



مؤلف: شهید

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته روانشناسی

عنوان پایان نامه:

بررسی هویت‌نویسی تک‌بخش‌گرا در تئوسوفی و پیروان در کلاس‌های مطالعات اسلامی

شهرستان شهید

استاد راهنما:

دکتر علیرضا صدر بزاز

استاد مشاور:

دکتر مصدود صالح مقدم

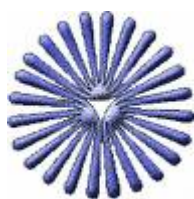
دکتر سعید فرهودی

انتشارش:

نیمه پایانی هجری

مهر ماه ۱۳۹۵

صلاة الاضلاع



دانشگاه پیام نور

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته بیوشیمی

عنوان پایان نامه

بررسی مولکولی تک یاخته کریپتوسپوریدیوم در گاوهای سالم

واسهالی شهرستان مشهد

استاد راهنما

دکتر علیرضا صدر بزاز

اساتید مشاور

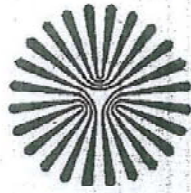
دکتر مسعود صالح مقدم

دکتر مجید فرهودی

نگارش

نجمه طاهر هدایتی

مهر ماه ۱۳۹۰



دانشگاه پیام نور خراسان رضوی
بسمه تعالی

تاریخ: ۱۳۹۰ / ۸ / ۲۵
شماره: ۱۲۲۶۰۲۲۶۷۹

تصویب نامه دفاع پایان نامه

پایان نامه تحت عنوان « بررسی مولکولی تک یاخته کریپتوسپوریدیوم در نمونه گاوهای سالم و اسهالی شهرستان مشهد » که توسط نجمه طاهر هدایتی تهیه و به هیات داوران ارائه گردیده است مورد تأیید می باشد.

تاریخ دفاع: ۱۳۹۰/۰۷/۲۶ نمره:
درجه ارزشیابی: عالی

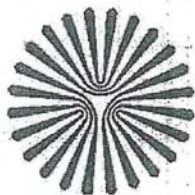
اعضای هیات داوران :

ردیف	نام و نام خانوادگی	هیات داوران	مرتبه دانشگاهی	دانشگاه / موسسه	امضاء
۱	دکتر علیرضا صدر بزاز	استاد راهنما	استاد یار	موسسه رازی مشهد	
۲	دکتر مجید فرهودی	استاد مشاور	استاد یار	موسسه رازی مشهد	
۳	دکتر مسعود صالح مقدم	استاد مشاور	استاد یار	دانشگاه پیام نور مشهد	
۴	دکتر محمد سیدین	استاد داور	استاد یار	موسسه رازی مشهد	
۵	دکتر مجید رجبیان	نماینده تحصیلات تکمیلی	استاد یار	دانشگاه پیام نور مشهد	

۱۳۹۰ / ۱۸ / ۲۵

تاریخ: شماره:

۱۳۴۱، ۲۲۴۸.....



دانشگاه پیام نور خراسان رضوی

بسم تعالی

جمهوری اسلامی ایران

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

صور تجلسه دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

جلسه دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد خانم نجمه طاهر هدایتی دانشجوی رشته زیست شناسی - گرایش بیوشیمی به شماره دانشجویی ۸۸۰۲۷۵۳۵۷ تحت عنوان « بررسی مولکولی تک یاخته کریپتوسپوریدیوم در نمونه گاوهای سالم و اسهالی شهرستان مشهد » با حضور هیات داوران در روز سه شنبه مورخ ۱۳۹۰/۰۷/۲۶ ساعت ۱۴ در محل ساختمان شماره ۱ برگزار شد و هیات داوران پس از بررسی، پایان نامه مذکور را شایسته نمره به عدد به حروف به درج تشخیص داد.

