Archive of SID

جداسازی کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی از درختان اکالیپتوس کامالدولنسیس

فرحناز بینشیان*[1](M.Sc)، فریده زینی[2](Ph.D)

۱ - *دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، بخش میکروبیولوژی*

۲ - *دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، بخش قارچ شناسی*

چکیده

سابقه و هدف: در استرالیا، درخت اکالیپتوس کامالدولنسیس به عنوان تنها مخزن محیطی کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی می‌باشد. با توجه به کشت اکالیپتوس کامالدولنسیس در ایران و آلودگی اولیه این درختان به علت استفاده از بذرهای وارداتی اکالیپتوس کامالدولنسیس حاوی میسلیوم دی کاریوتیک از استرالیا، در این مطالعه وجود کریپتوکوکوس نئوفورمنس در اکالیپتوس کامالدولنسیس بررسی شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌گیری، شامل ۳۸۰ نمونه برگ، ۳۰۰ نمونه گل، ۳۸۰ نمونه پوست درخت و ۸۰ نمونه میوه از ۳ منطقه گرمسار، آموزشکده منابع طبیعی گنبد و سد قابوس وشمگیر انجام شد. سوسپانسیون نمونه‌ها در محیط Sc و Niger seed agar (NSA) کشت و ۷ روز در اتو ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و مخمرهای بدست آمده به روش‌های لاکتوفنل‌کاتن بلو و مرکب چین رنگ آمیزی و از طریق محیط‌های کورن میل آگار+توئین ۸۰ و اوره‌آگار شناسایی شدند.

یافته‌ها: مجموعاً ۱۳۸ نمونه مخمر قادر به تولید بلاستوسپور روی محیط کورن میل و ایجاد رنگ ارغوانی روی اوره آگار بودند. با استفاده از کیت API 20c Aux دو مورد کریپتوکوکوس نئوفورمنس، یکی از گرمسار و دیگری از سد قابوس وشمگیر و ۴۳ مورد کریپتوکوکوس آلبیدوس و ۳۶ مورد کریپتوکوکوس لارنتی و ۵۷ مورد کریپتوکوکوس SP شناسایی شدند. به منظور تسریع تشکیل ملانین از محیط NSA حاوی ۰/۱ درصد گلوکز استفاده شد. در نتیجه کریپتوکوکوس نئوفورمنس، در محیط فوق پیگمان قهوه‌ای پررنگ ولی اکثریت استرین‌های کریپتوکوکوس لارنتی رنگ سبز و تعدادی از کریپتوکوکوس SP رنگ آبی ایجاد کردند. با استفاده از دو روش گلایسین سیکلوهگزامید فنل قرمز (GCP) و کاناوانین گلایسین برموتیمول آبی (CGB)، هویت کریپتوکوکوس نئوفورمنس بدست آمده از گل و میوه درخت اکالیپتوس کامالدولنسیس مشخص شد. از آموزشکده منابع طبیعی گنبد، ۳ مورد هندرسونلا تورولوئیده نیز از پوست درختان اکالیپتوس کامالدولنسیس ایزوله گردید.

نتیجه گیری: نتایج فوق نشان می‌دهند که بذر اکالیپتوس‌های وارد شده از استرالیا دارای آلودگی اولیه به کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی می‌باشد. این مطالعه همچنین نشان داد که محیط CGB، بهترین وسیله برای شناسائی واریته‌های کریپتوکوکوس نئوفورمنس بوده ولی برای تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس از کریپتوکوکوس لارنتی قابل استفاده نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کریپتوکوکوس نئوفورمنس، اکالیپتوس

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۳۱-۳۳۳۲۰۸۰، نمابر: ۰۲۳۱-۳۳۳۱۵۵۱

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یکی از درختان مهم و زود رشد که می‌تواند نقش سازنده‌ای در فضای سبز و جنگل داشته باشد اکالیپتوس است که شهرتی بی‌نظیر در عالم گیاهی دارد. اکالیپتوس که قسمت اعظم جنگل‌های استرالیا را تشکیل داده است و بومی این مناطق می‌باشد بیش از درختان دیگر در نقاط مختلف دنیا توسعه یافته و مورد استفاده بیشتر قرار گرفته است. به دلیل سازگاری بالای اکالیپتوس با محیط و به علت بهره‌دهی مداوم و مناسب بسیار مورد توجه است و در نقاط مختلف دنیا به منظورهای مختلف کشت می‌شود. آنچه از قدیم مورد توجه مردم به خصوص بومیان استرالیا بوده است خواص درمانی گیاه و استفاده از آن جهت پرورش زنبور عسل می‌باشد[۲].

