



دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی پزشکی

**بررسی عفونت کریپتوسپورید یوم پارووم در موش
BALB/c نوزاد و *RAT* نوزاد**

تهیه و تنظیم:

سید مهران میرزاقوامی

استاد راهنما:

دکتر جاوید صدرائی

اسفند 1387

با تشکر فراوان از
دکتر صدرائی که
با راهنمایی‌های
بی‌دریغ خویش
سه‌م شایانی در
ارتقای کیفی این
تحقیق داشتند.

چکیده

کریپتوسپوریدیوزیس به بیماری ناشی از تک یاخته انگل کریپتوسپوریدیوم پارووم اطلاق می‌شود که حیوانات اهلی، وحشی و انسان‌ها خصوصا افراد دارای نقص ایمنی را آلوده می‌سازد. در جوندگان اهلی عفونت توسط کریپتوسپوریدیوم پارووم بین هفته‌های اول تا سوم عمر بسیار شایع است، و می‌تواند با اسهالی خفیف تا شدید، دهیدراسیون، درد شکمی، بی‌حالی، کاهش اشتها، کاهش وزن و ریزش قابل توجه اووسیست در مدفوع همراه باشد. در اغلب موارد عفونت شدید، حیوان مبتلا ممکن است بمیرد.

در این مطالعه، موش BALB/c نوزاد و رت نوزاد برای عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم به عنوان مدل‌های ساده، ارزان و رایج بومی ارایه گردید تا با استفاده از آنها اقدامات درمانی و پیشگیرانه مورد ارزیابی قرار گیرد. ۵۰ موش BALB/c شیرخوار و ۵۰ رت شیرخوار استفاده شدند. موش‌های گروه I (مورد) با تعداد $10^5 \times 5$ اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم عفونی شدند، و موش‌های گروه II بعنوان شاهد فاقد عفونت نگهداری شدند. در هر دو مدل حیوانی شدت عفونت در روزهای ۶، ۹، ۱۲ و ۱۶ پس از تلقیح تعیین شد.

عفونت القا شده بطور تجربی در هر دو مدل موش الگویی مشابه را نشان داد. شدت عفونت در ۹ روز پس از تلقیح (سن ۱۰-۱۲ روزگی) به اوج رسید و به مرور در روزهای ۱۲ پس از تلقیح (سن ۱۵-۱۶ روزگی) و ۱۶ پس از تلقیح (سن ۱۹-۲۰ روزگی) کاهش نشان داد. با توجه به شبیه بودن روند افزایشی و کاهش‌ی شدت عفونت در هر دو جونده مورد مطالعه، مدل رت نوزاد به دلیل قرابت فیزیولوژیک با انسان و نیز جثه بزرگتر و سهولت کار با آن هنگام تلقیح دهانی نسبت به مدل BALB/c نوزاد مناسب‌تر تشخیص داده شد.

کلمات کلیدی: کریپتوسپوریدیوم پارووم، موش BALB/c نوزاد، رت نوزاد

فهرست مطالب

فصل اول - کلیات

1.....	بخش اول : توصیف ارگانسیم
1.....	1-مقدمه
2.....	2- توصیف ارگانسیم
2.....	2-1- طبقه‌بندی
4.....	2-2- چرخه زندگی
6.....	3- بیماری‌زایی
10.....	4-ایمنی شناسی
10.....	4-1- پاسخ های میزبان در برابر کریپتوسپوریدیوم پارووم
14.....	5- اپیدمیولوژی
15.....	5-1- همه گیری شناسی در جهان
17.....	5-2- همه گیری شناسی در ایران
19.....	5-3- روشهای انتقال بیماری به انسان
21.....	6- نشانه های بالینی
22.....	7- تشخیص
22.....	7-1- تشخیص بالینی
23.....	7-2- تشخیص آزمایشگاهی
26.....	8- درمان و مدیریت بالینی
28.....	8-1- عوامل دارودرمانی (شیمی درمانی)
29.....	8-2- درمان‌های حمایتی
30.....	9- پیشگیری و کنترل
31.....	10- اهداف آینده
33.....	بخش دوم : مدل‌های حیوانی
33.....	1- مقدمه
33.....	2- مدل‌های حیوانی برای تولید اووسیست و تکثیر انگل
34.....	2-1- گاو
35.....	3- مدل‌های حیوانی سنتی و جدید در تحقیقات
36.....	3-1- جوندگان آزمایشگاهی
42.....	4- مدل میمونی مبتلا به SIV
42.....	5- مدل ژربیل
43.....	6- مدل موشی در ژنتیک کریپتوسپوریدیوم
44.....	6-1- آزمون ضد عفونی آب

44	7- مدل حیوانی در مقایسه با کشت سلولی
فصل دوم - مواد لازم و روش کار	
47	بخش اول : مواد, وسایل و حیوانات لازم
47	1- حیوانات
47	2- محلولها و بافرها
48	بخش دوم : روش کار
48	1- نمونه‌های مورد مطالعه و روش نمونه‌گیری
49	2- بررسی نمونه‌ها از نظر وجود انگل
49	1-2- تهیه گسترش
49	2-2- رنگ‌آمیزی با روش ذیل نلسون
50	3- آماده سازی نمونه‌های مثبت جهت تلقیح به موش‌ها
50	1-3- صاف کردن نمونه و نگهداری آن در محلول ذخیره
50	2-3- حذف چربی و تخلیص اولیه نمونه
51	3-3- جداسازی اووسیست‌ها با روش گرادپان ساکارز
52	4- تهیه حیوانات مورد مطالعه و گروه‌بندی آنها
52	1-4- گروه‌های آزمایشی
53	2-4- تشخیص عفونت
فصل سوم - نتایج	
54	بخش اول: بررسی شدت عفونت در موش‌های BALB/c نوزاد
57	بخش دوم: بررسی شدت عفونت در رت‌های نوزاد
فصل چهارم - بحث و نتیجه‌گیری	
60	1- بحث و نتیجه‌گیری
69	2- پیشنهادات
70	منابع و مآخذ

