بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه شهید چمران اهواز
دانشکده دامپزشکی

پایان‌نامه دکترای دامپزشکی

عنوان:

مطالعه‌ی مولکولی و سرمی آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در کبوتران اهواز

اساتید راهنما:

دکتر سمیه بهرامی
دکتر زهرا برومند

استاد مشاور:

دکتر علیرضا البرزی

نگارش:

سیده بشری موسوی

بهمن ماه ۱۳۹۳

بسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

(نتیجه ارزشیابی پایان‌نامه‌ی دکتری حرفه‌ای)

پایان‌نامه‌ی خانم: **سیده بشری موسوی** دانشجوی رشته: **دامپزشکی** از دانشکده دامپزشکی به شماره دانشجویی: **۸۷۷۹٤۲** تحت عنوان: **مطالعه‌ی مولکولی و سرمی آلودگی به نئوسپورا کانینوم در کبوتران اهواز** ، جهت اخذ مدرک: **دکترای دامپزشکی** درتاریخ: ۱۳۹۳/۱۱/۲٦ توسط هیأت محترم داوران مورد ارزشیابی قرارگرفت و با درجه: **ممتاز** به تصویب رسید.

	اعضای هیأت داوران	**مرتبه‌علمی**	**سمت**	**امضا**
	دکتر سمیه بهرامی	استادیار	استاد راهنما اول	
	دکتر زهرا برومند	استادیار	استاد راهنما دوم	
	دکتر علیرضا البرزی	استادیار	استاد مشاور	
	دکتر عباس جلودار	دانشیار	استاد داور	
	دکتر حسین حمیدی نجات	دانشیار	استاد داور	
	دکتر محمد خسروی	استادیار	استاد ناظر	
۲	دکتر حسین حمیدی نجات	دانشیار	مدیر گروه	
۳	دکتر محمدحسین راضی جلالی	دانشیار	معاون پژوهشی دانشکده	
٤	دکتر عبدالرحمن راسخ	استاد	مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه	

گواهی صحت و اصالت

عنوان پایان‌نامه: **مطالعه‌ی مولکولی و سرمی آلودگی به نئوسپورا کانینوم در کبوتران اهواز**

اینجانب **سیده بشری موسوی** دانشجوی **دکترای دامپزشکی** دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران به شماره دانشجویی **۸۷۷۹٤۲** تحت راهنمایی **دکتر سمیه بهرامی و دکتر زهرا برومند** و مشاور **دکتر علیرضا البرزی** گواهی می‌دهم که:

۱- تحقیقات ارائه شده در این پایان‌نامه حاصل مطالعات علمی و عملی شخص اینجانب بوده و صحت و اصالت تمام مطالب مندرج در آن را تأیید می‌کنم.

۲- در صورت استفاده از آثار دیگران، مشخصات کامل آن‌ها را در منابع ذکر نموده‌ام.

۳- تاکنون مطالب درج شده در این پایان‌نامه، توسط اینجانب یا شخص دیگری به‌منظور اخذ هر نوع مدرک یا امتیازی به هیچ مرجعی تسلیم نشده و بعد از این نیز نخواهد شد.

٤- در تدوین متن پایان نامه، شیوه‌نامه مصوب دانشکده را رعایت نموده‌ام.

۵- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و مقالات مستخرج از آن، ذیل نام دانشگاه شهید چمران اهواز (Shahid Chamran University of Ahvaz) به چاپ خواهد رسید.

٦- حقوق معنوی تمامی افرادی که در این پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند (اساتید راهنما و مشاور) در مقالات مستخرج از آن رعایت خواهد شد.

۷- در صورت استفاده از موجودات زنده یا بافت‌های آن‌ها، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مندرج در منشور موازین و اصول اخلاق پژوهش وزارت علوم، تحقیقات و فناوری رعایت شده است.

