

تکثیر اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم بيله‌ای در تخم 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 بيله‌ای 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. اووسیست‌های 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 اووسیست‌های انگل، از جمله روش تعدیل یافته شناور سازی با محلول شکر اشباع شیتتر و افزودن هیپوکلریت سدیم انجام گرفت. سپس اووسیست‌ها با کمک محلول PBS شسته شدند و آنتی بیوتیک‌های مناسب اضافه گردید. دو نمونه شامل اووسیست‌های کامل و باز نشده و اووسیست‌های انگل پس از مجاورت با مایع آزاد کننده اسپوروزوئیت، به طور جداگانه در حفره آلائنتوئیک تخم مرغ‌های SPF جنین دار ۱۰ روزه تلقیح شده‌اند. سپس تخم مرغ‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز نگهداری و هر روز نور بینی گردید. نتایج نشان داد که هر دو نوع نمونه تلقیح شده منجر به رشد و تکثیر مراحل مختلف انگل در پرده کوریو آلائنتوئیک و رها شدن اووسیست‌ها در مایع آلائنتوئیک شده است. در تلقیح 1×10^5 اووسیست، 1×10^6 اووسیست از مایع آلائنتوئیک یک تخم مرغ حاصل شد. با توجه به تکثیر مناسب کریپتوسپوریدیوم بيله‌ای در تخم مرغ‌های جنین دار، بنظر می‌رسد که در کارهای تحقیقاتی و در موارد نیاز به تکثیر محدود انگل، به خوبی می‌توان از تلقیح مستقیم اووسیست‌های دست نخورده انگل به تخم مرغ جنین دار SPF یا احتمالاً تخم جنین‌دار سایر پرندگان هم استفاده نمود.

کلمات کلیدی: تکثیر، اووسیست، کریپتوسپوریدیوم بيله‌ای، 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@rsvi.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 1×10^5 oocysts or equivalent oocysts exposed by excystation fluid. The eggs inoculated by samples were incubated 7 days at 37 °C 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 1×10^5 oocysts caused releasing of 1×10^6 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 کریپتوسپورییدیوم یک انگل داخل سلولی دستگاه گوارشی، تنفسی و ادراری مهره داران می‌باشد. علاوه بر اینکه این انگل می‌تواند 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 کریپتوسپورییدیوز می‌گردد (Current Fayer; ۱۹۹۷، و همکاران ۱۹۹۰; Fayer ۱۹۹۷). در ماکیان دو گونه کریپتوسپورییدیوم مله 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 در آن سال هنوز گونه کریپتوسپورییدیوم 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 میزان حساس یعنی جوجه ماکیان ۲ روزه می‌خورانند 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 می‌گردد. 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 میزان 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

اوویست های کریپتوسپوریدیوم بیله ای: منشأ این اوویست ها از بورس های فابریسیوس جوجه های گوشتی ۳۰ روزه بود، که قبلاً از یک مرغداری در اطراف شیراز جداسازی و شناسایی شده بودند. اوویست 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: اوویست های 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 اوویست ها: به منظور شمارش اوویست ها از لام همو سیتومتر (haemocytometer) استفاده گردید.

رها سازی اسپوروزوئیت های انگل: پس از شستشو با کمک سانتریفوژ و PBS، اوویست های 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 اوویست ها در نظر گرفته شده است (Banani و همکاران ۲۰۱۲).

