



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة تشخيصية جزيئية ومناعية لأنواع الأكريات *Eimeria sp.* المخمجة للدجاج في محافظتي كربلاء المقدسة وبابل

أطروحة مقدمة

الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة

في علوم الحياة / علم الحيوان. طفيليات

من قبل

الطالبة ضمياء مكي حمزة

ماجستير علوم حياة - جامعة القادسية 2005

بإشراف

أ.م.د. زهير محمد علي المنكوشي

أ.م.د. هادي رسول حسن المسعودي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
﴿الرَّحْمَنُ﴾ ﴿عَلَّمَ الْقُرْآنَ﴾ ﴿خَلَقَ الْإِنْسَانَ﴾ ﴿عَلَّمَهُ
الْبَيَانَ﴾

صدق الله العلي العظيم

(الرحمن الآيات 1-4)

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أنني قد قومت الدراسة الموسومة (تشخيص انواع الكوكسيديا
المخمجة للدجاج بالطرق الجزيئية والمناعية في مدينتي كربلاء وبابل) للطالبة
ضمياء مكي حمزة الحيدري كلية التربية للعلوم الصرفة/ قسم علوم الحياة -
الدراسات العليا (الدكتوراه).

التوقيع:

الإسم :

العنوان:

الإهداء

إلهي لا يطيب الليل إلا بشكرك ولا يطيب النهار إلا بطاعتك .. ولا تطيب اللحظات إلا
بذكرك .. ولا تطيب الآخرة إلا بعفوك .. ولا تطيب الجنة إلا برويتك

الله جل جلاله

إلى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة .. ونصح الأمة .. إلى نبي الرحمة ونور
العالمين ..

نبينا محمد صلى الله عليه واله وسلم

إلى سادتي ومعتمدي الأئمة الأطهار (عليهم السلام)

إلى من كلفه الله بالهيبة والوقار .. إلى من علمني العطاء بدون انتظار إلى من
أحمل اسمه بكل افتخار .. أرجو من الله أن يجعل له في الجنة دار
والدي العزيز (رحمه الله)

إلى ملاكي في الحياة إلى معنى الحب و الحنان والتفاني ...
إلى من كان دعاؤها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي إلى أغلى الأحبة
أمي الحبيبة

إلى من تحلو بالإخاء وتميزوا بالوفاء إلى ينابيع الصدق الصافي

اخوتي اخواتي

إلى قلبي النابض بين الاضلاع .. إلى من بدونه لا طعم لأفراح الحياة

زوجي العزيز

إلى ثمرة الفؤاد ونور العيون .. اطفالي .. شهد .. علي .. شمس

أهدي ثمرة جهدي المتواضع

الشكر والتقدير

اشكر الله تعالى مولاي وخالقي واحمده حمدا كثيرا اذ منّ علي باتمام هذا العمل المتواضع مع رجائي ان يتقبله مني ويجعله خالصا لوجهه الكريم وصلى الله على محمد خير الانبياء والمرسلين واله الطيبين الطاهرين وسلم تسليما كثيرا.

انطلاقا من قوله تعالى ((وَمَنْ يَشْكُرْ فَإِنَّمَا يَشْكُرُ لِنَفْسِهِ)) وایمانا بفضل الاعتراف بالجميل وتقديم الشكر والامتنان لاصحاب المعروف فاني اتقدم بالشكر الجزيل والتقدير الكبير الى استاذي المشرفين الفاضلين الاستاذ المساعد الدكتور هادي رسول حسن المسعودي والاستاذ المساعد الدكتور زهير محمد علي المنكوشي على ما منحوني من سعة الصدر والنصح والارشاد ولاقتراحهما موضوع البحث وماقدماه من توجيه علمي سديد.

كما يطيب لي ان اتقدم بجزيل الشكر الى جامعة كربلاء وعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة والى رئاسة قسم علوم الحياة كما أقدم شكري الى كل من ساعدني من الناحية العملية او بالتوجيه واخص بالذكر الطبية البيطرية زينب الحبوبي والطبيب البيطري حسن حاجم لما قدموه من المساعدة في جمع العينات والتشخيص .

وعرفانا بالجميل اتقدم بوافر الشكر والتقدير الى عائلتي الصغيرة ..زوجي واطفالي الذين تحملوا الكثير لاتمم هذا العمل والى عائلتي الكبيرة ..امي ..اخوتي ..اخواتي لتشجيعي ودعمي في كل خطوة خطوتها في حياتي.

عذرا الى كل من لم اذكره وقد قدم لي المساعدة ولو بسؤال بسيط ,والى جميع زملائي اتقدم بالشكر الجزيل.

الباحثة

ضمياء مكي حمزة

Abstract الخلاصة

اجريت هذه الدراسة لبيان نسبة انتشار طفيلي الايميريا المسببة لخمج الدجاج وأنواعه في كل من محافظتي كربلاء وبابل باتباع عدد من الطرائق التشخيصية منها الطرق الروتينية والتي تشمل الفحص السريري وبتبعها الفحص العياني ثم اجراء الفحص المجهرى لغرض تشخيص العينات الموجبة.

لوحظ خلال الدراسة الحالية حصول ارتفاع و انخفاض في نسبة الخمج خلال اشهر السنة بسبب التغير الكبير في درجات الحرارة ونسبة الرطوبة في العراق بين الاشهر اذ اظهرت الدراسة ان اعلى نسبة للخمج في كل من مدينتي كربلاء وبابل كانت في شهر كانون الاول (23.12%) واقل نسبة كانت في شهر تموز (1.87%).

جمعت في هذه الدراسة 200 عينة من براز الدجاج المخمج بالاكريات وامعائه لمدة 12 شهرا ابتداءً من شهر اب 2013 الى شهر تموز 2014 وشخص منها 160 عينة موجبة اعتمادا على الفحص المجهرى والتي بدورها خضعت للمرحلة الثانية من الفحص لغرض التشخيص النوعي الدقيق للانواع الايميرية المسببة للاكريات في الدجاج باعتماد الطرق الجزيئية باستهداف منطقة ITS1 للحامض النووي DNA المشفرة للحامض النووي الرايبوسومي وهذه التقنيات تشمل كل من تقنية qRT-PCR و Conventional PCR , وتوصلت الى تشخيص ثلاثة انواع وهي *Eimeria tenella* التي شكلت النسبة الاكبر من مجموع العينات الموجبة (66.8%) وجاء بعدها النوع *Eimeria necatrix* الذي شكل نسبة (30%) واخيرا النوع *Eimeria maxima* والذي شكل (3.13%).

حللت الدراسة الحالية تتابعات الحامض النووي لخمس عشرة عينة (خمس عينات من كل نوع من الانواع الايميرية الثلاثة) في شركة Bioneer الكورية اذ تم تحليل متعددة اصطفاف تسلسل القواعد النيتروجينية (Multiple sequence alignment analysis) لمنطقة ITS 1 لنتائج فحص تفاعل تسلسل البلمرة PCR للنوع *Eimeria* باجراء مقارنة بين تسلسل القواعد للعزلات المحلية مع عزلات عالمية مسجلة في بنك الجينات لموقع NCBI-BLAST واثبتت المقارنة دقة الفحص الجزيئي المتبع في الدراسة الحالية ودقة التشخيص للانواع الثلاثة .

كما اجري تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic relationship tree analysis باستخدام برنامج (MEGA 6) اذ تم استخدام تحليل الشجرة الوراثية من نوع (Test UPGMA tree (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) لمقارنة الانواع الايميرية الثلاثة مع الانواع الاخرى لطفيلي الايميريا المسجلة عالميا ووجدت الدراسة الحالية ان نسبة التماثل في تتابع الحامض النووي للنوع *E. tenella* مع النوع ((JX853830.1)) *E. tenella* في بنك الجينات

لموقع NCBI-BLAST كانت تتراوح بين 98% و 99% , في حين ان نسبة التماثل بين النوع *E.necatrix* المحلي والنوع *E.necatrix*(JX853832.1) المسجل في بنك الجينات للموقع NCBI-BLAST تراوحت بين 91% و 100% ونسبة التماثل بين النوع *E.maxima* المحلي والنوع *E.maxima* (JX853828.1) في بنك الجينات للموقع NCBI-BLAST كانت 98% .

اجري نوع اخر من التشخيص وهو التشخيص المناعي بتقنية الامتزاز المناعي Indirect ELISA Technique لتشخيص الاجسام المضادة من النوع IgY في مصول الدجاج المخمجة تجريبيا بنوعين من الايميريا *E.tenella* و *E.necatrix*, تم تحديد العينات الموجبة بعد حساب قيمة مستوى الكشف البالغة 0.313 اذ كانت قيمة متوسط الامتصاصية في الدجاج المخمج بالنوع *E.tenella* (0.96 ± 0.029) في حين ان قيمة متوسط الامتصاصية في مصول الدجاج المخمج بالنوع *E.necatrix* كان (0.95±0.029) .

اجريت تجربة لقياس امكانية حصول تفاعلات عبورية Cross Reactions بين نوعي الايميريا المستخدمة في التخميج وتوصلت الدراسة الى امكانية حصول هذه التفاعلات العبورية اذ ان استخدام مصول الدجاج المخمجة بالنوع *E.tenella* مع المستضدات المحضرة من اكياس البيض المبوغة للنوع *E.necatrix* اظهر نتيجة ايجابية وكانت قيمة متوسط الامتصاصية (0.75±0.096), اما في حالة استخدام مصول الدجاج المخمجة بالنوع *E.necatrix* مع المستضدات المحضرة من اكياس البيض المبوغة للنوع *E.tenella* اظهر ايضا نتيجة ايجابية وقيمة متوسط الامتصاصية تساوي (0.75±0.097) .

قائمة المحتويات

الصفحة	العنوان	ت
أ	الخلاصة	
ث - ح	قائمة المحتويات	
ج - خ	قائمة الصور	
ح - ذ	قائمة الاشكال	
ذ- ر	قائمة الجداول	
1- 4	Introduction المقدمة	الفصل الاول
5-34	Literatures Review استعراض المراجع	الفصل الثاني
5	مراجعة تاريخية	1-2
5	Coccidiosis نبذة عن داء الاكريات	2-2
6	تصنيف الطفيلي	3-2
7	أنواع جنس <i>Eimeria</i> المخمجة للدواجن وتأثيرها المرضي	4-2
7	Life cycle دورة الحياة	5-2
8	sporogony الطور البوغي	1-5-2
10	Gametogony الطور الجنسي (المشيجي)	2-5-2
11	Pathogenicity الامراضية	6-2
14	<i>E.tenella</i> العلامات السريرية للخمج بالنوع	1-6-2
15	Cross lesion الافات العيانية	2-6-2
15	Severity of Disease شدة الامراضية	7-2
16	Epidemiology الوبائية	8-2
16	Epidemiology in world الوبائية في العالم	1-8-2
18	Epidemiology in Iraq الوبائية في العراق	2-8-2
19	<i>Eimeria sp</i> الاستجابة المناعية في الدواجن المخمجة بطفيلي	9-2
21	الاستجابة المناعية الخلطية Humeral Immune Responses	10-2
23	الاستجابة المناعية الخلوية Cell mediated Immune Response	11-2
24	مكونات اخرى للاستجابة المناعية	12-2
24	العوامل المؤثرة في الاستجابة المناعية	13-2
24	المضيف	1-13-2
24	الطفيلي	2-13-2
24	مدة المناعة	3-13-2
25	مستوى المناعة	14-2
25	طرائق السيطرة والوقاية من الخمج	15-2
26	good management الادارة الجيدة	1-15-2
27	Chemotherapy العلاج الكيميائي	2-15-2
27	Preventive Drugs الادوية الوقائية	1-2-15-2
27	Therapeutic Drugs الادوية العلاجية	2-2-15-2

28	Genomic التركيب الجيني لانواع الايميريا structure	16-2
31	تحديد الانواع وتشخيصها Species determination and diagnosis	17-2
35	Materials and Methods المواد وطرائق العمل	الفصل الثالث
35	Materials المواد	1-1-3
35	الأجهزة والمعدات Equipments and Instruments	1-1-1-3
36	Chemicals المواد الكيماوية	2-1-1-3
37	Kits العُدد	3-1-1-3
38	primers البادئات	2-1-3
39	Experimental Design تصميم التجربة	2-3
45	Methods طرائق العمل	4-3
45	طريقة الفحص المباشر (الفحص المجهرى)	1-4-3
45	Samples collection جمع العينات	2-4-3
45	استخلاص الحامض النووي من البراز Stool DNA Extraction	3-4-3
47	DNA profile فحص الحامض النووي المستخلص	4-4-3
47	Real-PCR master mix تحضير مزيج	5-3
49	qRT-PCR تحليل نتائج فحص	1-5-3
49	PCR-Protocols تقنية تفاعلات سلسلة البلمرة	6-3
51	عملية الترحيل الكهربائي في الهلام Agrose Gel Electrophoresis	1-6-3
51	قياس تركيز الحامض النووي Measurement of DNA Concentration	2-6-3
51	تحديد تتابعات الحامض النووي الرايبوسومي DNA Sequencing	3-6-3
52	ELISA الفحص بتقنية الامتزاز المناعي	7-3
52	Animals الحيوانات	1-7-3
52	عزل اكياس البيض المستخدمة للاصابة Oocysts Isolation	2-7-3
53	تحضير المستضدات من اكياس البيض المبوغة Preparation of antigen from sporulated Oocysts	3-7-3
54	تقنية الامتزاز المناعي لتشخيص الاجسام المضادة IgY في مصل	4-7-3

	الدجاج المخمج بالاكريات	
55	اختبار التفاعلات العبورية بين الانواع الايميرية Cross-reaction experiments	5-7-3
56	Statistical Analysis التحليل الاحصائي	8-3
57	Results النتائج	الفصل الرابع
57	نتائج الفحص السريري والعياني والمجهري	1-4
61	نتائج الفحص الجزيئي بتقنية qRT-PCR assay	2-4
67	نتائج دراسة تتابعات الحامض النووي DNA	3-4
67	نتائج الفحص الجزيئي بتقنية PCR	1-3-4
71	نتائج تسلسل الحمض النووي DNA sequencing results	2-3-4
86	نتائج الفحص بتقنية الامتزاز المناعي ELISA	4-4
86	الخمج في حيوانات التجربة	1-4-4
88	Detection Level (Cut-Off level) مستوى الكشف	2-4-4
89	مستوى الاجسام المضادة IgY في مصول الدواجن المخمجة بالاكريات	3-4-4
91	المناقشة	الفصل لخامس
91	الفحص العياني والمجهري	1-5
95	الكشف عن نتائج التشخيص الجزيئي بتقنية REAL-TIME PCR	2-5
98	دراسة تتابعات الحامض النووي DNA Sequencing	3-5
98	الكشف عن نتائج التشخيص الجزيئي بتقنية PCR	1-3-5
102	تسلسل الحمض النووي DNA sequencing	2-3-5
105	الكشف عن نتائج التشخيص المناعي بتقنية ELISA	4-5
109	الاستنتاجات والتوصيات	
I-III	الخلاصة بالانكليزي	
A-k	الملاحق	
111	المصادر العربية	
114	المصادر الاجنبية	

قائمة الصور

الصفحة	العنوان	ت
8	كيس البيض الناضج للنوع <i>Eimeria tenella</i>	1-2
10	دورة حياة <i>Eimeria tenella</i> في الدجاج	2-2

