نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۷ تابستان ۱۳۹۴
DOI: 10.22034/vj.2015.101270

تکثیر اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم بیله‌ای درتخم مرغ جنین‌دار عاری از پاتوژن‌های اختصاصی

• **منصور بنانی (نویسنده مسئول)**
عضو هیأت علمی و دانشیار بخش بیماری‌های باکتریایی، انگلی و قارچی طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
• **غلامرضا کریمی**
عضو هیأت علمی و استادیار بخش انگل‌شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۱۳۹۳
Email: m.banani@rvsri.ac.ir

چکیده

کریپتوسپوریدیوم بیله‌ای انگل تک یاخته ای و بیماری‌زای اختصاصی طیور است که قادر به رشد و تکثیر در سلول‌های پوششی دستگاه تنفسی، گوارشی و ادراری ماکیان می‌باشد و از صنعت ماکیان ایران هم جدا شده است. هدف از این تحقیق بررسی توانایی تکثیر این انگل در تخم مرغ جنین دار SPF بود. اووسیست های انگل با کمک پاساژ در جوجه و با استفاده از دی کرومات پتاسیم ۲/۵ در صد تکثیر و نگهداری شده بودند. ابتدا مراحل مختلف خالص نمودن اووسیست های انگل، از جمله روش تعدیل یافته شناور سازی با محلول شکر اشباع شیتر و افزودن هیپوکلریت سدیم انجام گرفت. سپس اووسیست ها با کمک محلول PBS شسته شدند و آنتی بیوتیک های مناسب اضافه گردید. دو نمونه شامل اووسیست های کامل و باز نشده و اووسیست‌های انگل پس از مجاورت با مایع آزاد کننده اسپوروزوئیت، به طور جداگانه در حفره آلانتوئیک تخم مرغ های SPF جنین دار ۱۰ روزه تلقیح شدند. سپس تخم مرغ ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز نگهداری و هر روز نور بینی گردید. نتایج نشان داد که هر دو نوع نمونه تلقیح شده منجر به رشد وتکثیر مراحل مختلف انگل در پرده کوریو آلانتوئیک و رها شدن اووسیست‌ها در مایع آلانتوئیک شده است. در تلقیح 1×10^{5} اووسیست، 1×10^{6} اووسیست از مایع آلانتوئیک یک تخم مرغ حاصل شد. با توجه به تکثیر مناسب کریپتوسپوریدیوم بیله ای در تخم مرغ های جنین دار، بنظر می رسد که در کارهای تحقیقاتی و در موارد نیاز به تکثیر محدود انگل، به خوبی می توان از تلقیح مستقیم اووسیست های دست نخورده انگل به تخم مرغ جنین دار SPF یا احتمالاً تخم جنین‌دار سایر پرندگان هم استفاده نمود.

کلمات کلیدی: تکثیر، اووسیست، کریپتوسپوریدیوم بیله‌ای، تخم مرغ جنین‌دار عاری از پاتوژن‌های اختصاصی

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 107 pp: 44-50

Propagation of *Cryptosporidium baileyi* in the chicken embryonated SPF eggs

By: Banani, M., (Corresponding Author), Associate Professor of Razi Vaccine & Serum Research Institute, Iran.
Karimi, Gh.R., Assistant Professor of Razi Vaccine & Serum Research Institute, Iran.

Received: January 2013 Accepted: July 2013

Emali: m.banani@rvsri.ac.ir

Cryptosporidium baileyi is one of the pathogen protozoa which is specific for poultry. *C. baileyi* is able to infect, grow and reproduce in epithelial cells of respiratory, gastrointestinal and urinary tracts of chickens. This parasite has been isolated from Iran poultry industry. The aim of this study was to propagate the parasite in the chicken embryonating SPF eggs. Oocysts were maintained by passage through chicks. Faeces containing excreted oocysts were mixed with 2.5% potassium dichromate (w/v) and stored at 4°C. Oocysts of *C. baileyi* were purified and cleaned by modification of Sheater's sugar flotation method and using 1% sodium hypochlorite solution. The oocysts were washed with PBS and appropriate antibiotics were added. Ten day- old embryonating SPF eggs were inoculated via allantoic cavity with 1x 105 oocysts or equivalent oocysts exposed by excystation fluid. The eggs inoculated by samples were incubated 7 days at 37 ºC and candled once a day. The results showed that both inoculated samples were able to grow and propagate in chorio allantoic membrane and release the oocysts in allantoic fluid. Inoculation of $1x10^5$ oocysts caused releasing of $1x10^6$ oocysts in the allantoic fluid of one egg. Upon the results the propagation of *C. baileyi* in the chicken embryonating SPF eggs can be used in research works. This method can be used for limited propagation of the parasite using the intact oocysts as inoculated samples in embryonating eggs of chickens or even other birds..