تخم مرغ جنین دار SPF: تخم مرغ های جنین دار 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) اوویست های خالص شده و کامل (بدون رها نمودن اسپوروزوئیت ها در آزمایشگاه) به میزان $10^5 \times 1$ اوویست به هر تخم مرغ ب) اوویست های خالص شده که در معرض مایع آزاد کننده اسپوروزوئیت، به همان میزان اوویست 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 آلتوتوئیک 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 0.2 ml از نمونه های آماده شده در شرایط کاملاً استریل و در کنار شعله به داخل حفره آلتوتوئیک 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 10 mg/ml ، 10000 IU/ml و 10 mg/ml و ضد قارچ نیستاتین به میزان 5000 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 اتاکن هوایی برداشته شده و پس از ایجاد سوراخ در ناحیه کم عروق پرده کوریو آلتوتوئیک، با کمک پمپ مایع آلتوتوئیک تخلیه می گشت. از هر تخم مرغ ۱۵-۱۰ میلی لیتر مایع بدست می آمد. با مشاهده میکروسکوپی قطره ای از مایع جمع آوری شده در صورتی که اوویست های انگل دیده می شد، مایع جمع آوری شده به مدت ۱۵ دقیقه در 1000 g سانتریفوژ می گردید و رسوب حاصل در دی کرومات پتاسیم ۵/۲ درصد نگهداری می شد (Current ۱۹۹۰).

نتایج

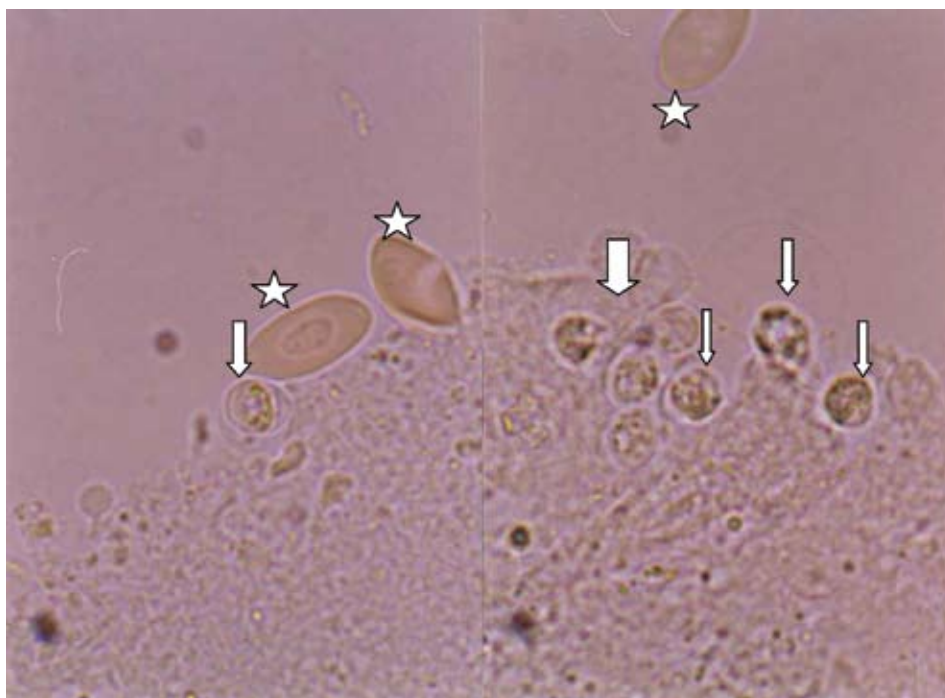
تکثیر در جوجه ماکیان و خالص سازی اوویست ها: تکثیر در جوجه ها به طور عمده در بورس فابریسیوس (شکل ۱) اتفاق می افتد و اوویست به داخل محوطه کلواک آزاد می شوند. اوویست ها در مرحله قبل از خالص سازی نهایی همراه باکتری های روده ای مشاهده می شدند (شکل ۲) ولی در خالص سازی نهایی اوویست های عاری از باکتری به دست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

آزاد سازی اسپوروزوئیت ها در محیط آزمایشگاه: شروع آزاد سازی پس از ۱۰ دقیقه نگهداری تعلیق اوویست ها در گرمخانه بود. در عرض ۴۵ تا ۶۰ دقیقه تعداد قابل ملاحظه ای (بالای ۳۰ درصد) از اوویست ها باز می شدند و پس از آن تقریباً ثابت می ماند.

