مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۲، شماره ۱، سال ۱۳۷۶

مروری بر بیماری کریپتوسپوریدیوز و تشخیص آزمایشگاهی آن

دکتر محمدجواد قراگوزلو*

خلاصه :

در این مقاله بیماری کریپتوسپوریدیوز از جنبه‌های تاریخی، اپیدمیولوژی و اپیدمیولوژی مرور می‌شود. این ارگانیسم تک‌یاخته‌ای است که در همه جا یافت می‌شود. گونه‌های مختلف پرندگان، دوزیستان، ماهیان، خزندگان و پستانداران را مبتلا نموده و ابتدا در سال ۱۹۰۷ توسط تایزر (Tyzzer) کشف و گزارش شد. اکنون مشخص شده است که این ارگانیسم یکی از انگل‌های مهم و مشترک بین انسان و دام می‌باشد و ممکن است در انواع حیوانات موجب بیماری و بروز علائم و نشانه‌های درمانگاهی شود. ایجاد عفونت و شدت تظاهرات درمانگاهی ممکن است تحت تأثیر شرایط ایمنی حیوان قرار گیرد. در میزبان مبتلا به نقص ایمنی، عفونت، علائم و نشانه‌های درمانگاهی ممکن است شدید و در مواردی کشنده باشد. تظاهرات بالینی منعکس‌کننده نوع ارگان مبتلا است از جمله دستگاه گوارش، پانکراس، مجاری صفراوی، ریه و ملتحمه چشم. عفونت کریپتوسپوریدیایی در روده کوچک گونه‌های مختلف حیوانات، همچون جوجه، بره، گوساله و موش آزمایشگاهی توسط مؤلف تشخیص داده شده است. به‌علاوه مؤلف اخیراً ابتلا بورس فابریسیوس و کلوآک جوجه به کریپتوسپوریدیوز را مشاهده نموده است. به استثنای کریپتوسپوریدیوز موش در تمامی موارد حضور انگل با علائم و نشانه‌های بالینی توأم بوده است. به علت اهمیت عفونت کریپتوسپوریدیایی در انسان و حیوانات، آزمایشگاه‌های تشخیص بایستی از تکنیک‌های متعددی که برای تشخیص این ارگانیسم در نظر گرفته شده است، آگاهی داشته باشند. اکنون شیوه‌های تشخیصی تهاجمی با شیوه‌های ساده‌ای چون جستجوی اووسیست در مدفوع جایگزین شده‌اند، با این حال آزمایشات آسیب‌شناسی و تشخیص با میکروسکپ الکترونیک، جایگاه ویژه و مهمی را در بین آزمایشات مختلف، دارا بوده و مؤید تشخیص اولیه می‌باشند.

واژه‌های کلیدی : کریپتوسپوریدیوز، تشخیص آزمایشگاهی

مقدمه :

کریپتوسپوریدیوم تک‌یاخته انگلی است که دستگاه گوارش و تنفسی پستانداران از جمله انسان را مبتلا می‌نماید. انتقال تجربی انگل جدا شده از انسان به موش، بره، گوساله و برخی حیوانات دیگر و بالعکس نشانگر این است که این میکروارگانیسم از انگل‌های مهم زئونوتیک می‌باشد (۳ و ۹). تاریخچه تشخیص اولیه این تک‌یاخته به سال ۱۹۰۷ برمی‌گردد. در این سال Ernest Edward Tyzzer این انگل را در غدد معده موش مشاهده و آن را کریپتوسپوریدیوم موریس

* - گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(Cryptosporidium muris) نام نهاد. سپس در سال ۱۹۱۲ انگلی را که از نظر ویژگی مرفولوژیکی با انگل قبلی شباهت داشت در روده موش تشخیص و آن را کریپتوسپوریدیوم پاروم (C. parvum) نامید. به‌علاوه اولین گزارش ابتلا پرندگان به این تک‌یاخته نیز به Tyzzer نسبت داده می‌شود. تقریباً برای نیم قرن بعد از شناخت این انگل، اهمیت آن از نظر اقتصادی و پزشکی در پرده ابهام باقی مانده بود، تا اینکه در سال ۱۹۵۵ بروز اسهال و مرگ و میر ناشی از ابتلا به کریپتوسپوریدیوم را در جوجه بوقلمون‌های ۱۴-۱۰ روزه گزارش نمودند. متعاقب آن در سال ۱۹۷۱ نشان داده شد که کریپتوسپوریدیوز گوساله با بروز اسهال همراه است. اولین موارد کریپتوسپوریدیوز انسان در سال ۱۹۷۶ شرح داده شد و در سال ۱۹۸۲ اسهال شدید موجود در بیماران مبتلا به کمبود ایمنی اکتسابی (AIDS) را به این تک‌یاخته نسبت دادند. با پی‌بردن به اهمیت اقتصادی و بهداشتی این انگل تحقیق و تفحص جنبه‌های اپیدمیولوژی، تشخیص آزمایشگاهی، درمان و پیشگیری از این بیماری مورد توجه مجامع دامپزشکی و پزشکی دنیا قرار گرفت (۳). در خلال سال‌های ۱۹۸۱ تا ۱۹۸۵ روش‌های متعددی جهت تشخیص اووسیست کریپتوسپوریدیوم در مدفوع و ترشحات آلوده بدن پیشنهاد گردید و سبب شد که روش‌های مشکل جای خود را به شیوه‌های نسبتاً عملی‌تر واگذار نمایند (۱، ۳، ۹ و ۱۱).

