نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۶، پاییز ۱۳۹۱

تأثیر غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم بر رها شدن و عدم رها شدن اسپوروزوئیت های *Cryptosporidium baileyi* در آزمایشگاه

• **منصور بنانی** (نویسنده مسئول)
دانشیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
• **حبیب اله دادرس**
استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز
• **غلامرضا مؤذنی جولا** • **غلامرضا کریمی** • **محمدرضا افخم نیا و لادن مخبرالصفا**
اعضای هیأت علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
تاریخ دریافت: مهر ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: تیر ماه ۱۳۹۱
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۹۵۵۸۳۴
Email: m.banani@rvsri.ir

چکیده

از هیپو کلریت سدیم به منظور ضد عفونی نمودن انگل کریپتوسپوریدیوم در برخی از محیط های آلوده به این انگل و همین طور در کارهای تحقیقاتی به منظور پاک سازی و خالص نمودن آن از باکتری ها و آماده نمودن آن برای آزاد سازی اسپوروزوئیت ها، استفاده شده است. هدف از اجرای این مطالعه تعیین تأثیر آزمایشگاهی ماده ضدعفونی کننده هیپو کلریت سدیم بر روی مرحله حیاتی رها شدن اسپوروزوئیت های انگل کریپتوسپوریدیوم بیله ای بود. بدین منظور هیپوکلریت تجاری معادل هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و در غلظت ها و دماهای مختلف به کار رفت. اووسیست های کریپتوسپوریدیوم بیله ای از بورس فابریسیو س جوجه های گوشتی ۳۰ روزه یک مرغداری در اطراف شیراز جدا سازی و شناسایی گردید. اووسیست های مذکور در جوجه های حساس دو روزه تکثیر و با روش تعدیل یافته محلول شکر شیتر خالص گردید. اووسیست ها با غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم ۵ در صد در دما و زمانهای متفاوت مجاور گردید. پس از شستشو، اووسیست ها در معرض مایع آزاد کننده اسپوروزئیت مناسب قرار گرفتند و آزاد سازی و تحرک اسپوروزوئیت ها با کمک میکروسکوپ نوری مورد مشاهده قرار گرفت. تأثیر کامل در ممانعت از رها سازی اسپوروزوئیت ها در غلظت ۵ و۲/۵ در صد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه مشاهده گردید. و عدم تأثیر کامل در غلظت ۱/۲۵ در صد و دمای ۴ درجه سانتی گراد مشاهده شد. در سایر موارد هم درجاتی از ممانعت از آزاد سازی اسپوروزوئیت ها دیده شد. با توجه به نتایج، می توان از غلظت ۲۵ درصد هیپوکلریت تجاری معادل ۱ درصد هیپوکلریت سدیم در دمای ۴ درجه و مدت ۱۵-۱۰ دقیقه به منظور خالص سازی و استریل نمودن اووسیست ها و افزایش درصد باز شدن اووسیست ها در روش های رهاسازی اسپوروزوئیت در آزمایشگاه استفاده نمود.

کلمات کلیدی: ***Cryptosporidium baileyi***، اووسیست، هیپوکلریت سدیم، رها شدن اسپوروزوئیت ها

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 96 pp: 1-6

Efficacy of different concentrations of sodium hypochlorite on the *in vitro* excystation of sporozoites of *Cryptosporidium baileyi*

By: Banani, M. Associate Professor of Razi Vaccine and Sorum Research Institute (Corresponding Author; Tel: +989123955835), Dadras H. Professor of Veterinarty Faculty, Shiraz University. Moazeni Jula Gh. Karimi Gh. Afkhamnia M. and Mokhber L. Scientific Members of Razi Vaccine and Serum Research Institue Karaj, Iran.

Sodium hypochlorite has been used for disinfecting of Cryptosporidium in some contaminated environments by this parasite and also in laboratory works it has been used for the purification of the parasite from bacteria and as a treatment for facilitating of releasing the sporozoites of Cryptosporidium (excystation). The excystation is a critical stage of life cycle of the parasite. The purpose of this study was to determine the efficacy of sodium hypochlorite on the laboratory excystation of sporozoites of *Cryptosporidium baileyi*. *C. baileyi* oocysts have been isolated and identified from the bursa of fabricus of naturally infected 30- day- old broiler chickens in Shiraz area. The oocysts were propagated in sensitive 2-day-old chicks and purified by modified sheater's sugar flotation method. Oocysts were exposed to various concentrations of bleach and incubated at various temperatures for 15 min prior to being washed by centrifuging. Then the oocysts were exposed to the appropriate excystation fluid and releasing the sporozoites were observed by light microscopy. Complete excystation inhibition was seen by 2.5% and 5% Sodium hypochlorite at 37 $^{\circ}$ C for 15 min. Treatment of oocysts with 1.25% Sodium hypochlorite at 4 $^{\circ}$ C had no effect on laboratory excystation. In other cases there were some degree of excystation inhibition. The results indicate that 25% commercial bleach or 1.25% Sodium hypochlorite at 4 $^{\circ}$ C for 10-15 min may be suitable for purification and sterilization of oocysts and also this treatment facilitates and enhances *in vitro* sporozoite releasing from the oocysts.

