بسم الله
الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته انگل شناسی پزشکی

عنوان

شناسایی مولکولی ایزوله‌های گاوی و گوسفندی فاسیولا با استفاده از ناحیهٔ ITS(rDNA)

نگارش

محمود محامی اسکوئی

استاد راهنما

دکتر عبدالحسین دلیمی اصل

اساتید مشاور

دکتر مهدی فروزنده مقدم دکتر محمد باقر رکنی

دی ۱۳۹۰

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای محمود محامی اسکوئی رشته انگل شناسی پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان:

« شناسایی مولکولی ایزوله های گاوی و گوسفندی فاسیولا با استفاده از ناحیه ITS (rDNA) » در تاریخ ۱۳۹۰/۱۰/۶ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر عبدالحسین دلیمی اصل	
استاد مشاور	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
استاد مشاور	دکتر محمد باقر رکنی	
استاد ناظر	دکتر فاطمه غفاری فر	
استاد ناظر	دکتر بهرام کاظمی	
استاد ناظر	دکتر فاطمه ملکی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر جاوید صدرایی	

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 ۱- 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 ۲- 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 ۳- 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 ٤- 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 ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **محمود محامی اسکوئی** دانشجوی رشته **انگل شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸٦** مقطع **دکتری** 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 ۱۳۹۰/۱۰/۱۹

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

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **انگل شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر عبدالحسین دلیمی اصل** ، مشاوره **دکتر مهدی فروزنده مقدم و دکتر محمد باقر رکنی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : 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 ٤ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : 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 ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **محمود محامی اسکوئی** دانشجوی رشته **انگل شناسی پزشکی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی:
محمود محامی اسکوئی
تاریخ و امضا ۱۳۹۰/۱۰/۱۹

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس خداوند متعال را که به من توفیق تحصیل علم عطا فرمود.

بر خود لازم می دانم تا از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر دلیمی که راهنمایی این تحقیق را بر عهده داشتند و همواره مرا از راهنمایی های ارزشمند خود بهره مند ساختند صمیمانه تشکر و سپاسگزاری نمایم.

همچنین از جناب آقای دکتر فروزنده مقدم و جناب آقای دکتر رکنی که زحمت مشاوره این پژوهش را به عهده داشتند، کمال تشکر را دارم.

از زحمات، تلاش ها و نظرات ارزنده جناب آقای دکتر صدرایی، مدیر محترم گروه انگل شناسی، و سرکار خانم دکتر غفاری فر تشکر و قدردانی می نمایم.

همچنین از جناب آقای دکتر کاظمی و سرکار خانم دکتر ملکی که برای داوری این تحقیق قبول زحمت فرموده و مرا از نظرات خود بهره مند نمودند، نهایت تشکر را دارم.

از شبکه دامپزشکی کشور، دامپزشکان محترمی که در تشخیص دام های آلوده نهایت همکاری را مبذول داشتند و مدیران محترم شعب موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در شهرهای مورد مطالعه به خاطر همکاری صمیمانه شان در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می نمایم.

همچنین از همکاری صمیمانه آقایان دکتر اربابی، دکتر ناصری فر، دکتر پیرستانی و تمامی عزیزانی که مرا در انجام این تحقیق یاری رسانده اند کمال تشکر را دارم.

چکیده

فاسیولیازیس، یکی از مهمترین بیماری‌های انگلی مشترک بین انسان و دام می‌باشد که به لحاظ مشکلات بهداشتی و خسارت‌های اقتصادی فراوان در مناطق مختلف دنیا مورد توجه قرار دارد. به لحاظ اهمیت فاسیولیازیس در ایران از نظر پزشکی، دامپزشکی و اقتصادی، مطالعهٔ حاضر در جهت شناسایی مولکولی ایزوله‌های گاوی و گوسفندی فاسیولا و مقایسهٔ آن با شاخص‌های مورفومتریک در ایران طراحی شد.