Key words: Propagation, oocyst, *Cryptosporidium baileyi*, chicken embryonating SPF egg

مقدمه

انگل کریپتوسپوریدیوم یک انگل داخل سلولی دستگاه گوارشی، تنفسی و ادراری مهره داران می‌باشد. علاوه بر اینکه این انگل می تواند از طریق اختلال فعالیت های طبیعی مخاطات مبتلا به تنهایی منجر به بیماری شود، اغلب زمینه ساز بروز و تشدید کننده سایر بیماری ها است و همچنین بیماری های دیگر و به خصوص آنها که تضعیف کننده سیستم ایمنی هستند باعث افزایش ابتلا به کریپتوسپوریدیوز می گردد (Current ;۱۹۹۷ Fayer، و همکاران ۱۹۹۰; Fayer ۱۹۹۷). در ماکیان دو گونه کریپتوسپوریدیوم ملـه اگریدیس و ک. بیله ای قادر به ایجاد عفونت و بیماری هستند. در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۶۰ وجود انگل در یک خروس بومی توسط قراگوزلو و خدا شناس گزارش گردید(Gharagozlou و Khodashenas ۱۹۸۵). در گزارش آن ها که بر اساس مطالعات هیستولوژی و مشاهده با میکروسکوپ الکترونی صورت گرفته بود، بررسی گونه انگل ممکن نبود و درآن سال هنوز گونه کریپتوسپوریدیوم بیله ای توسط Current و همکاران(۱۹۸۶) به عنوان یک گونه جدید در طیور معرفی نشده بود. در اکثر گزارش های مربوط به شیوع عفونت در نمونه های مدفوع طیور که با روش رنگ آمیزی زیل نیلسون انجام شده است، به گونه انگل اشاره نشده است. در یک مورد نیز ضمن بررسی هیستوپاتولوژیک، حضور انگل در بورس فابریسیوس مرغ تخم گذار مبتلا به بیماری مارک توسط Khodakaram Tafti و همکاران(۱۹۹۳) مشاهده شده است. در گزارش Noori و همکاران (۱۹۹۴) گونه جدا شده از مرغداری های اطراف تهران *Cryptosporidium meleagridis* تشخیص داده شد. Banani و همکاران برای اولین بار(۱۹۹۶, ۲۰۰۰) ابتلا جوجه های گوشتی به *C.baileyi* را گزارش کردند و آلودگی همزمان این انگل با چند پاتوژن طیور را اعلام نمودند(۱۹۹۶, ۲۰۰۲).

به منظور تکثیر انگل ک. بیله ای، روش متداول این است که اووسیست های بدست آمده از آلودگی های طبیعی را معمولاً به میزبان حساس یعنی جوجه ماکیان ۲ روزه می خورانند و سپس مدفوع جوجه ها در روزهای ۵ تا ۱۴ پس از آلودگی جمع آوری و با دی کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد مخلوط شده و در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می گردد. به منظور کارهای تحقیقاتی مختلف معمولاً خالص سازی اووسیست ها به درجات مختلف مورد نیاز می‌باشد (Banani و همکاران ۱۹۹۶;Banani، و همکاران ۲۰۰۰; Current ۱۹۹۰;Lindsay و همکاران ۱۹۸۸).

هدف از این تحقیق بررسی توانایی تکثیر این انگل در تخم مرغ جنین دار SPF بود. بدین منظور هم تخم مرغ انتخاب شده باید میزبان مناسبی باشد و هم نمونه انگل آماده شده برای تلقیح باید اولاً قابلیت تکثیر در تخم مرغ را داشته باشد و ثانیاً فاقد هر گونه آلودگی ثانویه باشد. رسیدن به هدف فوق مستلزم خالص نمودن انگل تکثیر شده در روده جوجه ها و سپس عاری نمودن کامل آن از آلودگی ها و در نهایت

آماده سازی کامل آن برای رشد و تکثیر در تخم مرغ بود.

مواد و روش کار

اووسیست های کریپتوسپوریدیوم بیله ای: منشأ این اووسیست ها از بورس های فابریسیوس جوجه‌های گوشتی ۳۰ روزه بود، که قبلاً از یک مرغداری در اطراف شیراز جداسازی و شناسایی شده بودند. اووسیست ها در محلول دی کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شدند(Banani و همکاران ۱۹۹۶).

تکثیر و خالص سازی انگل: اووسیست‌های مذکور در جوجه های حساس دو روزه تکثیر و با روش تعدیل یافته محلول شکر خالص گردید (Current ۱۹۹۰). در مرحله نهایی خالص سازی از روش افزودن هیپوکلریت سدیم و شستشو و سانتریفوژ با کمک PBS استریل استفاده می شد (Ortega-Mora و همکاران ۱۹۹۲).