Key words: *Cryptosporidium baileyi*, Oocyst, Sodium hypochlorite, Excystation

مقدمه

انگـل کریپتوسپوریدیوم یک انگل داخـل میکروویلوس سلول های مخاطی دستگـاه تنفس، گوارش و ادراری مهـره داران می باشد. بیشتر عفونت هـای بالینی در انسان و حیوانات پستاندار ناشی از *C.parvum* اسـت؛ اگرچه ایجاد عفونت توسط ارگانیسـم شبیه *C.baileyi* در بیمار مبتـلا به نقص دستگـاه ایمنی هم گزارش شده اسـت(۱۰، ۱۳). انتقال زئونوتیـک از حیوان به انسان از راه های سرایت عفونت انسان است(۱۳). آلودگـی کریپتوسپوریدیایی در دام و طیـور کشور طی مقالات متعددی بـه اثبات رسیده اسـت(۱، ۲، ۳، ۴ ،۵ ، ۱۴). در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۶۰ وجود انگل در یک خروس بومی توسط قراگوزلو و خداشناس گزارش گردید(۱۴). درآن سال هنوز گونه *C.baileyi* توسط Current و همکـاران (۷) به عنوان یـک گونه جدید در طیور معرفی نشده بود. در گزارش نوری و همکاران (۱۳۷۳) گونه جدا شده از مرغداری های اطراف تهـران *C. meleagridis* تشخیص داده شد(۳). بنانی و همکاران برای اولین بار ابتلا جوجه های گوشتی به *C.baileyi* را گزارش کردند(۱، ۵) و آلودگی همزمان این انگل با چند پاتوژن طیور را اعلام نمودند(۱، ۶).

روش آزمایشگاهی بررسی اثر مواد و محیط های مختلف بر زنده مانی انگل کریپتوسپوریدیوم، با کمک آزاد سازی اسپوروزوئیت ها در آزمایشگاه انجـام می شود. در این آزمون ابتدا انگل را تحت شرایط خاص مورد نظر و یـا در مجاورت ماده ضد عفونی کننده مورد آزمایش قرار داده و سپس در محیـط مناسب برای ایجاد آزادسازی اسپوروزوئیت ها، ممانعت از این مرحلـه کلیدی در چرخه حیاتی انگل بررسـی می شود(۱۳،۸). هدف از ایـن مطالعه این بود کـه غلظت و دمای مناسـب هیپوکلریت سدیم که هیـچ گونه تأثیر منفی بر رهاشـدن اسپوروزوئیت های انگل *C.baileyi* جدا شده، نداشته باشد، مشخص گردد. زیرا هیپوکلریت سدیم در خالص سازی و استریل نمودن سوسپانسیون اووسیست ای انگل از باکتری های موجـود در مدفـوع به منظور کارهـای تحقیقاتی بعـدی از جمله تلقیح انگل بـه داخل تخم مرغ جنیـن دار کاربرد فـراوان دارد. از طرف دیگر اووسیسـت هـای انگـل کریپتوسپوریدیـوم نسبـت بـه بسیـاری از ضدعفونی‌کننده‌های رایج مقاوم هستند و استفاده از یک ماده ضدعفونی کننده مؤثر و ارزان جهت پاکسازی محیط های آلوده ضرورت دارد. هر چند با این روش آزمایشگاهی نمی توان از ضد عفونی شدن کامل انگل اطمینان حاصل نمود؛ ولی مشخص شدن غلظت و دمایی که به طور کامل مانع رها شدن اسپوروزوئیت های *C.baileyi* گردد، از این نقطه نظر حائز اهمیت می باشد.

مواد و روش کار

C.baileyi

اووسیسـت های *C.baileyi* از بورس های فابریسیوس جوجه های گوشتـی ۳۰ روزه یک مرغداری در اطراف شیـراز جداسازی و شناسایی شدنـد (۱، ۵، ۶). اووسیست ها در محلـول دی کرومات پتاسیم ۲/۵ در صد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شدند.