58	يوضح الاغوران مصابان بالنوع <i>E.tenella</i> حيث يظهران ممثلتان بسوائل دموية ويمكن ملاحظة الدم المتخثر	1-4
58	يوضح امعاء مصابة بالنوع <i>E.necatrix</i> يلاحظ انتفاخ Ballooning واحتقان الجزء الوسطي المصاب	2-4
59	يوضح اكياس البيض الايميرية Eimerian Oocyst في المجهر الضوئي بقوة تكبير (40 x).	3-4
68	يوضح الترحيل الهلامي الكهربائي Gel Electrophoresis Agarose لنتائج PCR للنوع <i>E.tenella</i> .	4-4
69	يوضح الترحيل الهلامي الكهربائي Gel Electrophoresis Agarose لنتائج PCR للنوع <i>E.necatrix</i> .	5-4
69	يوضح الترحيل الهلامي الكهربائي Gel Electrophoresis Agarose لنتائج PCR للنوع <i>E.maxima</i> .	6-4
87	يوضح امتلاء الاغورين بالدم في الافراخ المخمجة تجريبيا بالنوع <i>E.tenella</i> (8 megapixel).	7-4
87	يوضح السطح الخارجي لمنطقة الاغورين مبقعان ببقع زرقاء في الدجاج المخمجة تجريبيا بالنوع <i>E.tenella</i> (8 megapixel).	8-4
88	انتفاخ وتخنن الامعاء الدقيقة في افراخ المجموعة الثانية المخمجة بالنوع <i>E.necatrix</i> (8 megapixel)	9-4

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	ت
30	رسم تخطيطي يوضح مناطق الحامض النووي الرايبوسومي rDNA مع بادئات Primers كل من المناطق ITS1 و ITS2	4-2
41	يوضح المرحلة الاولى من تصميم التجربة	1-3
42	يوضح المرحلة الثانية من تصميم التجربة	2-3
43	يوضح المرحلة الثالثة من تصميم التجربة	3-3
44	يوضح المرحلة الرابعة من تصميم التجربة	4-3

49	يوضح حالات الدورات الحرارية Thermo cycler لجهاز REAL- TIME PCR	5-3
60	يوضح النسب المئوية للخمج بطفيلي الايميريا خلال اشهر السنة .	1-4
62	يمثل التضخيم Amplification Plot أذ يظهر الومضان التآلقي لصبغة SYBER Green والتي تمثل العينات الموجبة للنوع <i>E. tenella</i> وعينات السيطرة التي تقع دون حد العتبة .	2-4
63	يمثل التضخيم Amplification Plot أذ يظهر الومضان التآلقي لصبغة SYBER Green والتي تمثل العينات الموجبة للنوع <i>E. tenella</i> وعينات السيطرة التي تقع دون حد العتبة .	3-4
63	يمثل منحنى التضخيم Amplification الذي يظهر الومضان التآلقي لصبغة SYBER Green والتي تمثل عينات <i>E.necatrix</i> وعينات السيطرة التي تقع دون حد العتبة .	4-4
64	يوضح الومضان التآلقي لصبغة SYBER Green الذي يظهر العينات الموجبة للنوع <i>E.maxima</i> وعينات السيطرة التي تقع دون حد العتبة	5-4
65	يوضح تحليل منحنى الذوبان Melt-curve لنتائج التفاعل للنوع <i>E.tenella</i> .	6-4
66	يوضح تحليل منحنى الذوبان Melt Curve لنتائج التفاعل للنوع <i>E.</i> <i>necatrix</i> .	7-4
67	يوضح تحليل منحنى الذوبان Melt-curve لنتائج التفاعل للنوع <i>E. maxima</i> .	8-4
72	يمثل اصطفاف تحليل متعددة تسلسل القواعد لمنطقة ITS1 في خمس عينات للنوع <i>E.tenella</i> المحلية مع الأنواع الأخرى من طفيلي الايميريا المنتشرة عالميا .	9-4

73	Phylogenetic relationship tree يمثل تحليل الشجرة الوراثية analysis لمقارنة النوع <i>E.tenella</i> مع الانواع الاخرى لطيفلي الایمیریا.	10-4
74	يوضح اصطفاف تحليل متعددة تسلسل القواعد لمنطقة ITS1 في خمس عينات للنوع <i>E.tenella</i> المحلية مع سلالات أخرى عالمية لنفس النوع.	11-4
75	Phylogenetic relationship tree يمثل تحليل الشجرة الوراثية analysis لمقارنة النوع <i>E.tenella</i> المحلي مع السلالات العالمية لنفس النوع.	12-4
76	يوضح اصطفاف متعدد تسلسل القواعد لمنطقة ITS1 لخمس عينات للنوع <i>E.necatrix</i> لمقارنته مع الانواع الاخرى لطيفلي الایمیریا . Eimeria	13-4
77	Phylogenetic relationship tree يمثل تحليل الشجرة الوراثية analysis لمقارنة النوع <i>E.necatrix</i> مع الانواع الاخرى لطيفلي . Eimeria	14-4
78	يوضح اصطفاف تحليل متعددة تسلسل القواعد لمنطقة ITS1 في خمس عينات للنوع <i>E.necatrix</i> المحلية مع السلالات الاخرى المسجلة عالميا لنفس النوع.	15-4
79	Phylogenetic relationship tree يمثل تحليل الشجرة الوراثية analysis لمقارنة خمس عينات محلية من النوع <i>E.necatrix</i> مع السلالات الاخرى العالمية.	16-4
80	يوضح اصطفاف متعدد تسلسل القواعد لمنطقة ITS1 لخمس عينات للنوع <i>E.maxima</i> لمقارنته مع الانواع الاخرى لطيفلي الایمیریا . Eimeria	17-4
81	Phylogenetic relationship tree يمثل تحليل الشجرة الوراثية analysis لمقارنة النوع <i>E.maxima</i> مع الانواع الاخرى لطيفلي . Eimeria	18-4

82	يوضح اصطفاف تحليل متعددة تسلسل القواعد لمنطقة ITS1 في خمس عينات للنوع <i>E.maxima</i> المحلية مع السلالات الاخرى المسجلة عالميا لنفس النوع .	19-4
83	Phylogenetic relationship tree فيمثل تحليل الشجرة الوراثية analysis لمقارنة خمس عينات محلية من النوع <i>E.maxima</i> مع السلالات الاخرى المسجلة عالميا للنوع نفسه.	20-4
90	يوضح مستوى الاجسام المضادة IgY المقاسة بواسطة تقنية الامتزاز المناعي ELISA للتعرف على امكانية حصول تفاعلات عبورية بين الانواع الايميرية المخمجة للدجاج.	21-4

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	ت
7	يوضح انواع الايميريا المخمجة للدجاج مع موقع الاصابة ,شدة الامراضية وابعاد اكياس البيض لكل نوع	1-2
35	يمثل الأجهزة والمعدات المختبرية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ.	1-3
36	يمثل المواد الكيماوية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ	2-3
37	يمثل العُدّ التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ.	3-3
38	البادئات الامامية والعكسية المستخدمة في تقنية PCR التي استخدمت في هذا الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي وحجم الدنا الناتج	4-3
39	يمثل البادئات الامامية والعكسية المستخدمة في تقنية qRT-PCR مع تسلسلها النيوكليوتيدي وحجم الدنا الناتج	5-3
47	يوضح مكونات المزيج الرئيسي لتقنية qRT-PCR	6-3
48	يوضح برنامج جهاز الدور الحراري Thermal cycler لتقنية qRT-PCR	7-3

49	يوضح برنامج جهاز المدور الحراري Thermal cycler لتقنية PCR	8-3
49	مكونات المزيج الرئيسي لتقنية PCR	9-3
60	النسبة المئوية للخمج بالاكريات خلال اشهر السنة	1-4
61	النسبة المئوية للأنواع الثلاثة من الايميريا المشخصة بالطرق الجزيئية	2-4
84	يوضح نسبة التماثل في تتابع الحامض النووي لعينات النوع <i>E.tenella</i> المحلية مع النوع <i>E.tenella</i> (JX853830.1) المسجل في بنك الجينات لموقع NCBI - BLAST	3-4
85	يوضح نسبة التماثل لتتابعات الحامض النووي لعينات النوع <i>E.necatrix</i> المحلية والنوع <i>E.necatrix</i> (JX853832.1) المسجل في بنك الجينات لموقع NCBI - BLAST	4-4
85	يوضح نسبة التماثل بين تتابع الحامض النووي لعينات النوع <i>E.maxima</i> المحلية والنوع <i>E.maxima</i> (JX853828.1) المسجل في بنك الجينات لموقع NCBI-BLAST .	5-4
89	يمثل قيم متوسط الامتصاصية في فحص الامتزاز المناعي ELISA (Mean± S.D) لتجربة امكانية حصول التفاعلات العبورية بين نوعين من الايميريا وهما <i>E.tenella</i> و <i>E.necatrix</i>	6-4

قائمة المختصرات

Abbreviation	Meaning
bp	Base pair
NCBI-BLAST	Basic local Alignment Search Tool
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
IBD	Infectious Bursal disease
ITS1	Internal Transcribed Spacer 1
ITS2	Internal Transcribed Spacer 2
Tm	Melting Temperature
MEGA6	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	REAL TIME PCR
RNA	Ribo nuclic acide
rDNA	Ribosomal DNA
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

الملحق (1): البرنامج الوقائي والصحي لافراخ التجربة.

العمر/يوم	الاجراءات الوقائية والصحية
1	اعطاء الماء السكري 50 غم/لتر
5	لقاح خليط (نيوكاسل B1 + لقاح التهاب الشعب الهوائية IB120) عن طريق ماء الشرب
6	اعطاء خليط من مجموعة الفيتامينات B-complex عن طريق ماء الشرب
12	لقاح كمبورو IBD
13	لقاح نيوكاسل ثاني Lasota عن طريق ماء الشرب
15	لقاح نيوكاسل ثالث Lasota عن طريق ماء الشرب
20	لقاح نيوكاسل رابع Lasota عن طريق ماء الشرب

الملحق (2): النسب المئوية لمكونات العليقة المستخدمة بالتجربة والتركيب الكيماوي لمحسوب لها .

النسبة المئوية للمكونات العلفية		المكونات العلفية
عليقة نمومن (21يوم – نهاية التجربة)	عليقة بادئ من (1يوم – 21يوم)	
52.9	50.25	ذرة صفراء
7.4	7	حنطة
30	33.55	كسبة فول صويا
5	5	مركز بروتيني (1)
3.4	0.3	ملح الطعام
0.8	1	حجر الكلس
3.4	2.5	زيت نباتي
0.1	0.2	لايسين%
0.1	0.2	ميثيونين%
100	100	المجموع

التحليل الكيماوي المحسوب

3109.48	3005.06	الطاقة الممثلة (كيلو سعرة /كغم علف)
21.02	22.29	البروتين الخام %
147.92	134.81	نسبة الطاقة الممثلة /البروتين الخام
0.90	1.04	كالسيوم %
0.47	0.50	الفسفور الكلي %
0.70	0.78	مثيونين وسستين %
1.0	1.1	لايسين %
5.92	4.94	الدهن %

الملحق (3): يوضح المعلومات التي جمعت من الاطباء البيطريين حول العلامات السريرية والفحص العياني و التي جمعت من اصحاب الحقول في محافظة كربلاء.

ت	الموقع الجغرافي للحقل	عدد الحقول	عدد العينات	سلالة الدجاج	العمر /يوم	مكان الاصابة	ظروف الحقل	الاعراض السريرية
1	المركز	3	13	Cobb Hubbard	14-30	الاعورين الامعاء	نسبة الرطوبة عالية+قليلة التهوية+اعداد كبيرة	اسهال دموي ,خمول عام والانقطاع عن الطعام
2	ناحية الحر	9	28	Hubbard Ross 308 Cobb	16-28	الاعورين الامعاء	رطوبة عالية+قليل التهوية	خمول عام ,انقطاع عن الطعام واللجوء الى التجمع

3	قضاء الحسينية	12	49	Ross 308 Hubbard	14-28	الاعورين الامعاء	رطوبة عالية+قليلة التهوية+اعداد كبيرة في مكان محدود المساحة	خمول عام انقطاع عن الطعام وللجوء الى التجمع
4	قضاء الهنديه	8	24	Hubbard Cobb Ross	21-24	الاعورين الامعاء	رطوبة عالية+قليل التهوية	خمول عام انقطاع عن الطعام وللجوء الى التجمع
5	المستشفى البيطري	10	17	Hubbard Cobb Ross	14-29	الاعورين	رطوبة عالية+قليلة التهوية+اعداد كبيرة في مكان محدود المساحة	خمول عام انقطاع عن الطعام وللجوء الى التجمع
6	الجمالية	2	3	Ross 308	14	الاعورين	رطوبة عالية+قليلة التهوية+اعداد كبيرة في مكان محدود المساحة	خمول عام انقطاع عن الطعام وللجوء الى التجمع

الملحق (4) : يوضح المعلومات التي جمعت من الاطباء البيطريين حول العلامات السريرية واماكن الخمج وتلك التي جمعت من اصحاب الحقول في محافظة بابل.

ت	الموقع الجغرافي للحقل	عدد الحقول	عدد العينات	سلالة الدجاج	العمر /يوم	مكان الاصابة	ظروف الحقل	الاعراض السريرية
1	قضاء المحاويل	9	21	Ross Cobb	14- 22	الامعاء ،الاعورين	رطوبة عالية+قليل التهوية	خمول عام انقطاع عن الطعام وللجوء الى التجمع
2	منطقة الوردية	3	17	Hubbard	24	الامعاء	رطوبة عالية+قليل التهوية	خمول عام انقطاع عن الطعام وللجوء الى التجمع
3	قضاء	2	6	Ross	14	الاعورين	رطوبة	اسهال دموي

308	الهاشمية						عالية, قليلة التهوية واعداد كبيرة في مكان محدود المساح	خمول عام, وانقطاع عن الطعام
Hubbard	المستشفى البيطري	5	3	25	الاعورين	رطوبة عالية وقليل التهوية	اسهال دموي, خمول عام, وانقطاع عن الطعام	
Cobb	المركز	3	2	18	الامعاء	رطوبة عالية وقليل التهوية	اسهال دموي, خمول عام, وانقطاع عن الطعام	
Ross 308	ناحية ابو غرق	9	3	16	الامعاء	رطوبة عالية, قليلة التهوية واعداد كبيرة في مكان محدود المساحة	خمول عام, انقطاع عن الطعام واللجوء الى التجمع	
Hubbard	ناحية الكفل	5	3	16	الامعاء	رطوبة عالية, قليلة التهوية واعداد كبيرة في مكان محدود المساح	خمول عام, انقطاع عن الطعام واللجوء الى التجمع	

الملحق (5): يوضح تشخيص منطقة ITS1 للحامض النووي الرايبوسومي rDNA لعينات موجبة للنوع *E.tenella* بتقنية RT-PCR.

