مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱٤، شماره ۳: از ۱۵-۲٤
پاییز ۱۳۹۰

شناسایی و تعیین ژنوتیپ میکروسپوریدیاهای آلوده کننده انسان در کبوتر کولومبا لیویا (*Columba livia*) تهران در سال ۱۳۸۹

مجید پیرستانی[1]، جاوید صدرایی[2*]، مهدی فروزنده[3]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۹۰/۰۱/۲۳ پذیرش مقاله: ۹۰/۰۴/۱۸

چکیده

هدف: میکروسپوریدیاها عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلبی هستند که تمامی شاخه‌های جانوری را آلوده می‌کنند. ماهیت زئونوتیک این عوامل بیماری‌زا در مورد برخی از گونه‌ها نظیر انتروسایتوزون بینئوسی به اثبات رسیده است. هدف از این مطالعه شناسایی میکروسپوریدیاهای انسانی در کبوترهای سطح شهر تهران با روش‌های رنگ‌آمیزی و مولکولی بود.

مواد و روش‌ها: در سال ۱۳۸۹ تعداد ۱٤۷ نمونه مدفوع کبوتر از مرکز فروش پرندگان و پارک‌های عمومی سطح شهر تهران به‌طور تصادفی جمع‌آوری شد. برای تشخیص از رنگ‌آمیزی تریکروم اصلاح شده و روش‌های Multiplex/Nested-PCR و RFLP استفاده شد.

نتایج: با استفاده از رنگ‌آمیزی، ۱۹ مورد (۱۲/۹۲ درصد) مثبت میکروسپوریدیا و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۳۱ مورد (۲۱/۰۸ درصد) مثبت شناسایی شد. تعیین ژنوتیپ براساس ناحیه ITS ژن rRNA روی تمامی نمونه‌های انتروسایتوزون بینئوسی، انسفالیتوزون اینتستینالیس، هلم و کانیکولی صورت گرفت. ژنوتیپ‌های انتروسایتوزون بینئوسی با ژنوتیپ‌های D، M و J، انسفالیتوزون هلم با ژنوتیپ‌های ۱ و ۳ و انسفالیتوزون کانیکولی با ژنوتیپ‌های I و II جدا شده از انسان و حیوانات یکسان بود. توالی ناحیه ITS انسفالیتوزون اینتستینالیس نیز با موارد ثبت شده در بانک ژن ۱۰۰ درصد تشابه داشت.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان داد که هیچ محدودیتی در بین کبوترهای تهران و انسان برای انتقال گونه‌های مهم آلوده کننده انسان وجود ندارد. این مطالعه به اهمیت بهداشتی این پرنده اشاره دارد، زیرا مدفوع کبوتر یکی از منابع عفونت میکروسپوریدیایی برای انسان بوده و به راحتی محیط پیرامون ما را آلوده می‌سازد. از سوی دیگر اکثریت افراد مراجعه کننده به پارک‌های عمومی کودکان و افراد مسن و در معرض خطر ابتلا به این عفونت هستند.

کلیدواژگان: انتروسایتوزون، انسفالیتوزون، ژنوتیپ، rRNA، ITS

۱- مقدمه

میکروسپوریدیاها (Microsporidia) عوامل بیماری‌زای داخل سلولی اجباری هستند که طیف وسیعی از جانوران و

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦
Email: sadraeij@modares.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

انواع مختلف سلول‌ها را آلوده می‌سازند. تا بـه امـروز نزدیـک بـه ۱۲۰۰ گونه میکروسپوریدیا در غالب ۱۵۰ جنس شناسایی شده‌انـد [۱]. این ارگانیسم بیشتر به‌عنوان یک عامل فرصت‌طلب در بیماران دارای نقص ایمنی نظیـر بیمـاران مبـتلا بـه سـندرم نقـص ایمنـی اکتـسابی (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS)، دریافـت کننـدگان پیونـد، کودکـان، مـسافران، افـراد استفاده کننده از لنزهای چشمی و افراد مسن تلقی می‌شـود امـا در افراد دارای ایمنی کارآمد نیز شایع اسـت [۲]. بیـشتر مـوارد انسانی با اسهال گزارش شده است. با این وجود طیـف علایـم ایجاد شده توسط این ارگانیسم بیمـاری‌زا بـه انـدازه‌ای وسـیع است که تمام ارگان‌های بدن را درگیر می‌کند و علایمـی نظیـر کراتوکانژکتیویت (Keratoconjunctivitis)، هپاتیت، میوزیت (Myositis)، سربریت (Cerebritis)، سـینوزیت (Sinusitis) و عفونت‌های منتشر ایجاد می‌نماید. ۸ جنس از میان جنس‌های شناسایی شده انـسان را آلـوده مـی‌کنـد کـه عبارتنـد از: نوزمـا (*Nosema*)، ویتافورمـــــا (*Vittaforma*)، پلیـــــستوفورا (*Pleistophora*)، انـــــسفالیتوزون (*Encephalitozoon*)، انتروســایتوزون (*Entertocytozoon*)، آنکالیـا (*Anncaliia*)، تراکی پلیستوفورا (*Trachipleistophora*) و میکروسپوریدیوم (*Microsporidium*). گونـــه‌هـــای بـــسیار شـــایع انـــسانی انتروســـایتوزون بینئوســـی (*Enterocytozoon bieneosi*)، انـسفالیتوزون اینتـستینالیس (*Encephalitozoon intestinalis*)، انسفالیتوزون هلـم (*Enc. hellem*) و انـسفالیتوزون کـانیکولی (*Enc. cuniculi*) [۳].

