نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هجدهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۴۰۱،
پیاپی ۴۴ : ۹۸-۸۹

مقاله پژوهشی

بررسی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در ترشحات مخاط بینی گربه‌های خانگی با روش‌های مولکولی و میکروبیولوژی

امیر غفارجباری[۱]، سید جمال هاشمی[*۲]، منصور بیات[۳] سیامک مشهدی‌رفیعی[۴]

۱- دانش‌آموخته گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- استاد گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- دانشیار . دانشیار گروه علوم درمانگاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۵

چکیده

کریپتوکوکوزیس یک بیماری تحت حاد ومزمن است. *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* عامل این عفونت است. این مخمر در مدفوع پرندگان یافت می‌شود و از طریق استنشاقی قابل انتقال است. افرادی که دارای نقص ایمنی هستند در خطر آلودگی با این قارچ هستند. دراین مطالعه ۱۵۰ نمونه از مخاط بینی گربه‌های خانگی جمع‌آوری شد. از این نمونه‌ها سوسپانسیون تهیه گردید و سپس در محیط‌های کشت S، Sc و BHI کشت داده و در حرارت ۲۵ و۳۷ سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از ۴۸ ساعت توسط رنگ‌آمیزی کاتن‌بلو و مرکب چینی مورد مطالعه قرار دادیم. سپس با استفاده از تست‌های تخمیر قندی، هیدرولیز اوره و لوله‌زایا (جرم‌تیوب) آنها شناسایی شدند. تعداد ۴ نمونه مشکوک به *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* بودند. کلنی‌های مشکوک به *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* جهت PCR مورد بررسی قرار دادیم. نتایج به‌دست‌آمده شامل انواع قارچ‌های رشته‌ای همانند *پنی‌سیلیوم*، *آسپرژیلوس*، *آلترناریا*، *اسکوپولاریپسیس*، *موکور*، *رایزوپوس* و مخمرهای همانند *رودوتورلا*، *کاندیدا آلبیکنس*، گونه‌های *کاندیدا* و *پاچیا* است وهیچ گونه *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* جدا نشد. نمونه‌های مشکوک به کریپتوکوکوس نیز از لحاظ مولکولی منفی بودند. عدم جداسازی این قارچ از مخاطات بینی گربه می‌تواند به دلیل رعایت بهداشت در مورد گربه خانگی، نگهداری آنها در فضای داخلی منزل و عدم تماس با حیوانات و محیط خارجی است.

کلمات کلیدی: گربه‌های خانگی، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*، روش‌های مولکولی