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
H03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.795	(+) Positive
H02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.742	(+) Positive
D03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.699	(+) Positive
C03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.669	(+) Positive
A03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.657	(+) Positive
G03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.651	(+) Positive
B01	SYBR	Unkn	E. tenella	0.650	(+) Positive
B03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.634	(+) Positive
E03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.633	(+) Positive
D02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.601	(+) Positive
F02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.588	(+) Positive
F03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.563	(+) Positive
C02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.536	(+) Positive
E02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.506	(+) Positive
G02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.488	(+) Positive
C01	SYBR	Unkn	E. tenella	0.484	(+) Positive
B02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.475	(+) Positive
A02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.364	(+) Positive
H01	SYBR	Neg Ctrl	E. tenella	0.0168	

الملحق (6): يوضح تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS1 للحمض النووي DNA للانواع
الاييميرية الثلاثة التي حلت بواسطة شركة (Bioneer/Korea)

Eimeria tenella.S1-F

TGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACA
CAATTCGCACGCCTGGAACGCGCTGCTGGTTTTACAGGTTTCAAGCATTTCGCTTT
GCCTGGGTGGCCAGCAGCAGGTAGTCGTCGGTGTGTTGGAAAGAAAAATTTAG
TCCATCGCAACCCTTGAATCTGTTTTTCTCTGCAACGGTTTTTCTACTTTTTAAAA
ATTGAAGGAATTTTTTGCTGCTGCAAGGATATA

TCGCAGTAGTATGTACGTGGGCGATCGGGGGGGTGGTGGCGCATGCACGGGCTC
GCGTGGGGCCTGTCGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCGGCGCCAGCCCCGTGATCGT
CGATCGCGCACGTACGTGGAGGGGATTATGAGAGGAGAAGACGCGCACGGGGC
TGTGTCGTATGCAGAGCGCTCGCGGCTCGGGCGATTGTTCCGTGTTGTGTGCTCT
GCTGCATGCTGGTGTGTGCGTTCTGTCTCTCTCTCTCCGTTA

Eimeria tenella.S2-F

TGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACA
CAATTCGCACGCCTGGAACGCGCTGCTGGTTTTACAGGTTTCAAGCATTTCGCTTT
GCCTGGGTGGCCAGCAGCAGGTAGTCGTCGGTGTGTTGGAAAGAAAAATTTAG

TCCATCGCAACCCTTGAATCTGTTTTTCTCTGCAACGGTTTTTCTACTTTTTAAAA
ATGGATGGAATTTTTTGCTGCTGCAAGGGTATG

TAACAGTAGTATGTACGTGGAGGGGATTATGAGAGGAGAAGACGCGCACGGGG
CTGTGTCGTATGCAGAGCGCTCGCGGCTCGGGCGATTGTTCCGTGTTGTGTGCTC
TGCTGCATGCTGGTGTGTGCGTTCTGTCTCTYCTCTCTCCGTTACATGCTGCTTG
GAACTTTGCTTCAGCAAGAAATTTGCTCACTAAGGTGAATCGAATCACTTTTGT
GATGAGCAGAAGGAAGAATAGGTAGAAAGCGGA

Eimeria tenella.S3-F

TGCAAAAGTCGTAACACGGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACA
CAATTTCGCACGCCTGGAACGCGCTGCTGGTTTTACAGGTTTCAAGCATTTCGCTTT
GCCTGGGTGGCCAGCAGCAGGTAGTCGTCGGTGTGTTGGAAAGAAAAATTTAG
TCCATCGCAACCCTTGAATCTGTTTTTCTCTGCAACGGTTTTTCTACTTTTTAAAA
ATGGATGGAATTTTTTGCTGCTGCAAGGATATA

TAGCAGTAGTATGTACGTGGGCGATCGGGGGGGTGGTGGCGCATGCACGGGCTT
GCGTGGGGCCTGTCGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCGGCGCCAGCCCCGTGATCGT
CGATCGCGCACGTACGTGGAGGGGATTATGAGAGGAGAAGACGCGCACGGGGC
TGTGTTCGTATGCAGAGCGCTCCCGGCTCGGGCGATTGTTCCGTGTTGTGTGCTCT
GCTGCATGCTGGTGTGTGCGTTCTGTCTCTTTCTCTCTCCGTTACATGCTGCTTG
A

Eimeria tenella.S4-F

TGCAAAAGTCGTAACACGGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACA
CAATTTCGCACGCCTGGAACGCGCTGCTGGTTTTACAGGTTTCAAGCATTTCGCTTT
GCCTGGGTGGCCAGCAGCAGGTAGTTGTCGGTGTGTTGGAAAGAAAACTTTAGT
CCATCGCAACCCTTGAATCTGTTTTTCTCTGCAACGGTTTTTCTACTTTTTAAAA
TGGATGGAATTTTTTGCTGCTGCAAGGATATA

TAGCAGTAGTATGTACGTGGGCGATCGGGGGGGTGGTGGCGCATGCACGGGCTC
GCGTGGGGTCTGTCGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCGGCGCCAGCCCCGTGATCGT
CGATCGCGCACGTACGTGGAGGGGATTATGAGAGGAGAAGACGCGCACGGGGC
TGTGTTCGTATGCAGAGCGCTCGCGGCTCGGGCGATTGTTCCGTGTTGTGTGCTCT
GCTGCATGCTGGTGTGTGCGTTCTGTCTCTTTCTCTCTCCGTTACATGCTGC

Eimeria tenella.S5-F

TGCAAAAGTCGTAACACGGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACA
CAATTTCGCACGCCTGGAACGCGCTGCTGGTTTTACAGGTTTCAAGCATTTCGCTTT
GCCTGGGTGGCCAGCAGCAGGTAGTCGTCGGTGTGTTGGAAAGAAAACTTTAG

TCCATCGCAACCCTTGAATCTGTTATTCTCTGCAACGGTTTTTCTACTTTTTAAAA
ATGGATGGAATTTTTTGCTGCTGCAAGGATATA

TAGCAGTAGTATGTACGTGGGCGGTTCGGGGGGGTGGTGGCGCATGCACGGGCTC
GCGTGGGGCCTGTCTGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCGGGCGCCAGCCCCGTGATCGT
CGATCGCGCACGTACGTGGAGGGGATTATGTTATGAGAGGAGAAGACGCGCACG
GGGCTGTGTCGTATGCAGAGCGCTCGCGGCTCGGGCGATTGTTCCGTGTTGTGTG
CTCTGCTGCATGCTGGTGTGTGCGTTCTGTCTCT

Eimeria necatrix.S1-F

ACACAGTTTGTACGCCTAGAACGCGCTGCTGCTGGGTTTACAGGTTTCAAGCGTC
AGCTTTCTGCCTCGGTGGTCAGCGAGCAGTCGTTCTTGGGTGTAGGAAGGAATAA
TTTGTTACATCCCAATCTTTGTATCGTTTTTCTCTCAGCAACGATTTTTTCTACTATTT
AAAAATTAAGGCATTTTGGTCTTGCAAGGCATGTGCTAGTAGTAGTATGGGCG
TGAGCGATGGAGGGGAAGTGGTGGTGCATGCGTGGGCTTGCATGTGTGGGGCTT
GTCGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCAGCCCCGAGCCCCGTGACCAGCCCCATAAT
CATCGATCACGACGAGGCGAGGGAATTATGATGAGACTTGATCGGGGCTGCTTT
TTTTTGCAGAACGTTTCGAGCTCGTGGGGATTCCGTGTTGTGTAGCGGTCTGTGT
GCTGCTGTGCGATTGGTCTCTCTCTCTCCTTCGCGTGCATGCTGCTCGAAGCTACT
ATGCCTCA

Eimeria necatrix.S2-F

ACACAGTTTGTACGCCTAGAACGCGCTGCTGCTGGGTTTACAGGTTTCAAGCGTC
AGCTTTCTGCCTCGGTGGTCAGCGAGCAGTCGTTCTTGGGTGTAGGAAGGAATAA
TTTGTTACATCCCAATCTTTGTATCGTTTTTCTCTCAGCAACGATTTTTTCTACTATTT
AAAAATTAAGGCATTTTGGTCTTGCAAGGCATGTGCTAGTAGTAGTATGGGCG
TGAGCGATGGAGGGGAAGTGGTGGTGCATGCGTGGGCTTGCATGTGTGGGGCTT
GTCGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCAGCCCCGAGCCCCGTGACCAGCCCCATAAT
CATCGATCACGACGAGGCGAGGGAATTATGATGAGACTTGATCGGGGCTGCTTT
TTTTTGCAGAACGTTTCGAGCTCGTGGGGATTCCGTGTTGTGTAGCGGTCTGTGT
GCTGCTGTGCGATTGGTCTCTCTCTCTCCTTCGCGTGCATGCTGCTCGAAGCTACT
ATGCCTCA

Eimeria necatrix.S3-F

TGCAAAAGTCGTAACACGGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACA
CAGTTTGTGCGCCTAGAACGCGCTGCTGCTGGACTTACAGGTTTCAAGCGTCAGC
TTTTTGCTGGGTGGTCAGCGAGCAGTCGTTCTTGGGTGTAGGAAGGAATAATTT
GTTACATCCCAATCTTTGAATCGTTTTTTTCTCAGCAACGATTTTTTCTACTATTTAA
AAATTAAGGCATTTTGGTCTTGCAAGGCATGTGCTAGTAGTAGTATGGGCGTG
AGCGATGGAGGGGAAGTGGTGGTGCATGCGCATGCGTGGGCTTGCATGTGTGGG
GCTTGTGCGGCGCAGCCCCAGCGCGGCAGCCCCGAGCCCCGTGACCAGCCCAC
CAGCCCCATAACCATCGATCACGACGAGGCGAGGGAATTATGATGAGACTTGAT

CGGGGCTATTTTTTTTTTGCAGCTCGGGGGCATTTCGTTGTGTAGCGGTCTGTGTGCT
GCTGTGCGATCGGTCTCTCTC

Eimeria necatrix.S4-F

CAGTTTGTACGCCTAGAACGCGCTGCTGCTGGGTTTACAGGTTTCAAGCGTCAGC
TTTCTGCCTCGGTGGTCAGCGAGCAGTCGTTCTTGGGTGTAGGAAGGAATAATTT
GTTACATCCCAATCTTTGTATCGTTTTCTCTCAGCAACGATTTTTCTACTATTTAA
AAATTA AAAAGGCATTTTGGTCTTGCAAGGCATGTGCTAGTAGTAGTATGGGCGTG
AGCGATGGAGGGGAAGTGGTGGTGCATGCGTGGGCTTGCATGTGTGGGGCTTGT
CGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCAGCCCCGAGCCCCGTGACCAGCCCCATAATCA
TCGATCACGACGAGGCGAGGGAATTATGATGAGACTTGATCGGGGCTGCTTTTTT
TTGCAGAACGTTTCGAGCTCGTGGGGATTCCGTGTTGTGTAGCGGTCTGTGTGCT
GCTGTGCGATTGGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCGCGTGCATGCTGCTCGAAGCTACTATG
CCTCAGCA

Eimeria necatrix.S5-F

TGCGGAAGGATCATTACACAGTTTGTGCGCCTAGAACGCGCTGCTGCTGGACTT
ACAGGTTTCAAGCGTCAGCTTTTTGCCTGGGTGGTCAGCGAGCAGTCGTTCTTGG
GTGTAGGAAGGAATAATTTGTTACATCCCAATCTTTGAATCGTTTTTTCTCAGCAA
CGATTTTTCTACTATTTAAAAATTA AAAAGGCATTTTGGTCTTGCAAGGCATGTGCT
AGTAGTAGTATGGGCGTGAGCGATGGAGGGGAAGTGGTGGTGCATGCGCATGCG
TGGGCTTGCATGTGTGGGGCTTGTGCGCGGCAGCCCCAGCGCGGCAGCCCCGCA
GCCCCGTGACCAGCCCACCAGCCCCATAACCATCGATCACGACGAGGCGAGGGA
ATTATGATGAGACTTGATCGGGGCTATTTTTTTTTTGCAGCTCGGGGGCATTTCGTTG
TGTAGCGGTCTGTGTGCTGCTGTGCGATCGGTCTCTCTCTCTCTCTCTCGCGTGCATGCT
GCTCGGAGCTACTATGCCTCAGC

Eimeria maxima.S1-F

AGAGCCCTCTAAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTACACAGTGCGTCCCAAAGCGGTTTCATCATCCATCATCGATC
GGAAAAGCTTTTCTGGAGCGTTCTGCATTGGTGGGACTTGTGGTATGGGGGCTGC
TGGGGGGGAACGCCAGAGAACTAGCCTAACCCAATCATTGAGTCCCTTTCAGTCT
TCTCACAACGTACTTTTGAAAATTAAGGACACAAACAATGCCTATTTTGTGCAAT
TGATGGATATGATGCTCTTTAGAAGGGTGGATGTCCTCTTGCATGAACAGGGTTG
TGAGCGCATGCTGGTGGTGGGCTGCATGCTTGCATGCATGCATGCAGGGCTGCAT
GCATGATGCATGCATGCATGCATGCATGCACGGCATGATCGTGCATGCATACATG
CGTGCAATCGGTGCAACCCAATGCATTCCCACGAGAATGCATGCTGTATGAAGT
GTCTTGCA

Eimeria maxima.S2-F

AGAGCCCTCTAAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTACACAGTGCGTCCCAAAGCGGTTTCATCATCCATCATCGATC

GGAAAAGCTTTTCTGGAGCGTTCTGCATTGGTGGGACTTGTGGTATGGGGGCTGC
TGGGGGGGAACGCCAGAGAACTAGCCTAACCCAATCATTGAGTCCCTTTCAGTCT
TCTCACAAACGTA CTTTTGAAAATTAAGGACACAAACAATGCCTATTTTGTGCAAT
TGATGGATATGATGCTCTTTAGAAAGGGTGGATGTCCTCTTGCATGAACAGGGTTG
TGAGCGCATGCTGGTGGTGGGCTGCATGCTTGCATGCATGCATGCAGGGCTGCAT
GCATGATGCATGCATGCATGCATGCATGCACGGCATGATCGTGCATGCATACATG
CGTGCAATCGGTGCAACCCAATGCATTCCCACGAGAATGCATGCTGTATGAAGT
GTCTTGCAT

.Eimeria maxima.S3-F

AGAGCCCTCTAAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTACACAGTGCGTCCCAAAGCGGTTTCATCATCCATCATCGATC
GGAAAAGCTTTTCTGGAGCGTTCTGCATTGGTGGGACTTGTGGTATGGGGGCTGC
TGGGGGGGAACGCCAGAGAACTAGCCTAACCCAATCATTGAGTCCCTTTCAGTCT
TCTCACAAACGTA CTTTTGAAAATTAAGGACACAAACAATGCCTATTTTGTGCAAT
TGATGGATATGATGCTCTTTAGAAAGGGTGGATGTCCTCTTGCATGAACAGGGTTG
TGAGCGCATGCTGGTGGTGGGCTGCATGCTTGCATGCATGCATGCAGGGCTGCAT
GCATGATGCATGCATGCATGCATGCATGCACGGCATGATCGTGCATGCATACATG
CGTGCAATCGGTGCAACCCAATGCATTCCCACGAGAATGCATGCTGTATGAAGT
GTCT

.Eimeria maxima.S4-F

AGAGCCCTCTAAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTACACAGTGCGTCCCAAAGCGGTTTCATCATCCATCATCGATC
GGAAAAGCTTTTCTGGAGCGTTCTGCATTGGTGGGACTTGTGGTATGGGGGCTGC
TGGGGGGGAACGCCAGAGAACTAGCCTAACCCAATCATTGAGTCCCTTTCAGTCT
TCTCACAAACGTA CTTTTGAAAATTAAGGACACAAACAATGCCTATTTTGTGCAAT
TGATGGATATGATGCTCTTTAGAAAGGGTGGATGTCCTCTTGCATGAACAGGGTTG
TGAGCGCATGCTGGTGGTGGGCTGCATGCTTGCATGCATGCATGCAGGGCTGCAT
GCATGATGCATGCATGCATGCATGCATGCACGGCATGATCGTGCATGCATACATG
CGTGCAATCGGTGCAACCCAATGCATTCCCACGAGAATGCATGCTGTATGAAGT
GTCTTGCA

.Eimeria maxima.S5-F

AGAGCCCTCTAAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTACACAGTGCGTCCCAAAGCGGTTTCATCATCCATCATCGATC
GGAAAAGCTTTTCTGGAGCGTTCTGCATTGGTGGGACTTGTGGTATGGGGGCTGC
TGGGGGGGAACGCCAGAGAACTAGCCTAACCCAATCATTGAGTCCCTTTCAGTCT
TCTCACAAACGTA CTTTTGAAAATTAAGGACACAAACAATGCCTATTTTGTGCAAT
TGATGGATATGATGCTCTTTAGAAAGGGTGGATGTCCTCTTGCATGAACAGGGTTG
TGAGCGCATGCTGGTGGTGGGCTGCATGCTTGCATGCATGCATGCAGGGCTGCAT

GCATGATGCATGCATGCATGCATGCATGCACGGCATGATCGTGCATGCATAACATG
CGTGCAATCGGTGCAACCCAATGCATTCCCACGAGAATGCATGCTGTATGA

الملحق (7): يوضح مستوى الاجسام المضادة IgY المقاسة بتقنية الامتزاز المناعية لمراحل التجربة الاربعة لقياس امكانية حصول تفاعلات عبورية بين النوعين *E.necatrix* و *E.tenella*.