بخش اول : توصیف ارگانسیم

۱-مقدمه

اولین گزارش رسمی از عفونت کریپتوسپورییدیوم در موش توسط انگل شناس امریکایی E. E. Tyzzer در سال ۱۹۰۷ منتشر شد. Tyzzer این ارگانسیم را در اپیتلیوم روده موش‌های آزمایشگاهی (*Mus musculus*, Japanese waltzing mice و English mice) پیدا کرد و آنرا اسپور مخفی یا hidden sporocyst نامید، بعدها مراحل چرخه حیات انگل توسط وی شرح داده شد و نیز مورفولوژی این مراحل توسط وی توصیف گردید و حدود ۱۷ سال بعد تایزر مراحل تکامل کریپتوسپورییدیوم را در اپیتلیوم سکوم جوجه نشان داد [۴۴]. مورفولوژی که در اووسیست‌های کریپتوسپورییدیوم دیده می شود به گونه‌ای نامعمول می‌باشد، زیرا اووسیست‌های این انگل فاقد اسپوروسیست و حاوی اسپوروزوئیت‌های باریک و دوکی شکل هستند. کریپتوسپورییدیوم موریس *C. muris* اولین گونه‌ای نام گرفت که در معده موش ایجاد عفونت کرده بود. با ادامه مطالعات، ارگانسیم‌های مشابهی که در روده کوچک استقرار یافته بودند توسط تایزر در سال ۱۹۱۲ شناسایی و کریپتوسپورییدیوم پارووم *C. parvum* نامیده شد. بتدریج با گذشت زمان، تعداد گونه‌های مختلف شناسایی شده این جنس رو به افزایش گذاشت و گونه‌های مختلف کریپتوسپورییدیوم در پرندگان، پستانداران و خزندگان شناسایی شد. نامگذاری این انگلها بر پایه نام اختصاصی میزبان صورت می‌گرفت این ارگانسیم‌ها به سبب ایجاد اسهال در پرندگان و گاوها بیشتر مورد توجه دامپزشکان قرار می‌گرفتند، تا اینکه گزارشها توسط نیم و همکاران و میزل و همکاران در سال ۱۹۷۶ نشان داد که احتمالاً این انگل یکی از دلایل ایجاد کننده اسهال در انسان می‌باشد. از این گزارشها یکی مربوط به کودک سه ساله مبتلا به اسهال مزمن بود و دیگری مربوط به زنی تحت شیمی درمانی و مبتلا به اسهال آبکی بود [۳۸، ۳۹].

کورت و همکارانش در سال ۱۹۸۳ نشان دادند که بیماران دارای ایمنی کارآمد و همچنین با نقص ایمنی به این انگل حساس بوده، دچار اسهال می‌شوند [۴۰]. با شناسایی طغیان‌های کریپتوسپورییدیوزیس با منشاء آب (خصوصاً همه گیری میلوآکی در ۱۹۹۳ با درگیر ساختن بیش از ۴۰۰ هزار نفر) و همه گیری های ایدز، کریپتوسپورییدیوم در زمره عوامل بیماریزای نو ظهور قرار گرفت. در ایران اولین بار در ۱۳۶۳ کریپتوسپورییدیوم در روده گوساله تشخیص داد شد و سال ۱۳۶۵، در یک قطعه خروس در کرمان این عفونت گزارش شد [۲۳].

امروزه کریپتوسپورییدیوم پارووم که انسان را مبتلا می‌کند مورد توجه پزشکان و محققان قرار گرفته است.

۲- توصیف ارگانسیم

۲-۱- طبقه‌بندی

از نظر تاکسونومی در سلسله تک یاخته‌ها، زیرشاخه اپی کمپلسا Apicomplexa، راسته اسپوروزواسیدا، زیراسته کوکسیدیا، رده یوکوکسیدیا و خانواده کریپتوسپورییدیه Cryptosporidiidae قرار دارد [۴۱]. گونه های این انگل عبارتند از: کریپتوسپورییدیوم بایله ای *C. baileyi*، کریپتوسپورییدیوم مله اگریدیس *C. meleagridis* در پرندگان، کریپتوسپورییدیوم پارووم *C. parvum* و کریپتوسپورییدیوم موریس *C. muris* در پستانداران. گونه پارووم حیوانات وحشی، اهلی و انسان‌ها خصوصاً افراد با نقص سیستم ایمنی را آلوده می‌سازد. مانند ایمریا، ایزوسپورا و سیکلوسپورا، در مجرای گوارشی مهره‌داران رشد می‌کند. از نظر تشکیل کیست در جرگه کوکسیدیاها قرار نمی‌گیرد و کیست آن مانند توکسوپلازما و سارکوسیستیس به تکامل خارج روده ای نیازی ندارد.