در این مطالعه، به منظور جمع‌آوری انگل‌های فاسیولا از کبدهای گوسفندان و گاوهای کشتار شده، از کشتارگاه‌های ۶ استان کشور واقع در مناطق مختلف جغرافیایی ایران نمونه‌گیری به عمل آمد. ۲۱ شاخص و نسبت استاندارد مورفومتریک از انگل‌های فاسیولا تعیین شده و مورد بررسی قرار گرفتند. شاخص‌های مورفومتریک ۴۲۰ انگل فاسیولای بالغ پس از اندازه‌گیری و محاسبه به نرم افزار SPSS منتقل و با استفاده از آزمون‌های One-Way ANOVA و T-Test تجزیه و تحلیل شدند. در این مطالعه پنج روش مختلف فنل کلروفرم، Chelex، CTAB، Ish-Horowicz و کیت جهت استخراج DNA از انگل‌های فاسیولا مورد استفاده، مقایسه و ارزیابی قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر ناحیهٔ ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 از ۱۸۰ ایزولهٔ فاسیولا به طول 1000 bp انجام شد. تکنیک PCR-RFLP برای تفکیک گونه‌های فاسیولا با استفاده آنزیم Tsp509I در این تحقیق طراحی و استفاده گردید. تعداد ۳۸ نمونهٔ فاسیولا پس از تعیین توالی مورد آنالیزهای فیلوژنی قرار گرفتند.

در این مطالعه از مجموع دام‌های مورد بررسی در ۶ کشتارگاه صنعتی کشور، ۱/۱۰ درصد آلوده به فاسیولا تشخیص داده شدند به طوری که شیوع فاسیولیازیس گوسفندی ۰/۹۷ درصد و فاسیولیازیس گاوی ۱/۳۶ درصد به دست آمد. در این تحقیق طول فاسیولا هپاتیکا در مجموع ۶ استان ایران برای ایزوله‌های گوسفندی ۲۹/۴۱ تا ۴۲/۷۹، برای ایزوله‌های گاوی ۲۷/۴۴ تا ۴۰/۲۹ میلی‌متر و طول فاسیولا ژیگانتیکا در مجموع ۶ استان ایران برای ایزوله‌های گوسفندی ۴۰/۲۹ تا ۵۴/۷۱ و برای ایزوله‌های گاوی ۲۹/۷۶ تا ۵۲/۲۴ میلی‌متر محاسبه شد. بررسی‌های ژنوتایپی و آنالیزهای فیلوژنیک بر اساس ناحیهٔ ITS نشان داد که ایزوله‌های فاسیولای گاوی و گوسفندی تعیین توالی شده، دو شاخهٔ اصلی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا را بر روی درخت فیلوژنی تشکیل می‌دهند. تمامی ایزوله‌های فاسیولا هپاتیکای تعیین توالی شده در این بررسی در شاخهٔ ژنوتایپ H1 بودند اما ایزوله‌های فاسیولا ژیگانتیکا در ۴ زیرشاخهٔ حاوی ژنوتایپ‌های G8, G7, G6, G5 قرار گرفتند.

روش‌های مورفومتریک در تشخیص و شناسایی اولیهٔ انگل‌های فاسیولا می‌تواند کاربرد داشته باشد اما تفکیک دقیق گونه‌ها، مطالعهٔ ژنوتایپ‌ها و بررسی‌های فیلوژنیک با استفاده از روش‌های مولکولی میسر است. این مطالعه اولین تحقیق در مورد تعیین ژنوتایپ‌ها و فیلوژنی ایزوله‌های فاسیولای ایران و مقایسهٔ ایزوله‌های مختلف فاسیولا از میزبان‌ها و استان‌های مختلف می‌باشد. از جمله نتایج حاصل از این مطالعه، غالب بودن ژنوتایپ G5 فاسیولا ژیگانتیکا در شمال و ژنوتایپ G7 در جنوب‌غرب کشور می‌باشد. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتایپ‌های فاسیولا مختص میزبان و مناطق جغرافیایی خاص نبوده اما احتمالاً در مناطق جغرافیایی خاص، برخی ژنوتایپ‌های فاسیولا غالب باشند. در مجموع نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در مطالعات مربوط به اپیدمیولوژی، تشخیص، درمان، مقاومت دارویی، طراحی واکسن وکنترل و پیشگیری فاسیولیازیس در کشور مفید واقع شود.

