عزل خميرة Cryptococcus neofrmans من براز الحمام ودراسة بعض جوانب أمراضيتها في الفئران

Isolation of Cryptococcus neofrmans from pigeon dropping and study of some pathogenesis aspects

حيدر طعمة الكعبي
قسم الثروة الحيوانية/كلية الزراعة /جامعة الكوفة

الخلاصة

تم عزل خميرة Cryptococcus neofrmans من براز الحمام من منطقة سوق الغزل في بغداد, وتم تشخيصها باستخدام الفحوصات الكيموحيوية وعزلها على وسط السابرويد دكستروز آكار. أستخدم 50 فأرآ سويسرياً أبيض لغرض معرفة التغيرات المرضية العيانية والنسجية , تم حقن 30 فأرآ تحت الجلد بنصف مللتر من عالق الخميرة الحاوي على $3X\ 10^6$; خلية خميرة وأستخدم 20 فأرآ كمجموعة سيطرة. قتلت ثلاث فئران من المجموعة المحقونة بالخميرة وفأرآ واحد من مجموعة السيطرة في أيام مختلفة,سجلت الأعراض السريرية المتمثلة بأعراض تنفسية والعصبية في الأيام الأخيرة من التجربة, كما ظهرت آفات جلدية مرضية في منطقة الحقن. عزلت الخميرة من الكبد والرئة والدماغ خلال فترة التجربة, وأستخدمت هذه الأعضاء لدراسة التغيرات المرضية العيانية والنسجية. تمثلت التغيرات المرضية العيانية بأحتقان الأعضاء الداخلية وظهور مناطق نخرية في الرئة والكبد وتورم شديد في منطقة الحقن. أما التغيرات المرضية النسجية تمثلت باحتقان الأوعية الدموية في الكبد والرئة وأرتشاح الخلايا الألتهابية وتكون الورم الحبيبي, أما في الدماغ لوحظ وجود تكهفات وأرتشاح خفيف للخلايا الألتهابية.

Summary

This study was conducted to isolate and identification of C. neofrmans from fecal samples of pigeon. C. neofrmans identified by biochemical tests .Fifty white Swiss mice were used to study the gross lesion and histopathological changes of tissue. Thirty mice were inoculated S.C. with 0.5 ml of yeast suspension contain $3X\ 10^6$; yeast cells. Twenty mice were used as control. Three mice were killed from treatment group and one mouse from the control group in different days. The respiratory signs were recorded in day while the nervous signs recorded in last days of the experiment. The yeast was isolate from liver, lung and brain during the experiment period and these organs were used to study grossly and microscopically. The gross lesions include congestion of internal organs and presences of necrotic aeries in lungs and liver and sever swelling in inoculated site. the histopathological changes includes congestion of blood vessels in livers and lungs with infiltration of inflammatory cells and formation of granulomatous lesions, while in brain we notes cavitations and miled infiltration of inflammatory cells.

المقدمة

تعد خميرة C. neofrmans من الفطريات الأنتهازية الواسعة الأنتشار في العالم والتي تؤدي الى الاصابة بداء المكورات الخبيئة, الذي يصيب الأنسان ومعظم الحيوانات بأستثناء الطيور التي تكون حاملة للخميرة ولا تصاب بها اذ تكون مقاومة للأصابة بسبب درجة حرارة جسمها العالية نسبيا (1) .

تحدث الأصابة بشكل عام عن طريق أستنشاق خلايا الخميرة المتواجدة في براز الطيور والمحمولة في الهواء وتكون الأصابة الأولية في الرئة من دون أعراض واضحة وقد تشفى الأصابة تلقائياً او تتطور الى الطور المزمن أو قد تنتشر الى بقية الأعضاء الداخلية للجسم (2) .

عزلت الخميرة من براز أنواع مختلفة من الطيور مثل الحمام والكناري (3) والفنجس والببغاء (4), أما في العراق فقد عزلت من براز الحمام (5) ومن النعاج مصابة بألتهاب الضرع (6) كما عزلها (7) من مسحة قصبية لذبيحة أبقار.

تهدف الدراسة الى معرفة بعض جوانب أمراضية خميرة C. neofrmans المعزولة من براز الحمام المحلي, وتمثلت هذه الجوانب بدراسة الأعراض السريرية والتغيرات المرضية العيانية والمجهرية في الفئران.

