بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

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

عنوان

بررسی مرفولوژیکی و مولکولی ایزوله های گوسفندی وبزی دیکروسلیوم دندریتیکوم با استفاده ازمارکر ITS2(rDNA)

نگارش

محسن اربابی

استاد راهنما

دکتر عبدالحسین دلیمی اصل

اساتیدمشاور

دکتر فاطمه غفاری فر

دکتر مهدی فروزنده مقدم

بهار۱۳۹۱

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای محسن اربابی رشته **انگل شناسی پزشکی** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **بررسی مرفولوژیکی و مولکولی ایزوله های گوسفندی و بزی دیکروسلیوم دندریتیکوم با استفاده از مارکر ITS2 (rDNA)** » در تاریخ **۱۳۹۱/۳/۷** ارائه کردند.

بدینوسیله 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 فاطمه غفاری فر	
استاد مشاور	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
استاد ناظر	دکتر شهلا رودبار محمدی	
استاد ناظر	دکتر مهدی محبعلی	
استاد ناظر	دکتر فریبا خوش زبان	
استاد ناظرو نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر جاوید صدرایی	

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 انسان ها 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 رساله و درآمدهای حاصل از آن ها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدیدآورندگان 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 ازپایان نامه ورساله به عهده اساتیدراهنما ودانشجو 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 آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- 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 ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ 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 محسن اربابی دانشجوی رشته انگل شناسی ورودی سال تحصیلی۱۳۸۷مقطع دکتری تخصصی 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 به نام 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 ».

نام و نام خانوادگی : محسن اربابی

تاریخ و امضا

۹۱/۳/۷

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 فعالیت های 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 ۱۳۹۱ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکترعبدالحسین دلیمی ، مشاوره سرکارخانم دکتر فاطمه غفاری فروجناب آقای دکترمهدی فروزنده مقدم 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 ۴ : 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 ۴ رااز محل توقیف کتاب های عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب محسن اربابی دانشجوی رشته انگل شناسی پزشکی مقطع دکتری تخصصی تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی : محسن اربابی

تاریخ و امضا

۹۱/۴/۱۷

تقدیم به :

روح پدر بزرگوارم

مادر عزیز و فداکارم به پاس تمامی زحماتش

همسر فداکارم به پاس تحمل مشکلات و مشقات فراوان دوران تحصیل

فرزندان عزیزم به خاطر مشقات متحمل شده

خواهران و برادر عزیزم

تشکر و قدردانی

وظیفه خود می دانم تا از استاد بزرگوار و عظیم الشان جناب آقای دکتر عبدالحسین دلیمی که زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده داشتند و در تمامی مراحل آن مشوق من بودند صمیمانه تشکر و سپاسگزاری نمایم. از سرکار خانم دکتر فاطمه غفاری فرمدیر محترم گروه انگل شناسی و جناب آقای دکتر مهدی فروزنده که زحمت مشاوره این رساله را بر عهده داشتند، به خاطر مساعدت ها و راهنمایی های ارزنده شان قدردانی می نمایم. از جناب آقای دکتر جاوید صدرائی استاد محترم گروه انگل شناسی به خاطر مساعدت ها و زحمات فراوانشان در طول تحصیل اینجانب، کمال تشکر و قدردانی را دارم. از جناب آقای دکتر مجید پیرستانی به خاطر کمک ها و زحمات خالصانه و بی دریغ شان در طول انجام تحقیق از صمیم قلب تشکر می نمایم. از ناظرین و داوران محترم جناب آقای دکتر محبعلی، سرکار خانم دکتر شهلا محمدی و سرکار خانم دکتر فریبا خوش زبان که زحمت نظارت و داوری این رساله را بر عهده گرفتند، تشکر می نمایم.