کلمات کلیدی: *فاسیولا*، مطالعهٔ مورفومتریک، شناسایی مولکولی، ITS، ژنوتایپ

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱: مقدمه ۲

۱-۲: تاریخچه ٤

۱-۳: تاکسونومی ٥

۱-٤: مورفولوژی ٦

۱-٤-۱: *فاسیولا هپاتیکا* ۱۱

۱-٤-۲: *فاسیولا ژیگانتیکا* ۱۲

۱-٥: سیرتکاملی ۱۲

۱-٥-۱: میزبان‌های نهایی فاسیولا ۱٥

۱-٥-۲: حلزون‌های میزبان واسط فاسیولا ۱٦

۱-٦: اپیدمیولوژی ۱۹

۱-٦-۱: اپیدمیولوژی فاسیولیازیس در جهان ۲۰

۱-٦-۲: اپیدمیولوژی فاسیولیازیس انسانی در جهان ۲۱

۱-٦-۳: اپیدمیولوژی فاسیولیازیس حیوانی در جهان ۲۲

۱-٦-٤: اپیدمیولوژی فاسیولیازیس انسانی در ایران ۲٤

۱-٦-٥: اپیدمیولوژی فاسیولیازیس حیوانی در ایران ۲٤

۱-۷: بیماری‌زایی، علایم بالینی و آسیب‌شناسی ۲٦

۱-۷-۱: بیماری‌زایی، علایم بالینی و آسیب‌شناسی فاسیولیازیس در انسان ۲٦

۱-۷-۲: بیماری‌زایی، علایم بالینی و آسیب‌شناسی فاسیولیازیس در حیوانات ۲۸

۱-۸: پیشگیری و کنترل ۳۱

۱-۹: واکسیناسیون ۳۳

۱-۱۰: تشخیص ۳٤

۱-۱۱: درمان ۳۶
۱-۱۲: کاربرد روش‌های مولکولی در مطالعات انگل‌شناسی ۳۸
۱-۱۲-۱: واکنش‌های زنجیره ای پلیمراز(PCR) ۳۹
۱-۱۲-۲: عوامل اصلی مورد نیاز برای انجام PCR ۳۹
۱-۱۲-۲-۱: DNA الگو ۳۹
۱-۱۲-۲-۲: آنزیم DNA پلیمراز ۳۹
۱-۱۲-۲-۳: dNTPs ۳۹
۱-۱۲-۲-٤: کلرید منیزیم (MgCl2) ٤۰
۱-۱۲-۲-۵: پرایمرها ٤۰
۱-۱۲-۲-٦: بافر ٤۰
۱-۱۲-۳: مراحل سیکل حرارتی PCR ٤۱
۱-۱۲-۳-۱: مرحلهٔ واسرشت سازی یا باز بودن دو رشتهٔ DNA ٤۱
۱-۱۲-۳-۲: مرحلهٔ اتصال پرایمرها به DNA هدف ٤۱
۱-۱۲-۳-۳: مرحلهٔ گسترش یا سنتز رشته‌های DNA مکمل ٤۱
۱-۱۲-٤: آشکارسازی محصول PCR ٤۲
۱-۱۲-۵: PCR-RFLP ٤۲
۱-۱۲-٦: فیلوژنتیک ٤۳
۱-۱۲-٦-۱: انواع درخت‌های فیلوژنی ٤۳
۱-۱۲-٦-۲: حالت‌های مختلف یک صفت در یک درخت فیلوژنتیکی ٤۵
۱-۱۲-٦-۳: روش‌های ایجاد درخت‌های فیلوژنی ٤٦
۱-۱۲-٦-٤: ارزیابی صحت درخت‌های فیلوژنی رسم شده ٤۸
۱-۱۳: مروری بر مطالعات گذشته ۵۰
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۵۵
۲-۱: جمع‌آوری نمونه ۵٦