شمارش اووسیست‌ها: به منظور شمارش اووسیست ها از لام همو سیتومتر (haemocytometer) استفاده گردید.

رها سازی اسپوروزوئیت‌های انگل: پس از شستشو با کمک سانتریفوژ و PBS، اووسیست‌های خالص شده در مجاورت مایع آزاد کننده اسپوروزوئیت (Excystation fluid) و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد همراه با تکان دادن قرار گرفتند. مایع آزاد کننده اسپوروزوئیت در این مطالعه شامل ابتدا محلول ۱ در صد تریپسین به مدت یک ساعت و سپس اضافه نمودن محلول ۲۰ در صد صفرای ماکیان در PBS بود. جستجوی میکروسکوپی تعلیق به منظور مشاهده اسپوروزوئیت های متحرک رها شده صورت گرفت. آزاد سازی اسپوروزوئیت ها به عنوان شاخص آزمایشگاهی برای زنده مانی اووسیست ها در نظر گرفته شده است(Banani و همکاران ۲۰۱۲)

تخم مرغ جنین‌دار SPF: تخم مرغ‌های جنین‌دار عاری از پاتوژن های اختصاصی(specific pathogen free) از کشور آلمان (Valo, Lohmann, Cuxhaven,Germany) و در مؤسسه رازی تهیه شده بود.

تکثیر در تخم مرغ جنین دار SPF: به منظور تکثیر انگل در تخم مرغ جنین دار دو نمونه تلقیح گردید: الف) اووسیست های خالص شده و کامل (بدون رها نمودن اسپوروزوئیت ها در آزمایشگاه) به میزان 1×10^5 اووسیست به هر تخم مرغ ب) اووسیست‌های خالص شده که در معرض مایع آزاد کننده اسپوروزوئیت، به همان میزان اووسیست اولیه برای هر تخم مرغ تزریق شده و برای هر نمونه تلقیح شده پنج تخم مرغ در نظر گرفته شد و این مرحله آزمایش یک بار دیگر هم به همین روش تکرار گردید.

در تمامی موارد تلقیح در تخم مرغ جنین دار، از تخم مرغ های SPF ۹ تا ۱۱ روزه و روش تلقیح داخل حفره آلانتوئیک استفاده می شد. پس از اطمینان از زنده بودن جنین ها با کمک نوربینی (candeling)، محل تزریق با محلول بتادین ضد عفونی می شد و ۰/۲ ml از نمونه های آماده شده در شرایط کاملاً استریل و در کنار شعله به داخل حفره آلانتوئیک تلقیح می گردید. به منظور ممانعت از آلودگی باکتریایی و قارچی به نمونه های مورد نظر آنتی بیوتیک های پنی سیلین، استرپتو مایسین و جنتامایسین به ترتیب به مقدار ۱۰۰۰۰ IU/ml، ۱۰ mg/ml و ۰/۲۵ mg/ml و ضد قارچ نیستاتین به میزان ۵۰۰۰ IU/ml افزوده می شد. پس از تلقیح، محل تزریق با کمک پارافین سرد شده مسدود می شد و تخم مرغ ها را در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و هر روز نوربینی می شدند. پس از ۷ روز با کمک قیچی پوسته ناحیه اتاقک هوایی برداشته شده و پس از ایجاد سوراخ در ناحیه کم عروق پرده کوریو آلانتوئیک، با کمک پیپت مایع آلانتوئیک تخلیه می گشت. از هر تخم مرغ ۱۵-۱۰ میلی لیتر مایع بدست می آمد. با مشاهده میکروسکوپی قطره‌ای از مایع جمع آوری شده در صورتی که اووسیست های انگل دیده می شد، مایع جمع آوری شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰ g سانتریفوژ می گردید و رسوب حاصل در دی کرومات پتاسیم ۵/۲ درصد نگهداری می‌شد (Current ۱۹۹۰).

