13 (1) 157-162, Spring 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Survey on the incidence of zoonotic disease caused by *Cryptococcus neoformans* in a domestic cockatiel

Neda Sharifi [1], Forough Talazadeh*[1], Ramezan Ali Jafari [1], Masoud Ghorbanpoor [2]

[1] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

[2] *Department of pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

Key Words

Cryptococcus neoformans
Nested-PCR
Domestic cockatiel

Abstract

Introduction: *Cryptococcus* is the cause of cryptococcosis especially in people with immunodeficiency's systems. Cryptococcosis is caused by *Cryptococcus neoformans* or *Cryptococcus gattii*. This study was conducted to investigate the infection of domestic cockatiels with *Cryptococcus neoformans* in Ahvaz.

Materials & Methods: A total of 58 sample of faeces (18 cloacal swabs, 40 dry faeces) were collected from domestic Cockatiel in Ahvaz. 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.

Result: Totally 4 out of 58 samples (6.89%) were contaminated with *C. neoformans*. In this study, 2 out of 18 cloacal swabs samples were positive for culture (11.11%) and 2 out of one 40 dry fecal samples of domestic cockatiel were positive for culture (5%).Their variety and serotype were determined. four strains were isolated, all *C. neoformans* strains belonged to serotype A and thus identified as *c. neoformans* variety *grubii*.

Conclusion: Due to the contamination of domestic cocktails with C. neoformans, people with immunodeficiency's systems, such as AIDS and HIV should avoid contact with domestic cockatiel. Also, pet shopes are important in viewpoint of public health.

* Corresponding Author's email: f.talazadeh@scu.ac.ir
Received: 1 February 2020; Reviewed: 25 April 2020; Revised: 17 May 2020; Accepted: 15 June 2020
(DOI): 10.22034/aej.2020.133169

مقاله پژوهشی

بررسی وقوع بیماری زئونوز ناشی از *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در کوکاتیل (عروس هلندی) خانگی

ندا شریفی[1]، فروغ طلازاده[1]، رمضانعلی جعفری[1]، مسعود قربانپور[2]*

[1] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[2] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

کریپتوکوس نئوفورمنس
کوکاتیل خانگی
Nested-PCR

چکیده

مقدمه: کریپتوکوکوس مسبب بیماری کریپتوکوکوزیس به‌ویژه در افراد دارای تضعیف سیستم ایمنی است. کریپتوکوکوزیس توسط کریپتوکوکوس نئوفورمنس یا کریپتوکوکوس گاتی ایجاد می‌شود. این مطالعه به‌منظور بررسی آلودگی کوکاتیل های (عروس هلندی) خانگی به کریپتوکوکوس نئوفورمنس در شهر اهواز صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: تعداد ۵۸ نمونه (۱۸ سواپ کلواک، ۴۰ فضله خشک) از کوکاتیل‌های خانگی در شهر اهواز جمع آوری شد. DNA نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، جهت تست PCR استخراج شد. جهت شناسایی جدایه های مثبت کریپتوکوکوس نئوفورمنس از یک جفت پرایمر در آزمون PCR استفاده شد. در ادامه برای افزایش دقت شناسایی، آزمون Nested PCR به‌کار گرفته شد.

نتایج: از ۵۸ نمونه مدفوعی کوکاتیل‌های خانگی ۴ مورد آلوده به کریپتوکوکوس نئوفورمنس بودند. ۲ مورد از سوآپ‌های کلواک (۱۱/۱۱٪) و ۲ مورد از فضولات خشک (۵ ٪)، آلوده به کریپتوکوکوس نئوفورمنس بودند. واریته و سروتیپ موارد مثبت مشخص شد. همه موارد مثبت متعلق به سروتیپ A کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گروبی بودند.