۲-۱-۱: موقعیت جغرافیایی و مشخصات مناطق مورد مطالعه ٥٦
۲-۱-۱-۱: موقعیت جغرافیایی ایران ٥٦
۲-۱-۱-۲: موقعیت جغرافیایی استان آذربایجان‌شرقی ٥٧
۲-۱-۱-۳: موقعیت جغرافیایی استان خراسان‌رضوی ٥٧
۲-۱-۱-٤: موقعیت جغرافیایی استان خوزستان ٥٨
۲-۱-۱-٥: موقعیت جغرافیایی استان فارس ٥٩
۲-۱-۱-٦: موقعیت جغرافیایی استان مازندران ٥٩
۲-۱-۱-۷: موقعیت جغرافیایی استان مرکزی ٦٠
۲-۱-۲: روش نمونه‌گیری ٦١
۲-۱-۲-۱: وسایل لازم برای نمونه‌گیری، جداسازی و آماده سازی نمونه‌ها ٦١
۲-۱-۲-۲: نحوهٔ انجام نمونه‌گیری، جداسازی و آماده‌سازی نمونه‌ها ٦١
۲-۲: مطالعات مورفومتریک ٦٢
۲-۲-۱: شاخص‌ها و نسبت‌های مورفومتریک فاسیولا (مورد بررسی در این مطالعه) ٦٣
۲-۳: مطالعات مولکولی ٦٦
۲-۳-۱: استخراج DNA (DNA Extraction) ٦٦
۲-۳-۱-۱: وسایل مورد نیاز جهت استخراج DNA ٦٦
۲-۳-۱-۲: استخراج DNA با استفاده از روش فنل کلروفرم ٦٦
۲-۳-۱-۳: استخراج DNA با استفاده از روش Chelex ٦٧
۲-۳-۱-٤: استخراج DNA با استفاده از روش CTAB ٦٧
۲-۳-۱-٥: استخراج DNA با استفاده از روش Ish-Horowicz ٦٨
۲-۳-۱-٥-۱: محلول‌های مورد نیاز جهت استخراج DNA به روش Ish-Horowicz ٦٨
۲-۳-۱-٥-۲: روش تهیه Sucrose 10% ۷۱
۲-۳-۱-٥-۳: روش تهیه 1X TE buffer ۷۱
۲-۳-۱-٥-٤: مراحل استخراج DNA از انگل‌های فاسیولا به روش Ish-Horowicz ۷۱

۲-۳-۱-٦: استخراج DNA با استفاده از روش کیت (*Bioneer AccuPrep*®) ۷۲
۲-۳-۱-۷: اندازه‌گیری غلظت DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری ۷۳
۲-۳-۲: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) ۷٤
۲-۳-۲-۱: وسایل و مواد مورد نیاز جهت انجام PCR ۷٤
۲-۳-۲-۲: مشخصات پرایمرها ۷٤
۲-۳-۲-۳: برنامهٔ PCR ۷۵
۲-۳-۲-٤: روش انجام PCR ۷۵
۲-۳-۳: PCR-RFLP ۷٦
۲-۳-۳-۱: تعیین آنزیم اندونوکلئاز محدود کننده ۷٦
۲-۳-۳-۲: وسایل و مواد مورد نیاز جهت انجام PCR-RFLP ۷٦
۲-۳-۳-۳: روش انجام PCR-RFLP ۷۷
۲-۳-٤: الکتروفورز محصول PCR و PCR-RFLP ۷۸
۲-۳-٤-۱: مواد و وسایل مورد نیاز برای انجام الکتروفورز ۷۸
۲-۳-٤-۲: طرز تهیه محلول Tris Acetate EDTA(TAE) ۷۹
۲-۳-٤-۲: طرز تهیه ژل آگارز و انجام الکتروفورز ۷۹
۲-۳-۵: تعیین توالی ۸۰
۲-۳-۵-۱: تخلیص محصول PCR از ژل آگارز ۸۰
۲-۳-۵-۱-۱: وسایل و مواد لازم برای تخلیص محصول PCR از ژل آگارز ۸۱
۲-۳-۵-۱-۲: روش انجام تخلیص محصول PCR از ژل آگارز ۸۱
۲-۳-٦: آنالیزهای فیلوژنتیک ۸۲
فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۸٤
۳-۱: نتایج تعیین شیوع و شدت آلودگی به فاسیولیازیس در دام‌های مناطق تحت مطالعه ۸۵
۳-۲: نتایج مطالعات مورفومتریک ۹۱
۳-۳: نتایج مطالعات مولکولی ۱۲۰