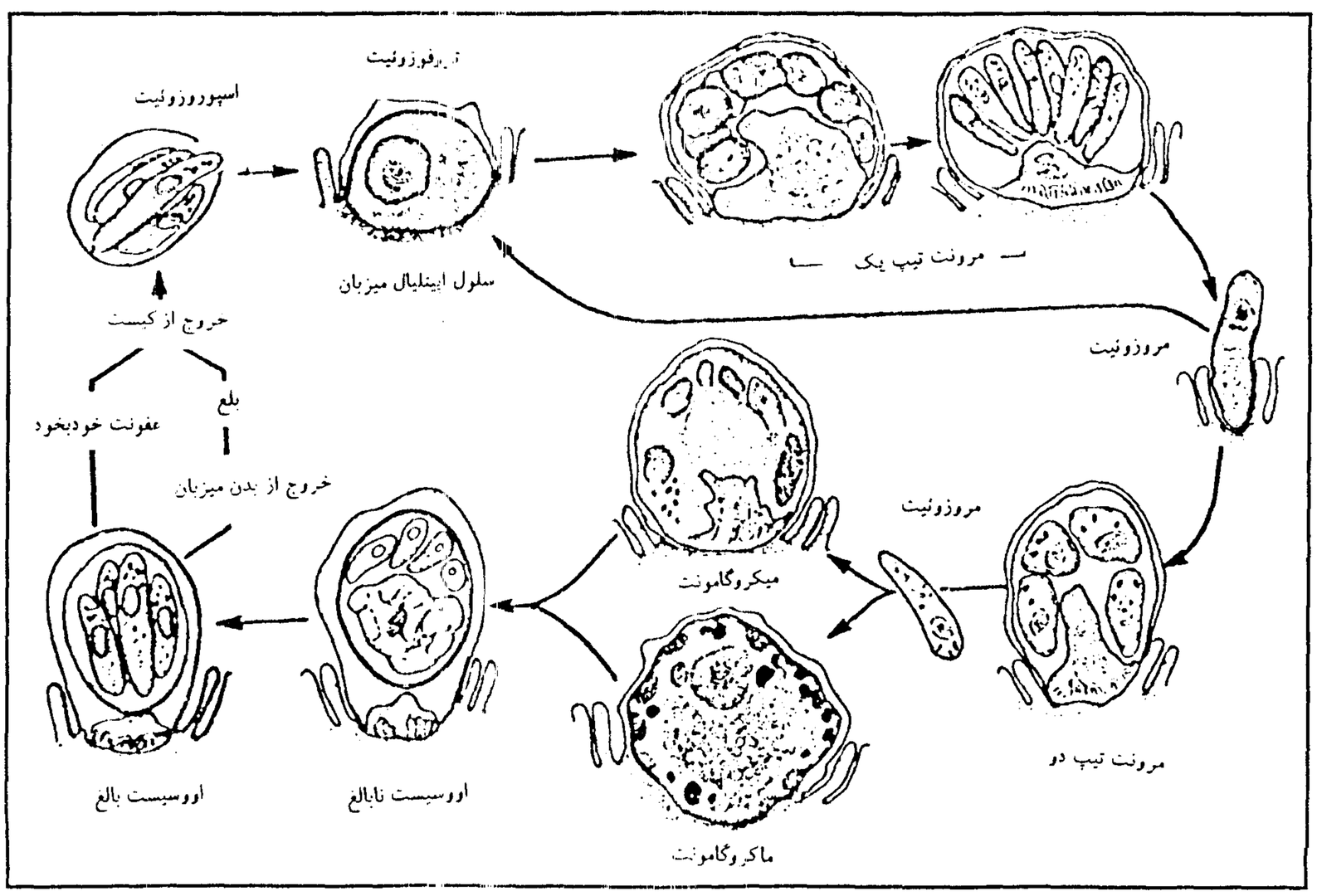
تاکسونومی و سیر تکاملی انگل :

این تک‌یاخته را در جنس پروتوزوآ و راسته **اپی‌کمپلکسا** طبقه‌بندی نموده‌اند. مجموعاً ۲۱ گونه از آن در ماهی، خزندگان، پرندگان و پستانداران یافت شده است. وجه تسمیه آنها براساس گونه‌ای است که این انگل‌ها از آن جدا شده‌اند. گونه‌هایی که اکنون مورد تأیید قرار گرفته‌اند، C. meleagridis و C. baileyi در پرندگان و C. parvum, و C. muris در پستانداران را شامل می‌شوند. به‌نظر می‌رسد که C. parvum برای تمامی گونه‌های پستاندار از جمله انسان پاتوژن باشد. مراحل تکاملی کریپتوسپوریدیوم همانند تک‌یاخته کوکسیدیا است با این اختلاف که به علت کوچک بودن تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم، مشاهده مورفولوژیک آن با میکروسکوپ نوری مشکل یا امکان‌پذیر نیست. از نظر استقرار، این انگل داخل سلولی ولی خارج سیتوپلاسمی می‌باشد، و بدین‌ترتیب مراحل تکاملی خود را در چنین وضعیتی طی می‌نماید. هنگام بلع اووسیست از طریق مصرف غذا یا آب آلوده یا تنفس آنها توسط میزبان مناسب، اسپوروزوئیت‌ها از کیست خارج شده و سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه گوارش یا تنفس را مبتلا می‌سازند. برای رهاشدن از کیست حضور آنزیم‌های پانکراس و نمک‌های صفراوی مورد لزوم است، با این حال برخی از اسپوروزوئیت‌های این تک‌یاخته در محلول‌های آبکی و گرم، بدون هر گونه تحریکات به‌خصوصی از اووسیست خارج می‌شوند. مراحل دیگر سیر تکاملی انگل، تشکیل تروفوزوئیت، مزوگونی یا شیزوگونی را شامل می‌گردد. دو تیپ مورفولوژیک از شیزونت وجود دارد : شیزونت تیپ یک که حاوی شش تا هشت مروزوئیت می‌باشد و شیزونت تیپ دو که واجد چهار مروزوئیت است. مروزوئیت‌های موجود در