نتیجه‌گیری و بحث: با توجه به مثبت بودن کوکاتیل‌های خانگی به کریپتوکوکوس نئوفورمنس، افراد مبتلا به تضعیف سیستم ایمنی نظیر افراد مبتلا به AIDS و HIV باید از تماس با این پرندگان اجتناب کنند. هم‌چنین فروشگاه‌های حیوانات خانگی از لحاظ بهداشت عمومی حائز اهمیت می‌باشند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: f.talazadeh@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۲ بهمن ۱۳۹۸؛ تاریخ داوری: ٦ اردیبهشت ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۲۸ اردیبهشت ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۲٦ خرداد ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.133169

مقدمه

اهمیت عفونت‌های قارچی در انسان و حیوانات افزایش یافته است. قارچ‌ها علل نسبتاً نادر بیماری در انسان‌های سالم و ایمن هستند. *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* شبیه مخمرها بوده و دارای کپسول پلی ساکاریدی است که در بیماری‌زایی آن نقش مهمی دارد. این قارچ در گیاهان، خاک و مدفوع پرندگان زندگی می‌کند. از بین همه گونه‌های *کریپتوکوکوس*، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* مهم‌ترین پاتوژن انسان و حیوانات است (Kohler و همکاران، ۲۰۱۵). کریپتوکوکوزیس بیماری قارچی مشترک بین انسان و پرندگان است که از طریق ورود قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* از بدن پرندگان به دستگاه تنفسی انسان ایجاد می‌شود. اگر هاگ‌های این قارچ توسط افراد استنشاق شود، عفونت ممکن است در ریه‌ها ایجاد شود. *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* برجسته‌ترین گونه مهم پزشکی می‌باشد که باعث فرم شدید مننژیت و مننژوانسفالیت در افراد مبتلا به AIDS می‌شود. هم‌چنین ممکن است در افراد گیرنده پیوند عضو یا تحت درمان سرطان باعث ایجاد بیماری شود (Cheng و همکاران، ۲۰۰۱). پرندگان به‌ندرت ابتلاء بالینی به *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* پیدا می‌نمایند، اگرچه از دستگاه گوارش (روده) آن‌ها ممکن است جدا شود. این قارچ در فضولات خشک و یا مرطوب می‌تواند دو سال یا بیش‌تر زنده بماند و افزایش میزان رطوبت سبب تکثیر ارگانیسم شده و در تابستان و در زیر تابش نور مستقیم آفتاب این عامل به سرعت از بین می‌رود، البته در تابستان‌های سردتر و با رطوبت بیش‌تر ماندگاری ارگانیسم بیش‌تر است. مقاومت پرندگان به این مخمر را به میزان بالای آهن سرم آن‌ها و البته دمای بالای بدنشان نسبت می‌دهند. مخمر از طریق استنشاق به آلوئول‌های تنفسی رسیده و در آن‌جا بیگانه‌خواری شده ولی در صورت کپسول‌دار بودن معمولاً بیگانه‌خوار قادر به کشتن آن نخواهد بود و اغلب عفونت به CNS رسیده و علائم عصبی بیماری ظاهر می‌گردند (Quinn و همکاران، ۲۰۱۱).

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: در این مطالعه ۴۰ نمونه مدفوع خشک از قفس کوکاتیل‌های خانگی موجود در پرنده فروشی‌های شهر اهواز که به صورت انفرادی بودند، جمع‌آوری شد. هم‌چنین ۱۸ سواپ کلواک از کوکاتیل‌های ارجاعی به بخش طیور بیمارستان دامپزشکی اهواز، اخذ شد. نمونه‌ها در ظرف جداگانه‌ای به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج DNA: DNA نمونه‌ها با استفاده از یک کیت ویژه استخراج(شرکت رهازیست پادتن)، استخراج شدند. ابتدا سوسپانسیون ۱۰ درصد در PBS از نمونه‌های کشت مثبت تهیه شد. سپس نمونه‌ها ورتکس شده و در دور ۸۰۰g به‌مدت ۱۵ ثانیه سانتریفیوژ شدند. مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شده و در دور ۵۰۰۰g به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد. ۳۵۰ میکرولیتر از بافر لیز به رسوب اضافه شده و ترکیب حاصل به‌مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد. نمونه‌ها در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت حداقل نیم‌ساعت انکوبه شدند. سپس در دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به میکروتیوب‌های دارای ستون منتقل شد. میکروتیوب‌ها در دور ۷۰۰۰g به‌مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مجدداً مایع زیرین به ستون منتقل شد. میکروتیوب‌ها در دور ۷۰۰۰g به‌مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع زیر ستون تخلیه شد. ۵۰۰ میکرولیتر محلول شستشو به ستون اضافه شد (Chae و همکاران، ۲۰۱۲). میکروتیوب‌ها در دور ۱۴۰۰۰g به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع زیر ستون تخلیه شد. ۷۵۰ میکرولیتر محلول شستشو (همراه با الکل) به ستون اضافه شد و در دور ۱۴۰۰۰g به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند (Lugarini و همکاران، ۲۰۰۸). مایع زیر ستون تخلیه شده و مجدداً در دور ۱۴۰۰۰g به‌مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ستون به میکروتیوب ۱/۵ انتقال یافته و ۵۰ میکرولیتر محلول آزادسازی به‌داخل ستون اضافه شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق میکروتیوب‌ها در دور ۱۴۰۰۰g به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در پایان، ستون دور ریخته شده و رسوب باقی‌مانده در میکروتیوب در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شده و به‌عنوان نمونه DNA استفاده شد.