ردیف	نام و نام خانوادگی	هیات داوران	مرتبه دانشگاهی	دانشگاه / موسسه	امضاء
۱	دکتر علیرضا صدر بزاز	استاد راهنما	استاد یار	موسسه رازی مشهد	
۲	دکتر مجید فرهودی	استاد مشاور	استاد یار	موسسه رازی مشهد	
۳	دکتر مسعود صالح مقدم	استاد مشاور	استاد یار	دانشگاه پیام نور مشهد	
	دکتر محمد سیدین	استاد داور	استاد یار	موسسه رازی مشهد	
۴	دکتر مجید رجیبیان	نماینده تحصیلات تکمیلی	استاد یار	دانشگاه پیام نور مشهد	

مشهد - بلوار معلم - معلم ۷۱ - صندوق پستی ۴۳۳ - ۹۱۷۳۵ - تلفن: ۵ - ۸۶۸۳۰۰۲ (۰۵۱۱)

نمابر: ۸۶۸۳۰۰۱ - نمابر دبیرخانه: ۸۶۸۳۹۳۶ - (۰۵۱۱) نشانی الکترونیکی: info@mshc.pnu.ac.ir

اینجانب **محمد طاهر هراسی** دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته **پروژکشن** گواهی می نمایم چنانچه در پایان نامه خود از فکر، ایده و نوشته دیگری بهره گرفته ام با نقل قول مستقیم یا غیر مستقیم منبع و ماخذ آن را نیز در جای مناسب ذکر کرده ام. بدیهی است مسئولیت تمامی مطالبی که نقل قول دیگران نباشد بر عهده خویش می دانم و جوابگویی آن خواهم بود. دانشجوی تأیید می نماید که مطالب مندرج در این پایان نامه (رساله) نتیجه تحقیقات خودش می باشد و در صورت استفاده از نتایج دیگران مرجع آن را ذکر نموده است.

نام و نام خانوادگی دانشجوی **محمد طاهر هراسی**
تاریخ و امضاء
۹۰/۷/۲۶

اینجانب **محمد طاهر هراسی** دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته **پروژکشن** گواهی می نمایم چنانچه براساس مطالب پایان نامه خود اقدام به انتشار مقاله، کتاب، و ... نمایم ضمن مطلع نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله، کتاب، و ... و به صورت مشترک و با ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.

نام و نام خانوادگی دانشجوی **محمد طاهر هراسی**
تاریخ و امضاء
۹۰/۷/۲۶

کلیه حقوق مادی مترتب از نتایج مطالعات، آزمایشات و نوآوری ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه پیام نور می باشد.

ماه و سال مهر ۱۳۹۰

صمد و پیاسر خدایم را سزا است که تیر جستم قضایت را هیچ سپر نمر شکند و لطف و محبت
و هدایتش را هیچ مانع باز نمدارد و هیچ آفریده‌ای به پار شبا هت مفلوقات او
نمیرسد.

... جهل و نادانم و عصیانم و گستاخم

تو را باز ندانم از اینکم راهنمایم کمر

به سوره صراط قربت و

موفقم گردانم به آنچه رضا و شنودرتوست.

هرگاه که تو را خواندم، پاسم گفتی؛

هر چه از تو خواستم، عنایتم فرمودی؛

هرگاه اطاعتت کردم، قدر دانم و تشکر کردی؛

و هر زمان که شکر ترا برجا آوردم، بر نعمت‌هایم افزودی؛

پسر

خدایا!

مرا با تقوا و خودت سعادت مند گردان و

قدرت برکاتت را بر من فروریز

مرا آزر مناک خویشم قرار ده

آنجای که انگار

مربینم

با سپاس بی‌قراخ بر همدلر، هم‌راهر و هم‌قامر همسر مهربانم

که اینار و مهربانی‌تر گل مصبت را در وجودم پروراند

لاکنوخ، با احترام فراوان

با چشم‌های پر از برق شوق و زیبایی‌ر صفور همسرم در کنارم،

شادمانر دختر عزیزم بهار

که خستگی‌ها را با راه را به امید و روشنر راه تبدیل کردند

ایخ پایخ نام را به همسر مهربانم تقدیم میکنم.

تقدیم به آناخ که مشوق راه دانشم بودند.

شکر خدا که هر چه طلب کردم از خدا

بر منتها رحمت خود کامراخ شدم

....

