



۸۹۷۹۶۶۱

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی

عنوان

جستجوی آنتی بادی ضد بروسلوز (بروسلا کنیس) در سگ های شهری و
روستایی شهرستان اهواز به روش ایمونوکروماتوگرافی

نگارش

ندا محمدیان

به راهنمایی

دکتر بهمن مصلی نژاد

دکتر مسعود قربانپور نجف آبادی

آذر ماه ۱۳۸۹

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری حرفه ای دامپزشکی

عنوان

جستجوی آنتی بادی ضد بروسلوز (بروسلا کنیس) در سگ های شهری و روستایی
شهرستان اهواز به روش ایمونوکروماتوگرافی

نگارش

ندا محمدیان

راهنما

دکتر مسعود قربانپور نجف آبادی

(استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

راهنما

دکتر بهمن مصلی نژاد

(استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

مشاور

دکتر رضا آویزه

(دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

داور

دکتر محمد راضی جلالی

(دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

داور

دکتر آریا رسولی

(استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

آذر ماه ۱۳۸۹

بسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران (اهواز)

دانشکده دامپزشکی

(نتیجه ارزشیابی پایان نامه دوره دکتری عمومی دامپزشکی)

بدین وسیله گواهی می‌شود پایان نامه خانم ندا محمدیان دانشجوی دکتری دامپزشکی از دانشکده دامپزشکی به شماره دانشجویی ۸۱۷۹۳۸ تحت عنوان :

« جستجوی آنتی بادی ضد بروسلوز (بروسلا کنیس) در سگ های شهری و روستایی

شهرستان اهواز به روش ایمونوکروماتوگرافی »

جهت اخذ درجه دکترای دامپزشکی در تاریخ ۸۹/۹/۶ توسط هیأت داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و با درجه عالی تصویب گردید.

۱- اعضاء هیأت داوران: مرتبه علمی امضا

الف - استاد راهنما اول : دکتر مسعود قربانپور استاد

ب- استاد راهنمای دوم : دکتر بهمن مصلی نژاد استادیار

ج- استاد مشاور : دکتر رضا آویزه دانشیار

د- داور اول: دکتر محمد راضی جلالی دانشیار

ه- داور دوم : دکتر آریا رسولی استادیار

و- نماینده تحصیلات تکمیلی دانشگاه (استاد ناظر):

دکتر عباس جلو دار دانشیار

۲- مدیر گروه :

دکتر علی رضا غدیری دانشیار

۳- معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده:

دکتر سیدرضا فاطمی طباطبائی استادیار

۴- مدیر کل تحصیلات تکمیلی دانشگاه:

دکتر رحیم پیغان استاد

تقدیم به آنان که بودم چون بودند، مسم چون هستند و خواهیم بود تا باشند

تقدیم به پدر بزرگوارم:

او که بودنش تاج افتخاریست بر سرم و نامش دلیلیست برای بودنم. او که همواره مشوق من در پی نمودن راه های نابهنوار زندگیست و سنگین ترین بارهای زندگی بر دوشش بوده است، او که تنها آرزویش عبور فرزندانش از مرزهای توانستن و رسیدن به اوج قله های عزت است و همواره به وجود ارزشمندش می بالم.

تقدیم به مادر مهربانم:

عبادتگاه جانم، فرشته ای که مهربانیهایش راهم تابی نیست. او که زندگی و زندگیم برایش رنج است. او که آرام کننده لحظات بی قراریم است، او که با تمام وجود درس صبر و گذشت و فداکاری را به فرزندانش می آموزد و ستون سبز آرزوهایم برپایه ی بودنش استوار است.

همیشه پاسگذار لطف و محبتشان خواهیم بود.

تقدیم به خواهر مهربانم سارا:

او که پناهگاه همیشگی دلتنگیهایم است، او که نگاه گرمش همواره امید بخش من در لحظات تنهایی و سختی است و وجودش برایم ترنم محبت و فداکاری است.

و تقدیم به شمای عزیز

او که نگاهش همه شور است و عشق و بادیدن پاک و صغای وجودش آرام می گیرم تنها آرزویم خوشبختی اوست.