کریپتوسپوریديوم پارووم بیماری مشترکی بین انسان و دام ایجاد می کند و به نظر می رسد که میزبان اختصاصی نداشته باشد. امروزه مشخص شده است که انسان ها می توانند به صورت انفرادی با گونه های مله/گریديس، فیلیس، کنیس، اندرسونی و موریس هم آلوده شوند. این ویژگی به همراه مقاومت دارویی، ایجاد واکنش پارازیتوفروس و قابلیت ایجاد عفونت خودبخودی کریپتوسپوریديوم را از دیگر کوکسیدیایها منحصر می سازد. نامگذاری گونه براساس میزبان صورت می گیرد. در حال حاضر اکثر نامگذاری های قدیمی رد شده و تنها ۸ گونه از جنس کریپتوسپوریديوم تایید شده است که در پستانداران ۴ گونه - *C. parvum*, *C. muris*, *C. felis*, *C. wrairi* - ۲ گونه در پرندگان - *C. meleagridis baileyi* - یک گونه در خزندگان - *C. serpentis* - و یک گونه در ماهیان - *C. nasanaurum* می باشد [۳۷، ۴۰].

کریپتوسپوریديوم پارووم به اسامی دیگری نیز خوانده می شود که عبارتند از: کریپتوسپوریديوم بویس *C. bovis*، کریپتوسپوریديوم کانیکولیس *C. caniculis*، کریپتوسپوریديوم اگری *C. agri*، کریپتوسپوریديوم رزی *C. rhesi*، و کریپتوسپوریديوم گارنهامی *C. garnhami* [۴۱، ۴۲]. به دلیل تفاوت های موجود در اطلاعات ریخت شناختی، ژنوتیپی و انتقال متقاطع در میان گونه ها طبقه بندی این انگل هنوز هم مورد بحث است.

New System

Empire: Eukaryota

Kingdom: Mastigota

Subkingdom: Dimastigota

Superphylum: Metakaryota

Phylum: Alveolata

Subphylum: Apicomplexa

Class: Sporozoasida

Subclass: Coccidia

Order: Eucoccidiorida

Family: Cryptosporididae

Genus: Cryptosporidium

در حیوانات اهلی معمولاً جوانترها در گیر می‌شوند، هر چند انسان در تمام سنین حساس می باشد . اگر چه گفته می‌شود تنها گونه آلوده کننده انسان ، کریپتوسپورییدیوم پارووم است که دارای دو ژنوتیپ می‌باشد. یکی ایزوله های حیوانی/گاوی که قادر است انسان و حیوانات را آلوده سازد و دیگری ایزوله های انسانی که فقط برای انسان عفونتزا است . عدم توانایی در تولید اووسیست‌های ایزوله انسانی در مقیاس زیاد بطور تجربی، مهمترین مانع در انجام مطالعات اساسی بر روی ایزوله های انسانی بوده است [۴۳]. منابع جدید *C. hominis* و *C. parvum* را جدا می‌دانند [۱۷۵].

۲-۲- چرخه زندگی

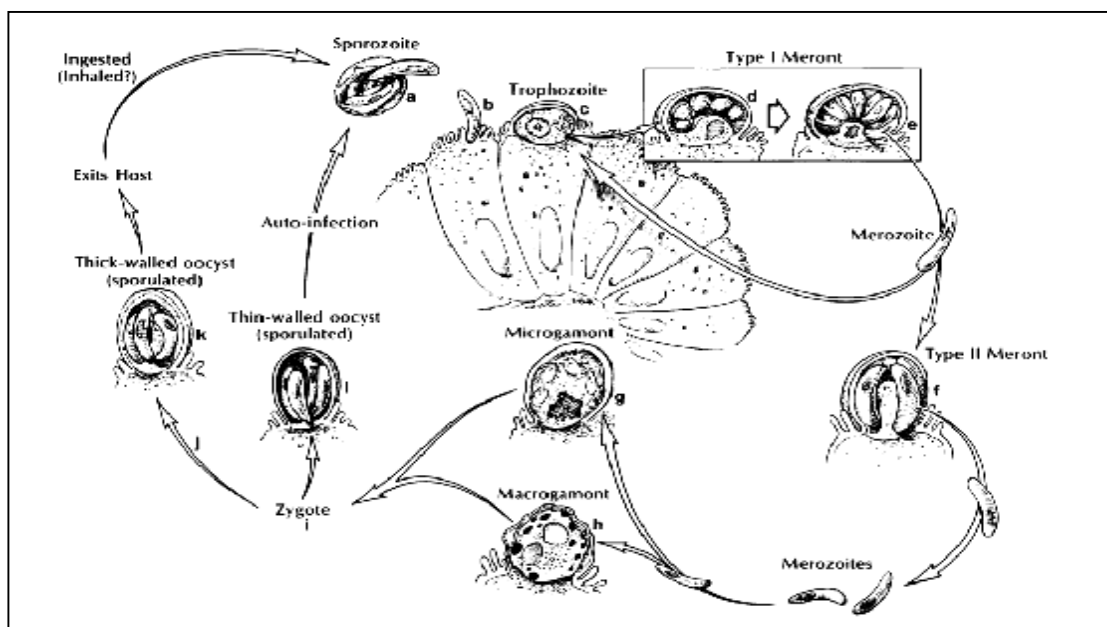
کریپتوسپورییدیوم انگل داخل سلولی (intracellular) و خارج سیتوپلاسمی (extracytoplasmic) می‌باشد. کریپتوسپورییدیوم بیشتر در بین سلول‌های اپیتلیال اندام‌های گوارشی (معمولاً ایلئوم وژژنوم) رشد و تکثیر پیدا می‌کند، هر چند در مجاری تنفسی به خصوص در پرندگان هم یافت شده است. لازم به ذکر است که در افراد دارای نقص سیستم ایمنی می‌توان انگل را در اپیتلیال مجاری تنفسی، مجاری صفراوی، مجاری پانکراتیک و معده نیز پیدا کرد. مراحل چرخه زندگی این انگل در یک میزبان طی می‌شود. این تک یاخته دو نوع اووسیست ایجاد می‌کند یکی با دیواره ضخیم و دیگری با دیواره نازک. اووسیست‌های با دیواره نازک در روده باز شده و بدین ترتیب باعث آلودگی مجدد فرد می‌شوند. اووسیست‌های با دیواره ضخیم از راه مدفوع در محیط رها شده و نسبت به بسیاری از شرایط سخت محیطی مقاومت نشان می‌دهند. هر نسل انگل می‌تواند در عرض ۱۲ - ۱۴ ساعت رشد کرده و بالغ شود. بعد از بلع این اووسیست‌ها توسط میزبان حساس ممکن است عفونت مجددی حادث شود (انتقال به روش مدفوعی-دهانی). پس می‌توان گفت چرخه زندگی انگل مونوگزنوس (Monoxenous) است و در روده یک میزبان طی می‌شود. اندازه