تکثیر و خالص سازی انگل

اووسیســت هــای مذکور به جوجه هــای حســاس دو روزه خورانده شــد و سپــس مدفوع جوجه ها که حــاوی اووسیست هــای تکثیر شده بــود، ابتدا در محلول کلرور سدیم اشبــاع مخلوط گردید و سوسپانسیون حاصــل، به مــدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گــراد و با دور g ۱۰۰۰ سانتریفــوژ شد. مایــع رویی که دارای غلظت بالایــی از اووسیست ها بود جمــع آوری و بــه آن آب مقطــر اضافه شــد و سانتریفــوژ گردید. برای خالــص ســازی نهایــی از باکتری ها و دبــری هــا، از روش تعدیل یافته شناورسازی با شکر Sheater توسط Current (۸) استفاده شد.

رهاسازی اسپوروزوئیت های انگل

پس از شستشو با کمک سانتریفوژ و PBS، اووسیست ها در مجاورت مایع آزادکننده اسپوروزوئیت (Excystation fluid) و در گرمخانه ۳۷ یــا ۳۹ درجه سانتی گــراد همراه با تکان دادن قــرار گرفتند. جستجوی میکروسکوپی تعلیق به منظور مشاهــده اسپوروزوئیت های متحرک رها شــده در فواصــل ۱۵ دقیقه صورت گرفت. آزادســازی اسپوروزایت ها به عنوان شاخــص آزمایشگاهی برای زنده مانی اووسیست ها در نظر گرفته شد. بدین منظور ابتدا چندین مایع آزادکننده اسپوروزوئیت مورد آزمایش قرار گرفت که شامل موارد زیر بودند:

۱- ابتدا محلول ۱ در صد تریپسین به مدت یک ساعت و سپس محلول ۲۰ در صد صفرای ماکیان در PBS

۲- ۲۰ در صد صفرای ماکیان در PBS به تنهایی

۳- نمک صفراوی سدیم توروگلیکو کولات (بدست آمده از گاو) ۲ در صد در PBS، به جای صفرای ماکیان در ترکیبات۱ و ۲ (۸، ۱۳).

بررسی تأثیر غلظت های متفاوت هیپوکلریت سدیم در پدماهای مختلف بر رها شدن اسپوروزوئیت ها

اووسیســت ها با غلظت هــای مختلف هیپوکلریــت سدیم در دما و زمــان هــای متفاوت مجاور شدنــد. در این مرحله ابتــدا اووسیست ها با غلظت هــای مختلف و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و در دما و زمان های متفاوت مجاور می شد. برای رقیق کردن هیپو کلریت سدیم PBS استفاده مــی شد. سپــس اووسیست ها کــه تعدادشان ۲×۱۰^{۵} عــدد بود پس از شستشــو در ۰/۵ میلــی لیتر مایع آزادکننــده اسپوروزوئیت مناسب قرار گرفتــه و در دمــای ۳۹ درجــه سانتی گراد نگهداری مــی شدند. پس از ۴۵ دقیقــه تعداد ۱۰۰ میدان میکروسکوپــی از نظر حضور اسپوروزوئیت متمرکــز مورد بررسی قــرار می گرفت. همزمان در ایــن آزمون در گروه اووسیســت های شاهد بــه جای هیپوکلریــت سدیــم از PBS استفاده می شد . به منظور شستشوی کامل هیپوکلریت سدیم ۴ مرتبه سانتریفیوژ بــا کمک PBS سرد (۴ درجه سانتی گــراد) و با دور g ×۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقــه انجام مــی گرفت و هر مرتبه مایــع روی دوز ریخته می شد. زنــده مانی اووسیســت ها با کمک روش رها ســازی اسپوروزوئیت ها در آزمایشگاه ارزیابی شده است، بدین صورت که رها شدن اسپوروزوئیت ها پس از طی شرایط خــاص آزمایشگاه به معنای زنده ماندن اووسیست ها ســت هر چند عدم رها شدن اسپوروزوئیت ها صد در صد به معنای عدم زنده‌مانی نمی باشد(۸ ، ۱۳).

آزمون آماری

از نرم افزار spss-۱۳ برای آنالیز داده ها استفاده شد. از آزمون های ناپارامتــری "کروسکال والیس" و "من ویتنی" برای آنالیز استفاده گردید. $p<۰/۰۵$ بــه عنوان سطــح معنی داری در نظر گرفتــه شد. لازم به ذکر اســت یک بــار با ثابت گرفتن غلظت, تاثیر دما و یــک بار با ثابت گرفتن دما، آزادسازی اسپوروزییت هــا در غلظت های مختلف مورد آزمون قرار گرفت.