یکی از وسایل پیشگیری از بیماری مالاریا از بین بردن مرداب‌ها و باطلاق‌ها است و گونه اکالیپتوس کاماالدولنسیس در ایران نیز برای خشک کردن باطلاق‌های شمال که منبع پشه مالاریا بود آورده شد[۱]. بررسی‌های محیطی ثابت کردند که کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی یک ارتباط اکولوژیکی ویژه با اکالیپتوس کاماالدولنسیس داشته باشد[۹]. تمامی موارد جدا شده کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی با اکالیپتوس کاماالدولنسیس ارتباط داشتند. به نظر می‌رسد که انتشار جهانی اکالیپتوس کاماالدولنسیس با انتشار اپیدمیولوژیکی کریپتوکوکوزیس ایجاد شده توسط کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی مطابقت داشته باشد[۸]. کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی اخیراً از گونه‌های دیگر درختان اکالیپتوس از قبیل اکالیپتوس رودیس، ترتیکورنیس، گومفوسفالا نیز جدا گردیده است [۱۳].

کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی ممکن است از استرالیا به وسیله بذرهای اکالیپتوس کاماالدولنسیس حاوی میسلیوم دی‌کاریوتیک واجد قارچ به دیگر نواحی صادر شده باشد. با صدور این درخت به آفریقا، آسیای جنوب شرقی، برزیل، مکزیک، کالیفرنیا و هاوائی بیماری ناشی از همین عامل گزارش گردید و چون برای ابتلاء نیاز به تماس با این درخت در وقت گل دهی آن است شیوع آن در بیماران ایدزی بسیار پائین می‌باشد [۹،۸].

در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری از قبیل استرالیا و کالیفرنیای جنوبی ملازمتی بین شیوع بالای کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی و منتزیت کریپتوکوکی در دیگر افراد نرمال وجود دارد[۷].

تاکنون ارگانیسم جدا شده از بیماران در ایران، فقط کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته نئوفورمنس بوده و واریته گتی از بیمار جدا نشده است. لذا از یک طرف با توجه به کشت اکالیپتوس در ایران که بیشتر به منظور مصارف داروئی بوده و مخزنی نیز برای این واریته به شمار می‌رود و از طرف دیگر، آلودگی اولیه این درختان و نیز از آنجایی که عفونت اولیه کریپتوکوکوزیس ریوی به دنبال استنشاق مخمر رخ می‌دهد بررسی وجود کریپتوکوکوس نئوفورمنس در اکالیپتوس کاماالدولنسیس کاملاً ضروری است. هدف این تحقیق، بررسی وجود کریپتوکوکوس نئوفورمنس در اکالیپتوس کاماالدولنسیس در بعضی از مناطق شمالی ایران است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و مناطق مورد بررسی. در این بررسی، آموزشکده منابع طبیعی گنبد کاووس، سد قابوس وشمگیر و گرمسار که محل کشت اکالیپتوس کاماالدولنسیس بودند جهت نمونه برداری انتخاب گردیدند. مجموعاً از ۲۰۰ اصله درخت در آموزشکده منابع طبیعی گنبد کاووس ۶۰۰ نمونه (۲۰۰ نمونه برگ، ۲۰۰ نمونه پوست درخت و ۲۰۰ نمونه گل)، از ۱۰۰ اصله درخت سد قابوس وشمگیر مجموعاً ۳۰۰ نمونه (۱۰۰ نمونه برگ، ۱۰۰ نمونه گل، ۱۰۰ نمونه پوست درخت) و از ۸۰ اصله درخت گرمسار مجموعاً ۲۴۰ نمونه (۸۰ نمونه برگ، ۸۰ نمونه پوست درخت و ۸۰ نمونه میوه) تهیه شدند. سد قابوس وشمگیر به خاطر دارا بودن کلکسیونی از درختان اکالیپتوس کاماالدولنسیس که همگی کشت هم زمان داشتند حائز اهمیت بود.

www.SID.ir

Archive of SID

روش کشت. تعدادی از برگ‌های موجود در هر نمونه به وسیله قیچی به قطعات بسیار کوچکی تبدیل می‌گردیدند و مقداری از برگ‌های خرد شده به لوله‌های حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریل و ۲ میلی لیتر از محلول آنتی‌بیوتیکی استرپتومایسین و پنی‌سیلین اضافه می‌شد و توسط Mixer کاملاً مخلوط می‌گردید لوله‌های حاوی سوسپانسیون به مدت ۲۰ - ۱۵ دقیقه به حالت سکون قرار می‌گرفت تا ذرات سنگین ته‌نشین شوند سپس ۰/۵ میلی لیتر از رویه سوسپانسیون توسط پی‌پت استریل به محیط Sc و ۰/۵ میلی لیتر دیگر به محیط Niger seed agar (NSA) منتقل گردیده و توسط لوپ استریل در سطح محیط‌های کشت پخش می‌گردید کشت‌ها پس از درج شماره نمونه و تاریخ کشت در انکوباتور ۳۰ - ۲۵ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفتند. نمونه‌های گل، میوه، پوست نیز همانند کشت برگ، آماده و کشت می‌گردیدند پس از انجام کشت و قرار دادن آنها در درجه حرارت مناسب به مدت ۷ روز به طور روزانه پلیت‌های Sc و NSA از نظر رشد مخمر مورد بررسی قرار می‌گرفتند. از آنجائی که قارچ‌های ساپروفیت بسیار سریع‌الرشد بودند لذا به محض مشاهده هر گونه کلنی مخمری، پس از بررسی میکروسکوپی، به محیط مجزائی منتقل کرده و با به دست آوردن کشت خالص مخمر، آزمایش‌های مربوط به شناسائی کریپتوکوکوس نئوفورمنس انجام می‌گردید.