نتایج

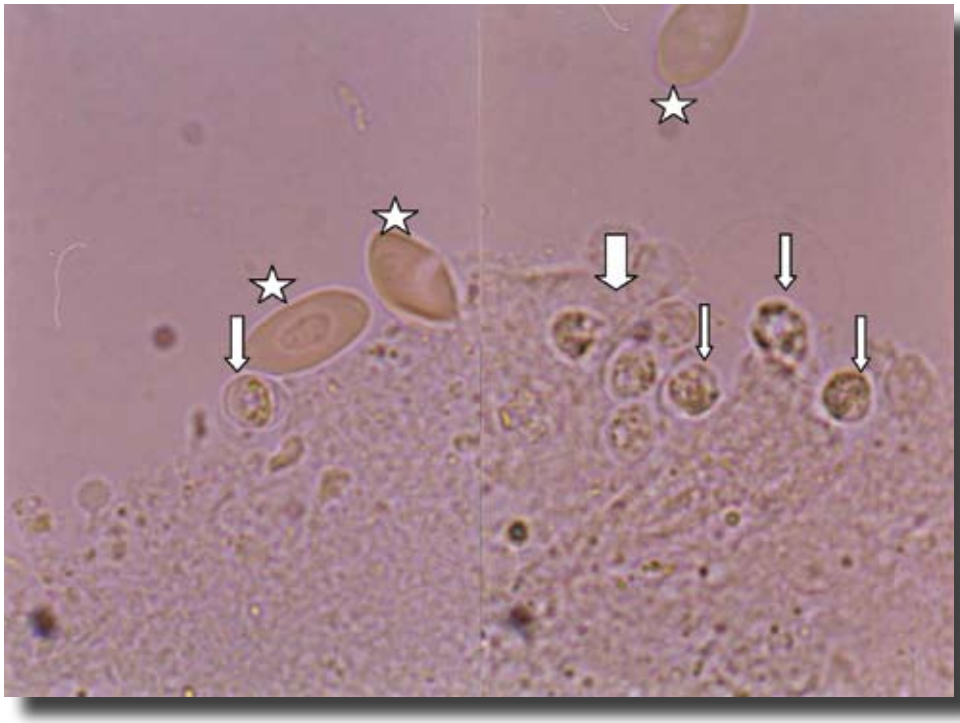
تکثیر در جوجه ماکیان و خالص سازی اووسیست‌ها: تکثیر در جوجه ها به طور عمده در بورس فابریسیوس(شکل ۱) اتفاق می افتد و اووسیست به داخل محوطه کلواک آزاد می شوند. اووسیست ها در مرحله قبل از خالص سازی نهایی همراه باکتری های روده ای مشاهده می شدند (شکل ۲) ولی در خالص سازی نهایی اووسیست های عاری از باکتری به دست می آمد(شکل ۳).

آزادسازی اسپوروزوئیت‌ها در محیط آزمایشگاه: شروع آزادسازی پس از ۱۰ دقیقه نگهداری تعلیق اووسیست ها در گرمخانه بود. در عرض ۴۵ تا ۶۰ دقیقه تعداد قابل ملاحظه ای (بالای ۳۰ در صد) از اووسیست ها باز می شدند و پس از آن تقریباً ثابت می ماند.

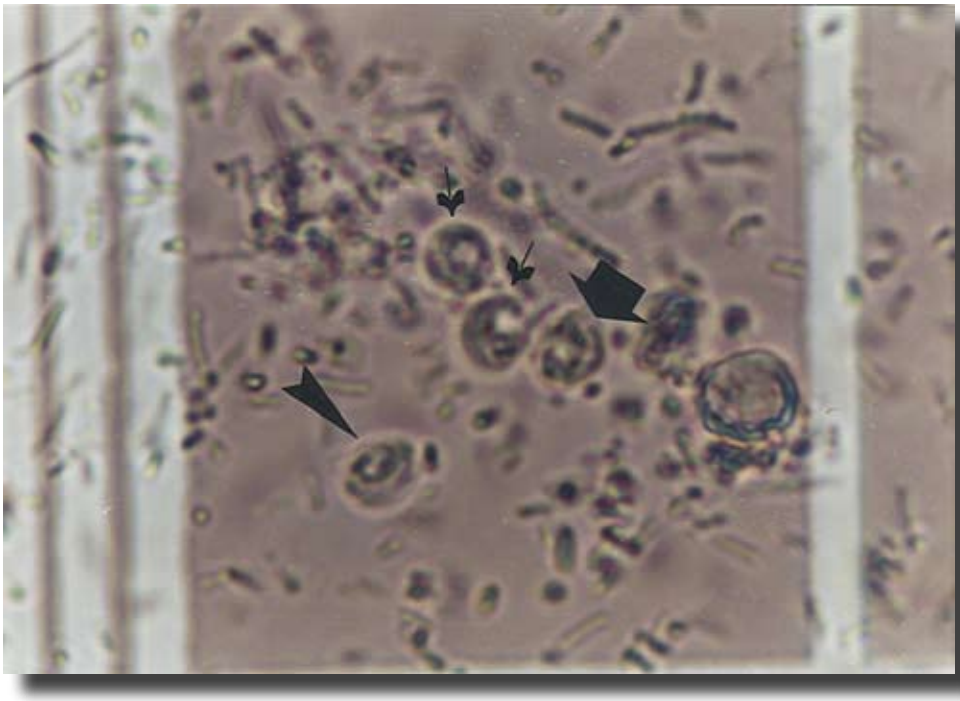
نتایج تلقیح نمونه‌های مختلف به تخم مرغ جنین دار SPF : تلقیح هر دو نوع نمونه مختلف (نمونه اووسیست کامل و باز نشده و نمونه اووسیست همراه با اسپوروزوئیت های رها شده) به تخم مرغ جنین دار ۹ تا ۱۱ روزه SPF، منجر به تکثیر انگل در پرده کوریو آلانتوئیک و رها شدن اووسیست ها در مایع آلانتوئیک می شد. اووسیست‌ها و اجسام هلالی مانند و متحرک (مروزوئیت ها و یا اسپوروزوئیت ها) در مشاهده مستقیم میکروسکوپی مایع آلانتوئیک به خوبی قابل مشاهده بودند. مراحل مختلف چرخه حیات انگل در مشاهده مستقیم پرده کوریوآلانتوئیک با کمک میکروسکوپ نوری دیده می شد. در گسترش تهیه شده از پرده کوریوآلانتوئیک به روش مالشی و رنگ آمیزی به روش گیمسا، مراحل مختلف حیات انگل و به ویژه اشکال هلالی مانند (مروزوئیت ها و یا اسپوروزوئیت ها) مشاهده می شدند(شکل ۳). در هیچکدام از مواردی که نمونه ها به طور کاملاً استریل تلقیح شده بود، مرگ جنین اتفاق نمی افتاد و در معاینه جنین و پرده های آن نیز ضایعه ای جلب توجه نمی کرد. میانگین شمارش مایع آلانتوئیک جمع آوری شده از هر دو نمونه با هم برابر و با استفاده از لام هموسیتو متر معادل 1×10^6 در هر تخم مرغ محاسبه شد، که حاکی از تکثیر و ازدیاد انگل در هر دو نمونه تلقیح شده بود.