نتایج

آزادسازی اسپوروزوئیت ها در محیط آزمایشگاه

سه ترکیــب زیر شامل ۱- ۲۰ در صد صفــرای ماکیان در تریپسین ورســن، ۲- مایع آزادکننده ۲ مرحله ای: ابتدا محلول ۱ در صد تریپسین بــه مدت یک ساعــت و سپس محلــول ۲۰ در صد صفــرای ماکیان در PBS و ۳- ۲۰ در صــد صفــرای ماکیان در PBS به تنهایی در آزادسازی اسپوروزوئیــت ها (شکل ۱) مؤثــر بودند، ولی استفاده از محلول ۲ درصد سدیم توروگلیکوکولات بی ثمر بوده است.

شروع آزادســازی پس از ۱۰ دقیقه نگهداری تعلیق اووسیست ها در گرمخانــه بود. در عرض ۴۵ تا ۶۰ دقیقه تعــداد قابل ملاحظه ای (بالای ۳۰ در صــد) از اووسیســت هــا باز می شدنــد و پــس از آن تقریباً ثابت مــی ماند. دماهــای ۳۷ یا ۳۹ درجه سانتی گراد هــر دو مؤثر بودند ولی در دمــای ۴ درجه سانتــی گراد رهاســازی در مجاور مایــع آزاد کننده اسپوروزوئیت اتفاق نمی افتاد.

نتایج تأثیر غلظت های متفاوت هیپوکلریت سدیم در دماهای مختلف بر رها شدن اسپوروزوئیت ها

هیپوکلریــت سدیــم موجب کاهش رهــا شــدن اسپوروزوئیت ها و وقفــه در این مرحله کلیدی و حیاتــی (excystation) (شکل ۱) انگل مــی شود. با استفــاده از آزمون کروسکال والیس در هــر یک از دماها به تفکیک، آزادســازی اسپوروزوئیت ها در غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم با یکدیگر تفاوت معنی دار نشان داد. $p=۰/۰۰۰$ جدول (۱)

در غلظت هــای پاییــن (۱/۲۵) آزادسازی اسپوروزوئیــت ها بیشتر است.

بــا استفــاده از آزمون مــن ویتنی نشان داده شد کــه در هر یک از غلظت ها به تفکیک آزاد سازی اسپوروزوئیت ها در دما های مختلف مورد بررســی با یکدیگر تفاوت معنی دار دارد. ($p < ۰/۰۵$) (در دمای ۴ درجه آزادسازی در هر یک از غلظت ها بیشتر و در دمای ۳۷ درجه کمتر بود.) جدول(۱).

در گروه شاهد به جای هیپوکلریت سدیم، اووسیست ابتدا در معرض PBS قــرار گرفتــه و سپس در مجــاورت مایع رهاکننــده اسپوروزوئیت قــرار می گرفتند. تنها مــوردی که از نظر رها شــدن اسپوروزوئیت ها با گــروه شاهد تفاوتی دیــده نمی شد، غلظت ۱/۲۵ درصد و دمای ۴ درجه سانتی گراد بود

بحث

در این مطالعــه تأثیر هیپوکلریت سدیم تجــاری در شرایط مختلف

(دمـا و غلظت) بر رهاسـازی و عدم رهاسـازی اسپوروزوئیت ها مطالعه گردیـد و نشان داده شد کـه در غلظت ۲/۵ درصـد و بالاتر و دمای بالا (۳۷ درجه سانتی گراد) ممانعت از رها سازی و در غلظت ۱/۲۵ در صد و پایین تر و دمای پایین (۴ درجه سانتی گراد) تسهیل در رهاسازی ایجاد مـی شود. غلظت ۱/۲۵ در صـد در دمای ۴ درجه سانتی گراد در مرحله حیاتی رها سازی اسپوروزوئیت ها انگل خللی ایجاد نمی کند و حتی آن را تسهیـل می نماید و از طرف دیگر مـی تواند باکتری های همراه انگل را از بیـن برده و اووسیست ها را جهت تلقیح به تخم مرغ و کشت سلول استریل و آماده نماید.