المواد وطرائق العمل

1) **عزل الخميرة**

عزلت خميرة C. neofrmans من براز الحمام في مدينة بغداد, اذ جمعت العينات الجافة من براز الحمام من أقفاص تربية الحمام في منطقة سوق الغزل بواقع 15 عينة وجدت الخميرة في عينتان فقط بعد عزلها من البراز حسب طريقة (8) وبأستخدام وسط السباروید دكستروز آكار أذ ظهرت المستعمرات على الوسط بعد 3—7 أيام في الحاضنة وبدرجة حرارة 37 م.

2) **تشخيص الخميرة**

❖ الفحص المجهري المباشر :-

بأستخدام الحبر الهندي أذ ظهرت الخميرة محاطة بهالة شفافة تمثل المحفظة (capsule) بينما ظهرت أرضية الشريحة الزجاجية بلون أسود وتراوحت أقطارها بين 5– 10 مايكرومتر .

❖ الأختبارات الكيموحيوية :-

a. أختبار أكار اليوريا المائل urea agar slant

أستخدم الفحص للتحري عن أنزيم اليوريز الذي تصنعة الخميرة, تم نقل جزء من المستعمرات الى الوسط الزرعي المائل وحضنت العينات بدرجة 25م لمدة 5 أيام بعدها لوحظ تغير لون الوسط الى الوردي, دلبل على أيجابية الأختبار (8).

b. وسط أستهلاك الكاربوهيدرات carbohydrate assimilation test أستخدم هذا الأختبار لمعرفة قابلية الخميرة على أستهلاك الكاربوهيدرات المختلفة بطريقة الأقراص, وتم تحضير الوسط حسب طريقة (8). تم أستخدام الأقراص الورقية المعقمة المشبعة بالمحاليل السكرية (كلوكوز, سكروز, أنوسيتول, رافينوز, لاكتوز, مليبايوز) ووضعت على سطح الوسط الزرعي وحضن الطبق بشكل مقلوب بدرجة حرارة 30م ولمدة 4 أيام, أن نمو الخميرة حول القرص دليل على أيجابية الفحص (جدول رقم 1) .

c. أختبار تخمر السكريات sugar fermentation test

أستخدم هدا الفحص للتحري عن قدرة الخميرة على تخمر السكريات (كلوكوز , سكروز , لاكتوز , مالتوز) وأجري الأختبار حسب طريقة (9) تم تلقيح الأنابيب الحاوية على وسط مرق الكاربوهيدرات بالخميرة وحضنت بدرجة 30م لمدة 24 – 48 ساعة أن ظهور اللون الأصفر دليل على أيجابية الفحص . (جدول رقم 1) .

❖ حيوانات التجربة :-

أستخدم 50 فأرا سويسريا أبيض قسمت إلى مجموعتين , الأولى , 30 فأرا حقنت تحت الجلد بنصف مللتر عالق الخميرة الحاوي على 3 X 10^6 خلية خميرة / فأر ,تم حساب عدد خلايا الخميرة في العالق باستخدام جهلز عد خلايا الدم Haemocytometer (10) وترك 20 فأرآ كمجموعة سيطرة حقنت تحت الجلد بنصف مللتر محلول دارىء الفوسفات الملحي .

تم قتل ثلاث فئران من مجموعة الأولى (المعاملة) وفأرآ واحدآ من مجموعة السيطرة في الأيام (1, 3, 7, 10, 15, 21, 30) تم عزل الخميرة من بعض الأعضاء الداخلية (الكبد , الرئة , الدماغ) لمجموعة المعاملة في الأيام 1, 10, 21, 30 وكما موضح في(الجدول رقم - 2) . أخذت العينات من الأعضاء الداخلية (الكبد , الرئة , الدماغ) مباشرة بعد قتل أو هلاك الفأر لغرض تحضير الشرائح النسجية وصبغت المقاطع النسجية بصبغة الهيماتوكسلين – أيوزين (11).

النتائج

1. **الأختبارات الكيموحيوية :**

نتائج الأختبارات الكيموحيوية موضحة في جدول رقم - 1

الأختبارات	النتائج
❖ أختبارات أستهلاك الكلوكوز	
كلوكوز	+
سكروز	+
أنوسيتول	+
رافينوز	+
لاكتوز	–
مليبايوز	–
❖ أختبار تخمر الكاربوهيدرات	
كلوكوز	–
سكروز	–
لاكتوز	–
ماتوز	–
❖ فحص تحلل اليوريا	+

جدول رقم – 1 يوضح نتائج الأختبارات الكيموحيوية لعزلة خميرة C . neofrmans المعزولة من براز الحمام

2. الأعراض السريرية :

ظهرت الأعراض السريرية في اليوم الخامس بعد حقن الفئران وتمثلت بظهور الأعراض التنفسية (صعوبة التنفس) والتي زادت شدتها بعد اليوم العاشر من الحقن مما أدى الى هلاك فأرين في الأيام 10 و 21 بعد الحقن.

