

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 مخبرالصفی

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 هیپوکلریت سدیم به منظور ضد عفونی نمودن انگل کریپتوسپورییدیوم 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 ضد عفونی کننده هیپوکلریت سدیم بر روی مرحله حیاتی رها شدن اسپوروزوئیت های انگل کریپتوسپورییدیوم بیله ای بود. بدین منظور هیپوکلریت تجاری معادل هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و در غلظت ها و دماهای مختلف به کار رفت. اووسیست های کریپتوسپورییدیوم بیله ای از بورس فابریسیوس 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 شیتزر خالص گردید. اووسیست ها با غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم ۵ درصد در دما و زمانهای متفاوت مجاور گردید. پس از شستشو، اووسیست ها در معرض مایع آزاد کننده اسپوروزوئیت 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 و ۲/۵ درصد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه مشاهده گردید. و عدم تأثیر کامل در غلظت ۱/۲۵ درصد 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 Serum Research Institute (Corresponding Author; Tel: +989123955835), Dadras H. Professor of Veterinary Faculty, Shiraz University. Moazeni Jula Gh. Karimi Gh. Afkhamnia M. and Mokhber L. Scientific Members of Razi Vaccine and Serum Research Institute 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 °C for 15 min. Treatment of oocysts with 1.25% Sodium hypochlorite at 4 °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 °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

انگل کریپتوسپورییدیوم یک انگل داخل میکروویروس سلول های مخاطی دستگاه تنفس، گوارش و ادراری مهره داران می باشد. بیشتر عفونت های بالینی در انسان و حیوانات پستاندار ناشی از *C. parvum* است؛ اگرچه ایجاد عفونت توسط ارگانیزم شبیه *C. baileyi* در بیمار مبتلا به نقص دستگاه ایمنی هم گزارش شده است (۱۰، ۱۳). انتقال زئونوتیک از حیوان به انسان از راه های سرایت عفونت انسان است (۱۳). آلودگی کریپتوسپورییدیایی در دام و طیور کشور طی مقالات متعددی به اثبات رسیده است (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۴). در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۶۰ وجود انگل در یک خروس بومی توسط قراگوزلو و خدانشناس گزارش گردید (۱۴). در آن سال هنوز گونه *C. baileyi* توسط Current و همکاران (۷) به عنوان یک گونه جدید در طیور معرفی نشده بود. در گزارش نوری و همکاران (۱۳۷۳) گونه جدا شده از مرغداری های اطراف تهران *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 کریپتوسپورییدیوم، با کمک آزاد سازی اسپوروزوئیت ها در آزمایشگاه انجام می شود. در این آزمون ابتدا انگل را تحت شرایط خاص مورد نظر و یا در مجاورت ماده ضد عفونی کننده مورد آزمایش قرار داده و سپس در محیط مناسب برای ایجاد آزادسازی اسپوروزوئیت ها، ممانعت از این

مرحله کلیدی در چرخه حیاتی انگل بررسی می شود (۸، ۱۳). هدف از این مطالعه این بود که غلظت و دمای مناسب هیپوکلریت سدیم که هیچ گونه تأثیر منفی بر رهاسدن 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 موجود در مدفوع به منظور کارهای تحقیقاتی بعدی از جمله تلقیح انگل به داخل تخم مرغ جنین دار کاربرد فراوان دارد. از طرف دیگر اووسیست های انگل کریپتوسپورییدیوم نسبت به بسیاری از ضد عفونی کننده های رایج مقاوم هستند و استفاده از یک ماده ضد عفونی 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*

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

آزمون آماری

از نرم افزار ۱۳-SPSS برای آنالیز داده ها استفاده شد. از آزمون های ناپارامتری "کروسکال والیس" و "من ویتنی" برای آنالیز استفاده گردید. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است یک بار با ثابت گرفتن غلظت، تاثیر دما و یک بار با ثابت گرفتن دما، آزادسازی اسپوروزوئیت ها در غلظت های مختلف مورد آزمون قرار گرفت.