با تشکر ویژه از محضر اساتید فرزانه:

جناب آقای دکتر مسعود قربانپور نجف آبادی و دکتر بهمن مصلی نژاد، که با صبر و
موصله فراوان، دقت نظر خاص، علو طبع بی مانند و دانش پربار خود، راهنمایی پایان
نامه اینجانب را پذیرا شدند و صفات این پایان نامه را به قلم زیبای خود آراستند.

جناب آقای دکتر رضا آویزه، مشاور پایان نامه که با دلسوزی فراوان در به ثمر رسیدن
این پایان نامه از هیچ کوششی فرو گذار نکردند و در کمال صبر و موصله در تمام مراحل
انجام این تمقیق راهگشا و راهنمای اینجانب بودند.

جناب آقای دکتر محمدراضی جلالی و دکتر آریا رسولی، که قبول زحمت فرمودند و داوری
این پایان نامه را بر عهده داشتند.

جناب آقای دکتر عباس جلودار، نماینده‌ی ممتزم تمصیلات تکمیلی که نظارت بر مسن
اجرای جلسه را برعهده داشتند.

تقدیم به دوستان عزیزه، دکتر مرضیه امدی آرپناهی، دکتر مسین گرایش،
دکتر آزاده شوشی‌زاده، دکتر ناهید گوهری و دکتر مریم بابادی...

و همهی دوستان و همراهانم در سالهای آشنایی و غربت....

با تشکر و قدردانی از کلیه کارکنان و کارگران صدیق و زمتکش دانشکده دامپزشکی
شهید چمران اهواز به ویژه جناب آقای ممدیان، آقای امیری، آقای مسین پور
و آقای مسینوند و همچنین سرکار خانم ارزانی و خانم تسلیمی.

صفحه	عنوان
۱	چکیده پایان نامه
	فصل اول: مقدمه وهدف
۴	مقدمه وهدف
	فصل دوم: مروری بر منابع موجود
۸	الف- تاریخچه بیماری
۸	الف-۱- تاریخچه بروسلوز در جهان
۱۰	الف-۲- تاریخچه بروسلوز در ایران
۱۰	الف-۳- گونه‌های بروسلا.....
۱۳	الف-۴- کشت بروسلا.....
۱۳	الف-۴-۱- محیط‌های کشت بروسلا برای جدا سازی اولیه.....
۱۳	الف-۴-۱-۱- محیط‌های جامد.....
۱۳	الف-۴-۱-۲- محیط‌های مایع.....
۱۴	الف-۴-۱-۳- محیط‌های انتخابی.....
۱۴	الف-۴-۱-۴- محیط‌های مغذی.....
۱۴	الف-۴-۱-۵- محیط‌های مورد استفاده برای آزمایش حساسیت به رنگ.....
۱۵	الف-۵- روش‌های رنگ آمیزی.....
۱۵	الف-۵-۱- روش اصلاح شده ذیل- نلسون.....
۱۵	الف-۵-۲- روش اصلاح شده کاستر.....

- الف-۶- خصوصیات رشد و کشت بروسلا..... ۱۶
- الف-۷- ژنتیک بروسلا..... ۱۷
- الف-۸- واکنش‌های متقاطع..... ۱۸
- الف-۹- مقاومت بروسلا..... ۱۸
- الف-۹-۱- غیر فعال کننده‌های فیزیکی..... ۱۸
- الف-۹-۲- غیر فعال کننده‌های شیمیایی..... ۱۹
- الف-۹-۳- ضد عفونی کننده‌های مورد مصرف در انسان و حیوانات..... ۱۹
- ب- ساختمان آنتی ژن بروسلا..... ۱۹
- ب-۱- تمایز گونه‌های مختلف بروسلا..... ۲۰
- ب-۱-۱- خصوصیات بیولوژیکی..... ۲۰
- ب-۱-۲- واکنش‌های بیوشیمیایی..... ۲۰
- ب-۱-۳- حساسیت به رنگ‌های حیاتی..... ۲۱
- ب-۱-۴- آگلوتیناسیون توسط سرم‌های تک اختصاصی..... ۲۱
- ب-۱-۵- اکسیداسیون..... ۲۱
- ب-۲- ایمنی در برابر عفونت‌های بروسلائی..... ۲۲
- ب-۲-۱- انواع ایمونوگلوبولین‌های ضد بروسلا..... ۲۲
- ب-۳- بروسلوز در انسان..... ۲۲
- ب-۳-۱- اپیدمیولوژی..... ۲۲
- ب-۳-۴- پاتوژنز..... ۲۴
- ب-۳-۵- نشانه‌های بالینی..... ۲۵