شناسایی مولکولی کریپتوکوکوس نئوفورمنس: مطابق روش Chae و همکاران(۲۰۱۲) جهت شناسایی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*، Nested-PCR با استفاده از دو مجموعه پرایمر انجام گرفت که به ترتیب محصولاتی با ۱۳۸۶ و ۶۹۰ جفت باز تولید کردند. جهت هماننداسازی اولیه مجموعاً ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۲ میکرولیتر از جفت پرایمر خارجی ژن CNLAC1 (هر پرایمر ۱ میکرو لیتر)، ۲/۵ میکرولیتر (۲۰ نانوگرم) از DNA الگو، ۸ میکرولیتر آب مقطر، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس ۲X (شامل ۱/۵ میلی‌مول منیزیم کلرید و ۰/۲ میلی‌مول dNTP) استفاده شد. شرایط دمایی که با استفاده از مستر سایکلر به شرح زیر است:

مرحله دناتوراسیون اولیه (predenaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل (شامل مرحله دناتوراسیون (denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال (annealing) در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل‌سازی (elongation) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه.

در هر مجموعه از PCR، DNA *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* ATCC 66031 به‌عنوان کنترل مثبت و آب مقطر مخصوص PCR به عنوان کنترل منفی درنظر گرفته شد. جهت همانندسازی ثانویه، مجموعاً ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۲ میکرولیتر جفت پرایمر داخلی ژن CNLAC1 (هر پرایمر ۱ میکرولیتر)، ۰/۱ میکرولیتر محصول PCR اولیه، ۱۰/۴ میکرولیتر آب مقطر و ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس ۲X استفاده شد. سیکل دمایی به‌شرح زیر است:

مرحله دناتوراسیون اولیه (predenaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل (شامل مرحله دناتوراسیون (denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال (annealing) در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل‌سازی (elongation) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه.

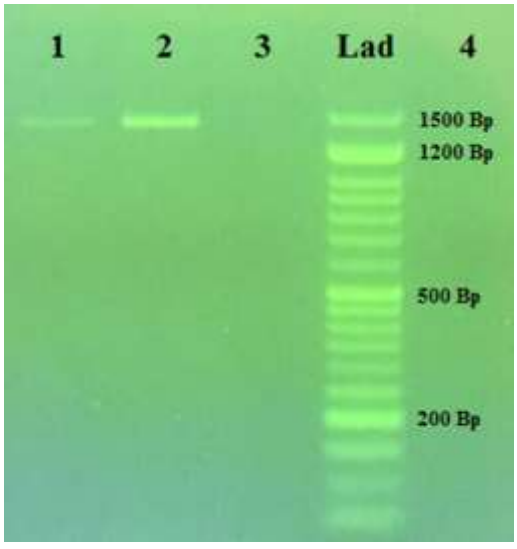
محصولات اولیه و ثانویه PCR با الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ در بافر TAE [100 mM Tris HCl (pH 9.0), 40 mM EDTA] حاوی safe stain آنالیز شد و زیر تابش نور UV مشاهده شد. اندازه محصولات همانندسازی در مقایسه با نشانگر DNA (ladder) ۱۰۰ جفت بازی ارزیابی شد.