شیزونت‌های تیپ یک تکثیر و تزاید جنسی را آغاز می‌نمایند (گامتوگونی). در سلول‌های جدید مروزوئیت‌ها یا به‌صورت میکروگامونت (Microgamont) یا ماکروگامونت (Macrogamont) که به‌ترتیب مراحل نر و ماده انگل می‌باشند، متمایز می‌شوند. میکروگامونت‌ها در مراحل اولیه چند هسته‌ای شده و هنگامی که بالغ می‌شوند هر هسته معادل یک اسپرم بوده و میکروگامت (Microgamete) را تشکیل می‌دهند و در نهایت سلول ماده را بارور می‌سازند. بعد از باروری، ماکروگامونت به‌صورت اووسیست متکامل و اسپوردار می‌شود. در هنگام کامل‌شدن اسپوروگونی هر اووسیست حامل چهار اسپوروزوئیت است. اغلب اووسیست‌ها بدن را ترک می‌گویند. اووسیست‌های موجود در دستگاه گوارش از طریق مدفوع یا در صورت ابتلاء دستگاه تنفس توسط ترشحات دستگاه تنفس و ترشحات بینی دفع می‌شوند. برخی از اووسیست‌ها بدن را ترک ننموده، بلکه اسپوروزوئیت‌های خود را آزاد می‌نمایند. اسپوروزوئیت آزاد شده مخاطات را مورد حمله قرار داده و چرخه زندگی انگل یعنی شیزوگونی، گامتوگونی و اسپوروگونی مجدداً طی می‌شود. مراحل مختلف سیر تکاملی این تک‌یاخته در تصویر ۱ ارائه شده است (۳ و ۵).

راه‌های انتقال بیماری :

انتقال این تک‌یاخته عمدتاً از راه دهان و از طریق آب و مواد آلوده به مدفوع می‌باشد. گاو، خوک و سایر حیوانات اهلی منابع آلودگی را برای انسان تشکیل می‌دهند. بنابراین افرادی که به نحوی با حیوانات سر و کار دارند بیشتر در معرض ابتلا واقع می‌شوند. به‌علاوه انتقال از طریق حیوانات وحشی و



تصویر ۱ - چرخه تکاملی انگل کریپتوسپور بدیوم

حیوانات موجود در باغ‌وحش امکان‌پذیر است. آب آشامیدنی و یا آبی که برای شنا از آن استفاده می‌شود نیز ممکن است باعث انتقال اووسیست‌های این تک‌یاخته شوند. در برخی کشورها نظیر مکزیک، آب‌های سطحی آلوده یکی از منابع مهم انتقال این تک‌یاخته است. آب رودخانه‌ها و چاه‌های آلوده به فاضلاب، یا آب آلوده چراگاه‌های حیوانات اهلی و وحشی و استفاده از فاضلاب در امر کشاورزی در انتقال این انگل نقش مهمی را ایفا می‌نماید. به‌علاوه انتقال اووسیست‌ها از راه هوا در نتیجه ابتلا دستگاه تنفس، انتقال به وسیله حشرات نظیر مگس، غذاهای آلوده (سبزیجات، میوه و شیر خام آلوده) و لوازم شخصی افراد آلوده نیز قابل ذکر است. افراد آسمپتوماتیک می‌توانند منبع آلودگی برای افراد سالم باشند. براساس تحقیقات انجام شده میزان افراد آسمپتوماتیک در هندوستان ۶٪ و در لیبریا ۱۰٪ می‌باشد (۳ و ۸). مطالعه‌ای که توسط دکتر محمد فلاح در شهر همدان بر روی ۵۵۴ نمونه مدفوع انجام شده است، در ۵/۴ درصد (۳۰ نفر) این افراد ابتلا به این انگل وجود داشته و اووسیست با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی متداول در مدفوع آنها مشاهده شده است. بیشترین موارد در کودکان ۴-۱ ساله و ۶ نفر از افراد مبتلا، با حیوانات اهلی سر و کار داشته‌اند (۱). اووسیست این تک‌یاخته در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی بسیار مقاوم است، در محیط خارج و در شرایط مساعد ماه‌ها و گاهی تا دو سال زنده و عفونت‌زا باقی می‌ماند. مواد ضدعفونی که در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند قادر به از بین‌بردن اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم نمی‌باشند و کلر موجود در آب آشامیدنی نمی‌تواند آنها را نابود نماید (۳).

پاتوژنز :

پاتوژنز این تک‌یاخته و علت بروز بیماری ناشی از عفونت با کریپتوسپوریدیوم به‌خوبی مورد شناسایی قرار نگرفته است. برخی معتقدند که علت بروز علائم و نشانه‌های بیماری توکسین‌های آزاد شده از این انگل می‌باشد، و برخی دیگر به تغییرات آنزیمی در سلول‌های مبتلا و یا تأثیرات مکانیکی ناشی از ابتلا به این میکروارگانیسم اشاره می‌نمایند (۳، ۵ و ۸). ارتباط واضح و آشکاری مابین حضور این ارگانیسم در مواضع خاص بدن و ویژگی‌های بالینی این بیماری وجود دارد. مواضعی که اغلب مبتلا می‌شوند، دستگاه گوارش و ضمائم مربوطه (مجاری صفراوی، کبد، کیسه صفرا و پانکراس)، تنفس و بعضاً ملتحمه چشم را شامل می‌گردد. در ماهی و خزندگان معده و احتمالاً روده و در پرندگان دستگاه تنفس، روده و برخی از ارگان‌ها نظیر بورس فابریسیوس و کلوآک مبتلا می‌شوند (۲، ۳، ۴ و ۵). در پستاندارانی که سیستم ایمنی آنها سالم و اعمال فیزیولوژیک خود را به‌خوبی انجام می‌دهد، غالباً عفونت به روده محدود می‌شود، در حالیکه در آنهایی که دچار نقص ایمونولوژیکی می‌باشند وسعت ابتلا بسیار و عفونت شدید و ممکن است تمامی طول دستگاه گوارش از مری تا رکتوم و نیز پانکراس، کبد و کیسه صفرا و مجاری تنفسی مبتلا شود (۳، ۶ و ۱۱).