- ب-۳-۵-۱- بروسلوز حاد ۲۵
- ب-۳-۵-۲- بروسلوز تحت حاد یا تب مواج ۲۶
- ب-۳-۵-۳- بروسلوز در کودکان ۲۶
- ب-۳-۵-۴- بروسلوز مزمن ۲۷
- ب-۳-۵-۴-۱- عوارض بروسلوز مزمن ۲۸
- ب-۴- تشخیص ۲۸
- ب-۴-۱- کشت ۲۸
- ب-۴-۲- تست‌های سرولوژیک ۲۹
- ب-۵- درمان ۲۹
- ب-۶- پیشگیری ۳۰
- ب-۷- بروسلوز در گاو ۳۰
- ب-۸- بروسلوز در گوسفند و بز ۳۱
- ج- بروسلوز در سگ ۳۱
- ج-۱- مقدمه ۳۱
- ج-۲- تاریخچه آلودگی انسان به بروسلا کنیس ۳۲
- ج-۳- مورفولوژی بروسلا کنیس ۳۳
- ج-۴- راه‌های انتقال ۳۴
- ج-۵- پاتوژنز ۳۶
- ج-۶- علائم بالینی ۳۸
- ج-۷- تشخیص بیماری ۴۱

- ج-۷-۱- یافته‌های آزمایشگاهی ۴۱
- ج-۷-۲- آزمایشات اسپرم ۴۲
- ج-۷-۳- تست‌های سرولوژی ۴۳
- ج-۷-۳-۱- آزمایش آگلوتیناسیون سریع بر روی لام (RSAT) ۴۵
- ج-۷-۳-۲- آزمایش آگلوتیناسیون اسلاید سریع و پیشرفته (فرم اصلاح شده) ۴۶
- ج-۷-۳-۳- آزمایش آگلوتیناسیون در داخل لوله (TAT) ۴۶
- ج-۷-۳-۴- تست ایمونودیفوزیون ژل آگار (AGID) ۴۷
- ج-۷-۳-۵- تست ایمونوفلورسانس آنتی بادی غیر مستقیم ۴۸
- ج-۷-۳-۶- تست الیزا ۴۹
- ج-۷-۴- روش‌های باکتریولوژی ۴۹
- ج-۷-۵- یافته‌های پاتولوژی ۵۱
- ج-۷-۶- درمان ۵۳
- ج-۷-۷- حیوانات برای نسل کشی ۵۴
- ج-۷-۸- حیوانات دست آموز ۵۴
- ج-۷-۹- درمان با آنتی بیوتیک‌ها ۵۵
- ج-۷-۱۰- دیسکواسپوندیلیت ۵۷
- ج-۷-۱۱- عوارض چشمی ۵۷
- ج-۷-۱۲- منگوانسفالیت ۵۸
- ج-۷-۱۳- کنترل در کنل‌های آلوده ۵۸
- ج-۸- پیشگیری ۵۹