تشخیص اولیه این مخمرها بر اساس شکل ظاهری، رنگ و قوام کلنی، آزمایش مستقیم میکروسکوپی با استفاده از رنگ آمیزی لاکتوفنل‌کاتن‌بلو صورت می‌گرفت.

برای مشاهده کپسول از رنگ آمیزی مرکب چین استفاده می‌شد چون استرین‌های کریپتوکوکوس نئوفورمنس به دست آمده از منابع ساپروبیک معمولاً فاقد کپسول و یا دارای کپسول ناچیزی هستند برروی همه نمونه‌ها اعم از سلول‌های واجد کپسول یا فاقد کپسول آزمایش‌های تشخیصی کورن‌میل آگار، اوره، جذب قندها توسط سیستم API 20c Aux، گلایسین‌فنل‌رد آگار، کاناوانین‌گلایسین‌برموتیمول‌بلو آگار انجام گرفت.

نتایج

الف - منطقه گرمسار. از ۲۴۰ نمونه (برگ، میوه، پوست) گرفته شده از گرمسار فقط ۳۱ نمونه مخمری قادر به تولید بلاستوکونیدیا در روی محیط کورن‌میل آگار و ایجاد رنگ ارغوانی بر روی محیط اوره آگار بودند. تمام این نمونه‌ها در محیط NSA ۱ درصد گلوکز، کلنی‌های قهوه‌ای (با شدت رنگ متفاوت) تولید کردند به استثناء دو نمونه که سبب تغییر رنگ سبز در محیط NSA ۰/۱ درصد گلوکز شده بودند که شدت تولید پیگمان در محیط نیجرسید آگار حاوی ۰/۱ درصد گلوکز در مقایسه با محیط نیجرسید آگار حاوی ۱ درصد گلوکز بیشتر و نمایان‌تر بود.

نتایج جذب قند با استفاده از کیت API 20 c Aux به شرح زیر بود:

۱ - ۱ مورد کریپتوکوکوس نئوفورمنس از میوه درخت اکالیپتوس کامالدولنسیس.

۲ - ۲ مورد کریپتوکوکوس لارنتی از میوه (مسبب تغییر رنگ سبز در محیط NSA).

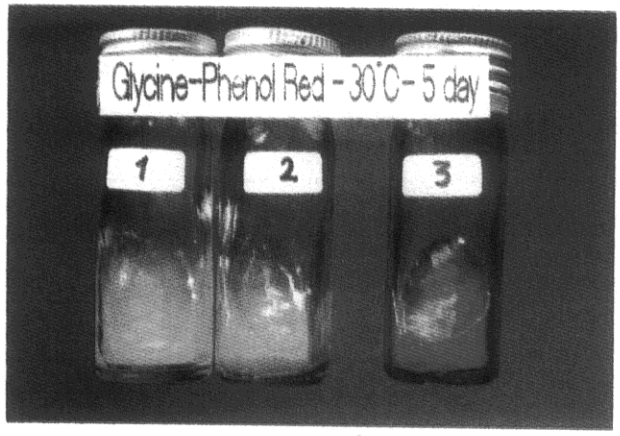
۳ - ۲۸ موردکریپتوکوکوس آلبیدوس که ۱۴ مورد از برگ، ۹ مورد از پوست درخت، ۵ مورد از میوه.

به منظور بیوتایپ کردن کریپتوکوکوس نئوفورمنس بدست آمده از درخت اکالیپتوس از دو روش گلایسین سیکلوهگزامید فنل رد (GCP) و کاناوانین گلایسین‌برموتیمول‌بلو (CGB) استفاده شد و در نهایت کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی شناسایی شد.

