

صلى الله عليه وسلم



دانشگاه شهید چمران اهواز  
دانشکده دامپزشکی

۹۲۹۱۲۶۱

پایان نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی دامپزشکی

عنوان:

ارزیابی آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس (LAT) و  
هماگلوتیناسیون غیر مستقیم جهت تشخیص دیکروسلیوز  
گوسفند

استاد راهنما:

دکتر محمدحسین راضی جلالی

استاد مشاور:

دکتر مسعود قربانپور

نگارش:

فروزان جهانگیری نصر

شهریور ۹۲

## بسمه تعالی

### دانشگاه شهید چمران اهواز

#### دانشکده دامپزشکی

#### (نتیجه ارزشیابی پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد)

پایان‌نامه‌ی خانم فروزان جهانگیری نصر دانشجوی رشته: انگل شناسی گرایش: دامپزشکی دانشکده دامپزشکی به شماره دانشجویی: ۹۰۹۱۲۰۲ تحت عنوان: ارزیابی آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس (LAT) و هماگلوتیناسیون غیر مستقیم جهت تشخیص دیکروسلیوز گوسفند جهت اخذ مدرک: کارشناسی ارشد در تاریخ: ۱۳۹۲/۶/۲۷ توسط هیأت محترم داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و با درجه: بسیار خوب به تصویب رسید.

۱	اعضای هیأت داوران	مرتبه علمی	سمت	امضا
	دکتر محمد حسین راضی جلالی	دانشیار	استاد راهنمای اول	
	دکتر مسعود قربانپور	استاد	استاد مشاور	
	دکتر حسین حمیدی نجات	دانشیار	استاد داور	
	دکتر مسعود رضاصیفی آبادشاپوری	استاد	استاد داور	
۲	دکتر آناهیتا رضایی	استادیار	استاد ناظر	
۳	دکتر داریوش غریبی	استادیار	مدیر گروه	
۴	دکتر بابک محمدیان	دانشیار	معاون پژوهشی دانشکده	
۵	دکتر مسعود قربانپور	استاد	مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه	

## گواهی صحت و اصالت

عنوان پایان‌نامه: ارزیابی آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس (LAT) و هماگلوتیناسیون غیر مستقیم جهت تشخیص دیکروسلیوز گوسفند اینجانب فروزان جهانگیری نصر دانشجوی کارشناسی ارشد رشته‌ی انگل‌شناسی دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران به شماره دانشجویی ۹۰۹۱۲۰۲ تحت راهنمایی دکتر محمد حسین راضی جلالی و مشاوره دکتر مسعود قربانپور، 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 تایید 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 به منظور اخذ هر نوع مدرک یا امتیازی به هیچ مرجعی تسلیم نشده و بعد از این نیز نخواهد شد.
  - ۴- در تدوین متن پایان‌نامه، 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.
  - ۶- حقوق معنوی تمامی افرادی که در این پایان‌نامه تاثیرگذار 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 هر گونه 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.

تاریخ ۱۳۹۲/۶/۲۷

فروزان جهانگیری نصر

### مالکیت نتایج و حق نشر

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

تقدیم به مادر عزیزتر از جانم:

مادم آن که آفتاب مهرش در آستنی قلم، همچنان پیر جاست و مرکز غروب نخواهد کرد.

تقدیم بابوسه بردستان پدرم:

به او که نمی دانم از بزرگی اش بگویم یا مردانگی، سخاوت، سکوت، مهربانی و....

پدرم راه تمام زندگیست پدرم دهنوشی همشگیت

تقدیم به:

فرزند دلبندم، امید بخش جانم که آسایش او آرامش من است.

باشکر:

از استاد صبور و باتقوا جناب آقای دکتر محمد حسین راضی جلالی که با نکته های دلاویز و گفته های بلند صحیفه های سخن را علم

پرور نمود و همواره راهبنا و راه کشای اینجانب در تمام و اکل پایان نامه بوده است.