بحث

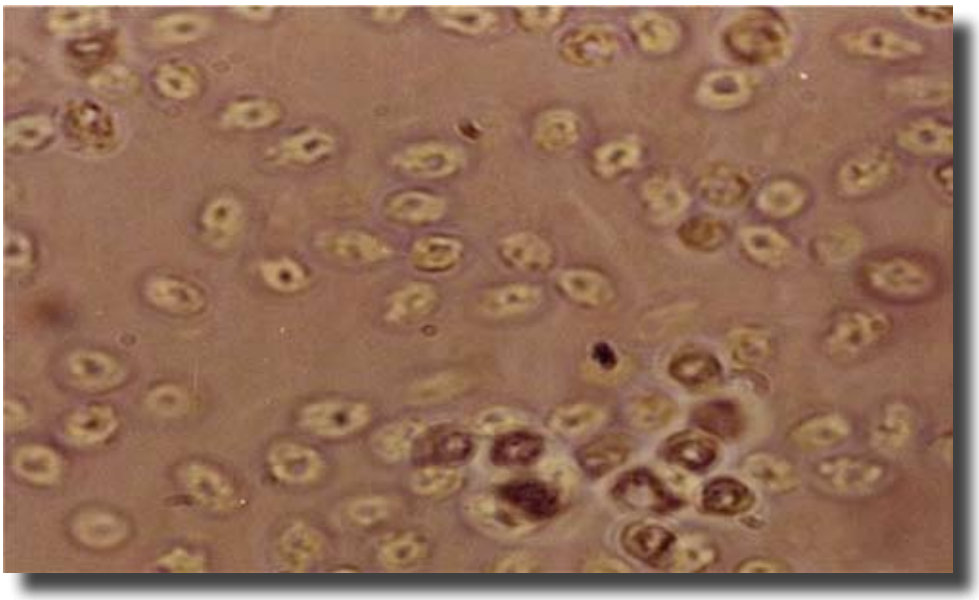
با تکثیر ک. بیله ای جدا شده در ایران در تخم مرغ جنین دار SPF می‌توان از این روش هم برای ازدیاد انگل در کارهای تحقیقاتی استفاده نمود. در این روش اووسیست های جمع آوری شده استریل بوده



