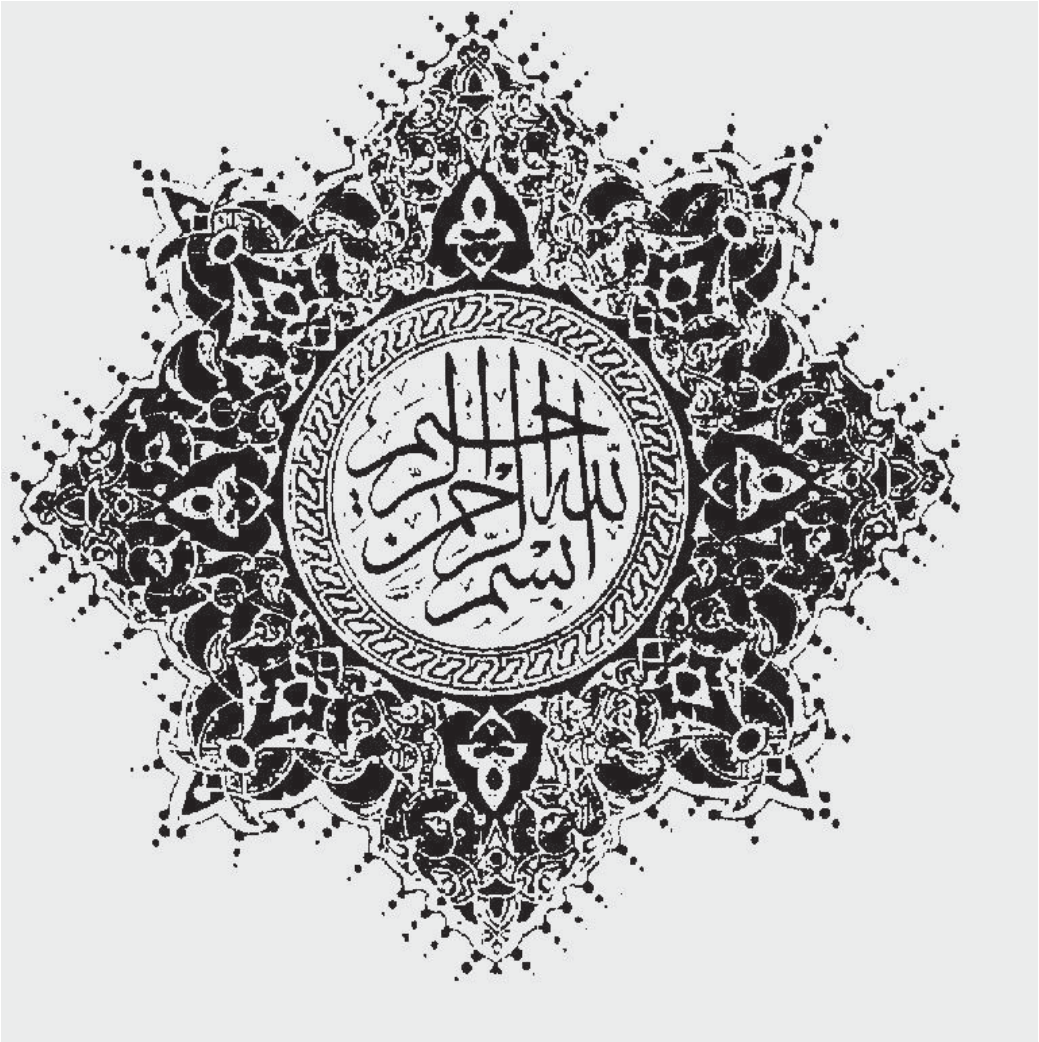
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته انگل شناسی پزشکی

عنوان

تعیین آلودگی و شناسایی مولکولی گونه های کریپتوسپوریدیوم جدا شده از رتهای وحشی مناطق مختلف تهران با استفاده از روش PCR-RFLP برای ژن 18s rRNA

نگارش

فارس بهرامی خودلان

استاد راهنما

دکتر جاوید صدرایی

استاد مشاور

دکتر مهدی فروزنده مقدم

دی ماه ۱۳۸۹

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای فارس بهرامی خودلان رشته:انگل شناسی گرایش: -- تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر جاوید صدرایی (استاد راهنما)

دکتر مهدی فروزنده مقدم (استاد مشاور)