روش آزمایشگاهـی بررسـی اثر مواد و محیط هـای مختلف بر زنده مانی انگـل کریپتوسپوریدیوم، با کمک آزاد سـازی اسپوروزوئیت ها در آزمایشگاه انجام می شود. در این آزمون ابتدا انگل را تحت شرایط خاص مـورد نظر و یا در مجاورت مـاده ضد عفونی کننده مـورد آزمایش قرار داده و سپـس در محیط مناسب بـرای ایجاد آزادسازی اسپوروزوئیت ها، ممانعت از این مرحله کلیدی در چرخه حیاتی انگل بررسی می شود(۱۳). بـا وجود این بررسی زنـده مانی انگل از طریق تلقیح بـه موجود زنده یا کشت سلول روش مطمئن تـری می باشد(۱۸،۱۲). مشابه نتایج مطالعه حاضـر در خصـوص *C.baileyi*، در سایر تحقیقـات انجام شده بر روی *C.parvum* هـم مشاهده شده است که بـا استفاده از روش رها سازی اسپوروزوئیت ها، هیپوکلریت ۲/۸ در صد در دمای ۲۲ درجه به مدت ۳۰ دقیقـه و هیپوکلریت ۱ در صد در دمـای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه، به ترتیـب ۸۹ و ۶۹ در صد در کاهش عفونـت زایی *C.parvum* مؤثر بـوده اند(۱۳). با وجود این با آزمایـش در بدن موجود زنده، هیپوکلریت در مقابلـه با عفونت زایی انگل ناموفق بـوده است(۱۲، ۱۳، ۱۸). بدیهی اسـت اگر ماده ضدعفونی کننده به طـور کامل قادر به از بین بردن همه اووسیست ها نشود تعداد کم اووسیست ها هم به دلیل تکثیر و تزاید در داخل روده و سایر بافت های پوششی حیوان مورد آزمایش یا کشت سلول مناسب مـی تواننـد باعـث عفونت و بیمـاری شونـد. از سوی دیگـر رها شدن اسپوروزوئیت ها در بدن میزبـان حساس در مقایسه با آزمایشگاه ممکن اسـت با سهولت و به میزان خیلـی بیشتری انجام شود. در بررسی حاضر مؤثرترین غلظت و دما در ممانعت از رها شدن اسپوروزوئیت ها، ۵ و ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بود که هیچ گونه اسپوروزوئیتی مشاهده نگردید. به نظر می رسد که دما نیز فاکتور مهمی است زیرا در غلظت ۵ درصد ولی دمای ۲۵ درجه رهاشدن اسپوروزوئیت هـر چند بـه نسبت کمتر مشاهده گردید. دمـای ۳۷ درجه به تنهایی یا همـراه با برخی مواد ضدعفونی کننده رایـج در زمان یک ساعت و کمتر مانـع از رها شدن اسپوروزوئیت ها نشده اسـت(۱۳). Weir و همکاران تأثیـر ۹ ماده ضدعفونی کننده بر روی عفونـت زایی انگل ک. پاروم در کشـت سلـول بررسی نمودنـد و دریافتند که هیپوکلریـت ۶ در صد در دمـای اتاق مانـع عفونت زایی انگل نمی شـود (۱۸). در تحقیق دیگری Fayer نشـان داد که ۱۲۰ دقیقه مجاورت اووسیست های *C.parvum* بـا هیپوکلریت ۵ در صد در دمای ۲۱ درجه سانتی گراد در عفونت زایی انگـل در موش ها بی تأثیر است(۱۲). اووسیست های کریپتوسپوریدیوم در مقابـل مـواد ضدعفونـی کننـده رایـج که بـه راحتی ویـروس ها، باکتـری هـا و قـارچ ها را مـی کشنـد مقاومـت قابل توجهـی نشان می دهند. در یک بررسی ۹ ماده ضدعفونی کننده را به مدت ۳۰ دقیقه در غلیـظ تریـن میزان توصیه شده توسـط سازنده به کار بردنـد. این مواد هیـچ گونـه تأثیری بر زنـده مانی اووسیست هـا نداشتند یـا تاثیر آنها ناچیـز بود (۹). در گزارش هـای متعدد انجام شـده ۱۸ ماده شیمیایی ضدعفونی کننـده علیه *C.parvum* و ۷ ماده دیگـر علیه *C.baileyi* بی تاثیر بوده اند. از جمله آنها می توان از دتول، ساولن، کرئولین و لیزول نام برد (۱۳). از آنجا که داروی مناسب و موثری جهت پیشگیری و درمان انسان یا حیوان مبتلا به انگل وجود ندارد تا قادر به توقف تکثیر انگل در میزبان آلوده گردد. بنابراین کاربرد اقدامات بهداشتی از جمله ضد عفونی کردن محیط آلوده موثر ترین راه مبارزه با بیماری است (۹، ۱۳). در بین مـواد شیمیایی موثر علیه کریپتوسپوریدیوم می توان از ترکیبات مختلف هالوژنـه، آمونیاک، پر اکسیـد هیدروژن و ازون نام برد ولی سمی بودن و گران بودن آنها در دوز موثر از موانع کاربرد عملی آنهاست. در یک گزارش هم گاز فرمالین به مدت ۲۴ ساعت بی تاثیر بوده است(۱۳).