باشکر:

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر مسعود قربانپور که با سهی صدر و صبوری مرار اینجانبی نمود و با ارائه ی نظرات سازنده

در، نمودهای بی دریغ شان در پیشبرد این پایان نامه سعی تمام مبذول داشتند.

عنوان	فهرست مطالب	صفحه
فهرست مطالب	.....	أ
فهرست جداول	.....	ز
فهرست تصاویر	.....	ح
چکیده فارسی	.....	۱
فصل اول : مقدمه و هدف	.....	۳
فصل دوم : مروری بر منابع	.....	۸
الف - طبقه بندی انگل	.....	۹
ب- محل ، میزبان و شکل ظاهری انگل	.....	۱۰
ج- سیر تکاملی انگل	.....	۱۱
د- وضعیت آلودگی حیوانات در ایران و دنیا	.....	۱۵
هـ - وضعیت آلودگی انسان در ایران و دنیا	.....	۱۶
و- اهمیت اقتصادی	.....	۱۷
ز- همه گیر شناسی و عوامل موثر بر دیگروسلیازیس	.....	۱۸
ز- ۱- عوامل محیطی	.....	۱۹

عنوان	فهرست مطالب	صفحه
ز-۲- میزان های واسط	.....	۱۹
ز-۳- میزان نهایی	.....	۲۱
ح- آسیب شناسی	.....	۲۲
ط- ایمنی شناسی	.....	۲۴
ی - روش های تشخیص دیکروسلیازیس	.....	۲۵
ی-۱- آزمایش مدفوع	.....	۲۵
ی-۲- کالبد گشایی	.....	۲۶
ی-۳- سرولوژی	.....	۲۷
ی-۳-۱- الایزا	.....	۲۷
ی-۳-۲- ایمنو فلورسانس غیر مستقیم	.....	۲۸
ی-۳-۳- واکنش های رسوبی	.....	۲۹
ی-۳-۴- الگوهای پروتئین	.....	۲۹
ی-۳-۵- تست آگلوتیناسیون لاتکس	.....	۳۰
ک- کنترل و درمان	.....	۳۰



- فصل سوم : مواد و روش کار ..... ۳۲
- الف- مواد مورد استفاده ..... ۳۳
- ب- دستگاه های مورد استفاده ..... ۳۴
- ج- محلول ها ..... ۳۴
- ج-۱- بافر PBS ..... ۳۴
- ج-۲- بافر گلیسین - سالین ۰/۵ مولار ..... ۳۵
- ج-۳- بافر گلیسین - سالین ۰/۰۵ مولار ..... ۳۵
- ج-۴- بافر گلیسین - سالین ۰/۲۵ مولار ..... ۳۵
- ج-۵- معرف برادفورد ..... ۳۶
- ج-۶- محلول استوک اسید تانیک (  $\frac{1}{1000}$  ) ..... ۳۶
- ج-۷- محلول  $\frac{1}{20000}$  اسید تانیک ..... ۳۶
- ج-۸- محلول سترات دو سود ..... ۳۶
- ج-۹- محلول BSA ۰/۱ درصد در تست آگلوتیناسیون لاتکس ..... ۳۷
- ج-۱۰- محلول BSA ۰/۱ درصد در آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم ..... ۳۷