دکتر فاطمه غفاری فر (استاد ناظر)

دکترفاطمه ملکی (استاد ناظر)

دکتر شهلا رودبار محمدی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده 1- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده 2- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده 3- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده 4- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده 5- این آیین‌نامه در 5 ماده و یک تبصره در تاریخ87/4/1 در شورای پژوهشی و در تاریخ 87/4/23 در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ 87/7/15 شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **فارس بهرامی خودلان** دانشجوی رشته **انگل شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **1387**مقطع **ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده 1 : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده 2 : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **انگل شناسی پزشکی** است که در سال **1389** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر جاوید صدرایی** ، مشاوره **دکتر مهدی فروزنده مقدم** از آن دفاع شده است.

ماده 3 : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده 4 : در صورت عدم رعایت ماده 3، 50% بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده 5 : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده 4 را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده 6 : اینجانب **فارس بهرامی خودلان** دانشجوی رشته **انگل شناسی پزشکی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی
فارس بهرامی خودلان
تاریخ و امضا

تقدیم به :

پدر و مادر

عزیزم

تشکر و قدردانی

سپاس و ستایش خدا را که زیبایی های آفرینش را بر ما نشان داد. و نور شناختش را به قلب ما تابانید و شکرش را بر وجودمان الهام فرمود و دروازه بی پایان دانش را، بر ما گشود و از ماندن در ورطه انکار و شک بازمان داشت.

انجام این تحقیق را مدیون زحمات و مساعدتهای بزرگواران بسیاری می دانم که بی تردید بدون یاری و همکاری آنها امکان به نتیجه رسیدن آن وجود نمی داشت در اینجا بر خود لازم میدانم که زحماتشان را ارج نهاده و از همه آنها تشکر و قدردانی نمایم.

نخست از زحمات، کمک ها و رهنمود های بی دریغ و صمیمانه جناب آقای دکتر جاوید صدرایی به عنوان استاد راهنما کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم که مشاوره این رساله را متقبل شدند صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم.

از اساتید گرانقدر گروه انگل شناسی، جناب آقای دکتر عبدالحسین دلیمی اصل که همواره از خزانه دانششان بهره بردم کمال تشکر و قدر دانی را دارم و همچنین از خانم دکتر فاطمه غفاری فر به خاطر همه آنچه که از ایشان آموختم تشکر و قدردانی می نمایم.

از دوست خوبم جناب آقای دکتر مجید پیرستانی به خاطر مساعدتهای علمی و همراهی همیشگیشان صمیمانه تشکر می کنم.

از همکلاسی هایم آقایان سجاد رشیدی و امیر عبدلی و خانم بهشتی و خانم ابراهیمی و کارشناس گروه انگل شناسی خانم قاسمی و تکنسین گروه آقای رجبعلیها تشکر می کنم.

چکیده

جنس کریپتوسپوریدیوم ترکیبی از انگلهای تک یاخته ای است که لبه میکروویلی های سلولهای پوششی مجرای گوارشی تمام رده های مهره داران را آلوده می سازد. این انگلها در سراسر جهان یافت می شوند. اثرات عفونت ناشی از این انگل در گونه های مختلف کریپتوسپوریدیوم متغیر می باشد. برخی از گونه های کریپتوسپوریدیوم بسیاری از گونه های میزبانی را آلوده ساخته درحالیکه تعدادی در گروه محدودی از قبیل جوندگان یا نشخوارکنندگان یافت شده و حتی گونه هایی هم شناخته شده که تنها یک گونه میزبانی را آلوده می کنند.

در این مطالعه به تعیین آلودگی و شناسایی مولکولی گونه های کریپتوسپوریدیوم در رتهای وحشی در سطح شهر تهران پرداخته شد ، که با صید تعداد 77 رت وحشی و انتقال به آزمایشگاه و آزمایش بر روی محتویات روده به دو روش میکروسکوپی و مولکولی موارد مثبت شناسایی شدند که تعداد موارد مثبت در روش میکروسکوپی که با استفاده ازتکنیک ذیل نلسون (رنگ آمیزی اسید فست) بود ،10 مورد (13 %) شناسایی شد و این در حالی است که در روش مولکولی که با استفاده از Nested PCR بود تعداد موارد مثبت 21 مورد (27 %) بود تمام موارد مثبت در روش فوق را جهت شناسایی گونه های آلوده کننده با روش RFLP مورد آزمایش قرار دادیم. از لحاظ الگوی RFLP تمامی نمونه ها کریپتوسپوریدیوم با گونه پاروووم شناسایی شدند، که جهت تایید مطالعه RFLP اقدام به تعیین توالی گردید که موارد مورد نظر از لحاظ گونه تایید شدند ، و در نتیجه آزمایش RFLP و تعیین توالی همان گونه کریپتوسپوریدیوم پاروووم را نشان داد.