اووسیست‌ها حدود $4-6 \mu\text{m}$ بوده، تنها مرحله خارجی (Exogenous) یا اگزوجنوس چرخه حیات انگل محسوب می‌گردد.

اووسیست‌ها پس از بلع در اثر ترشحات معده لایه های داخلی و خارجی خود را از دست می‌دهند و چهار اسپوروزوئیت متحرک و دوکی شکل از آنها خارج می‌گردد که از قسمت راسی خود بصورت انتخابی به ناحیه سطحی انتروسیت‌ها در منطقه بالایی مجرای معدی-روده ای متصل می‌شوند. اسپوروزوئیت‌ها با ترشحات راسی غشاء خود حفره ای در زیر غشاء و مجزا از سیتوپلاسم سلول‌های پوششی میزبان ایجاد می‌کنند که اصطلاحاً واکوئل پارازیتوفروس (Parasitophorous vacuol خوانده می‌شود.

در پایه واکوئل پارازیتوفروس ارگانلی با الکترودنس مشخص به نام اندامک تغذیه‌گر Feeder organel وجود دارد که احتمالاً وظیفه تبادلات بین سلول میزبان و انگل را به عهده دارد. اکنون اسپوروزوئیت‌ها به تروفوزوئیت‌های مدور تمایز می‌یابند و سپس مرحله مروگونی یا شیزوگونی یا همان تقسیم غیر جنسی صورت می‌گیرد. نسل اول به مرون‌های (شیزونت‌ها) نوع I تبدیل می‌شوند که حاوی ۸-۶ مروزوئیت هستند. مروزوئیت نیز مثل اسپوروزوئیت دوکی شکل و خمیده بوده، دارای دو غشاء داخلی و مجموعه راسی شامل رینگ‌ها و میکرنم‌ها می‌باشند. با پاره شدن مرون‌های نوع I، مروزوئیت‌های بالغ آزاد و به سلول‌های پوششی مجاور حمله می‌کنند که حاصل آن تولید مرون‌های نوع I یا II می‌باشد. علاوه بر عفونت خودبخودی ناشی از پاره شدن اووسیست‌های دیواره نازک، شاید این چرخه مرون‌های نوع I نیز بتواند تا حدی توجیه کننده توانایی ماندگاری کریپتوسپوریدیوم پارووم در انسان باشد. مرون‌های نوع II حاوی ۴ مروزوئیت است که با پاره شدن آن و آزاد شدن و تهاجم مروزوئیت‌ها به سلول‌های میزبان، تقسیم جنسی یا گامتوگونی را ادامه داده، به گامونت‌های ماده و نر تبدیل می‌شوند. احتمالاً این مرحله ۳۶ ساعت پس از عفونی شدن اتفاق می‌افتد. با ترکیب میکروگامونت (نر) و ماکروگامونت (ماده) لقاح صورت گرفته زیگوت تشکیل می‌شود. زیگوت‌ها سپس به دو نوع اووسیست با دیواره نازک و ضخیم تبدیل

می‌شوند که حاوی ۴ اسپوروزوئیت هستند و توانایی ایجاد عفونت در میزبان حساس را دارند. Prepatent period یا همان زمان لازم از بلع اووسیست تا دفع اووسیست عفونتزا در میزبان انسانی تقریباً ۲۲-۴ روز می‌باشد [۴۴، ۴۵].



تصویر ۱- چرخه زندگی کریپتوسپوریديوم پارووم

۳- بیماریزایی

کریپتوسپوریديوزیس بیماری است که به وسیله تک یاخته انگل کریپتوسپوریديوم ایجاد می‌شود. در افراد با سیستم ایمنی مناسب بیماری به صورت حاد و خود محدود شونده بروز می‌کند و معمولاً بعد از ۸-۲۰ روز علائم ناپدید می‌شود. در افراد دارای نقص ایمنی علائم پایدار بوده و از خامت بیشتری برخوردار است این علائم از نظر بالینی عبارتند از: اسهال فراوان، آبکی، انفجاری همراه با کرامپ های شکمی در اغلب موارد، تهوع، استفراغ، تب بالای ۳۹ درجه، بی اشتهایی، ضعف و لاغری به دلیل کاهش جذب مواد غذایی در اثر آتروفی پرزهای روده. البته هنوز بطور کامل مکانیسم‌های ایجاد اسهال توسط این انگل مشخص نیست. بر اساس اطلاعات موجود تغییر در سیستم عصبی، ایمنی و عملکرد سلول‌های پوششی روده توسط انگل ایجاد می‌گردد. با وجود تفاوت‌های ژنتیکی ما