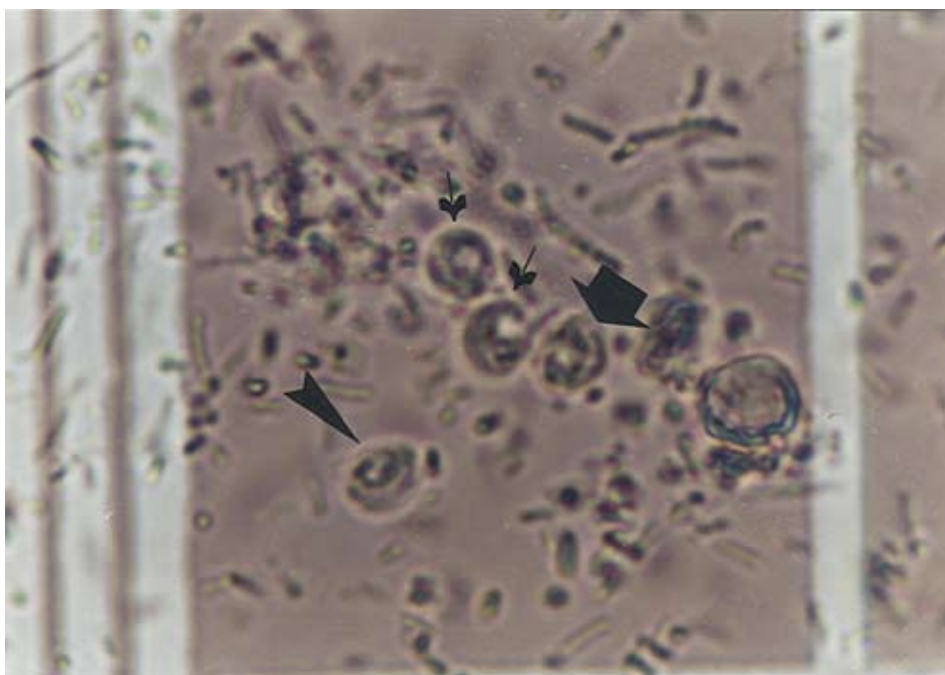
نتایج تلقیح نمونه های مختلف به تخم مرغ جنین دار SPF: تلقیح هر دو نوع نمونه مختلف (نمونه اوویست کامل و باز نشده و نمونه اوویست همراه با اسپوروزوئیت های رها شده) به تخم مرغ جنین دار ۹ تا ۱۱ روزه SPF، منجر به تکثیر انگل در پرده کوریو آلتوتوئیک و رها شدن اوویست ها در مایع آلتوتوئیک می شد. اوویست ها و اجسام هلالی مانند و متحرک (مروزوئیت ها و یا اسپوروزوئیت ها) در مشاهده مستقیم میکروسکوپی مایع آلتوتوئیک به خوبی قابل مشاهده بودند. مراحل مختلف چرخه حیات انگل در مشاهده مستقیم پرده کوریو آلتوتوئیک با کمک میکروسکوپ نوری دیده می شد. در گسترش تهیه شده از پرده کوریو آلتوتوئیک 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 آلتوتوئیک جمع آوری شده از هر دو نمونه با هم برابر و با استفاده از لام هموسیتو متر معادل $10^6 \times 1$ در هر تخم مرغ محاسبه شد، که حاکی از تکثیر و ازدیاد انگل در هر دو نمونه تلقیح شده بود.