نتایج بدست آمده حاصل از این مطالعه نشان می دهد ، که رتهای وحشی آلوده به گونه ای از کریپتوسپوریدیوم هستند که توانایی ایجاد آلودگی در انسان را داشته و این خود نشانی از اهمیت بهداشتی رتهای آزاد در سطح شهرهاست ، که احتمالا گونه کریپتوسپوریدیوم آلوده کننده انسان که بیشتر همان گونه پاروووم است می تواند از رتهای وحشی به انسان منتقل شود.

کلمات کلیدی: کریپتوسپوریدیوم، رت وحشی، Nested PCR ، 18S rRNA، PCR-RFLP ، تعیین توالی

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات و مروری بر مطالعات گذشته 1

1-1: مقدمه 2

2-1: تاریخچه 3

3-1: طبقه بندی 7

1-3-1: شرایط لازم برای شناسایی گونه 13

2-3-1: گونه های معتبر و بی اعتبار 16

4-1: اختصاصیت میزبان 21

5-1: چرخه زندگی 23

6-1: بیماری زایی 25

7-1: راههای انتقال بیماری در انسان 30

1-7-1: انتقال زئونوتیک 30

2-7-1: انتقال محیطی 30

3-7-1: انتقال غیر زئونوتیک 31

8-1: ایمونولوژی 31

1-8-1: ایمنی ذاتی 31

1-8-2: ایمنی اکتسابی.....32
1-9: ژنومیک.....33
1-9-1: بدنبال هم آوردن توالی های بیانی.....34
1-9-2: توالی های سنجش ژنومی.....34
1-9-3: توالی های ژنومی.....35
1-9-4: خصوصیات ژنوم.....36
1-9-5: فیلوژنتیک.....37
1-10: تشخیص.....40
1-10-1: تشخیص افتراقی.....40
1-10-2: تشخیص آزمایشگاهی.....40
1-10-2-1: رنگ آمیزی.....41
1-10-2-2: روش‌های بیوشیمیایی و روش‌های مولکولی بر پایه اسید نوکلئیک.....42
1-10-2-3: تفاوت‌های بیوشیمیایی.....43
1-10-2-4: تفاوت‌های ژنتیکی.....43
1-10-2-5: سرولوژی.....44
1-10-2-6: استفاده از روش‌های ایمونولوژی برای یافتن آنتی‌ژن‌های کریپتوسپوریدیوم.....44
1-10-2-7: تشخیص اووسیت در آبهای سطحی.....45
1-10-2-8: استفاده از رنگ‌های حیاتی برای بررسی عفونت‌زایی اووسیست.....46

1-11: پیشگیری، کنترل و درمان.....46
1-12: همه گیر شناسی.....47
1-13: مروری بر مطالعات گذشته.....48
فصل دوم: مواد و روش‌ها.....50
2-1: واکنش زنجیره ای پلیمراز.....51
2-2: کاربرد PCR.....54
2-3: اصول PCR.....55
2-4: پارامترهای مؤثر در PCR.....58
2-5: انواع و روش‌های تغییریافته PCR.....59
2-5-1: Nested-PCR 59
2-5-2: PCR-RFLP 59
2-5-3: Multiplex-PCR.....60
2-5-4: RT-PCR 60
2-5-5: Real-Time PCR 61
2-5-6: ARMS-PCR.....61
2-6: پرایمر 61
2-6-1: محاسبهٔ غلظت پرایمر.....62
2-6-2: دمای ذوب (Tm) برای پرایمر.....62