أما منطقة الحقن فتورمت بشكل واضح في اليوم 12 بعد الحقن كما ظهرت تقرحات جلدية في منطقة الحقن في بعض الفئران في اليوم 30 .ظهرت الأعراض العصبية في بعض الفئران في اليوم 28 بعد الحقن وتمثلت بتهيج الفئران وسرعة حركتها داخل القفص .

3. **عزل الخميرة :**

تم عزل الخميرة من بعض الأحشاء الداخلية للفئران (الكبد , الرئة , الدماغ) المقتولة والهالكة بعد حقنها بالخميرة ,نتائج العزل موضحة في الجدول رقم – 2

الأيام	الفئران	الكبد	الرئة	الدماغ
اليوم الأول	1	+	−	−
	2	−	−	−
	3	−	−	−
اليوم العاشر	1	−	+	−
	2	+	−	+
	3	+	−	−
اليوم الحادي والعشرين	1	+	+	+
	2	−	+	+
	3	+	+	+
اليوم الثلاثيون	1	−	−	−
	2	−	−	−
	3	+	+	+

جدول رقم – 2 يوضح العزل الخميري من الأحشاء الداخلية للفئران

4. **التغيرات المرضية العيانية :**

ظهرت التغيرات المرضية العيانية في اليوم السابع بعد حقن الخميرة وتمثلت بأحتقان الرئة وتضخم الكبد والطحال وأزدادت شدة التغيرات بعد اليوم الخامس عشر من الحقن , أما في اليوم الثلاثين ظهرت مناطق نخرية بيضاء في الرئة والكبد.

5. **التغيرات المرضية المجهرية :**

❖ **اليوم الأول بعد الحقن :-** لوحظ أحتقان الأوعية الدموية في الكبد والرئة ولم تلاحظ أي تغيرات تذكر في الدماغ.

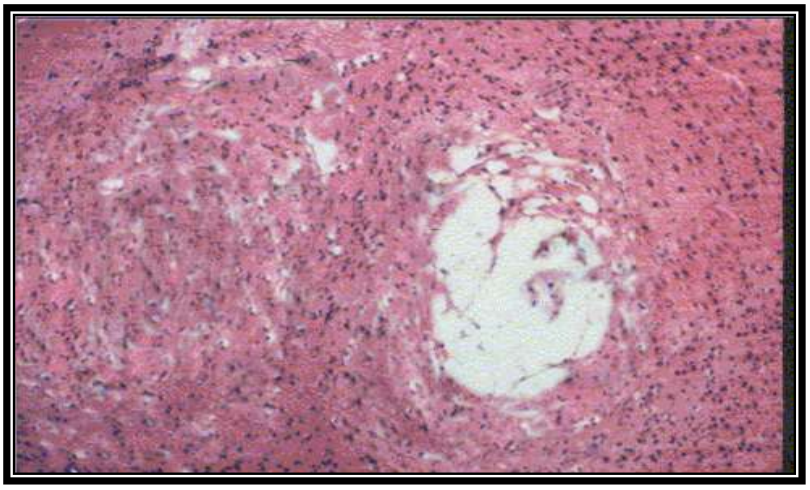
❖ **اليوم الثالث بعد الحقن :-** لوحظ وجود تغيرات تنكسية ونخرية في الخلايا الكبدية تمثلت بزيادة حمضية الهيولي وتفجية وتغلظ الأنوية فضلاً عن الأحتقان الشديد للأوعية الدموية , أما في الرئة فقد لوحظ أحتقان الأوعية الدموية وأرتشاح طفيف للعدلات (neutrophil), ولم تلاحظ أي تغيرات مهمة في الدماغ

❖ **الأيام السابع والعاشر بعد الحقن :-** لوحظ وجود أحتقان شديد للأوعية الدموية ونزف وأرتشاح الخلايا الألتهابية (العدلات ووحيدة النواة) داخل الأسناخ . أما في الكبد فقد لوحظ تغيرات تنكسية تمثلت بموه الخلايا الكبدية وزيادة حجمها مع ظهور تغيرات نخرية فضلاً عن وجود ارتشاح لخلايا العدلات والبلعمية واللمفية تحيط بتكهفات حاوية على الخميرة, أما في الدماغ لوحظ أحتقان الأوعية الدموية مع وجود تكهفات (صورة رقم 1) حاوية على الخميرة مع أستجابة التهابية محددة. .