<i>E.tenella</i> serum + <i>E.tenella</i> antigen	<i>E.necatrix</i> Serum + <i>E.necatrix</i> Antigen	<i>E.tenella</i> Serum + <i>E.necatrix</i> Antigen	<i>E.necatrix</i> Serum + <i>E.tenella</i> Antigen
0.95	0.94	0.94	0.22
0.96	0.95	0.25	0.93
1	0.9	0.93	0.83
1	0.95	0.60	0.73
0.97	0.91	0.70	0.82
0.98	0.94	0.70	0.69
0.9	0.97	0.66	0.83
0.96	0.24	0.93	0.66
0.99	0.95	0.48	0.69
0.97	0.95	0.31	0.81
0.91	0.95	0.39	0.79
0.95	0.94	0.72	0.65
0.89	0.95	0.81	0.92
0.98	0.98	0.93	0.83
0.92	0.95	0.82	0.66
0.95	0.95	0.82	0.72
0.98	0.12	0.81	0.65
0.91	0.94	0.45	0.59
0.96	0.93	0.53	0.77
0.93	0.96	0.50	0.92
0.99	0.92	0.32	0.9
0.91	0.99	0.21	0.64
0.92	1	0.21	0.62
0.95	0.91	0.22	0.79
0.94	1	0.35	0.72
0.98	0.99	0.53	0.67
0.96	0.93	0.73	0.76
0.96	0.92	0.21	0.22
0.94	0.97	0.70	0.75
0.91	0.95	0.70	0.32
0.95	0.89	0.25	0.73
0.21	0.99	0.35	0.62
1	0.98	0.93	0.83
0.96	0.99	0.66	0.86
0.21			
0.96			
0.32			

0.93			
0.94			
0.99			
0.97			
0.99			
0.96			
0.96			
0.92			
0.96			
0.23			
1			
0.98			
0.98			

1-3 المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1-1-3 المواد Materials

1-1-1-3 الأجهزة والمعدات Equipments and Instruments

الجدول (1-3): الأجهزة والمعدات المختبرية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ.

الشركة المصنعة (المنشأ)	الأجهزة والمعدات	ت
Memmert/Germany	Autoclave	1
Olympus (Japan)	Compound light microscope	2
BBL/USA	Conical flasks	3
Concord (Lebanon)	Deep freeze -80C°	4
Sterile EO. / China	Disposable syringe 10 ml	5
Neubour (England)	Disposable plane tubes 10ml	6
Fisons(Japan)	Distiller	7
Lp-Italian-pa/Italy	Eppendorf tubes	8
Bioneer/ korea	Exispin vortex centrifuge	9
Unico TMI 100,USA	Filter papers	10

Weber Scientific International Lta/England	Haemocytometer	11
Eppendorf /Germany	High Speed Cold centrifuge	12
Nissei, Model US 330 /Japan	Sonicator machine	13
CYAN/ Belgium	Micropipettes 5-50, 0.5-10, 100-1000µl	14
THERMO/ USA	Nanodrop spectrophotometer	15
Memmert/Germany	Oven	16
BioRad .USA	Real-Time PCR machine	17
Concord (Lebanon)	Refrigerator	18
Gallen Kaamp(England)	Sensitive electron balance	19
Kottermann /Germany	Shaker water bath	20
Superestar(India)	Slides and cover slides	21
Superestar(India)	Test tubes	22
Bioneer/ korea	Thermal cycler machine	23
Clever Scientific /UK	UV-trans illuminator	24
CYAN China	Vortex	25
Memmert (Germany)	Water bath	26

Chemicals 2-1-1-3 المواد الكيميائية

الجدول (2-3): المواد الكيميائية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ.

الشركة وبلد المنشأ	اسم المادة	ت
BDH (England)	Absolute ethanol	1

BioBasic (Canada)	Agarose	2
Abcam/England	Carbonated buffer	3
Bioneer/ Korea	DEPC water (Diethylpyrocarbonate)	4
Abcam/England	Enzyme substrate	5
BioBasic (Canada)	Ethidium bromide	6
Abcam/England	Flat bottomed polystyrene microtitration plates	7
Bioneer/ Korea	Free nuclease water	8
BDH (England)	Isopropanol	9
Promega	Ladder 100bp	10
Abcam/England	Phosphate buffer saline &Tween 0.1% (PBST)	11
Abcam/England	Rabbit anti- chicken IgY H&L antibodies immunoglobulin-IgG conjugate	12
Abcam/England	Sodium Hypochlorite (6%)	13
BioBasic (Canada)	TBE Buffer	14
Abcam/England	2NH ₂ SO ₄	15

Kits 3-1-1-3 العُدّة

الجدول (3-3): العُدّة التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ.

الشركة وبلد المنشأ	مكوناته	اسم العدة	ت
Bioneer	GT Buffer 30 ml	عدة استخلاص الحمض النووي	1

(Korea)	GB Buffer 40 ml	Stool DNA extration Kit	
	W1 Buffer 45 ml		
	Wash Buffer 100 with ethanol		
	Elution Buffer 30 ml		
	GD Colum 100pcs		
	2ml collection tubes 100 pcs		
Bioneer (Korea)	Taq DNA polymerase	AccuPower™ PCR Premix	2
	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		
	Tris-HCl pH 9.0		
	KCl		
	MgCl ₂		
	Stabilizer and Tracking dye		
Bioneer (Korea)	single-tube lyophilized 2X Green Star qPCR Master tube contains (Master Mix including SYBR Green I dye, Hotstart Top DNA polymerase)	Real-Time PCR عدة فحص AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master Mix	3
	DEPC water		

primers 2-1-3 البادئات

تم تصميم البادئات الخاصة بمنطقة ITS1 الواقعة ضمن جين الدنا الرايبوسومي (rDNA) الخاصة بهذه الدراسة باستخدام موقع بنك الجينات NCBI Gene- Bank وحسب موقع Primer 3 online و جهزت البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية وكما موضح في الجدول (4-3) :

الجدول(4-3): يمثل البادئات الامامية والعكسية المستخدمة في تقنية qRT- PCR مع تسلسلها النيوكليوتيدي وحجم الدنا الناتج:

Real-Time Primer	Sequence		PCR SIZE
<i>E.tenella</i>	F	TTGTTCCGTGTTGTGTGCTCTG	81bp
	R	AGTTCCAAGCAGCATGTAACGG	
<i>E.maxima</i>	F	TCCCAAAGCGGTTTCATCATCC	72bp
	R	ACAGTCCCACAAATGCAGAACG	
<i>E.necatrix</i>	F	ATTGGTCTTGCGAGGCATGTG	96bp
	R	ACAAGCCCCACACATGCAAG	

الجدول (3-5): البادئات الامامية والعكسية المستخدمة في تقنية PCR التي استخدمت في هذا الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي وحجم الدنا الناتج:

Primer	Sequence		Amplicon
<i>E.tenella</i>	F	TGCAAAAGTCGTAACACGGT	525bp
	R	TCCAAGCAGCATGTAACGGA	
<i>E.necatrix</i>	F	TGCTGCTGGACTTACAGGTT	501bp
	R	TTCGAGCAAAGAGTATCGCC	
<i>E.maxima</i>	F	AGAGCCCTCTAAAGGATGCA	503bp
	R	AATGCAAGACACTTCATACAGC	

**Eimeria tenella* isolate internal transcribed spacer 1, complete sequence

GenBank: AF446074.1

**Eimeria necatrix* isolate internal transcribed spacer 1, complete sequence

GenBank: AF446070.1

**Eimeria maxima* isolate internal transcribed spacer 1, complete sequence

GenBank: AF446061.1

2-3 تصميم التجربة Experimental Design

جمعت 200 عينة من الدجاج المربي في الحقول الذي تظهر عليه علامات المخمج بالاكريات والتي احضرت الى العيادات البيطرية المنتشرة في محافظتي كربلاء المقدسة وبابل بالاضافة الى

المستشفى البيطري في كلا المحافظتين اعتمادا على العلامات السريرية، واجراء الفحوص العيانية ثم اخضعت العينات للفحص المجهرى الذي اثبت ان 160 من العينات كانت موجبة والتي استخدمت لغرض الحصول على اكياس البيض Oocysts, كما دونت مجموعة من المعلومات المتعلقة بالعينات المجموعة وهي موقع الحقل, سلالة الدجاج Strain, التشخيص العياني لموقع الاصابة, الاعراض المرضية Clinical signs والعمر والاستفسار اذا كانت ملقحة ام غير ملقحة بالاضافة الى الاستفسار عن ظروف الحقل والموسم. جمعت اكياس البيض وحفظت في 2.5 % من ثاني كرومات البوتاسيوم Dichromate potassium في درجة حرارة 4C (الثلاجة) لحين الاستعمال بالاضافة الى 20 عينة سيطرة جمعت من الدجاج الذي تمت تربيته ولم يلحق بلقاح مضاد للاكريات والذي ربي في قاعة مغلقة ومعقمة وتم التأكد من خلوه من الاكريات .

تمت دراسة العينات (اكياس البيض) باستخدام الطرق التالية:-

1- طريقة الفحص السريري والعياني والمجهرى باستخدام المجهر الضوئي .

2- التشخيص الجزيئي بتقنية REAL TIME- PCR

3- طريقة التشخيص الجزيئي بتقنية ال Conventional PCR لمجموعتي الاصابة و السيطرة.

4- تحليل تسلسل الحامض النووي DNA sequence method لنتائج PCR بتحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic Tree analysis.

5- جمع المصل من الافراخ التي خمدت مختبريا بنوعي الايميريا المشخصة بالطرق الجزيئية وكذلك من مجموعة السيطرة الغير مخمجة واخضاعها للفحص بتقنية الامتزاز المناعي ELISA.

وتوضح الاشكال (1-3), (2-3) و(3-3) التالية تصميم التجربة:

تصميم التجربة
(المرحلة الاولى)



جمعت 200 عينة من براز وامعاء
الدجاج المخبج بالاكريات من
محافظة كربلاء وبابل



اجريت الفحوص التالية بالتسلسل
لتشخيص العينات الموجبة

3

2

1

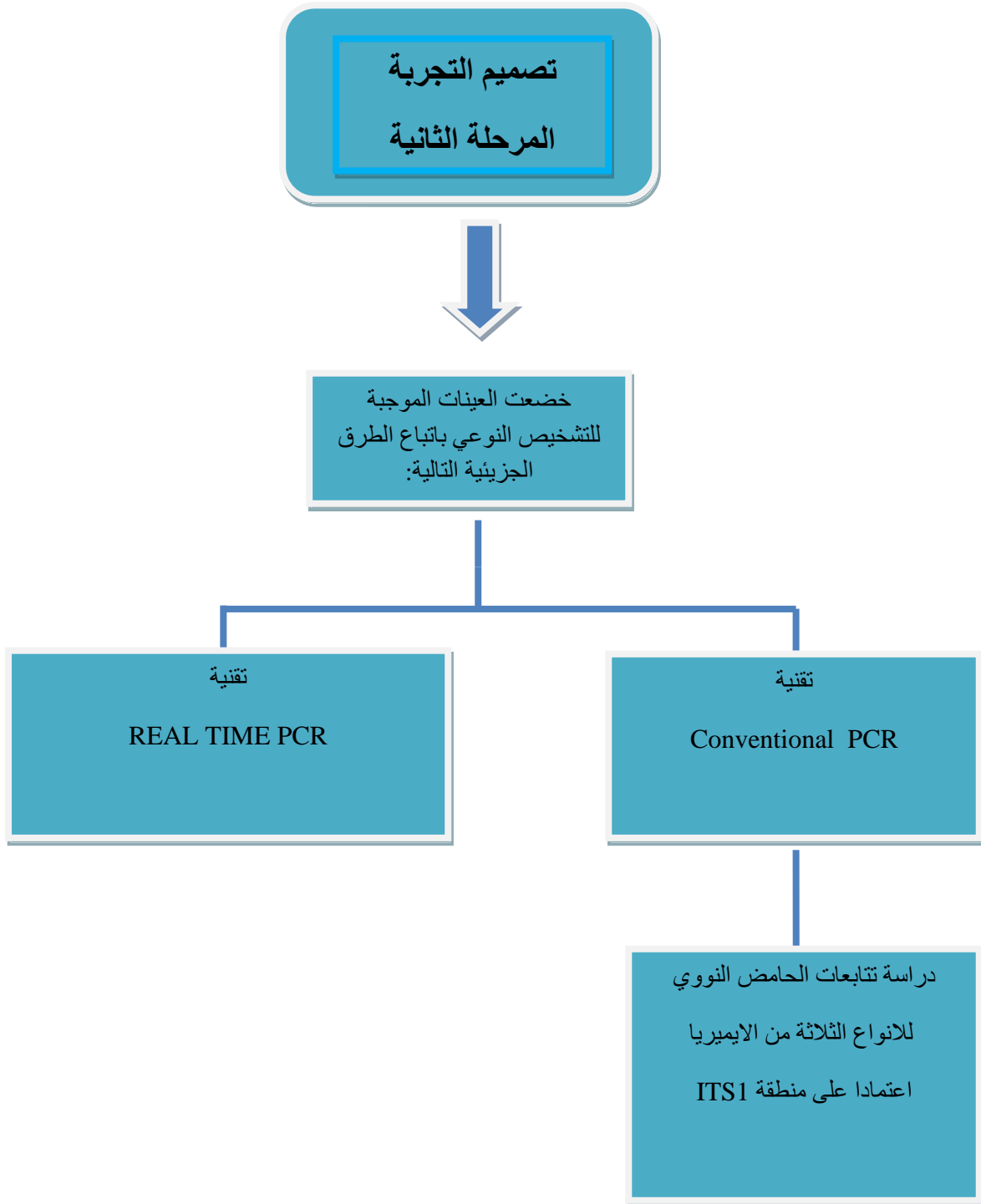
الفحص
المجهري

الفحص
العياني

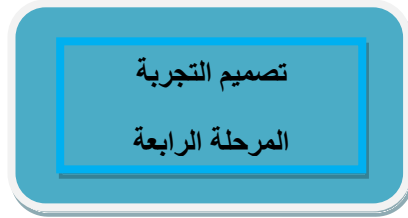
الفحص
السريري

شخصت 160 عينة موجبة
خضعت لفحوص المرحلة
التالية.