بین ایزوله‌های مختلف کریپتوسپوریدیوم پارووم و تفاوت احتمالی در حدت بیماری هنوز فاکتور های اختصاصی حدت کریپتوسپوریدیوم پارووم و قابلیت ژنتیک در بروز جهش‌های معین برای آنالیز کریپتوسپوریدیوزیس ارائه نشده است. لذا، در حال حاضر اطلاعات ما در مورد بیماریزایی این عفونت، ناشی از بررسی آسیب شناختی روده‌ای عفونت در انسان و حیوان و مطالعات در شرایط Invivo و Invitro می‌باشد [۴۶، ۴۷]. در مورد عفونت روده‌ای در انسان بیشتر از بیوپسی های بیماران ایدزی مبتلا به اسهال های مزمن یا کریپتوسپوریدیوزیس استفاده شده است. نتایج آسیب شناختی بافتی اپیتلیوم روده ناشی از تهاجم کریپتوسپوریدیوم پارووم متفاوت می‌باشد [۵۸، ۵۹، ۶۰، ۶۱]. در بیماران ایدزی رابطه‌ای بین شدت عفونت و حجم مدفوع دیده نشده است. در موارد شدید عفونت که با آسیب شناختی بافتی و تعداد اووسیست در مدفوع مشخص می‌شود آسیب‌های شدیدتر بافت روده شامل آتروفی ویلی های روده، هایپر پلازی کریپت‌های روده و ارتشاح سلول‌های تک هسته‌ای و چند هسته‌ای به زیر مخاط همراه با اختلال در جذب پروتئین، کربوهیدرات و ویتامین B12 دیده می‌شود. در فعالیت آنزیمی آنزیم‌هایی مانند لاکتاز و سوکراز در ناحیه کناره برس مانند سلول‌های پوششی کاهش دیده می‌شود که احتمالاً از نظر بالینی حائز اهمیت است [۵۸، ۶۰، ۶۱، ۶۲].

در ایجاد علائم روده‌ای مکانیسم‌های احتمالی دیگری را علاوه بر سوء جذب در نظر می‌گیرند. از آن جمله، اختلال احتمالی در انتقال یون‌ها در روده و یا افزایش نفوذ پذیری روده می‌باشد که در مطالعات فیزیولوژیک صورت گرفته بر روی بافت‌های روده آلوده به کریپتوسپوریدیوم پارووم در موش، خوک و انسان مشخص شده است [۶۳، ۶۴، ۶۵].

در مدل‌های حیوانی، جذب ناقص سدیم و گلوکز دیده می‌شود که می‌تواند علامت‌دار شدن بیماری را باعث شود [۶۶، ۶۷، ۶۸، ۶۹، ۷۰]. بطور مقایسه‌ای، دیده شده که جذب سدیم تحریک شده توسط گلوتامین تا حدود زیادی ثابت می‌ماند که این موضوع می‌تواند ارجحیت استفاده از محلول‌های خوراکی جبرانی آب بدن بر پایه گلوتامین را بر محلول‌های بر پایه گلوکز در درمان اسهال‌های ناشی

از کریپتوسپوریدیوم پارووم نشان دهد [۶۴، ۶۹، ۷۰]. در موارد شدیدتر بیماری در بچه خوک‌ها همراه اسهال، ترشح پروستانوئیدها هم ممکن است دیده شود که این امر می‌تواند در اثر فعال شدن کینازها در پی تهاجم سلولی انگل و نیز تحریک ترشحات روده باشد [۵۲، ۶۴]. بررسی‌های انجام شده در شرایط آزمایشگاهی و بیماران ایدزی نشان دهنده کاهش عملکرد سد روده‌ای می‌باشد [۷۱]. افزایش پروستاگلاندین نورواکتیو (PGI₂) و سنجش مهار کننده‌اش در بافت‌های روده بچه خوک‌های مبتلا به کریپتوسپوریدیوم پارووم نشان می‌دهد که در ترشحات روده‌ای ناشی از عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم سیستم عصبی روده دخالت دارد [۷۲، ۷۳]. در تحریک بکارگیری لوکوسیت‌های مخاطی، سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند TNF α و IL-8 با تولید واسطه‌های التهابی دخالت دارند [۵۴، ۵۵، ۵۶، ۷۴]. این واسطه‌های التهابی در واکنش به عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم تولید و با افزایش ترشحات روده مشخص می‌شوند، در بیش از ۷۵ درصد موارد علامتدار ناشی از عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم نقش بالقوه التهاب در بروز اسهال ثابت شده است [۷۵]. در بافت‌های روده انسان و در *Invitro* در واکنش به عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم آسیب‌های سلولی و آپوپتوزیس نیز احتمالاً در بیماریزایی نقش دارند [۶۱، ۶۶]. احتمالاً در پاسخ به عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم انترتوکسینی تولید می‌شود که ترشحات روده را افزایش می‌دهد [۷۷، ۷۹]. البته تا کنون محصول اختصاصی انگل تحت این عنوان شناسایی نشده و این فرضیه نیاز به بررسی بیشتر دارد [۴۶، ۴۷]. بنابر این در ایجاد اسهال توسط کریپتوسپوریدیوم پارووم مجموع مکانیسم‌های مذکور دخالت دارند. پیشرفت‌های حاصل در زمینه بیماریزایی انگل کریپتوسپوریدیوم پارووم مدیون تحقیقات اخیر بر روی داوطلبان انسانی می‌باشد. سال ۱۹۹۹ در بررسی انجام شده توسط اکویسن و همکاران مشخص شد که ژنوتیپ گاوی ایزوله‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم شدت بیماری متغیری نشان می‌دهند که این موضوع، به دلیل تعداد کم اووسیست در ایجاد بیماری حتی در افراد سالم، حائز اهمیت است [۷۶]. در این بررسی داوطلبان سالمی شرکت کردند که از نظر سرولوژیک فاقد آنتی‌بادی ضد کریپتوسپوریدیوم پارووم بودند و هر