علائم و نشانه‌های بالینی :

بسته به گونه انگل، سن و وضعیت

ایمونولوژیکی میزبان ممکن است علائم و نشانه‌های بالینی بیماری از تحت کلینیکی تا شدید تغییر نماید. بیشترین شیوع این بیماری در کودکان ۲-۱۵ ساله به‌ویژه زیر دو سال می‌باشد. دوره کمون بیماری ۳-۱۴ روز و به‌طور متوسط ۷-۱۰ روز است. در انسان و حیوانات مختلف آشکارترین تظاهرات کریپتوسپوریدیوز به‌صورت اسهال آبکی بروز می‌نماید که در مواردی به اسهال وبایی شباهت دارد. در انسان علائم و نشانه‌های بیماری عمدتاً با بروز تب خفیف، درد عضلانی، بی‌حالی، بی‌اشتهایی، تهوع و استفراغ (به علت ابتلا احتمالی معده)، احساس ناراحتی در معده، اسهال بدبو همراه با نفخ و گاز، دزهیدراتاسیون، از دست‌دادن وزن بدن (تا ۱۰٪ وزن بدن) و در موارد عفونت تنفسی با کوریزا و سرفه مشخص می‌شود. مدت تداوم اسهال از دو روز تا دو ماه و به‌طور میانگین ۸ روز می‌باشد. ابتلا پانکراس و کیسه صفرا با احساس درد شدید شکم که درد ناشی از آپاندیسیت را تداعی می‌نماید، همراه است (۱، ۲، ۳، ۶، ۷، ۹ و ۱۱).

در رادیوگرافی وجود گاز در قولون، تجمع مایع در روده باریک و کلفت مشاهده می‌شود. عکس‌برداری بعد از تجویز ترکیبات باریوم، نواحی اولسره و غیرطبیعی بودن نواحی مبتلا دستگاه گوارش را آشکار خواهد ساخت. قولون نازل، قولون سیگموئید و رکتوم ادماتوز و با کولیت حاد همخوانی دارد. در پروتوسکوپی، مخاط رکتوم ادماتوز و پلاک‌های زرد رنگی که اکسودای فیبرینی به‌نظر می‌رسند، سطح آن را پوشانیده‌اند. با این که ضایعات در سرتاسر لوله گوارش مشاهده می‌شوند، با این حال معمولاً ابتلا ژژونوم وایلئوم شدیدتر است (۱، ۲، ۳ و ۴).

ضایعات ماکروسکپیک :

عقده‌های لنفاوی مزانتریک گاهی متورم، جدار بخش‌های مبتلای روده ضخیم، روده ممکن است پرخون یا هیچگونه پرخونی وجود نداشته باشد. ممکن است روده حاوی مایع و گاز باشد. در کالبدگشایی حیوانات مبتلا به شکل مزمن بیماری، عدم رشد، لاغری مفرط، تحلیل بافت چربی و آتروفی سروزی چربی، تحلیل عضلات و علائم و نشانه‌های کمبودهای مختلف تغذیه‌ای مشاهده می‌شود (۲، ۳ و ۴).

ضایعات میکروسکوپیک :

برای مشاهده این تک‌یاخته می‌توان مقاطع آسیب‌شناسی را به روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی نمود. در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین این تک‌یاخته قابل رؤیت می‌باشد. بسته به شدت ابتلا شماری معدود یا تعداد بسیار زیادی از اجرام کریپتوسپوریدیایی را می‌توان در سطح سلول‌های پوششی بافت مخاطی مشاهده نمود. برحسب مرحله تکاملی انگل، اندازه این اجرام متفاوت و تقریباً قطری حدود ۲-۵ میکرون دارند. این تک‌یاخته رنگ هماتوکسیلین را به خود گرفته، به‌صورت اجرام دیسک مانند به رنگ بنفش کم رنگ بیرون می‌آیند و معمولاً پیرامون این ساختمان‌ها را حاله‌ای کم رنگ احاطه نموده است (Vacuole parastophorous). نگارنده رنگ‌آمیزی گیمسا جنرز (Giemsa jenner's) را برای مقاطع بافتی به‌کار گرفته و نتایج خوبی را کسب نموده است. در رنگ‌آمیزی با گیمسا جنرز، این ارگانیسم‌ها رنگ آبی پررنگ را به خود می‌گیرند (۲ و ۴).

به‌علاوه می‌توان مقاطع آسیب‌شناسی را با روش

ذیل‌نیلسن تغییر یافته رنگ‌آمیزی نمود. با این روش، اووسیست‌های تک‌یاخته قرمز پررنگ می‌شوند. با استفاده از رنگ سبز مالاشیت می‌توان زمینه بافتی را رنگ‌آمیزی نمود. در چنین حالتی اجرام قرمز رنگ انگلی در یک زمینه سبز قابل رؤیت خواهند بود (۱۰). به‌علاوه با این رنگ‌آمیزی و در بزرگ‌نمایی بالا می‌توان اسپوروزوئیت‌ها را در داخل اووسیست مشاهده نمود. تغییرات هیستوپاتولوژیک این بیماری در انسان تقریباً مشابه آن تغییراتی است که در حیوانات دیده می‌شود. به‌طور کلی حضور انگل ممکن است با واکنش‌های التهابی در پارین مخاطات مبتلا هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های بافت اپی‌تلیال مخاطی، از بین‌رفتن میکروویلی‌های اپی‌تلیوم روده و مژک‌های سلول‌های پوششی مجاری تنفسی و نکروزهای کانونی سلول‌های اپی‌تلیال مبتلا همراه باشد. در مشاهده میکروسکوپی روده از ارتفاع سلول‌های پوششی مخاطی کاسته شده، به‌صورت استوانه‌ای کوتاه، مکعبی یا سنگفرشی ساده بیرون می‌آیند، این سلول‌ها ممکن است میکروویلی‌های خود را از دست داده باشند. در مشاهده با میکروسکوپ الکترونیک میتوکندری‌های سلول‌های مبتلا متورم، و واکوئول‌دارند. در سرتاسر سیتوپلاسم سلول و در پیرامون هسته واکوئول‌هایی با دیواره صاف و پر از مایع حضور دارند (۲، ۳ و ۴).

