اختبار المذنب (Comet assay) للكشف عن الضرر بالـ DNA أثر الاصابة بطفيليات الدم في الاغنام العواسي التركي

مثنى صباح عزاوي * احمد علاء الدين العاني نصر نوري الانباري*****

جامعة الفرات الأوسط / الكلية التقنية المسيب /قسم تقنيات الانتاج حيواني *

وزارة الزراعة / دائرة الأبحاث الزراعية**

جامعة بغداد/ كلية الزراعة/قسم تقنيات الانتاج حيواني***

m.sabah41@yahoo.com *Nasr_noori@yahoo.com*

المستخلص

أجريت هذه الدراسة في محطة أبحاث المجترات التابعة للهيئة العامة للبحوث الزراعية/ وزارة الزراعة (20 كم غرب مدينة بغداد)، فضلا عن مختبر الفسلجة/كلية الزراعة/جامعة بغداد ومركز التقانة الاحيائية/جامعة النهرين للمدة من 2013/1/1 ولغاية 2014/6/1، بهدف دراسة الضرر بالحامض النووي (DNA) بتطبيق اختبار المذنب (Comet assay) بعد فحص الاغنام للإصابة بالطفيليات الداخلية (Blood parasites). تأثر كل من انتاج الحليب اليومي والكلي معنويا ($P\leq0.05$) بالإصابة بالطفيليات الداخلية، إذ تدهورت هاتين الصفتين أثر الاصابة. كما تأثرت نسبة البروتين ونسبة المواد الصلبة غير الدهنية معنويا ($P\leq0.05$) بالإصابة بالطفيليات الداخلية، بينما لم تتأثر مكونات الحليب ومواصفاته الاخرى بهذه الاصابة. وأظهرت نتائج الدراسة الحالية ان غالبية صفات الـ Comet assay تأثرت من معنويا الى عالي المعنوية أثر الإصابة بالطفيليات الداخلية. يمكن أن نستنتج ان موضوع الاصابة بالطفيليات الداخلية يستحق الدراسة والاهتمام لعلاقته بالصفات الاقتصادية، كما أن تطبيق الدراسة على عينة أكبر ولعدة مواسم إنتاجية من شأنه أعطاء نتائج أكثر دقة لتطبيق إستراتيجية الاستبعاد والاستبدال.

الكلمات المفتاحية: الاغنام العواسي التركي–اختبار المذنب – طفيليات الدم –الضرر بالدنا.

Comet assay technique for indicator of DNA damage in Turkish Awassi sheep

Azzawi, M.S. AL-Ani, A.A Al-Anbari, N.N

Abstract

This study was carried out at the Ruminants Researches Station (20 km west of Baghdad) /State Board for Agriculture Researches / Ministry of Agriculture, Reproductive laboratory in college of Agriculture/Univ. of Baghdad & Technical Center of AL-Nahrain Univ. over period from 1/1/213 until 1/6/2014. The aim of this study was to find DNA damage according to comet assay procedure, after a test of sheep for incidence of blood parasites. Significant effect ($P\leq0.05$) of incidence of blood parasites on daily milk yield , total milk production, protein and total solid non-fat percentage were recorded, but no-significant effect of incidence on other parameters

of milk. The present study,for more accuracy,suggest to applied on larger sample of sheep.

