي لا تكون بويضات في الأمعاء ولكن في الأعورين. بينما بينت نتائج المقاطع النسيجية للأمعاء في المعاملة الأولى والتي كانت معاملة سليمة ومقاطعها النسيجية (اللفائفي والصائم) تدل على خلوها من أي إصابة. أما المعاملات الثالثة والرابعة فكانت في حالة رجوع إلى الحالة السليمة صورة (8)، وأخيراً المعاملة الخامسة والتي بينت وجود تكتل لخلايا الدم البيضاء ووجود أكياس البيض للطفيلي، صورة (9).



صورة (8) مقطع نسيجي للأمعاء (اللفائفي) يلاحظ تماسك الطبقة الطلائية وعدم تخللها بالفجوات وأكياس البيض وبقاءها بحالتها الطبيعية (المعاملات الأولى والثالثة والرابعة)، الصبغة H&E(40x)



صورة (9) مقطع نسيجي للأمعاء (اللفائفي) يلاحظ وجود أكياس البيض والخلايا البيضاء وتكتلها بشكل كبير في محاولة للرجوع إلى الحالة الطبيعية (المعاملة الخامسة)، الصبغة H&E(40x)

المصادر

1. Gabriel, I.; Mallet, S.; Leconte, M.; Fort, G. & Naciri, M. (2003). Effects of whole wheat feeding on the development of coccidial infection in broiler chickens. Poultr. Sci., 82 (11): 1668-1676.
2. Yun, C.; Hyun, S.; Jingtao, Z. & Wongi, M. (2000). Kinetic Differences in Intestinal and Systemic Interferon-γ and Antigen-Specific Antibodies in Chickens Experimentally Infected with *Eimeria maxima.* Avian Dis., 44(2): 305-312.
3. Guzman, V.; Silva, D.; Kawazoe, U. & Mineo, J. (2003). A comparison between IgG antibodies against *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella* and oocyst shedding in broiler-breeders vaccinated with live anticoccidial vaccines. Vaccine. 21(27-30): 4225-4233.

4. الألوسي، ثائر عبد القادر صالح؛ شهاب، احمد محمد؛ الألوسي، توفيق إبراهيم؛ الضنكي، زياد طارق وعبد اللطيف، هاجر عمار. (2014). استعمال الكلوبيولين المناعي النوعي IgY المنقى من صفار البيض ومعرفة تأثيره في أوزان وأطوال الأعضاء الداخلية في الدجاج المخمج بالطفيلي *Eimeria tenella*. مجلة جامعة الأنبار للعلوم الصرفة. 8 (3): 41-57.

5. الألوسي، ثائر عبد القادر صالح؛ شهاب، احمد محمد؛ الألوسي، توفيق إبراهيم؛ الضنكي، زياد طارق وعبد اللطيف، هاجر عمار. (2015). استخلاص الكلوبيولين المناعي IgY ودراسة تأثيره في الأداء الإنتاجي لفروج اللحم نوع Ross 308 المخّمج بالطفيلي *Eimeria tenella*. مجلة جامعة الأنبار للعلوم الزراعية. 13 (1): 123- 134.

6. الألوسي، ثائر عبد القادر صالح؛ حسن، عمر محمد ومحيميد، عبد الخالق علوان. (2015). تخميج الفئران البيضاء Albino نوع *Mus musculus* تجريبياً بطفيلي *Cryptosporidium parvum* وعلاجها بالكلوبيولين المناعي النوعي IgG بعد استخلاصه وتنقيته وتقدير وزنه الجزيئي. مجلة جامعة كركوك. 7 (2): 197- 226.