ج-۹- ملاحظات عمومی ۶۰

فصل سوم: مواد و روش کار

الف- مواد و وسایل مورد نیاز..... ۶۴

ب- منطقه مورد مطالعه..... ۶۴

ج- حیوانات مورد مطالعه..... ۶۵

د- تهیه نمونه‌های سرمی..... ۶۶

و- روش انجام تست ایمونوکروماتوگرافی و تفسیر کیت..... ۶۶

ه- روش آماری..... ۶۷

فصل چهارم: نتایج

الف- نتایج..... ۶۹

الف-۱- جمعیت سگ‌های شهری..... ۶۹

الف-۲- جمعیت سگ‌های روستایی..... ۷۱

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

بحث و نتیجه‌گیری..... ۷۶

پیشنهادات..... ۸۲

منابع..... ۸۳

چکیده انگلیسی..... ۹۲

فهرست جداول

صفحه

عنوان

-
- جدول ۱-۲: طبقه‌بندی گونه‌های بروسلا بر حسب میزبان اصلی، میزبان‌های فرعی، سال و محل کشف آن‌ها ۱۰
- جدول ۲-۲: تشخیص تفریقی بروسلا از سایر کوکوباسیل‌های گرم منفی ۱۱
- جدول ۳-۲: خصوصیات تفریقی گونه‌ها و بیوتیپ‌های جنس بروسلا ۱۲
- جدول ۱-۳: روستاهای محل نمونه‌گیری و تعداد نمونه اخذ شده از هر روستا ۶۵
- جدول ۱-۴: شیوع سرمی علیه بروسلا کنیس در جمعیت سگ‌های شهری منطقه اهواز، بر اساس سن و جنس به روش ایمونوکروماتوگرافی در طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ ۶۹
- جدول ۲-۴: شیوع سرمی علیه بروسلا کنیس در جمعیت سگ‌های روستایی منطقه اهواز، بر اساس سن و جنس به روش ایمونوکروماتوگرافی در طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ ۷۲

فهرست نمودار

صفحه

عنوان

-
- نمودار ۴-۱: میزان شیوع سرمی ناشی از بروسلا کنیس بر اساس فاکتور سن در جمعیت سگ‌های شهری شهرستان اهواز (شماره ۱ = سگ‌های بالای ۵ سال، شماره ۲ = سگ‌های ۵ - ۱ سال) ۷۰
- نمودار ۴-۲: میزان شیوع سرمی ناشی از بروسلا کنیس بر اساس فاکتور جنس در جمعیت سگ-های شهری شهرستان اهواز (شماره ۱ = جنس نر، شماره ۲ = ماده) ۷۰
- نمودار ۴-۳: میزان شیوع سرمی ناشی از بروسلا کنیس بر اساس فاکتور نژاد در جمعیت سگ‌های شهری شهرستان اهواز (شماره ۱ = نژاد مخلوط، شماره ۲ = ژرمن شفرد، شماره ۳ = دوبرمن پینچر، شماره ۴ = تریر، شماره ۵ = پکینز و شماره ۶ = اشپیتز) ۷۱
- نمودار ۴-۴: میزان شیوع سرمی ناشی از بروسلا کنیس بر اساس فاکتور سن در جمعیت سگ‌های روستایی شهرستان اهواز (شماره ۱ = سگ‌های بالای ۵ سال، شماره ۲ = سگ‌های ۵ - ۱ سال) .. ۷۳
- نمودار ۴-۵: میزان شیوع سرمی ناشی از بروسلا کنیس بر اساس فاکتور جنس در جمعیت سگ-های روستایی شهرستان اهواز (شماره ۱ = جنس نر، شماره ۲ = ماده) ۷۳
- نمودار ۴-۶: میزان شیوع سرمی ناشی از بروسلا کنیس بر اساس فاکتور نژاد در جمعیت سگ‌های روستایی شهرستان اهواز (شماره ۱ = نژاد مخلوط، شماره ۲ = ژرمن شفرد و شماره ۳ = دوبرمن پینچر) ۷۴