جدول۱: توالی‌های اولیه برای شناسایی قارچ‌های شبه مخمر

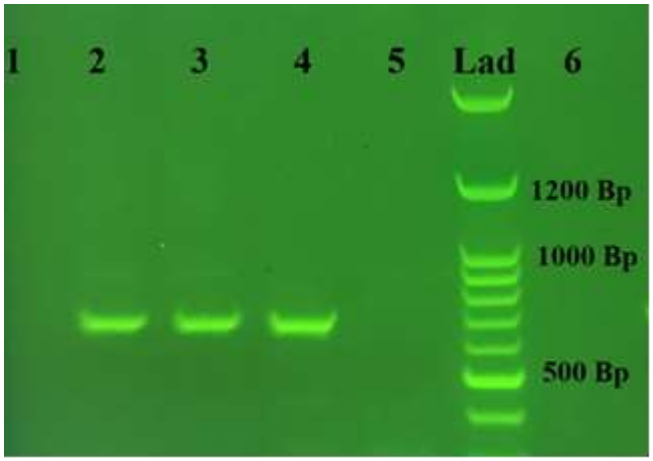
Primer name	Primer sequence (5′–3′)[1]	PCR product (bp)	Thermal conditions	Refferences
C. neo outer	F-ACGGTGTCCCTGGTATAA R-GCGTTGGACGATTGAAAG	1386	95˚C- 5 min; 30 × (95˚C- 30 s, 58˚C- 30 s, 72˚C- 90 s); 72˚C- 5 min.	Chae و همکاران، ۲۰۱۲
C. neo inner	F-CACTCGCCCAATGAACC R-TATACCTCACCACCGCC	690	95˚C- 5 min; 30 × (95˚C- 30 s, 58˚C- 30 s, 72˚C- 45 s); 72˚C- 5 min.	
C. neo Var	F- GAGATTCGGCAGGAAGAAGC R- CGTAAGGGATGACGAAAAGGTA	224 or 274	95˚C- 5 min; 30 × (95˚C- 30 s, 60˚C- 30 s, 72˚C- 30 s); 72˚C- 5 min.	Feng و همکاران، ۲۰۱۲

نتایج

کریپتوکوکوس نئوفورمنس از مدفوع کوکاتیل‌های خانگی اهواز کشت و جداسازی شد. در این مطالعه از ۵۸ نمونه مدفوعی (۴۰ فضله خشک، ۱۸سواپ کلواک) کوکاتیل‌های خانگی اهواز *C. neoformans* از ۴ مورد در کشت جداسازی شد. این ۴ مورد مثبت، ۲ مورد متعلق به سواپ‌های کلواک کوکاتیل‌های خانگی ارجاعی به بخش طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز و ۲ مورد متعلق به فضولات خشک کوکاتیل‌های خانگی فروشگاه‌های حیوانات خانگی اهواز بودند. طبق روش Chae و همکاران (۲۰۱۲)، برای تأیید جدایه‌های جمع‌آوری شده، تست Nested-PCR با استفاده از آغازگرهای مرحله اول F-ACGGTGTCCCTGGTATAA و R-GCGTTGGACGATTGAAAG و آغازگرهای مرحله دوم F-CACTCGCCCAATGAACC و R-TATACCTCACCCCCCC آن‌ها به‌ترتیب محصولاتی با ۱۳۸۶ و ۶۹۰ جفت پایه ایجاد کردند. از ۵۸ نمونه (۴۰ فضله خشک، ۱۸ سواپ کلواک) جمع‌آوری شده از کوکاتیل‌های خانگی، ۲ نمونه از سواپ‌های کلواک و ۲ نمونه فضله خشک برای تست Nested-PCR و PCR مثبت بودند (شکل‌های ۱و ۲). تست PCR برای تعیین انواع *C. neoformans* انجام شد. کل گونه‌های جدا شده (۴ جدایه) متعلق به نوع *grubii* بودند که محصولی با ۲۷۴ جفت پایه تولید می‌کردند (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱: اکتروفورز در ژل آگارز جهت محصول PCR.
۱ و ۲- محصول PCR با اندازه ۱۳۸۶ جفت بازی از مخمر کریپتوکوکوس نئوفورمنس ۳- کنترل منفی ۴ - نمونه منفی



شکل۲: الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR، ۱-کنترل منفی (آب)؛ ۲- کنترل مثبت؛ ۳،۴- محصول Nested-PCR با اندازه ۶۹۰ جفت باز *C. neoformans*؛ ۵ و ۶ نمونه منفی

بحث

بیماری‌های قارچی انسانی به‌عنوان پدیده بزرگ قرن بیستم و بیست و یکم شناخته شده‌اند، ازجمله این بیماری‌ها کریپتوکوکوز است. کریپتوکوکوز یکی از عفونت‌های قارچی فرصت‌طلب است که اغلب به‌وسیله *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* (*Cryptococcus neoformans*) و یا *کریپتوکوکوس گاتی* (*Cryptococcus gattii*) عارض می‌شود. کریپتوکوکوز مهم‌ترین بیماری قارچی باعامل مخمری است که گسترش جهانی داشته که انسان به‌خصوص مبتلایان به نقصان‌های ایمنی و برخی از سایر پستانداران را درگیر می‌سازد. در انسان بیماری اغلب با سرکوب ایمنی یا وارد شدن مقادیر زیاد مخمر همراه بوده است (Nnadi و همکاران، ۲۰۱۶).