نتایج

آزادسازی اسپوروزوئیت ها در محیط آزمایشگاه

سه ترکیب زیر شامل ۱- ۲۰ در صد صفرای ماکیان در تریپسین و رسن، ۲- مایع آزادکننده ۲ مرحله ای: ابتدا محلول ۱ در صد تریپسین به مدت یک ساعت و سپس محلول ۲۰ در صد صفرای ماکیان در PBS و ۳- ۲۰ در صد صفرای ماکیان در PBS به تنهایی در آزادسازی اسپوروزوئیت ها (شکل ۱) مؤثر بودند، ولی استفاده از محلول ۲ درصد سدیم توروگلیکوکولات بی ثمر بوده است. 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. دماهای ۳۷ یا ۳۹ درجه سانتی گراد هر دو مؤثر بودند ولی در دمای ۴ درجه سانتی گراد رهاسازی در مجاور مایع آزاد کننده اسپوروزوئیت اتفاق نمی افتاد.

نتایج تأثیر غلظت های متفاوت هیپوکلریت سدیم

در دماهای مختلف بر رها شدن اسپوروزوئیت ها

هیپوکلریت سدیم موجب کاهش رها شدن اسپوروزوئیت ها و وقفه در این مرحله کلیدی و حیاتی (excystation) (شکل ۱) انگل می شود. با استفاده از آزمون کروسکال والیس در هر یک از دماها به تفکیک، آزادسازی اسپوروزوئیت ها در غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم با یکدیگر تفاوت معنی دار نشان داد. $p=0.000$ جدول (۱) در غلظت های پایین (۱/۲۵) آزادسازی اسپوروزوئیت ها بیشتر است.

با استفاده از آزمون من ویتنی نشان داده شد که در هر یک از غلظت ها به تفکیک آزاد سازی اسپوروزوئیت ها در دما های مختلف مورد بررسی با یکدیگر تفاوت معنی دار دارد. ($P < 0.05$) (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 قرار گرفته و سپس در مجاورت مایع رهاکننده اسپوروزوئیت قرار می گرفتند. تنها موردی که از نظر رها شدن اسپوروزوئیت ها با گروه شاهد تفاوتی دیده نمی شد، غلظت ۱/۲۵ درصد و دمای ۴ درجه سانتی گراد بود

بحث

در این مطالعه تأثیر هیپوکلریت سدیم تجاری در شرایط مختلف

تکثیر و خالص سازی انگل

اووسیست های مذکور به جوجه های حساس دو روزه خوراندند شد و سپس مدفوع جوجه ها که حاوی اووسیست های تکثیر شده بود، ابتدا در محلول کلرور سدیم اشباع مخلوط گردید و سوسپانسیون حاصل، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی که دارای غلظت بالایی از اووسیست ها بود جمع آوری و به آن آب مقطر اضافه شد و سانتریفیوژ گردید. برای خالص سازی نهایی از باکتری ها و دبیری ها، از روش تعدیل یافته شناورسازی با شکر Sheater توسط Current (۸) استفاده شد.

رهاسازی اسپوروزوئیت های انگل

پس از شستشو با کمک سانتریفیوژ و PBS، اووسیست ها در مجاورت مایع آزادکننده اسپوروزوئیت (Excystation fluid) و در گرمخانه ۳۷ یا ۳۹ درجه سانتی گراد همراه با تکان دادن قرار گرفتند. جستجوی میکروسکوپی تعلیق به منظور مشاهده اسپوروزوئیت های متحرک رها شده در فواصل ۱۵ دقیقه صورت گرفت. آزادسازی اسپوروزوئیت ها به عنوان شاخص 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 توروگلیکوکولات (بدست آمده از گاو) ۲ در صد در PBS، به جای صفرای ماکیان در ترکیبات ۱ و ۲ (۸، ۱۳).