7. El.Behairy, A. (2005). Immuno-characterization on some *Eimeria* spp. Infecting chicken in Egypt. M.V.Sc. Thesis Fac. Vet. Med. Cairo University. P. 122.
8. Amer, M.; Awaad, M.; El-Khateeb, R.; Abu-Elezz, N.; Said, S.; Ghetas, M. & Kutkat, M. (2010). Isolation and Identification of Eimeria from Field coccidiosis in chickens. J. Am. Sci., 6(10): 127-135.
9. Allen, P. & 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. Clin. Microbiol. Rev., 15: 58-65.
10. Yeong, H.; Hyun, S.; Lillehoj, E. & Lee, S. (2006). Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria maxima* infection of chickens. Veterin. Immunol. Immunopathol., 114(3-4): 259-272.
11. Bowman, D. & Lynn, R. (1995). George's Parasitology for veterinarians, Philadelphia, London, Toronto, Tokyo. WB Sanders Company. 2th Ed. P. 297.

12. Ibrahim, A.; Arafa, E. & Msahlabe, A. (1997). Study on pathogenicity and immunoginicity of irradiated sporulated intestinal *Eimeria* oocysts in chickens. Ass. Vet. Med. J., 37:133-140.
13. Jeffers, T. (1978). *Eimeria tenella* sensitivity of recent field isolants to monensin. Avian Dis., 22: 157-161.
14. Davis, L. (1973). Techniques. In: The Coccidia. Ed. By: Hammond, D. H. & Long, P. L. Baltimore. Butter worth, London, University Par Press. PP.411-458.
15. Jorgensen, W.; Stewart, N.; Jeston, P.; Molloy, J.; Blight, G. & Dalgliesh, R. (1997). Isolation and pathogenicity of Australian strains of *Eimeria praecox* and *Eimeria mitis* Animal Research Institute, Moorooka; Queensland, 4105. PP. 10-18.
16. Al-Attar, M. (1981). Factors effecting the pathogenesis *Eimeria necatrix* infections in chicken. PhD. Thesis University of Guelph. Canada. P. 157.
17. Calnek, B.; Barnes, H.; Beard, C.; McDougald, L. & Saif, Y. (1997). Disease of poultry. 10th ed. Mosby, Wolf. PP.865-878.
18. Edagar, S. (1992). Field diagnosis of coccidiosis in chickens. Agri-Bio Corporation.
19. Amer, M.; Awaad, M.; El-Khateeb, R.; Abu-Elezz, N.; Said, S.; Ghetas, M. & Kutkat, M. (2010). Isolation and Identification of Eimeria from Field coccidiosis in chickens. J. Am. Sci., 6(10): 1107- 1114.
20. Hansen, P.; Scoble, J.; Hanson, B. & Hoogenraad, N. (1998). Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. J. Immunol. Meth., 215:1-7.
21. الألوسي، ثائر عبد القادر صالح؛ شهاب، احمد محمد والألوسي، توفيق إبراهيم. (2014). دراسة التغيرات النسيجية في منطقة الأعورين للدجاج المخّمج تجريبياً بطفيلي *Eimeria tenella* بعد معالجتها بالكلوبيولين المناعي IgY. مجلة جامعة تكريت للعلوم الصرفة. 19 (4): 50- 53.
22. Ungar, B.; Soave, R.; Fayer, R. & Nash, T. (1986). Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. J. Infect. Dis., 153: 570-578.
23. Hudson, L. & Hay, F. (1989). Practical Immunology. Blackwell scientific Publication. 2nd ed. Oxford. London. UK. PP. 94-97.
24. Diana, P.; Pablo, A.; Esteban, G.; Bjorn, B. & Rudiger, S. (2011). IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodes from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipition. J. Visualiz. Experim. (JOVE). 51: 1-5.
25. Layne, E. (1957). Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins (Spectrophotometric Determination of Total Protein-Biuret Method). Methods in Enzymology . University of Central Arkansas, 10: 447-455.
26. Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227 (15): 680-685.
27. Ahmed, W. & Soad, E. (2008). A Field Investigation on the Correlation Between Reproductive Disorders and Eimeriosis in Female Buffaloes with Emphasis on Use of Partially Purified Oocyst Antigen for Diagnosis. Global Veterinaria., 2 (6): 372-378.