۳-۳-۱: نتایج استخراج DNA از انگل‌های فاسیولا ۱۲۰
۳-۳-۲: نتایج PCR ناحیهٔ ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 انگل‌های فاسیولا ۱۲۲
۳-۳-۳: نتایج PCR-RFLP ۱۲۵
۳-۳-٤: نتایج تعیین توالی ناحیهٔ ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 نمونه‌های فاسیولا ۱۳۱
۳-۳-۵: نتایج هم‌ردیفی چندگانه ۱۳۲
۳-۳-۵-۱: نتایج هم‌ردیفی چندگانهٔ ناحیهٔ ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 ایزوله‌های فاسیولا هپاتیکای نمونه‌گیری شده از استان‌های مختلف ایران ۱۳۳
۳-۳-۵-۲: نتایج هم‌ردیفی چندگانهٔ ناحیهٔ ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 ایزوله‌های فاسیولا ژیگانتیکای نمونه‌گیری شده از استان‌های مختلف ایران ۱۳۹
۳-۳-۵-۳: نتایج هم‌ردیفی چندگانه و مقایسهٔ توالی‌های ناحیهٔ ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکای نمونه‌گیری شده از استان‌های مختلف ایران ۱٤۳
۳-۳-٦: تعیین ژنوتایپ ۱۵۳
۳-۳-۷: ترسیم درخت فیلوژنی ۱۵٦
فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱٦۱
٤-۱: بحث ۱٦۲
٤-۲: نتیجه‌گیری ۱۷۷
٤-۳: پیشنهادها ۱۷۹
فهرست منابع ۱۸۰
ضمائم ۱۹۳
چکیده انگلیسی ۲٤۱

فهرست جداول

جدول ۱-۱: تاریخچهٔ انگل‌های فاسیولا ٤
جدول ۱-۲: گونه‌های احتمالی حلزون‌های میزبان واسط فاسیولا هپاتیکا در مطالعات ثبت شده از مناطق مختلف دنیا ۱۸
جدول ۱-۳: گونه‌های احتمالی حلزون‌های میزبان واسط فاسیولا ژیگانتیکا در مطالعات ثبت شده از مناطق مختلف دنیا ۱۹
جدول ۱-٤: میزان شیوع فاسیولا ژیگانتیکای حیوانی برحسب نوع میزبان نهایی در مناطق مختلف جهان ۲۲
جدول ۱-۵: میزان شیوع فاسیولا هپاتیکای حیوانی برحسب نوع میزبان نهایی در مناطق مختلف جهان ۲۳
جدول ۱-٦: مطالعات انجام شده در ایران در مورد فاسیولیازیس حیوانی برحسب منطقه و نوع میزبان نهایی ۲۵
جدول ۱-۷: بیماری‌زایی و علایم بالینی فاسیولیازیس حاد، تحت حاد و مزمن در گوسفند و بز ۲۷
جدول ۲-۱: نمونهٔ جدول تهیه شده برای ثبت مشخصات و اندازهٔ شاخص‌های مورفومتریک انگل‌های فاسیولا در این مطالعه ٦۵
جدول ۲-۲: روش تهیهٔ 10X Grinding buffer ٦۹
جدول ۲-۳: روش تهیهٔ 2X SDS buffer ٦۹
جدول ۲-٤: روش تهیهٔ 10X TE buffer ٦۹
جدول ۲-۵: روش تهیهٔ 20X Spermine/Spermidine ۷۰
جدول ۲-٦: روش تهیهٔ Grinding mix ۷۰
جدول ۲-۷: روش تهیهٔ SDS mix ۷۱
جدول ۲-۸: روش تهیهٔ 8M Potassium acetate ۷۱
جدول ۲-۹: مشخصات و توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه ۷٤
جدول ۲-۱۰: برنامهٔ PCR مورد استفاده در این مطالعه ۷۵
جدول ۳-۱: توزیع فراوانی فاسیولیازیس گوسفندی و گاوی به تفکیک استان‌های مختلف کشور طی سال‌های ۸۹-۱۳۸۸ ..... ۸٦