یک با یکی از سه ایزوله ژنوتیپ گاوی آلوده شدند. در هر گروه از افراد تحت مطالعه، بین ده تا صد برابر اختلاف در تعداد اووسیست‌های لازم برای ایجاد پنجاه درصد عفونت (ID50) دیده شد. ID50 لازم برای سویه TAMU، با حدت‌ترین ایزوله، با بیشترین سرعت تهاجم و طول دوره اسهال، تنها ۹ اووسیست بود. مطالعات بعدی بر روی داوطلبان نشان داد ابتلا اولیه به ایزوله‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم، هیچ مصونیتی در ایجاد اسهال در مواجهه ثانویه با همان گونه انگل ایجاد نمی‌کند اما وخامت بیماری را کاهش می‌دهد [۷۹]. از طرفی، در افراد آنتی‌بادی مثبت آلوده شدن با تعداد زیاد اووسیست، احتمالاً از ایزوله‌های گوناگون، شدت علائم و عوارض بیماری را در پی خواهد داشت که نشان می‌دهد پاسخ‌های ایمنی در برابر بیماری‌زایی و اسهال ناشی از عفونت با ایزوله‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم در افراد دخالت دارد. ایمنی محافظت‌کننده با تلقیح زیاد اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم بصورت متناوب با اختلال همراه می‌شود [۸۰، ۸۱].

بر اساس اطلاعات موجود، مدلی از مکانیسم عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم بیان شده است که احتمالاً به اسهال منجر می‌شود. برای اتصال کریپتوسپوریدیوم پارووم به سلول‌های پوششی روده و یا سلول‌های پوششی مجاری صفراوی وجود اپی‌توپ‌های GAL/GALNAC بر روی سلول‌های پوششی و غشاء اسپوروزئیت لازم است که بیانگر رابطه اختصاصی بین انگل و میزبان می‌باشد [۴۸، ۴۹]. تهاجم پی در پی اسپوروزئیت‌ها و مروزوئیت‌ها به سلول‌های پوششی روده وابستگی آنها را به اکتین و عدم احتیاجشان را به توبولین نشان می‌دهد که به ایجاد ساختاری شبه پلاکی از جنس اکتین بین انگل و سلول پوششی میزبان منجر می‌گردد [۳۶، ۵۱، ۵۲].

در مرز بین سلول میزبان و انگل در محلی که تصور می‌شود در تبادل مولکول‌ها بین انگل و سلول میزبان نقش داشته باشد، علاوه بر اکتین و پروتئین متصل شونده به اکتین (آلفا اکتین)، یک پروتئین انتقالی مختص کریپتوسپوریدیوم پارووم با نام اختصاری CpABC وجود دارد [۳۶، ۵۳]. مکانیسم‌های دقیق تهاجم سلولی کریپتوسپوریدیوم پارووم که به بازآرایی اکتین منجر می‌شود، مشخص نبوده، ولیکن در حال حاضر دخالت مسیرهای علامت‌دهنده کیناز سلول میزبان را در این

امر دخیل می‌دانند، علاوه بر این، تهاجم سلولی کریپتوسپوریدیوم پارووم، سنتز پروتئین‌های جدیدی را تحریک می‌کند که شامل پروستاگلاندین H سنتاز ۲، سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های التهابی از قبیل $TNF-\alpha$ ، IL-8، GRo- α و احتمالاً $IL-1\beta$ و پپتیدهای آنتی‌بیوتیکی مخاطی (β -دفنسین) می‌باشد، همگی در بیماریزایی انگل کریپتوسپوریدیوم پارووم نقش دارند [۳۶، ۵۴، ۵۵، ۵۶، ۵۷].

۴- ایمنی شناسی

۴-۱- پاسخ‌های میزبان در برابر کریپتوسپوریدیوم پارووم

در حال حاضر اطلاعات در باره پاسخ‌های میزبان در برابر کریپتوسپوریدیوم پارووم اندک است و شواهد موجود از وضعیت عفونت در بیماران ایدزی، مبتلایان به نقص سیستم ایمنی مادرزادی و یا بیماران تحت شیمی درمانی بدست آمده است. لذا، مشخص شده است که جهت پیشگیری و کنترل از عفونت‌های ناشی از کریپتوسپوریدیوم، فعال‌سازی و تقویت سیستم ایمنی لازم است. بیشتر بررسی‌های انجام گرفته در این باره، در مدل‌های موشی دارای نقص ایمنی مادرزادی یا ژنتیکی بوده است. اغلب حیوانات، تنها هنگامی که خیلی جوان هستند در برابر عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم حساس هستند و با گذشت زمان، مقاومت ذاتی در آنها ایجاد می‌شود [۸۲، ۸۳، ۸۴، ۸۵]. به نظر می‌رسد در حساسیت حیوانات جوان به عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم عواملی چون نقص در سیستم‌های موثر ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی علیه آنتی ژن، مانند مسیره‌های $IL-2$ و $IFN\gamma$ دخالت داشته باشند. در انسان رابطه سن و حساسیت به عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم قطعاً معلوم نشده و در هر رده سنی احتمال ابتلا به عفونت وجود دارد. به همین دلیل به کارگیری مدل‌های حیوانی در مطالعه بیماریزایی کریپتوسپوریدیوم پارووم در انسان با مشکل همراه است [۸۶].