بحث

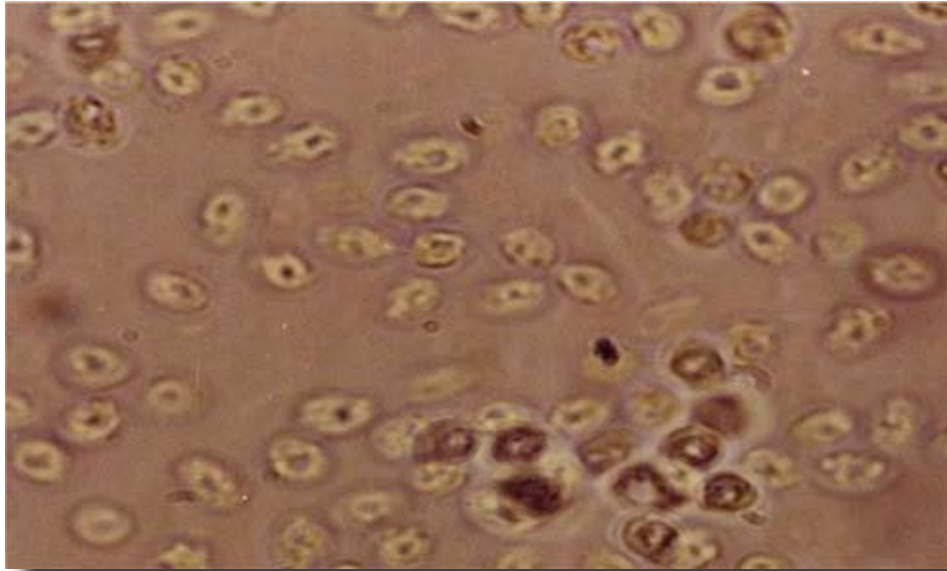
با تکثیر ک. بیله ای جدا شده در ایران در تخم مرغ جنین دار SPF می توان از این روش هم برای ازدیاد انگل در کارهای تحقیقاتی استفاده نمود. در این روش اوویست های جمع آوری شده استریل بوده



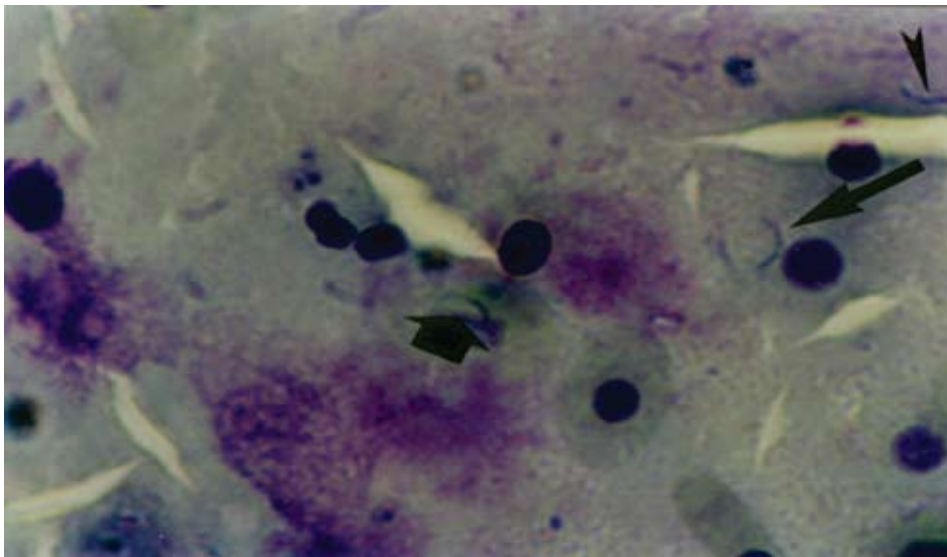
شکل ۱- آلودگی کریپتوسپوریدیایی مخاط بورس فابریسیوس جوجه ۹ روزه، ۷ روز پس از آلودگی داخل چینه دان. مشاهده گسترش مرطوب از بورس فابریسیوس جوجه های آلوده به انگل در PBS. مراحل مختلف رشد انگل در حاشیه فوقانی ناحیه میکروویلوس سلول های پوششی بورس مشاهده می شوند (پیکان ها). سه گلبول قرمز بیضوی و هسته دار پرنده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



شکل ۲ - شمارش تعلیق اووسیست ها قبل از خالص سازی نهایی. اووسیست ها (پیکان ها)، خطوط سفید رنگ لام هموسیتمتر و باکتری های روده هم مشاهده می شوند.