اووسیست هـای کریپتوسپوریدیوم در مقابل عوامل فیزیکی مختلف نیـز مقاومت نسبـی دارند. با وجود این دمای ۴۵ درجـه سانتی گراد به مـدت ۲۰ دقیقه، ۶۰ درجـه سانتی گراد به مدت ۶ دقیقه و ۷۲/۴ درجه سانتـی گراد به مدت ۱ دقیقه در کاهـش عفونت زایی و یا نابودی کامل اووسیسـت ها موثر مـی باشند (۱۱، ۱۳). اووسیست هـای انگل قادرند دماهـای صفر درجه و زیر صفر درجه تا ۲۰ – سانتی گراد را ساعت ها و روزها تحمل نمایند اما در ۷۰ – سانتی گراد یا پایین تر از بین می روند. خشکی و اشعه ماوراء بنفش نیز در نابودی اووسیست ها موثرند (۱۳).

نتایـج به دسـت آمده در ایـن بررسی و سایر تحقیقـات موثر بودن مـاده هیپوکلریـت سدیم در ممانعـت از رها شـدن اسپوروزوئیت ها در غلظت های ۲/۵ درصد و بالاتر را در دماهای ۲۵ درجه و بالاتر (جدول ۱) نشـان داده است ولی با تحقیقات انجام شده در میزبان حساس مشخص شـده است که این ماده به تنهایی قـادر به ضد عفونی کامل انگل نیست (۱۲، ۱۳، ۱۸)؛ بنابـر ایـن توصیه می شود که در مـوارد استفاده از این مـاده حتماً از دمای ۴۵ درجه وبالاتر، بـه صورت آب داغ یا شعله افکنی و همیـن طور خشـک نگه داشتن مکـان به مدت ۱تـا ۴ روز و تاباندن اشعه ماورای بنفش هم استفاده گردد(۱۳). بدیهی است که پنهان ماندن اووسیسـت ها در لابه لای مواد آلـی ممکن است تاثیر این مواد را بکاهد بنابراین قبل از به کاربردن این روش ها تمیز بودن ظاهری سطوح الزامی می باشد. با توجه به اینکه غلظت های کمتر از ۲/۵ درصد حتی در ممانعت از رهایی اسپوروزوئیت ها موثر نیست، در عمل کاربرد هیپوکلریت سدیم در ضـد عفونی مکان ها محدود به محیط های کوچک می باشد. در یک گزارش از Hoerr در پی آلودگی و تلفات شدید در یک مزرعه نگهداری بلدرچیـن، آبخوری ها و دانخوری هـا و سایر ظروف فلزی با هیپوکلریت سدیـم تمیز شـده و سپس ۳ روز در معرض خورشیـد قرار گرفتند کف سیمانـی سالن ها هم تمیز شـده و با بستر تازه پوشانده می شدند. بدین ترتیب از عود بیماری جلوگیری به عمل آمد (۱۵). همانطور که در جدول (۱) مشاهـده می شـود هیپوکلریت سدیم ۱ درصـد موجب کاهش در رهایی اسپوروزوئیت های انگل نمی شود.

از ایـن غلظت بـه خوبی می تـوان در برخـی کارهـای تحقیقاتی استفـاده نمـود. کارنت جهت رها سـازی بهتـر اسپوروزوئیت ها غلظت

۱ درصد هیپوکلریت سدیم را در دمای ۴ درجه سانتی گراد و مدت ۱۰ دقیقه توصیه می کند (۸)، همین غلظت را در دمای ۲۳ درجه و مدت چند ثانیه برای خالص سازی اووسیست های *C.parvum* از باکتری ها به کاربرده است(۱۷). Ortega-Mora نیز غلظت ۱ درصد هیپوکلریت سدیم را در دمای ۴ درجه و مدت ۱۰ دقیقه به منظور خالص سازی انگل استفاده نموده است (۱۶). Fayer از غلظت ۰/۵۲۵ در صد در دمای ۴ درجه و به مدت ۸ دقیقه به منظور رها سازی بهتر اسپوروزوئیت ها استفاده نمود(۱۲). در یک تجربه دیگر؛ محققین این بررسی؛ اووسیست های استریل شده با کمک هیپوکلریت سدیم ۱ درصد در دمای ۴ درجه و مدت ۱۵-۱۰ را به تخم مرغ های جنین دار تلقیح نمودند و متعاقب آن زنده بودن جنین و عدم تکثیر هر گونه باکتری یا قارچ نشان دهنده موثر بودن این روش در استریل نمودن اووسیست ها بود (گزارش منتشر نشده؛ بنانی و همکاران). با توجه به نتایج بدست آمده در جدول (۱) و تجربیات سایر محققین (۸، ۱۲، ۱۶، ۱۷)، بخوبی می توان از غلظت ۲۵ درصد هیپوکلریت تجاری معادل ۱ درصد هیپوکلریت سدیم در دمای ۴ درجه و مدت ۱۵-۱۰ دقیقه به منظور خالص سازی و استریل نمودن اووسیست در موارد تلقیح اسپوروزوایت به کشت سلول و یا تخم مرغ جنین دار و همچنین افزایش درصد باز شدن اووسیست ها در روش های رهاسازی اسپوروزوئیت در آزمایشگاه استفاده نمود.