فصل اول

مقدمه و هدف

بروسلوز یکی از بیماری‌های عفونی و مشترک بین انسان و دام است. عامل آن، یک باکتری گرم منفی کوکوباسیل به نام بروسلا است. این بیماری از دو نظر حائز اهمیت می‌باشد، یکی اینکه بهداشت عمومی جامعه را تهدید می‌کند و دیگر اینکه با عوارضی مثل سقط جنین و کاهش تولید در انواع دام‌ها و مهمتر از همه، عقیمی دائم و موقت حیوانات مبتلا، خسارات اقتصادی زیادی را وارد می‌سازد. سگ‌ها میزبان طبیعی بروسلا کنیس می‌باشند ولی این حیوان می‌تواند از طریق خوردن جفت و جنین‌های سقط شده عفونی دام‌های اهلی به بروسلا آبورتوس، بروسلا ملی تنسیس و بروسلا سوئیس مبتلا شود. اگرچه موارد انسانی در نتیجه آلودگی آزمایشگاهی و تماس با سگ‌های آلوده گزارش شده است، اما به نظر می‌رسد انسان نسبت به بروسلا کنیس مقاوم باشد (۳۴). بروسلا کنیس برای اولین بار از مایع آلانتوئید^۱ جنین سقط شده نژاد بیگل در نیوجرسی آمریکا جدا شد. با توجه به اینکه سگ‌هایی که به بروسلاهای غیر اختصاصی شان آلوده می‌شوند، در اکثر موارد علائم بالینی ندارند و می‌توانند بیماری را به انسان و دیگر حیوانات اهلی نیز انتقال دهند، تشخیص به موقع، به منظور جلوگیری از انتشار سریع آن، در مبارزه با این بیماری اهمیت زیادی دارد. بروسلا کنیس نسبت به بقیه بروسلاها، دارای میزبانان محدودی است و تنها سگ‌ها و سگ‌سانان به آن حساس هستند. از مشخصات بروسلا کنیس، سقط در سگ‌های ماده، آتروفی بیضه، تورم اپیدیدیم و ناباروری در سگ‌های نر و لنفادنیت عمومی در هر دو جنس است. به علت انگل داخل سلولی اختیاری بودن انواع بروسلاها، درمان ظاهری با درمان واقعی همیشه مطابقت ندارد و به طور کلی به دلیل خطرات ناشی از انتقال بیماری به انسان، درمان در دام مدنظر قرار نمی‌گیرد، بلکه کنترل و ریشه‌کنی بیماری حائز اهمیت است. تشخیص قطعی عفونت ناشی از

۱ - Allantoid

بروسلا کنیس در سگ‌ها بستگی به استفاده از روش‌های کشت و یا انجام آزمایشات سرولوژیک دارد. استفاده از روش‌های سرولوژیک جهت یافتن پادتن‌های ضد بروسلا در سرم حیوانات مشکوک، روشی کاربردی‌تر و عملی‌تر جهت تشخیص می‌باشد (۳۴). کنترل بروسلوز در کنل‌های با موارد تایید شده بیماری، از طریق تست‌های سرولوژیک و جداسازی ارگانیسیم، مشکل، وقت‌گیر و کار سختی هم برای صاحبان سگ و دامپزشکان است. مشکل زمانی مضاعف می‌شود که درمان با آنتی بیوتیک شروع شود اما هنوز بروسلوز از طریق جداسازی ارگانیسیم تایید نشده باشد و تست‌های سرولوژیک نیز مشکوک باشند. به محض اینکه عفونت ناشی از بروسلا کنیس در کنل تایید شد، می‌بایست کنل قرنطینه شود و حیوانات آلوده حذف گردند. استفاده از روش‌های ضد عفونی مناسب، منجر به توقف انتشار عفونت از طریق اجسام بی‌جان خواهد شد. از آنجایی که تاکنون هیچگونه تحقیقی در سگ‌های شهرستان اهواز در زمینه شیوع و شناسایی کانون‌های آلوده به این بیماری صورت نگرفته بود، انجام تحقیق حاضر ضروری تشخیص داده شد تا با مشخص شدن وضعیت بیماری در منطقه، روش‌های کنترل، پیشگیری و درمان مناسب اعمال گردد. در این مطالعه تعداد ۲۱۸ نمونه سرم از سگ‌های شهری (۱۰۲ نمونه) و سگ‌های روستایی (۱۱۶ نمونه) اخذ و مورد مطالعه قرار گرفت. در حال حاضر تشخیص عفونت، امکان‌پذیرتر شده و بیشتر مراکز تحقیقاتی قادر به تشخیص آن هستند. تشخیص سریع بروسلوز در سگ‌ها به منظور جلوگیری از گسترش بیماری ضروری است. از