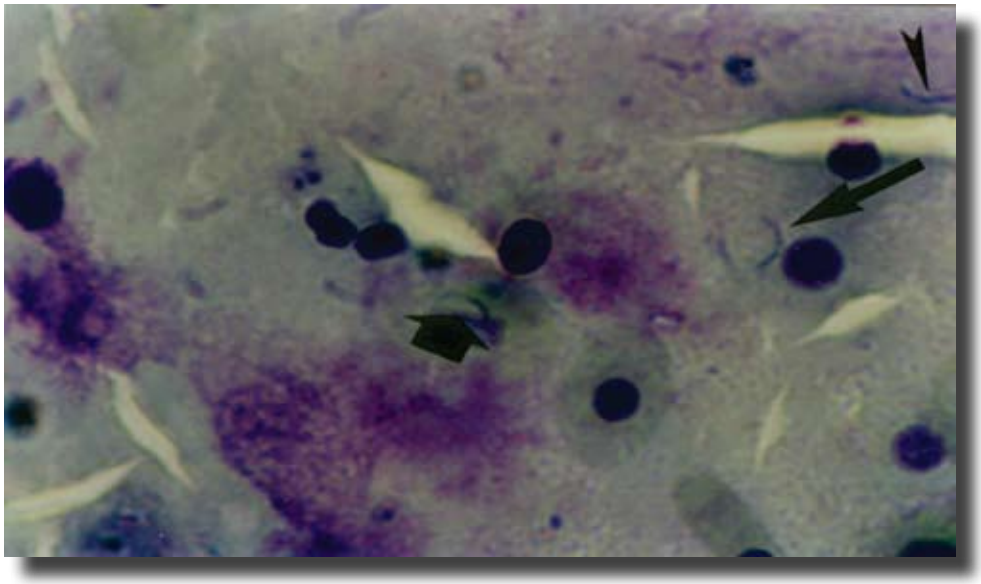
شـــکل ۱- آلودگی کریپتوســـپوریدیایی مخاط بورس فابریســـیوس جوجه ۹ روزه ، ۷ روز پس از آلودگی داخل چینه دان. مشاهده گسترش مرطوب از بورس فابریسیوس جوجه های آلوده به انگل در PBS . مراحل مختلف رشد انگل در حاشـــیه فوقانی ناحیه میکروویلوس ســـلول های پوششی بورس مشـــاهده می شوند(پیکان ها). سه گلبول قرمز بیضوی و هسته دار پرنده هم قابل مشاهده است (ستاره‌ها).



شـــکل ۲ – شـــمارش تعلیق اووسیست ها قبل از خالص سازی نهایی. اووسیست ها(پیکان ها)، خطوط سفید رنگ لام هموسیتومتر و باکتری های روده هم مشاهده می شوند.



شکل ۳- اووسیست های تکثیر شده و خالص شده با روش محلول شکر شیتر تعدیل یافته.



شـــکل ۴- اشکال هلالی مانند مروزوئیت های کریپتوسپوریدیوم (پیکان ها)، در پرده کوریو آلانتوئیک. ۵ روز پس از تلقیح اووسیست های کامل به داخل حفره آلانتوئیک تخم مرغ های SPF جنین دار ۱۰ روزه . رنگ گیمسا.

و بـرای پاساژ بعـدی در تخم مرغ یا کشت سلول، نیـازی به خالص سازی یـا حتی افزودن آنتـی بیوتیک هم نیسـت. بنظر می رسد کـه رهاسازی اسپوروزوئیـت هـا هم برای تکثیـر انگل جدا شده در ایـن نوع تخم مرغ ضـروری نمی باشد و ایـن مرحله از حیات انگل در داخـل تخم مرغ قابل انجام است.

تکثیـر ک. بیلـه ای در جوجه ماکیـان به طور عمـده در سلول های پوششی بورس فابریسیوس اتفاق می افتد و سپس اووسیست ها در کلواک و انتهـای روده آزاد مـی شونـد. تکثیر این انگل در تخـم مرغ جنین دار، در پـرده کوریو آلانتوئیـک انجام می گردد و اووسیسـت های تکثیر شده به داخـل حفره آلانتوییک رها می شوند. اووسیسـت ها ی تکثیر شده در جوجه ماکیان همراه باکتری های روده و سایر محتویات مدفوع و ادرار دفع مـی شوند و تفکیک اووسیسـت ها و خالص سازی آنهـا از سایر محتویات مدفوع زمان بر و دشوار است.