بررسی تأثیر غلظت های متفاوت هیپوکلریت سدیم در پدماهای

مختلف بر رها شدن اسپوروزوئیت ها

اووسیست ها با غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم در دما و زمان های متفاوت مجاور شدند. در این مرحله ابتدا اووسیست ها با غلظت های مختلف و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و در دما و زمان های متفاوت مجاور می شد. برای رقیق کردن هیپو کلریت سدیم PBS استفاده می شد. سپس اووسیست ها که تعدادشان 2×10^5 عدد بود پس از شستشو در ۰/۵ میلی لیتر مایع آزادکننده اسپوروزوئیت مناسب قرار گرفته و در دمای ۳۹ درجه سانتی گراد نگهداری می شدند. پس از ۴۵ دقیقه تعداد ۱۰۰ میدان میکروسکوپی از نظر حضور اسپوروزوئیت متمرکز مورد بررسی قرار می گرفت. همزمان در این آزمون در گروه اووسیست های شاهد به جای هیپوکلریت سدیم از PBS استفاده می شد. به منظور شستشوی کامل هیپوکلریت سدیم ۴ مرتبه سانتریفیوژ با کمک PBS سرد (۴ درجه سانتی گراد) و با دور $1000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه انجام می گرفت و هر مرتبه مایع روی دوز ریخته می شد. زنده مانی اووسیست ها با کمک روش رها سازی اسپوروزوئیت ها در آزمایشگاه ارزیابی شده است، بدین صورت که رها شدن اسپوروزوئیت ها پس از طی شرایط خاص آزمایشگاه به معنای زنده ماندن اووسیست ها ست هر چند عدم رها شدن اسپوروزوئیت ها صد در صد به معنای عدم زندهمانی نمی باشد (۸، ۱۳).

دمای و غلظت) بر رهاسازی و عدم رهاسازی اسپوروزوئیت ها مطالعه گردید و نشان داده شد که در غلظت ۲/۵ درصد و بالاتر و دمای بالا (۳۷ درجه سانتی گراد) ممانعت از رهاسازی و در غلظت ۱/۲۵ درصد و پایین تر و دمای پایین (۴ درجه سانتی گراد) تسهیل در رهاسازی ایجاد می شود. غلظت ۱/۲۵ درصد در دمای ۴ درجه سانتی گراد در مرحله حیاتی رهاسازی اسپوروزوئیت ها انگل خللی ایجاد نمی کند و حتی آن را تسهیل می نماید و از طرف دیگر می تواند باکتری های همراه انگل را از بین برده و اووسیست ها را جهت تلقیح به تخم مرغ و کشت سلول استریل و آماده نماید.

روش آزمایشگاهی بررسی اثر مواد و محیط های مختلف بر زنده ماندن انگل کریپتوسپوریدیوم، با کمک آزاد سازی اسپوروزوئیت ها در آزمایشگاه انجام می شود. در این آزمون ابتدا انگل را تحت شرایط خاص مورد نظر و یا در مجاورت ماده ضد عفونی کننده مورد آزمایش قرار داده و سپس در محیط مناسب برای ایجاد آزادسازی اسپوروزوئیت ها، ممانعت از این مرحله کلیدی در چرخه حیاتی انگل بررسی می شود (۱۳). با وجود این بررسی زنده ماندن انگل از طریق تلقیح به موجود زنده یا کشت سلول روش مطمئن تری می باشد (۱۲، ۱۸). مشابه نتایج مطالعه حاضر در خصوص *C. baileyi*، در سایر تحقیقات انجام شده بر روی *C. parvum* هم مشاهده شده است که با استفاده از روش رهاسازی اسپوروزوئیت ها، هیپوکلریت ۲/۸ درصد در دمای ۲۲ درجه به مدت ۳۰ دقیقه و هیپوکلریت ۱ درصد در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه، به ترتیب ۸۹ و ۶۹ درصد در کاهش عفونت زایی *C. parvum* مؤثر بوده اند (۱۳). با وجود این با آزمایش در بدن موجود زنده، هیپوکلریت در مقابله با عفونت زایی انگل ناموفق بوده است (۱۲، ۱۳، ۱۸). بدیهی است اگر ماده ضد عفونی کننده به طور کامل قادر به از بین بردن همه اووسیست ها نشود تعداد کم اووسیست ها هم به دلیل تکثیر و تزیاد در داخل روده و سایر بافت های پوششی حیوان مورد آزمایش یا کشت سلول مناسب می توانند باعث عفونت و بیماری شوند. از سوی دیگر رهاسازی اسپوروزوئیت ها در بدن میزبان حساس در مقایسه با آزمایشگاه ممکن است با سهولت و به میزان خیلی بیشتری انجام شود. در بررسی حاضر مؤثرترین غلظت و دما در ممانعت از رهاسازی 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 رهاسازی اسپوروزوئیت هر چند به نسبت کمتر مشاهده گردید. دمای ۳۷ درجه به تنهایی یا همراه با برخی مواد ضد عفونی کننده رایج در زمان یک ساعت و کمتر مانع از رهاسازی اسپوروزوئیت ها نشده است (۱۳). Weir و همکاران تأثیر ۹ ماده ضد عفونی کننده بر روی عفونت زایی انگل ک، پارووم در کشت سلول بررسی نمودند و دریافتند که هیپوکلریت ۶ درصد در دمای اتاق مانع عفونت زایی انگل نمی شود (۱۸). در تحقیق دیگری Fayer نشان داد که ۱۲۰ دقیقه مجاورت اووسیست های *C. parvum* با هیپوکلریت ۵ درصد در دمای ۲۱ درجه سانتی گراد در عفونت زایی انگل در موش ها بی تأثیر است (۱۲). اووسیست های کریپتوسپوریدیوم در مقابل مواد ضد عفونی کننده رایج که به راحتی ویروس ها، باکتری ها و قارچ ها را می کشند مقاومت قابل توجهی نشان