به مصداق «من لم يشكر المخلوق لم يشكر الخالق»

بسی شایسته است از

استاد فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر صدر

که با کرامتی چون خورشید ، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای

علم و دانش

را با راهنمایی های کارساز و سازنده بارور ساختند ؛

تقدیر و تشکر نمایم.

همچنین از استادان ارجمندم جناب آقای دکتر صالح مقدم و جناب آقای

دکتر فرهودی که در طول اجرای این طرح از معونت ، مساعدت ، حمایت و

همدلی ، هم اندیشی ، همسویی ایشان بهره مند گردیدم

سپاس گزارم.

علما مقامت ز عرش برتر باد

همیشه توسن اندیشه ات مظفر باد

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فهرست	أ - ۵
چکیده	و
هدف از تحقیق	ز

فصل اول: کلیات

۱-۱- مقدمه	۱
۱-۲- تاریخچه	۳
۱-۳- تک یاخته ای ها	۵
۱-۴- کوکسیدیا	۷
۱-۵- کریپتوسپوریدیوم	۷
۱-۶- چرخه زندگی	۸
۱-۷- کریپتوسپوریدیوزیس چیست؟	۱۴
۱-۸- بیوشیمی کریپتوسپوریدیوم	۱۵
۱-۹- راه های انتقال	۱۷
۱-۱۰- میزبان ها	۱۹
۱-۱۰-۱- کریپتوسپوریدیوم در گاو	۲۱
۱-۱۱- اختصاصی بودن میزبان	۲۲
۱-۱۲- اپیدمیولوژی	۲۴
۱-۱۳- منابع عفونت گوساله ها	۲۵

۲۵	۱۴-۱- آسیب شناسی
۲۶	۱۵-۱- درمان کنترل
۲۹	۱۶-۱- اصول جمع آوری نمونه و آماده سازی آن برای
۲۹	۱۷-۱- تشخیص
۳۰	۱-۱۷-۱- روشهای تشخیصی جهت مشاهده اووسیت ها
۳۱	۱۸-۱- تشخیص گونه های کریپتوسپوریدیوم
۳۳	۱۹-۱- استخراج DNA
۳۶	۲۰-۱- PCR
۳۷	۱-۲۰-۱- مواد اولیه واکنش PCR
۴۰	۲-۲۰-۱- PCR بافر
۴۰	۲۱-۱- آماده کردن مخلوط اصلی
۴۱	۲۲-۱- بررسی محصولات PCR
۴۱	۱-۲۲-۱- آگارز
۴۳	۲۴-۱- PCR- RFLP

فصل دوم: مواد و روش انجام کار

۴۶	۱-۲- تجهیزات و لوازم مورد استفاده
۴۸	۲-۲- مواد مصرفی عمومی
۴۹	۳-۲- مواد مصرفی شیمیایی
۵۱	۴-۲- مواد مصرفی بیولوژیک
۵۲	۵-۲- محلول ها و بافرهای مورد استفاده

۵۲	۲-۵-۱- محلولهای لازم جهت رنگ آمیزی
۵۲	۲-۵-۲- محلولهای لازم جهت استخراج DNA
۵۴	۲-۵-۳- محلولهای لازم جهت انجام PCR
۵۵	۲-۵-۴- محلولهای لازم جهت الکتروفورز کردن DNA
۵۵	۲-۶-۱- روشهای مورد استفاده
۵۵	۲-۶-۱- نمونه برداری
۵۶	۲-۷-۱- رنگ آمیزی
۵۶	۲-۷-۱- روش رنگ آمیزی اسید فست اصلاح شده ذیل نیلسون
۵۷	۲-۸-۱- استخراج DNA ژنومی
۵۷	۲-۸-۱- استخراج به روش فنل کلروفرم واجد پروتئیناز K
۶۱	۲-۸-۲- استخراج DNA با استفاده از کیت
۶۳	۲-۹-۱- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده
۶۵	۲-۱۰-۱- PCR
۶۸	۲-۱۰-۱- بهینه سازی PCR
۷۰	۲-۱۰-۲- تهیه ژل آگارز و الکتروفورز محصولات PCR اولیه
۷۱	۲-۱۱-۱- خواندن نتایج الکتروفورز
۷۲	۲-۱۲-۱- PCR ثانویه
۷۴	۲-۱۳-۱- RFLP