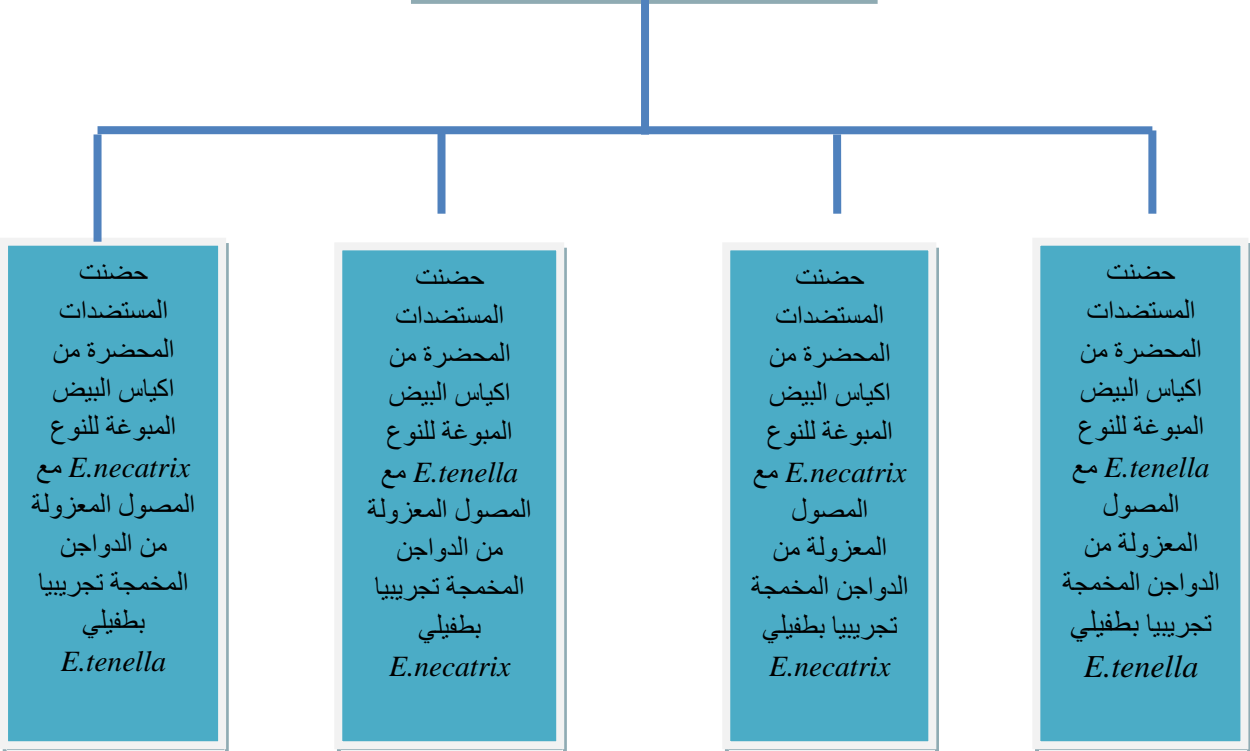
الشكل (1-3): يوضح المرحلة الاولى من تصميم التجربة



الشكل (3-3): يوضح المرحلة الثالثة من التجربة



اجريت تجربة من اربعة مراحل باستخدام تقنية الفحص المناعي ELISA للتأكد من امكانية حدوث تفاعلات عبورية بين نوعين من الایمیریا *E.tenella* و *E.necatrix*



الشكل(3-4): يوضح المرحلة الرابعة من تصميم التجربة

3-3 فحص العينات

1-3-3 طريقة الفحص المباشر (الفحص المجهرى)

جمعت عينات البراز من الدجاج المشكوك باصابته بداء الاكريات وفحصت مجهريا للكشف عن اكياس البيض وتستعمل عادة الطريقة المباشرة في حالات الاسهال الحادة وتفحص العينات اما طازجة Fresh او تثبت بمحلول الفورمالين المتعادل الدارى بتركيز 10% او الكحول المتعدد الفينيل, كما يمكن صبغ المسحة الرطبة بصبغة اليود Iodin stain او صبغة الكمزا Giemsa stain لاطهار المكونات الداخلية للكيس بشكل واضح (مشنت, 2013).

2-3-3 جمع أكياس البيض Oocysts collection

جمعت اكياس البيض من امعاء الدجاج المخمج بطفيلي الايميريا بعد التشخيص العياني باستخدام المجهر الضوئي وذلك باحداث شق طولي في الامعاء ونزع الغشاء المخاطي المبطن للامعاء مع محتويات الامعاء ووزعت كل عينة الى عدة عينات ثانوية قسم منها تحفظ بالتجميد في انابيب ابندروف وسجلت المعلومات الخاصة بكل عينة عليها واستخدامها في استخلاص DNA واستخدامه في التشخيص النوعي بالطرق الجزيئية والقسم الاخر حفظ في انابيب بلاستيكية ومزجت بمحلول ثنائي كرومات البوتاسيوم Potassium Dichromate وبتركيز 2.5 % بصورة جيدة ثم رشح العالق بمصفاة ذات فتحات صغيرة للتخلص من الالياف والمواد العالقة, ثم وضع العالق في انابيب معقمة وحفظ في الثلجة في درجة +4C لحين استعماله في احداث الاصابات التجريبية في الافراخ التي ربيت في اقفاص خاصة لغرض الحصول على المصول واستخدامها في التشخيص بتقنية الامتزاز المناعي .

3-3-3 استخلاص الحامض النووي DNA من البراز

Stool DNA Extraction

استخلص الحامض النووي من عينات براز الدجاج المخمج بالاكريات وذلك باستخدام ال (AccuPrep® Stool DNA Extraction Kit) المجهزة من شركة Bioneer الكورية, وتم إجراء الاستخلاص حسب تعليمات الشركة كآلاتي:

- 1- أخذت حوالي 200 ملغم من عينات البراز وتوضع في انابيب ابندروف ذات سعة 1.5مل.
- 2- اضيف 20 مايكروليتر من انزيم Proteinase K لكل انبوبة.
- 3- اضيف 400 مايكروليتر من محلول تحليل البراز Stool Lysis Buffer لكل انبوبة وتمزج لمدة 30 ثانية.
- 4- حضنت الانابيب في درجة حرارة °C 60 لمدة 10 دقائق في حمام مائي Water bath.
- 5- تركت لمدة 10 دقائق ثم تطرد الانابيب مركزيا بسرعة 12000دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق .
- 6- نقل الطافي الى انابيب جديدة واضيف 200 مايكروليتر من محلول الربط (Binding Buffer (ST buffer) لكل انبوبة .
- 7- حضنت الانابيب لعشر دقائق في درجة 60 مئوية في الحمام المائي .
- 8- اضيف 100مايكروليتر كحول Isopropanol ومزجت بلطف لمدة 5 دقائق وتدور باستمرار لمدة 10 ثواني.
- 9- ثم وضعت اعمدة الربط Binding column في انابيب ذات سعة 2 مل وينقل السائل الى اعمدة الربط وغلقت الانابيب بحذر وتطرد مركزيا لدقيقة بسرعة 8000 دورة/دقيقة.
- 10- بعدها نقلت اعمدة الربط الى انابيب جديدة ذات سعة 2 مل واضيف اليها 500 مايكروليتر من محلول الغسل الاول (W 1) Washing Buffer 1 وطردت مركزيا لدقيقة واحدة بسرعة 8000دورة /دقيقة.
- 11- نقلت اعمدة الربط الى انابيب جديدة بسعة 2 مل واضيف لها 500 مايكروليتر من محلول الغسل الثاني (W 2) Washing Buffer 2 وطردت مرة اخرى لدقيقة وبسرعة 8000دورة /دقيقة.
- 12- بعدها دورت باستمرار لدقيقة واحدة وبسرعة 13000دورة/ دقيقة للتخلص من بقايا الايثانول .

13- نقلت اعمدة الربط الى انابيب جديدة بسعة 1.5 مايكروليتر و اضيف اليها 50 مايكروليتر من محلول الاستخراج Elution Buffer وتركنت مستقرة لدقيقة واحدة ليسمح للمحلول بالمرور خلال اعمدة الربط.

14- استخرج الحامض النووي بتدويره باستمرار لدقيقة واحدة وبسرعة 8000دورة/دقيقة.

3-3-4 فحص الحمض النووي المستخلص

تم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص من عينات البراز وذلك من خلال استخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) الخاص بالكشف وقياس تركيز الحمض النووي (DNA and RNA) أذ يتم الكشف عن الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي DNA (نانو غرام/مايكروليتر) وقياس نقاوة الحمض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين(260-280 نانوميتر) وتم استخدام الجهاز على النحو التالي:

- 1- بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع DNA .
- 2- تم تصفير ركيزة المقياس مرتين باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع 1 مايكروليتر من (ddH₂O) باستخدام مايكروبايبييت معقمة على سطح ركيزة المقياس واجراء التصفير وبعدها تنظف الركيزة لقياس العينات.
- 3- تم الضغط على زر OK لبدء عملية قياس تركيز ال DNA وذلك باستخدام 1 ميكروليتر من كل عينة من ال DNA المستخلص ومن ثم تنظف ركيزة المقياس للجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.
- 4- وكذلك تم تحديد نقاوة عينات ال DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية بواسطة جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260/280 نانوميتر) أذ ان الحامض النووي DNA المستخلص يعد نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8) نانوميتر.

3-4 تحضير مزيج Real-PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل qRT-PCR باستخدام عدة ال AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master Mix المجهزه من قبل شركة ال Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة , كما في الجدول (6-3) الاتي:

الجدول (6-3): يوضح مكونات المزيج الرئيسي لتقنية RT-PCR

RT-PCR master mix	Volume
-------------------	--------

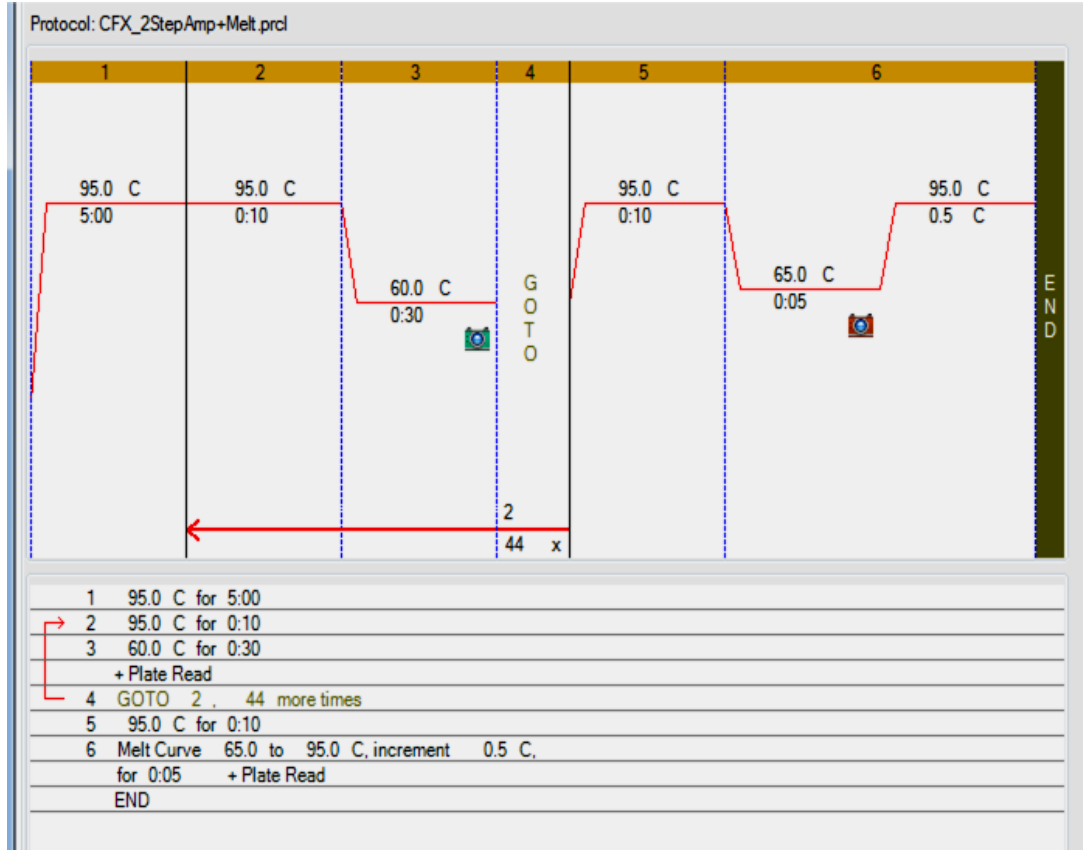
2X Green star master mix	25 µL
DNA template	5µL
ITS1 forward primer 10pmol	1µL
ITS1 reverse primer 10pmol	1µL
DEPC water	18µL
Total	50µL

بعد ذلك تم وضع مكونات مزيج تفاعل Real-Time PCR التي ذكرت في الجدول اعلاه الى انابيب بيضاء معتمدة بحجم 0.2 مل خاصة بجهاز ال Real-Time PCR ومن ثم نقلت جميع الانابيب الى جهاز الطرد المركزي المازج (Exispin) vortex centrifuge بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة ثلاثة دقائق و تم وضعت في جهاز Real-Time PCR .

تم تطبيق الدورات الحرارية لفحص ال Real-Time PCR وذلك بالاعتماد على تعليمات عدة AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master Mix وكذلك من خلال حساب درجة ال Tm البادئات وذلك باستخدام جهاز ال MiniOpticon Real-Time PCR system BioRad. USA كما في الجدول (7-3) و الشكل (5-3) ادناه:

الجدول (7-3) : يوضح برنامج جهاز الدور الحراري Thermal cyler لتقنية RT-PCR

Step	Condition	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C 5 min	1
Denaturation	95 °C 10 sec	45
Annealing/Extension	60 °C 30 sec	
Detection (Scan)		



الشكل(3-5): يوضح حالات الدورات الحرارية Thermo cycler لجهاز PCR REAL-TIME

1-4-3 تحليل نتائج فحص RT-PCR

تم تحليل نتائج فحص ال Real-Time PCR وذلك من خلال منحنى التضخم Amplification plot المعتمد على قيمة خط جهد العتبة Threshold cyler number (CT) value أذ تكون العينة موجبة عندما تتجاوز خط العتبة وكذلك تم تحديد خصوصية الفحص للعينات الموجبة من خلال منحنى الانصهار melt peak أذ تكون العينات موجبة اذا كان ظهورها في نفس درجة الانصهار والتي تتراوح في التضخيم الحقيقي للجين من 95-65Tm مئوية.

5-3 تقنية تفاعل سلسلة البلمرة PCR- Protocols

استخدمت عينات الحامض النووي المستخلص من عينات البراز في جهاز Thermal cycler لمضاعفة منطقة ITS1 في الحمض النووي الرايبوسومي rDNA وباستخدام البادئات الامامية والعكسية المصممة حسب موقع NCBI وحسب البرنامج الموضح في الجدول (8-3) التالي :

الجدول (8-3) :يوضح برنامج جهاز الدور الحراري Thermal cycler لتقنية PCR

Step	Temperature and duration	
Initial denaturation	95°C for 4 min	
Denaturation	94°C for 30sec	30 cycles
Annealing	59°C for 30 sec	
Elongation	72°C for 1 min	
Final elongation	72°C for 5 min	

أذ استخدمت PCR master mix 50 µl لمضاعفة منطقة ITS1 ومكونات المزيج الرئيسي master mix ذكرت في الجدول (9-3) .

الجدول (3- 9): يوضح مكونات المزيج الرئيسي لتقنية PCR:

Component	Quantity/concentration
<i>Taq</i> DNA polymerase	1 U
Each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 µM
Tris-HCl (pH 9.0)	10 mM
KCl	30 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Stabilizer and tracking dye	No specific concentration

اضيف (5مايكروليتر) من قالب الحمض النووي DNA المستخلص من كل عينة براز واضيف ايضا 1.5 مايكروليتر من كل نوع من البادئات Primers الى المزيج الرئيسي ومن ثم مزج جيدا باستخدام جهاز Exispin vortex centrifuge .