جدول ۳-۲: توزیع شدت آلودگی به فاسیولا در ایزوله‌های گوسفندی و گاوی به تفکیک استان‌های مختلف کشور طی سال‌های ۸۹-۱۳۸۸ ..... ۸۸
جدول ۳-۳: مقایسهٔ آماری شدت آلودگی بین کبدهای گوسفندی و گاوی در هر کدام از استان‌های مورد مطالعه ۸۹
جدول ۳-٤: مقایسهٔ آماری شدت آلودگی کبدهای گوسفندی به فاسیولا بین استان‌های مختلف ۸۹
جدول ۳-۵: مقایسهٔ آماری شدت آلودگی کبدهای گاوی به فاسیولا بین استان‌های مختلف ۹۰
جدول ۳-٦: تعداد نمونهٔ انگل فاسیولا جهت انجام مطالعات مورفومتریک بر حسب میزبان، گونه و محل جمع‌آوری نمونه ۹۱
جدول ۳-۷: نتایج مربوط به محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا هپاتیکا در٦ استان ایران به تفکیک میزبان ۹۳
جدول ۳-۸: نتایج مربوط به محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا ژیگانتیکا در٦ استان ایران به تفکیک میزبان ۹٤
جدول ۳-۹: مقایسه شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکای گوسفندی و گاوی بین ٦ استان مختلف ایران ۹۷
جدول ۳-۱۰: مقایسهٔ شاخص‌های مورفومتریک بین فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکای گوسفندی ۹۸
جدول ۳-۱۱: مقایسهٔ شاخص‌های مورفومتریک بین فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکای گاوی ۹۸
جدول ۳-۱۲: مقایسهٔ شاخص‌های مورفومتریک بین فاسیولا هپاتیکای گاوی و گوسفندی ۹۹
جدول ۳-۱۳: مقایسهٔ شاخص‌های مورفومتریک بین فاسیولا ژیگانتیکای گاوی و گوسفندی ۹۹
جدول ۳-۱٤: نتایج مربوط به محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا هپاتیکا در استان آذربایجان‌شرقی به تفکیک میزبان ۱۰۱
جدول ۳-۱۵: نتایج مربوط به محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا هپاتیکا در استان خراسان‌رضوی به تفکیک میزبان ۱۰۲
جدول ۳-۱٦: نتایج مربوط به محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا هپاتیکای گوسفندی در استان فارس ۱۰۳

جدول ۳-۱۷: نتایج مربوط به محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا هپاتیکا در استان مرکزی به تفکیک میزبان ۱۰٤
جدول ۳-۱۸: نتایج مربوط به محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا هپاتیکا در استان مازندران به تفکیک میزبان ۱۰۵
جدول ۳-۱۹: نتایج مربوط به محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا ژیگانتیکای گوسفندی در استان خراسان‌رضوی ۱۰٦
جدول ۳-۲۰: نتایج مربوط به محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا ژیگانتیکا در استان خوزستان به تفکیک میزبان ۱۰۷
جدول ۳-۲۱: نتایج مربوط به محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا ژیگانتیکای گاوی در استان فارس۱۰۸
جدول ۳-۲۲: نتایج مربوط به محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا ژیگانتیکای گوسفندی در استان مرکزی..... ۱۰۹
جدول ۳-۲۳: نتایج مربوط به محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا ژیگانتیکا در استان مازندران به تفکیک میزبان ۱۱۰
جدول ۳-۲٤: مقایسهٔ آماری طول و عرض بدن، قطر خارجی و داخلی بادکش‌های دهانی و شکمی و طول فارنکس فاسیولا هپاتیکای گوسفندی و گاوی بین استان‌های تحت مطالعه ۱۱۱
جدول ۳-۲۵: مقایسهٔ آماری عرض فارنکس، فاصله بین بادکش دهانی و شکمی، طول و عرض شانه رأسی، طول و عرض بیضه و ابتدا تا اول بادکش شکمی در فاسیولا هپاتیکای گوسفندی و گاوی بین استان‌های تحت مطالعه ۱۱۲
جدول ۳-۲٦: مقایسهٔ آماری طول غدد زرده، فاصله بین بادکش شکمی تا انتها، فاصله غدد زرده تا انتها، مساحت بدن، نسبت طول به عرض بدن، نسبت بادکش شکمی به بادکش دهانی و نسبت طول بدن به طول غدد زرده در فاسیولا هپاتیکای گوسفندی و گاوی بین استان‌های تحت مطالعه ۱۱۳
جدول ۳-۲۷: مقایسهٔ آماری طول و عرض بدن، قطر خارجی و داخلی بادکش‌های دهانی و شکمی و طول فارنکس فاسیولا ژیگانتیکای گوسفندی و گاوی بین استان‌های تحت مطالعه ۱۱٤
جدول ۳-۲۸: مقایسهٔ آماری عرض فارنکس، فاصله بین بادکش دهانی و شکمی، طول و عرض شانه رأسی،