- د- روش کار ..... ۳۷
- د-۱- تهیه نمونه های سرم گوسفندان آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم ..... ۳۷
- د-۲- تهیه نمونه های سرم بره های غیر آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم ..... ۳۸
- د-۳- تهیه آنتی ژن های پیکری ..... ۳۸
- د-۴- تهیه آنتی ژن های دفعی ترشچی ..... ۳۹
- د-۵- اندازه گیری پروتئین به روش برادفورد ..... ۳۹
- د-۶- استاندارد سازی و روش LAT با استفاده از آنتی ژن های دفعی ترشچی و پیکری ..... ۴۰
- د-۶-۱- انجام تست ..... ۴۱
- د-۶-۲- قرائت نتیجه ..... ۴۱
- د-۷- استاندارد سازی و روش IHA با استفاده از آنتی ژن های دفعی ترشچی و پیکری ..... ۴۱
- د-۷-۱- تهیه گلبول های قرمز گوسفند و حساس کردن آنها با محلول  $\frac{1}{20000}$  اسید تانیک... ۴۱
- د-۷-۲- تهیه سوسپانسیون ۲/۵ درصد از گلبول های قرمز ..... ۴۲
- د-۷-۳- حساس کردن گلبول قرمز با محلول  $\frac{1}{20000}$  اسید تانیک ..... ۴۲
- د-۷-۴- افزودن آنتی ژن های دفعی ترشچی و پیکری به گلبول های قرمز حساس شده ..... ۴۲

عنوان	فهرست مطالب	صفحه
د-۷-۵- افزودن BSA به گلبول های قرمز حساس شده حاوی آنتی ژن های دفعی ترشحي و پیکری		۴۳.....
د-۷-۶- انجام تست		۴۳.....
د-۷-۷- قرائت نتیجه		۴۴.....
د-۸- بررسی واکنش های متقاطع		۴۴.....
د-۹- محاسبه حساسیت و ویژگی تست های آگلوتیناسیون لاتکس و هما گلوتیناسیون غیر مستقیم		۴۵.....
<b>فصل چهارم : نتایج</b>		۴۷.....
الف- نتایج حاصل از تست آگلوتیناسیون لاتکس		۴۸.....
الف-۱- نتایج حاصل از تست LAT با استفاده از آنتی ژن دفعی ترشحي		۴۸.....
الف-۲- نتایج حاصل از تست LAT با استفاده از آنتی ژن پیکری		۴۸.....
ب- نتایج حاصل از آزمایش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم		۴۹.....
ب-۱- نتایج حاصل از آزمایش IHA با استفاده از آنتی ژن دفعی ترشحي		۴۹.....
ب-۲- نتایج حاصل از آزمایش IHA با استفاده از آنتی ژن پیکری		۵۰.....

صفحه	فهرست مطالب	عنوان
۵۱.....	واکنش های متقاطع	ج- نتایج حاصل از بررسی واکنش های متقاطع
۵۳.....	نتیجه گیری	فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری
۵۷.....		پیشنهادات
۵۸.....		فهرست منابع
۶۶.....		چکیده انگلیسی

صفحه	فهرست جداول	جدول
۱۳.....		۱-۲ : برخی از حلزون های میزبان واسط دیکروسلیوم دندرتیکوم در دنیا
۱۵.....		۲-۲ : برخی از مورچه های میزبان واسط دیکروسلیوم دندرتیکوم در دنیا
۴۸.....		۱-۴ : نتایج حاصل از محاسبه حساسیت و ویژگی سرم گوسفندان مورد آزمایش به روش LAT
۵۰.....		۲-۴ : نتایج حاصل از محاسبه حساسیت و ویژگی سرم گوسفندان مورد آزمایش به روش IHA