28. Jonhson, J. & Ried, W. (1970). Anticoccidial drugs lesions scoring techniques in battery and floor pen experiments with chickens. Exp. Parasitol., 28: 30-36.
29. Bancroft, J. & Stevens, A. (1975). Haematoxylin and eosin and the applications of haematoxylins. In: J. D. Bancroft & A. A. Stevens (eds). Histopathlogical stain and their diagnostic uses. Churchill Livingston, Edinburgh, London. PP. 1-11.
30. Humason, G. (1967). Animal Tissue Techniques. 2nd. ed., W. H. Freeman Company, San Francisco.
31. Little, T. & Hills. F. (1972). Statistical Methods agricultural research. Agricultural extension. University of California.
32. Carvalho, F.; Melo, A.; Albuquerque, G.; Teixeira, M; Matos, C. & Wenceslau, A. (2011). Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. Vet. Parasitol., 10;176(2-3):95-100.
33. Danforth, H. (1997). Use of live oocysts based vaccines in a vain coccidian control. In: Control of coccidiosis into next millennium. Ed by Shirley, M. W.; Tomley, F. M. and Freeman, B. M. Institute for animal health, Compton, New Burg Berks. PP. 95-96.
34. Long, P. & Gruber, A. (2005). Proceedings of The IXth International Coccidiosis Conference. chapter 1. Universidade de São Paulo (USP)-Brazil.
35. Sterling, B. & Alexander, B. (1952). The Reproductive Potential of Five Species of Coccidia of the Chicken as Demonstrated by Oocyst Production. J. Parasitol., 38 (2): 133-139.
36. Long, P. & Millard, B. (1976). Studies on site finding and site specificity of *Eimeria* praecox, *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina* in chickens. J. Parasitol., 73(3): 327-336.
37. Garcia, L.; Brewer, T. & Bruckner, D. (1987). Fuorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol., 25: 119-121.
38. Campbell, P. & Current, W. (1983). Demonstration of serum antibodies to *Cryptosporidium* sp. in normal and immunodeficient humans with confirmed infections. J. Clin. Microbiol., 18: 165-169.
39. Akhtar, K.; Noor, N.; Abdus, S. & Abbas, Q. (2002). Incidence and antibiogram patterns of *Escherichia coli* isolated from various clinical samples from patients at N.I.H. Islamabad. Pak. J. Biol. Sci., 5: 111-113.
40. Koch, K.; Phillips, D.; Aber, R. & Current, W. (1985). Cryptosporidiosis in hospital personnel. Evidence for person-to-person transmission. Ann. Intern. Med., 102: 593-596.
41. Sung-Hyen, L.; Hyun, S.; Seung, I.; Yeong-Ho, H.; Wongi, M.; Erik, P.; Robert, J. & Yancey, P. (2010). Embryo vaccination of chickens using a novel adjuvant formulation stimulates protective immunity against Eimeria maxima infection. Vaccine, 28(49): 7774-7778.
42. Lúcia, M.; Braz, V.; Clara, I.; Ferrari, M.; Palhares, V.; Amato, M.; Santos, H.; Marques, M.; Vallada, L.; Nakanishie, H. & Andrade, J. (1996). Human cryptosporidiosis: detection of specific antibodies in the serum by an indirect immunofluorescence. Rev. Saúde Pública, 30 (5): 395-402.

43. Stec, J.; Leokadia, B. & Jacek, K. (2004). Isolation and Purification of polyclonal IgG Antibodies from Bovine Serum by High Performance Liquid Chromatography. Bull Vet Inst Pulawy, 48: 321-327.

44. الألوسي، ثائر عبد القادر صالح؛ شهاب، احمد محمد والألوسي، توفيق إبراهيم. (2012). تقييم تأثير الكلوبيولين المناعي IgY على مناعة الدجاج المخمج بطفيلي *Eimeria tenella*. مجلة جامعة الأنبار للعلوم الصرفة. 6 (1): 19- 28.