مهم‌ترین روش‌های سرولوژیک که در تشخیص بیماری بکار برده می‌شود می‌توان به روش آگلوتیناسیون سریع (RSAT)، ۲-مرکاپتواتانول (2-ME)، آزمایش آگلوتیناسیون لوله‌ای، رزبنگال، آگار ژل ایمونودیفیوژن (AGID)، PCR و الیزا را نام برد. اگرچه این روش‌ها حساس، دقیق و اختصاصی هستند اما تنها در برخی از مراکز آزمایشگاهی قابل استفاده هستند (۳۹، ۳۱، ۳۰، ۱۹، ۱۶، ۶).

روش ایمونوکروماتوگرافی (IC)، یکی از سریع‌ترین روش‌های تشخیصی می‌باشد که با استفاده از کیت‌های (Anigen Rapid Canine Brucella Ab Test kit, RB21-03)، حتی در کلینیک‌های حیوانات کوچک نیز قابل استفاده بوده و هزینه آن نسبت به روش‌های فوق کمتر است. از مزایای استفاده از روش ایمونوکروماتوگرافی این است که ساده و سریع بوده و نتایج حاصل از آن نیز قابل اعتماد است. مطالعات انجام شده در استفاده از این کیت‌ها و مقایسه با دیگر روش‌ها نشان داده است که حساسیت و ویژگی این کیت‌ها به ترتیب ۹۵/۸ و ۹۹/۷ درصد می‌باشد (بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده). امید است که نتایج حاصل از این تحقیق، بتواند به کنترل بیماری در سگ‌ها کمک نماید و قدمی در جهت ارتقاء بهداشت عمومی باشد.

فصل دوم

مروری بر منابع موجود

الف - تاریخچه بیماری

الف - ۱ - تاریخچه بروسلوز در جهان

بیماری بروسلوز از روزگاران قدیم در انسان و حیوانات شایع بوده است و در حال حاضر نیز به عنوان یکی از مشکلات جهانی مطرح است. بیماری را در انسان و دام به ۴۵۰ سال قبل از میلاد مسیح نسبت می‌دهند. عقیده بر این است که آنچه بقراط در یونان و سواحل دریای مدیترانه «تب‌های طولانی» نامید، مواردی از این بیماری بوده است. مارستون^۱ اولین فردی بود که در سال ۱۸۶۳ میلادی به وجود بیماری در جزیره مالت پی برد. در سال ۱۸۸۷ مقامات انگلیسی ساکن جزیره، با اعزام گروهی پزشک به منطقه، تحقیقاتی را آغاز کردند که منجر به جداسازی عامل بیماری گردید و نام آن را ملیتوکوکسی^۲ نامیدند. در همین سال فردی به نام بروس^۳ باکتری را از طحال سربازی که تلف شده بود جدا نمود و نام آن را میکروکوکوس ملی تنسیس^۴ نامید. در سال ۱۸۹۷ فردی به نام بانگ^۵ باکتری باسیلی شکلی را از ترشحات گاوهایی که سقط کرده بودند، جدا کرد و نام آن را باسیلوس آبورتوس^۶ خواند. در سال ۱۸۹۷ رایت^۷ در مطالعاتش بر روی بیماری در جزیره مالت، روش سروآگلوتیناسیون را ابداع نمود. در همین سال هیوس^۸ به دنبال بررسی علائم بالینی، این بیماری را شرح داد و نام تب مالت، تب مواج یا تب مدیترانه‌ای را بر آن نهاد. در سال ۱۹۰۵ زامیت^۹ متوجه شد افرادی که شیر بزهای به ظاهر سالم را می‌خورند که در بررسی‌های سرولوژیک به روش آگلوتیناسیون مثبت هستند، دچار بیماری می‌شوند. بنابراین

۱- Marston

۲- Melito cocci

۳- Bruce

۴- Micrococcus melitensis

۵- Bang

۶- Bacillus abortus

۷- Wright

۸- Hues

۹- Zamit