Key words: Turkish awassi sheep-Comet assay- Blood DNA damage - DNA damage

المقدمة

ان الأصابه بالطفيليات تعد من المؤشرات الخطيرة على صحة وأنتاجية الحيوان مما يؤثر على المردود الأقتصادي [1] ، ان الامراض الطفيليه الدميه المنقوله بالقراد تغطي مساحات واسعه من العالم ولاتخلو منها إلا بعض المناطق في العالم مثل المرتفعات الجبليه المغطاة بالثلوج أو المناطق الصحراويه القاحله [9] كما ان الأصابه العاليه بطفيليات الدم ناتج عن البيئه المفضله لبقاء وتكاثر المفصليات الناقله والمسؤوله عن انتقال الطفيليات في الأغنام المرباة تحت أنظمة الأدارة والتربيه المكثفه وشبه المكثفه [4] مما يجعل عملية السيطرة على هذه الأمراض أكثر تعقيدا بسبب كلفة المبيدات فضلا عن ظهور بعض حالات المقاومه عند الأستعمال المتكرر[13]. ان الانتخاب لمقاومة الطفيليات التي تصيب الاغنام ومنها طفيليات الدم اهمية كبيرة في مجال تطوير انتاج الاغنام وحيوانات المزرعة عموما، اذ ان الطفيليات المتمثلة بكل من الثليريا والبيبيزيا والانبلازما وغيرها تعيق بشكل كبير تطور الانتاج الحيواني في الدول النامية [11]. تعد طريقة أختبار المذنب (Comet assay) الأسهل للأستدلال على الضرر الحاصل في الماده الوراثيه (DNA) في خلايا الكائنات حقيقية النواة وهي أختبار للسميه الجينيه(Genotoxicity testing) وتعتبر طريقة بسيطه لقياس التحطم الحاصل في الشريط المزدوج للمادة الوراثيه [16]. ونظرا لندرة الدراسات الجارية بهذا الخصوص في العراق، لذا كان الهدف من البحث دراسة وجود او عدم وجود ضرر في الـ DNA باستعمال اختبار المذنب وعلاقته بحصول الاصابات الطفيلية في الدم (Blood parasites) لدى الاغنام العواسي التركي.

المواد وطرائق العمل

نفذت الدراسة في محطة أبحاث المجترات التابعة للهيئة العامة للبحوث الزراعية / وزارة الزراعة، للمدة من 2013/1/1 ولغاية 2014/6/1، على عينة مكونة من 127 عواسي تركي، لدراسة الطفيليات الداخلية والضرر في المادة الوراثية من خلال اختبار المذنب (Commet assay).

الكشف عن الطفيليات الدمية في الحملان

حظرت المسحة الدمية بعد اخذ عينة من دم الحملان (عينة من الوريد الوداجي 3 مل وحفظت في انبوبة جمع مضاف لها مانع تخثر من نوع K2 EDTA لعمل المسحات واختبارات اخرى) بعد ذلك اخذت قطرة من الدم باستخدام ساق زجاجي دقيق ثم وضعت على حافة الشريحة الزجاجية ووضع فوقها شريحة اخرى نظيفة وفرشت بوساطة تحريك الشريحة الاولى على الثانية حتى نهايتها ثم تركت لتجف وتثبت بالكحول المثيلي لمدة 3 دقائق وصبغت بصبغة الكمزا ذات التركيز 10% لمدة نصف ساعة ثم غسلت بالماء المقطر وفحصت تحت المجهر باستخام العدسة الزيتية 100X [7].

اختبار المذنب Comet assay:

يستخدم هذا الاختبار لقياس مقدار الضرر في الـ DNA، استخدمت العدة (KIT) oxiselect comet assay Kit لاجراء هذا الاختبار [8] كما استخدم برنامج محوسب (Softwear) لاجراء قياسات مختلفة لكل عينة.

تحضير الكواشف Reagent preparation

يجب ان تكون الكواشف المستخدمة المحضرة عليها علامات تميزها عن غيرها ويتم اعدادها قبل الاستخدام مباشرة، ويتوجب ارتداء قفازات وبدلات المختبر عند حمل اي مادة كاشفة.

1XPBS-1: مزج 10XPBS مع الماء الايوني لتجهيز هذا المركب 1XPBS وحفظت في درجة حرارة الغرفة (10XPBS مجهز من شركة Trervigen).

2- Lysis solution (محلول التحلل): لتجهيز اكثر من عشرة شرائح زجاجية (slides)(نموذجين في كل شريحه).

أ- محلول تحليل الخلايا Lysis solution (40 ml).

ب- DMSO (اختياري) 4 مل.

تم تبريد على درجة 4 درجة مئوية او في الثلج لمدة 20 دقيقة على الاقل قبل الاستخدام، اما اضافة DMSO فتكون اختيارية وهي فقط في حالة الخلايا الحاوية على مادة الحديد (hem) (كالدم او الانسجه).