*نویسنده مسئول: سید جمال هاشمی

آدرس: دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

پست الکترونیک: sjhashemi@tums.ac.ir

مقدمه

باتوجه به فور روزافزون بیماری‌های قارچی در عصر حاضر و اهمیت تشخیص آنها و نقش این میکروارگانیسم‌ها در ایجاد بیماری‌های سطحی و احشایی موجب شده‌است که در اغلب کشورهای پیشرفته جهان، مطالعات و تحقیقات بسیاری پیرامون مسائل ناشناخته ایجادکننده این ارگانیسم‌ها به‌عمل آید. البته در کشور ما با توجه به نوع شرایط اقلیمی و آب و هوای و اکولوژیکی و همین‌طور پیشرفت وضع اجتماعی، اقتصادی، صنعتی و کشاورزی شناخت عوامل قارچی و ارتباط آنها با شرایط مذکور از لحاظ بهداشت و طب پیشگیری و افتراق آنها از عوامل بیماری‌زا، اهمیت فراوانی دارد(۴،۱۹،۲۰،۲۲). بنابراین در این زمینه، شناخت این عوامل بسیار مهم است. کریپتوکوکوزیس یک عفونت مزمن، تحت‌حاد یا حاد ریوی، احشایی است. این عفونت توسط قارچی مخمری به‌نام *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* ایجاد می‌شود. اهمیت عمده این مخمر، ماهیت فرصت‌طلب بودن آن است. این ارگانیسم مهم‌ترین عامل قارچی تهدیدکننده حیات در بیماران مبتلا به ایدز است(۳،۱۸،۲۰،۳۰). منابع عمده محیطی آن خاک آلوده به فضولات کبوتر و یا درخت‌های اکالیپتوس است. جنس کریپتوکوکوس تقریباً ۳۷ گونه بوده که در بین آنها *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* تنها گونه‌ای است که پاتوژنیک است. دارای چهار سروتیپ A تا D است. این قارچ مخمری دارای سه واریته است، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* (*C. neoformans*)، *کریپتوکوکوس گاتی* (*C. gattii*)، *کریپتوکوکوس گروبی* (*C. grubii*) است(۵،۸،۱۲،۱۳). حیوانات شامل گربه، سگ، روباه، اسب، گوسفند، میمون، بز و غیره می‌توانند کریپتوکوکوزیس را کسب نمایند. این قارچ مخمری می‌توان از فضولات کبوتر جدا کرد. احتمالاً به دلیل درجه حرارت بدن کبوتر که در حدود ۴۲ سانتی‌گراد است و فلور باکتریای روده، در پرنده ایجاد بیماری نمی‌کند. دلیل وجود *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در داخل فضولات کبوتر، به قدرت استفاده از کراتینین به عنوان منبع نیتروژن است (۹،۲۵،۲۹). *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* برای پرندگان بیماری‌زا نیست و یا به میزان بسیار کمی بیماری‌زا است. این قارچ می‌تواند در ماده غذایی به عنوان ساپروفیت باقی بماند وغالباً در کودهای کهنه یا مدفوع پرندگان تشخیص داده می‌شود(۲۵). این قارچ در اندام‌ها و بافت‌های پرنده مهاجم نیست که این مربوط به درجه حرارت بالای بدن پرندگان است. ازطرف دیگر مرغدانی‌ها، قفس پرندگان، لانه کبوتر و واحدهای پرورش طیور، منابع اصلی عفونت کریپوکوکوسی برای پستانداران و انسان هستند(۲۶). سلول‌های مخمری برای مدت طولانی در مدفوع زنده می‌مانند. این قارچ می‌تواند از طریق گرد و غبار واستشاق وارد دستگاه تنفسی شود و باعث بروز عفونت گردد. یکی از مهم‌ترین خصوصیات این قارچ استعداد تولید کپسول است، که از عوامل مهم در بیماری‌زایی(۸،۹) این مخمر است. قدرت بیماری‌زایی بستگی به ضخامت کپسول دارد. در خاک به سرعت از بین می‌رود زیرا غذای خوبی برای انواع آمیب‌ها است. در فصل گرما به دلیل تابش نور مستقیم آفتاب خیلی زود خاک‌های آلوده از کریپتوکوکوس سترون می‌شوند. از لحاظ اپیدمیولوژی، عواملی چون سن و نژاد، چندان تاثیری ندارند ولی از لحاظ شغلی پرورش‌دهنگان کبوتر بیش از افراد عادی دارای آنتی‌بادی هستند، ولیکن میزان عفونت در آنها بیش از دیگران نیست. در مورد جنس نیز درگیری در آقایان به نسب ۲ به ۱ بیشتر از زنان است (۸،۲۵)، علت این

تفاوت نیز تماس بیشتر و مسائل شغلی و اختلافات هورمونی بین این دو جنس است. در مجموع می‌توان گفت در شیوع این عفونت عوامل فوق تاثیر چندانی ندارند. عفونت کریپتوکوکوزیس در اشکال بالینی متعددی در گربه ظهور می‌کند. گربه نسبت به سگ به این مخمر حساس‌تر است. گربه‌های دارای نقص ایمنی و گربه‌های مسن حساسیت بیشتری دارند. استنشاق قارچ می‌تواند منجر به تشکیل تومور در ناحیه گلو و بینی شود و ایجاد نارسایی‌های تنفسی و بینایی در حیوان کند که عفونت ریوی و کوری از آن جمله است (۹،۸،۳). ماهیت فرصت‌طلب بودن این قارچ، باعث می‌شود این ارگانیسم به عنوان یک عامل مهم در ایجاد عفونت در افرادی که دارای نقص ایمنی هستند، محسوب گردد (۱۰،۹). هدف از این تحقیق بررسی میزان حضور این مخمر در مخاطات بینی گربه‌های نگهداری‌شده در داخل منزل است؛ زیرا در صورت آلودگی گربه‌ها به این قارچ امکان دارد در صورتی که صاحب حیوان دارای نقص ایمنی باشد، دچار عفونت گردد.