45. الألوسي، ثائر عبد القادر صالح؛ وشهاب، احمد محمد والألوسي، توفيق إبراهيم. (2013). استخلاص وتنقية وتقدير الوزن الجزيئي للكلوبيوبين المناعي IgY المتخصص ضد نوع الطفيلي *Eimeria tenella* في الدجاج. مجلة جامعة الأنبار للعلوم الصرفة. 7 (2): 55- 58.

46. Joyner, L.; Patterson, D.; Berrett, S.; Boarer, C.; Cheong, F. & Norton, C. (1975). Amino acid malabsorption and intestinal leakage of plasma proteins in young chicks infected with *Eimeria acervulina*. Avian Patholog., 4: 17-33.

47. Dalloul, R. & Lillehoj, H. (2005). Recent Advances in Immunomodulation and Vaccination Strategies Against Coccidiosis. Avian Dis., 49:1-8.

48. Tilley, N.; Fayer, R.; Guidry, A.; Upton, S. & Blagburn, B. (1990). *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiae) oocysts and sporozoite antigens recognized by bovine colostral antibodies. Infect. Immun., 58: 2966-2971.

49. Vesey, G.; Deere, D.; Weir, C.; Ashbolt, N.; Williams, K. & Veal, D. (1997). A simple method for evaluating *Cryptosporidium*-specific antibodies for monitoring environmental water samples. Lett. Appl. Microbiol., 25: 316-320.

50. Takhar, B. S. & Farrell, D. J. (1979). Energy and nitrogen metabolism of chicken infected with either *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella*. Br. Poult. Sci. 20: 197- 211.

51. Mojca, N. (2003). Production of Antibodies in Chickens. University of Ljubljana, Food Technol. Biotechnol., 41 (3): 259-267.

52. Allen, P. & 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. Clin. Microbiol. Rev., 15: 58-65.

53. الطائي، أحلام فتحي والنعمة، مصطفى سالم شاكر. (2012). التغيرات المرضية المصاحبة للإصابة بالايميريا في أمعاء فروج اللحم في منطقه الحمدانية. مجلة الأنبار للعلوم البيطرية. 5 (2): 148- 157.

54. Conway, D.; Mathis, G.; Johnson, J.; Schwartz, M. & Baldwin, C. (2001). Efficacy of Diclazuril in Comparison with Chemical and Ionophorous Anticoccidials Against *Eimeria* spp. in Broiler Chickens in Floor Pens. Poult. Sci., 80 (4): 426-430.

55. Witlock, D. & Ruff, D. (1977). Comparison of the Intestinal Surface Damage Caused by *Eimeria mivati*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti*, and *E. acervulina* by Scanning Electron Microscopy. J. Parasitol., 63(2): 193-199.

56. Lillehoj, H.; Min, W. & Dalloul, R. (2004). Recent Progress on the Cytokine Regulation of Intestinal Immune Responses to *Eimeria*. College of Veterinary Medicine, University of Maryland. Poult. Sci., 83:611-623.
57. McDonald, V. (1999). Gut interaepithelial lymphcytes and immunity to coccidian. J. Parasit., 15:483-487.
58. Choi, K. & Lillehoj, H. (2000). Role of chicken Il-2on gamma delta T-cell and *Eimeria acervulina* induced changes in intestinal Il-2 mRNA expression and gamma delta T-cells. Vet. Immunol., 73:309-321.
59. Yun, C.; Lillehoj, H. & Choi, K. (2000). Chicken IFN-gamma monoclonal antibodies and their application in Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay. Vet. Immmuno.Immunopathol., 73:297-308.
60. Allen, P. (1997). Production of free radical species during *Eimeria maxima* infections in chickens. Poult. Sci., 76 (6): 814-821.
61. Long, P. L. & Joyner, L. P. (1984). Problems in the Identification of Species of *Eimeria*. J. Protozool., 31 (4): 535-541.