کریپتوکوکوس نئوفورمنس دارای دو جدایه *neoformans* و *gattii* است. این دو جدایه، به‌روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی از یکدیگر قابل شناسایی هستند. تکنولوژی مولکولی پیشرفته سطح طبقه‌بندی میکروارگانیسم را افزایش داده است. گونه‌های *کریپتوکوکوس* تنوع وسیعی در سطح زیرگونه دارند که هر کدام تایپ‌های مولکولی متفاوتی را براساس تفاوت‌های ژنتیکی ایجاد می‌کنند، عمدتاً به‌دلیل توزیع‌های مختلف جغرافیایی و خصوصیات مولکولی و اکولوژی می‌باشد (Cogliati، ۲۰۱۳).

در حال حاضر *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* براساس ویژگی‌های ژنتیکی و خواص سرولوژیکی پلی‌ساکاریدهای کپسولی (pcs) به دو نوع واریته تقسیم‌بندی می‌شود، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* واریته *گروبی* (سروتیپ A) و *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* واریته *نئوفورمنس* (سروتیپ D). سروتیپ‌های B و C عمدتاً در *کریپتوکوکوس نئوفورمنس گاتی* یافت می‌شوند. هم‌چنین ترکیب‌های بین *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* و *کریپتوکوکوس گاتی* وجود دارد. ۸ تیپ مولکولی عمده از گونه‌های بیماری‌زای *کریپتوکوکوس* وجود دارد که *VNI, VNII, VNIII, VNIV* در گروه جدایه *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* و *VGI, VGII, VGIII, VGIV* در گروه جدایه *کریپتوکوکوس گاتی* طبقه‌بندی شدند (Heitman و همکاران، ۲۰۱۰؛ Springer و همکاران، ۲۰۱۴).

روش‌های کشت، اگرچه در برخی موارد هنوز هم استاندارد طلایی هستند، اما به‌طورکلی ویژگی‌های یک روش بهینه برای تشخیص سریع میکروارگانیسم‌ها ازجمله *Cryptococcus neoformans* را ندارند. در واکنش PCR، زیرا فقط ژنوم عامل مورد نیاز است، حتی اگر سلول‌های مرده نیز حضور داشته باشند، آزمایش مثبت خواهد بود. این امر حساسیت تست PCR را تا حد زیادی افزایش داده است (Raimondi و همکاران، ۲۰۰۷).

در ایران مطالعات متعددی درخصوص نمونه‌های حیوانی صورت گرفته است که وجود گونه‌های مختلف *کریپتوکوکوس* را در فضولات پرندگان نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر ۱۸ نمونه سواپ کلواک از کوکاتیل‌های خانگی ارجاعی به بخش طیور بیمارستان دامپزشکی اهواز و ۳۴ نمونه مدفوع خشک از قفس کوکاتیل‌های خانگی فروشگاه‌های شهر اهواز جمع‌آوری شد. ۲ مورد از ۱۸ نمونه سواپ کلواک و ۲ مورد از فضولات خشک کوکاتیل‌ها، به‌روش کشت و nested-pcr مثبت شدند، تمام موارد مثبت *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* واریته *گروبی* بودند.

گزارش‌های کمی از آلودگی بالینی پرندگان به *کریپتوکوکوس* وجود دارد. پرندگان مبتلا به‌طورکلی هیچ علائم واضحی را نشان نمی‌دهند که این موضوع باعث توسعه کریپتوکوکوز می‌شود. در مطالعه‌ای Malik و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند کریپتوکوکوس باعث ایجاد بیماری تهاجمی موضعی دستگاه تنفسی فوقانی طوطی‌های ساکن استرالیا شد. Raso و همکاران (۲۰۰۴) شیوع کریپتوکوکوزیس را در پرندگان دست آموز برزیل گزارش کردند که در هفت پرنده از طوطی‌سانان گونه‌های مختلف عدم تعادل، فلجی پیش‌رونده و مشکل در پرواز همراه با تغییرات تنفسی مشاهده شد. این یافته‌ها با مطالعه اخیر مغایرت داشت. در مطالعه حاضر کوکاتیل‌های خانگی مورد مطالعه فاقد علائم مشخص بیماری بودند.