مواد و روش‌ها

تعداد نمونه‌های جمع‌آوری‌شده ۱۵۰ نمونه بوده است که براساس مطالعات پیشین انجام شده‌است و نمونه‌گیری به صورت تصادفی و از کلیه حیوانات مراجعه‌کننده به کلینیک شامل گربه‌های خانگی که جهت ویزیت و یا بیماری به کلینیک‌های دامپزشکی مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شده‌است. تعداد کلینیک‌های دامپزشکی انتخاب شده در سطح شهر تهران ۷ عدد بودند. نمونه‌برداری از بینی گربه‌ها توسط دو عدد سوآب استریل انجام گردید. ابتدا سوآب‌ها را به آب مقطر استریل آغشته کرده و سپس از دو حفره بینی حیوان نمونه‌گیری صورت گرفت. کلیه مشخصات صاحب دام وگربه در یک پرسشنامه دریافت می‌شد. یکی از سوآب‌ها را جهت تهیه دو لام استفاده گردید و یکی با رنگ‌آمیزی کاتن‌بلو و دیگری با رنگ‌آمیزی مرکب چینی جهت مشاهده اجرام کپسول قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* رنگ شد. سوآب دیگر را به مدت ۲۴ ساعت در محیط برین‌هارت‌اینفیوژن‌براث قرار داده، سپس از محیط فوق ۱ میلی‌لیتر به هر یک از محیط‌های سابرودکستروزآگار و سابرودکستروزآگار حاوی کلرامفنیکل و برین‌هارت‌اینفیوژن‌آگار منتقل و به صورت خطی کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده شده را در حرارت ۲۵ سانتی‌گراد و ۳۷ سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم. محیط‌های کشت‌شده ابتدا پس از ۴۸ ساعت و سپس هرروز به مدت یک هفته از نظر رشد و وجود ارگانیسم‌های مخمر مانند کنترل وکلنی‌های رشد کرده در سطح هر محیط از نظر تعداد و شکل ظاهری بررسی می‌شود. کلنی‌های مخمری مشکوک را با مرکب چینی جهت بررسی کپسول رنگ‌آمیزی کرده وسپس در محیط کشت نایجر جهت بررسی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* کشت داده شد. در صورت عدم تایید، مخمرهای فوق را ازنظر تست‌های قندی و لوله زایا (جرم تیوب) جهت تشخیص مورد سنجش قرار داده شد. همچنین جهت یررسی قارچ‌های رشته‌ای نیز از اسلاید کالچر استفاده شد. نمونه‌های مشکوک به *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* از لحاظ ژنومی (DNA) تخلیص گردید (کیت سیناژن)؛ سپس (18SrDNA) تکثیر گردید و در مرحله بعد بر روی ژل آگاروز باند محصول (PCR) تخلیص و آنالیز گردید. پرایمرهای مورد استفاده (*URA5-AS1*) و (*URA5-S1*) بود که براساس مطالعات پیشین انتخاب شده‌اند(۲۴)؛ سپس برای تعیین توالی به شرکت بیوتک کره ارسال گردید.

پس از وصول نتایج به وسیله (*n BIAST*)، توالی‌ها با بانک داده‌های ژنی (*NBCI*) مقاسیه گردید.

نتایج

در ۱۵۰ نمونه مخاطات و ترشحات بینی گربه‌های مورد بررسی، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* جدا نگردید (جدول-۶).گربه‌ها از لحاظ جنسیت شامل ۵۲ نر و ۹۸ ماده بود که تعداد و درصد فراوانی آنها در جدول شماره یک بیان شده است. در بررسی فوق توانستیم انواعی از ارگانیسم‌های میکروبی را جدا کنیم. که طبق جدول شماره ۲ شامل انواعی از قارچ‌های ساپروفیت رشته‌ای، قارچ‌های مخمری بودند.

از ۱۵۰ نمونه در ۱۲۳ نمونه قارچ‌های ساپروفیت توانستند رشد کنند. مخمرها در ۹۸ نمونه رشد کردند (جدول-۲). قارچ‌های رشته‌ای ساپروفیت براساس تست اسلاید کالچر تشخیص داده‌شده و شامل گونه‌های مختلف آسپرژیلوس، آلترناریا، موکور، رایزوپوس و اسکوپولاریسیس و کلادوسپوریوم بوده است. که در بین آنها گونه‌های مختلف آسپرژیلوس دارای بیشترین فراوانی بودند (جدول-۳). مخمرهای جداشده از مخطات بینی گربه شامل، انواع گونه‌های *کاندیدا*، *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا تروپیکالیس*، و مخمرهای دیگری همانند *رودوتورلا*، *ژئوتریکوم* بودند. در بین آنها گونه‌های کاندیدا با ۹۲ مورد فراوانی بیش از سایر مخمرها بود (جدول-۴). سپس مخمرها براساس تست‌های تخمیر قندی و با استفاده از قندهای هم‌چون گلوکز لاکتوز، ترهالوز، مالتوز و ساکاروز و هم‌چنین با استفاده از تست جرم تیوب و هیدرولیز اوره توانستیم مخمرها را شناسایی کنیم (جدول شماره ۵).