۴-۱-۱- ایمنی سلولی

احتمالاً موثرترین و مهمترین پاسخ‌های ایمنی در مقابل عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم و در بهبودی و پیشگیری از عفونت مجدد به این انگل به عهده ایمنی سلولی می‌باشد. در پاسخ‌های ایمنی علیه عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم در مبتلایان به ایدز، موش‌های *nude* (فاقد تیموس) و SCID (نقص ایمنی شدید)، اهمیت سلول‌های T بویژه $CD4^+$ در ایجاد عفونت‌های پایدار، اسهال‌های مزمن و اشکال کشنده عفونت مشخص می‌شود [۸۶]. با توجه به مطالعات تجربی صورت گرفته بر روی مدل‌های موشی، اهمیت سلول‌های T از نوع $CD4^+$ ، $IFN\gamma$ و IL-12 در تعیین دوره بیماری و یا بهبودی عفونت به اثبات رسیده است [۳۶]. افزایش حساسیت به عفونت در مدل‌های موشی با نقص در سلول‌های $CD4^+$ با ایجاد عفونت‌های علامتدار و پایدار مشخص می‌شود که با انتقال لنفوسیت‌های طحال، از موش‌های ایمن شده به موش‌های مذکور، این حساسیت رفع می‌شود [۸۷، ۸۸]. این یافته‌ها به تجربیات بالینی در انسان شباهت دارد که نسبت سلول‌های $CD4^+$ را در خون محیطی در استعداد بیماران ایدزی در بهبودی عفونت نشان می‌دهند [۸۹، ۹۰، ۹۱]. سلول‌های $CD4^+$ در سیستم ایمنی روده‌ای (GALT) شامل پلاک‌های پیر، لامینا پروپریا و لنفوسیت‌های اینترا اپیتلیال (IEL) و سلول‌های پوششی روده از طریق فعال سازی پاسخ‌های ایمنی ذاتی (نظیر تولید دفنسین)، بعنوان اولین خط دفاعی در کنترل بیماری محسوب می‌شوند [۳۶]. در ابتدای عفونت لنفوسیت‌های اینترا اپیتلیال (IEL) و گره‌های لنفاوی مزانتر (MLN) می‌توانند تعداد زیادی سلول‌های $CD4^+$ اختصاصی تولید کنند. با انتقال و جایگیری این سلول‌ها در روده موش‌های SCID آلوده بهبود حاصل شد. این توانایی بهبود عفونت با حذف سلول‌های $CD4^+$ موجود در MLN و IEL موش‌های ایمن شده، از بین رفت. در مورد نقش سلول‌های $CD8^+$ اطلاعات متفاوت می‌باشد و اهمیت سلول‌های NK در مهار عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم هنوز مشخص نیست. احتمالاً سلول‌های $CD8^+$ اینترا اپیتلیال در سرکوب عفونت دخالت

دارند، کاهش سیستمیک سلول‌های $CD8^+$ در دفع اووسیست یا حساسیت به عفونت تغییری ایجاد نمی‌کند [۹۲]. $IFN\gamma$ (سایتوکانی از گروه سلول‌های $Th1$) در مهار عفونت‌های انسانی موثر است ولی حذف آن در موش‌ها توسط آنتی بادی باعث افزایش دفع اووسیست می‌شود [۸۸، ۹۲]. تجویز $IL-12$ با القای $IFN\gamma$ به جلوگیری یا کاهش وخامت عفونت در موش‌های مبتلابه نقص ایمنی آلوده به کریپتوسپوریدیوم پارووم منجر شد. مطالعات دیگر نشان می‌دهد که سایتوکاین‌های تولیدی از گروه سلول‌های $Th2$ مانند $IL-4$ ، نیز در کنترل عفونت و بیماری نقش دارند. همچنین مشخص گردیده فعال سازی لیگاند $CD40$ که مانند TNF توسط سلول‌های T فعال بیان می‌شود، در مهار عفونت موثر است، این لیگاند با افزایش تولید $IL-12$ و $IFN\gamma$ ، در مهار عوامل بیماریزای درون سلولی، با تاثیر بر فعال سازی سلول‌های T ، سیگنال دهی توسط سلول‌های B و تعاملات این سلول‌ها با یکدیگر عمل می‌نماید [۹۳]. لازم به ذکر است که مطالعات بالینی انجام شده بر روی پاسخ‌های ایمنی سلولی انسان در برابر عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم بسیار محدود می‌باشد.

۴-۱-۲- ایمنی همورال

در سرم خون اکثر بیماران واجد ایمنی کارآمد و یا نقص ایمنی آلوده به کریپتوسپوریدیوم پارووم از جمله افراد HIV مثبت با عفونت پایدار، آنتی بادی‌های IgA ، IgG ، IgM یافت شده است، اما نقش آنها در مصونیت و پاکسازی عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم هنوز کاملاً مشخص نشده است. بررسی تغییرات آنتی‌بادی‌ها در افراد داوطلب با علائم بالینی، با استفاده از تکنیک‌های ایمونوبلات صورت می‌گیرد. در پی ایجاد عفونت تجربی در انسان، میزان فعالیت IgG علیه آنتی‌ژن‌های ۱۵، ۱۷ و ۲۷ کیلودالتونی انگل در افراد با علائم شایع، نسبت به افراد بی علائم، بیشتر است. همچنین مشخص گردید که آنتی بادی‌های IgM شناسایی شده علیه آنتی‌ژن‌های ۱۷ و ۲۷ کیلودالتونی پیش از عفونت تجربی با کریپتوسپوریدیوم پارووم (در افراد قبلاً آلوده شده و شناسایی نشده)، مانع