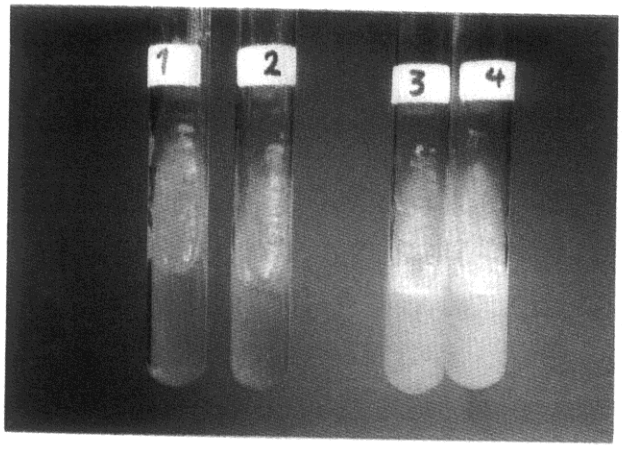
هم‌زمان با انجام این آزمایش‌ها، دو مورد کریپتوکوکوزیس در واحد قارچ‌شناسی تشخیص داده شد که تست‌های تشخیصی گوناگون از قبیل کشت روی محیط اوره، کورن میل + توئین ۸۰، محیط اختصاصی نیجر، GCP، CGB روی ارگانیسم‌های مزبور انجام گرفت و در نهایت کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته نئوفورمنس شناسایی شد (تصاویر ۱ و ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. محیط گلایسین سیکلوهگزامید فنل رد (GCP). ۱ و ۲ (GCP) منفی و ۳ (GCP) مثبت می‌باشند.



شکل ۲. محیط کاناوانین گلایسین برموتیمول بلو (CGB). ۱ و ۲ (CGB) مثبت، ۳ و ۴ (CGB) منفی می‌باشند.

ب - منطقه آموزشکده منابع طبیعی گنبد. از بررسی‌های انجام شده روی ۶۰۰ نمونه (برگ، گل، پوست) از آموزشکده منابع طبیعی گنبد، فقط ۷۳ نمونه مخمری قادر به تولید بلاستوکونیدیا روی محیط کورن‌میل آگار و ایجاد رنگ ارغوانی روی محیط اوره آگار بودند. نتایج جذب قند با استفاده از کیت API 20c Aux به شرح زیر بود:

۱ - ۱۲ مورد کریپتوکوکوس آلبیدوس (۸ مورد از برگ، ۴ مورد از گل).

۲ - ۲۷ مورد کریپتوکوکوس لارنتی (۱۴ مورد از برگ، ۹ مورد از گل و ۴ مورد از پوست درخت).

۳ - ۳۴ موردکریپتوکوکوس SP (۱۴ مورد از برگ، ۸ مورد از گل، ۱۲ مورد از پوست درخت) که ۶ نمونه از این ۳۴ مخمر در محیط NSA تغییر رنگ آبی ایجاد کردند.

۳ مورد هندرسونلاتورولوئیده ایزوله گردید که هر ۳ مورد از پوست درختان اکالیپتوس بدست آمده بود.

ج - منطقه سد قابوس وشمگیر. از بررسی‌های انجام شده روی ۳۰۰ نمونه (برگ، گل، پوست) از سد قابوس وشمگیر فقط ۳۴ نمونه مخمری قادر به تولید بلاستوکونیدیا در محیط کورن میل آگار و ایجاد رنگ ارغوانی در محیط اوره‌آگار بودند. نتایج جذب قند با استفاده از کیت API 20c Aux به شرح زیر بود:

۱ - ۱ مورد کریپتوکوکوس نئوفورمنس از گل درخت اکالیپتوس کامالدولنسیس.

۲ - ۷ مورد کریپتوکوکوس لارنتی (۵ مورد از برگ، ۲ مورد از گل).

۳ - ۳ مورد کریپتوکوکوس آلبیدوس (۱ مورد از برگ و ۲ مورد از پوست درخت).

۴ - ۲۳ مورد کریپتوکوکوس SP (۷ مورد از برگ، ۴ مورد از گل و ۱۲ مورد از پوست درخت) که ۲۰ نمونه آن در محیط NSA تغییر رنگ آبی ایجاد کردند (تصاویر ۳ و ۴).

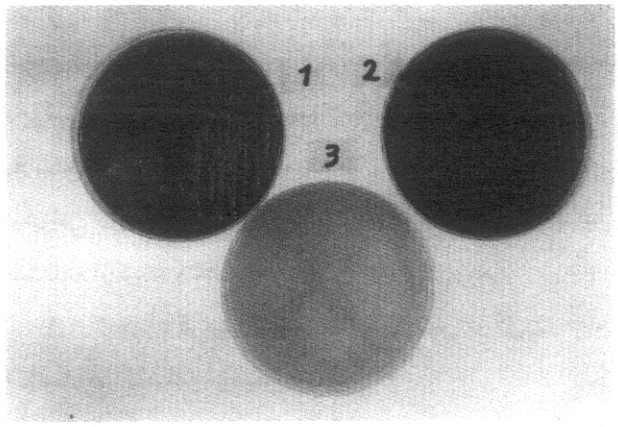
بیوتایپ کریپتوکوکوس نئوفورمنس جداشده با انجام روش‌های گلایسین سیکلوهگزامیدفنل‌رد (GCP) و کاناوانین گلایسین برموتیمول بلو (CGB) کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی تعیین گردید. در ضمن ۳ نمونه از کریپتوکوکوس لارنتی و ۳ نمونه از کریپتوکوکوس آلبیدوس نیز در محیط گلایسین سیکلوهگزامید فنل رد کشت داده شدند. کریپتوکوکوس لارنتی سبب ایجاد تغییر رنگ از زرد به قرمز درخشان گردید (GCP مثبت) در حالی که کریپتوکوکوس آلبیدوس تغییر رنگی در محیط ایجاد نکرد (GCP منفی). از ۱۲ نمونه کریپتوکوکوس لارنتی و ۱۵ نمونه کریپتوکوکوس آلبیدوس نیز در محیط کاناوانین گلایسین برموتیمول بلو کشت داده شدند.