سئوالات بـسیاری دربـاره نحـوه انتقـال میکروسـپوریدیاها بی‌پاسخ باقیمانده است، اما در سال‌های اخیر با اطلاعات جدید به‌دست آمده تصور کلی در مورد این عامـل بیمـاری‌زا بـه‌کلـی تغییر یافته است. پیش از این تصور بـر آن بـود کـه سـه گونـه انتروسایتوزون بینئوسی، انسفالیتوزون اینتستینالیس و هلم فقـط در انسان دیده می‌شوند، در حـالی کـه دو گونـه اول در طیـف وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی شناسایی شـده‌انـد [٤-٦] و انـسفالیتوزون هلـم نیـز از پرنـدگان جـدا شـده اسـت [۷، ۸]. انسفالیتوزون کانیکولی نیز علاوه بر گوشت‌خواران، جوندگان و خرگوش، از جوجه‌ها و نوعی طوطی به‌نام عروس هلندی جدا شـده اسـت. در نتیجـه ایـن اطلاعـات امکـان زئونـوز بـودن (Zoonose) چهار گونه اصلی آلوده کننـده انـسان را مطـرح و تلاش‌های فراوانی در جهت ایجاد شاخص‌هـای ژنتیکـی بـرای برخی از گونه‌ها صـورت گرفـت [۹-۱۱]. از بـین ایـن چهـار گونه، انسفالیتوزون کانیکولی از لحاظ مولکولی شناخته شده‌تـر است، به‌طوری که توالی ژنوم این عامل بیماری‌زا به‌طور کامـل در بانـک ژن ثبـت شـده اسـت [۱۲]. از سـال‌هـای گذشـته ژنوتیپ‌های این انگـل و زئونـوز بـودن آن نیـز مـشخص و در سال‌های اخیر با جدا شدن سه گونه دیگر از حیوانـات اهلـی و وحشی توان زئونوتیک (Zoonotic) آن‌ها بـارزتر شـده اسـت. با تجزیه و تحلیل شاخص‌های ژنتیکی مختلف تغییرپذیری بین گونه‌ای در ایـن گونـه‌هـا بـه اثبـات رسـید. از ایـن‌رو مطالعـه فیلـوژنتیکی و پیـشگیرانه روی انتقـال میکروسـپوریدیوزیس انـسانی (Human Microsporidiosis) و انتـشار آن‌هـا در حیوانات در تماس با آن به‌منظـور شناسـایی عوامـل بیمـاری‌زا گسترش یافته است [۹].

با تجزیـه و تحلیـل قطعـه جـدا کننـده داخلـی رونویـسی (Internal Transcribed Spacer: ITS) ژن RNA ریبوزومی اختلاف ژنتیکی قابل توجهی در جدایه‌های انـسانی و حیـوانی انتروســایتوزون بینئوســی را بــه اثبــات رســاند و بــیش از ۵۰ ژنوتیپ مختلـف براسـاس تفـاوت‌هـای موجـود در تـوالی ۲٤۳ جفت‌بازی این قطعـه تـشریح شـده اسـت. بررسـی‌هـای صورت گرفته روی جنس انسفالیتوزون نیز به گونه‌ای بود که با نتایج حاصل از سـایر ژن‌هـا مطابقـت داشـت و ایـن قطعـه را به‌عنوان شاخصی برای تعیین ژنوتیپ‌هـای ایـن جـنس مطـرح نمود [۱۳].

این مطالعه برای اولـین بـار در ایـران بـه‌منظـور شناسـایی عوامل میکروسپوریدیایی انسانی در کبوترهای شهر تهران انجام گرفـت. بـرای تـشخیص مـوارد مثبـت و مـشکوک از روش رنگ‌آمیزی تریکروم (Trichrome Staining) اصـلاح شـده و

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

برای شناسایی جنس آن‌ها از روش مولکولی Multiplex/Nested-PCR و برای تعیین گونه از روش RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) استفاده شد. به‌منظور تعیین ژنوتیپ گونه‌های شناسایی شده از ناحیه ITS ژن زیرواحد کوچک ریبوزومی (Small Subunit Ribosomal RNA: SSU rRNA) استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌گیری

تعداد ۱٤۷ نمونه مدفوع از کبوترهای سطح شهر تهران جمع‌آوری شد که به‌ترتیب ۷۱ نمونه مربوط به کبوترهای آزاد و ۷٦ نمونه کبوتر نگهداری شده در قفس بودند. نمونه‌ها از مراکز پرورش کبوتر، پارک‌های عمومی شهر تهران جمع‌آوری شد که هیچ‌یک از آن‌ها دارای علایم گوارشی نبودند. نمونه مدفوع از داخل قفس پرندگان و محتویات داخل روده کبوترهای صید شده از پارک‌ها به‌دست آمد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، صاف، تغلیظ شد و سپس با دو برابر حجم دی کروماتپتاسیم ۲/۵ درصد مخلوط و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [١٤، ١٥].