نمونه‌های مشکوک به *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* پس از بررسی‌های میکروبی و مولکولی هیچ‌کدام *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* نبودند. نمونه *c2* جداشده قرابت نزدیکی با *کریپتوکوکوس پودزولیکوس* (*Cryptococcus podzolicus*) دارد.

جدول-۱. جامعه آماری براساس جنسیت

نوع حیوان	فراوانی جنس نر	فراوانی جنس ماده	فراوانی جنس نر برحسب درصد	فراوانی جنس ماده برحسب درصد
گربه	۵۲	۹۸	٪۳۴.۷	٪۶۵.۳

جدول-۲. میزان رشد عوامل میکروارگانیسمی در گربه

نوع میکروارگانیسم	فراوانی رشد	فراوانی عدم رشد	فراوانی رشد برحسب درصد	فراوانی عدم رشد برحسب درصد
قارچ ساپروفیت	۱۲۳	۲۷	٪۸۹.۵۱	٪۱۰.۲۹
مخمر	۹۸	۲۶	٪۷۹.۴	٪۲۰.۹۶

جدول-۳. فراوانی قارچ‌های ساپروفیت در گربه

نوع قارچ	فراوانی	میزان فراوانی بر حسب درصد
آسپرژیلوس	۷۷	٪۱۹.۸
آلترناریا	۹۷	٪۲۴.۹
موکور	۹۸	٪۱۷.۵
رایزوپوس	۴۴	٪۱۱.۳
اسکوپولاریسیس	۵۲	٪۱۱.۱
کلادوسپوریوم	۶۰	٪۱۵.۴
مجموع	۴۱۹	٪۱۰۰

جدول-۴. فراوانی قارچ‌های مخمری در گربه

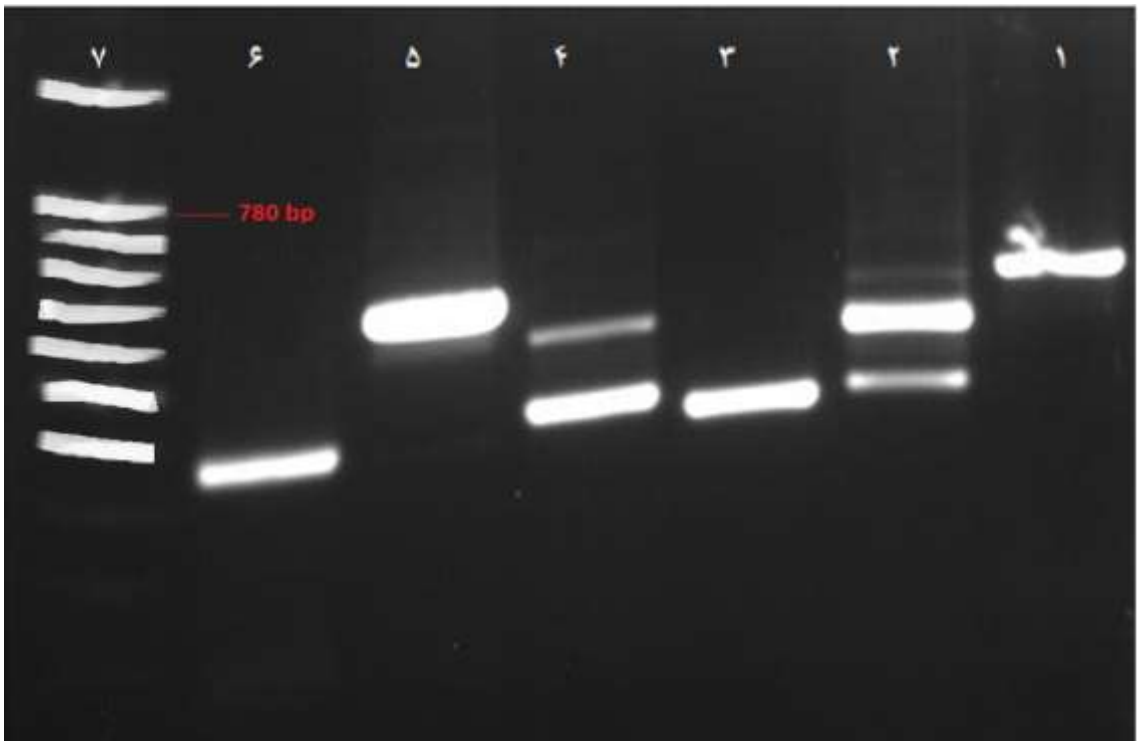
نوع قارچ	فراوانی	میزان فراوانی بر حسب درصد
کاندیدا SP	۹۲	٪۲۴.۶
کاندیدا آلبیکنس	۸۵	٪۲۲.۷
کاندیدا ترویکالیس	۲۵	٪۶.۷
ژئوتریکوم	۹۰	٪۲۴.۱
رودوتروla	۸۲	٪۲۱.۹
مجموع	۷۳۴	٪۱۰۰