ک. پـاروم و ک. بیلـه ای قادرنـد تمامی مراحل چرخـه حیات خود از اسپوروزوئیـت تـا اووسیسـت را در تخـم مـرغ جنیـن دار، طی کنند (Current ۱۹۹۰; Fayer ۱۹۹۷). کورنـت محـل تکثیر انگل را سلول های آندودرم پـرده کوریوآلانتوئیک می‌دانـد (Current ۱۹۹۰). در این بررسی هـم مراحل مختلف زندگی انگل در غشاء کوریـو آلانتوئیک، ۷ روز پس از تلقیـح به خوبی قابل مشاهده بود. کورنـت دو تفاوت بین ک. پاروم و ک. بیله ای در تلقیح به داخل تخم مرغ قائل می شود (Current ۱۹۹۰)؛ یکی اینکـه در مـورد ک. پاروم آزاد شدن اووسیسـت ها بـه داخل مایع کمتر اتفـاق می‌افتد، در حالی که در این بررسی تعداد قابل توجهی اووسیسـت در مشاهده مسـتقیم میکروسکوپی مایع آلانتوئیک دیده می شد و در یک مورد شمارش اووسیست های موجود در مایع آلانتوئیک جمع آوری شده از یـک تخم مـرغ، تعداد آنها بالغ بر 1×10^6 تخمین زده شد و این امر مؤید رهاشدن اووسیسـت ها به داخل مایع آلانتوئیک بود. تفاوت دیگر این است که ک. پاروم در هر تخم مرغی قابل کشت نبوده و فقط در تخم مرغ برخی سویـه ها یـا گله های مرغ قادر به تکثیر می باشـد (Current ۱۹۹۰). ک. بیلـه ای نه تنها در تخم مرغ تمامی سویه های ماکیان بلکه طبق تجربیات لیندسـی در تخم مرغ جنین دار حاصـل از ۸ گونه پرنده دیگر هم قادر به تکثیر است و جالب اینکه پس از ۲۰ بار پاساژ در تخم مرغ جنین دار هنوز بیمـاری زایی اووسیسـت ها حفظ می شـود (Lindsay و همکاران ۱۹۸۸). کورنـت و همکاران اعـلام نمودند که تا ۳ سال متوالی توانسـته اند ک. بیلـه ای را در تخم مرغ جنین دار پاسـاژ داده، بدون آنکه عفونت زایی آن در تخـم مرغ جنین دار یا جوجه ها کاهش یابد (Current و Long ۱۹۸۳; Current و Layer ۱۹۸۸).

Current در روش کار پیشنهادی خود (۱۹۹۰)، آزادسازی اسپروزوئیت هـا را به عنوان یکی از مراحـل اولیه لازم برای تلقیح بـه داخل تخم مرغ جنیـن دار ذکـر کرده اسـت. در بررسی حاضـر ابتـدا اسپروزوئیت ها به داخـل تخـم مرغ جنیـن دار SPF تلقیح شـد، اما در تجربیـات بعدی در ایـن بررسی، اووسیسـت های خالص و دسـت نخورده، به طور مسـتقیم بـه داخل تخم مـرغ SPF تلقیح گردید. Lindsay و همکـاران (۱۹۸۸) از اووسیسـت هـای کامل و دست نخورده جهت تلقیح بـه تخم مرغ استفاده نموده اند. در صورتی که Current (۱۹۹۰) اسپوروزوئیت های انگل را بدین منظور توصیه نموده است.

استفاده از اووسیسـت های کامل و دست نخـورده در تلقیح به داخل تخم مرغ در مورد آیمریا کارآیی نداشته و تکثیر انگل بدین شیوه غیرممکن اسـت. در مورد آیمریا رهاسـازی اسپوروزوئیت ها در چرخه طبیعی آن دو مرحله انجـام می شود. ابتدا فشار های مکانیکی ناشی از عضلات سنگدان، دیواره اووسیسـت را باز کرده و اسپوروزوئیـت ها آزاد می شوند. در مرحله بعـد اسپوروزوئیت هـای آزاد شده تحت تأثیر آنزیم هـای پروتئولیتیک و نمـک های صفراوی قرار گرفتـه و در نهایت اسپروزوئیـت های آیمریا در دستگاه گوارش آزاد می شوند. اما در مورد کریپتوسپوریدیوم به مرحله اول نیازی نیسـت و در مرحله دوم هم به ویژه در مـورد ک. بیله ای رهاسازی اسپوروزوئیـت هـا علاوه بر دستگاه گـوارش در دستگاه تنفـس هم اتفاق مـی افتـد (Banani و همکـاران ۱۹۹۶; Current و Long ۱۹۸۳; Fayer و همکـاران ۱۹۹۰; Fayer ۱۹۹۷) و بنابراین رهاشدن اسپوروزوئیت ها در داخل تخم مرغ جنین دار هم نباید غیر عادی جلوه کند. از همین خصوصیت شاید بتوان جهت خالص سازی نمونه کریپتوسپوریدیوم از اووسیسـت های آیمریـا استفاده نمـود. با توجه بـه تجربیات بدست آمـده در این بررسی مـی توان اظهار نمـود که مرحله آزادسـازی اسپوروزوئیت ها جهت کشت و تکثیـر کریپتوسپوریدیـوم مورد مطالعه در تخم مـرغ جنین دار ضروری نمـی باشـد. در این بررسـی جراحـات ماکروسکوپی در جنیـن و یا پرده کوریـو آلانتوئیک مشاهده نشد. در هیچکـدام از مواردی که تلقیح استریل انگـل انجام گرفته بـود، مرگ و میری در جنین ها دیـده نشد. لیندسی و کورنـت نیـز جراحاتی بر اثر تکثیر انگل در جنیـن و پرده کوریوآلانتوئیک گزارش نکرده‌انـد (Current و Long ۱۹۸۳; Lindsay و همکاران ۱۹۸۸). بنابراین می توان گفت که کریپتوسپوریدیوم مورد مطالعه برای جنین مرغ غیربیماری‌زا می باشد.