۲-۲- بررسی میکروسکوپی

به‌منظور بررسی وجود اسپورهای میکروسپوریدیایی در نمونه‌های مدفوع از رنگ‌آمیزی تریکروم اصلاح شده [تریکروم- بلو (Trichrome Blue)] استفاده شد. پس از تهیه گسترش نازک از مدفوع و ثابت نمودن آن با متانول، نمونه‌ها به‌مدت ۲٤۰ دقیقه در رنگ تریکروم قرار داده شد و پس از رنگ‌بری در اسید- الکل، و شستشو با اتانول ۹۵ درصد به‌مدت ۱۰ ثانیه، لام‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در اتانول ۹۵ درصد قرار داده شد. در نهایت نمونه‌ها در اتانول مطلق و برای شفاف‌سازی در گزیلول قرار گرفت. پس از چسباندن لامل روی لام‌ها به‌منظور بررسی میکروسکوپی از بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× و عدسی روغنی استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی اسپورهای میکروسپوریدیا به رنگ قرمز دیده می‌شود و دارای ۲ وجه تشخیصی واکوئل انتهایی و کمربند میانی است.

۲-۳- استخراج DNA

روش‌های مختلفی برای استخراج DNA از مدفوع وجود دارد که در این مطالعه از ترکیب دو روش هضم قلیایی و کیت استخراج DNA از مدفوع شرکت Qiagen استفاده شد. بدین منظور ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه مدفوع را برداشته و به‌منظور حذف دی کروماتپتاسیم ۲/۵ درصد سه مرتبه با PBS (Phosphate Buffered Saline) در دور g ۱٤۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه شستشو و حجم محلول با PBS به ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. برای هضم قلیایی ۱۸/٦ میکرولیتر DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane) (۱ مولار) و ٦٦/٦ میکرولیتر هیدروکسید پتاسیم (KOH) (۱ مولار) اضافه و در دمای ٥٦ درجه به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. محلول هضم شده با ۸/٦ میکرولیتر HCl (۲۵ درصد) خنثی و بلافاصله با ۱٦۰ میکرولیتر Tris-HCl (pH=۸/۳، ۲ مولار) بافری شد. ۵۰۰ میکرولیتر فنل-کلروفرم- ایزوآمیل الکل به نسبت (۲۵:۲٤:۱) اضافه و در دور g ۵۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی به اپندورف (Eppendorf) جدید منتقل شد. از این مرحله به بعد طبق برنامه کیت (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA) عمل و DNA استخراج شده تا مرحله بعدی آزمایش‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-٤- شناسایی مولکولی

در این مرحله از آغازگرهای (Primers) اختصاصی چهار گونه اصلی آلوده کننده انسان طراحی شده توسط کاتزوینکل (Katzwinkel) و همکارانش استفاده شد [١٦]. این آغازگرها برای ناحیه خاصی از ژن ریبوزومی شامل زیرواحد کوچک

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

ریبوزومی، ناحیه ITS و زیرواحد بزرگ ریبوزومی طراحی شده است و در شناسایی و تعیین ژنوتیپ گونه‌های مختلف میکروسپوریدیا قابل استفاده است. در این مطالعه از روش مولکولی Multiplex/nested PCR استفاده شد که همزمان قادر به شناسایی هر دو جنس انتروسایتوزون و انسفالیتوزون است. آغازگرهای واکنش اول عبارتند از:

MSP-1: tgaatgkgtccctgt
MSP-2A: tcactcgccgctact
MSP-2B: gttcattcgcactact

و واکنش دوم:

MSP-3: ggaattcacaccgcccgtcrytat
MSP-4A: ccaagcttatgcttaagtymaargggt
MSP-4B: ccaagcttatgcttaagtccagggag

جدول ۱ مشخصات و شرایط انجام PCR

مواد تشکیل دهنده	PCR اولیه (برحسب میکرولیتر)	PCR ثانویه (برحسب میکرولیتر)
DNA	٦	۲ [۳]
مخلوط اصلی [۱]	۲	۲
آغازگر [۲]	٦	٦
آب مقطر	٦	۱۰
شرایط PCR اولیه و ثانویه		
دمای واسرشتگی اولیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه	
٤۵ چرخه		
دمای واسرشتگی	۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ٤۵ ثانیه	
دمای اتصال	۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه	
دمای بسط	۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ٤۵ ثانیه	
دمای بسط نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه	
دمای غوطه‌وری (Soaking)	٤ درجه سانتی گراد	

۱- Master mix: از AccuPowerTM PCR PreMix شرکت BioNEER استفاده شد.
۲- در PCR اولیه از آغازگرهای MSP-1، 2A، 2B و در PCR ثانویه از آغازگرهای MSP-3، 4A، 4B به میزان ۲۰ پیکومول استفاده شد.
۳- از محصول PCR ثانویه استفاده شد.

با استفاده از آغازگرهای فوق یک قطعه حدود ۵۰۰ جفت‌بازی برای جنس انتروسایتوزون و یک قطعه حدود ۳۰۰ جفت‌بازی برای جنس انسفالیتوزون تکثیر می‌یابد. شرایط و مواد تشکیل دهنده PCR اولیه و ثانویه در جدول ۱ آمده است. به‌منظور تأیید قطعه تکثیر یافته از آنزیم *Mnl*I استفاده شد. این آنزیم قادر است که سه گونه انسفالیتوزون را از یکدیگر تفکیک نموده و از طرفی تأییدی بر عملکرد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) است.