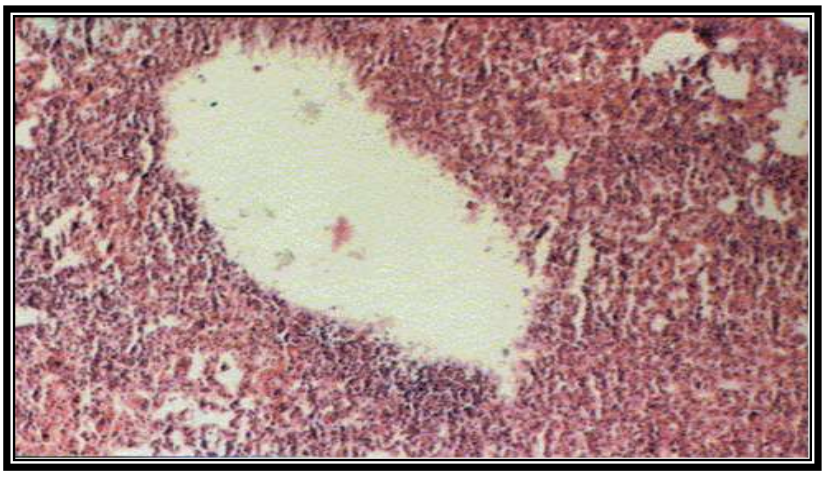
❖ **اليوم الخامس عشربعد الحقن : -** لوحظ أنتشار شديد للخلايا الألتهابية (العدلات واللمفية والبلعمية) في الحواجز بين الأسناخ وتجاويفها كما لوحظ وجود تكهفات ناتجة عن النخر الاماعي (صورة رقم 2). أما التغيرات في الكبد والدماغ فقد كانت مشابهة للأيام السابقة الآ أنها أكثر شدة .

❖ **اليوم الحادي والعشرون :-** تكون الورم الحبيبي في الرئة وتألف من الخلايا العدلات واللمفية والبلعمية. أما في الكبد فقد لوحظ الورم الحبيبي مكون من الخلايا العدلات واللمفية والبلعمية (صورة رقم 3). فيما لوحظ زيادة في حجم التكهفات الموجودة في الدماغ والناتجة عن التغيرات النخرية لخلايا الدماغ مع أرتشاح الخلايا اللمفية .

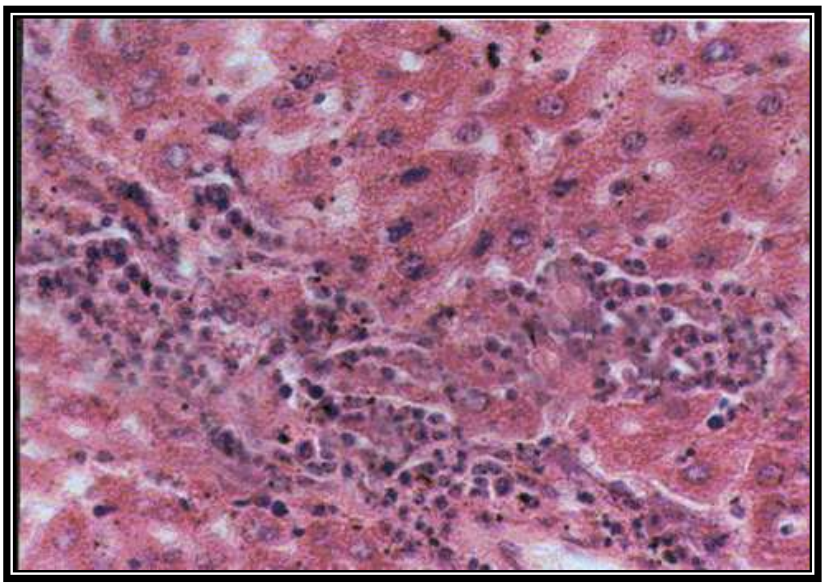
❖ **اليوم الثلاثون بعد الحقن :-** كانت التغيرات في الرئة مشابهة لليوم الحادي والعشرون مع وجود أعداد كبيرة من الخميرة في الأسناخ . أما في الكبد فقد كانت التغيرات مشابهة للسابق , وفي الدماغ أستمرت حجم التكهفات الحاوية على الخميرة .