فصل سوم: نتایج

۷۹	۳-۱-۱- رنگ آمیزی
----	------------------------

۸۱	۲-۳- نتایج استخراج DNA
۸۱	۱-۲-۳- نتایج تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده
۸۲	۳-۳- نتایج تکثیر قطعه 18 s SSU- r RNA توسط PCR اولیه
۸۴	۴-۳- نتایج تکثیر قطعه حاصل از PCR ثانویه
۸۵	۵-۳- آنالیز آماری آلودگی کریپتوسپوریدیوم در گروههای مختلف
۸۶	۶-۳- نتایج تشخیص گونه های کریپتوسپوریدیوم توسط PCR- RFLP
۸۷	۷-۳- نتایج اثر آنزیم SSPI
۸۸	۸-۳- نتایج اثر آنزیم VSPI
۸۹	۹-۳- نتایج اثر آنزیم DdeI
۹۰	۱۰-۳- بررسی نتایج هضم آنزیمی نمونه های مثبت

فصل چهارم: بحث و پیشنهادات

۹۲	۱-۴- بحث
۱۰۱	۲-۴- پیشنهادات
۱۰۳	۳-۴- نتیجه گیری کلی
۱۰۴	منابع

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱- رده بندی کریپتوسپوریدیوم	۶
جدول ۲-۱- گونه های کریپتوسپوریدیوم	۲۳
جدول ۳-۱- مواد مورد نیاز برای تهیه بافر لیز	۳۴
جدول ۴-۱- طیف جداسازی DNA خطی در ژل آگارز	۴۲
جدول ۱-۲- لیست دستگاهها و لوازم مورد استفاده	۴۶
جدول ۲-۲- لیست مواد مصرفی عمومی	۴۸
جدول ۳-۲- لیست مواد مصرفی شیمیایی	۴۹
جدول ۴-۲- لیست مواد مصرفی بیولوژیک	۵۱
جدول ۵-۲- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR اولیه	۶۶
جدول ۶-۲- غلظت اجزای واکنش PCR اولیه	۶۶
جدول ۷-۲- غلظت اجزای واکنش PCR اولیه به روش دستی	۶۷
جدول ۸-۲- مراحل PCR اولیه ، دما و مدت زمان آنها	۶۹
جدول ۹-۲- اجزای واکنش PCR ثانویه	۷۳
جدول ۱۰-۲- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR ثانویه	۷۳
جدول ۱۱-۲- مراحل PCR ثانویه ، دما و مدت زمان آنها	۷۴
جدول ۱۲-۲- مشخصات آنزیمهای به کار برده شده جهت RFLP	۷۵
جدول ۱۳-۲- غلظت مواد مورد نیاز برای آنزیم SSPI	۷۵
جدول ۱۴-۲- غلظت مواد مورد نیاز برای آنزیم DdeI	۷۶