۲-۵- تعیین ژنوتیپ

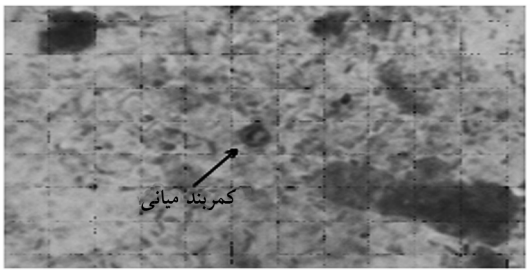
تعیین ژنوتیپ چهار گونه مورد نظر براساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS ژن rRNA صورت می‌گیرد. برای این منظور تمامی نمونه‌های مثبت از لحاظ مولکولی به‌جز عفونت‌های توام تعیین توالی شدند و با استفاده از نرم‌افزارهای Sequencher و MEGA 4 توالی‌ها بررسی و با توالی‌های استاندارد ثبت شده در بانک ژن مقایسه و ژنوتیپ آن‌ها مشخص شد.

۳- نتایج

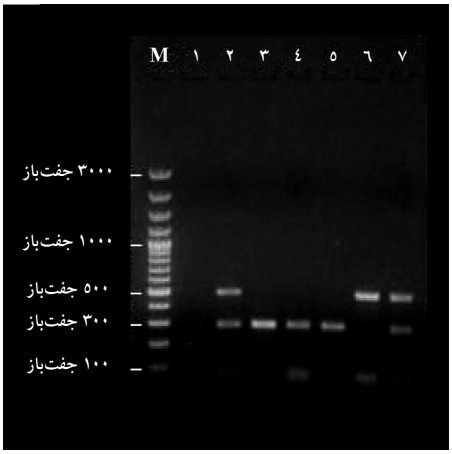
در این مطالعه از ۷۱ کبوتر آزاد و ۷٦ کبوتر نگهداری شده در قفس، نمونه مدفوع جمع‌آوری شد. با استفاده از رنگ‌آمیزی تریکروم اصلاح شده ۱۹ نمونه (۱۲/۹۲ درصد) حاوی اسپورهای میکروسپوریدیایی شناسایی شد (شکل ۱) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی چهار گونه اصلی آلوده کننده انسان و روش Multiplex/nested-PCR تمامی نمونه‌ها مورد ارزیابی مولکولی قرار گرفت. در مجموع تعداد ۳۱ نمونه مثبت شناسایی شد (شکل ۲). برای شناسایی گونه‌های انسفالیتوزون و از طرفی تأیید عملکرد PCR از آنزیم محدودالاثر *Mnl*I استفاده شد. با استفاده از آنزیم *Mnl*I قطعه ۵۰۰ جفت‌بازی انتروسایتوزون بینئوسی به قطعات ۱۸۰، ۹۰، ۸۰، ٦۰، ۵۰، ۳۰ و ۲۰ جفت‌بازی (باند قابل مشاهده ۱۸۰، ۹۰ و ٦۰ جفت‌بازی)، قطعه ۳۰۰ جفت‌بازی انسفالیتوزون اینتستینالیس به قطعات ۱٦۰، ٦۰، ۳۰ و ۲۰ جفت‌بازی (باند قابل مشاهده ۱٦۰ و ٦۰ جفت‌بازی) انسفالیتوزون هلم به قطعات ۱۸۰ و ۸۰ جفت‌بازی و انسفالیتوزون کانیکولی به قطعات ۲۱۰ و ۹۰ جفت‌بازی بریده

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

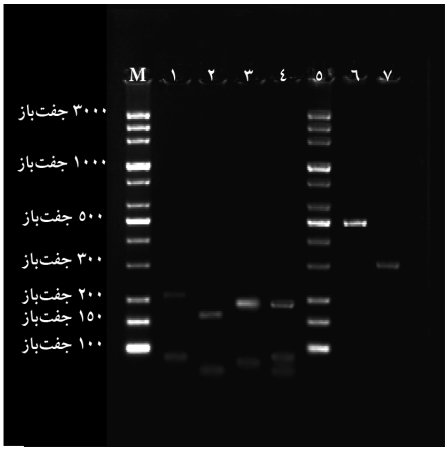
می‌شوند (شکل ۳). از بین ۳۱ نمونه مثبت، ۱۳ کبوتر آلوده به انتروسایتوزون بینئوسی (۸/۸ درصد)، ٤ مورد آلوده به انسفالیتوزون اینتستینالیس (۲/۷ درصد)، ٦ مورد انسفالیتوزون هلم (٤/۱ درصد) و ۲ مورد آلوده به انسفالیتوزون کانیکولی (۱/٤ درصد) بودند. عفونت همزمان در ٦ کبوتر (٤/۱ درصد) تشخیص داده شد که ۲ مورد انتروسایتوزون بینئوسی و انسفالیتوزون هلم، یک مورد انسفالیتوزون بینئوسی و انسفالیتوزون اینتستینالیس، یک مورد انسفالیتوزون اینتستینالیس و هلم و ۲ مورد انسفالیتوزون هلم و کانیکولی بودند (جدول ۲). نتایج تعیین ژنوتیپ با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی قطعات تکثیر یافته نشان دادکه ژنوتیپ‌های انتروسایتوزون بینئوسی با ژنوتیپ‌های D (٦ مورد)، M (۳ مورد) و J (٤ مورد) (شماره دستیابی بانک ژن به‌ترتیب AF101200، AF267143 و AF135837)، ژنوتیپ‌های انسفالیتوزون هلم با ژنوتیپ‌های ۱ (٤ مورد) و ۳ (۲ مورد) (شماره دستیابی بانک ژن به‌ترتیب L29557 و AF110328) ژنوتیپ‌های انسفالیتوزون کانیکولی با ژنوتیپ‌های I و II (شماره دستیابی بانک ژن به‌ترتیب GU198948 و GQ422153) یکسان است. توالی ناحیه ITS انسفالیتوزون اینتستینالیس با موارد ثبت شده در بانک ژن (GQ408912) ۱۰۰ درصد تشابه داشت. لازم به ذکر است شماره دستیابی بانک ژن برای توالی‌های به‌دست آمده از کبوتر JF776168-70 و JF792394-98 است (جدول ۳).