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



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

استفاده از اووسیست های کامل و دست نخورده در تلقیح به داخل تخم مرغ در مورد آیمیریا کارآیی نداشته و تکثیر انگل بدین شیوه غیرممکن است. در مورد آیمیریا رهاسازی اسپوروزوئیت ها در چرخه طبیعی آن دو مرحله انجام می شود. ابتدا فشار های مکانیکی ناشی از عضلات سنگدان، دیواره اووسیست را باز کرده و اسپوروزوئیت ها آزاد می شوند. در مرحله بعد اسپوروزوئیت های آزاد شده تحت تأثیر آنزیم های پروتئولیتیک و نمک های صفراوی قرار گرفته و در نهایت اسپوروزوئیت های آیمیریا در دستگاه گوارش آزاد می شوند. اما در مورد کریپتوسپورییدیوم به مرحله اول نیازی نیست و در مرحله دوم هم به ویژه در مورد ک. بیله ای رهاسازی اسپوروزوئیت ها علاوه بر دستگاه گوارش در دستگاه تنفس هم اتفاق می افتد (Banani و همکاران ۱۹۹۶؛ Current و Long ۱۹۸۳؛ Fayer و همکاران ۱۹۹۰؛ Fayer ۱۹۹۷) و بنابراین رهاسدن اسپوروزوئیت ها در داخل تخم مرغ جنین دار هم نباید غیر عادی جلوه کند. از همین خصوصیت شاید بتوان جهت خالص سازی نمونه کریپتوسپورییدیوم از اووسیست های آیمیریا استفاده نمود. با توجه به تجربیات بدست آمده در این بررسی می توان اظهار نمود که مرحله آزادسازی اسپوروزوئیت ها جهت کشت و تکثیر کریپتوسپورییدیوم مورد مطالعه در تخم مرغ جنین دار ضروری نمی باشد. در این بررسی جراحات ماکروسکوپی در جنین و یا پرده کوریو آلتوئیک مشاهده نشد. در هیچکدام از مواردی که تلقیح استریل انگل انجام گرفته بود، مرگ و میری در جنین ها دیده نشد. لیندسی و کورنت نیز جراحاتی بر اثر تکثیر انگل در جنین و پرده کوریو آلتوئیک گزارش نکرده اند (Lindsay و Long ۱۹۸۳؛ Current و همکاران ۱۹۸۸). بنابراین می توان گفت که کریپتوسپورییدیوم مورد مطالعه برای جنین مرغ غیربیماری زا می باشد.

منابع مورد استفاده

- 1- Ahourai, P., Ezzi, A., Gholami, M.R., Vandeyousefi, J., Kargar, R. and Maalghagh, 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 concentration 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-

و برای پاساژ بعدی در تخم مرغ یا کشت سلول، نیازی به خالص سازی یا حتی افزودن آنتی بیوتیک هم نیست. بنظر می رسد که رهاسازی اسپوروزوئیت ها هم برای تکثیر انگل جدا شده در این نوع تخم مرغ ضروری نمی باشد و این مرحله از حیات انگل در داخل تخم مرغ قابل انجام است.

تکثیر ک. بیله ای در جوجه ماکیان به طور عمده در سلول های پوششی بورس فابریسیوس اتفاق می افتد و سپس اووسیست ها در کلوک و انتهای روده آزاد می شوند. تکثیر این انگل در تخم مرغ جنین دار، در پرده کوریو آلتوئیک انجام می گردد و اووسیست های تکثیر شده به داخل حفره آلتوئیک رها می شوند. اووسیست های تکثیر شده در جوجه ماکیان همراه باکتری های روده و سایر محتویات مدفوع و ادرار دفع می شوند و تفکیک اووسیست ها و خالص سازی آنها از سایر محتویات مدفوع زمان بر و دشوار است.