در صورت اثبات تخلف از مندرجات فوق، مسئولیت هرگونه پاسخگویی به اشخاص حقیقی و حقوقی و مراجع ذیصلاح بر عهده اینجانب بوده و دانشگاه شهید چمران هیچ مسئولیتی بر عهده نخواهد داشت. همچنین در صورت تضییع حقوق و منافع دانشگاه، حق پیگیری موضوع در مراجع ذیصلاح و اعمال قوانین مربوطه برای دانشگاه شهید چمران در حال و آینده محفوظ بوده و اینجانب مسئول پرداخت کلیه خسارات وارده خواهم بود.

سیده بشری موسوی

۹۳/۱۱/۲٦

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه‌ی حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل‌واگذاری به غیر نیست. استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

این پایان نامه را در کمال افتخار تقدیم می نمایم به:

مادرم:

که مقدس ترین واژه در لغت نامه ی دلم، مادر مهربانم که زندگیم را مدیون مهر و عطوفت او می دانم.

برادرم و خواهرانم:

که همواره در طول تحصیل متحمل زحماتم بوده اند و تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات، و وجودشان مایه دلگرمی من می باشد.

سپاس بی پایان خود را تقدیم می دارم به:

استادان گران قدر **سرکار خانم دکتر بهرامی و سرکار خانم دکتر برومند** که در کنار ایشان علم، صبر و صداقت را آموختم. اساتید

بزرگواری که کسب علم و شاگردی در کنارشان باعث افتخار من بوده و خواهد بود.

از استاد مشاور گرانقدرم **جناب آقای دکتر البرزی** که از همکاری و مشورت های گهربار ایشان بهره جستم بی نهایت سپاسگزارم.

همچنین از اساتید بزرگوارم **جناب آقای دکتر حمیدی نجات و جناب آقای دکتر جلودار** که صمیمانه همکاری نموده و داوری این

پایان نامه را بر عهده گرفتند قدردانی می نمایم.

از استاد ارجمند **جناب آقای دکتر خسروی** به خاطر نظارت بر حسن اجرای این جلسه دفاع بسیار سپاس گزارم.

از خداوند مهربان توفیق و تندرستی را برای ایشان و خانواده محترمشان آرزومندم.

فهرست

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده..... ۱

فصل اول: مقدمه و هدف..... ۳

فصل دوم: مروری بر منابع..... ۷

الف- تاریخچه..... ۹

ب- طبقه‌بندی..... ۱۱

ج- سیر تکاملی و ساختار انگل..... ۱۲

د- انتقال..... ۱٤

د-۱- انتقال عمودی..... ۱۵

د-۲- انتقال افقی..... ۱٦

د-۳- انتقال از راه شیر..... ۱۷

د-٤- انتقال از راه جفت‌گیری..... ۱۷

هـ-بیماریزایی..... ۱۸

و- نشانه‌های بالینی..... ۲۰

و-۱- سگ..... ۲۰

و-۲- گاو..... ۲۱

و-۳- گوسفند..... ۲٤

و-٤- بز..... ۲۵

و-۵- اسب ۲۵
و-٦- گاومیش ۲٦
و-۷- گربه ۲٦
و-۸- حیات وحش ۲۷
و-۹- انسان ۲۸
ز- یافته‌های کالبدگشایی ۲۸
ح- خسارات اقتصادی نئوسپوروزیس در گاو ۲۹
ط- مطالعات همه‌گیرشناسی صورت گرفته در ایران ۳۱
ی- عوامل مستعدکننده ۳۲
ی-۱- حضور سگ‌ها ۳۳
ی-۲- سایر میزبانان گوشتخوار ۳٤
ی-۳- میزبان‌های واسط به غیر از گاو ۳٤
ی-٤- تغذیه گوساله‌ها با آغوز یا شیر ۳۵
ی-۵- سرکوب ایمنی ۳۵
ی-٦- فصل و نژاد ۳٦
ی-۷- سن ۳٦
ی-۸- تراکم گله و ابعاد مزرعه ۳۷
ی-۹- چراگاه، علوفه و آب ۳۷
ی-۱۰- آب و هوا ۳۸

