



مطالعه کریپتوسپوریديوم (*C.baileyi*) در نای و بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM

• حسن نیلی، دانشیار بخش طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
• حبیب اله دادرس، دانشیار بخش طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
• منصور بنانی عضو هیأت علمی موسسه رازی حصارک کرج

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۱۳۸۳

چکیده

کریپتوسپوریديوم یک انگل کوچک تک یاخته ای است که در سلولهای پوششی دستگاه تنفس، گوارش و ادراری مهره داران رشد و تکثیر می‌یابد. در این مطالعه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) Scanning Electron Microscopy نای و بورس فابریسیوس در جوجه‌هایی که به صورت تجربی به گونه *C.baileyi* آلوده شده بودند، مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌های مقاطع پافتی از مخاط نای و بورس با استفاده از گلوترآلدئید ۳٪ پایدار و در بافر فسفات شستشو گردید. پایدارسازی با استفاده از تتراکسید اسمیوم انجام، و مرحله شستشو تکرار و سپس در اتانول آگیری صورت گرفت. با استفاده از روش تغییر یافته CPD، نمونه‌ها خشک و سپس با کربن پوشش داده شده و نهایتاً با استفاده از SEM مورد مطالعه قرار گرفت. کلیه سطوح مخاطی بورس به دلیل آلودگی انگلی پوشیده شده بود ولی در نای تراکم انگل به میزان کمتری مشاهده گردید. سیستم موکوسیلیاری در نای قابل مشاهده نبود.

کلمات کلیدی: SEM، *C.baileyi*، نای، بورس فابریسیوس، جوجه گوشتی

Pajouhesh & Sazandegi No:63 pp:72-74

An Electronmicroscops study SEM of *Cryptosporidium baileyi* infection in the trachea and bursa of fabricius of broiler chickens

By: Nili, and H., Dadras, H, Department of Clinical Studies, School of Vererinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran, Banani, M. Razi Vaccine and Serum Research Institute. Tehran, Iran

Cryptosporidium is a small parasite living in the epithelial cells of the respiratory, gasterointestinal and the urinary systems of vertebrates. In this study by using scanning electron microscope (SEM), the trachea and the bursa of fabricius of broiler chickens experimentally infected by *C. baileyi* were examined. Tissue samples from the trachea and the bursa of fabricius were fixed in 3% gluteraldehyde, post-fixed in ascending concentration of ethanol and critical-point dried, mounted on aluminium stubs, coated with carbon and examined under SEM. All mucosal surfaces of the bursa were affected and very dense population of the parasite were observed on the epithelium. However less concentration of the parasite was observed on the tracheal epithelium. The mucocilliary apparatus was no longer visible.

Key words: *Cryptosporidium baileyi*, Trachea, Bursa of fabricius, SEM

مقدمه

بیماری کریپتوسپورییدیوز از جمله بیماریهای دام، طیور و انسان است که هم از نظر بهداشتی و هم از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت است. این بیماری توسط انگل کوکسیدیایی کوچکی از جنس کریپتوسپورییدیوم ایجاد می‌شود، انگل داخل میکروویولوس سلولهای مخاطی دستگاه تنفس، گوارش و ادراری مهره داران و از جمله پرندگان بسر می‌برد (۴).

در ایران اولین بار قراگوزلو و خداشناس (۵) وجود این انگل را بدون شناسایی گونه از یک خروس بومی گزارش کردند. همچنین نوری و همکاران (۱) حضور انگل را در مرغداری های اطراف تهران گزارش کردند. بنانی و همکاران (۲) برای اولین بار ابتلاء جوجه‌های گوشتی به *C.baileyi* را گزارش کردند. وجود انگل در قسمت‌های مخاطی دستگاه تنفس، گوارش و ادراری می‌تواند علاوه بر اختلال فعالیت‌های طبیعی مخاطات، به ویژه در دستگاه تنفس زمینه فعالیت سایر عوامل پاتوژن را فراهم آورد. عوامل بیماریزای متعددی از پرندگان مبتلا به کریپتوسپورییدیوم جدا شده‌اند که از جمله می‌توان گونه‌های مله اگریدیس، اینرس و آناتیس مایکوپلاسما همچنین *E. coli*، استافیلوکوکوس،

میکروکوکوس و برخی دیگر از اجرام بیماری زا را نام برد (۶).

در این مطالعه علاوه بر علائم بالینی و ضایعات کالبدگشایی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) مخاط دستگاه تنفس و بورس جوجه‌های آلوده شده به صورت تجربی مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که در شرایط مزرعه در ایران عواملی غیر بیماری زا در شرایط آزمایشگاهی، مانند ویروس آنفلونزا H_۱N_۲، توانسته اند تلفات و خسارات سنگینی را به طیور گوشتی وارد نمایند (Asasi و Nili (۱۰)، شایسته است نقش سایر عوامل بیماریزا در تخریب سیستم دفاع غیر اختصاصی دستگاههای بدن، بویژه دستگاه تنفس مورد بررسی قرار گیرد.