هر ۱۲ نمونه کریپتوکوکوس لارنتی بعد از ۵ روز انکوباسیون در درجه حرارت ۳۰-۲۵ درجه سانتیگراد سبب تغییر رنگ محیط از زرد به آبی کبالتی

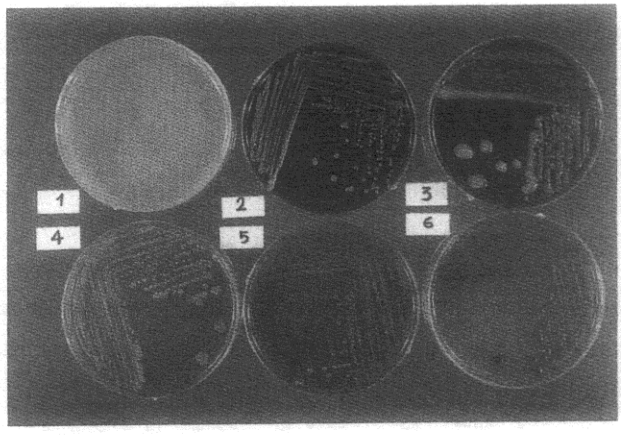
www.SID.ir

Archive of SID

شدند (CGB مثبت) در حالی که هیچ یک از ۱۵ نمونه کریپتوکوکوس آلبیدوس تغییر رنگی در محیط ایجاد نکردند (CGB منفی).



شکل ۳. کلنی‌های گونه‌های کریپتوکوکوس لارنتی (۱) و کریپتوکوکوس SP روی محیط نیجرسید آگار با گلوکز ۰/۱ درصد.



شکل ۴. کلنی‌های گونه‌های کریپتوکوکوس روی محیط نیجرسید آگار با گلوکز ۰/۱ درصد (۱). کریپتوکوکوس SP (۲)، کریپتوکوکوس لارنتی (۳)، کریپتوکوکوس آلبیدوس (۴)، کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی (۵)، کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته نئوفورمنس (۶).

بحث

کریپتوکوکوزیس یکی از عوامل مهم مرگ‌ومیر در افراد دچار نقص ایمنی به خصوص مبتلایان به AIDS می‌باشد. عامل بیماری مخمر کریپتوکوکوس نئوفورمنس است که دارای دو واریته نئوفورمنس و گتی می‌باشد. از زمان تحقیقات Emmonss (۱۹۵۰) تا به حال ارتباط ساپروفیتی کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته نئوفورمنس با کبوتر و فضولات آن در بسیاری از نقاط دنیا ثابت شده است. کبوتر به عنوان عامل مهمی در نگهداری و انتشار این واریته شناخته شده است. گر چه مشخص گردیده که کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی از نظر جغرافیایی توزیع محدودتری داشته و گزارش موارد عفونت حاصل از این واریته معمولاً از نقاط گرمسیری جهان بوده و لیکن مخزن طبیعی آن سال‌ها ناشناخته مانده بود [۵،۱۰،۱۴].

Pfeiffer و Ellis در سال ۱۹۹۰ [۸] طی یک بررسی محیطی ثابت کردند که کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی یک ارتباط اکولوژیکی ویژه با اکالیپتوس کامالدولنسیس دارد، و همچنین انتشار جهانی اکالیپتوس کامالدولنسیس با انتشار اپیدمیولوژیکی کریپتوکوکوزیس ایجاد شده توسط کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی مطابقت دارد.

بر این اساس و با توجه به کشت گونه‌های مختلف اکالیپتوس به خصوص گونه کامالدولنسیس در ایران و همراهی احتمالی واریته گتی با این گیاه مطالعه حاضر صورت پذیرفت. در این بررسی، ۲ مورد کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی بدست آمد که یک نمونه مربوط به میوه گیاه در گرمسار و یک نمونه دیگر مربوط به گل گیاه در سد قابوس بود. دیگر کریپتوکوکوس‌های جدا شده به شرح زیر می‌باشد:

در گرمسار ۲۸ مورد کریپتوکوکوس آلبیدوس (۱۴ مورد از برگ، ۹ مورد از پوست درخت، ۵ مورد از میوه) و ۲ مورد کریپتوکوکوس لارنتی (۲ مورد از میوه). در سد قابوس وشمگیر ۳ مورد کریپتوکوکوس آلبیدوس (۱ مورد از برگ، ۲ مورد از پوست درخت) و ۷ مورد کریپتوکوکوس لارنتی (۵ مورد از برگ و ۲ مورد از گل) و ۲۳ مورد کریپتوکوکوس SP (۷ مورد از برگ، ۴ مورد از گل، ۱۲ مورد از پوست درخت). در آموزشکده منابع طبیعی ۱۲ مورد کریپتوکوکوس آلبیدوس (۸ مورد از برگ، ۴ مورد از گل) و ۲۷ مورد کریپتوکوکوس لارنتی (۱۴ مورد از برگ، ۹ مورد از گل، ۴ مورد از پوست درخت) و ۳۴ مورد کریپتوکوکوس SP (۱۴ مورد از برگ، ۸ مورد از گل، ۱۲ مورد از پوست درخت) ایزوله گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل با توجه به نظریات Ellis و همکاران کاملاً قابل توجیه می‌باشد، زیرا Ellis و همکارانش معتقدند که کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی در فاز جنسی خود به صورت نهفته در قسمت‌های مختلفی از درخت اکالیپتوس مانند غنچه، نهنج و یا پارانشیم گیاه باقی مانده و هنگام گل دهی همراه با گرده افشانی گل‌ها این ذرات عفونی در فضا پخش می‌شوند [۹]. در ایران نیز علوی [۳]، ۴۴۹ نمونه از مناطق گرگان، بهشهر، کوی علیمحمدی، روستای سعدآباد، جنگل‌های بهشهر و کردکوی، باغ مرکز تحقیقات جنگل کاری زاغ مرز، ساری، محمودآباد، نور، نوشهر، چالوس، نکا، اهواز، خرمشهر، دزفول، اندیمشک، بندرعباس، بندر خمیر استان‌های تهران، اصفهان و شیراز را مورد مطالعه قرار داد که نمونه‌ها عبارت بودند از: ۱۵۲ نمونه خاک، ۱۵۲ نمونه برگ، ۱۱۳ نمونه گل و ۳۲ نمونه از هوای مجاور درخت. در مطالعه مزبور ۱۷ نمونه مخمری اوره‌آز مثبت به دست آمد که با توجه به مشاهده میکروسکوپی و حضور احتمالی کپسول دراطراف مخمر،ارگانیسم‌هابه داخل صفاق موش سوری تزریق گردیدند. پس از پایان چهار هفته موش‌ها را بیهوش و سپس کالبد شکافی گردید و مغز و احشاء آنها جهت تهیه مقاطع بافتی در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. نتایج برش بافتی تهیه شده با رنگ آمیزی موسی کارمن مایر نشان دهنده حضور فعال مخمر کپسولدار کریپتوکوکوس نئوفورمنس (به غیر از ۴ مورد) بود. در نهایت جهت اطمینان شناسایی دقیق واریته قارچ نمونه ها را به صورت نقطه‌ای در مرکز محیط CGB کشت داده که در نتیجه پس از ۷-۳ روز ۱۳ مورد از مخمرها روی محیط رشد کرده و باعث تغییر رنگ آن به آبی تیره گردیدند. در مجموع ۱۳ مورد کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی تعیین هویت گردید که ۴ مورد از هوا، ۱ مورد ازگل، ۵ مورد از خاک، ۳ مورد از برگ ایزوله شده بود، که از این تعداد ۳ نمونه مربوط به استان خوزستان، ۵ نمونه از منطقه گرگان و ۵ نمونه از منطقه ساری بود.

با مقایسه نتایج حاضر و مطالعه علوی می‌توان چنین نتیجه گرفت که منطقه سدقابوس از نظر شرایط آب و هوایی تا حدودی همانند گرگان ومنطقه گرمسار تقریباً از نظر شدت گرما همچون خوزستان می‌باشند و بنابراین جدا شدن کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی از این نواحی با بررسی‌های علوی مطابقت دارد.

نتایج مطالعات کشورهای دیگر تا سال ۱۹۹۶ توسط Sorrell و همکاران [۱۵]،از مکان‌های مختلف به شرح زیر بود:

- بقایای چوب اکالیپتوس کامالدولنسیس ۸ مورد
- پوسته وساقه اکالیپتوس کامالدولنسیس ۷ مورد
- میوه اکالیپتوس کامالدولنسیس ۲ مورد
- بقایای برگ اکالیپتوس کامالدولنسیس ۳ مورد
- بقایای گیاه اکالیپتوس کامالدولنسیس ۵ مورد
- نمونه هوا ۳مورد

روش‌های بکار گرفته شده توسط آنها عبارتند از کشت سوسپانسیون بر روی محیط NSA و تعیین هویت مخمرها با استفاده ازکیت API 20c Aux و بیوتایپ نمودن توسط محیط ال کاناوانین برموتیمول بلوآگار (CGB)صورت گرفت.