بعد عملية المزج نقلت انابيب المزيج الرئيسي الى جهاز Thermocycler والذي تمت برمجته حسب البرنامج السابق لغرض مضاعفة منطقة ITS1.

1-5-3 عملية الترحيل الكهربائي في الهلام

Agarose Gel Electrophoresis

تم تحضير الهلام عن طريق اذابة 1 غرام من الاكاروزفي 100مل من محلول TBE (Tris) Borate EDTA), ثم وضع في حمام مائي في درجة الغليان لمدة خمسة دقائق للحصول على محلول رائق, و اضيف اليها مادة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide (3 مايكروليتر/100 مل) بعدها صب الهلام في علبة جهاز الترحيل الكهربائي. عند تصلب الهلام نقل الى الخزان وغطي بكمية مناسبة من محلول TBE Buffer ورفع المشط Comb بحذر, اضيف حوالي 10 مايكروليتر من ناتج PCR ووضع في داخل حفر الهلام ثم وصل الجهاز بالطاقة الكهربائية 100 volt لمدة ساعة واحدة, بعدها فحصت وصورت باستعمال الأشعة فوق البنفسجية (U.V. transilluminator . Vendramini et al., 2011). فورنت قطع الحامض النووي المضخمة مع 100 bp ladder .

واخيرا, تم الحصول على PCR products لمنطقة ITS1 في الحامض النووي الرايبوسومي المجموع من الدجاج المخبج بالاكريات, تم عزل وتنقية ناتج PCR الذي ارسل للحصول على تتابعات ثلاثة انواع من الايميريا قيد الدراسة .

2-5-3 قياس تركيز الحمض النووي Measurement of DNA Concentration

قيس تركيز الحامض النووي DNA المستخلص الحاوي على المنطقة ITS1 المضخمة في عملية PCR لخمس عشرة عينة قبل ان ترسل لاجل تحديد تتابعات الحامض النووي للانواع الايميرية الثلاثة المسببة للمخج بالاكريات وذلك باستعمال جهاز Nanodrop spectrophotometer (خمس عينات لكل نوع) كل العينات المختارة اعطت تركيز اكثر من 100نانوغرام/مل وهو اقل تركيز مطلوب في عملية تحديد تتابعات الحامض النووي (Al-Mayah, 2013).

3-5-3 تحديد تتابعات الحمض النووي DNA Sequencing methods

ارسل ناتج تفاعلات البلمرة PCR لمنطقة ITS1 في الحامض النووي rDNA (خمس عينات لكل نوع من الايميريا التي شخست) الى شركة Bioneer/Korea

أذ تم إجراء تحليل تسلسل الحمض النووي DNA لتأكيد نتائج تشخيص فحص ال PCR لكل من الانواع الايميرية الثلاثة المشخصة في الدراسة الحالية وذلك من خلال إجراء تحليل الشجرة الوراثية

Phylogenetic tree analysis للمنطقة ITS1 في الحمض النووي DNA , أذ في البداية تم اجراء تفاعل ال PCR البالغ طوله (525 زوج قاعدي) لطيفلي *E.tenella* , الطول (501 زوج قاعدي) للنوع *E.necatrix* والطول (503 زوج قاعدي) للنوع *E.maxima* .

قورنت نتيجة التتابعات مع مثيلاتها من تتابعات الحمض النووي لطيفلي الايميريا المسجلة عالميا في موقع بنك الجينات باستخدام برنامج (MEGA 6) حسب الموقع الالكتروني www.genome.jp أذ تم استخدام تحليل الشجرة الوراثية من نوع Test UPGMA tree (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) .

6-3 الفحص بتقنية الامتزاز المناعي ELISA

1-6-3 الحيوانات Animals

ربيت افراخ الدجاج و البالغ عددها 110 فرخ والتي تم الحصول عليها من مفسس بحر العرب /في محافظة كربلاء المقدسة في غرفة ابعادها 4×3×3 م للفترة من 2014/3/1 الى 2014/6/1 ,تم تجهيز الغرفة بمفرغات للهواء ,جهاز تكييف ومصادر للانارة وعقمت الارضية بمادة الفورمالين بتركيز 40 % ومادة برمنغنات البوتاسيوم بنسبة 2/1 وجهزت الغرفة بالمناهل البلاستيكية واواني العلف البلاستيكية,بعد تربية الافراخ من عمر يوم واحد واعطاء البرنامج اللقاحي الكامل (ماعداد مضادات الاكريات) (الملحق 1) والعليقة الموضح مكوناتها حسب (الملحق 2) حتى الوصول الى عمر اسبوعين أذ قسمت الى ثلاثة مجاميع (50 فرخا) لكل من المجموعتين الاولى والثانية اما المجموعة الثالثة وهي مجموعة السيطرة فمكونة من (10 فرخ) أذ خمجت المجموعة الاولى باكياس البيض المتبوعة لطيفلي *E.tenella* اما المجموعة الثانية فخمجت باكياس البيض المتبوعة لطيفلي *E.necatrix* ولم يتم استحداث اصابة تجريبية بالنوع *E.maxima* لندرة عدد العينات التي لم تكن كافية لاستحداث الاصابة .

2-6-3 عزل اكياس البيض المستخدمة للخمج Oocysts Isolation غسلت

اكياس البيض المستخدمة للاصابة والتي حفظت مسبقا في محلول دايكرومات البوتاسيوم 2.5 % بالماء المقطر ثلاث مرات بعد ترسيبها بالطرد المركزي لمدة خمسة دقائق وبسرعة 2000 دورة /دقيقة وبعد ازالة المحلول الطافي اضيف الى الراسب محلول شيزر السكري (فينول 6.5 غم يذوب في 320مل من الماء المقطر) لغرض التطويف ,مزجت جيدا وسحب المحلول الطافي باستخدام ماصة باستور ووضع في دورق زجاجي حجمي واعيدت عملية التطويف ثلاث مرات مع سحب المحلول الطافي واطيف الى الدورق الحجمي لغرض التأكد من تطويف كل الاكياس.تم تخفيف المحلول بالماء المقطر واطيف محلول

هايبيوكلورايت الصوديوم بتركيز 6% الى الراسب ومزج باستخدام جهاز المزج المغناطيسي لمدة - 30 20 دقيقة, وزع المحلول في انابيب الطرد المركزي بصورة متساوية ثم اضيف اليه الماء المقطر بواسطة محقنة بلاستيكية بسعة 1 مل بصورة بطيئة على جدران انابيب الاختبار وطرقت مركزيا بسرعة rpm 2000, ظهرت طبقة بيضاء مفصولة بين الماء المقطر ومحلول هايبيوكلورايت الصوديوم وهي عبارة عن اكياس البيض اليميرية المعقمة. سحبت هذه الطبقة بواسطة الماصة وغسلت عدة مرات للتخلص من الكلور وحفظت في قناني نظيفة. خفف الراسب بالماء المقطر وتم تجريع الافراخ بعمر 14 يوم بحوالي $10^3 \times 3$ من الاكياس المتبوعة Sporulated oocysts والتي يتم حسابها باستخدام شريحة McMaster. slide

تم اجراء الفحوصات الروتينية بعد الاسبوع الاول من استحداث الاصابة من خلال معاينة الدجاج لملاحظة الاعراض المرضية وفحص الفرشة لملاحظة طبيعة البراز .

جمع 2 مل من الدم من مجاميع الدواجن المصابة بالاكريات ومن مجموعة السيطرة من الوريد الجناحي وسمح لها بالتخثر لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة ثم نقلت العينات المتخثرة وخنزت طوال الليل في الثلجة بدرجة $4^\circ C$ وطرقت العينات مركزيا لمدة 5 دقائق على 8000 دورة /دقيقة, تم فصل المصل Serum وسخن على درجة $56^\circ C$ لمدة 30 دقيقة لغرض تثبيط المتممات وخنزت بدرجة $-80^\circ C$ لحين الاستعمال .

3-6-3 تحضير المستضدات من اكياس البيض المتبوعة

Preparation of antigens from sporulated Oocysts

غسلت اكياس البيض المتبوعة مرتين بمحلول Carbonated buffer (0.05M, PH9.6)] والذي حضر من خلط (1.59غم) من كاربونات الصوديوم Na_2CO_3 و (2.93غم) من مادة بيكاربونات الصوديوم $NaHCO_3$ ثم كمل الحجم الى لتر باضافة الماء منزوع الايونات (Deionized Water) وعلقت في 1 مل من المحلول المذكور, بعدها عرضت اكياس البيض للتجميد والذوبان ثلاث مرات ثم كسرت باستخدام جهاز الموجات فوق صوتية Sonicater (20 KHZ) لمدة 5 دقائق في اوعية مغلقة Jacketed vessels في درجة حرارة $4-8^\circ C$, طرد المحلول المتجانس مركزيا بسرعة 10000 دورة /دقيقة لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة $4^\circ C$ للتخلص من اي مواد عالقة غير مرغوب فيها. يستخدم الطافي كمستضد وخنزن في درجة $-80^\circ C$ لحين الاستعمال .

3-6-4 تقنية الامتزاز المناعي لتشخيص الاجسام المضادة IgY في مصل الدجاج المخمخ بالاكريات

تم تنفيذ هذه التقنية اعتمادا على دراسة (Hiroshi *et al*,2005) :

1- حضنت 100 مايكروليتر من المستضد المحضر سابقا في الصفيحة المسطحة لفحص الامتزاز المناعي Flat bottomed polystyrene microtitration plates في كل حفرة من الرقاقة وحضنت في درجة 4مئوية لمدة 12 ساعة.

2- غسلت ثلاث مرات بمحلول Phosphate buffer saline (PBS) يحتوي على 0.1 % Tween (PBST) 20 (اضيف 300 مايكروليتر من المحلول في كل حجيرة وترك لمدة 30 ثانية بعد كل اضافة) بعد الغسل الاخير تجفف الرقاقة باستخدام ورق التجفيف.

3- اضيف 100 مايكروليتر من 10% Fetal calf serum الى كل حجيرة وحضنت لمدة 1.5 ساعة في درجة حرارة الغرفة لغلق المواقع غير النوعية Non-specific sites.

4- ثم غسلت الرقاقة ثلاث مرات بمحلول PBST .

5- خفف المصل 1:100 في محلول PBST ثم اضيف الى كل حفرة وترك في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة .

6- بعدها غسلت ثلاث مرات بمحلول PBST .

7- اضيف 100 مايكروليتر من 1:400 من Rabbit anti- chicken antibodies immunoglobulin-IgY conjugate مخفف بمحلول PBST الى كل حفرة وحضن لساعة واحدة في درجة حرارة الغرفة.

8- غسلت الرقاقة ثلاثة مرات بمحلول PBST.

9- بعدها اضيف 100 مايكروليتر من Avidin to Horse radish peroxidase (Substrate) conjugated وحضنت الصفيحة في الظلام بدرجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة .

10- ايقاف التفاعل الانزيمي باضافة 100 مايكروليتر من Stop Solution (2H₂SO₄) الى كل حفرة في الصفيحة المسطحة.

11- قيست امتصاصية المحلول Optical density على طول موجي 450 نانوميتر بواسطة جهاز قارئ الامتزاز المناعي ELISA Reader.

3-6-5 اختبار التفاعلات العنبرية بين الانواع

Cross-reaction experiments

صممت التجربة التالية لغرض التعرف على امكانية حصول تفاعلات مناعية عرضية بين الانواع اليميرية المختلفة باستخدام تقنية الامتزاز المناعي ELISA و الانواع التي شخضت في الدراسة الحالية *E.maxima* و *E.necatrix*, *E.tenella* الا ان التجربة اقتصرت على النوعين الاولين لتوفر اكياس البيض المبوغة العائدة لهما باعداد كبيرة بينما التخميج لم ينجح بالنوع *E.maxima* لكون العينات المشخصة قليلة و اكياس البيض غير كافية لاحداث الخمج اذ تكونت التجربة من اربع مراحل :

1- حضنت المستضدات المحضرة من اكياس البيض المبوغة للنوع *E.tenella* كما في الطريقة المذكورة سابقا. و استخدمت في فحص الامتزاز المناعي بحضنه مع المصول المعزولة من الدواجن المخمجة تجريبيا بطفيلي *E.tenella*.

2- حضنت المستضدات المحضرة من اكياس البيض المبوغة الخاصة بالنوع *E.necatrix* مع المصول المعزولة من الدواجن المخمجة تجريبيا بطفيلي *E.necatrix*.

3- حضنت المستضدات المحضرة من اكياس البيض المبوغة للنوع *E.tenella* مع المصول المعزولة من الدواجن المخمجة تجريبيا بالنوع *E.necatrix*.

4- حضنت المستضدات المحضرة من اكياس البيض المبوغة للنوع *E.necatrix* مع المصول المعزولة من الدواجن المخمجة تجريبيا بالنوع *E.tenella*.

3-7 التحليل الاحصائي Statistical Analysis

حللت النتائج احصائيا حسب برنامج The Statistical Analysis (SAS) System باستخدام الاختبار Lest Significant Difference (LSD) وكان مستوى الاحتمالية $P < 0.05$ لايجاد الفروق المعنوية والتي عدت ذات دلالة احصائية (الراوي وخلف الله, 2000).

الملحق (1): البرنامج الوقائي والصحي لافراخ التجربة.

العمر/يوم	الاجراءات الوقائية والصحية
1	اعطاء الماء السكري 50 غم/لتر
5	لقاح خليط (نيوكاسل B1 + لقاح التهاب الشعب الهوائية IB120) عن طريق ماء الشرب
6	اعطاء خليط من مجموعة الفيتامينات B-complex عن طريق ماء الشرب
12	لقاح كمبورو IBD
13	لقاح نيوكاسل ثاني Lasota عن طريق ماء الشرب
15	لقاح نيوكاسل ثالث Lasota عن طريق ماء الشرب
20	لقاح نيوكاسل رابع Lasota عن طريق ماء الشرب

الملحق (2): النسب المئوية لمكونات العليقة المستخدمة بالتجربة والتركيب الكيماوي لمحسوب لها .

النسبة المئوية للمكونات العلفية		المكونات العلفية
عليقة بادئ من (1يوم – 21يوم)	عليقة نمون (21يوم – نهاية التجربة)	
52.9	50.25	ذرة صفراء
7.4	7	حنطة
30	33.55	كسبة فول صويا
5	5	مركز بروتيني (1)
3.4	0.3	ملح الطعام
0.8	1	حجر الكلس
3.4	2.5	زيت نباتي
0.1	0.2	لايسين %
0.1	0.2	ميثيونين %
100	100	المجموع

التحليل الكيماوي المحسوب

3109.48	3005.06	الطاقة الممثلة (كيلو سعرة /كغم علف)
21.02	22.29	البروتين الخام %
147.92	134.81	نسبة الطاقة الممثلة /البروتين الخام
0.90	1.04	كاليوم %
0.47	0.50	الفسفور الكلي %
0.70	0.78	مثيونين وسستين %
1.0	1.1	لايسين %
5.92	4.94	الدهن %

الملحق (3): يوضح المعلومات التي جمعت من الاطباء البيطريين حول العلامات السريرية والفحص العياني و التي جمعت من اصحاب الحقول في محافظة كربلاء.