ی-۱۱- تراکم جمعیت انسانی ۳۸
ی-۱۲- پرورش ۳۸
ک- کنترل و پیشگیری ۳۸
ل- تشخیص ٤۳
ل-۱- روش‌های سرولوژیک ٤۳
ل-۲- روش‌های تشخیص بافتی ٤٤
ل-۲-۱- هیستوپاتولوژی ٤٤
ل-۲-۲- هیستوشیمی ٤٤
ل-۲-۳- ایمونوهیستوشیمی ٤٥
ل-۳- تکنیک‌های مولکولی ٤٦
ل-٤-استفاده از حیوانات آزمایشگاهی ٤۷
ل-٥- روش کشت سلول ٤۸
م- درمان ٤۹
فصل سوم: مواد و روش کار ٥۰
الف-وسایل و مواد مورد استفاده ٥۲
الف-۱-وسایل مورد استفاده ٥۲
الف-۲- مواد مورد استفاده ٥۳
ب- روش کار ٥٥
ب-۱- تهیه‌ی کبوتر ٥٥
ب-۲-۱- آگلوتیناسیون اصلاح شده ٥٥

ب-۲-۲- تزریق آنتی‌ژن به خرگوش و تهیه‌ی آنتی‌بادی اولیه ۵۶
ب-۳- مطالعه مولکولی..... ۵۶
ب-۳-۱- استخراج DNA..... ۵۶
ب-۳-۲-PCR ۵۸
ب-۳-۳- روش تهیه ی ژل آگارز ۱/۵ درصد و الکتروفورز محصول PCR..... ۶۰
فصل چهارم: نتایج..... ۶۳
الف- نتایج مرتبط با آگلوتیناسیون اصطلاح شده..... ۶۵
ب- نتایج مطالعه مولکولی ۶۵
ج- مقایسه نتایج بدست آمده از آگلوتیناسیون اصلاح شده و مولکولی..... ۶۶
فصل پنجم:بحث ونتیجه گیری..... ۷۱
پیشنهادات..... ۷۷
منابع..... ۸۰
چکیده انگلیسی ۹۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۳-۱- مواد به‌کار رفته برای انجام PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر.....۵۹

جدول۳-۲- برنامه حرارتی به‌کار رفته در این مطالعه برای انجام PCR.....٦۰

جدول ٤-۱-نتایج مطالعه‌ی سرولوژی و مولکولی آلودگی نئوسپورا کانینوم در کبوتران.....٦۷

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

تصویر ۳-۱- محل اتصال پرایمرهای جلویی و معکوس..... ۵۹

تصویر ٤-۱- محصول PCR بارگذاری شده در ژل آگارز ۶۶

چکیده

نام خانوادگی: موسوی	**نام**: سیده بشری	**شماره دانشجویی**: ۸۷۷۹۴۲
عنوان پایان‌نامه: مطالعه‌ی مولکولی و سرمی آلودگی به *نئوسپورا کانینوم* در کبوتران اهواز		
اساتید راهنما: دکتر سمیه بهرامی، دکتر زهرا برومند		**استاد**: دکتر علیرضا البرزی
درجه تحصیلی: دکتری	**رشته**: دامپزشکی	**گرایش**: دامپزشکی
دانشگاه شهید چمران	**دانشکده**: دامپزشکی	**گروه**: پاتوبیولوژی
تاریخ دانش‌آموختگی: بهمن ماه ۱۳۹۳		**تعداد صفحات: ۹۰**