منابع مورد استفاده

۱- بنانی، منصور؛ دادرس، حبیب اله؛ خداکرم تفتی، عزیزاله و سجادی سید محمود. (۱۳۷۵) وضعیت ضایعات کریپتوسپوریدیایی در جوجه های گوشتی مبتلا به گامبورو اطراف شیراز. پژوهش و سازندگی. شماره ۳۲، پائیز. ص۱۰۳-۱۰۰.

۲- خداکرم تفتی، عزیزاله. (۱۳۷۲) بررسی پاتولوژیک بیماری مارک در تعدادی از مرغداری های تهران. پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای تخصصی آسیب شناسی دامپزشکی از دانشگاه تهران، شماره ۸.

۳- نوری، محمد؛ بزرگمهری فرد، محمد حسن؛ مصوری، نادر. (۱۳۷۳) بررسی کریپتوسپوریدیوز تنفسی و گوارشی در مرغداری های صنعتی اطراف تهران، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۴۹ ، ۱و۲ . ص ۹۷-۹۳.

4- Ahourai, P. , Ezzi, A., Gholami, M.R., Vandeyousefi, J. , Kargar, R. and Maalhagh, N. (1986) Cryptosporidium spp. In new born lambs in Iran. *Arch. Inst. Razi*, 36/37, IS.

5- Banani, M., Dadras, H., Moazeni-Jula, G., Hooshmand-Rad, P., (2000) Serologic incidence of Cryptosporidial infection in broiler flocks in Shiraz, Iran. *Archives of Razi Institute.* 51:95-102.

6- Banani, M., Pourbakhsh, S.A., Ezzi, A., Ardehali, M. and Jannati, M. (2002) Coinfection associated with naturally occurring cryptosporidiosis in broilers. *Archives of Razi Institute*. 53: 67-77.

7- Current, W.L. , Upton, S.J. and Hynes, T.B. (1986) The life cycle of *Crypotosporidium baileyi*. SP. (apicomplexa, cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. protozool.*, 33(2), 289296.

8- Current, W.L. (1990) *Techniques and Laboratory maintenance of cryptosporidium.* In: Dubey, J.P. , Speer, C.A. and Fayer, R. (Eds). Cryptosporidiosis of man and animals . PP. 31-49 (Boca Raton, FL, CRC press).

9- Current, W.L. (1997) *Cryptosporidiosis*. In: Calenek, B.W. , Barnes, H.J., Beard, C.W., NC Dougald and Saif, Y.M. (Eds). Diseases of Poultry, 10thed, (Lowa State Univ. press, Amess) PP: 883-890.

10- Ditrich, O., Palkavic,L., Sterba,J., Prokopic, J., loudova, J. and Giboda, M. (1990) The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. *Parasitology Res*. 77,44.

11- Fayer, R. , Speer, C.A. and Dubey, J.P. (1990) *General biology of cryptosporidium*, In: Cryptosporidiosis of man and animals, Dubey, J.P., Speer, C.A., and Fayer, R. , Eds, CRC press, Boca Raton, FL.

12- Fayer, R. (1995) Effect of sodium hypochlorite exposure on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts for neonatal BALB/c. *Appl. Environ. Microbiol*. 61(2):844-6.

13- 1992 Fayer, R. (1997) *Cryptosporidium and cryptosporidiosis.* CRC press., PP. 1-41, 43-64, 111-128.