روش‌های انجام آزمایش‌ها در تحقیق حاضر کاملاً با روش‌های بکار گرفته شده توسط دیگران [۸،۱۵] مطابقت دارد. دراین مطالعه تعداد ۱۲ نمونه کریپتوکوکوس نئوفورمنس لارنتی و ۱۵ نمونه کریپتوکوکوس آلبیدوس روی محیط CGB کشت داده شد که فقط کریپتوکوکوس‌های لارنتی قادر به تغییر رنگ آبی در محیط بودند. اکثریت استرین‌های کریپتوکوکوس لارنتی محیط NSA حاوی ۰/۱٪ گلوکز را سبز می‌کنند همان طوری که بسیاری ازایزوله‌های کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی انجام می‌دهند، این سوال مطرح می‌شود که آیا ارتباطی بین تولید توکسین کشنده و تولید رنگ سبز GCE (Green colour effect) وجود دارد؟ یااین تولید یک محصول فرعی محسوب می شود [۱۶].

در سال ۱۹۹۲ نشان داده شد که کریپتوکوکوس لارنتی به دست آمده ازدرخت اکالیپتوس به نسبت گونه های دیگر جنس کریپتوکوکوس وابستگی بسیار نزدیک

www.SID.ir

Archive of SID

به کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی دارد [۱۲]. اگرچه آزمایش کاناوانین گلایسین برموتیمول‌بلو برای شناسایی واریته های کریپتوکوکوس نئوفورمنس برتر از محیط گلایسین فنل رد آگار است ولی کریپتوکوکوس لارنتی نیز ایجاد تغییرات مشابه در محیط CGB می‌نماید. با توجه به نتایج و مشاهدات کن چانگ و نیز مطالعه اخیر می‌توان چنین نتیجه گرفت که از این آزمایش جهت افتراق کریپتوکوکوس لارنتی از کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی نمی توان استفاده نمود.

طی گزارشی با روش کیمولومینسانس بعد از عمل هیبریداسیون کن چانگ و الیس نشان دادند که کریپتوکوکوس نئوفورمنس متجاوز از ۵۰۰۰۰ Rlu (Relative light unit) تولید می‌کند. در حالی که گونه های فیلوبازیدیوم وکریپتوکوکوس لارنتی همه کمتر از ۱۱۰۰ Rlu تولید می‌کنند و می‌تواند فقط بدین وسیله این دو ارگانیسم را از هم تشخیص داد [۱۱].

عامل عفونت زا را در واریته گتی ذرات فیلوبازیدیلایی دانسته‌اند که بازیدیوسپورها روی گیاه اکالیپتوس قرار گرفته است. منبع غذایی کوآلا، اکالیپتوس کامالدولنسیس است با بلع مخمر توسط پرندگان و حیواناتی که مرتبط با درخت میزبان هستند مثلاً در کوآلا، ارگانیسم پس از عبور از دستگاه گوارش همراه فضولات حیوان به شکل مخمر کپسول دار دفع شده و در محیط انتشار یافته و بالاخره باعث عفونت در انسان و حیوان می شود و این مطالب نه تنها گزارش‌های اخیر کریپتوکوکوزیس در کوآلا را شرح می‌دهد. همچنین اطلاعات بیشتری در رابطه با نقش جانور و پرنده ناقل در اپیدمیولوژی این بیماری را فراهم می‌کند [۹].

پژوهش‌های قبلی روی بیمار آلمانی که در کارخانه چوب‌بری کار می‌کرد و در معرض مقادیر زیادی از خاک اره قرار داشت، وجود کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی را تائید نمود [۱۰]. براساس این مشاهدات چوب می‌تواند یک مکان طبیعی برای هر دو واریته کریپتوکوکوس نئوفورمنس باشد. سیستم تجزیه چوب به طور وسیع یک فعالیت اکسیداتیو و غیر اختصاصی است و این مدرکی برای نقش فنل اکسیداز در کاهش لیگنین چوب است. رشد ساپروفیتیکی روی چوب اکالیپتوس به عنوان یک منبع اصلی کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی در طبیعت پیشنهاد شده است به ویژه اکالیپتوسی (از قبیل اکالیپتوس کامالدولنسیس) که حاوی مقادیر زیادی لیگنین و پلی‌فنلها باشد[۱۲].

در سال ۱۹۹۷،اولین جداسازی کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی از درختان اکالیپتوس کامالدولنسیس وارد شده از استرالیا را در هند گزارش شد [۶]. در ایران نیز جدا شدن دو مورد کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی از درختان اکالیپتوس تأییدی بر یافته‌های ا پژوهش‌های دیگر از نظر ارتباط اکولوژیکی میان کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی واکالیپتوس می‌باشد [۹].