کلمات کلیدی: *نئوسپورا کنینوم*، کبوتر، تست آگلوتیناسیون، PCR

نئوسپورا کانینوم تک‌یاخته انگلی است که گسترش جهانی دارد و بعنوان عامل اصلی سقط گاوها در جهان به حساب می‌آید. دلایلی مبنی بر وجود پرندگان در گاوداری‌ها و افزایش شیوع سرمی آلودگی به انگل و افزایش سقط ناشی از آن در گاوها وجود دارد. اگرچه نشان داده شده است که وجود پرنده‌ها در گاوداری با افزایش میزان آلودگی به این انگل همراه می-باشد اما یافته‌های اندکی در مورد نقش پرنده‌ها در چرخه زندگی این انگل وجود دارد. هدف از این مطالعه، دانستن فراوانی آلودگی به این انگل با استفاده از روش‌های سرولوژی و مولکولی در میان کبوترها بوده است. در این مطالعه از ۱۰۲ پرنده نمونه خونی گرفته و سپس سرم آن‌ها جداسازی گردید. از بافت مغز نیز برای استخراج DNA استفاده شد. با توجه به روش‌هایی که در گذشته برای ردیابی توکسوپلاسما استفاده شده بود تست آگلوتیناسیون برای ردیابی نئوسپورا کانینوم انجام گرفت. جهت بررسی مولکولی، DNA مغز کبوترها با استفاده از کیت استخراج DNA جداسازی گردید و برای ردیابی نئوسپورا کانینوم، پرایمر بر اساس ژن NC5 انتخاب شد و PCR انجام گرفت. از ۱۰۲ نمونه، ۳۱ نمونه (۳۰/۳۹ درصد) در روش آگلوتیناسیون در غلظت‌های $\frac{1}{2}$ تا $\frac{1}{128}$ آلودگی را نشان دادند. در روش PCR نیز DNA نئوسپورا در ۱۰ نمونه از ۱۰۲ نمونه (۹/۸درصد) ردیابی گردید. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که با توجه به تغذیه کبوتر از روی زمین، خاک به انگل نئوسپورا کانینوم آلوده بوده است. ممکن است که گوشت کبوتران منبع آلودگی سگ‌ها به این انگل - باشد. یافته‌های این مطالعه می‌تواند نقش کبوترها را در اپیدمیولوژی انگل نشان دهد. اگرچه ردیابی یا جداسازی انگل در بافت‌ها برای اثبات میزبان واسط بودن کبوتر برای انگل نئوسپورا کانینوم ضروری است.

فصل اول

«مقدمه و هدف»

فصل اول: مقدمه و هدف

نئوسپورا کانینوم تک‌یاخته‌ای از شاخه آپی‌کمپلکسا است که به عنوان عامل مهمی در سقط جنین گاو به خصوص گاوهای شیری اهمیت جهانی یافته است. آنچه به این بیماری اهمیت جهانی داده، انتشار وسیع و خسارات اقتصادی فراوان ناشی از این انگل می‌باشد. این تک‌یاخته - انگلی داخل سلولی اجباری و بسیار شبیه به *توکسوپلاسما گوندای* می‌باشد.

این انگل دارای سه مرحله به نام‌های تاکی‌زوئیت، برادی‌زوئیت و اُاُسیست در چرخه‌ی زندگی خود می‌باشد. اُاُسیست‌های انگل همراه با مدفوع میزبان نهایی در محیط قرار می‌گیرند و در شرایط مناسب در عرض ۳۰ روز هاگ‌دار می‌شوند و می‌تواند طیف وسیعی از گونه‌های مختلف حیوانات را آلوده نماید. سگ و کایوت میزبانان نهایی و طیف وسیعی از پستانداران میزبانان واسط انگل می‌باشند. گاو و طیف وسیعی از حیوانات خونگرم از جمله سگ، گوسفند، بز، اسب و آهو میزبانان واسط این انگل می‌باشند اما با توجه به مطالعات سرم‌شناسی گاومیش، روباه، شتر، کرگدن، کایوت هم می‌توانند به‌عنوان میزبانان واسط مطرح باشند اما آلودگی طبیعی به طور متداول در سگ و گاو دیده می‌شود (Dubey و همکاران۱۹۹۷).