همان‌طور که اشاره شد این تک‌یاخته داخل سلولی و خارج سیتوپلاسمی است. بنابراین در مشاهده با میکروسکپ الکترونیک می‌توان تک‌یاخته را در درون فضایی که توسط میکروویلی‌های سلول مبتلا ایجاد شده است مشاهده نمود. انگل از طریق دستگاه تغذیه‌ای خود (Feedr organ) با سلول مبتلا ارتباط داشته و از این طریق مواد لازم را برای تکامل و ادامه حیات کسب می‌نماید، و احتمالاً از طریق آزادنمودن توکسین‌ها و اختلال در متابولیسم و آنزیم‌های سلول میزبان بیماریزایی خود را بر ارگان مبتلا تحمیل می‌کند. در روده مبتلا، خمل‌ها دچار آتروفی شده، کوتاهتر، عریض‌تر از حد معمول، انتهای آنها کند و پهن می‌شود. برخی از خمل‌ها با یکدیگر ادغام و یکی می‌شوند. مشاهده با میکروسکوپ الکترونیک حضور دسموزوم‌ها را مابین انتروسیت‌های خمل‌های ادغام‌شده مجاور نشان داده است.

تغییرات التهابی توسط پالایش پلاسماسل‌ها، نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها به داخل پارین مخاط مشخص می‌شود. پلاک‌های پیر (Peyer's patche's) راکتیف، کریپت‌ها متسع و بافت پوششی آنها هیپرپلاستیک و ممکن است حاوی ترشحات ائوزینوفیلیک و سلول‌های نکروزه باشند. مکن است در کانون‌های نکروزه سلول‌های اپی‌تلیال، باکتری‌های روده کلونیزه و عفونت ثانویه را سبب شوند. در عفونت دستگاه تنفس، مجاری تنفسی مبتلا حاوی مقادیر زیادی ترشحات مخلوط با موکوس می‌باشند. مخاط متورم، اپی‌تلیوم مژه‌های خود را از دست داده و تغییرات هیپرپلاستیک یا هیپرتروفیک ممکن است در آن مشهود باشد. ممکن است انفیلتراسیون سلول‌های التهابی به داخل پارین مخاط و در زیر بافت اپی‌تلیوم مشاهده شود. با توجه به علائم و نشانه‌های بالینی، مشاهده اجرام کریپتوسپوریدیایی در

نمونه‌های به‌دست آمده از بیوپسی یا اتوپسی انسان یا حیوان می‌توان به تشخیص رسید (۲، ۳، ۴، ۵، ۷، و ۱۱).

لازم به یادآوری است که تشخیص این انگل در مقاطع هیستوپاتولوژیکی نیاز به تجربه داشته و به‌علاوه حتی‌الامکان بایستی سعی شود که از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی نظیر گیمسا جنرز و زیل‌نیلسن تغییر یافته نیز استفاده شود. در صورت وجود امکانات، عده‌ای ترجیح می‌دهند که برای تأیید تشخیص از میکروسکپ الکترونیک ترانس میسشن (TEM) استفاده نمایند. کاربرد این وسیله آزمایشگاهی کلیه تردیدها را در مورد تشخیص این بیماری از بین می‌برد، با این حال با توجه به هزینه زیاد، وقت‌گیربودن، و عدم دسترسی همه آزمایشگاه‌ها به آن، ترجیح داده می‌شود که از روش‌های ساده‌تر استفاده نمایند. در ازمایش با میکروسکپ الکترونیک ترانس میشن می‌توان تمامی مراحل سیر تکاملی کریپتوسپوریدیوم از جمله مراحل شیزوگونی، گامتوگونی و اسپوروگونی را به‌خوبی مشاهده و جزئیات هر یک را به‌خوبی نشان داد. استفاده از میکروسکپ الکترونیک اسکن (SEM) بیشتر جنبه تحقیقاتی داشته و برای تشخیص بیماری توصیه نمی‌شود. در مطالعه‌ای که نگارنده بر روی قطعاتی از بورس فابریسیوس و کلوآک مبتلا به کریپتوسپوریدیوم انجام داده است، این قطعات بافتی پس از مراحل دهیدراتاسیون و خشک‌نمودن در خلاء و پوشانیدن سطح آنها با ذرات طلا (با دستگاه Gold coater)، تحت میکروسکپ الکترونیک اسکن متعلق به گروه متالوژری دانشگاه صنعتی شریف مورد آزمایش قرار داده شدند. در این مطالعه محل استقرار انگل، شدت ابتلا، مورفولوژی سطحی انگل، از دست‌رفتن سلول‌های مخاطی،مواضع آزاد شدن اسپوروزوئیت‌ها از اووسیست، (از شکاف یا Sature) مشاهده گردیدند. این اولین مطالعه‌ای است که بر روی کریپتوسپوریدیوزیس بورس فابریسیوس و کلوآک پرندگان در ایران انجام شده است و بنابر این گزارش می‌شود.

استفاده از حیوانات آزمایشگاهی جهت تکثیر و تزاید کریپتوسپوریدیوم برای مقاصد تحقیقاتی و تشخیص :

بهترین حیوانات آزمایشگاهی برای تکثیر این تک‌یاخته گرسانه، بز و بره‌های شیرخوار است. سن این حیوانات در هنگام خوراندن مواد مشکوک یا آلوده بایستی کمتر از سه ماه باشد. می‌توان برای همین منظور از نوزاد شیرخوار موش کوچک سفید آزمایشگاهی استفاده نمود. به‌علاوه کریپتوسپوریدیوم را می‌توان در پرده کوریوآلانتوئیک تخم مرغ جنین‌دار تکثیر نمود (۳).