۴-۱: نتایج حاصل از قرائت تست آگلوتیناسیون لاتکس ..... ۴۹

۴-۲: نتایج حاصل از قرائت تست هماگلوتیناسیون غیر مستقیم ..... ۵۱

## چکیده

شماره دانشجویی: ۹۰۹۱۲۰۲	نام: فروزان	نام خانوادگی: جهانگیری نصر
عنوان پایان نامه: ارزیابی آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس (LAT) و هماگلوتیناسیون غیرمستقیم جهت تشخیص دیکروسلیوز گوسفند		
استاد راهنما: دکتر محمد حسین راضی جلالی		استاد مشاور: دکتر مسعود قربانپور
درجه تحصیلی: کارشناسی ارشد	رشته: انگل شناسی	گرایش: دامپزشکی
دانشگاه: شهید چمران اهواز	دانشکده: دامپزشکی	گروه: پاتوبیولوژی
تاریخ دانش آموختگی: ۱۳۹۲/۶/۲۷		تعداد صفحات: ۶۶
کلمات کلیدی: تشخیص، دیکروسلیوم دندریتیکوم، آگلوتیناسیون لاتکس، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم، گوسفند		
<p>دیکروسلیوم دندریتیکوم از انواع ترماتودهای دیزنه آ است که در کبد، مجاری صفراوی و کیسه ی صفراوی پستانداران خصوصا نشخوارکنندگان یافت می شود. با استفاده از روش های ایمنی شناسی می توان به تشخیص زود هنگام بیماری اقدام نمود. هدف از انجام این مطالعه قابلیت تست آگلوتیناسیون لاتکس (LAT) و هماگلوتیناسیون غیر مستقیم (IHA) در تشخیص آلودگی گوسفندان به دیکروسلیوم دندریتیکوم می باشد. پس از جداسازی انگل های زنده، بخشی از انگل ها به منظور تهیه ی آنتی ژن پیکری با استفاده از سونیکاتور هموژن شدند و بخشی دیگر در شرایط استریل به محیط کشت انتقال یافتند تا از مواد ترشح شده از انگل به عنوان آنتی ژن دفعی ترشحی استفاده شود. از گوسفندان آلوده و بره های غیر آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم به منظور تهیه ی سرم های مثبت و منفی خونگیری به عمل آمد. جهت تست آگلوتیناسیون لاتکس روی ذرات مذکور، آنتی ژن ها جداگانه اضافه و مخلوط شدند تا اتصال آنتی ژن به ذرات لاتکس برقرار شود. نمونه های سرم مثبت و منفی به لاتکس فوق اضافه و از نظر واکنش آگلوتیناسیون مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمایش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم پس از رقت سازی سرم ها، گلبول قرمز حساس شده و حاوی آنتی ژن اضافه و مخلوط گردید و از نظر ظهور واکنش هما گلوتیناسیون مورد بررسی قرار گرفتند.</p> <p>حساسیت و ویژگی تست LAT با استفاده از آنتی ژن دفعی ترشحی به ترتیب ۸۴٪ و ۹۷/۶٪ و در استفاده از آنتی ژن پیکری ۹۶٪ و ۹۷/۶٪ محاسبه شد. حساسیت و ویژگی تست IHA با استفاده از آنتی ژن دفعی ترشحی</p>		

به ترتیب ۶۰٪ و ۹۲/۹٪ و در استفاده از آنتی ژن پیکری ۹۲٪ و ۶۶/۷٪ محاسبه شد. از تست های LAT و IHA برای تشخیص دیکروسلیازیس می توان استفاده کرد. با توجه به بررسی حاضر تست LAT با استفاده از آنتی ژن دفعی ترشچی و سوماتیک از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است و روشی سریع و بدون نیاز به ابزارخاص در تشخیص دیکروسلیازیس می باشد.



# فصل اول

---

---

## مقدمه و هدف

---

---

## فصل اول: مقدمه و هدف

دیگروسلیازیس بیماری انگلی کرمی ناشی از دیگروسلیوم دندرتیکوم از انواع ترماتودهای دیزنه آ است که بنا بر عقیده ی ولف، از دو منظر بهداشتی و اقتصادی از اهمیت ویژه ای در دام های نشخوار کننده برخوردار است (Traversa , Otranto ، ۲۰۰۳).

این انگل گسترش جهانی دارد. کرم بالغ در کیسه صفرا و مجاری صفراوی کبد پستانداران و اساسا نشخوارکنندگان زندگی می کند ولی انسان هم تصادفا به آن مبتلا می شود (Rack و همکاران، ۲۰۰۴).

در این مورد در سال های اخیر آلودگی انسان در عربستان (Helmy و همکاران، ۲۰۰۳)، ترکیه (Karadag و همکاران، ۲۰۰۵)، قرقیزستان (Jeandron و همکاران، ۲۰۱۱) و ایران (Zali و همکاران، ۲۰۰۴) گزارش شده است.