انتقال بیماری در گاو در حیوان آبستن از طریق جفت به جنین صورت می‌گیرد و انتقال بیماری در آبستنی‌های بعدی نیز تکرار می‌گردد. سقط جنین از نشانه‌های اصلی نئوسپوروزیس در گاو می‌باشد که هم در گاوهای شیری و هم در گاوهای گوشتی به صورت اپیدمیک یا اندمیک رخ می‌دهد.

در حال حاضر واکسن و یا درمان مناسبی برای پیشگیری از سقط‌های ناشی از *نئوسپورا* و یا انتقال عمودی انگل در گاو وجود ندارد. در مطالعات اپیدمیولوژیک و مشاهدات در سطح گله‌ها، شواهد زیادی مبنی بر آلودگی افقی گاوها به‌دست آمده است. مشاهدات مهم در این زمینه عبارتند از بروز ناگهانی سقط‌های وابسته به *نئوسپورا کانینوم* که برخورد با یک منبع مهم آلودگی را تأیید می‌کند (Dubey و همکاران، ۲۰۰۶). سقط جنین ممکن است بصورت انفرادی یا همه‌گیر در طول سال رخ دهد. بنابراین جلوگیری از انتقال افقی انگل از طریق کاهش تماس گوشتخواران با میزبانان واسط می‌تواند راهکاری موثر در پیشگیری از شیوع نئوسپوروزیس باشد.

در مطالعات مختلف، کنار بسیاری از ریسک فاکتورهای مربوط به آلودگی گاو به *نئوسپورا* به حضور همزمان سگ و پرندگان در فارم اشاره شده است. بطوریکه نتایج مطالعه‌ی Bartels و همکاران (۱۹۹۹) نشان داده است که حضور پرندگان در گاوداری‌ها احتمال ایجاد سقط‌های طوفانی ناشی از *نئوسپورا* را افزایش می‌دهد. Otranto و همکاران (۲۰۰۳) نیز در مطالعه‌ای که در شمال و جنوب ایتالیا انجام دادند بین گاوان آلوده به *نئوسپورا* و تعداد سگ در فارم، اندازه فارم و حضور پرندگان در آن ارتباط معنی‌داری یافتند.

از طرفی اطلاعات شیوع وابسته به سن، نشان داده است که اغلب سگ‌ها پس از تولد آلوده به انگل *نئوسپورا* می‌شوند و هر چه سن سگ افزایش می‌یابد شیوع آلودگی به انگل نیز در آن‌ها افزایش می‌یابد (Dubey و همکاران، ۲۰۰۷). بافت هر حیوانی که دارای کیست انگل *نئوسپورا* باشد می‌تواند به عنوان مخزن آلودگی برای سگ مطرح باشد. کیست‌های انگل بیشتر در مغز، نخاع و قلب یافت می‌شوند. تاکی‌زوئیت‌های موجود در جفت و کیست‌های موجود در بافت‌های میزبانان واسط منبع مهم آلودگی برای سگ‌ها هستند (Dubey و همکاران، ۲۰۰۶).

بنابراین می‌توان گفت که پرندگان نیز می‌توانند در صورت آلوده بودن به انگل مذکور در این رابطه نقش داشته باشند و به منزله‌ی شکاری آلوده به انگل برای گوشتخوار محسوب گردند. همچنین آلودگی پرنده به انگل می‌تواند شاخصی از آلودگی محیط باشد. با توجه به موارد فوق هدف از مطالعه حاضر بررسی آلودگی کبوتران بومی منطقه به *نئوسپورا کانینوم* به دو روش سرولوژی و مولکولی بوده است.