گزارش‌هایی از کریپتوکوکوزیس در افراد پس از قرار گرفتن در معرض آئروسل پرندگان گزارش شده است. Nosanchuk و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که زن ۷۲ ساله مبتلا به مننژیت کریپتوکوکوزی صاحب کوکاتو (طوطی کاکل سفید) بود و *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* از مدفوع کوکاتو جدا شد و نمونه‌های کوکاتو و صاحبش با استفاده از پروفایل‌های بیوشیمیایی و الگوهای اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال و تجزیه و تحلیل پلی‌مورفیسم طول قطعه محدود و کاریوتایپینگ با

هم‌مقایسه شدند جدایه‌های بیمار و کوکاتو دارای پروفایل‌های شیمیایی یکسان بودند که نشان داد وقوع بیماری به‌علت در معرض قرار گرفتن با آئروسل مدفوع کوکاتو بوده است.

Rabin و همکاران (۲۰۰۴) یک مورد آلودگی مرد ۶۵ ساله‌ای به پنومونی کریپتوکوکی گزارش کردند که صاحب کوکاتیل خانگی بود که بیمار به‌علت مصرف طولانی مدت infliximab برای درمان آرتریت روماتوئید دچار تضعیف سیستم ایمنی شده بود و طبق آزمایشات انجام شده انتقال عفونت از مدفوع کوکاتیل به صاحبش صورت گرفته بود. در مطالعه حاضر، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* واریته *گروبی* از نمونه‌های سواپ کلواک و مدفوع خشک کوکاتیل‌های مورد آزمایش جدا شد.

Lagrou و همکاران (۲۰۰۵) یک مورد آلودگی انسان به مننژیت کریپتوکوکوزی در اثر در معرض قرار گرفتن با مدفوع زاغ آلوده را گزارش کردند که جداسازی قارچ از مایع مغزی- نخاعی بیمار و مدفوع زاغ انجام گرفت که هر دو از سروتیپ A *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* واریته *گروبی* بودند.

Tay و همکاران (۲۰۰۵) ۵۴۴ نمونه مدفوع از باغ وحش و فروشگاه‌های حیوانات خانگی و مناطق عمومی جمع‌آوری کردند که از ۲۵ نمونه (۴/۶٪) *کریپتوکوکوس نئوفورمس* جدا شد که تمامی جدایه‌ها سروتیپ A *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* واریته *گروبی* بودند. در این مطالعه مواردمثبت فقط از راسته طوطی‌سانان بود مطالعه فوق ازحیث واریته جدا شده با مطالعه اخیر هم‌خوانی دارد.

Lugarini و همکاران(۲۰۰۸)طی تحقیقی که ۱۴۱ نمونه مدفوع از کف قفس طوطی‌سانان و کنجشگ‌سانان جمع‌آوری کردند و با استفاده از روش تشخیص مولکولی PCR fingerprinting, multiplex PCR و mating type PCR نشان دادند که ۳۶ نمونه از نمونه‌های گنجشگ‌سانان و طوطی‌سانان (۲۵/۵۳٪) *کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گروبی* جد اشد. این نتایج نشان داد علاوه بر مدفوع کبوتر، مدفوع این پرندگان می‌تواند مخزنی برای *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در محیط‌های داخلی و عمومی باشد و هم‌چنین از اهمیت زئونوز برای بیماران مبتلا به تضعیف سیستم ایمنی است.

Lugarini و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* و *کریپتوکوکوس گاتی* همراه با مدفوع خشک پرندگان هستند اما به‌ندرت از ناحیه دستگاه گوارش جدا می‌شوند برای این منظور ۱۷۲ نمونه کلواک و ۷۷ نمونه چینه‌دان از کبوتران خانگی و گنجشک‌سانان و طوطی‌سانان جمع‌آوری شد که هیچ‌کدام از نمونه‌ها مثبت نبودند فقط یک نمونه از ۸۲ سرم جمع‌آوری شده از طوطی سانان مثبت بود که نشان داد گونه‌های *کریپتوکوکوس* دارای قابلیت تهاجمی کمی در پرندگان هستند. در مطالعه حاضر، بین جداسازی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* از مدفوع خشک و سواپ کلواک تفاوت دیده شد. میزان جداسازی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* از نمونه‌های سواپ بیش‌تر بود که با مطالعه فوق مغایریت دارد.