جدول-۵. شناسایی مخمر

	لوله زایا	گلوگز	مالتوز	ساکاروز	لاکتوز	ترهالوز	هیدرولیز اوره
کاندیدا آلبیکنس	+	+	+	+	-	+	-
کاندیدا ترویپیکالیس	-	+	+	+	-	+	-
رودوترولا	-	+	+	+	-	-	+
سارکومیس	-	+	+	v	v	-	+

جدول-۶. فراوانی کریپتوکوکوس نئوفورمنس

نام قارچ	فراوانی رشد	فراوانی عدم رشد	فراوانی رشد برحسب درصد
کریپتوکوکوس نئوفورمنس	۰	۰	٪۰



شکل-۱. الکتروفورز مربوط به 18SrDNA حاصل از PCR نمونه‌های مشکوک به کریپتوکوکوس نئوفورمنس (باندهای شماره ۱ تا ۶ مربوط به نمونه‌های مشکوک و باند شماره ۷ مربوط به مارکر)، باند bp ۷۸۰ مربوط به کریپتوکوکوس نئوفورمنس است.

بحث

کریپتوکوکوزیس یک بیماری قارچی تحت‌حاد و حتی مزمن است. این بیماری عمدتاً مغز، منژها، ریه و پوست را در انسان و حیوانات اهلی مثل سگ، گربه، گاو، اسب مورد تهاجم قرار می‌دهد (۳،۸،۶،۹،۲۸). ارگانیسم عامل، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* است که ساپروفیت خارجی است که بر روی چوب، گیاهان و میوه‌ها حضور دارد. با این وجود ترجیحاً بر روی مدفوع پرندگان رشد می‌کند(۲۶). سلول‌های مخمری هم از طریق گرد وغبار استنشاق شده و هم از طریق ضایعات پوستی وارد بدن انسان و حیوان می‌شود. کریپتوکوکوزیس در مناطق استوایی شایع‌تر است و تنها به صورت انفرادی دیده می‌شود. نقصان ایمنی و سیستم ایمنی مختل‌شده از فاکتورهای مستعدکننده هستند؛ بنابراین شیوع کریپتوکوکوزیس نیز به شدت در سال‌های اخیر افزایش پیدا کرده و یکی از عوامل مهم در عفونت‌های شایع در بیماران ایدزی است (۳،۱۱،۱۴،۱۵،۳۰). تمایل انسان‌ها به نگهداری حیوانات از جمله انواع گربه‌ها (حتی گربه‌های خیابانی) و احساس نزدیکی به آنها و هم‌چنین حضور کودکان و علاقه زیاد آنها جهت نگهداری و بازی با گربه‌ها، باعث ایجاد خطر عفونت در آنها می‌شود. در نتیجه احتمال وجود نقص ایمنی در صاحب دام منجر به احتمال بروز عفونت می‌شود (۳،۱۱،۱۴،۱۵). در بررسی انجام شده، ما موفق به جداسازی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* از مخاطات و ترشحات بینی گربه‌های خانگی نگردیدیم. علت آن می‌تواند به رعایت سطح بهداشت خوب در نگهداری این حیوان باشد، از جمله دفع مدفوع توسط حیوان در خاک، کنترل غذایی و تماسی حیوان و شست‌وشوی گربه و ویزیت از لحاظ بیماری از آن جمله موارد است. در بررسی فوق بیشترین میزان درگیری قارچ‌های ساپروفیتی آلترناریا با ۲۴/۹ درصد است. سپس قارچ‌های آسپرژیلوس، موکور و کلادوسپوریوم با آلودگی معادل ۱۹/۸ و ۱۷/۵ و ۱۵/۴درصد بیشترین درگیری وجود دارد دلیل آن می‌تواند به گستردگی اسپور این قارچ‌ها باشد .در مورد مخمرها نیز گونه‌های کاندیدا بسیار قابل توجه هستند، علت آن می‌تواند از طریق محیط و مواد خوراکی باشد. *کاندیدا آلبیکنس* با ۲۲/۷ درصد آلودگی از طریق تماس با صاحبش یا مواد خوراکی باشد، درحالی‌که مخمرهای دیگر هم‌چون ژئوتریکوم با ۲۴/۱ درصد و رودوترولا ۲۱/۹ درصد بیشتر از طریق آلودگی محیطی و فضایی به حیوان منتقل می‌شود. در مطالعه‌ای توسط تین و همکاران در سال ۲۰۰۶ به‌مدت ۶ سال در استرالیا، آنها توانستن از ۲۰ نمونه از ترشحات بینی گربه‌های ارسالی به کلینیک واریته جدیدی از *کریپتوکوکوس نئوفورمنس–گروبی* را جدا کنند که دارای یک تغییر ژنومی نسبت به گروبی بود(۷،۱).