شکل ۱ اسپورهای میکروسپوریدیا در رنگ‌آمیزی تریکروم اصلاح شده با بزرگنمایی ۱۰۰۰×



شکل ۲ ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) محصول PCR دوم؛ **M)** نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی، **۱)** کنترل منفی، **۲)** کنترل مثبت (عفونت همزمان انتروسایتوزون بینئوسی و انسفالیتوزون) تهیه شده از مرکز ملی کنترل بیماری‌های واگیردار هند) **۳، ٤ و ۵)** انسفالیتوزون **٦)** انتروسایتوزون بینئوسی **۷)** عفونت همزمان انتروسایتوزون بینئوسی و انسفالیتوزون



شکل ۳ ژل الکتروفورز ۳ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید محصول RFLP با آنزیم MnlI؛ **M)** نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی، **۱)** انسفالیتوزون کانیکولی (باند ۲۱۰ و ۹۰ جفت‌باز)،**۲)** انسفالیتوزون اینتستینالیس (باند ۱٦۰ و ٦۰ جفت‌باز)، **۳)** انسفالیتوزون هلم (باند ۱۸۰ و ۸۰ جفت‌باز)، **۵)** انتروسایتوزون بینئوسی (باند ۱۸۰، ۹۰ و ٦۰ جفت‌باز)، **٦)** کنترل انتروسایتوزون بینئوسی بدون آنزیم،**۷)** کنترل انسفالیتوزون بدون آنزیم

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

جدول ۲ نتایج به‌دست آمده شناسایی میکروسکوپی و مولکولی

نمونه مدفوع کبوتر	آزاد	نگهداری در قفس	تعداد کل
تعداد	۷۱	۷٦	۱٤۷
موارد مثبت میکروسکوپی (درصد)	۱۱ (۱۵/۵)	۸ (۱۰/۵)	۱۹ (۱۲/۹)
موارد مثبت مولکولی (درصد)	۱۷ (۲٤)	۱٤ (۱۷/۱)	۳۱ (۲۱/۱)
موارد مثبت انتروسایتوزون بینئوسی (درصد)	۷ (٤۱/۲)	٦ (٤۲/۸)	۱۳ (۸/۸)
موارد مثبت انسفالیتوزون اینتستینالیس (درصد)	۱ (۵/۹)	۳ (۲۱/٤)	٤ (۲/۷)
موارد مثبت انسفالیتوزون هلم (درصد)	٤ (۲۳/۵)	۲ (۱٤/۳)	٦ (٤/۱)
موارد مثبت انسفالیتوزون کانیکولی (درصد)	۱ (۵/۹)	۱ (۷/۱)	۲ (۱/٤)
موارد مثبت عفونت توام (درصد)	٤ (۲۳/۵)	۲ (۱٤/۹)	٦ (٤/۱)

جدول ۳ ژنوتیپ‌های شناسایی شده در کبوتر به تفکیک جنس و گونه

جنس و گونه	ژنوتیپ (تعداد)	شماره دستیابی ژن	شماره دستیابی ژن مرجع
انتروسایتوزون بینئوسی	D (٦)، M (۳)، J (٤)	JF776168-70	AF101200، AF267143 و AF135837
انسفالیتوزون اینتستینالیس	-	JF792394	GQ408912
انسفالیتوزون هلم	I (٤)، 3 (۲)	JF792395-6	L29557 و AF110328
انسفالیتوزون کانیکولی	I (۱)، II (۱)	JF792397-8	GU198948 و GQ422153

٤- بحث

شناسایی و توصیف ژنتیکی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا منجر به ایجاد روش‌های مولکولی تشخیصی شده که در درک انتقال عوامل بیماری‌زا و بررسی‌های همه‌گیرشناسی کمک شایانی نموده است. با وجود پیشرفت‌های فراوان در امر شناسایی و تعیین ژنوتیپ گونه‌های میکروسپوریدیایی، سئوالات زیادی از جمله منبع عفونت و راه انتقال در مورد آن‌ها بدون پاسخ باقیمانده است. انسان و حیوانات آلوده به میکروسپوریدیا، اسپورها را از طریق مدفوع، ادرار و ترشحات دفع نموده و محیط پیرامون خود را آلوده می‌سازند. از این‌رو منبع اصلی آلودگی به‌شمار می‌روند. بر همین اساس در چند سال اخیر محققان روی میکروسپوریدیوزیس حیوانات به‌ویژه پستانداران تمرکز نموده تا خاستگاه زئونوتیک احتمالی میکروسپوریدیوزیس انسانی را مشخص نمایند [۱۷].