عفونت‌های علامتدار می‌شود اما، قادر به جلوگیری از عفونت نمی‌باشد. در تحقیقات بعدی معلوم شد که در این عفونت آنتی بادی‌های تولید شده یا مصونیت‌زا نیستند، یا مصونیت نسبی ایجاد می‌کنند. با این حال، در افراد دارای آنتی بادی ضد کریپتوسپوریدیایی افزودن دوز اووسیست‌های آلوده کننده جهت ایجاد بیماری و علایم، نشان می‌دهد که حضور این آنتی بادی‌ها در موارد آلودگی با تعداد کم اووسیست نظیر آنچه بطور شایع از راه آب آشامیدنی رخ می‌دهد، احتمالاً می‌تواند محافظت کننده باشد. مطالعات انجام شده در باره آنتی بادی‌های روده‌ای بر ضد کریپتوسپوریدیوم پارووم نیز نقش محافظت کننده آنها را در برابر ایجاد بیماری نشان می‌دهد. مراحل از چرخه حیات انگل که خارج از سلول میزبان طی می‌شوند (اسپوروزوئیت و مروزوئیت) از نظر ایمونولوژیک، مورد مطالعه تجربی قرار گرفته است. این اشکال از انگل بعنوان اهدافی برای آنتی بادی‌های اختصاصی می‌باشند. توانایی اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم پارووم در آلوده سازی سلول‌های پوششی روده موش، بر اثر آنتی بادی‌های ضد اسپوروزوئیت و مروزوئیت، کاهش می‌یابد [۹۴]. با روش ایمونوفلورسانس اتصال مونوکلونال آنتی بادی‌های انسانی از کلاس IgG1 به اووسیست و اسپوروزوئیت کریپتوسپوریدیوم پارووم نشان داده شده است. در شرایط آزمایشگاهی این آنتی بادی‌ها از آلوده شدن محیط کشت انتروسیت‌های انسانی جلوگیری می‌کنند. کلاستروم (آغوز) گاو حاوی آنتی بادی‌های ضد کریپتوسپوریدیوم پارووم بوده و مقادیر زیادی از آنتی ژن‌های اووسیست و اسپوروزوئیت بوسیله آن تشخیص داده شده است. تغذیه با آغوز گاوی حاوی آنتی بادی‌های ضد کریپتوسپوریدیوم پارووم و نیز با آنتی بادی‌های تخلیص شده ضد کریپتوسپوریدیوم پارووم در موش و گوساله تا حدی در مقابل ایجاد عفونت نقش محافظتی دارد [۴۴]. در معدود مواردی گزارش شده که در برخی افراد با نقص ایمنی تغذیه با آغوز گاوی غنی شده حاوی آنتی بادی‌های ضد کریپتوسپوریدیوم پارووم به بهبودی یا از بین رفتن عفونت منجر شده است [۹۴]. از طرف دیگر، از بین رفتن عفونت کریپتوسپوریدیوم پارووم در افراد ایدزی، علی‌رغم افزایش پاسخ‌های IgA تام و IgM اختصاصی

ضد کریپتوسپوریدیوم پارووم در مدفوع آنها، بیانگر این مطلب می‌باشد که برای مهار عفونت روده‌ای ناشی از کریپتوسپوریدیوم پارووم صرفاً پاسخ‌های ایمنی همورال کفایت نمی‌کند [۹۴].

۵- اپیدمیولوژی

از نظر انتشار جغرافیایی بیماری کریپتوسپوریدیوزیس انتشار جهانی دارد و بیشتر در مناطق گرم و نواحی تروپیکال دیده می‌شود. کریپتوسپوریدیوم پارووم انگلی فراگیر بوده و برای اغلب پستانداران، خزندگان، ماهی‌ها و سایر جانوران عفونت‌زا می‌باشد. انتقال عفونت به انسان معمولاً به سه طریق رخ می‌دهد: ۱- تماس مستقیم انسان - انسان یا حیوان - انسان ۲- خوردن یا نوشیدن آب و غذای آلوده ۳- تماس با اجسام آلوده. منابع بالقوه انتقال انگل عبارتند از: افرادی که از قبل آلوده شده‌اند، حیوانات خانگی، حیوانات اهلی و آب و غذای آلوده. البته نسبت عفونت‌های ایجادشده با هر یک از طرق مذکور مشخص نیست اما بطور مجزا انتقال انسان به انسان و با منشاء آب در ایجاد اپیدمی‌ها و اندمی‌ها به احتمال زیاد نقش دارند.

همانگونه که ذکر شد احتمال انتقال این تک یاخته از راه آب آشامیدنی وجود دارد و در سال‌های اخیر منبع بسیاری از همه‌گیری‌های بوجود آمده با این نگل، آب آشامیدنی آلوده به اووسیست‌های دفعی توسط حیوانات شناخته شده است. اووسیست‌های دفعی تا مدت‌ها در آب زنده می‌مانند و نسبت به کلرزنی با مقادیر معمولی مقاومت نشان می‌دهند. از این رو با افزایش تشخیص آبهای سطحی با آلودگی پایین ممکن است روش انتقال با منشاء آب نیز در زمره موارد مهم ایجاد عفونت‌های اندمیک این انگل محسوب گردد. افراد با ریسک بالای عفونت عبارتند از: ۱- افراد دارای نقص سیستم ایمنی که یا تحت درمان با داروهای سرکوبگر پاسخ‌های ایمنی قرار دارند و یا در اثر بیماری سیستم ایمنی‌ایشان دچار نقص شده است ۲- افرادی که سیستم ایمنی‌ایشان مشکلی ندارد و عبارتند از: ۱- کارکنان مهدهای کودک ۲- کودکان شیرخوار که در مهد کودک نگهداری می‌شوند ۳- افراد مسن ۴- افرادی که از راه تماس‌های جنسی با مدفوع تماس پیدا می‌کنند ۵-