در بررسی دیگری در برزیل توسط ژما و همکاران در سال ۲۰۰۸ موفق به جداسازی واریته *کریپتوکوکوس نئوفورمنس گاتی* از گربه شدند (۲۱) در ضمن موفق به جداسازی مخمرهای دیگر همانند کاندیدا و رودوتلا و .... نیز شدند.

در مطالعه‌ای دیگر توسط نیکول و همکاران در آمریکای شمالی، موفق به جداسازی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* و *بلاستومیسیس* از سگ شدند (۲۷،۲۹). آنچه که باعث تفاوت کار انجام شده با سایرین است، هدف‌گذاری این طرح است. نمونه‌گیری از گربه‌های خانگی بوده که هیچ‌گونه تماس خارجی با محیط بیرون یا سایر حیوانات ولگرد نداشته‌اند. در ایران مطالعات انجام شده بیشتر بر روی پرندگان به‌خصوص کبوتر است. در بررسی که توسط شادزی و همکاران در شهر

اصفهان صورت گرفت موفق به جداسازی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* از کبوتر شدند (۱۷). هم‌چنین خسروی و همکاران در مطالعه‌ای دیگر درباره میزان شیوع قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در کبوتران استان‌های شمالی ایران موفق به جداسازی ۱۷۵ نمونه شدند(۱۶). فردی به نام بن فیلد در آمریکا توانست این قارچ را از کبوتر ایزوله کند (۲۷). در بررسی فوق قادر به جداسازی قارچ‌های رشته‌ای از جمله آسپرژیلوس، آلترناریا، موکور، رایزوپوس، اسکوپولاریپسیس شدیم که میزان فراوانی آلودگی مدفوع پرندگان با این قارچ‌ها ٪۷۶/۷۱ بود که در مطالعه خانم ایرانی‌خواه میزان آلودگی ٪۷۸/۵۰ درصد بوده است (۲). میزان آلودگی به مخمرها در این بررسی ٪ ۸۰/۵۲ که در بررسی ایرانی‌خواه این میزان ٪۷۰/۵۹ بوده است.

نتیجه‌گیری

عدم جداسازی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* از مخاط و ترشحات بینی گربه‌های خانگی، می‌تواند به دلیل رعایت بهداشت فردی در مورد گربه‌ها از جمله تمیز نگه داشتن این موجودات، رسیدگی بهداشتی به تغذیه حیوان و استفاده از مواد غذایی بهداشتی، عدم تماس با حیوانات ولگرد و کنترل حیوان در هنگام گردش در فضای خارجی و ویزیت به موقع حیوان باشد. البته در مطالعه فوق درگیری قارچ‌های ساپروفیتی آلترناریا، قارچ‌های آسپرژیلوس، موکور و کلادوسپوریوم به دلیل گستردگی اسپور این قارچ‌ها در و هم‌چنین مخمرهایی از گونه‌های کاندیدا مانند *کاندیدا آلبیکنس* از طریق تماس با صاحب خود یا مواد خوراکی و مخمرهای دیگر هم‌چون ژئوتریکوم رودوترولا نیز از طریق آلودگی محیطی و فضایی در حیوانات مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

از کلینیک دام‌های کوچک و آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی و میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران و آزمایشگاه مولکولی قارچ‌شناسی دانشگاه تهران نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