اگر چه روشهای تشخیصی متعددی در مورد شناسایی این انگل تک یاخته ای بکار گرفته شده است که از جمله می‌توان به رنگ آمیزی زیل نلسن، رنگ آمیزی فلورسنت و استفاده از روشهای سرولوژی اشاره کرد ولی استفاده از تکنیک SEM قادر است وسعت ضایعات و تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده در سطح مخاطات را به خوبی نشان دهد.

دانشکده مهندسی دانشگاه شیراز مورد مطالعه قرار می‌گرفت.

نتایج

تمامی جوجه های آلوده شده، آلودگی با *C.baileyi* را در بورس، کلوآک و مدفوع نشان می‌دادند. کوتولگی و عدم رشد در جوجه های مذکور کاملاً مشهود بود. مدفوع جوجه ها همانند موارد طبیعی بیماری از رنگ و قوام عادی برخوردار بود. در کالبدگشایی در یک مورد کیسه های هوایی کدر و پریکاردیت و سالیتریت تشخیص داده شد. در کالبدگشایی مخاط نای به ظاهر طبیعی به نظر می‌رسید.

جوجه های ۹ روزه ۷ روز پس از آلودگی به صورت تلقیح داخل چینه دان آلودگی شدید مخاط بورس فابریسیوس و مخاط نای مشاهده گردید. تصاویر تهیه شده با استفاده از SEM، تراکم انگل را در قسمت های مخاطی نای (تصویر ۱) بخوبی نشان می‌دهد. میزان آلودگی در سطح نای به حدی شدید بود که سیستم Mucociliary apparatus را کاملاً از بین برده و تمام سطح مخاطی نای از انگل پوشیده شده بود.

همچنین در بورس تراکم شدید انگل در سطح چین های داخلی بورس بخوبی مشهود بود (تصاویر ۲a,b).

بحث

در این مطالعه از SEM به منظور نشان دادن وسعت و شدت آلودگی در مخاط نای و بورس استفاده گردید. اگر چه تکنیک های مختلفی از جمله روشهای سرولوژی و رنگ آمیزی اختصاصی جهت شناسایی

مواد و روش کار**ایجاد تجربی بیماری**

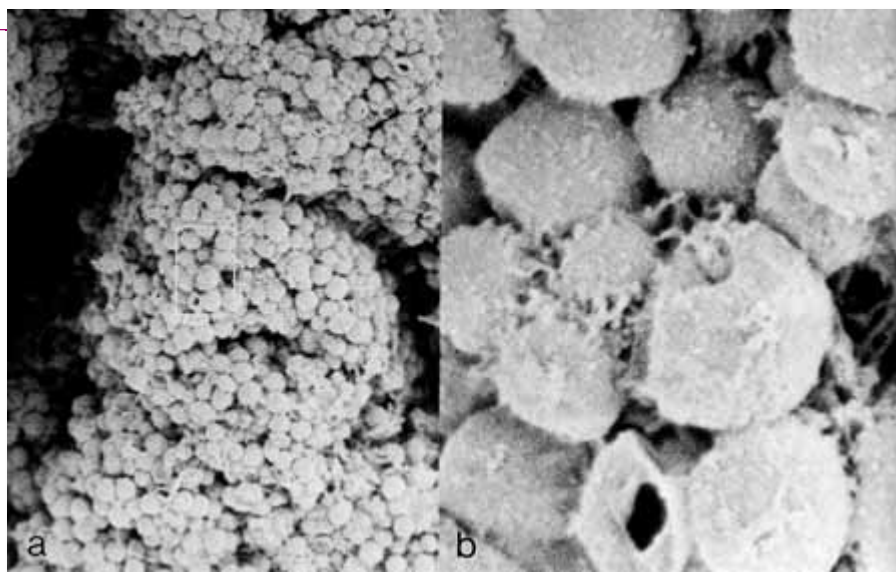
تعداد ۱۰ قطعه جوجه حساس ۲ روزه با نمونه های جدا شده از بورس های مبتلا به صورت خوراکی و از طریق داخل چینه دان، مشابه کار سایر محققین نظیر (۷) آلوده شدند. ۵ تا ۱۲ روز پس از آلوده سالی جوجه ها کشته شده و بلافاصله مورد کالبدگشایی قرار می‌گرفتند.

کلیه ضایعات مشاهده شده در اندامهای داخلی ثبت و از اندامهای بورس و نای مقاطع بافتی به ضخامت ۲ تا ۳ میلی متر تهیه و توسط محلول گلوترآلدهید پایدارسازی شده سپس سه مرتبه بوسیله بافر شستشو داده شد. پایدارسازی ثانویه با استفاده از تتراکسید اسمیوم ۱٪ انجام گرفته و مرحله شستشو تکرار گردید. سپس با استفاده از غلظت های افزایشنده اتانول (۳۰ تا ۱۰۰ درصد) آب گیری شده و متعاقباً با استفاده از روش Critical Point Drying خشک گردید (۹)، سپس در شرایط خلأ با استفاده از کربن پوشش داده شد و با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی SEM موجود در

شکل ۱: مخاط نای جوجه گوشتی ۹ روزه ۷ روز پس از آلودگی به صورت تجربی با *C.baileyi* در داخل چینه دان در تصویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی SEM مشاهده می‌شود. انگل کریپتوسپورییدیوم (Cryp) بزرگنمایی ۵۲۰۰.