جدول ۲-۱۵- غلظت مواد مورد نیاز برای آنزیم VSPI ۷۷

جدول ۳-۱- گروه سنی و تعداد نمونه های مثبت ۸۰

جدول ۳-۲- گاوهای سالم و اسهالی و تعداد نمونه های مثبت ۸۰

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- چرخه زندگی کریتوسپوریدیوم پارووم	۱۲
شکل ۲-۱- میکروگراف میکروسکوپ الکترونی اووسیستها	۱۳
شکل ۱-۲- دستگاه میکروسانتریفیوژ	۶۰
شکل ۲-۲- دستگاه میکرواسپین	۶۱
شکل ۳-۲- دستگاه نانودراپ ۱۰۰۰	۶۴
شکل ۴-۲- دستگاه ترموسایکلر	۶۸
شکل ۵-۲- دستگاه الکتروفورز محصولات PCR	۷۱
شکل ۶-۲- دستگاه ژل داگ	۷۲
شکل ۱-۳- اووسیست کریتوسپوریدیوم	۷۹
شکل ۲-۳- تصویر کمی سنجی DNA استخراج شده توسط نانودراپ	۸۱
شکل ۳-۳- الکتروفورز محصول PCR اولیه	۸۲
شکل ۴-۳- مارکر مورد استفاده در PCR اولیه	۸۳
شکل ۵-۳- تصویر کمی سنجی PCR اولیه توسط نانودراپ	۸۳
شکل ۶-۳- الکتروفورز محصول PCR ثانویه	۸۴
شکل ۷-۳- تصویر کمی سنجی PCR ثانویه توسط نانودراپ	۸۵
شکل ۸-۳- الگوی برش محصول PCR ثانویه با آنزیم SSPI	۸۷
شکل ۹-۳- الگوی برش محصول PCR ثانویه با آنزیم VSPI	۸۸
شکل ۱۰-۳- الگوی برش محصول PCR ثانویه با آنزیم DdeI	۸۹

چکیده

کریپتوسپوریدیوم انگل تک یاخته ای داخل سلولی و خارج سیتوپلاسمی شاخه آبی کمپلسکا می باشد. آلودگی با این انگل باعث ایجاد یک گاستروانتریت حاد و خود محدود شونده در افراد سالم (از نظر دستگاه ایمنی) و یک عفونت پایدار و کشنده در افراد با نقص دستگاه ایمنی در سراسر جهان می شود. به دلیل اهمیت و نقش عامل در ایجاد سندروم اسهال در انسان و گاو بالاخص در گروه های سنی پائین و تأثیر تنوع گونه های انگل در طراحی استراتژیهای کنترل بیماری لذا این تحقیق جهت تعیین نوع گونه های کریپتوسپوریدیوم در گاوهای شیری با استفاده از روش PCR-RFLP انجام گردید. در این بررسی در طی سالهای ۱۳۸۸-۱۳۹۰ تعداد ۸۰۰ نمونه مدفوع از گاوهای سالم واسهالی دامداری های شهرستان مشهد جمع آوری شده و با استفاده از روش رنگ آمیزی ذیل نیلسون سرد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی های میکروسکوپی نشان داد که از تعداد کل نمونه ها تعداد ۲۳ نمونه (۲/۸۷ درصد) آلوده به انگل هستند. در نهایت بر روی DNA استخراج شده از نمونه های مثبت آزمایش PCR-RFLP انجام گردید. با توجه به الگوی PCR-RFLP ژن 18s rRNA در اثر هضم آنزیمی با آنزیمهای برش دهنده SSPI و DdeI و VSPI، نتایج PCR-RFLP نشان داد که کلیه نمونه های مثبت مورد آزمایش، کریپتوسپوریدیوم آندرسونی بودند. می توان نتیجه گرفت که در شهرستان مشهد ژنوتیپ کریپتوسپوریدیوم آندرسونی گونه غالب بوده و سبب آلودگی در دامها می گردد. همچنین با بررسی نتایج بدست آمده تفاوت معنی داری بین گروه گاوهای اسهالی و سالم و گروه های سنی (کمتر از ۶ ماه، بین ۶-۱۸ ماه و بیشتر از ۱۸ ماه) وجود نداشت.

هدف از انجام تحقیق

با وجود آنکه کریپتوسپورییدیوم پارووم برای اولین بار در سال ۱۹۱۲ شناسایی شد، ولی نخستین رد پای بیماریزایی آن در سال ۱۹۷۱ در گوساله ای مبتلا به اسهال آشکار گردید. اینکه در خلال نزدیک به ۶ دهه این انگل از دیدگاه بیماریزایی در حیوانات چه وضعیتی داشته، بر کسی روشن نیست. آنچه از سال ۱۹۷۲ تا کنون مشخص شده آن است که این تک یاخته تقریباً در تمامی حیوانات اعم از پستاندار یا غیر آن، چه آنها که در خشکی زندگی می کنند یا آبی می باشند، میتواند چرخه زندگی خود را ادامه دهد و نیز آنکه در شرایطی حتی به تنهایی می تواند سبب اختلال در سلامتی میزبان حساس گردد که در این حالت در پستانداران، آسیب ساختار و عمل روده ها بویژه ایلئوم در نوزادان و نیز بالغین با سیستم ایمنی ناکارا را موجب می شود.