ت	الموقع الجغرافي للحقل	عدد الحقول	عدد العينات	سلالة الدجاج	العمر /يوم	مكان الاصابة	ظروف الحقل	الاعراض السريرية
1	المركز	3	13	Cobb Hubbard	14-30	الاعورين الامعاء	نسبة الرطوبة عالية+قليلة التهوية+اعداد كبيرة	اسهال دموي ,خمول عام وانقطاع عن الطعام
2	ناحية الحر	9	28	Hubbard Ross 308 Cobb	16-28	الاعورين الامعاء	رطوبة عالية+قليل التهوية	خمول عام ,انقطاع عن الطعام واللجوء الى التجمع
3	قضاء الحسينية	12	49	Ross 308 Hubbard	14-28	الاعورين الامعاء	رطوبة عالية+قليلة التهوية+اعداد كبيرة في مكان محدود المساحة	خمول عام ,انقطاع عن الطعام واللجوء الى التجمع

4	قضاء الهندية	8	24	Hubbard Cobb Ross	21-24	الامعاء الاعورين	رطوبة عالية+قليل التهوية	خمول عام انقطاع عن الطعام واللجوء الى التجمع
5	المستشفى البيطري	10	17	Hubbard Cobb Ross	14-29	الاعورين	رطوبة عالية+قليلة التهوية+اعداد كبيرة في مكان محدود المساحة	خمول عام انقطاع عن الطعام واللجوء الى التجمع
6	الجمالية	2	3	Ross 308	14	الاعورين	رطوبة عالية+قليلة التهوية+اعداد كبيرة في مكان محدود المساحة	خمول عام انقطاع عن الطعام واللجوء الى التجمع

الملحق (4) : يوضح المعلومات التي جمعت من الاطباء البيطريين حول العلامات السريرية واماكن الخمج وتلك التي جمعت من اصحاب الحقول في محافظة بابل.

ت	الموقع الجغرافي للحقول	عدد الحقول	عدد العينات	سلالة الدجاج	العمر /يوم	مكان الاصابة	ظروف الحقول	الاعراض السريرية
1	قضاء المحاويل	9	21	Ross Cobb	14- 22	الامعاء الاعورين	رطوبة عالية+قليل التهوية	خمول عام انقطاع عن الطعام واللجوء الى التجمع
2	منطقة الوردية	3	17	Hubbard	24	الامعاء	رطوبة عالية وقليل التهوية	خمول عام انقطاع عن الطعام واللجوء الى التجمع
3	قضاء الهاشمية	2	6	Ross 308	14	الاعورين	رطوبة عالية+قليلة التهوية واعداد كبيرة في مكان محدود المساح	اسهال دموي خمول عام والانقطاع عن الطعام

4	المستشفى البيطري	3	5	Hubbard	25	الاعورين	رطوبة عالية وقليل التهوية	اسهال دموي ،خمول عام والانقطاع عن الطعام
5	المركز	2	3	Cobb	18	الامعاء	رطوبة عالية وقليل التهوية	اسهال دموي ،خمول عام والانقطاع عن الطعام
6	ناحية ابوغرق	3	9	Ross 308	16	الامعاء	رطوبة عالية قليلة التهوية واعداد كبيرة في مكان محدود المساحة	خمول عام ،انقطاع عن الطعام واللجوء الى التجمع
7	ناحية الكفل	3	5	Hubbard	16	الامعاء	رطوبة عالية قليلة التهوية واعداد كبيرة في مكان محدود المساح	خمول عام ،انقطاع عن الطعام واللجوء الى التجمع

الملحق (5): يوضح تشخيص منطقة ITS1 للحامض النووي الرايبوسومي rDNA لعينات
موجبة للنوع *E.tenella* بتقنية RT-PCR.

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
H03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.795	(+) Positive
H02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.742	(+) Positive
D03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.699	(+) Positive
C03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.669	(+) Positive
A03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.657	(+) Positive
G03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.651	(+) Positive
B01	SYBR	Unkn	E. tenella	0.650	(+) Positive
B03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.634	(+) Positive
E03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.633	(+) Positive
D02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.601	(+) Positive
F02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.588	(+) Positive
F03	SYBR	Unkn	E. tenella	0.563	(+) Positive
C02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.536	(+) Positive
E02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.506	(+) Positive
G02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.488	(+) Positive
C01	SYBR	Unkn	E. tenella	0.484	(+) Positive
B02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.475	(+) Positive
A02	SYBR	Unkn	E. tenella	0.364	(+) Positive
H01	SYBR	Neg Ctrl	E. tenella	0.0168	

الملحق (6): يوضح تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS1 للحمض النووي DNA للانواع
الاييميرية الثلاثة التي حلت بواسطة شركة (Bioneer/Korea)

Eimeria tenella.S1-F

TGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACA
CAATTCGCACGCCTGGAACGCGCTGCTGGTTTTACAGGTTTCAAGCATTTCGCTTT
GCCTGGGTGGCCAGCAGCAGGTAGTCGTCGGTGTGTTGGAAAGAAAAATTTAG
TCCATCGCAACCCTTGAATCTGTTTTTCTCTGCAACGGTTTTTCTACTTTTTAAAA
ATTGAAGGAATTTTTTGCTGCTGCAAGGATATA

TCGCAGTAGTATGTACGTGGGCGATCGGGGGGGTGGTGGCGCATGCACGGGCTC
GCGTGGGGCCTGTCGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCGGCGCCAGCCCCGTGATCGT
CGATCGCGCACGTACGTGGAGGGGATTATGAGAGGAGAAGACGCGCACGGGGC
TGTGTCGTATGCAGAGCGCTCGCGGCTCGGGCGATTGTTCCGTGTTGTGTGCTCT
GCTGCATGCTGGTGTGTGCGTTCTGTCTCTCTCTCTCCGTTA

Eimeria tenella.S2-F

TGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACA
CAATTCGCACGCCTGGAACGCGCTGCTGGTTTTACAGGTTTCAAGCATTTCGCTTT
GCCTGGGTGGCCAGCAGCAGGTAGTCGTCGGTGTGTTGGAAAGAAAAATTTAG

TCCATCGCAACCCTTGAATCTGTTTTTCTCTGCAACGGTTTTTCTACTTTTTAAAA
ATGGATGGAATTTTTTGCTGCTGCAAGGGTATG

TAACAGTAGTATGTACGTGGAGGGGATTATGAGAGGAGAAGACGCGCACGGGG
CTGTGTCGTATGCAGAGCGCTCGCGGCTCGGGCGATTGTTCCGTGTTGTGTGCTC
TGCTGCATGCTGGTGTGTGCGTTCTGTCTCTYCTCTCTCCGTTACATGCTGCTTG
GAACTTTGCTTCAGCAAGAAATTTGCTCACTAAGGTGAATCGAATCACTTTTGT
GATGAGCAGAAGGAAGAATAGGTAGAAAGCGGA

Eimeria tenella.S3-F

TGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACA
CAATTTCGCACGCCTGGAACGCGCTGCTGGTTTTACAGGTTTCAAGCATTTCGCTTT
GCCTGGGTGGCCAGCAGCAGGTAGTCGTCCGGTGTGTTGGAAAGAAAAATTTAG
TCCATCGCAACCCTTGAATCTGTTTTTCTCTGCAACGGTTTTTCTACTTTTTAAAA
ATGGATGGAATTTTTTGCTGCTGCAAGGATATA

TAGCAGTAGTATGTACGTGGGCGATCGGGGGGGTGGTGGCGCATGCACGGGCTT
GCGTGGGGCCTGTCCGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCGGCGCCAGCCCCGTGATCGT
CGATCGCGCACGTACGTGGAGGGGATTATGAGAGGAGAAGACGCGCACGGGGC
TGTGTTCGTATGCAGAGCGCTCCCGGCTCGGGCGATTGTTCCGTGTTGTGTGCTCT
GCTGCATGCTGGTGTGTGCGTTCTGTCTCTTTCTCTCTCCGTTACATGCTGCTTG
A

Eimeria tenella.S4-F

TGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACA
CAATTTCGCACGCCTGGAACGCGCTGCTGGTTTTACAGGTTTCAAGCATTTCGCTTT
GCCTGGGTGGCCAGCAGCAGGTAGTTGTCCGGTGTGTTGGAAAGAAAACTTTAGT
CCATCGCAACCCTTGAATCTGTTTTTCTCTGCAACGGTTTTTCTACTTTTTAAAA
TGGATGGAATTTTTTGCTGCTGCAAGGATATA

TAGCAGTAGTATGTACGTGGGCGATCGGGGGGGTGGTGGCGCATGCACGGGCTC
GCGTGGGGTCTGTCCGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCGGCGCCAGCCCCGTGATCGT
CGATCGCGCACGTACGTGGAGGGGATTATGAGAGGAGAAGACGCGCACGGGGC
TGTGTTCGTATGCAGAGCGCTCGCGGCTCGGGCGATTGTTCCGTGTTGTGTGCTCT
GCTGCATGCTGGTGTGTGCGTTCTGTCTCTTTCTCTCTCCGTTACATGCTGC

Eimeria tenella.S5-F

TGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACA
CAATTTCGCACGCCTGGAACGCGCTGCTGGTTTTACAGGTTTCAAGCATTTCGCTTT
GCCTGGGTGGCCAGCAGCAGGTAGTCGTCCGGTGTGTTGGAAAGAAAACTTTAG

TCCATCGCAACCCTTGAATCTGTTATTCTCTGCAACGGTTTTTCTACTTTTTAAAA
ATGGATGGAATTTTTTGCTGCTGCAAGGATATA

TAGCAGTAGTATGTACGTGGGCGGTTCGGGGGGTGGTGGCGCATGCACGGGCTC
GCGTGGGGCCTGTCTGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCGGGCGCCAGCCCCGTGATCGT
CGATCGCGCACGTACGTGGAGGGGATTATGTTATGAGAGGAGAAGACGCGCACG
GGGCTGTGTCGTATGCAGAGCGCTCGCGGCTCGGGCGATTGTTCCGTGTTGTGTG
CTCTGCTGCATGCTGGTGTGTGCGTTCTGTCTCT

Eimeria necatrix.S1-F

ACACAGTTTGTACGCCTAGAACGCGCTGCTGCTGGGTTTACAGGTTTCAAGCGTC
AGCTTTCTGCCTCGGTGGTCAGCGAGCAGTCGTTCTTGGGTGTAGGAAGGAATAA
TTTGTTACATCCCAATCTTTGTATCGTTTTTCTCTCAGCAACGATTTTTTCTACTATTT
AAAAATTAAGGCATTTTGGTCTTGCAAGGCATGTGCTAGTAGTAGTATGGGCG
TGAGCGATGGAGGGGAAGTGGTGGTGCATGCGTGGGCTTGCATGTGTGGGGCTT
GTCGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCAGCCCCGCAGCCCCGTGACCAGCCCCATAAT
CATCGATCACGACGAGGCGAGGGAATTATGATGAGACTTGATCGGGGCTGCTTT
TTTTTGCAGAACGTTTCGAGCTCGTGGGGATTCCGTGTTGTGTAGCGGTCTGTGT
GCTGCTGTGCGATTGGTCTCTCTCTCTCCTTCGCGTGCATGCTGCTCGAAGCTACT
ATGCCTCA

Eimeria necatrix.S2-F

ACACAGTTTGTACGCCTAGAACGCGCTGCTGCTGGGTTTACAGGTTTCAAGCGTC
AGCTTTCTGCCTCGGTGGTCAGCGAGCAGTCGTTCTTGGGTGTAGGAAGGAATAA
TTTGTTACATCCCAATCTTTGTATCGTTTTTCTCTCAGCAACGATTTTTTCTACTATTT
AAAAATTAAGGCATTTTGGTCTTGCAAGGCATGTGCTAGTAGTAGTATGGGCG
TGAGCGATGGAGGGGAAGTGGTGGTGCATGCGTGGGCTTGCATGTGTGGGGCTT
GTCGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCAGCCCCGCAGCCCCGTGACCAGCCCCATAAT
CATCGATCACGACGAGGCGAGGGAATTATGATGAGACTTGATCGGGGCTGCTTT
TTTTTGCAGAACGTTTCGAGCTCGTGGGGATTCCGTGTTGTGTAGCGGTCTGTGT
GCTGCTGTGCGATTGGTCTCTCTCTCTCCTTCGCGTGCATGCTGCTCGAAGCTACT
ATGCCTCA

Eimeria necatrix.S3-F

TGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTCA
CAGTTTGTGCGCCTAGAACGCGCTGCTGCTGGACTTACAGGTTTCAAGCGTCAGC
TTTTTGCCTGGGTGGTCAGCGAGCAGTCGTTCTTGGGTGTAGGAAGGAATAATTT
GTTACATCCCAATCTTTGAATCGTTTTTTTCTCAGCAACGATTTTTTCTACTATTTAA
AAATTAAGGCATTTTGGTCTTGCAAGGCATGTGCTAGTAGTAGTATGGGCGTG
AGCGATGGAGGGGAAGTGGTGGTGCATGCGCATGCGTGGGCTTGCATGTGTGGG
GCTTGTGCGGCGCAGCCCCAGCGCGGCAGCCCCGCAGCCCCGTGACCAGCCCAC
CAGCCCCATAACCATCGATCACGACGAGGCGAGGGAATTATGATGAGACTTGAT

CGGGGCTATTTTTTTTTTGCAGCTCGGGGGCATTTCGTTGTGTAGCGGTCTGTGTGCT
GCTGTGCGATCGGTCTCTCTC

Eimeria necatrix.S4-F

CAGTTTGTACGCCTAGAACGCGCTGCTGCTGGGTTTACAGGTTTCAAGCGTCAGC
TTTCTGCCTCGGTGGTCAGCGAGCAGTCGTTCTTGGGTGTAGGAAGGAATAATTT
GTTACATCCCAATCTTTGTATCGTTTTCTCTCAGCAACGATTTTTCTACTATTTAA
AAATTAAGGCATTTTGGTCTTGCAAGGCATGTGCTAGTAGTAGTATGGGCGTG
AGCGATGGAGGGGAAGTGGTGGTGCATGCGTGGGCTTGCATGTGTGGGGCTTGT
CGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCAGCCCCGAGCCCCGTGACCAGCCCCATAATCA
TCGATCACGACGAGGCGAGGGAATTATGATGAGACTTGATCGGGGCTGCTTTTTT
TTGCAGAACGTTTCGAGCTCGTGGGGATTCCGTGTTGTGTAGCGGTCTGTGTGCT
GCTGTGCGATTGGTCTCTCTCTCTCCTTCGCGTGCATGCTGCTCGAAGCTACTATG
CCTCAGCA

Eimeria necatrix.S5-F

TGCGGAAGGATCATTCACACAGTTTGTGCGCCTAGAACGCGCTGCTGCTGGACTT
ACAGGTTTCAAGCGTCAGCTTTTTGCCTGGGTGGTCAGCGAGCAGTCGTTCTTGG
GTGTAGGAAGGAATAATTTGTTACATCCCAATCTTTGAATCGTTTTTTCTCAGCAA
CGATTTTTCTACTATTTAAAAATTAAGGCATTTTGGTCTTGCAAGGCATGTGCT
AGTAGTAGTATGGGCGTGAGCGATGGAGGGGAAGTGGTGGTGCATGCGCATGCG
TGGGCTTGCATGTGTGGGGCTTGTGCGCGGCAGCCCCAGCGCGGCAGCCCCGCA
GCCCCGTGACCAGCCCACCAGCCCCATAACCATCGATCACGACGAGGCGAGGGA
ATTATGATGAGACTTGATCGGGGCTATTTTTTTTTTGCAGCTCGGGGGCATTTCGTTG
TGTAGCGGTCTGTGTGCTGCTGTGCGATCGGTCTCTCTCTCCTTCGCGTGCATGCT
GCTCGGAGCTACTATGCCTCAGC