طول و عرض بیضه و ابتدا تا اول بادکش شکمی در فاسیولا ژیگانتیکای گوسفندی و گاوی بین استان‌های تحت مطالعه ۱۱۵
جدول ۳-۲۹: مقایسهٔ آماری طول غدد زرده، فاصله بین بادکش شکمی تا انتها، فاصله غدد زرده تا انتها، مساحت بدن، نسبت طول به عرض بدن، نسبت بادکش شکمی به بادکش دهانی و نسبت طول بدن به طول غدد زرده در فاسیولا ژیگانتیکای گوسفندی و گاوی بین استان‌های تحت مطالعه ۱۱٦
جدول ۳-۳۰: مقایسهٔ نتایج حاصل از محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا هپاتیکای گاوی از مجموع ٦ استان کشور با نتایج حاصل از سایر مطالعات انجام شده در بولیوی، اسپانیا و استان گیلان از شمال ایران ۱۱۷
جدول ۳-۳۱: مقایسهٔ نتایج حاصل از محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا ژیگانتیکای گاوی از مجموع ٦ استان کشور با نتایج حاصل از سایر مطالعات انجام شده در بورکینافاسو و استان گیلان از شمال ایران.... ۱۱۸
جدول ۳-۳۲: مقایسهٔ نتایج حاصل از محاسبهٔ شاخص‌های مورفومتریک فاسیولا هپاتیکای گوسفندی از مجموع ٦ استان کشور با نتایج حاصل از مطالعهٔ انجام شده در اسپانیا ۱۱۹
جدول ۳-۳۳: تعداد نمونهٔ انگل فاسیولا جهت انجام مطالعات مولکولی بر حسب میزبان، گونه و محل جمع‌آوری نمونه ۱۲۰
جدول ۳-۳٤: میانگین و Std.Error کمیّت و کیفیت DNA استخراج شده از انگل‌های فاسیولا با استفاده از روش‌های مختلف استخراج DNA ۱۲۱
جدول ۳-۳۵: جایگاه بازهای متغیر و تفاوت آن‌ها در توالی‌های ITS1 و ITS2 گونه‌های فاسیولا ۱۵۳
جدول ۳-۳٦: ژنوتایپ‌های مختلف فاسیولا بر اساس جایگاه‌های متغیر در ناحیهٔ ITS2..... ۱۵٤
جدول ۳-۳۷: ژنوتایپ‌های مختلف شناسایی شده از ایزوله‌های فاسیولای گاوی و گوسفندی نمونه‌گیری شده از استان‌های مختلف ایران ۱۵۵

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱: شیوع فاسیولیازیس در استان‌های مورد مطالعه ۸۶

نمودار ۳-۲: شیوع فاسیولیازیس گاوی در استان‌های مورد مطالعه..... ۸۷

نمودار ۳-۳: شیوع فاسیولیازیس گوسفندی در استان‌های مورد مطالعه ۸۷

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱: انگل‌های مهم خانوادهٔ فاسیولیده ٦