Ferreira و همکاران (۲۰۱۱) طی سال‌های ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۸، از ۲۵۳ نمونه‌مدفوع(۱۲۰ تازه‌و ۱۳۳ خشک)جمع‌آوری‌شده‌ازقفس‌های فروشگاه‌های حیوانات خانگی در محل‌های مختلف ۱۹ نمونه مدفوع خشک (۱۴/۲۸٪) و یک نمونه (۰/۸٪) مدفوع تازه، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* جدا شد که تایپینگ مولکولی کریپتوکوکوس نئوفورمنس با روش URA5-RFLP و mating type specific PCR انجام شد. در مطالعه‌حاضر میزان آلودگی‌به *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* درنمونه‌های سواپ ۱۱/۱۱٪ و در نمونه‌های مدفوع خشک ۵٪ بود. نتیجه مطالعه حاضر با مطالعه Ferreira و همکاران (۲۰۱۱) متفاوت بود.

Pereira و همکاران (۲۰۱۴) به‌منظور جداسازی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* از فروشگاه‌های حیوانات خانگی در شهر ریودوژانیرو ۱۲۶۸ نمونه مدفوع جمع‌آوری کردند که براساس آزمایشات انجام شده ۸۵ نمونه (۶/۷٪) آلوده بودند. این گزارش و نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد این مکان‌ها می‌توانند از نظر آلودگی انسان به *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* حائز اهمیت باشند.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کوکاتیل‌های (عروس هلندی) خانگی شهرستان اهواز به *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* آلوده هستند و *کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گروبی* شایع می‌باشد. از آن‌جایی‌که *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* باعث بیماری کریپتوکوزیس (ریوی، مغزی، استخوانی...) در افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف می‌شود لذا این افراد باید از نگه‌داشتن کوکاتیل (عروس هلندی) در محل زندگی خود، خودداری کنند. فروشگاه‌های‌حیوانات‌خانگی از لحاظ بهداشت عمومی حائز اهمیت هستند و باید قفس پرندگان این فروشگاه‌ها مرتب ضد عفونی شود، توصیه می‌شود کنترل‌های دوره‌ای فروشگاه‌های حیوانات خانگی صورت گیرد زیرا از این طریق می‌توان منبع عفونت را که خطر بالقوه برای افراد مستعد به کریپتوکوزیس هستند را شناسایی کرد.

منابع

1. **Chae, H.S.; Park, G.N.; Kim, S.H.; Jo, H.J.; Kim, J.T.; Jeoung, H.Y.; An, D.J.; Kim, N.H.; Shin, B.W.; Kang, Y.I. and Chang, K.S., 2012.** Rapid direct identification of Cryptococcus neoformans from pigeon droppings by nested PCR using CNLAC1 gene. Poultry Science Association Inc. Vol. 91, No. 8, pp: 1983-1989.
2. **Cheng, M.F.; Chiou, C.C.; Liu, Y.C.; Wang, H.Z. and Hsieh, K.S., 2001.** Cryptococcus laurentii fungemia in a premature neonate. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 39, No. 4, pp: 1608-1611.
3. **Cogliati, M., 2013.** Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica.675213.

4. **Feng, X.; Fu, X.; Ling, B.; Wang, L.; Liao, W. and Yao, Z., 2013.** Development of a Singleplex PCR Assay for Rapid Identification and Differentiation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cryptococcus gattii*, and Hybrids. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 51, No. 6, pp: 1920-1923.

5. **Ferreira, P.K.; Andrade-Silva, L.; Mora, D.J.; Pedrosa, A.L.; Rodrigues, V. and Silva-Vergara, M.L., 2001.** Genotyping og *cryotococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Grais, Brazil. Mycoses. Vol. 54, No. 5, pp: 294-300.

6. **Heitman, J.; Kozel, T.R. and Kwon-Chung, K.J., 2010.** *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast. Washington: ASM Press.