در حالی که پیشرفت‌های قابل توجهی در راستای شناسایی مولکولی و ژنتیکی انگل‌های روده‌ای بیماری‌زا صورت گرفته است اما مطالعات همه‌گیرشناسی مولکولی درباره عوامل بیماری‌زای میکروسپوریدیایی روی انسان یا حیوانات در ایران انجام نشده است.

از آن‌جایی که مطالعه روی پرندگان در تماس با انسان بسیار نادر است، بنابراین در این مطالعه از بین پرندگان در تماس با انسان، حضور احتمالی میکروسپوریدیاهای انسانی در کبوترهای سطح شهر تهران بررسی شد. کبوترها چه در پارک‌های عمومی و چه مکان‌های دیگر تقابل بسیار نزدیکی با انسان به‌ویژه کودکان و افراد مسن داشته و این دو گروه خاص به دلیل ضعف در سیستم ایمنی‌شان از افراد در معرض خطر عفونت‌های فرصت‌طلب از جمله عفونت میکروسپوریدیایی هستند [۱۸]. در سالخوردگی فرایند شناخته شده‌ای تحت عنوان پیری سیستم ایمنی وجود داشته که اغلب به فعالیت ناقص ایمنی سلولی بر می‌گردد. با اهمیت بالای ایمنی سلولی در کنترل عفونت میکروسپوریدیایی مرتبط است. این حالت نه تنها در مدل‌های حیوانی بلکه در بیماران مبتلا به AIDS نیز

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

دیده شده است [۱۹].

اسپورهای میکروسپوریدیا در رنگ‌آمیزی تریکروم اصلاح شده قرمز مایل به صورتی می‌شوند که مشخصات میکروسپوریدیاها از جمله واکوئل انتهایی و کمربند میانی در آن‌ها مشاهده می‌شود. علاوه بر این آلودگی‌ها، عفونت‌های همزمان در ٦ مورد مشاهده شد که ۲ مورد عفونت همزمان انتروسایتوزون بینئوسی و انسفالیتوزون هلم، یک مورد انتروسایتوزون بینئوسی و انسفالیتوزون اینتستینالیس، یک مورد انسفالیتوزون اینتستینالیس و هلم و ۲ مورد انسفالیتوزون هلم و کانیکولی بود. مطلب بسیار مهم در مورد به‌کار بردن روش PCR برای تجزیه و تحلیل نمونه‌های مدفوع، احتیاط در موارد منفی کاذب است. در DNA استخراج شده از مدفوع غلظت DNA انگل بسیار کم بوده و تنها زمانی عمل تکثیر انجام می‌شود که حجم استفاده شده از نمونه بالا باشد. از سوی دیگر مهار کننده‌های PCR به میزان فراوان در مدفوع وجود دارند، در نتیجه در مقادیر مناسب از نمونه یا در زمان استفاده از روش‌های تخلیص DNA با استفاده از کیت مورد استفاده می‌توان قطعه مورد نظر را تکثیر نمود [۲۰].

مطالعات متعددی مبنی بر تعیین اختلاف ژنتیکی انگل‌های میکروسپوریدیایی انسفالیتوزون کانیکولی، هلم و اینتستینالیس و انتروسایتوزون بینئوسی صورت گرفته است [۱۰، ۲۱]. به استثنای موارد استفاده از کاریوتایپینگ (Karyotyping) و ژل الکتروفورز در میدان ضربان‌دار، در اکثر مطالعات به‌منظور تعیین ژنوتیپ از ناحیه ITS ژن RNA ریبوزومی استفاده شده است [۱۳]. تا به امروز انسفالیتوزون کانیکولی شناخته شده‌ترین میکروسپوریدیا بوده و زئونوز بودن آن به اثبات رسیده است و ژنوتیپ‌های متعددی از آن گزارش شده است [۲۱]. در مطالعه حاضر برای اولین بار انسفالیتوزون کانیکولی از کبوتر گزارش شد که خود بر گستره میزبانی این گونه افزوده و بر توان زئونوتیک آن بیش از پیش می‌افزاید. انسفالیتوزون اینتستینالیس دومین گونه شایع انسانی [۱٤، ۲۲] از پستانداران مختلفی نظیر میمون، سگ، گاو، خوک و بز جدا شده است [۲۳]. پیش از این طی مطالعه‌ای در جمهوری چک انسفالیتوزون اینتستینالیس از کبوترها گزارش شده است و به احتمال زئونوز بودن آن اشاره شده است [۲۳]. نکته قابل توجه در مورد این گونه نبودن تفاوت ژنتیکی به‌عنوان شاخصی مناسب در تعیین ژنوتیپ یا سدی در برابر انتقال آن در بین گونه‌های میزبانی گزارش شده است.