روش‌های آزمایشگاهی ساده و کم هزینه برای تشخیص عفونت‌های کریپتوسپوریدیایی :

با استفاده از این روش‌ها می‌توان اووسیست‌ها را در مدفوع با ترشحات برونش و یا هر مایع بیولوژیک آلوده‌ای نشان داد. تا قبل از ۱۹۸۰ تشخیص این بیماری تنها از طریق آزمایش مقاطع هیستولوژیک مخاط روده انجام می‌گرفته و برای مشاهده انگل رنگ‌آمیزی روتین هماتوکسیلین ائوزین به‌کار گرفته می‌شده است. در نهایت برای تأیید تشخیص از آزمایش با میکروسکوپ الکترونیک

استفاده می‌نموده‌اند. اکنون نیز شیوه‌های مذکور از نظر تشخیص آزمایشگاهی و امور تحقیقاتی کاربرد وسیعی دارند، با این حال امروزه تشخیص بیماری عمدتاً براساس مشاهده اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم در گسترش مدفوع یا ترشحات آلوده است. این روش‌ها تا حدودی مطمئن، کم‌خرج و سریع بوده، و می‌توان در هر آزمایشگاهی آنها را برای تشخیص بیماری به‌کار گرفت. برخی از این روش‌ها حساس و اقتصادی می‌باشند، بنابراین علاوه‌بر نشان دادن اووسیست‌ها در گسترش، می‌توان آنها را از اجرام مشابه نظیر مخمرها متمایز نمود (۱، ۳، ۹ و ۱۲).

برای تشخیص اووسیست در نمونه‌های مدفوع، یا سایر مواد آلوده از روش‌های زیر استفاده می‌شود :

الف) فلوتاسیون در محلول قندی اشباع شیتر (Sheather's suger flotation)

ب) رنگ‌آمیزی گسترش مدفوع، خلط یا سایر مواد آلوده

۱ - رنگ‌آمیزی اسیدفست (زیل‌نیلسن کاینیون تغییریافته) (Modified kinyoun cold technique)

۲ - رنگ‌آمیزی منفی

۳ - رنگ‌آمیزی با سافرانین - متیلن بلو

۴ - رنگ‌آمیزی گیمسا

۵ - رنگ‌آمیزی با اورامین O یا رودامین - اورامین

۶ - رنگ‌آمیزی با مپاکرین (Mepacrine)

۷ - رنگ‌آمیزی با روش ایمونوفلورسانس

قابل ذکر است که رنگ‌آمیزی‌های روتین (تری‌کروم و هماتوکسیلین آهن) که برای تشخیص حضور انگل‌های دیگر مدفوع استفاده می‌شود، برای نشان‌دادن اووسیست این تک‌یاخته مفید نبوده و کاربرد ندارد.

قبل از شرح مختصر شماری از متداول‌ترین روش‌های فوق، درباره شیوه ارسال و پایدارنمودن نمونه اختصاراً بحث می‌شود. مدفوع یا مایعات دیگر از جمله ترشحات حاصله از دستگاه تنفس را می‌توان به‌طور تازه یا پایدار شده در محلول‌های پایدارکننده ارسال نمود. فرمالین ۱۰٪ و یا یک ماده نگهدارنده حاوی مخلوطی از استات سدیم، اسید استیک و فرمالین را می‌توان برای همین‌منظور به‌کار گرفت. در صورتی که نیازی به تکثیر و تزاید این انگل نباشد، بهتر است نمونه همراه با مواد پایدارکننده ارسال شود، زیرا احتمال ابتلا افرادی که در حمل و نقل این نمونه‌ها دخالت دارند وجود دارد. برای حفظ و نگهداری این تک‌یاخته می‌توان از محلول دیکرومات پتاسیم در آب استفاده نمود.

کاربرد روش فلوتاسیون با محلول قندی اشباع (Sheater's suger flotation) :

همراه با میکروسکپ فاز کنتراست برای تشخیص اووسیست‌های این تک‌یاخته شیوه مناسبی می‌باشد. اووسیست‌ها براق، نور را منعکس نموده، به اندازه ۴/۵ تا ۵/۵ میکرون و حاوی ۱-۴ گرانول تیره می‌باشند. با برخی از انواع میکروسکپ‌ها، این اجرام صورتی رنگ به‌نظر می‌رسند. برای انجام این روش محلول قندی اشباع فنل‌دار، لوله سانتریفوژ در پیچ‌دار، و سانتریفوژ g ۵۰۰ گرم مورد نیاز است. بعد از سانتریفوژ مخلوط محلول قندی اشباع و نمونه رقیق‌شده و صاف‌شده مدفوع یا خلط، توسط لوپ میکروب‌شناسی یا پیپت پاستور نمونه‌ای از مواد شناور

موجود در سطح مخلوط سانتریفوژ شده برداشت و پس از قراردادن بر روی لام و پوشانیدن آن با لامل تحت میکروسکپ فاز کنتراست مورد مطالعه قرار داده می‌شود. در این روش اجرام مخمری فاقد گرانول‌های مشخص موجود در اووسیست کریپتوسپوریدیوم بوده و رنگ آنها صورتی نمی‌باشد.

متداول‌ترین روش‌های رنگ‌آمیزی برای نشان‌دادن اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم در نمونه‌های مدفوع و مواد آلوده روش زیل‌نیلسن است که بر اساس ویژگی اسیدفست‌بودن دیواره اووسیست این تک‌یاخته می‌باشد.

رایج‌ترین رنگ‌آمیزی اسیدفست مورد استفاده، تکنیک سرد تغییر یافته کاینیون (Modified kinyoun cold technique) است. در این رنگ‌آمیزی اووسیست‌های قرمز رنگ به اندازه قطر ۴/۵-۵/۵ میکرون و رنگ زمینه بستگی به رنگ‌آمیزی افتراقی دارد. سبز مالاشیت زمینه را سبز رنگ و متیلن بلو آن را آبی رنگ می‌نماید. اغلب ذرات و خرده ریزهای موجود در مدفوع و مواد مورد آزمایش و مخمرها رنگ زمینه یا افتراقی را به‌خود می‌گیرند. بنابراین با اجرام کریپتوسپوریدیایی اشتباه نمی‌شوند (۱، ۳ و ۹).