هرچند کریپتوسپورییدیوم و نیز رد پای بیماریزایی آن برای اولین بار در کشور آمریکا مورد توجه قرار گرفته ولی امروزه حضور این تک یاخته در تمامی کشورهای جهان به اثبات رسیده است و اهمیت مشترک بودن آن بین انسان و دام باعث شده که در دنیای پزشکی و دامپزشکی جایگاه خاصی را به خود اختصاص دهد.

کریپتوسپورییدیوم یکی از چهار پاتوژن مهم عامل اسهال در کودکان بوده که به عنوان یکی از مشکلات عمده بهداشتی مطرح است. در کشور ما اکثریت مطالعات انجام گرفته بر روی جنبه های اپیدمیولوژی انگل معطوف بوده و مطالعات محدودی در زمینه مولکولی انجام گرفته است. با توجه به اهمیت این انگل و مطالعات کمی که در ایران خصوصاً در خراسان رضوی - مشهد صورت گرفته، این مطالعه می تواند به عنوان روش آزمایشگاهی سریع و قابل اطمینان در آزمایشگاههای تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد.

فصل اول

کلیات

۱-۱- مقدمه

شاخه پروتوزوا در کنار دو شاخه جانوران و گیاهان شاخه ای مستقل است. تک یاخته ای ها در تمام نقاط سطح زمین یافت می شوند. آنها در دریاها، اقیانوسها و در تمام طبقات آب حتی در کف دریاها وجود دارند. همچنین در آبهای شیرین و در خاک نیز زندگی می کنند (۵۴، ۶۷).

کریپتوسپورییدیوم (Cryptosporidium) انگل تک یاخته ای داخل سلولی شاخه آبی کمپلسکا (Apicomplexa) می باشد. این انگل باعث ایجاد یک گاستروآنتریت حاد و خود محدود شونده در افراد سالم (از نظر دستگاه ایمنی) و یک عفونت پایدار و کشنده در افراد با نقص دستگاه ایمنی در سراسر جهان می شود. برآورد شده که سالانه میلیونها مورد از بیماری در کشورهای در حال توسعه و توسعه نیافته رخ می دهد. در تعداد زیادی از آزمایشگاهها این انگل یکی از شایعترین عوامل بیماریزای روده ای گزارش شده در انسان است (۵۴، ۶۶).

در دامها، عفونت باعث بیماری و گاهی اوقات مرگ و میر شده، لذا از نظر بالینی و اقتصادی دارای اهمیت است (۱۱، ۱۳، ۵۴).

کریپتوسپورییدیوز (Cryptosporidiosis) به عنوان تهدیدی برای بیماران مبتلا به ایدز و دیگر افراد مبتلا به نقص دستگاه ایمنی مطرح بوده و نسبت عفونت در سطح جهان کمتر از یک درصد تا بیشتر از ۵۰ درصد است (۱۱، ۸۲). سیمای اپیدمیولوژیک در افراد با دستگاه ایمنی کارا و افراد با نقص دستگاه ایمنی با هم متفاوت است (۴۱).

چنین پنداشته می شود که جنس کریپتوسپورییدیوم دارای گونه های مختلفی می باشد که در شمار زیادی از حیوانات اهلی و انسان یافت شده اند (۵۰). این تک یاخته با شیوع اسهال در گوساله ها، بره ها، بچه خوک ها، کره اسب ها، توله سگ و بچه گربه ها و جوجه بوقلمون ها همراه بوده است. این انگل از این دیدگاه شایان توجه است که برخلاف دیگر اعضاء خانواده های آیمری ئیده به درون سلولهای میزبان نمی رود و نسبت به میزبان اختصاصی نیست، به گونه ای که آلودگی متقاطع بین دامهای اهلی و حیوانات آزمایشگاهی و انسان رخ می دهد (۵۴).