منابع

1) Bemis. D. A.. Krahwinkel. D. J.. Bowman. L. A.. Mondon. P.. & Kwon-Chung. K. J. (2000). Temperature-sensitive strain of *Cryptococcus neoformans* producing hyphal elements in a feline nasal granuloma. *Journal of clinical microbiology*. ***38,*** 926-928.
2) Bineshian. F.. & Zaini. F. (2002). Study of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in some northern regions of Iran. *Koomesh*. ***3*****:** 59-67.
3) Elsegeiny**.** W. Marr**.** K. A. & Williamson**.** P. R. (2018). Immunology of cryptococcal infections: developing a rational approach to patient therapy. *Frontiers in immunology*, ***9,*** 651.
4) Ettinger**.** S. J. Feldman**.** E. C. & Cote**.** E. (2016). *Textbook of Veterinary Internal Medicine-Inkling E-Book*. Elsevier health sciences.
5) Franzot. S. P.. Salkin. I. F.. & Casadevall. A. (1999). Cryptococcus neoformans var. grubii: separate varietal status for Cryptococcus neoformans serotype A isolates. *Journal of clinical microbiology*. **37**, 838-840.
6) Headley**.** S. A. Mota**.** F. C. D. Lindsay**.** S. de Oliveira**.** L. M. Medeiros**.** A. A**..** Pretto-Giordano, L. G. & Krockenberger**.** M. (2016). Cryptococcus neoformans var. grubii-induced arthritis with encephalitic dissemination in a dog and review of published

literature. *Mycopathologia*. ***181***, 595-601.

7) Jacobs. G. J.. Medleau. L.. Calvert. C.. & Brown. J. (1997). Cryptococcal infection in cats: factors influencing treatment outcome, and results of sequential serum antigen titers in 35 cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. ***11***, 1-4.
8) Khosravi.A.R.. Shokri.H.. Raiit. R. (2005). Mycology Veterinary. *Tehran jahad daneshgahi*.
9) Khosravi. A. R.. Shokri. H.. (2008). Fungial Diseases in immuno compromised patients. *Tehran university*.
10) Khosravi. A. R.. (2003). Medical Mycology a parctical approach. *Tehran jahad daneshgahi*.
11) Khosravi. A. R.. (2001). Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (Columbia livia) droppings in northern Iran. *Mycopathologia*. **6**:20-22
12) Kwon-Chung. K. J.. Boekhout. T.. Fell. J. W.. & Diaz. M. (2002). (1557) Proposal to conserve the name Cryptococcus gattii against C. hondurianus and C. bacillisporus (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*. **51,** 804-806.
13) Kwon-Chung. K. J.. & Varma. A. (2006). Do major species concepts support one, two or more species within Cryptococcus neoformans. *FEMS Yeast Research*. ***6,*** 574-587.
14) Malik. R.. Wigney. D. I.. Muir. D. B.. Gregory. D. J.. & Love. D. N. (1992). Cryptococcosis in cats: clinical and mycological assessment of 29 cases and evaluation of treatment using orally administered fluconazole. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. **30,** 133-144.
15) Malik. R.. Wigney. D. I.. Muir. D. B.. & Love. D. N. (1997). Asymptomatic carriage of Cryptococcus neoformans in the nasal cavity of dogs and cats. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. **35,** 27-31
16) Moghadami .M.. Kordbacheh .P.. Emami. M. (1988). A case report of cryptococcal meningitis. *Iran Jornal of Public Health*. **17**,61-68 .
17) Nasr Isfahani.B.. Shadzi. Sh.. Chadegani Pour. M.. Ilchi. N. (2001). Isolation and detection of Cryptococcus neoformans from pigeon droppings: Isfahan and its suburbs province pigeon towers. *Jornal of medical Sciences*; **6**,20-22.
18) Nunes, J. D. O. Tsujisaki. R. A. D. S. Nunes. M. D. O. Lima. G. M. E. Paniago. A. M. M. Pontes. E. R. J. C. & Chang. M. R. (2018). Cryptococcal meningitis epidemiology: 17 years of experience in a State of the Brazilian Pantanal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **51**, 485-492.
19) Park. B. J.. Wannemuehler. K. A.. Marston. B. J.. Govender. N.. Pappas. P. G.. & Chiller. T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*. **23,** 525-530.
20) Park. J.. Rajasingham. R.. Smith. R. M.. & Boulware. D. R. (2014). Update on the global burden of cryptococcosis. *Mycoses*. **57**, pp. 6-6.
21) Pasquier. E.. Kunda. J.. De Beaudrap. P.. Loyse. A.. Temfack. E.. Molloy. S. F.. ... & Lortholary. O. (2018). Long-term mortality and disability in cryptococcal meningitis: a systematic literature review. *Clinical Infectious Diseases*. **66,** 1122-1132.
22) Pennisi. M. G.. Hartmann. K.. Lloret. A.. Ferrer. L.. Addie. D.. Belák. S. & Horzinek. M. C. (2013). Cryptococcosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. **15,** 611-618.
23) Pfaller. M. A.. Messer. S. A.. Boyken. L.. Hollis. R. J.. Rice. C.. Tendolkar.