3- هلام المذنب(Comet LMAgarose): يحضر الهلام الخاص بالفحص وهو يكون صالح للاستخدام مرة واحدة عند اذابته ويتم اذابة هذا الهلام بوضع العلبة في حمام مائي من 90-100 درجة مئوية لمدة خمس دقائق او حتى ذوبان الهلام مع ازالة غطاء العلبة من اجل السماح للهلام بالتمدد نتيجة الحرارة بعد ذلك تم وضع الهلام في حمام مائي 37 درجة مئوية لخفض درجة حرارته وحفظ على هذه الدرجة لحين اتمام تحضير العينة.

4- محلول التصبيغ (SYBER® green staining solution): ان الكمية المذابة المخزونة من هذه المادة تبقى صالحة للاستخدام لعدة اسابيع إذا ما خزنت على درجة 4 درجة مئوية في الظلام.

أ- 10000XSYPER Green مع 1µlDMSO

ب- المحلول المنظم TE pH 7.5 ml

5-محلول منع التلاشي (اختياري): يحضر في حالة حدوث تلاشي(اختفاء) في العينات،نمزج 500 mg mlPhenulenedi aminedihydro chloride مع 4.5 ml 1X PBS حتى الذوبان في انبوبة بحجم 10.

6- محلول فك التحلزن القاعدي (pH > 13 Alkaline unwinding solution)

عند تحضير هذا المحلول يتوجب الحذر وارتداء القفازات. في كل50 مل من هذا المحلول يوجد NaOH 0.4 gm (حبيبات) و 250 µl mMEDTA 200 و49.75 ml dH_2O، يحرك حتى اتمام عملية الذوبان. ترتفع درجة حرارة المحلول عند التحضير لذلك يترك حتى يكون بدرجة حرارة الغرفة قبل الاستخدام.

7- تحضير محلول الترحيل الكهربائي القاعدي لاختبار المذنب (نظام ES).

نحضر كمية مخزونة من هذا المحلول (Stoke) وكالآتي: لتحضير 1 لتر من محلول الترحيل الكهربائي NaOH 8g مسحوق 500 mM EDTA pH 8 2ml ، dH_2O.(بعد ذوبان NaOH تضاف الى 1l) وبعد ذلك يحفظ في التبريد 4 درجة مئوية.

بروتوكول الاختبار Assay protocol

ان ظروف الترحيل الكهربائي هي من يحدد حساسية الاختبار، فإن اختبار المذنب العادي سوف يحدد التحطم في السلسلة المزدوجة للـDNA، اما اختبار المذنب القاعدي فإنه سيحدد التحطم في السلاسل المزدوجه او المفرده وكذلك غالبية المواقع في القواعد والمركبات الاخرى في DNA مثل(Phosphoglycols , Phosphotriesters).

اختبار المذنب القاعدي Comet AssayAlkaline :

1- تحضير محلول التحلل ويبرد على درجة 4 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة قبل الاستخدام.

2- اذابة الهلام في بيكر بالماء الغلي لمدة 5 دقائق وبعد ذلك يوضع في حمام مائي على درجة 37 درجة مئوية قبل 20 دقيقة من العمل (قد تكون درجة الهلام حرجة او قد تصاب الخلايا بصمة الحرارة).

3- مزجت الخلايا بتركيز $1 * 10^5$ /ml مع الهلام الذائب في درجة حرارة 37 درجة مئوية وبنسبة 1:10 (V/V) وسحبت مباشرة بالماصة(pipette) الى شريحة المذنب واذا كان من الضروري نستخدم المساحة الجانبية للفوهة البلاستيكية للماصة لنشر الهلام والخلايا فوق مساحة العينة في الشريحة للتأكد من تغطية كافة مساحة العينة واذا لم تتوزع بشكل متساوي ندفئ الشريحة بدرجة 37 درجة مئوية قبل اكمال التطبيق.

4- في حالة العمل مع عدة عينات نقسم الهلام في قناني او انابيب مدفأة 37 درجة مئوية وأضافة الخلايا ونمزج بلطف بطريقة التقليب وننشر 50 µl في مساحة العينة .