منابع مورد استفاده

1- 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.

2- Banani, M., Dadras,H., Khodakaram – Tafti, A. and Sajjadi, M. (1996). Cryptosporidial lesions in broiler chickens suffering from IBD HN Shiraz. Pajouhesh and Sazandgi : 32 :100 – 104 (In persion).

3- Banani, M., Dadras, H., Moazeni-Jula, G., Hooshmand-Rad, P., Khodashenas, M., Nili, H. and Sajjadi, M. (2000); Isolation and identification of *Cryptosporidium baileyi* and serologic incidence of Cryptosporidium in Shiraz broiler flocks. World's Poultry Congress, Montreal, Canada. Pp: 20-24.

4- Banani, M., Dadras, H., Moazeni-Jula, Gh., Karimi, Gh., Afkhamnia, M., and Mokhber, L., (2012). Efficacy of different concentrtation of sodium hypochlorite on the in vitro excystation of sporozoites of *Cryptosporidium baileyi*. Pajouhesh and Sazandgi : 96 :1 – 6 (In persion).

5- Banani, M., Pourbakhsh, S.A., Ezzi, A., Ardehali, M. and Jannati, M. (2002): Coinfection associated with naturally occurring cryp-

tosporidiosis in broilers. Archives of Razi Institute. 53: 67-77.
6- Current, W.L. and Long , P.L. (1983). Development of human and calf Cryptosporidium in chicken embryos. J. infectious Dis. 148(6): 1108-1113.
7- Current, W.L. , Upton, S.J. and Hynes, T.B. (1986); The life cycle of *Crypotosporidium baileyi* n. SP. (apicomplexa, cryptosporidiidae) infecting chickens. J. protozool. , 33(2), 289296.
8- Current,W. L. and Layer, D. B. (1988). Development of and serologic evaluation of acquired immunity to *Cryptosporidium baileyi* by broiler chickens. Poultry Sci. 67: 720-729.
9- 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).
10- 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.
11- 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.
12- 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.
13- 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.
14- Fayer, R.Speer, C.A., and Dubey, J.P. (1990). General biology of Cryptosporidium. In: Dubey, J.P., Speer, C.A., and Fayer, R. (Eds). Cryptosporidiosis of man and animals. (Boca Raton, FL, CRC Press.)
15- Fayer, R. (1997); Cryptosporidium and cryptosporidiosis. CRC press. , PP. 1-41, 43-64, 111-128.
16- Gharagozlou, M.Y. and Khodashenas, M. (1985). Cryptosporidiosis in a native rooster with chronic proliferative enteritis". Arch. , Vet. , 17, 129-138.
17- Hoerr, F.J. , Current, W.L. and Haynes.T.B. (1986); "Fatal Cryptosporidiosis in quail." Avain Dis. , 30, 421.
18- Khodakaram Tafti, A., Sohrabi Haghdoost, I., Bozorgmehrifard, M. H. and Naghshineh, R. (1995) A pathological study (gross and microscopic pathology) of Marek's disease (MD) in some poultry farms of Tehran area. J. Fac. of Vet. Med. Univ. of Tehran 51, 29-47.
19- Lindsay, D.S., ., Sundermann,C.A. and Blagburn, B. L. (1988). Cultivation of *Cryptosporidium baileyi*: studies with cell cultures, avian embryos and pathogenicity of chicken embryo-passaged oocysts. J. Parasitol., 74(2): 288.
20- Lindsay, D.S., Blagburn, B. L., Sundermann, C.A. and Hoerr, F.J.(1989). Experimental infections in domestic ducks with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. Avian Diseases. 33: 69-73.
21- Noori, M.,Bozorgmehri –Fard, M.H.,and Mosavari, N. (1994). Respiratory and intestinal cryptosporidiosis in commercial chicken in Tehran. Journal of the Facultyof Veterinary Medicin. UnIversity of Tehran.49: 93 -98 (In persian).
22- 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.
23- 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.
24- 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.