2-7: موادی مورد نیاز برای PCR 63
2-7-1: بافر PCR..... 63
2-7-2: غلظت منیزیم..... 64
2-7-3: دی اکسی نوکلئوزید تری فسفات ها (dNTP) 64
2-7-4: آنزیم های پلیمراز..... 65
2-7-4-1: DNA پلیمراز تگ (Taq) 65
2-7-4-2: غلظت آنزیم..... 65
2-7-4-3: اختصاصی بودن واکنش..... 66
2-8: ضد عفونی کردن وسایل، سطوح و دستگاههای مورد استفاده..... 66
2-9: تجهیزات لازم جهت انجام PCR..... 67
2-10: محلول ها و بافرها..... 67
2-10-1: محلول دی کرومات پتاسیم 5 درصد..... 67
2-10-2: مواد لازم برای رنگ آمیزی ذیل نلسون..... 67
2-10-3: بافر فسفات سالین (PBS) 67
2-10-4: مواد لازم برای آماده سازی نمونه..... 68
2-10-4-1: حذف کردن چربی مدفوع..... 68
2-10-4-2: تغلیظ نمونه..... 68
2-10-5: بافر الکتروفورز (TAE 10X) 68

2-10-6: اتیدیوم بروماید 12 درصد.....69
2-11: نمونه های مورد مطالعه و روش نمونه برداری.....69
2-12: روشهای بررسی نمونه از نظر وجود انگل.....69
2-12-1: رنگ آمیزی با روش ذیل نلسون.....69
2-12-2: استخراج DNA.....70
2-12-2-1: آماده سازی نمونه ها برای استخراج DNA.....71
2-12-2-2: تخلیص DNA با استفاده از کیت شرکتQIAGEN.....71
2-12-2-3: تخلیص DNA به روش دستی با استفاده از پروتئیناز K، SDS و CTAB.....74
2-12-2-4: ارزیابی کیفیت DNA.....76
2-12-2-5: شرایط نگهداری DNA.....77
2-12-3: PCR نمونه ها.....77
2-12-3-1: پرایمرها مورد استفاده برای ژن 18s RNA.....77
2-12-3-2: مراحل Nested PCR.....78
2-12-4: آشکارسازی و آنالیز محصولات PCR.....80
2-12-5: مرحله RFLP.....81
2-12-6: استخراج DNA از ژل جهت تعیین توالی.....82
فصل سوم: نتایج.....84
3-1: نتایج نمونه گیری.....85

2-3: نتایج بررسی میکروسکوپی نمونه ها.....86
3-3: نتایج استخراج DNA.....87
4-3: نتایج Nested-PCR.....88
5-3: مقایسه دو روش میکروسکوپی و Nested –PCR در تشخیص انگل کریپتوسپوریدیوم..... 92
6-3: نتایج هضم آنزیمی و PCR-RFLP برای ژن 18s rRNA 93
7-3: نتایج تعیین توالی.....95
8-3: آنالیز فیلوژنتیک.....101
فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها.....103
1-4: بحث و نتیجه گیری.....104
2-4: پیشنهادها.....119
فهرست منابع 120
چکیده انگلیسی.....136

فهرست جداول

جدول1 -1: طبقه بندی کریپتوسپوریدیوم.....10

جدول1-2: ایزوله های انسانی و حیوانی کریپتوسپوریدیوم پاروووم.....12

جدول1-3: ژنوتیپ های کریپتوسپوریدیوم.....16

جدول 1-4: اسامی معتبر گونه های کریپتوسپوریدیوم، نوع میزبان و اندازه اووسیست.....17

جدول1-5: اسامی نامعتبر گونه های کریپتوسپوریدیوم.....19

جدول 1-6: گونه های اصلی و فرعی کریپتوسپوریدیوم که انسان و حیوانات اهلی را آلوده می سازد.....20