ونضع العينات في سطح مستوي ومضلم على درجة 4 م (في الثلاجة) لمدة 10 دقائق، تظهر حلقة واضحة بقطر 0.5mm في حافة المساحة المحددة للعينة، ان زيادة وقت التبلور الى 30 دقيقة يزيد من التصاق العينات في حالة الرطوبه العاليه.

5- غمرت العينات في محلول التحلل بدرجة 4 درجة مئوية لمدة 30 – 60 دقيقة ومن اجل زيادة حساسية الاختبار يمكن استمرار مدة الحضن بنفس الدرجة لمدة ليلة كاملة.

6- ازيل المحلول الزائد من العينة وتم غمره بمحلول منع الالتفاف القاعدي على ان يحضر قبل الاستخدام مباشرة(يجب ارتداء القفازات عند تحضير او حمل هذا المحلول).

7- استمر الغمر بالمحلول السابق لمدة 20دقيقة في درجة حرارة الغرفة او لمدة ساعة واحدة في درجة 4 درجة مئوية وفي الظلام.

8- لاجراء اختبار المذنب ES-unit(Comet Assay) اضف 850 مل بدرجة 4 درجة مئوية من محلول الترحيل الكهربائي القاعدي، ثم نقل النموذج الى الترحيل الكهربائي (تكون جهة الشريحة المعلمة بأتجاه القطب السالب) وتغطى بالغطاء الخاص ونضبط الجهاز على 21v لمدة 30 دقيقة.

9- ازيل محلول الترحيل الكهربائي الزائد بلطف وغمرت العينة بـ dH2O لمدة خمس دقائق وكررت العملية مرتين ثم غمر في محلول كحولي 70% لمدة خمس دقائق.

10-جفف النموذج في درجة 37 درجة مئوية لمدة 10-15 دقيقة، التجفيف يجعل الخلايا في مستوى واحد مما يسهل عملة مراقبتها، خزنت النماذج في درجة حرارة الغرفة مع التجفيف المسبق لاجراء القياسات في هذه المرحلة.

11- وضع 100 مل من صبغة SYBR Green في كل دائرة من الاكروز الجاف وصبغت لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في الظلام، رفع النموذج برفق لأزالة الصبغة الزائدة وشطف بالماء لمدة قليلة ثم سمح للنموذج ان يجف بشكل كامل في درجة 37 درجة مئوية.

12- وضع النموذج في المجهر الومضي (Fluorescence) (ان الانبعاث /الاثارة القصوى للصبغة هي 522 /496 كحد اقصى).

ان مرشح الوميض يكون كافي الاجراء الاختبار، يمكن اجراء خمسين قياس مختلف في هذا الاختبار، نقيس من النسبة التالية L/W دليل المذنب المدى 1.2-2.0 يشير إلى ان مستوى الضرر قليل LD low DNA (damage) ، 2.1-3.0 يعتبر متوسط (MD) و اكثر من 3 يعد عالي (HD) [7 و 5].

التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات احصائيا باستعمال البرنامج SAS– Statistical Analysis System [14] للمقارنة بين مجموعة الاغنام المصابة بالطفيليات الداخلية عن مثيلاتها التي كان اختبارها سالب للاصابة بالطفيليات في صفات الشكل المذنب (Comet assay).

استعمل الانموذج الرياضي الاول للمقارنة بين مجموعة الاغنام المصابة بالطفيليات الداخلية عن مثيلاتها التي كان اختبارها سالب للإصابة بالطفيليات في صفات الشكل المذنب (Comet assay).

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijkl}$$

Ai: الاصابة بالطفيليات الداخلية (مصابة ، سليمة)، أما بقية الرموز في هذا الانموذج فهي للتعديل لتسلسل الدورة الانتاجية (P_j) ونوع الولادة (T_k).

كما استعمل الانموذج الرياضي الثاني لدراسة تأثير نوع الطفيلي في قياسات الشكل المذنب (Comet assay) لمجموعة الاغنام المصابة بالطفيليات الداخلية.