ک. پارووم و ک. بیله ای قادرند تمامی مراحل چرخه حیات خود از اسپوروزوئیت تا اووسیست را در تخم مرغ جنین دار، طی کنند (Current ۱۹۹۰؛ Fayer ۱۹۹۷). کورنت محل تکثیر انگل را سلول های آندودرم پرده کوریو آلتوئیک می داند (Current ۱۹۹۰). در این بررسی هم مراحل مختلف زندگی انگل در غشاء کوریو آلتوئیک، ۷ روز پس از تلقیح به خوبی قابل مشاهده بود. کورنت دو تفاوت بین ک. پارووم و ک. بیله ای در تلقیح به داخل تخم مرغ قائل می شود (Current ۱۹۹۰)؛ یکی اینکه در مورد ک. پارووم آزاد شدن اووسیست ها به داخل مایع کمتر اتفاق می افتد، در حالی که در این بررسی تعداد قابل توجهی اووسیست در مشاهده مستقیم میکروسکوپی مایع آلتوئیک دیده می شد و در یک مورد شمارش اووسیست های موجود در مایع آلتوئیک جمع آوری شده از یک تخم مرغ، تعداد آنها بالغ بر 1×10^6 تخمین زده شد و این امر مؤید رهاسدن اووسیست ها به داخل مایع آلتوئیک بود. تفاوت دیگر این است که ک. پارووم در هر تخم مرغی قابل کشت نبوده و فقط در تخم مرغ برخی سویه ها یا گله های مرغ قادر به تکثیر می باشد (Current ۱۹۹۰). ک. بیله ای نه تنها در تخم مرغ تمامی سویه های ماکیان بلکه طبق تجربیات لیندسی در تخم مرغ جنین دار حاصل از ۸ گونه پرنده دیگر هم قادر به تکثیر است و جالب اینکه پس از ۲۰ بار پاساژ در تخم مرغ جنین دار هنوز بیماری زایی اووسیست ها حفظ می شود (Lindsay و همکاران ۱۹۸۸). کورنت و همکاران اعلام نمودند که تا ۳ سال متوالی توانسته اند ک. بیله ای را در تخم مرغ جنین دار پاساژ داده، بدون آنکه عفونت زایی آن در تخم مرغ جنین دار یا جوجه ها کاهش یابد (Current و Long ۱۹۸۳؛ Current و Layer ۱۹۸۸).

Current در روش کار پیشنهادی خود (۱۹۹۰)، آزادسازی اسپوروزوئیت ها را به عنوان یکی از مراحل اولیه لازم برای تلقیح به داخل تخم مرغ جنین دار ذکر کرده است. در بررسی حاضر ابتدا اسپوروزوئیت ها به داخل تخم مرغ جنین دار SPF تلقیح شد، اما در تجربیات بعدی در این بررسی، اووسیست های خالص و دست نخورده، به طور مستقیم به داخل تخم مرغ SPF تلقیح گردید. Lindsay و همکاران (۱۹۸۸) از اووسیست های کامل و دست نخورده جهت تلقیح به تخم مرغ استفاده نموده اند. در صورتی که Current (۱۹۹۰) اسپوروزوئیت های انگل را بدین منظور توصیه نموده است.

- 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 *Cryptosporidium baileyi* n. SP. (apicomplexa, cryptosporidii-dae) infecting chickens. J. protozool., 33(2), 289-296.
- 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, 10th ed, (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." Avian Dis., 30, 421.
- 18- Khodakaram Tafti, A., Sohrabi Haghdoost, I., Bozorgmehrfard, 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 Faculty of Veterinary Medicine. 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 immunocompetent 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.