سیده بشری موسوی

بهمن ۱۳۹۳، اهواز

فصل دوم

«مروری بر منابع»

فصل دوم: مروری بر منابع

الف- تاریخچه

تاریخچه‌ی *نئوسپورا کانینوم* به میزان زیادی با تاریخچه‌ی *توکسوپلاسما گوندای* که یکی از عوامل مهم ایجاد کننده‌ی سقط جنین و بیماری عصبی- عضلانی در انسان و حیوانات است، آمیخته می‌باشد.

نئوسپورا کانینوم تک‌یاخته‌ای داخل سلولی اجباری و بسیار شبیه به *توکسوپلاسما گوندای* می‌باشد. در ابتدا Bjerkas و همکاران (۱۹۸٤)، در سگ‌های نروژی دارای علائم عصبی مانند آنسفالیت و فلجی اندام‌های حرکتی انگلی شبیه به *توکسوپلاسما گوندای* گزارش کردند (Bjerkas و همکاران، ۱۹۸٤).

Dubey و همکاران (۱۹۸۸)، در یک مطالعه‌ی گذشته‌نگر مقاطع آسیب‌شناسی، نشانه‌های بالینی و اطلاعات آزمایشگاهی ثبت شده از ۲۳ سگ نروژی که در آن‌ها یک بیماری مانند توکسوپلاسموزیس تشخیص داده شده بود را مورد بررسی و با میکروسکوپ نوری و الکترونی

مورد مطالعه قرار دادند. در ۱۳ مورد عامل بیماری *توکسوپلاسما گوندای* تشخیص داده شد، اما در ۱۰ مورد دیگر از سگ‌ها یک جنس جدید به نام *نئوسپورا* و گونه‌ای به نام *نئوسپورا کانینوم* که از نظر ساختمانی و آنتی‌ژنی متفاوت از *توکسوپلاسما گوندای* بود، تشخیص داده شد. این انگل به این خاطر *نئوسپورا* نام گرفت که از لحاظ سیر تکاملی و ریخت‌شناسی مشابه با سایر اعضای دسته اسپوروزوآ[1] بود و چون برای اولین بار تشخیص داده می‌شد انگل هاگ‌دار جدید یا *نئوسپورا* نام گرفت (Dubey، ۲۰۰۳؛ Dubey و همکارن، ۱۹۸۸).

تا مدت‌ها سیر تکاملی این انگل کاملاً روشن نبود و میزبان نهایی آن شناسایی نشده بود و تنها حدس زده می‌شد که به دلیل شباهت‌هایی که با خانواده سارکوسیستیده[2] دارد باید میزبان نهایی آن یک گوشتخوار باشد. محققین تعداد زیادی از حیوانات و پرندگان را با مرحله‌ی کیستی انگل به طور تجربی آلوده کردند، اما نتوانستند اُاُسیست‌های[3] انگل را به‌دست بیاورند و همچنان میزبان نهایی ناشناخته بود تا این‌که در یک بررسی اُاُسیست‌های انگل از دو قلاده سگ که به طور طبیعی آلوده شده بودند، جدا شد و سگ به‌عنوان میزبان نهایی انگل معرفی گردید. مدتی بعد نیز اُاُسیست‌های این انگل را از مدفوع چند قلاده کایوت جدا کردند و کایوت نیز به‌عنوان میزبان نهایی انگل مطرح گردید (Dubey و همکاران، ۱۹۹۲؛ Haddad و همکاران، ۲۰۰۵).

در مطالعات اخیر، کایوت یا سگ‌گرگ، گرگ خاکستری[4]، و دینگوی استرالیایی[5] نیز به‌عنوان میزبانان اصلی مطرح می‌باشند (Dubey و همکاران، ۲۰۱۱؛ Gondim و همکاران، ۲۰۰٤).

[1]. Sporozoa
[2]. Sarcocystidae
[3]. Oocysts
[4]. Gray wolf
[5]. *Canis lupus* dingo