به دلیل وقوع شکل تحت درمانگاهی دیکروسلیازیس، در اغلب موارد بیماری به صورت بالینی و صرفاً از روی علائم تشخیص داده نشده و به همین دلیل است که تشخیص اساساً در ضمن بررسی های کشتارگاهی یا کالبدگشایی و جداسازی ترماتود بالغ از مجاری صفراوی و یا توسط آزمایش مدفوع با دیدن و شناسایی تخم کرم در دام زنده صورت می گیرد (Senlik و همکاران، ۲۰۰۶)، اگرچه براساس گزارش Ambrosi، آزمایش مدفوع گوسفندان با کمتر از ۱۰۰ عدد کرم بالغ منفی خواهد بود (Ambrosi و همکاران، ۱۹۸۰). از طرفی در آزمون های مدفوعی نوع روش به کار گرفته شده، نوع محلول (های) شناورسازی مورد استفاده (Cringoli و همکاران، ۲۰۰۴؛ Rehbein و همکاران، ۱۹۹۹)، سن (Gonzalez – Lanza و همکاران، ۱۹۹۳) و مدت زمان بعد از آلودگی (Kopp، ۱۹۷۵) نیز تاثیرگذار هستند.

بنابر نظر Campo و Senlik تعداد تخم دفع شده در یک دام نه تنها از یک روز به روز دیگر، حتی در ساعات مختلف روز هم تغییر می کند (Campo و همکاران، ۲۰۰۰؛ Senlik و همکاران، ۲۰۰۶).

گوسفندان متناسب با تعداد کرم بالغ در کبد به سه گروه آلودگی مختصر (تعداد کمتر از ۵۰۰)، آلودگی متوسط (تعداد ۵۰۰ تا ۱۰۰۰) و آلودگی شدید (تعداد بیشتر از ۱۰۰۰) تقسیم شده اند. و رابطه ی بین تعداد تخم در گرم مدفوع و تعداد کرم بالغ در مجاری صفراوی مورد ارزیابی قرار گرفته است (اسلامی و همکاران، ۱۳۸۸).

در ۳۰ سال گذشته روش های ایمنی شناسی پیشرفت قابل توجهی در تشخیص دیکروسلیازیس داشته اند (Traversa , Otranto ، ۲۰۰۲). و در این ارتباط روش های مختلفی نظیر پرسی پیتاسیون، هما گلو تیناسیون، ثبوت کمپلمان و الیزا مورد استفاده قرار گرفته است (Revilla – Nuin و همکاران ، ۲۰۰۵).

با توجه به طولانی بودن فاصله ی آلودگی و دفع تخم، این روش ها در تشخیص زود هنگام آلودگی ارزش زیادی دارند (Gonzalez – Lanza و همکاران ، ۲۰۰۰).

اعتقاد بر این است که چهره تحت درمانگاهی دیکروسلیازیس باعث عدم توجه به تشخیص دقیق و به موقع آن شده است (Geburtsort , Broglia ، ۲۰۰۶).

این ترماتود زمینه ساز سایر بیماری های عفونی در میزبان های آلوده و بیمار است و همچنین باعث خسارت اقتصادی بالایی می شود. کاهش تولیدات دام ها در آلودگی شدید دیده می شود. تشخیص آلودگی در مراحل ابتدایی بیماری می تواند در کاهش خسارت موثر باشد.

تاکنون روش های به کار برده شده برای کنترل آلودگی موفق نبوده، لذا تشخیص اولیه ی دقیق اهمیت زیادی دارد (Gonzalez – Lanza و همکاران ، ۲۰۰۰).

با توجه به اهمیت اقتصادی و بهداشتی انگل و با توجه به نقاط ضعف آزمایش مدفوع در شناسایی آلودگی، دستیابی به روش های تشخیص که از کارایی لازم برخوردار هستند، در خور توجه و اهمیت می باشند.