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijkl}$$

Ai: نوع الطفيلي الداخلي (ثلاث مجاميع وهي السيطرة و Anaplasma-A و*Babesi*-B و AB فضلا عن Control)، والرموز في هذا الانموذج فهي كما وردت في النماذج الرياضية سابقة الذكر.

النتائج والمناقشة

تأثير الاصابة بالطفيليات الداخلية في انتاج الحليب ومكوناته لعينة الاغنام المدروسة

يظهر من الجدول (1) تأثير الاصابة بالطفيليات الداخلية في انتاج الحليب ومكوناته، وقد كانت الفروق معنوية بين النعاج المصابة والسليمة فيما يخص انتاج الحليب اليومي (0.961 ± 0.07 و 0.802 ± 0.02 كغم) والكلي (109.39 ± 7.94 و 90.29 ± 8.56 كغم) خلال موسم الدراسة، وقد يعزى سبب ذلك الى تأثير الاصابة بالطفيليات الداخلية في حيوية الحيوان وكمية العلف المستهلك مما ينعكس على كمية الحليب اليومية والكلية المنتجة. بينما لم يتأثر طول موسم الحليب بالإصابة بالطفيليات الداخلية وقد بلغ معدله 113.83 ± 4.78 و 112.59 ± 5.02 يوم للمجموعين السليمة والمصابة على التوالي. أن نسبة البروتين في الحليب تنخفض معنويا اثر الاصابة بالطفيليات الداخلية المختلفة، وبلغت نسبة البروتين 3.97 ± 0.04% في حليب النعاج السليمة، في حين كانت 3.54 ± 0.04 % في حليب مثيلاتها المصابة بالطفيليات الداخلية، كما تأثرت نسبة المواد الصلبة الكلية معنويا بالإصابة بالطفيليات الداخلية، ولصالح المجموعة السليمة، إذ كانت نسبة هذه المواد 8.34 ± 0.67 و 9.66 ± 0.07% في حليب النعاج السليمة والمصابة على التوالي. أن هذه النتيجة انعكاس واضح للأعراض المرافقة للإصابة بالطفيليات، أذ أشار عبد الرحمن[2] الى ارتفاع درجة الحرارة وفقدان الشهية والضعف العام وفقر الدم والإسهال لدى الحملان المصابة تجريبيا بالبيبيزيا كما ذكر Ndungo وزملاؤه [12] الى حدوث فقر الدم عند الإصابة الحادة بالأنابلازما وحدوث فقر الدم يعد أبرز عوائق التحسين لإنتاج اللحم والحليب في المناطق الموبوءة، كما ان الاصابة بأحد انواع الانابلازما أدى الى حدوث ارتفاع في درجات الحرارة بصورة متقطعة ثم ظهور أعراض فقر الدم مصحوبة بإمساك مزمن نتيجة عسر الهضم [3]. من ناحية اخرى لم تتأثر مكونات الحليب او صفاته الاخرى اثر الاصابة بالطفيليات الداخلية وهي نسبة الدهن واللاكتوز والرماد والاس الهيدروجيني (الجدول 1).