در ایران، تاکنون فقط کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته نئوفورمنس از بیماران جدا شده ولی هرگز موردی از واریته گتی مشاهده نشده است که شاید دلیل آن را بتوان علاوه بر عدم تعیین هویت کلیه ارگانیسم‌های مزبور تاکنون ،احتمالاً به علت عدم وجود میزبان ناقل نظیر کوآلا در ایران نسبت داد. لازم به ذکر است فاکتورهایی مانند سرمای شدید زمستانی، تغییرات زیاد دما و شرایط آب و هوایی در فصول گل‌دهی گیاه می‌توانند از عوامل مؤثر در نتیجه جداسازی ارگانیسم از محیط باشند.

نهایتاً با توجه به بررسی‌های این تحقیق و مطالعه علوی در ایران می توان گفت که بذر اکالیپتوس‌های وارد شده از استرالیا دارای آلودگی اولیه به کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گتی می‌باشد و برای اثبات این موضوع نیاز به مطالعات و تحقیقات بیشتری در مورد جنبه‌های اکولوژیکی ارگانیسم در ایران ونیز وجود سایر منابع احتمالی به غیر از درختان اکالیپتوس وجود دارد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از آقایان مهندس فخر طباطبائی، علی

www.SID.ir

Archive of SID

ستاریان، مصطفی ایران‌منش و پرسنل محترم بخش قارچ شناسی دانشکده بهداشت علوم پزشکی تهران و ریاست محترم دانشگاه علوم پزشکی سمنان جناب آقای دکتر رشیدی پور و پرسنل محترم کتابخانه مرکزی و آزمایشگاه دانشکده پزشکی سمنان و کلیه دوستان عزیز و همکاران گرامی به خصوص سرکار خانم پریسا کوهساریان که صمیمانه مرا در انجام این تحقیق یاری نمودند قدردانی و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

[۱] احمدزاده حسینی، ع. اکالیپتوس ایران، پایان‌نامه تحصیلی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران شماره ۹۹.

[۲] جوانشیر، ک.، مصدق، ا. اکالیپتوس، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۵۱.

[۳] علوی، س. م. جداسازی کریپتوکوکوس نئوفورمنس (واریته گتی) از اکالیپتوس و خاک مناطق ایران، پایان‌نامه تحصیلی دکترای علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، شماره ۷۳۸۰

[4] Josep, B., Rodrigues, M.T. and DeMendoza, M.H., First identification of autochthonous cryptococcus neoformans var.gattii isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in spain, J. Clin. microbiol., 36 (1998) 458-461.

[5] Bennett, J.E., Kwon-Chung, K.J. and Howard, D.H., Epidemiologic differences among serotypes of cryptococcus neoformans, Am. J. Epidemiol, 105 (1977) 582-586.

[6] Chakrabarti, M., Jatana, P., Kumar, L. and Chatha, A., Kaushal, A., Isolation of cryptococcus neoformans var.gattii from eucalyptus camaldulensis in India, J. Clin. Microbiol, 35 (1997) 3340-3342.

[7] Ellis, D.H., Cryptococcus neoformans var.gattii in Australia, J.Clin.Microbiol., 25 (1987) 430-431.

[8] Ellis, D.H. and Pfeiffer.T.J., Natural habitat of cryptococcus neoformans var.gattii, J. Clin. Microbiol., 28 (1990) 1642-1644.

[9] Ellis, D.H. and Pfeiffer,T.J., Ecology, life cycle, and infectious propagule of cryptococcus neoformans, Lancet, 336 (1990) 923-925.

[10] Kwon-Chun, K.J. and Bennett, J.E., Epidemiologic differences between the two varieties of cryptococcus neoformans, Am. J. Epidemiol., 120 (1984) 123-130.

[11] Kwon-Chung, K.J, Wickes, B.I, Stockman, L., Roberts, C.D. and Ellis, D., Virulences, serotype,and molecular characteristics of environmental strains of cryptococcus neoformans var.gattii, Infec. Immun., 60 (1992) 1869-1874.

[12] Lazera, M.S., Pires, F.D.A., Camillo-Coura, L., Nishikawa, M.M. and Natural habitat of cryptococcus neoformans var.neoformans in decaying wood forming hollows in living trees, J. Med.Vet. Mycol., 34 (1996) 127-131.

[13] Laurenson, I.F., Lalloo.D.G., Naraqi. S., Seaton. R.A., Trevett.A.J., Cryptococcus neoformans in Papua New Guinea:a common pathogen but an elusive source, J. Med. Vet. Mycol., 35 (1997) 437-440.

[14] Levitz, S.M., The ecology of cryptococcus neoformans and the epidemiology of cryptococcosis, Rev. Infect. Dis., 13(1991) 1163-1169.

[15] Sorrell,T.C., Brownlee, A.G., Ruma, P.,

www.SID.ir

Archive of SID

Malik, R., Pfeiffer,T.J. and Ellis, D.H., Natural environmental sources of cryptococcus neoformans var.gattii, J. Clin. Microbiol., 34 (1996) 1261-1263.

[16] Staib, F., The green colour effect (G C E) of the killer strain cryptococcus laurentii CBS 139 on staib agar, Mycoses, 42 (1999) 103-106.

www.SID.ir