S.. & Diekema. D. J. (2004). In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of Candida spp. and Cryptococcus neoformans collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. **48,** 201-205 **.**

24) Restrepo. B. I.. & Barbour. A. G. (1989). Cloning of 18S and 25S rDNAs from the pathogenic fungus Cryptococcus neoformans. *Journal of bacteriology*. ***171,*** 5596-5600.

25) Soltani. M. Bayat. M. Hashemi. S. J. Zia. M. & Pestechian. N. (2013). Isolation of Cryptococcus neoformans and other opportunistic fungi from pigeon droppings. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. ***18,*** 56.

26) Takahara**.** D. T. Lazéra**.** M. D. S**.**. Wanke**.** B. Trilles**.** L. Dutra**.** V. Paula**.** D. A. J. D. & Hahn**.** R. C. (2013). First report on Cryptococcus neoformans in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo***. 55**, 371-376.

27) Trivedi. S. R. Sykes. J. E. Cannon. M. S. Wisner. E. R. Meyer. W. Sturges. B. K. & Johnson. L. R. (2011). Clinical features and epidemiology of cryptococcosis in cats and dogs in California: 93 cases (1988–2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. ***239,*** 357-369**.**

28) Vorathavorn**.** V. I. Sykes**.** J. E. & Feldman**.** D. G. (2013). Cryptococcosis as an emerging systemic mycosis in dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care***. *23,*** 489-497.

29) Warren**.** N. G**.**. & Hazen**.** K. C. (1999). *Cryptococcus* and other yeasts of medicalimpor importence. *Manual of Clinical Microbiology***.** 1184-1199**.**

30) Warkentien. T.. & Crum-Cianflone. N. F. (2010). An update on Cryptococcus among HIV-infected patients. *International journal of STD & AIDS*. **21,** 679-684.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 18, Issue 1,
Spring & Summer 2022

Study of *Cryptococcus neoformans* from nasal mucosal secretions in domestic cats by molecular and microbiological methods

Amir Ghafar Jabari[1], Seyed Jamal Hashemi[2*], Mansour Bayat[3], Siamak Mashhadi-rafie[4]
1. PhD candidates of Department of Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Professor of school of health research, Tehran University Of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3.Professor of Department of Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Associate Professor of Department of Clinical Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Received: 13 October2022 *Accepted: 25 January2023*

Abstract
Cryptococcosis is usually a subacute or chronic infection in nature and Cryptococcus neoformans is the cause of this infection.This yeast is found in bird droppings and can be transmitted through dust and inhalation. People with immunodeficiency disorders are at high risk for this infection. In this study, 150 samples were collected from nasal mucosa of domestic cats. The suspension was prepared samples cultured in S, Sc and BHI media and incubated at 25 and 37°C. After 24 hours, we assessed sample by using Chinese Cotton Blue stain solution. Afterwards, samples were identified by using sugar fermentation tests, urea hydrolysis and germ tube formation. We examined 4 suspected colonies of Cryptococcus neoformans by PCR. The results shown a variety of filamentous fungi such as Penicillium, Aspergillus, Alternaria, Scopulariopsis, Mucor, Rhizopus and yeasts such as Rhodotorula, Candida albicans, Candida Sp, Pachia were isolated and Cryptococcus neoformans were not isolated. Molecular tests of suspected samples of Cryptococcus were negative, The reason of this results could be personal hygiene in the case of domestic cats, keeping them indoor and not have contact with other animals and outdoor environments.

Keywords: Domestic cats, Cryptococcus neoformans, Molecular methods.

**Corresponding author: Seyed Jamal Hashemi*
Address: school of health research, Tehran University Of Medical Sciences.
E. mail: sjhashemi@tums.ac.ir