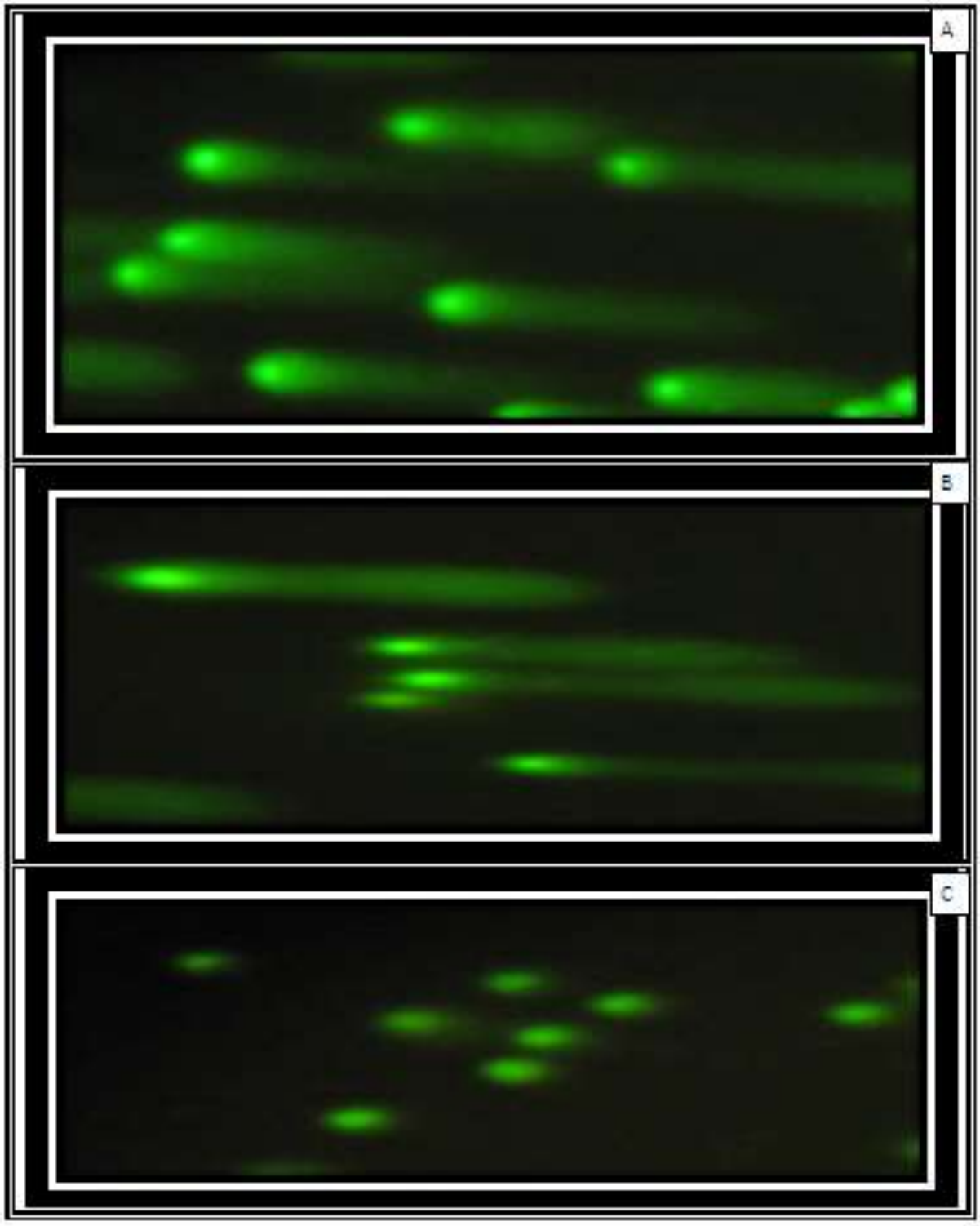
الجدول (1) متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي ومستوى المعنوية لتأثير الاصابة بالطفيليات الداخلية في انتاج الحليب ومكوناته.

الصفة	المتوسط ± الخطأ القياسي		مستوى المعنوية
	سليمة	مصابة	
انتاج الحليب اليومي (كغم)	a 0.07 ± 0.961	b 0.02 ± 0.802	*
انتاج الحليب الكلي (كغم)	a 7.94 ± 109.39	b 8.56 ± 90.29	*
طول موسم الحليب (يوم)	a 4.78 ± 113.83	a 5.02 ± 112.59	NS
البروتين (%)	a 0.04 ± 3.97	b 0.04 ± 3.54	*
الدهن (%)	a 0.52 ± 7.12	a 0.38 ± 7.31	NS
المواد الصلبة غير الدهني(%)	b 0.67 ± 8.34	a 0.07 ± 9.66	*
اللاكتوز (%)	a 0.16 ± 5.40	a 0.23 ± 5.29	NS
الرماد (%)	a 0.06 ± 0.788	a 0.08 ± 0.792	NS
الاس الهيدروجيني (PH)	a 0.04 ± 6.83	a 0.02 ± 6.79	NS
المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها. * ($P\leq0.05$) ، NS: غير معنوي.			