جدول 1-7: انتشار جغرافیایی کریپتوسپوریدیوزیس انسانی گزارش شده.....23

جدول 1-8: کریپتوسپوریدیوم پاروووم یک انگل بسیار عفونتزا.....29

جدول 1-9: مقایسه تفسیر ژنومی کریپتوسپوریدیوم.....35

جدول 1-10: راههای انتقال کریپتوسپوریدیوم.....47

جدول 2-1: مراحل مختلف رنگ آمیزی ذیل نلسون و زمان بهینه آن.....70

جدول 2-2: مقادیر مورد نیاز برای PCR اولیه.....78

جدول 2-3: مقادیر مورد نیاز برای PCR ثانویه.....79

جدول 2-4 : مشخصات آنزیمVspI (AseI).....81

جدول 2-5 : مشخصات آنزیمSspI.....81

جدول 2-6: مراحل آماده سازی master mixture برای یک واکنش RFLP.....81

جدول3-1: نتایج مربوط به جمع آوری نمونه ها.....85

جدول 3-2: نتیجه بررسی میکروسکوپی با رنگ آمیزی اسید فست.....86

جدول 3-3: نتیجه بررسی مولکولی با روش Nested-PCR.....91

جدول 3-4: الگوی برش محصول Nested-PCR با دو آنزیم Vsp I و Ssp I.....93

جدول3-5: نتایج آنالیز توالی ایزوله شماره 22/1 از مرکز تهران در NCBI.....98

جدول3-6: نتایج آنالیز توالی ایزوله شماره 8/3 از شرق تهران در NCBI.....99

جدول 3-7: مقایسه میزان تشابه ایزوله های شماره 22/1 و 8/3 با ایزوله های استاندارد.....100

فهرست نمودارها

نمودار1-1: فیلوژنی پیشنهاد شده در مورد کریپتوسپوریدیوم پاروم.....11

نمودار 3-1: نتیجه آزمایش میکروسکوپی به تفکیک مناطق..... 87

نمودار 3-2: نتایج آزمایش Nested –PCR به تفکیک مناطق..... 91

نمودار3-3: مقایسه دو روش میکروسکوپی و Nested-PCR در تشخیص انگل کریپتوسپوریدیوم در رتهای وحشی به تفکیک مناطق مختلف تهران..... 92

نمودار3-4: مقایسه میزان شیوع آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم در رتهای وحشی تهران با استفاده از دو روش میکروسکوپی و Nested –PCR 92

نمودار 3-5: نتایج آنالیز فیلوژنتیک نمونه های مربوط به مرکز و شرق تهران.....101

فهرست تصاویر

تصویر 1-1: چرخه زندگی کریپتوسپوریدیوم پاروم..... 25

تصویر 1-2: مکانیسم بیماریزایی کریپتوسپوریدیوم در روده..... 26

تصویر 1-3: سازماندهی های محدوده ای از یک مجموعه ارائه دهنده پروتئین های سطحی کریپتوسپوریدیوم پاروم..... 38

تصویر2-1: اولین چرخه ازدیاد DNA بوسیله PCR مراحل سه گانهٔ آن..... 52

تصویر 2- 1: توسعه پرایمر بوسیله DNA پلیمراز..... 56

تصویر 2- 3: سیکل های حرارتی در PCR..... 56

تصویر 2- 4: توانایی تکثیر و افزایش تعداد کپی های محصول در PCR..... 57

تصویر 2- 5: پروفایل سیکل حرارتی سه مرحله ای..... 57

تصویر2-6: موادی که دریک میکروتیوپ PCR وجود دارد..... 63

تصویر 2-7: مراحل تخلیص DNA با استفاده از کیت شرکتQIAGEN 74

تصویر 3-1 : اووسیست های کریپتوسپوریدیوم مشاهده شده در محتویات روده رتهای صید شده در تهران..... 86

تصویر 3-2: نتایج آزمایش Nested-PCR نمونه های مثبت و منفی روی ژل آگارز..... 89

تصویر3-3: نمونه های مثبت مربوط به مناطق مختلف تهران روی ژل آگارز 1 %..... 90

تصویر 3-4 : محصولات RFLP حاصل از نمونه مثبت مربوط به منطقه مرکز تهران با استفاده از دو آنزیم Vsp I و Ssp I..... 94

تصویر 3-5 : محصولات RFLP حاصل از نمونه های مثبت مربوط به مناطق غرب ، شرق ، شمال و جنوب تهران با استفاده از دو آنزیم Vsp I و Ssp I 94

تصویر 3-6: توالی نوکلئوتیدی قطعه bp 824 محصول Nested-PCR ایزوله شماره 22/1 مربوط به مرکز تهران 95

تصویر 3-7: توالی نوکلئوتیدی قطعه bp 823 محصول Nested-PCR ایزوله شماره 8/3 مربوط به شرق تهران 96

تصویر 3-8: مقایسه توالی نوکلئوتیدی قطعه bp 824 محصول Nested-PCR در دو گونه شناسایی شده مربوط به مرکز و شرق تهران 97

فصل اول

مقدمه و مروری بر

مطالعات گذشته