7. **Kohler, J.R.; Casadevall, A. and Perfect, J., 2015.** The spectrum of fungi that infects humans. Cold Spring Harb Perspect Med. Vol. 5, No. 1, pp: a019273.

8. **Lagrou, K.; Van Eldere, J.; Keuleers, S.; Hagen, F.; Merckx, R.; Verhaegen, J.; Peetermans, W.E. and Boekhout, T., 2005.** Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. Journal of Internal Medicine. Vol. 257, pp: 385-388.

9. **Lugarini, C.; Goebel, C.S.; Condas, L.A.Z.; Muro, M.D.; de Farias, M.R.; Ferreira, F.M. and Vainstein, M.H., 2008.** *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. Mycopathologia. Vol. 166, No. 2, pp: 61-69.

10. **Lugarini, C.; Condas, L.A.Z.; Soresini, G. and Montiani-Ferreira, F., 2008.** Screening of antigenemia and isolation of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* from cloaca and crop of birds in the state of Paraná, Brazil, Pesq. Vet. Bras. Vol. 28, No. 7, pp: 341-344.

11. **Malik, R.; Krockenberger, M.B.; Cross, G.; Doneleyy, R.; Madillz, D.N.; Black, D.; Mcwhirter, P.; Rozenwax, A.; Rose, K.; Alleyyy, M.; Forshawzz, D.; Russell-Brown, I.; Johnstoneyy, A.C.; Martin, P.; O'brien, C.R. and Love, D.N., 2003.** Avian cryptococcosis. Medical Mycology. Vol. 41, pp: 115-124.

12. **Nnadi, N.E.; Enweani, I.B.; Cogliati, M.; Ayanbimpe, G.M.; Okolo, M.O.; Kim, E.; Sabitu, M.Z.; Criseo, G.; Romeo, O. and Scordino, F., 2016.** Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* VNII isolates in Jos, Plateau State, Nigeria. Journal de mycologie medicale. Vol. 26, No. 4, pp: 306-311.

13. **Nosanchuk, J.D.; Shoham, S.; Fries, B.C.; Shapiro, Levitz, D.S.; Levitz, S.M. and Casadevall, A., 2000.** Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. Ann Intern Med. Vol. 132, No. 3, pp: 205-208.

14. **Pereira, J.R.; Campos, F.L.; de Abreu, D.P.B. and de Assis Baroni, F., 2014.** *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* isolados de excretas de aves comercializadas em lojas de animais do município do Rio de Janeiro. RJ, Rev. Bras. Med. Vet. Vol. 36, No. 1, pp: 90-94.

15. **Quinn, P.J.; Markey, B.K.; Leonard, F.C.; Hartigan, P.; Fanning, S. and Fitzpatrick, E.S., 2011.** Veterinary microbiology and microbial disease. John Wiley & Sons.

16. **Rabin, K.; Stoller, J.K.; Honari, G.; Procop, G.W. and Gordon, S.M., 2004.** Pneumonia Due to *Cryptococcus neoformans* in a Patient Receiving Infliximab: Possible Zoonotic Transmission from a Pet Cockatiel, Respir Care. Vol. 49, No. 6, pp: 606-608.

17. **Raimondi, A.; Ticozzi, R.; Sala, G. and Bellotti, M.G., 2007.** Genotype-based differentiation of the *Cryptococcus neoformans* serotypes by combined PCR-RFLP analysis of the capsule-associated genes CAP10 and CAP 59. Med Mycol. Vol. 45, pp: 491-501.

18. **Raso, T.F.; Werther, K.; Miranda, E.T. And Mendes Giannini, M.J.S., 2004.** Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. Med Mycol. Vol. 42, No. 4, pp: 355-362.

19. **Springer, D.J.; Billmyre, R.B.; Filler, E.E.; Voelz, K.; Pursall, R.; Mieczkowski, P.A.; Larsen, R.A.; Dietrich, F.S.; May, R.C.; Filler, S.G. and Heitmanand, J., 2014.** *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. PLoS Pathogens. Vol. 10, No. 8, pp: e1004285.

20. **Tay, S.T.; Chai, H.C.; Na, S.L.; Hamimah, H.; Rohani, M.Y. and Soo-Hoo, T.S., 2005.** The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from bird excreta in Klang Valley, Malaysia. Mycopathologia. Vol. 159, pp: 509-513.