می دهند. در یک بررسی ۹ ماده ضد عفونی کننده را به مدت ۳۰ دقیقه در غلیظ ترین میزان توصیه شده توسط سازنده به کار بردند. این مواد هیچ گونه تأثیری بر زنده ماندن اووسیست ها نداشتند یا تأثیر آنها ناچیز بود (۹). در گزارش های متعدد انجام شده ۱۸ ماده شیمیایی ضد عفونی کننده علیه *C. parvum* و ۷ ماده دیگر علیه *C. baileyi* بی تأثیر بوده اند. از جمله آنها می توان از دتول، ساون، 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 مواد شیمیایی موثر علیه کریپتوسپوریدیوم می توان از ترکیبات مختلف هالوژنه، آمونیاک، پر اکسید 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 تأثیر بوده است (۱۳).

اووسیست های کریپتوسپوریدیوم در مقابل عوامل فیزیکی مختلف نیز مقاومت نسبی دارند. با وجود این دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶ دقیقه و ۷۲/۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه در کاهش عفونت زایی و یا نابودی کامل اووسیست ها موثر می باشند (۱۱، ۱۳). اووسیست های انگل قادرند دماهای 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 مؤثرند (۱۳).

نتایج به دست آمده در این بررسی و سایر تحقیقات موثر بودن ماده هیپوکلریت سدیم در ممانعت از رهاسازی اسپوروزوئیت ها در غلظت های ۲/۵ درصد و بالاتر را در دماهای ۲۵ درجه و بالاتر (جدول ۱) نشان داده است ولی با تحقیقات انجام شده در میزبان حساس مشخص شده است که این ماده به تنهایی قادر به ضد عفونی کامل انگل نیست (۱۲، ۱۳، ۱۸)؛ بنابراین توصیه می شود که در موارد استفاده از این ماده حتماً از دمای ۴۵ درجه و بالاتر، به صورت آب داغ یا شعله افکنی و همین طور خشک نگه داشتن مکان به مدت ۴ تا ۱ روز و تاباندن اشعه ماورای بنفش هم استفاده گردد (۱۳). بدیهی است که پنهان ماندن اووسیست ها در لابه لای مواد آلی ممکن است تأثیر این مواد را بکاهد بنابراین قبل از به کار بردن 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 رهاسازی اسپوروزوئیت ها موثر نیست، در عمل کاربرد هیپوکلریت سدیم در ضد 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 بلدرچین، آبخوری ها و دانخوری ها و سایر ظروف فلزی با هیپوکلریت سدیم تمیز شده و سپس ۳ روز در معرض خورشید قرار گرفتند کف سیمانی سالن ها هم تمیز شده و با بستر تازه پوشانده می شدند. بدین ترتیب از عود بیماری جلوگیری به عمل آمد (۱۵). همانطور که در جدول (۱) مشاهده می شود هیپوکلریت سدیم ۱ درصد موجب کاهش در رهاسازی اسپوروزوئیت های انگل نمی شود.

از این غلظت به خوبی می توان در برخی کارهای تحقیقاتی استفاده نمود. کارنت جهت رهاسازی بهتر اسپوروزوئیت ها غلظت

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 *Cryptosporidium baileyi*. SP. (apicomplexa, cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. protozool.*, 33(2), 289-296.

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*, 10th ed, (Lowa State Univ. press, Amess) PP: 883-890.

10- Ditrach, 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- Gharagozlu, 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. *Avian 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 immunocompetent 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.

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 اوویسیست های *C. parvum* از باکتری ها به کار برده 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 درصد 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؛ اوویسیست 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 اوویسیست 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)، خوبی 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 اوویسیست در موارد تلقیح اسپوروزوئیت به کشت سلول و یا تخم مرغ جنین دار و همچنین افزایش درصد باز شدن اوویسیست ها در روش های رها سازی 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. ص ۱۰۳-۱۰۰.