رنگ‌آمیزی منفی :

برای نشان‌دادن اووسیست در نمونه‌های مدفوع مفید می‌باشد، از روش قبلی ساده‌تر بوده ولی نمی‌توان لام تهیه‌شده را به‌طور دائم نگهداری نمود. برای نمونه‌های مدفوع تازه بهترین روش بوده با این حال با مدفوع پایدار شده در فرمالین ۱۰٪ نیز نتایج رضایت‌بخشی حاصل می‌شود. در این روش از رنگ کاربول فوشین تغییر یافته کاینیون (Kinyoun's carbol fuchsin) استفاده می‌شود. با این رنگ‌آمیزی اووسیست تک‌یاخته براق، نور را منعکس نموده و زمینه لام قرمز تیره می‌شود. خرده ریزه‌های موجود در مدفوع، مخمرها و باکتری‌ها رنگ قرمز تیره را به‌خود می‌گیرند (۲).

رنگ‌آمیزی با رنگ‌های فلورسانت :

برای رنگ‌آمیزی اووسیست کریپتوسپوریدیوم در نمونه مدفوع می‌توان از رنگ‌های فلورسانت نظیر اورامین O، رودامین (۳ و ۹) و مپاکرین (۱۲) استفاده نمود. در بسیاری از موارد، اجرام کریپتوسپوریدیایی را نمی‌توان نشان داد، زیرا اندازه آنها کوچک و از نظر مورفولوژیکی با مخمرها شباهت دارند. رنگ‌آمیزی با اورامین -O (Auramin - O) بسیار حساس بوده و می‌توان تعداد بیشتری از اووسیست‌های این انگل را تحت میکروسکپ فلورسانت مشاهده نمود. شیوه دیگری که اخیراً برای رنگ‌آمیزی اووسیست‌ها پیشنهاد شده است، روش رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسانت مپاکرین (Mepacrine) است. مپاکرین ارزانتر از اورامین -O بوده و در کشورهای در حال توسعه بیشتر در دسترس قرار دارد (۱۲). بعد از رنگ‌آمیزی، اووسیست‌های دیسک مانند را که دارای رنگ فلورسانس زرد براق می‌باشند، می‌توان تحت میکروسکپ فلورسانس مشاهده نمود. نمونه‌های مثبت در صورت لزوم توسط روش ذیل‌نیلسن تغییر یافته مورد آزمایش مجدد قرار می‌گیرند. این روش سریع، انجام آن آسان و زمان تشخیص را کوتاه می‌نماید. حساسیت روش رنگ‌آمیزی با مپاکرین زیاد و هنگامی

که تعداد نمونه‌ها زیاد می‌باشد، برای اسکرین‌نمودن آنها شیوه مناسبی است.

روش‌های ایمونوفلورسانس در تشخیص اووسیست کریپتوسپوریدیوم

انسان و حیوانات مبتلا به کریپتوسپوریدیوز اغلب تعداد زیادی اووسیست دفع می‌نمایند، بنابراین در اکثر موارد کاربرد شیوه‌های معمول تغلیظ (فلوتاسیون) و رنگ‌آمیزی‌های رایج برای جستجو و تشخیص انگل کافی می‌باشد. هنگامی که تعداد انگل‌ها معدود و یا تعداد خرده‌ریزه‌های موجود در نمونه زیاد باشد تکنیک‌های حساس‌تری مورد نیاز است. این موارد نمونه‌های مدفوع افراد ناقل آسمپتوماتیک نمونه‌هایی که از آب‌های سطح‌الارضی آلوده و آب شرب مشکوک به‌دست آمده را شامل می‌شوند. در چنین شرایطی می‌توان از شیوه‌های ایمونوفلورسانس مستقیم یا غیرمستقیم سود جست. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال یا منوکلونال مختص کریپتوسپوریدیوم پاروووم در آزمایشات ایمونوفلورسانس مستقیم و غیرمستقیم و جهت تشخیص اووسیست‌های موجود در نمونه‌های آلوده مورد استفاده قرار می‌گیرند. کاربرد آنتی‌بادی کونژوگه با فلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC) و رنگ آبی اوانس (Evans blue) در تمایز اووسیست‌های این تک‌یاخته از خرده‌ریزه‌های موجود در مدفوع و سلول‌های مخمری کمک می‌نماید. در تحت میکروسکپ فلورسانس در یک زمینه تاریک، اووسیست‌های به رنگ سبز درخشان خود را نشان می‌دهند. آبی اوانس که به‌عنوان رنگ افتراقی به‌کار گرفته می‌شود، سبب قرمز رنگ‌شدن خرده ریزه‌های موجود در مدفوع و مخمرها می‌شود (۳).

تشخیص سرولوژیکی :

برای نشان‌دادن تماس انسان یا حیوان با تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم از روش‌های مختلف سرولوژیکی استفاده می‌گردد. این آزمایشات فقط در معدودی از آزمایشگاه‌های کشورهای مختلف دنیا انجام می‌گیرد و هدف از آن تجسس آنتی‌بادی‌های ضدکریپتوسپوریدیوم در سرم می‌باشد. برای این منظور، از روش‌های ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و الیزا (ELISA) استفاده می‌کنند. جهت جستجوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی این تک‌یاخته با استفاده از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، از مقاطع هیستولوژیکی یا انجمادی روده موش آلوده یا اووسیست‌های خالص‌شده سود می‌جویند. هنگامی که روده موش آلوده به‌کار گرفته می‌شود، می‌توان آنتی‌بادی را برعلیه تمامی مراحل انگل نشان داد در حالیکه استفاده از اووسیست فقط آنتی‌بادی‌های ضددیواره خارجی اووسیست را نشان می‌دهد. با کاربرد تکنیک الیزا می‌توان به حضور آنتی‌بادی‌های کلاس IgG و IgM که برای کریپتوسپوریدیوم اختصاصی می‌باشند، پی برد. در این روش از پلیت‌های ۹۶ گوده‌ای که توسط آنتی‌ژن بسیار خالص‌شده اووسیست پوشیده شده‌اند استفاده می‌شود (۳).