تأثير الاصابة بالطفيليات الداخلية في صفات الـ Comet assay

يظهر في الشكل (1) تأثير الإصابة الطفيلية في شكل خلايا الدم البيضاء كما يلاحظ من الجدول (2) تأثير الاصابة بالطفيليات الداخلية في صفات الـ Comet assay، ويتضح أن الصفات المتمثلة بكل من Comet length و Comet height و Head diameter لم تتأثر معنويا بالإصابة بالطفيليات الداخلية أي ان الفروق لم تكن معنوية بين النعاج السليمة ومثيلاتها المصابة لهذه الصفات. بينما كانت الفروق عالية المعنوية بين النعاج السليمة والنعاج المصابة في صفات شكل المذنب والمتمثلة بكل من Comet area و intensity Comet و Head area و Head intensity و% DNA in Head و Tail length و Tail intensity و Tail in moment و Olive moment ، بينما كانت الفروق معنوية ($P\leq0.05$) فيما يخص صفة Tail area و% DNA in Tail ، وفي جميع هذه المعالم كان الزيادة في معدلاتها لدى النعاج المصابة بالطفيليات الداخلية موازنة على مثيلاتها السليمة، وعند ملاحظة % DNA in Head و% DNA in Tail نجد ان معدلاتها كانت 99.14 ± 0.21 و 0.852 ± 0.207 في النعاج السليمة في حين بلغت 84.89 ± 2.12 و 15.09 ± 0.211 في مثيلاتها المصابة بالطفيليات الداخلية قي عينة الاغنام العواسي المدروسة.

يتضح من الجدول (2) أن الفروق بين الاغنام السليمة والمصابة كانت عالية المعنوية فيما يخص نسبة الخلايا المصابة (%)، إذ بلغت النسبة 29.27 ± 0.41 و 86.86 ± 4.19 في كل منهما على التوالي. وقد أشار Ismail kucukkurt [10] الى حدوث ضرر في DNA الخلايا مرافق لحدوث الإصابة الطفيلية بالبيبيزيا في الماعز، وذلك بسبب أن جسم الحيوان المضيف ينتج جزيئات اوكسجين ونايتروجين تسمى اختصارا ROS (Reactive Oxygen Species) و RNS (Reactive Nitrogen Species) كأحدى وسائل الدفاع ضد الطفيليات وأن هذه الجزيئات تعمل على تحليل او تفسيخ جزيئات الكربوهيدرات والدهون والبروتينات وكذلك DNA، أذ تنتج عن أكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة مركبات عديدة (Lipid peroxidation (LP) products) منها مادة MDA (Malondialdehyde) وأن الإصابة بالطفيليات تكون مصحوبة بارتفاع في مستوى مادة MDA [15].



الشكل 1: شكل الخلايا:A. خلايا بشكل مذنب في حالة الاصابة بطفيلي البابيزيا B.خلايا بشكل المذنب في حالة الأصابة بطفيلي الأنابلازما C. خلايا سليمة لمجموعة السيطرة

الجدول (2) متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي ومستوى المعنوية لمجموعة السليمة والمجموعة المصابة بالطفيليات الداخلية في صفات الـ Comet assay.

الصفة	المتوسط ± الخطأ القياسي		مستوى المعنوية
	سليمة	مصابة	
Comet length	a 11.82 ± 259.57	a33.98 ± 652.81	NS
Comet height	a 8.54 ± 192.36	a 6.09 ± 205.08	NS
Comet area	b 3149.95± 51174.85	a 6408.74 ± 130624.59	**
intensity Comet	b152635.4 ± 2402365.88	395583.97 ± 7646515.54 a	**
Head diameter	a 8.54 ± 192.36	a 8.14 ± 183.46	NS
Head area	b 3149.95 ± 51173.85	a 8850.72 ± 112351.27	**
Head intensity	151396.3 ± 2379552.09 b	419008.30 ± 5544855.41 a	**
% DNA in Head	a 0.21 ± 99.14	b 2.12 ± 84.89	**
Tail length	b 11.20 ± 69.33	a 41.24 ± 419.35	**
Tail area	b 0.00 ± 1.00	a 18.432 ± 39.48	*
Tail intensity	b 5419.84 ± 22813.79	a 143760.85 ± 838000.68	**
% DNA in Tail	b 0.207 ± 0.852	a 0.211 ±15.09	*
Tail in moment	b 0.07 ± 0.295	a 9.49 ± 58.36	**
Olive moment	b 0.19 ± 0.793	a 5.54 ± 38.02	**
نسبة الخلايا المصابة (%)	b 0.41 ± 29.27	a 4.19 ± 86.86	**