صورة 1 :- مقطع نسجي لدماغ احد فئران مجموعة المعاملة في اليوم العاشر بعد الحقن, يلاحظ وجود التكهف في الدماغ (X250, H&E).



صورة 2 :- مقطع نسجي لرئة احد فئران مجموعة المعاملة في اليوم الخامس عشر بعد الحقن, يلاحظ وجود منطقة تكهف ناتجة عن النخر الاماعي (X125, H&E).



صورة 3 :- مقطع نسجي لكبد احد فئران مجموعة المعاملة في اليوم الحادي والعشرون بعد الحقن, يلاحظ وجود الورم الحبيبي الحاوي على الخميرة (سهم) (X500, H&E).

المنافشة

أن نسبة عزل الخميرة C . neofrmans من براز الحمام الجاف في الدراسة الحالية بلغت (13.5%) , وهدا يتفق مع دراسة (5) أذ بلغت نسبة العزل (11.6%) وتختلف مع نتائج بحوث أخرى (12) حيث بلغت نسبة العزل 85 % , أن هدا التفاوت في نسبة العزل قد يعود الى أختلاف الظروف البيئية والتغيرات الموسمية , فأرتفاع درجات الحرارة في العراق لايوفر ظروف نمو جيدة ومشجعة.

أن ظهور أعراض سريرية تنفسية في اليوم السادس بعد الحقن تحت الجلد يشير الى شدة أصابة الرئة بالخميرة وتتفق هذة النتائج مع (10, 13) حيث أن المناعة الخلوية في الرئة غير كافية للسيطرة على الأصابة وبأمكان الخميرة مقاومة هضم البلاعم السنخية بواسطة المحفظة المتعددة السكريات (13).

أما ظهور الأعراض العصبية في اليوم الثامن والعشرون بعد الحقن فيمكن تفسيره بسبب ميل الخميرة لأصابة الجهاز العصبي حيث تمتلك الخميرة خواص سطحية تمكنها من دخول الجهاز العصبي المركزي وأستغلال بيئتة المعزولة نسبياً عن الجهاز المناعي (14) .

بلغت نسبة الهلاكات في الدراسة الحالية 6.66 % فيما أشارت دراسة أخرى (10) الى أن نسبة الهلاكات في الفئران المحقونة تحت الجلد بلغت 15% وقد يعود السبب في ذلك الى بطىء أنتقال الخميرة الى الأعضاء الأخرى وأن طريقة الحقن تحت الجلد تؤدي الى أصابة أقل شدة مقارنة مع الحقن بالطرق الأخرى مثل الحقن داخل تجويف الخلب (15).

أما الأفات الجلدية العيانية المتمثلة بتورم منطقة الحقن وظهور التقرحات فقد جاءت مطابقة لدراسات أخرى (10, 16) أذ أن ، الحقن تحت الجلد يتميز ببطىء أنتشار الخميرة فضلآ عن تموضعها في منطقة الحقن مما يوفر لها مدة كافية لأنتاج أنزيم البروتيز protease الذي يؤدي الى تحلل النسيج وظهورالأفات المرضية (10).أما التغيرات المرضية العيانية الملاحظة في الأعضاء الداخلية مثل التغيرات التنكسية والنخرية , يمكن أن تعزى الى قدرة الخميرة على أحداث النخر في الأنسجة بسبب أمتلاكها أنزيمات الفوسفولاييزالذي يؤدي الى تحلل خلايا العضو المصاب (17), وبالتالي يؤدي الى جذب العدلات التي بموتها وتحللها تفرز أنزيمات الجسيمات الحالة والتي تعمل على هضم الأنسجة (13) .