منابع :

۱ - فلاح، م. مطالعه کریپتوسپوریدیوم در کودکان مبتلا به اسهال در همدان. طرح تحقیقاتی پایان‌یافته. دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی (۱۳۶۳).

۲ - قراگوزلو، م.ح. کریپتوسپوریدیوز در گوساله و تحلیلی از این بیماری. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۴۰، شماره ۲، ۳ و ۴ صفحات : (۱۳۶۳).

References :

3 - Dubey, J.P., Speer, C.A. and Fayer, K. Cryptosporidiosis of man and animals. CRC press, PP: 4(29), 31-47, 52-55, (1990).

4 - Gharagozlou, M.J. and Khodashenas, M. Cryptosporidiosis in a native rooster with a chronic proliferative enteritis. Archiva Veterinary, TOM XXVII, 129-138, (1985).

5 - Jervis, H.R., Merill, I.G. and Sprinzh. Coccidiosis in the Guineapig small intestine due to cryptosporidium. Am. J. Vet. Res. 27, 408-414, (1966).

6 - Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, G. and Robin, C.E. Over whelming watery diarrhea associated with a cryptosporidium in an immunosuppressed patient. Gasteroenterology, 70, 1156-1160, (1976).

7 - Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A. and Yardley, J.H. Acute enterocolitis in a human-being infected with the protozoan cryptosporidium. Gasteroenterology, 70, 592-598, (1976).

8 - Pozio, E., Morales, M.A.G. Mancin Barbieri and La Rose, G. Cryptosporidium, different behaviour in calves of isolated human origin. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 86, 636-638, (1992).

9 - Shu Xian, Zu Shu, Yu Zhu and Jin Fer. Li. Human cryptosporidiosis in China. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. (86), 639-640, (1992).

10 - Stefana Dan, Benescu, R. Application De Le Methode de Coloration Ziehl Neelsen Modifiee Sur De Sections Histologiques Des Le Diagnostic Cryptosporidiose. Archiva Veterinaria. TOM XVIII, 67-72, (1978).

11 - Synder, S.P., England, J.J. and Mc Chesney, A.E. Cryptosporidiosis in immunodeficient arabian foals. Vet. Pathology, 15, 12-17, (1978).

12 - Ungureanu, E.M., Dontu, G.E. A new staining technique for the identification of cryptosporidium oocysts in fecal smears. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, (86), 636, (1992).

have been discussed. During the last decade invasive methods were replaced by the several laboratory tests to indentify oocysts in fecal materials and respiratory secretions as following :

A - Sheater's sugar floatation technique, direct examination of prepared, fresh unstained slides by a suitable phase contrast microscope.

B - Available staining procedures for fecal material or suspected secretions.

1 - Acid fast staining (Modified Kinyouin cold technique)

2 - Negative staining

3 - Safranine - methylene blue

4 - Auramine - O, Auramin - Rhodamine

5 - Mepacrine

6 - Immunoflourescence staining techniques

7 - Giemsa's stain

Modified kinyouin cold technique is the best method chosen for detection of oocysts in fecal materials, recommended for medical or veterinary medical diagnostic labratories. Auramine - O or Auramin - Rhodamine staining method is more sensitive, could detect more oocysts in the speciemens. Staining with mepacrine (a flourescence dye), is simply performed, inexpensive and fast; a suitable method for screening purposes, In the positive cases, the specimens could be stained further by the acid fast method, if required.

Immunoflourescence techniques are more sensitive and specific. The method is useful when the number of oocysts in the specimens is little (in asymptomatic carriers).

Key words : Cryptosporidiosis, Laboratory diagnosis

J. Fac. of Vet. Med. Univ. of Tehran, Vol. 52, No. 1, 1997

A review of cryptosporidiosis, laboratory diagnosis and preliminary report of both bursa of Fabricius (centeral immunologic organ of birds) and cloaca infection with cryptosporidium

Gharagozlou, M.J.*

Summary :

In this review cryptosporidiosis has been discussed from the historical, clinicopathological, etiological and epidemiological points of view. This ubiquitous protozoan ogranism parasitizes different species of birds, amphibian, fishes, repitles and mammals, was primarily identified, characterized and reported by Tyzzer in 1907. At the present time it is known that the organism to be an important zoonotic, may produce infection and clinical disease in different species of animals.

Infection and severity of clinical manifestations may be influenced by the state of immunity. In immunocompromized hosts, the infection and clinical signs and symptoms may be severe and sometimes fatal. The clinical manifestations may be a reflection of organs infected, ie, gasterointestinal tract pancreas, billiary tract, lung and conjunctiva.

The cryptosporidial infection has been reported in small intestine of several species of animals by author in Iran, including chickens, calves, lambs and small white labratory mice. In addition, the author has been recently diagnosed cryptosporidiosis of chiken bursa of fabricius and cloaca therefore it is reported. In all cases of cryptosporidiosis diagnosed (except in mice), the presence of cryptosporidium was associated with clinical signs and symptoms. Due to the importance of cryptosporidial infection in human and animals, the diagnostic laboratories should be aware of the different techniques used in clinical laboratory diagnosis of the organism. In this paper, several useful and available diagnostic methods such as histopathology using routine staining and histochemical and immunohistochemical staining of tissue speciemens obtained from biopsy or autopsy procedures, and suspected biological excreta, such as fecal materials or respiratory secretion using several laboratory techniques,

---

* - Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.