* ($P\leq0.05$)، ** ($P\leq0.01$) ، NS: غير معنوي.

المصادر

1- **العماري، فراس عوده خضير. 2008.** دراسة'في وبائية بعض الأمراض المنقوله القراد(داء الثايليريا، البابيزيا.الأنابلازما) في أغنام مجزرة كربلاء . رسالة ماجستير.كلية الطب البيطري.جامعة بغداد.

2- **عبد الرحمن،ندى حاتم.1986.** عزل طفيلي Babesia motasi ودراسة بعض التغيرات السريرية والمرضية في الأغنام المخمجة.رسالة ماجستير في كلية الطب البيطري . جامعة بغداد.

3- **عطيفي،يحيى زكريا.1996.**الطفيليات البيطرية . جامعة عمر المختار.

4- **Adejinmi, J.O; Sadiq, N.A; Fashanu, S.O; Lasisi, O.T. and Ekundayo, S.2004.** Studiesn on the blood parasites of sheep in Ibadan, Nigeria. African.J.biomed.RES. vol.7,(1), p: 41-43.

5- **AL-Jewari ,H.S.J. 2010**. In vitro cytotoxic Activity of the pathogenic Escherichia Coliagainst for leukemic cell lines. A thesis Ph. D. In Genetic Engineering Biotechnology for post Graduate studies ,University of Baghdad ,Iraq.

6- **Aktas, M., Altay, K. and Dumanll, N. 2006.** Determination of prevalence and risk factors for infection with B *abesia ovis* in small ruminants from turkey by polymerase chain reaction. ParasitologyResearch

7- **Collins,A.R.,Harrington,v.;Drew,J.and Melvin, R. 2003.**Nutritional Modulation of DNA repairs in ahuman Intervention Study. Carcinogenesis.24,511-515.

8- **De Boeck, M.; Touil, N.; De Visscher, G.; Vande, P.A. and Kirsch–Volders,M. 2000.** Validation and implementation of an internal standard in comet assay. Mutat.Res.469, 181-197.

9- **FAO. 1984.** Ticks and tick-borne disease control, A practical field manual. Volume11., FAW, Rome.

10- **Ismail kucukkrt, I. Hakki cigerci, Sinan ince, Esma kozan, Ismail aytekin, Abdullah eryavuz A. Fatih fidan**. **2014.** The Effects of Babesiosis on Oxidative Stress and DNA Damage in Anatolian Black Goats Naturally Infected with Babesia ovis, Iranian J Parasitol: Vol. 9, No. 1, Jan -Mar 2014, pp.90-98.

11- **Masake, R. and Muoke, A. 2000 .** Blood parasitic diseases and specific immune responses. (ILRI),P.O.Box30709,Naivobi,Kenya.

12- **Ndungu, L.W; Aguirre, C; Rurangirwa, F.R; Mcelwain, T.F; Mcguire, T.C; Knowles, D.P; Palmer, G. 1995.** Detection of anaplasma ovis infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition Enzyme-linked Immunosorbent Assay.J.Clin.Microbiol.,33(3),p:675-679.

13- **13-Radostites, O.M; Blood, D.C; and Gay, C.C. 1994.** Veterinary Mid-icine Atextbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats, and Horses., 7 ed., Bailliere Tindall.

14-SAS. 2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.

15-Serarslan G, Yılmaz HR. and Sögüt S. 2005. Serum anti-oxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. Clin. Exp Dermatol. 30: 267-71.

16-Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175:184 –191.