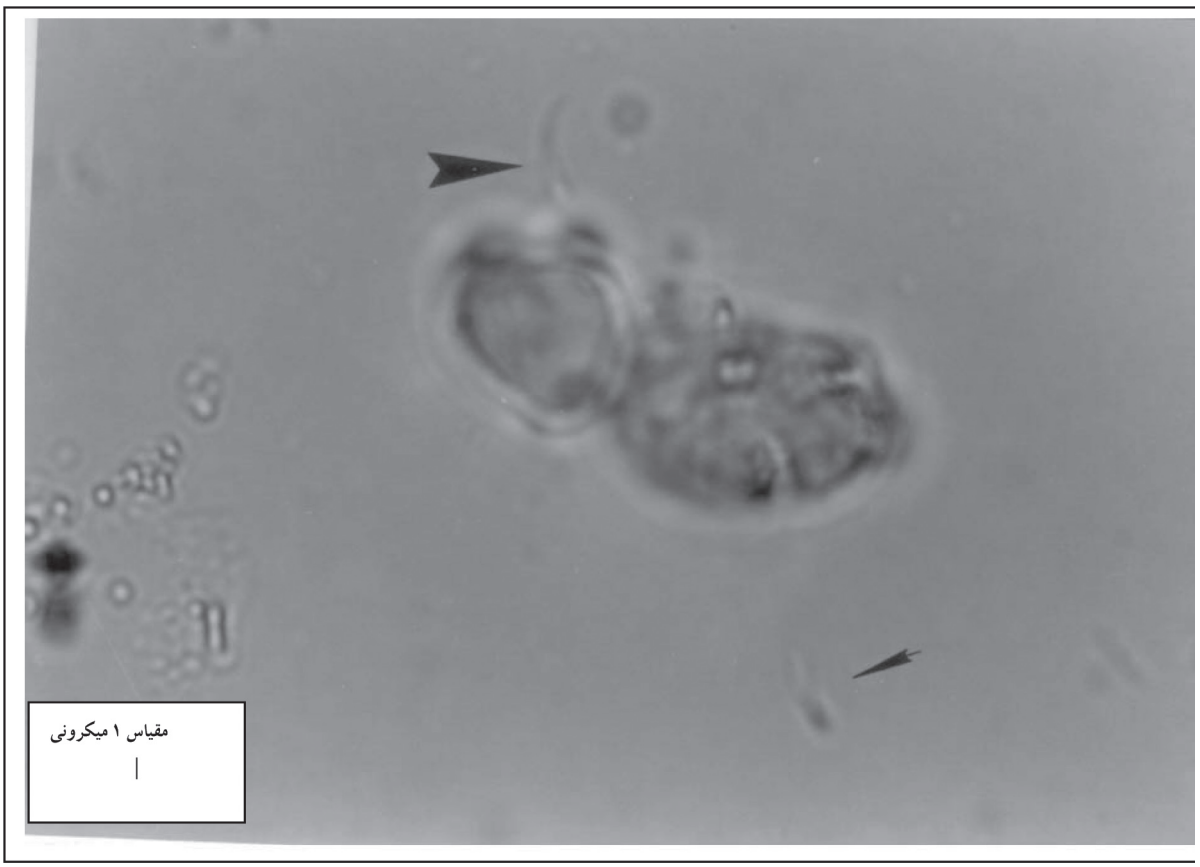
14- Gharagozlou, M.Y. and Khodashenas, M. (1985) Cryptosporidiosis in a native rooster with chronic proliferative enteritis. *Arch. , Vet.*, 17, 129-138.

15- Hoerr, F.J., Current, W.L. and Haynes. T.B. (1986) Fatal Cryptosporidiosis in quail. *Avain Dis*., 30, 421.

16- Ortega-Mora, L.M., Tronooso, J.M. , Roio-Vazquez, F.A. and Gomes-bautista, M., (1992) Evaluation of an improved method to purify *Cryptosporidium Parvum* Oocysts. *Res and Reviews in parasitol.*, 52(3-4). 127-130.

17- Ungar, B.L., Soave, R., Fayer, R. and Nash, T.E. (1986) Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to Cryptosporidium in immunocompetenent and immunocompromised persons. *J. Infect. Dis*. , 153, 570.

18- Weir, S.C., Pokorny, N. J., Carreno, R. A., Trevors, J. T., and Lee, H., (2002) Efficacy of common laboratory disinfectants on the infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cell culture. Appl. *Environ. Microbiol*.68(5):2576-9.



شکل ۱- اسپوروزوئیت های متحرک کریپتوسپوریدیوم (پیکان ها)، پس از تأثیر مایع رهاکننده اسپوروزوئیت، مشاهده می شوند. میکروسکوپ نوری

جدول ۱- تاثیر هیپوکلریت سدیم بر رها شدن اسپوروزوئیت های کریپتوسپوریدیوم ها در غلظت ها و دماهای مختلف در مدت زمان ۱۵ دقیقه مجاورت

غلظت هیپوکلریت سدیم (درصد)	دما (سانتی گراد)	زمان بر حسب دقیقه	تعداد اسپوروزوئیت های مشاهده شده در ۱۰۰ فیلد میکروسکوپی	تعداد اسپوروزوئیت های مشاهده شده در ۱۰۰ فیلد میکروسکوپی (گروه شاهد)
۵	۳۷	۱۵	۰	> ۲۰۰
۵	۲۵	۱۵	۲	> ۲۰۰
۵	۴	۱۵	۱۱	> ۲۰۰
۲/۵	۳۷	۱۵	۰	> ۲۰۰
۲/۵	۲۵	۱۵	۴	> ۲۰۰
۲/۵	۴	۱۵	۶۸	> ۲۰۰
۱/۲۵	۳۷	۱۵	۱۴	> ۲۰۰
۱/۲۵	۲۵	۱۵	۷۴	> ۲۰۰
۱/۲۵	۴	۱۵	> ۲۵۰	> ۲۰۰