أن التغيرات النسجية في رئات وأكباد الفئران تراوحت بين احتقان الأوعية الدموية والتغيرات التنكسية والنخرية في الأيام الأولى من التجربة الى تكون الأورام الحبيبية في الأيام الأخيرة من التجربة , وان التغيرات التنكسية والتنخرية تعود الى عوامل الضراوة التي تملكها الخميرة مثل أنزيمات البروتيز والفوسفولاييز , أما تكون الأورام الحبيبية فيعتبر دليلاً على الأستجابة المناعية في الجسم ومحاولتها للسيطرة على الأصابة من خلال وجود أنواع مختلفة من الخلايا الألتهابية لاسيما البلاعم والخلايا اللمفية وأن تلك الأورام الحبيبية جاءت مطابقة للتغيرات النسجية في الدراسات الأخرى (13, 10) .

أما في الدماغ فقد تركزت معظم التغيرات النسجية بتكون التكهفات مع محدودية الأستجابة الألتهابية وهذا يتفق مع دراسات أخرى في العراق أجريت على الفئران وبطرق حقن مختلفة في البريتون وتحت الجلد والحبل الشوكي (10 , 5). أن ظهور التكهفات وزيادة حجمها في الأيام الأخيرة من التجربة ناتج عن النخر الحاصل لخلايا الدماغ مع تكاثر الخميرة داخل هذه التكهفات بفعل أحتواء الدماغ على مركبات مشجعة لنمو الخميرة (18) .

References:

1- Mitchell, T.G. and perfect, J.R. (1995). Cryptococcosis in the era of ADIS-100 years after the discovery of Cryptococcus neoformans. Clin. microbiol. Rev., **8** (4): 515-548.

2- King, J. W. (2001). Cryptococcosis. eMedicine J. **2** (5)

3-Kwon-Chung, K.J. and Bennett, J.E. (1992). Medical Mycology. Lea and Febiger, Philadelphia.

4-Otcenasek, M. and Ditrich, O. (1985). Exotic birds as potential source of cryptococcosis. Ceskoslovenska Epidemiologie Immunologie., **34(**6**):** 342-345. Veterinary Bulletins (1987), Abstract 7764.

5-Al-Dulami, H. A. (1998). Survey of C. neoformans isolated from pigeon droppings in Baghdad province. A thesis of master degree submitted to the College of Science Al-Mustansiryah University.

6-Al-Kubysi, S.M. (2000). Bacterial and fungal mastitis in ewes in Al-Anbar. A thesis of master degree submitted to the college of Vet. Med. University of Baghdad.

7- Samaka, H. M. (2001). Study of some systemic fungal infections in cattle and sheep in Baghdad. A thesis of master degree submitted to the college of Vet. Med. University of Baghdad.

8-McGinnis, M. R.(1980).Laboratory Handbook of Medical Mycology. New York, Academic Press.

9- Baron , E. J. And Finegoled, S. M. (1990). Diagnostic Microbiology: Laboratory methods in Basic Mycology . 8th ed. **Pp**: 748-775.

10- Al- Awadi A.Q. (2002).Study of Some Aspects Of Pathogenesis of C. neoformans in immunosuppressed and immunocompetent mice . A thesis of master degree submitted to the college of Vet. Med. University of Baghdad.
11- Luna, L. G. (1968). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology 3rd Ed., Mcgrow-Hill Book Company, New York.
12- Swine-Disgain, D. (1974). The pigeon as reservoir for C. neofprmans.Lancet, **2:** 842-846.
13- Feldmesser, M.; Kress, Y.; Novikoff, P. and Casadevall, A. (2000). Cryptococcus neoformans is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. Infect. Immun ., **68** (7): 4225-4237.
14- Cox, G.M. and Perfect, J.R. (1998). Cryptococcus neoformans var. neoformans and gattii and Trichosporon species. In: Medical Mycology (Vol.4) , (eds.) Ajello, L. and Hay, R. At: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. By Collier, L.; Balows, A. and Sussman, M., 9th Ed. Arnold, London. **PP**. 461-473.
15- Dykstra, M.A. and Friedman, L. (1978). Pathogenesis, lethality and immunizing effect of experimental cutaneous cryptococcosis. Infect. Immun., **20:** 446-455.
16- Duguid, J.P.; Marmion, B.P. and Swain, R.H. (1978) Mackie and McCartney Medical Microbiology. 13th Ed. (Vol.1), Churchill Livingstone, London.
17- Buchanan, K.L. and Murphy, J.W. (1998). What makes Cryptococcus neoformans a pathogen. Emerg. infect. dis**., 4**: 71-83.
18- Polacheck I.; Platt, Y. and Aronovitch J. (1990). Catecholamines and virulence of Cryptococc neoformans.Infect.Immun.,**58**: 2919-2922.