آلودگی انسان به انسفالیتوزون هلم اغلب خارج روده‌ای است، با این وجود این انگل در مدفوع میزبانان حیوانی مختلف دیده شده است. در سال ۱۹۹۷ برای اولین بار این انگل از مدفوع پرندگان طوطی‌وار خانواده سیتاسین (Psittacine) با استفاده از روش PCR جدا شد [۲٤]. در سال‌های اخیر این گونه از پرندگان در تماس با انسان نظیر طوطی، شترمرغ، مرغ عشق و فنچ جدا شده است [۲۳، ۲۵]. علاوه بر مطالعه حاضر، تمام مطالعات دیگر نیز بر این نکته اذعان دارند که شیوع این گونه بسیار بیشتر از تصورات قبلی است. برای اولین بار تغییرپذیری بین گونه‌ای ژنوتیپ‌های انسفالیتوزون هلم، براساس ناحیه ITS ژن RNA ریبوزومی مشخص شد و پس از آن از دو جدا کننده ژن (IGS-TH و IGS-HZ) و ژن پروتئین لوله قطبی (Polar Tube Protein: PTP) برای تأیید ژنوتیپ‌های شناسایی شده استفاده شد [۹، ۲٦]. جالب توجه این است که از ۷ مورد گزارش شده انسانی انسفالیتوزون هلم از افراد مبتلا به HIV (Human Immunodeficiency Virus) در اسپانیا، ایتالیا و آمریکا، شش مورد از آن‌ها توالی ITS ژنوتیپ 1A را نشان داده‌اند [۹]. این ژنوتیپ سویه‌ای از ژنوتیپ ۱ جدا شده از کبوترهای سطح شهر تهران است. این مطلب بدان معنا است که ژنوتیپ ITS یافت شده در میان کبوترهای شهر تهران سویه شایع با پراکندگی جغرافیایی وسیعی است و به‌طور واضح بین انسان و کبوتر در کشورهای اسپانیا، ایتالیا و آمریکا مشترک است. سطح آلودگی میکروسپوریدیوزیس روده‌ای در میان کبوترهای تهران که به‌وسیله PCR تأیید شده است بالا است. فراوانی کبوترها در مناطق شهری و نیمه‌شهری و ارتباط نزدیک آن‌ها با انسان، احتمال نفوذ اسپورهای میکروسپوریدیایی از این

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

منابع از طریق استنشاق، تماس مستقیم با مخاط یا بلعیده شدن آن را افزایش می‌دهد. کبوترها به‌طور دسته‌جمعی حرکت کرده و هنگامی‌که به منبع غذایی برخورد می‌کنند با حرکات بال و پر خود ذرات معلق در هوا را ایجاد کرده و زمین را با مدفوع خود کاملاً آلوده می‌سازند. در این شرایط اگر اسپور میکروسپوریدیا وجود داشته باشد به راحتی می‌تواند از طریق مخاط چشم، تنفس یا بلعیده شدن تصادفی به بدن انسان نفوذ نماید.

بالاترین شیوع میکروسپوریدیوزیس روده‌ای در انسان مربوط به انتروسایتوزون بینئوسی است که در کبوترها نیز بیشترین درصد آلودگی را به خود اختصاص داده است (۱۰/۹ درصد). تا به‌حال بیش از ۵۰ ژنوتیپ از انتروسایتوزون بینئوسی در میزبانان مختلف گزارش شده است که در این مطالعه توالی ITS جدایه‌های انتروسایتوزون بینئوسی کبوترهای سطح شهر تهران با ژنوتیپ‌های D (٦ مورد)، M (۳ مورد) و J (٤ مورد) یکسان بود. این ژنوتیپ‌ها پیش از این از میزبان‌های دیگری نظیر خوک، انسان، راکون، خرس، روباه، موسکارت و میمون جدا شده است [۲۸، ۲۷]. همان‌طور که مطالعات فیلوژنی اخیر نشان داده است، نبودن مانعی در انتقال انتروسایتوزون بینئوسی بین انسان و حیوانات نشان دهنده زئونوز بودن این گونه است [۱۳]. برای اولین بار انتروسایتوزون بینئوسی در میزبان غیرپستاندار (جوجه) شناسایی شد [۲۵] و گزارش حاضر همانند گزارش هارو (Haro) و همکارانش در سال ۲۰۰۵ از کبوتر [۲۳] گستره زئونوتیک و همین‌طور گستره جغرافیایی این انگل را افزایش داد.

در نهایت باید اشاره کرد که این مطالعه به دلایل بهداشتی دارای اهمیت است زیرا عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلبی از قبیل میکروسپوریدیاهای انسانی از کبوترهای سطح تهران جدا شده است. چنین حیواناتی رابطه بسیار نزدیکی با انسان به ویژه کودکان و افراد مسن دارند. افراد دیگری که از نقص سیستم ایمنی رنج می‌برند نیز در معرض خطر میکروسپوریدیوزیس قرار دارند. ارایه اطلاعات صحیح در مورد خطر تماس مستقیم با این حیوانات به افراد در معرض خطر به‌منظور طراحی معیارهای پیشگیری مناسب ضروری به‌نظر می‌رسد. در پایان برای درک بهتر نحوه انتقال این عفونت بایستی مطالعات بیشتری چه در زمینه همه‌گیرشناسی و چه ژنتیکی روی میزبانان دیگر از جمله انسان در ایران صورت گیرد تا به‌طور قطع بتوان این حیوان را در زمره میزبانان مخزن این عوامل فرصت‌طلب قرار داد.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق نتیجه بخشی از رساله دکتری است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

٦- منابع

[1] Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Annu Rev Microbiol 2002; 56: 93-116.

[2] Didier ES. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta Trop 2005; 94(1): 61-76.