Eimeria maxima.S1-F

AGAGCCCTCTAAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTCACACAGTGCCTCCCAAAGCGGTTTCATCATCCATCATCGATC
GGAAAAGCTTTTCTGGAGCGTTCTGCATTGGTGGGACTTGTGGTATGGGGGCTGC
TGGGGGGGAACGCCAGAGAACTAGCCTAACCCAATCATTGAGTCCCTTTCAGTCT
TCTCACAACGTACTTTTGAAAATTAAGGACACAAACAATGCCTATTTTGTGCAAT
TGATGGATATGATGCTCTTTAGAAGGGTGGATGTCCTCTTGCATGAACAGGGTTG
TGAGCGCATGCTGGTGGTGGGCTGCATGCTTGCATGCATGCATGCAGGGCTGCAT
GCATGATGCATGCATGCATGCATGCATGCACGGCATGATCGTGCATGCATACATG
CGTGCAATCGGTGCAACCCAATGCATTCCCACGAGAATGCATGCTGTATGAAGT
GTCTTGCA

Eimeria maxima.S2-F

AGAGCCCTCTAAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTCACACAGTGCCTCCCAAAGCGGTTTCATCATCCATCATCGATC

GGAAAAGCTTTTCTGGAGCGTTCTGCATTGGTGGGACTTGTGGTATGGGGGCTGC
TGGGGGGGAACGCCAGAGAACTAGCCTAACCCAATCATTGAGTCCCTTTCAGTCT
TCTCACAACGTA CTTTTGAAAATTAAGGACACAAACAATGCCTATTTTGTGCAAT
TGATGGATATGATGCTCTTTAGAAAGGGTGGATGTCCTCTTGCATGAACAGGGTTG
TGAGCGCATGCTGGTGGTGGGCTGCATGCTTGCATGCATGCATGCAGGGCTGCAT
GCATGATGCATGCATGCATGCATGCATGCACGGCATGATCGTGCATGCATACATG
CGTGCAATCGGTGCAACCCAATGCATTCCCACGAGAATGCATGCTGTATGAAGT
GTCTTGCAT

.Eimeria maxima.S3-F

AGAGCCCTCTAAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTACACAGTGCGTCCCAAAGCGGTTTCATCATCCATCATCGATC
GGAAAAGCTTTTCTGGAGCGTTCTGCATTGGTGGGACTTGTGGTATGGGGGCTGC
TGGGGGGGAACGCCAGAGAACTAGCCTAACCCAATCATTGAGTCCCTTTCAGTCT
TCTCACAACGTA CTTTTGAAAATTAAGGACACAAACAATGCCTATTTTGTGCAAT
TGATGGATATGATGCTCTTTAGAAAGGGTGGATGTCCTCTTGCATGAACAGGGTTG
TGAGCGCATGCTGGTGGTGGGCTGCATGCTTGCATGCATGCATGCAGGGCTGCAT
GCATGATGCATGCATGCATGCATGCATGCACGGCATGATCGTGCATGCATACATG
CGTGCAATCGGTGCAACCCAATGCATTCCCACGAGAATGCATGCTGTATGAAGT
GTCT

.Eimeria maxima.S4-F

AGAGCCCTCTAAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTACACAGTGCGTCCCAAAGCGGTTTCATCATCCATCATCGATC
GGAAAAGCTTTTCTGGAGCGTTCTGCATTGGTGGGACTTGTGGTATGGGGGCTGC
TGGGGGGGAACGCCAGAGAACTAGCCTAACCCAATCATTGAGTCCCTTTCAGTCT
TCTCACAACGTA CTTTTGAAAATTAAGGACACAAACAATGCCTATTTTGTGCAAT
TGATGGATATGATGCTCTTTAGAAAGGGTGGATGTCCTCTTGCATGAACAGGGTTG
TGAGCGCATGCTGGTGGTGGGCTGCATGCTTGCATGCATGCATGCAGGGCTGCAT
GCATGATGCATGCATGCATGCATGCATGCACGGCATGATCGTGCATGCATACATG
CGTGCAATCGGTGCAACCCAATGCATTCCCACGAGAATGCATGCTGTATGAAGT
GTCTTGCA

.Eimeria maxima.S5-F

AGAGCCCTCTAAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTACACAGTGCGTCCCAAAGCGGTTTCATCATCCATCATCGATC
GGAAAAGCTTTTCTGGAGCGTTCTGCATTGGTGGGACTTGTGGTATGGGGGCTGC
TGGGGGGGAACGCCAGAGAACTAGCCTAACCCAATCATTGAGTCCCTTTCAGTCT
TCTCACAACGTA CTTTTGAAAATTAAGGACACAAACAATGCCTATTTTGTGCAAT
TGATGGATATGATGCTCTTTAGAAAGGGTGGATGTCCTCTTGCATGAACAGGGTTG
TGAGCGCATGCTGGTGGTGGGCTGCATGCTTGCATGCATGCATGCAGGGCTGCAT

GCATGATGCATGCATGCATGCATGCATGCACGGCATGATCGTGCATGCATAACATG
CGTGCAATCGGTGCAACCCAATGCATTCCCACGAGAATGCATGCTGTATGA

الملحق (7): يوضح مستوى الاجسام المضادة IgY المقاسة بتقنية الامتزاز المناعية لمراحل التجربة الاربعة لقياس امكانية حصول تفاعلات عبورية بين النوعين *E.necatrix* و *E.tenella*.

<i>E.tenella</i> serum + <i>E.tenella</i> antigen	<i>E.necatrix</i> Serum + <i>E.necatrix</i> Antigen	<i>E.tenella</i> Serum + <i>E.necatrix</i> Antigen	<i>E.necatrix</i> Serum + <i>E.tenella</i> Antigen
0.95	0.94	0.94	0.22
0.96	0.95	0.25	0.93
1	0.9	0.93	0.83
1	0.95	0.60	0.73
0.97	0.91	0.70	0.82
0.98	0.94	0.70	0.69
0.9	0.97	0.66	0.83
0.96	0.24	0.93	0.66
0.99	0.95	0.48	0.69
0.97	0.95	0.31	0.81
0.91	0.95	0.39	0.79
0.95	0.94	0.72	0.65
0.89	0.95	0.81	0.92
0.98	0.98	0.93	0.83
0.92	0.95	0.82	0.66
0.95	0.95	0.82	0.72
0.98	0.12	0.81	0.65
0.91	0.94	0.45	0.59
0.96	0.93	0.53	0.77
0.93	0.96	0.50	0.92
0.99	0.92	0.32	0.9
0.91	0.99	0.21	0.64
0.92	1	0.21	0.62
0.95	0.91	0.22	0.79
0.94	1	0.35	0.72
0.98	0.99	0.53	0.67
0.96	0.93	0.73	0.76
0.96	0.92	0.21	0.22
0.94	0.97	0.70	0.75
0.91	0.95	0.70	0.32
0.95	0.89	0.25	0.73
0.21	0.99	0.35	0.62
1	0.98	0.93	0.83
0.96	0.99	0.66	0.86
0.21			
0.96			
0.32			

0.93			
0.94			
0.99			
0.97			
0.99			
0.96			
0.96			
0.92			
0.96			
0.23			
1			
0.98			
0.98			

المصادر العربية:

الاعرجي، فرقان صبار (2002). تقييم لقاح اميريا تينيليا المنتج محليا في ذكور الفاوبرو. رسالة ماجستير الطب البيطري بغداد.

الأمانة ، غازي يعقوب عزال ؛كاظم، مريم عبد الحسين؛ حسن،زهرة عباس (2006). علاج الدجاج المحلي المصاب بطفيلي *Eimeria tenella* بمستخلص قشور الرمان المائي وعقار التندازول. مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري،المجلد/5 عدد 2:17-22.

حسن، عامر عبد الله (2005). مقارنة بين لقاح تجاري لداء الاكريات والسالينومايسين في تربية فروج اللحم المخمج تجريبيا بطفيلي الايمريا (*Eimeria sp*). رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد.

الراوي، خاشع محمود و خلف الله، عبد العزيز محمد (2000) . تصميم و تحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للنشر. جامعة الموصل.

زكريا، إحسان كوركيس. (2005). محاولة تحضير لقاح الأيميريا تنيلا المعزولة من الدجاج محلياً. رسالة الماجستير . كلية الطب البيطري في جامعة الموصل.

الشمري، مجيد حميد عبود (2010). تقييم فعالية بعض المستخلصات النباتية في الأداء الإنتاج والفسلجي لفروج اللحم المخمج بطفيلي *Eimeria tenella*. رسالة ماجستير، كلية التقنية /مسيب 117 ص.

الشيخلي،فؤاد ابراهيم عبد الجبار (2003). امراض الدواجن . الطبعة الثانية. بغداد / العراق

- الصائغ، علي عبد الرزاق. (1978). دور طفيليات الكوكسيديا في احداث مرض التهاب الامعاء التنخري المسبب عن الكلوستريديام بيرفرنجنس في الدجاج. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
- صالح , ثائر عبد القادر ، شهاب احمد محمد وتوفيق إبراهيم . (2013). تقدير الوزن الجزيئي للكلوبيولين المناعي النوعي IgY المستخلص والمنقى من صفار البيض وتقييم فعاليته ضد نوع الطفيلي *E.tenella* في الدجاج. مجلة الأنبار للعلوم البيطرية، المجلد (6) العدد (1).
- الصفار , ربي شوقي (2001). الكفاءة التمنيعية لطفيلي الاكريات المضعفة باشعة كاما في دجاج اللحم .رسالة ماجستير كلية الطب البيطري بغداد.
- الطائي، أحلام فتحي محمود (1996). تفعيل البلاعم بالمعدلات المناعية وتأثير ذلك على الخمج بطفيلي المشوكات الحبيبية *Echinococcus granulosus*، رسالة ماجستير مقدمة إلى كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق.
- القطار ، ماجد احمد وشبر، اسماعيل كاظم وشاهين ، منير جورج (1999). حماية الدجاج ضد مرض الاسهال الدموي بأستعمال اكياس بيض الايميريا تنيلا المشععة بأشعة كاما. مجلة الزراعة العراقية. العدد الخاص 1:4-8.
- العلواني، طلعت خضير عبادي (2008). تأثير مضادات الاكريات في الاستجابة المناعية للقاح مرض نيوكاسيل في فروج اللحم. رسالة ماجستير الطب البيطري بغداد.
- عبد الله ، دنيا عبد الرزاق (2010). داء الاكريات المعوية في البط الاليف في محافظة نينوى . المجلة العراقية للعلوم البيطرية، 2: 149-153.
- عبد العزيز، محمد ومحمد الغضبان. (2013). دراسة تشخيصية لانواع طفيلي ايميريا دجاج اللحم بتقنية REAL TIME – PCR في المملكة العربية السعودية. مجلة العلوم البيطرية، المجلد (2)، العدد (5).
- كاظم، لطيف إبراهيم، إسماعيل، عبد الأمير عودة و القطار، ماجد (1998). التغيرات المرضية في دجاج اللحم المحصن ضد الأيميريا تنيلا، الطبيب البيطري، مجلد 8، العدد 3: 75-83.

محسن، ممدوح عبد الرزاق(1988)تأثير الرطوبة وعقار الموننسينعلى افراخ اللحم المصابة
بطفيلي الأيميريا تنيلا.رسالة ماجستير.كلية الطب البيطري-جامعة بغداد.

مشتت،سكينة جبار(2013).دراسة طفيلية مناعية لطفيليات القناة الهضمية في الدجاج.اطروحة
دكتوراة مقدمة الى جامعة كربلاء – كلية التربية للعلوم الصرفة / علوم الحياة/ الطفيليات.

معله، عفاف عبدالرزاق(2001).تأثير حجوم اجزاء العلف على خمج فروج اللحم بالاكريات.
رسالة ماجستير طب بيطري /بغداد.

معله، عفاف عبدالرزاق(2006).تحصين افراخ الدجاج ضد داء الاكريات باستعمال اكياس
بيض
حية لانواع مختلفة من جنس الاميريا.اطروحة دكتوراة كلية الطب البيطري
/بغداد.

Summary

This study was conducted to demonstrate the prevalence and determine the species of parasites responsible for Poultry Coccidiosis in each of the provinces of Babel and Kerbala. A different diagnostic method was used during this study including the traditional methods, which include all of the clinical examination, Macroscopic and microscopic examination to determine the positive samples in the suspected chickens.

The present study observations were revealed increasing and decreasing the percentages of infection with coccidiosis during different months of a year and that due to the large change in temperature and humidity in Iraq, so the present study showed that the highest rate of infection in both of Kerbala and Babylon provinces were in December (23.12%) and the lowest rate in July (1.87%).

A lot of 200 samples of feces and intestines were collected from chickens that suspected infection with coccidiosis during the period from August 2013 to July 2014 and the results revealed that 160 samples were positive depending on the macroscopic and microscopic examination which in turn have undergone the second stage of the examination for the purpose of qualitative accurate diagnosis of the species of *Eimeria* that causing coccidia in chickens using of molecular methods for the target region

ITS1 nucleic acid DNA encoded ribosomal RNA, these techniques include the qRT-PCR technique and Conventional PCR, which diagnosed three species of *Eimeria* includes *E.tenella* which formed the largest proportion of the total positive samples (66.8%) then the species *E.necatrix* which accounted for (30%) and finally the species *E.maxima* which form (3.13%).

A Fifteen DNA samples (five samples for each of three species) of *Eimeria* has been sequenced and analyzed in Korean Bioneer corporation in which multiple sequence alignment online based analysis for the ITS1 region that previously amplified by polymerase chain reaction, A comparison between the sequences of bases of local isolates of *Eimeria* with global isolates that recorded in Gen Bank and the comparative molecular screening of the present study results revealed the Validity and accuracy of diagnosis of three *Eimerian* species.

Phylogenetic tree analysis using the program (MEGA 6) were adopted to determine genetic tree of the species analysis (Test UPGMA tree) (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) to compare the three of local species with global strains of *Eimeria* and found the Homology sequence identity of *Eimeria tenella* local isolates in comparison with NCBI-Gen bank *Eimeria tenella* (JX853830) . using NCBI-BLAST the results showed 98% & 99% , while the Homology sequence identity of *Eimeria necatrix* of local isolates in comparison with NCBI-Genbank *Eimeria necatrix* (JX853832.1) were 91% & 100 % and the Homology sequence identity of *Eimeria maxima* of local isolates to NCBI-Genbank *Eimeria maxima* (JX853828.1) was 98%.

Immunological examination of Indirect ELISA Technique was adopted for diagnosis of IgY in chickens sera that experimentally infected with *E .tenella* and *E .necatrix* , positive samples were determined after calculating the value of the detection level (Cut-off level) which equal to 0.313, where the average value of absorbance (Optical density) in chickens which experimentally infected with *E.tenella* was (0.96 ± 0.029), while the average value of absorbance in chicken sera that infected with the species *E .necatrix* was (0.95 ± 0.029).

To measure the possibility of Cross Reactions between the two species of *Eimeria* that used in experimental infection. The present study results showed the possibility of cross – reaction as the use of chicken sera that infected with species *E.tenella* species with antigens prepared from sporulated oocysts of *E.necatrix* species showed a positive result and the value of the average absorbance (0.75 ± 0.096), either in the case of the use of chicken sera infected with *E.necatrix* species with antigens prepared from

sporulated oocysts of *E .tenella* species also showed a positive result and the average absorbance value was (0.75 ± 0.097).

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
& Scientific Research
University of Karbala /College of Education



Identification of Chickens Coccidian species by Molecular and Immunological Methods in Kerbala and Babylon Provinces

A Thesis Submitted

to the Council of College of Education For Pure Sciences University of Karbala in Partial Fulfillment of
the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Biology

Zoology- Parasitology

BY

Dhamiaa Maki Hamza

M. SC. Biology- Al- Qadisiyah University 2005

Supervised by

Assistant Prof. Dr. Hadi Rasol Hasan Al-Massodi

Assistant Prof. Dr. Zuhair Muhammad Ali Jeddoa

2015 A.D

1436 A.H