شکل ۱-۲: ساختمان تگومنت فاسیولا هپاتیکا ۸

شکل ۱-۳: مراحل مختلف تکاملی فاسیولا ۱۱

شکل ۱-٤: سیر تکاملی انگل‌های فاسیولا ۱۵

شکل ۱-۵: نحوهٔ انتشار جغرافیایی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا در جهان ۲۰

شکل ۱-٦: انواع اصلی درخت‌های فیلوژنی ٤۵

شکل ۲-۱: موقعیت جغرافیایی مناطق مورد مطالعه ٦۰

شکل ۲-۲: نمونهٔ کبد گاو آلوده به انگل فاسیولا ٦۲

شکل ۲-۳: شاخص‌های استاندارد مورفومتریک فاسیولا ٦٤

شکل ۳-۱: ایزولهٔ فاسیولا هپاتیکای گوسفندی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه اراک ۹۲

شکل ۳-۲: ایزولهٔ فاسیولا ژیگانتیکای گاوی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه اهواز ۹۲

شکل ۳-۳: تصویر شماتیک ناحیهٔ ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 بین ساب‌یونیت کوچک(18S) و ساب‌یونیت بزرگ(28S) از DNA ریبوزومی ۱۲۲

شکل ۳-٤: الکتروفورز محصول PCR-Gradient به منظور دستیابی به دمای مناسب برای مرحلهٔ Annealing (62-65 °C) ۱۲۲

شکل ۳-۵: الکتروفورز محصول PCR-Gradient به منظور دستیابی به دمای مناسب برای مرحلهٔ Annealing (57-62 °C) ۱۲۳

شکل ۳-٦: الکتروفورز محصول PCR ناحیهٔ ITS1,5.8S rDNA,ITS2 فاسیولا با استفاده از پرایمرهای BD1 و BD2 (ایزوله‌های مختلف فاسیولای گاوی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه صنعتی شیراز) ۱۲٤

شکل ۳-۷: الکتروفورز محصول PCR ناحیهٔ ITS1,5.8S rDNA,ITS2 فاسیولا با استفاده از پرایمرهای BD1 و BD2 (ایزوله‌های مختلف فاسیولای گوسفندی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه صنعتی مشهد) ۱۲٤

شکل ۳-۸: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ایزوله‌های فاسیولای گاوی و گوسفندی نمونه‌گیری شده از

کشتارگاه صنعتی مشهد ۱۲۵
شکل ۳-۹: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ایزوله‌های فاسیولای گاوی و گوسفندی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه صنعتی مشهد ۱۲۶
شکل ۳-۱۰: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ایزوله‌های فاسیولای گوسفندی و گاوی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه صنعتی شیراز ۱۲۶
شکل ۳-۱۱: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ایزوله‌های فاسیولای گاوی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه صنعتی شیراز ۱۲۷
شکل ۳-۱۲: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ایزوله‌های فاسیولای گوسفندی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه صنعتی تبریز ۱۲۷
شکل ۳-۱۳: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ایزوله‌های فاسیولای گاوی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه صنعتی تبریز ۱۲۸
شکل ۳-۱۴: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ایزوله‌های فاسیولای گاوی و گوسفندی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه اهواز ۱۲۸
شکل ۳-۱۵: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ایزوله‌های فاسیولای گوسفندی و گاوی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه صنعتی ساری ۱۲۹
شکل ۳-۱۶: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ایزوله‌های فاسیولای گاوی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه صنعتی ساری ۱۲۹
شکل ۳-۱۷: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ایزوله‌های فاسیولای گوسفندی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه صنعتی اراک ۱۳۰
شکل ۳-۱۸: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ایزوله‌های فاسیولای گاوی نمونه‌گیری شده از کشتارگاه صنعتی اراک ۱۳۰
شکل ۳-۱۹: تصویر شماتیک از ژنوتایپ‌های مختلف فاسیولا ۱۵۴
شکل ۳-۲۰: درخت فیلوژنی ایزوله‌های فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا بر اساس ناحیهٔ ITS با استفاده از الگوریتم Neighbor-Joining ۱۵۷