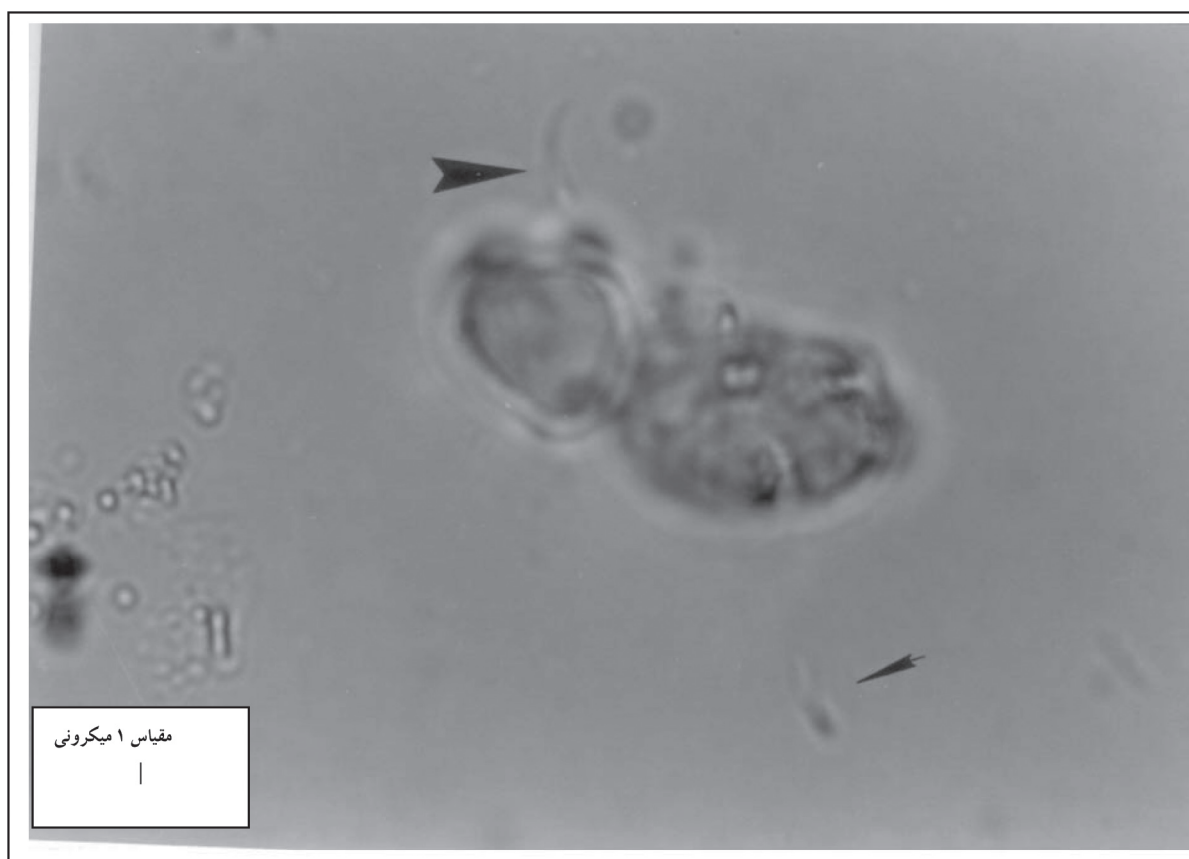
۲- خداکرم تفتی، عزیزاله. (۱۳۷۲) بررسی پاتولوژیک بیماری مارک در تعدادی از مرغداری های تهران. پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای تخصصی آسیب شناسی دامپزشکی از دانشگاه تهران، شماره ۸.

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، ۱ و ۲، ص ۹۷-۹۳.

4- Ahourai, P., Ezzi, A., Gholami, M.R., Vandeyousefi, J., Kargar, R. and Maalhigh, 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



شکل ۱- اسپوروزوئیت های متحرک کریبتوسپورییدیوم (پیکان ها)، پس از تأثیر مایع رهاکننده اسپوروزوئیت، مشاهده می شوند. میکروسکوپ نوری
جدول ۱- تأثیر هیپوکلریت سدیم بر رها شدن اسپوروزوئیت های کریبتوسپورییدیوم 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

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop