DOI: 10.22092/VJ.2020.342314.1702
شماره ۱۳۲ پاییز ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی وقوع کریپتوکوکوزیز در کبوتران شهر اهواز در فصول گرم

• **سید ساعد میرپوریان**
بهداشت و بیماری های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **فروغ طلازاده (نویسنده مسئول)**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **مسعود قربانپور**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **رمضانعلی جعفری**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۱۲-۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۳-۲۱
Email: f.talazadeh@scu.ac.ir

چکیده

پاتوزن قارچی فرصت‌طلب و زئونوز است که ممکن است باعث مننژو انسفالیت کشنده در افراد تحت سرکوب ایمنی شود. این مطالعه با هدف تعیین میزان آلودگی گله‌های کبوتر در اهواز انجام شده است.۴۰ نمونه مدفوع کبوتر از کبوترخانه‌ها، در فصول گرم جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری، DNA نمونه‌ها جهت تست PCR استخراج شد. جهت شناسایی جدایه‌های مثبت کریپتوکوکوس نئوفورمنس از یک جفت پرایمر در آزمون PCR استفاده شد. در ادامه برای افزایش دقت شناسایی، آزمون Nested PCR به کار گرفته شد. در مجموع ۱۱ نمونه از ۴۰ نمونه آلوده به کریپتوکوکوس نئوفورمنس بودند که ۲۷/۵٪ کل نمونه‌های جمع‌آوری شده بود. بر طبق این نتایج، کریپتوکوکوس نئوفورمنس در های کبوتر در اهواز شایع می‌باشد و این مسئله باید مورد توجه پرورش‌دهندگان کبوتر، دامپزشکان و سازمان بهداشت عمومی قرار گیرد. جهت کنترل و جلوگیری از بروز این بیماری، ضد عفونی گله‌ها توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: کریپتوکوکوس نئوفورمنس، کبوتر، شناسایی مولکولی

Veterinary Researches & Biological Products No 132 pp: 55-61

Survey on the incidence of cryptococcosis (causative agent of pigeon fancier's disease) in pigeons in warm seasons

By:Mirpourian, S. S., Poultry Diseases and Health, *Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Talazadeh, F., (Corresponding Author) Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Ghorbanpoor, M., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. and Jafari, R. A., Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.*

Received: 2020-03-15 **Accepted: 2020-06-14**

Email: f.talazadeh@scu.ac.ir

Cryptococcus neoformans is a worldwide opportunistic fungal zoonotic pathogen which may cause lethal meningoencephalitis in immunosupressed individuals. This study was carried to determine the infection rate of pigeon flocks in Ahvaz, the capital of Khuzestan province in Iran. The 40 Samples collected from lofts in warm seasons. The DNA of the samples was extracted for PCR test. A pair of primers was used to identify positive isolates of *Cryptococcus neoformans*. In the following, Nested PCR was used to increase the accuracy of identification. Totally 11 out of 40 samples (27/5%) were contaminated to C. neoformans. According to the results, *C. neoformans* is prevalent in pigeon flocks in Ahvaz area and should be considered by pigeon breeders, veterinarians and public health organizations. Disinfection of the flocks recommended to control and prevent this disease.

Key words: Molecular identification, *Cryptococcus neoformens*, pigeons

مقدمه

کریپتوکوکوزیس عفونت قارچی است که سیستم عصبی مرکزی را درگیر می‌کند. این عفونت هم برای افراد دارای نقص سیستم ایمنی و هم برای افراد سالم مضر می‌باشد. عفونت کریپتوکوکوزیس مهم‌ترین عفونت قارچی تهدیدکننده زندگی در بیماران ایدزی است که سبب مشکلات رو به رشدی در مدیریت بیمارانی که با مجموعه بیماری‌های مرتبط با ایدز درگیر هستند می‌شود. اثرات این بیماری برای این بیماران مخرب است به طوری که باعث مرگ و میر یا اختلال در عملکرد سیستم عصبی مرکزی می‌شود مگر اینکه این شرایط تشخیص داده شود و در ابتدای شروع بیماری درمان صورت گیرد (۱۳).

کریپتوکوکوزیس مسئول میزان گسترده مرگ و میر یا واگیری در بیماران ایدزی می‌باشد به شکلی که چهارمین عفونت رایج در افراد دارای نقص ایمنی می‌باشد (۱۲).

بیماری کریپتوکوکوزیس دارای دو گونه کریپتوکوکوس نئوفورمنس و کریپتوکوکوس گاتی می‌باشد که باعث بیماری در انسان می‌شود. این دو گونه در حدت، دامنه میزبانی، حساسیت ضدقارچی، اپیدمیولوژی و توزیع جغرافیایی با یکدیگر متفاوت هستند(۱۴).

در حال حاضر، کریپتوکوکوس نئوفورمنس بر اساس ویژگی‌های ژنتیکی و خصوصیات سرولوژی کپسول پلی‌ساکاریدی (CPS) به دو واریته کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته نئوفورمنس (سروتیپ D) و کریپتوکوکوس واریته گروبی (سروتیپ A) تقسیم می‌شود (۱۱).

کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گروبی گستردگی جهانی داشته و به طور طبیعی در درختان و مدفوع پرندگان وجود دارد. کریپتوکوکوس واریته نئوفورمنس غالباً در اروپا گزارش شده است (۷) اما کریپتوکوکوس گاتی غالباً محدود به مناطق گرمسیری و تحت گرمسیری است (۶). هم‌چنین کریپتوکوکوس گاتی در برخی مناطق معتدل یافت می‌شود که با درختان به ویژه *Eucalyptus camaldulensis* و *Eucalyptus tereticornis* در ارتباط است (۹). تحقیقات نشان می‌دهد که سروتیپ A سروتیپ غالب کریپتوکوکوس نئوفورمنس می‌باشد که از منابع محیطی و بیماران آلوده با ویروس HIV جداسازی شده است (۱).

کریپتوکوکوس نئوفورمنس مخمر همه جایی است و معمولاً با مدفوع پرندگان به ویژه مدفوع کبوتر در ارتباط است. این مخمر در فضولات کبوتر به مقدار فراوان یافت می‌شود و کبوتر بعنوان مخزن این مخمر نقش مهمي در نگهداري و انتشار آن دارد. به علت درجه حرارت بدن

پرندگان (۴۲ درجه سانتی‌گراد) و احتمالا بالا بودن میزان آهن سرم در پرندگان، این مخمر معمولاً در پرندگان بیماری ایجاد نمی‌کند (۱۸).
این قارچ در محیط وجود دارد و مکانیسم انتقال آن به انسان هنوز به طور کامل مشخص نیست. احتمالاً عفونت از طریق قرار گرفتن در معرض قطعات تکثیری (propagules) کریپتوکوکوس که در محیط وجود دارد مانند هاگ، مخمرهای دهیدراته حاصل می‌شود و این قطعات تکثیری می‌توانند به آلوئول‌های ریوی نفوذ کنند و سبب ایجاد بیماری شوند (۸).
روش‌های رایجی که به صورت کاربردی برای تشخیص این عامل استفاده می‌شوند شامل رنگ‌آمیزی India ink، کشت و روش‌های سرولوژیک و مولکولی (PCR base) می‌باشند. به دلیل خطای بالا و غیرحساس بودن روش رنگ‌آمیزی، نمی‌توان به عنوان روشی مطمئن به آن تکیه کرد. همچنین روش‌های مبتنی بر کشت هم وقت‌گیر بوده و همچنین هنگامی که سلول‌های مخمری در نمونه بالینی به دلایل مختلف از جمله کوتاهی در انتقال نمونه به آزمایشگاه مرده باشند، نتیجه این آزمایش منفی می‌شود (۵). روش‌های سرولوژیک از دو روش پیشین حساس‌تر است اما یافته‌های مثبت کاذب و منفی کاذبی که در نتایج حاصل از آنها به دست می‌آید، امر تشخیص را دچار مشکل می‌کند. علاوه بر این هر سه روش یاد شده نیاز به مهارت بالا برای تفسیر نتایج دارد که این مسئله احتمال تشخیص اشتباه را افزایش می‌دهد (۵). از این رو هیچ کدام از این روش‌های سنتی، حساسیت، ویژگی و سرعت قابل قبولی را ندارند. روش مولکولی مورد استفاده در سال‌های اخیر جهت تشخیص، PCR است که روشی سریع، حساس و دارای مزایای بسیاری است.
در دهه گذشته، برخی روش‌های شناسایی از روی تیپ DNA (دزوکسی ریبونوکلئیک اسید) جهت مطالعه اپیدمیولوژی کریپتوکوکوس نئوفورمنس به کار برده می‌شوند. این روش‌ها شامل کاریوتایپینگ، مطالعات هیبریداسیون DNA، چند شکلی طولی قطعات حاصل از برش (RFLP)، چند شکلی طولی قطعات تکثیر یافته DNA (AFLP)، چند ریختی تکثیر یافته تصادفی (random amplification of polymorphic DNA) و انگشت‌نگاری واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR fingering) می‌باشد. انگشت‌نگاری واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به عنوان روش تایپینگ اصلی در پروسه بررسی اپیدمیولوژی مولکولی جهانی مخمر کریپتوکوکوس نئوفورمنس مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵).
با توجه به اینکه بیماری کریپتوکوکوزیس یک بیماری زئونوز است از نظر بهداشت انسانی دارای اهمیت بالایی می‌باشد. مدفوع کبوتر از مخازن این مخمر می‌باشد لذا کریپتوکوکوس نئوفورمنس می‌تواند در صاحبان و پرورش دهندگان کبوتر، فروشندگان فروشگاه‌های پرندگان و دامپزشکانی که خصوصا دارای ضعف ایمنی بوده و در ارتباط با کبوتران هستند ایجاد بیماری نماید. با توجه به گسترش روزافزون نگهداری کبوتر و احتمال انتقال این بیماری به پرورش‌دهندگان و نگهدارندگان این دسته از پرندگان، این مطالعه با هدف تعیین وضعیت آلودگی گله‌های کبوتر به کریپتوکوکوس نئوفورمنس در فصول گرم در شهر اهواز انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه در فصول گرم از ۴۰ کبوترخانه نمونه اخذ شد. لازم به ذکر است از هر کبوترخانه به ازای هر پنج کبوتر موجود، پنج نمونه مدفوع از بستر جمع‌آوری و با یکدیگر مخلوط شد (pooled sample).

استخراج DNA جدایه‌های کریپتوکوکوس نئوفورمنس

DNA نمونه‌ها با استفاده از یک کیت ویژه استخراج (شرکت رهازیست پادتن) استخراج شدند. ابتدا سوسپانسیون ۱۰٪ در PBS از نمونه‌های مدفوع کبوتر تهیه شد. سپس نمونه‌ها ورتکس شده و در دور g ۸۰۰ به مدت s ۱۵ سانتریفیوژ شدند. مقدار µl ۲۵۰ از مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شده و در دور g ۵۰۰۰ به مدت min ۵ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد. مقدار µl ۳۵۰ از بافر لیز به رسوب اضافه شده و ترکیب حاصل به مدت s ۱۵ ورتکس شد. نمونه‌ها در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل min ۳۰ انکوبه شدند. سپس در دور g ۱۰۰۰۰ به مدت min ۱ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به میکروتیوب‌های دارای ستون منتقل شد. میکروتیوب‌ها در دور g ۷۰۰۰ به مدت min ۱ سانتریفیوژ شدند. مجدداً مایع زیرین به ستون منتقل شد. میکروتیوب‌ها در دور g ۷۰۰۰ به مدت min ۱ سانتریفیوژ شده و مایع زیر ستون تخلیه شد. مقدار µl ۵۰۰ محلول شستشوی (۱) به ستون اضافه شد. میکروتیوب‌ها در دور g ۱۴۰۰۰ به مدت min ۲ سانتریفیوژ شدند و مایع زیر ستون تخلیه شد. مقدار µl ۷۵۰ محلول شستشوی (۲) (همراه با الکل) به ستون اضافه شد و در دور g ۱۴۰۰۰ به مدت min ۲ سانتریفیوژ شدند. مایع زیر ستون تخلیه شده و مجدداً در دور g ۱۴۰۰۰ به مدت min ۳ سانتریفیوژ شدند. سپس ستون به میکروتیوب ۱/۵ انتقال یافته و µl ۵۰ محلول آزادسازی به داخل ستون اضافه شد. پس از min ۵ انکوباسیون در دمای اتاق میکروتیوب‌ها در دور g ۱۴۰۰۰ به مدت min ۲ سانتریفیوژ شدند. در پایان، ستون دور ریخته شده و رسوب باقی مانده در میکروتیوب در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شده و به عنوان نمونه DNA استفاده شد.

شناسایی مولکولی کریپتوکوکوس نئوفورمنس

مطابق روش چا و همکاران (۳) جهت شناسایی کریپتوکوکوس نئوفورمنس، Nested-PCR با استفاده از دو مجموعه پرایمر ژن CNLAC۱ انجام گرفت که به ترتیب محصولاتی با bp ۱۳۸۶ و bp ۶۹۰ تولید کردند. جهت همانندسازی اولیه مجموعاً µl ۲۵ مخلوط واکنش شامل µl ۲ از جفت پرایمر خارجی ژن CNLAC۱ (هر µl ۱)، مقدار µl ۲/۵ (۲۰ ng) از DNA الگو، µl ۸ آب مقطر، µl ۱۲/۵ مسترمیکس X۲ (شامل mM ۱/۵ منیزیم کلرید و mM ۰/۲ dNTP) استفاده شد. شرایط دمایی با استفاده از مستر سایکلر در جدول ۱ ذکر گردیده است.
در هر مجموعه از DNA، PCR کریپتوکوکوس نئوفورمنس ATCC ۶۶۰۳۱ به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر مخصوص PCR به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. جهت همانندسازی ثانویه، مجموعاً µl ۲۵ مخلوط واکنش شامل µl ۲ جفت پرایمر داخلی ژن CNLAC۱ (هر پرایمر µl ۱)، µl ۰/۱ محصول PCR اولیه، µl ۱۰/۴ آب مقطر و µl ۱۲/۵ مسترمیکس X۲ استفاده شد. سیکل دمایی در جدول ۲ توضیح داده شده است.
محصولات اولیه و ثانویه PCR با الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ در بافر TAE [۱۰۰ mM Tris HCl (pH ۹/۰), ۴۰ mM EDTA] حاوی safe stain

آنالیز شد و زیر تابش نور UV مشاهده شد. اندازه محصولات همانندسازی در مقایسه با نشانگر DNA (ladder) ۱۰۰ جفت بازی ارزیابی شد.

نتایج

شناسایی مولکولی با روش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز)

شناسایی مولکولی با استفاده از ژن CNLAC۱ با استفاده از دو مجموعه پرایمر صورت گرفت (شکل ۱ و ۲). از مجموع ۴۰ نمونه پولد شده که در فصول گرم جمع‌آوری شده بود، ۱۱ نمونه پولد شده در آزمون PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) و Nested PCR مثبت شدند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ۲۷/۵٪ کل نمونه‌های جمع‌آوری شده آلوده به کریپتوکوکوس نئوفورمنس بود.

یک جدایه مشکوک به کریپتوکوکوس نئوفورمنس (ستون ۲) به همراه کنترل مثبت (ستون ۱) و کنترل منفی (ستون ۳) و نمونه منفی (ستون ۴

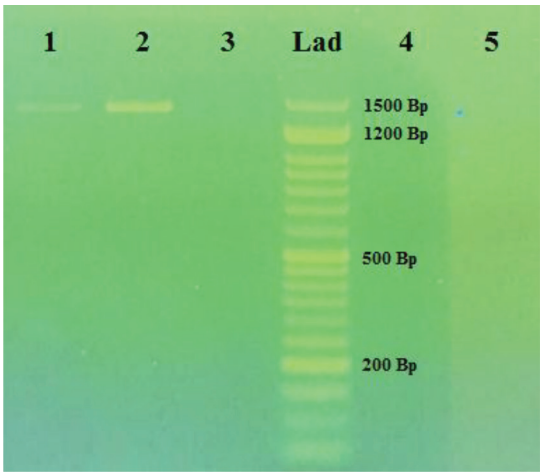
جدول ۱- توالی پرایمر همانند سازی اولیه جهت شناسایی مولکولی کریپتوکوکوس نئوفورمنس.

نام پرایمر	توالی پرایمری(′۵–′۳)	اندازه محصول PCR(bp)	شرایط دمایی	شماره رفرانس
پرایمر خارجی ژن *CNLAC۱*	F-ACGGTGTCCCTGGTATAA R-GCGTTGGACGATTGAAAG	۱۳۸۶	مرحله دناتوراسیون اولیه (predenaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ min، ۳۰ سیکل (شامل مرحله دناتوراسیون (denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ s، مرحله اتصال (annealing) در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ s، مرحله طویل سازی (elongation) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ s و مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ min	۳

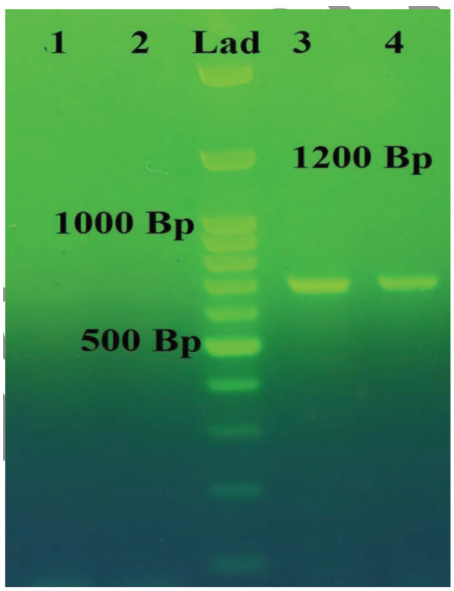
جدول ۲- توالی پرایمر همانند سازی ثانویه جهت شناسایی مولکولی کریپتوکوکوس نئوفورمنس.

نام پرایمر	توالی پرایمری(′۵–′۳)	اندازه محصول PCR(bp)	شرایط دمایی	شماره رفرانس
پرایمر خارجی ژن *CNLAC۱*	F-CACTCGCCCAATGAACC R-TATACCTCACCACCGCC	۶۹۰	مرحله دناتوراسیون اولیه (predenaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ min، ۳۰ سیکل (شامل مرحله دناتوراسیون (denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ s، مرحله اتصال (annealing) در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ s، مرحله طویل سازی (elongation) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ s و مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ به مدت ۵ min	۳

و ۵) که مورد مثبت محصولی با طول ۱۳۸۶ جفت باز تولید نموده است. یک جدایه مشکوک به کریپتوکوکوس نئوفورمنس (ستون ۴) به همراه کنترل مثبت (ستون ۳) و کنترل منفی (ستون ۱) و نمونه منفی (ستون ۲) که مورد مثبت محصولی با طول ۶۹۰ جفت باز تولید نموده است.



شکل ۱- الکتروفورز در ژل آگارز محصول PCR مرحله‌ی اول.



شکل ۲- الکتروفورز در ژل آگارز محصولات PCR مرحله‌ی دوم (Nested PCR).

بحث

بیماري‌هاي قارچي انساني به عنوان پديده بزرگ قرن بيستم و بيست و يكم شناخته شده‌اند؛ از جمله اين بيماری‌ها كريپتوكوكوز است. كريپتوكوكوز يكي از عفونت‌هاي قارچي فرصت‌طلب است كه اغلب به وسيله كريپتوكوكوس نئوفورمنس (*Cryptococcus neoformans*) و يا كريپتوكوكوس گاتی (*Cryptococcus gattii*) عارض می‌شود. كريپتوكوكوز مهم‌ترين بيماري قارچي با عامل مخمري است كه گسترش جهاني داشته كه انسان و برخي از ساير پستانداران بخصوص مبتلايان به نقصان‌های ايمنی را درگير مي‌سازد. در انسان بيماري اغلب با سركوب ايمني يا وارد شدن مقادير زياد مخمر همراه بوده است (۱۸).

مدفوع کبوتر به عنوان عامل اصلی محیطی در ارتباط با عفونت‌های قارچی مخمری شکل در برخی کشورها گزارش شده است. مدفوع کبوتر منبع تغذیه‌ای خوبی برای رشد کریپتوکوکوس نئوفورمنس شناخته شده است (۴)، خصوصاً اگر مدفوع کبوتر در محل نگهداری کبوتر انباشته شود و به مدت طولانی باقی بماند شرایط محیطی مناسبی شامل تاریکی، رطوبت و دما پیدا می‌کند که کریپتوکوکوس نئوفورمنس می‌تواند زنده بماند و رشد کند (۳).

در مطالعه حاضر، کریپتوکوکوس نئوفورمنس از مدفوع خشک کبوتر در فصول گرم به شکل پراکنده از مناطق مختلف اهواز جمع‌آوری شد. از مجموع ۴۰ نمونه مدفوع پولد شده، ۱۱ نمونه حاوی مخمر کریپتوکوکوس نئوفورمنس بودند که این میزان برابر با ۲۷/۵٪ از نمونه‌ها می‌باشد.

در مطالعه اخیر، ما موفق به جداسازی کریپتوکوکوس نئوفورمنس از مدفوع خشک کبوتر شدیم. مطالعات قبلی نشان داد که کریپتوکوکوس نئوفورمنس به ندرت از مدفوع تازه جداسازی می‌شود و جداسازی این مخمر از مدفوع خشک به‌طور چشمگیری بیشتر از مدفوع مرطوب و تازه است (۲، ۱۰، ۱۴). در حقیقت مدفوع خشک سوبسترای مورد علاقه جهت رشد مخمر است به این علت که باکتری کمتری در آن وجود دارد رقابت کمتری جهت رشد این مخمر می‌باشد. این مسئله می‌تواند تراکم جمعیتی بیشتری از این مخمر در سوبسترا را توضیح دهد (۲۱). هر چند وو و همکاران (۲۳) در شهر پکن چین چندین سویه از کریپتوکوکوس نئوفورمنس را از مدفوع تازه جداسازی کردند.

چندین مطالعه در ایران بر روی این موضوع انجام شده است که در زیر به برخی از آنها اشاره می‌کنیم:

میکائیلی (۱۶) در مطالعه ای بر روی مدفوع ۱۰۰۰ کبوتر در کرمانشاه بیان کردند که تنها ۸ مورد از ۱۰۰۰ نمونه مدفوع (۰/۸٪) به مخمر کپسول دار کریپتوکوکوس نئوفورمنس آلوده بودند.

یوسفی و همکاران (۲۴) در قزوین تنها ۴٪ عفونت با کریپتوکوکوس نئوفورمنس را توسط PCR و روش‌های مولکولی گزارش کردند. آنها هم چنین عفونت با کریپتوکوکوس یونیگوتولاتوس را ۵/۷٪، کریپتوکوکوس آلبیدوس را ۴/۳٪ و کریپتوکوکوس هیومیکولا را ۱/۴٪ گزارش کردند.

در مطالعه زرین و همکاران (۲۵)، ۳۴٪ نمونه‌های حاصل آلوده به کریپتوکوکوس نئوفورمنس بودند تفاوت مطالعه ما با این مطالعه این است که در این مطالعه، آزمون‌های مولکولی (PCR و Nested PCR) انجام شد در حالی‌که در مطالعه قبلی (۲۵) فقط برای جداسازی از روش کشت بهره‌گیری شد. اگر چه روش‌های سنتی مبتنی بر کشت

در مواردی هنوز به عنوان استاندارد طلایی مطرح است ولی عموماً ویژگی‌های یک روش مطلوب در شناسایی سریع میکروارگانیسم‌ها از جمله کریپتوکوکوس نئوفورمنس را ندارند. این مسئله که در روش‌های کشت و رنگ‌آمیزی نتایج منفی رخ می‌دهد هم به دلیل حساسیت کم این آزمایش‌ها و گاهی نیز ممکن است به دلیل دیر رسیدن نمونه به آزمایشگاه باشد که در این حالت ممکن است سلول‌های کریپتوکوکوس نئوفورمنس از بین رفته باشند. در روش‌های کشت و رنگ‌آمیزی نیاز به سلول‌های زنده است و اگر سلول‌ها به دلایل مختلفی از جمله کوتاهی در انتقال نمونه به آزمایشگاه مرده باشند، منفی کاذب رخ می‌دهد. اما در واکنش PCR، چون تنها به ژنوم عامل مورد نظر نیاز است، حتی در صورت وجود سلول‌های مرده، نتیجه آزمایش مثبت خواهد شد (۱۹). این مسئله حساسیت آزمایش PCR را تاحد زیادی افزایش داده است و دلیلی دیگر برای مناسب‌بودن این روش به عنوان یک روش تشخیص بالینی مطمئن است (۲۲).

در این مطالعه از آزمایش nested PCR انجام شد که این تکنیک حداقل ۱۰۷ برابر حساس‌تر از PCR معمولی می‌باشد (۳).

در مطالعه افشاری و همکاران (۱) در استان مازندران، تنها ۲۰ جدایه کریپتوکوکوس نئوفورمنس از ۴۰۰ نمونه مدفوع کبوتر (۵٪) از شهرهای استان مازندران جداسازی شد.

همان‌طور که ملاحظه گردید، جداسازی این مخمر به طور قابل توجهی در مناطق مختلف ایران از ۰/۸٪ در غرب (۱۶) تا ۳۴٪ در جنوب (۲۵) متفاوت بوده است این در حالی است که در بررسی حاضر شیوع ۲۷/۵٪ کریپتوکوکوس نئوفورمنس را نشان داد. چندین فرضیه می‌تواند دلیل این تفاوت را روشن کند. تنوع شرایط بومی و اقلیمی شامل PH، رطوبت نسبی و در معرض نور خورشید قرار گرفتن مدفوع کبوتر می‌تواند جداسازی این مخمر را تحت تاثیر قرار دهد (۱).

روزاریو و همکاران (۲۰) با بررسی ۳۳۱ نمونه جمع‌آوری شده از کلوآک کبوتر از اسپانیا، ۲۶ جدایه کریپتوکوکوس (۷/۸٪) را شناسایی کردند.

الابیب و همکاران (۸) در لیبی تعداد ۳۲ جدایه کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گروبی را از ۱۰۰ نمونه مدفوع کبوتر با روش تایپینگ مولکولی جداسازی کردند.

چی و لی (۴) ۷۲ نمونه مدفوع کبوتر از ۲۶ ناحیه مختلف شهر سئول جمع‌آوری کردند و رخداد کریپتوکوکوس نئوفورمنس را بررسی کردند. ۱۷ نمونه از ۸ ناحیه مختلف از نظر این مخمر مثبت بودند.

بر طبق نتایج این مطالعه، کریپتوکوکوس نئوفورمنس در گله‌های کبوتر در منطقه اهواز شایع می‌باشد و این موضوع باید مورد توجه پرورش دهندگان کبوتر، دامپزشکان و سازمان‌های بهداشت عمومی قرار گیرد. جهت کنترل و جلوگیری از بروز این بیماری، ضدعفونی گله‌ها توصیه می‌شود.

با توجه به جداسازی کریپتوکوکوس نئوفورمنس در منطقه اهواز و به دلیل حساسیت افراد دارای ضعف ایمنی به این بیماری، از احداث پناهگاه کبوتران در اطراف بیمارستان انسانی باید جلوگیری شود. افراد دارای نقص ایمنی مثل ایدز، رماتیسم، دیابت، هپاتیت B و ... نباید در تماس با کبوتران در منطقه اهواز باشند. هم چنین اگر پرورش‌دهندگان دارای نقص ایمنی باشند آنها نباید در تماس با کبوتران در این منطقه باشند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب شماره پژوهانه (Scu.VC۹۹,۳۷۲) در انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

1.Agha Kuchak Afshari, S., T. Shokohi, R. Aghili and H. Badali. 2012. Epidemiology and molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from pigeon excreta in Mazandaran province, northern Iran. *Journal de mycologie medicale* 22: 160-166.

2.Baroni, F. D. A., C. R. Paula, E. G. Silva, F. C. Viani, I. N. Rivera, M. T. B. D. Oliveira and W. Gambale. 2006. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48: 71-75.

3.Chae, H. S., G. N. Park, S. H. Kim, H. J. Jo, J. T. Kim, H. Y. Jeoung, D. J. An, N. H. Kim, B. W. Shin, Y. I. Kang and K. S. Chang. 2012. Rapid direct identification of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings by nested PCR using CNLAC1 gene. *Poultry Science* 91: 1983-1989.

4.Chee, H. Y. and Y. K. Kim. 2003. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (*serotype A*) from pigeon droppings in Seoul, Korea. *Mycobiology* 31: 162-165.

5.Chen, J., A. Varma, M. R. Diaz, A. P. Litvintseva, K. K. Wollenberg and K. J. Kwon-Chung. 2008. *Cryptococcus neoformans* Strains and Infection in Apparently Immunocompetent Patients, China. *Emerging infectious diseases* 14: 755-762.

6.Chen, S. C., W. Meyer and T. C. Sorrell. 2014. *Cryptococcus gattii* infections. *Clinical microbiology reviews* 27: 980-1024.

7.Cogliati, M. 2013. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. *Scientifica* 2013.

8.Ellabib, M. S., A. Aboshkiwa, W. M. Husien, R. D'Amicis and M. Cogliati. 2016. Isolation, Identification and Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans* from Pigeon Droppings and Other Environmental Sources in Tripoli, Libya. *Mycopathologia* 181: 603-608.

9.Ellis, D. H and T. J. Pfeiffer. 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of clinical microbiology* 28: 1642-1644.

10.Gonzalez-Hein, G., J. Gonzalez-Hein and M. C. Jarabran. 2010. Isolation of *Cryptococcus neoformans* in dry droppings of captive

birds in Santiago, Chile. *Journal of avian medicine and surgery* 24: 227-236.

11.Heitman, J., T. R. Kozel, K. J. Kwon-Chung, J. R. Perfect and A. Casadevall. 2010. Cryptococcus: from human pathogen to model yeast. Washington: ASM Press.pp:32-40.

12.Hubalek, Z. 1975. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitat. *Folia Parasit* 22: 73-79.

13.Kwon-Chung, K, J., J. A. Fraser, T. L. Doering, Z. A. Wang, G. Janbon, A. Idnurm and Y. S. Bahn. 2014. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4: a019760.

14.Loperena-Alvarez, Y., P. Ren, X. Li, D. J. Schoonmaker-Bopp, A. Ruiz, V. Chaturvedi and C. Rios-Velazquez. 2010. Genotypic characterization of environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Puerto Rico. *Mycopathologia* 170: 279-285.

15.Meyer, W., A. Castaneda, S. Jackson, M. Huynh, E. Castaneda and the IberoAmerican Cryptococcal Study Group. 2003. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates. *Emerging Infectious Diseases* 9: 189-195.

16.Mikaili, A. 2001. *Cryptococcus neoformans* in excreta of pigeons of Kermanshah. *Journal of Kermanshah University of Medical Sciences* (*behbood*) 5: 71-73.

17.Mseddi, F., A. Sellami, M. A. Jarboui, H. Sellami, F. Makni and A. Ayadi. 2011. First Environmental Isolations of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Tunisia and Review of Published Studies on Environmental Isolations in Africa. *Mycopathologia* 171: 355-360.

18.Nnadi, N. E., I. B. Enweani, M. Cogliati, G. M. Ayanbimpe, M. O. Okolo, E. Kim, M. Z. Sabitu, G. Criseo, O. Romeo and F. Scordino. 2016. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* VNII isolates in Jos, Plateau State, Nigeria. *Journal de mycologie medicale* 26(4): 306-311.

19.Raimondi, A., R. Ticozzi, G. Sala and M. Grazia Bellotti. 2007. Genotype-based differentiation of the *Cryptococcus neoformans* serotypes by combined PCR-RFLP analysis of the capsule associated genes CAP10 and CAP 59. *Medical mycology* 45: 491-501.

20.Rosario, I., M. Hermoso de Mendoza, S. Deniz, G. Soro, I. Alamo and B. Acosta. 2005. Isolation of *Cryptococcus species* including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses* 48: 421–424.

21.Ruiz, A., R. A. Fromtling and G. S. Bulmer. 1981. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. *Infection and immunity* 31: 560-563.

22.Shahhosseiny, M. H., S. Beglari, M. Bayat, E. Moslemi and M. Ghahri. 2014. Improvement of the Molecular diagnosis of *Cryptococcus neoformans* using Internal Control. *Iran South Medical Journal* 17(3): 377-390.

23. Wu, Y., P. G. Du, W. G. Li and J. X. Lu. 2012. Identification and Molecular Analysis of Pathogenic Yeasts in Droppings of Domestic Pigeons in Beijing, China. *Mycopathologia* 174: 203-214.

24.Yousefi, N., M. R. Aghamirian and H. Jahani Hashemi. 2010. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from Pigeon Feces in Qazvin city. PhD Thesis from Qazvin University of Medical Sciences and Health Services (In Persian).

25.Zarrin, M., M. Jorfi, N. Amirrajab and M. Rostami. 2010. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings in Ahwaz, Iran. *Turk Journal Medical Sciences* 40: 313-316.