[3] Weiss LM. Microsporidia 2003: IWOP-8. J. Eukaryot Microbiol 2003; 50 Suppl: 566-8.

[4] Akerstedt J, Nordstoga K, Mathis A, Smeds E, Deplazes P. Fox encephalitozoonosis: isolation of the agent from an outbreak in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) in Finland and some hitherto unreported pathologic lesions. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2002; 49(8): 400-5.

[5] Dengjel B, Zahler M, Hermanns W, Heinritzi K, Spillmann T, Thomschke A, Löscher T, Gothe R, Rinder H. Zoonotic Potential of

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

Enterocytozoon bieneusi. J Clin Microbiol 2001; 39(12): 4495-9.

[6] Reetz J, Wiedemann M, Aue A, Wittstatt U, Ochs A, Thomschke A, Manke H, Schwebs M, Rinder H. Disseminated lethal *Encephalitozoon cuniculi* (genotype III) infections in cotton-top tamarins (*Oedipomidas oedipus*)--a case report. Parasitol Int 2004; 53(1): 29-34.

[7] Fayer R, Santin M, Palmer R, Li X. Detection of *Encephalitozoon hellem* in feces of experimentally infected chickens. J Eukaryot Microbiol 2003; 50 Suppl: 574-5.

[8] Snowden KF, Logan K, Phalen DN. Isolation and characterization of an avian isolate of *Encephalitozoon hellem*. Parasitology 2000; 121(Pt 1): 9-14.

[9] Haro M, Del Aguila C, Fenoy S, Henriques-Gil N. Intraspecies genotype variability of the microsporidian parasite *Encephalitozoon hellem*. J Clin Microbiol 2003; 41(9): 4166-71.

[10] Rinder H, Katzwinkel-Wladarsch S, Thomschke A, Löscher T. Strain differentiation in microsporidia. Tokai J Exp Clin Med 1998; 23(6): 433-7.

[11] Sulaiman IM, Fayer R, Lal AA, Trout JM, Schaefer FW 3rd, Xiao L. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. Appl Environ Microbiol 2003; 69(8): 4495-501.

[12] Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretaillade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivares CP. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. Nature 2001; 414(6862): 450-3.

[13] Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. Clin Microbiol Rev 2005; 18(3): 423-45.

[14] Liguory O, Fournier S, Sarfati C, Derouin F, Molina JM. Genetic Homology among Thirteen *Encephalitozoon intestinalis* Isolates Obtained from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Intestinal Microsporidiosis. J Clin Microbiol 2000; 38(6): 2389-91.

[15] Cama VA, Pearson J, Cabrera L, Pacheco L, Gilman R, Meyer S, Ortega Y, Xiao L. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* between a child and guinea pigs. J Clin Microbiol 2007; 45(8): 2708-10.

[16] Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Helse W, Löscher T, Rinder H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. Trop Med Int Health 1996; 1(3): 373-8.

[17] Rinder H, Thomschke A, Dengjel B, Gothe R, Löscher T, Zahler M. Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle. J Parasitol 2000; 86(1): 185-8.

[18] Lores B, López-Miragaya I, Arias C, Fenoy S, Torres J, del Aguila C. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus--negative patients from Vigo, Spain. Clin Infect Dis 2002; 34(7): 918-21.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[19] Conteas CN, Berlin OG, Speck CE, Pandhumas SS, Lariviere MJ, Fu C. Modification of the clinical course of intestinal microsporidiosis in acquired immune-deficiency syndrome patients by immune status and anti-human immunodeficiency virus therapy. Am J Trop Med Hyg 1998; 58(5): 555-8.

[20] Mathis A, Tanner I, Weber R, Deplazes P. Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. Int J Parasitol 1999; 29(5): 767-70.

[21] Reetz J, Nöckler K, Reckinger S, Vargas MM, Weiske W, Broglia A. Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. Parasitol Int 2009; 58(3): 285-92.

[22] Graczyk TK, Bosco-Nizeyi J, da Silva AJ, Moura IN, Pieniazek NJ, Cranfield MR, Lindquist HD. A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. Parasitol Res 2002; 88(10): 926-31.

[23] Haro M, Izquierdo F, Henriques-Gil N, Andrés I, Alonso F, Fenoy S, del Águila C. First Detection and Genotyping of Human-Associated Microsporidia in Pigeons from Urban Parks. Appl Environ Microbiol 2005; 71(6): 3153-7.

[24] Black SS, Steinohrt LA, Bertucci DC, Rogers LB, Didier ES. *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Vet Pathol 1997; 34(3): 189-98.

[25] Reetz J, Rinder H, Thomschke A, Manke H, Schwebs M, Bruderek A. First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). Int J Parasitol 2002; 32(7): 785-7.

[26] Xiao L, Li L, Visvesvara GS, Moura H, Didier ES, Lal AA. Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2248-53.

[27] Chalifoux LV, Carville A, Pauley D, Thompson B, Lackner AA, Mansfield KG. *Enterocytozoon bieneusi* as a cause of proliferative serositis in simian immunodeficiency virus-infected immune-deficient macaques (*Macaca mulatta*). Arch Pathol Lab Med 2000; 124(10): 1480-4.

[28] Buckholt MA, Lee JH, Tzipori S. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in Swine: an 18-Month Survey at a Slaughterhouse in Massachusetts. Appl Environ Microbiol 2002; 68(5): 2595-9.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]