شکل ۲: (a) در تصویر تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM با بزرگنمایی ۸۰۰ مخاط بورس نشان داده شده که کاملاً به وسیله انگل پوشیده شده است. (b) همان تصویر با بزرگنمایی ۸۰۰۰.



آلودگی *C. bailei* مورد استفاده قرار گرفته است. ولی تصاویر سه بعدی تهیه شده با استفاده از SEM بیانگر میزان آلودگی و تغییرات مرفولوژیک ایجاد شده در سطح مخاطات دستگاه تنفس و بورس می باشد. شدت ضایعات در دستگاه تنفس به حدی است که عمل سیستم Mucociliary apparatus را کاملاً مختل کرده و زمینه نفوذ اجرام پاتوژن را به قسمت های عمقی تر دستگاه تنفس فراهم ساخته است. اگر چه سرکوب سیستم ایمنی بویژه توسط بیماریهای ویروسی، در ابتلاء به عفونت های کریپتوسپورییدیایی نقش اساسی دارد، آلودگی به این انگل بویژه در دستگاه تنفس می تواند باعث از بین رفتن دفاع غیراختصاصی این دستگاه شده و زمینه گسترش عفونتهای تنفسی را فراهم سازد. در شرایط مزارع ایران عفونت های تنفسی حتی توسط عواملی که در شرایط آزمایشگاهی غیرپاتوژن هستند باعث ایجاد خسارات سنگین اقتصادی شده است (۱۰) توجه بیش از حد به عفونت های ویروسی می تواند نقش عوامل انگلی مانند *C. bailei* را تحت شعاع قرار دهد. بنابر این با توجه به بیماری زایی این انگل در تخریب سد دفاعی غیر اختصاصی دستگاههای بدن از جمله دستگاه تنفس، می تواند علت تلفات سنگین را در شرایط مزرعه تا حدودی توجیه نماید.

Nakamura و همکاران (۸)، بیماری کریپتوسپورییدیوز را توأم با اسپرژیلوس، عفونت های باکتریایی و تک یاخته آیمریا گزارش کرده اند. تعدادی از محققین انگل را از طیور مبتلا به ویروسهای نیوکاسل، آبله، برونشیت عفونی، کم خونی عفونی ماکیان و ... جدا نموده اند (۸،۶). در مطالعات سرولوژیکی با استفاده از تست الیزا بر روی گله های طیور کوشتی بیش از ۵۰ روزه، که توسط بنانی و همکاران (۳) انجام گردید، ۸/۲٪ گله ها آلوده به این انگل گزارش شد.

منابع مورد استفاده

۱- نوری، محمد. بزرگمهری فرد، محمد حسن و مصوری، نادر، ۱۳۷۳. بررسی کریپتوسپورییدیوز تنفسی و گوارشی در مرغداری های صنعتی اطراف تهران. مجله

- دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره ۴۹. شماره ۲. ص ۹۷-۹۳.
- 2-Banani M., Dadras H., Moazeni-Jula G., Hooshmand-Rad P. Khodashenas, M. Nili H., and Sajjadi M. 2000a; Isolation & Identification of *Cryptosporidium baileyi* and serologic incidence of cryptosporidium in Iran. World's Poultry Congress, Montreal, Canada 20-24.
- 3-Banani M., Dadras H., Moazeni-Jula G., Hooshmand-Rad P. 2000b; Serologic incidence of cryptosporidial infection in broiler flocks in shriaz, Iran. Arch. Razi Ins. 51:95-102
- 4-Fletcher O.J., Munnell J.F. and Page P.K. 1975; Cryptosporidiosis of the bursa of fabricius of chickens. Avian Diseases. 19: 630-639.
- 5-Gharagozlou M. Y. and Khodashenas, M. 1985; Cryptosporidiosis in a native rooster with chronic proliferative enteritis. Arch vet. 17: 129-138.
- 6-Goodwin M.A. 1989; Cryptosporidiosis in birds, a review, Avian Pathol. 18, 365.
- 7-Linsay, D.S. and Blagburn, B. L. 1986; Cryptosporidium infections in chickens produced by intra-cloacal inoculation of oocytes. Journal of Parasitology. 72: 615.
- 8-Nakamura K., and Abe, F., 1988. Respiratory (especially pulmonary) and urinary infections of cryptosporidium in layer chickens. Avian Pathology. 17, 703.
- 9-Nili H., & Kelly W.R., 1995; Form & function of lacuna in the ovary of laying hen. Anatomical Record. 244:165-174
- 10-Nili H., & Asasi K., 2002; Natural cases and an experimental study of H₉N₂ avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. Avian Pathology. 31:247-252