از همکاری صمیمانه آقای دکتر شهاب الدین سروی، دکتر محمود محامی، دکتر راضی ناصری فر، دکتر مهدی دلاوری، دکتر مهدی عبدلی، دکتر منصور سیاح و دیگر دوستان و عزیزانی که مراد انجام این تحقیق یاری نمودند از صمیم قلب تشکر کرده و برایشان آرزوی سلامت و توفیق روز افزون دارم. از مسئولین فنی و دام پزشکان استان های مورد مطالعه که در انجام بازرسی های دام مساعدت فرمودند نهایت سپاسگزاری را دارم. از روسا و پرسنل محترم موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعب شهرستان ها که در امر نمونه گیری همکاری صمیمانه مبذول نمودند، سپاسگزاری می نمایم. از کارشناسان گروه انگل شناسی خانم ها قاسیمی و باغخانی و همچنین از جناب آقای رجبعلی ها که در طول تحصیل کمک های فراوانی نمودند، نهایت سپاسگزاری را دارم. از معاونت محترم آموزش و پژوهشی دانشکده پزشکی و دانشگاه که زمینه های انجام این تحقیق را فراهم نمودند، صمیمانه سپاسگزاری می نمایم.

چکیده

دیکروسلیازیس یک بیماری انگلی کبدی است که توسط گونه‌های دیکروسلیوم ایجاد می‌شود و دارای اهمیت بالینی برای انسان و علف‌خواران دربسیاری از نقاط جهان است. با توجه به اهمیت پزشکی، دام‌پزشکی و اقتصادی بیماری درایران، مطالعه حاضر باهدف شناسائی مولکولی ایزوله‌های گوسفندی و بزی دیکروسلیوم در مقایسه با شاخص‌های مرفومتریک انجام شد.

در مجموع ۸۰۰ ترماتود از کبد گوسفندان و بزهائی که به طور طبیعی آلوده شده بودند، از کشتارگاه‌های استان‌های آذربایجان شرقی، خراسان رضوی، مازندران، فارس، مرکزی، خوزستان و تهران جمع آوری گردید. ۱۸ شاخص و نسبت استاندارد مرفومتریک در انگل‌های بالغ دیکروسلیوم اندازه‌گیری و محاسبه و با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون های One-Way ANOVA و T-Test مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. برای انجام مطالعه مولکولی DNA انگل با استفاده ازکیت استخراج و واکنش PCR برای تکثیر نواحی(963bp)28S rDNA و ITS2 rDNA(236bp) از ۱۹۶ ایزوله دیکروسلیوم انجام شد. تکنیک PCR-RFLP برای تعیین گونه دیکروسلیوم با استفاده ازآنزیم‌های محدودالاثر Tru1I و Bfa1 طراحی واجرا گردید. تعداد ۳۷ نمونه دیکروسلیوم پس ازتعیین توالی مورد آنالیز فیلوژنی قرارگرفت.

نتایج نشان داد درمجموع ۰/۹۳ ٪ از دام ها آلوده بودند. شیوع عفونت دیکروسلیوم درگوسفند و بز به ترتیب ۰/۸۵٪ و۱/۲۹٪ بود. طول و عرض دیکروسلیوم در ۸ استان ایران درگوسفند به ترتیب ۰/۷۵۸±۶/۲۶۳ و ۰/۹۷۹±۱/۵۸۲ میلی‌متر و در بز ۰/۱۶۹±۵/۵۷۹ و ۰/۰۵۱±۱/۵۰۹ میلی‌متر بود (P<0.001).شاخص مهم مرفومتریک موقعیت بیضه نشان داد درتمامی ایزوله ها، بیضه ها پشت سرهم بودند. مقایسه همولوژیک توالی ها نشان داد، ناحیه 28S و ITS2 درتمامی ایزوله ها قطعه هایی به ترتیب به طول ۹۶۳bp و۲۳۶bp تشکیل داده بودند که مشابه موارد ثبت شده در بانک ژن بود. الگوی RFLP برای ناحیه 28S، ۳ جایگاه برش وبرای ناحیه ITS2یک ناحیه برش نشان داد. بررسی آنالیزهای فیلوژنیک براساس هر دو ناحیه 28S و ITS2 نشان داد که ایزوله های دیکروسلیوم گوسفندی و بزی تعیین توالی شده ، یک شاخه اصلی بر روی درخت فیلوژنی تشکیل می دهند.

روش‌های مرفومتریک در تشخیص و شناسائی اولیه دیکروسلیوم کاربرد دارد ولی تفکیک دقیق گونه، مستلزم بررسی‌های فیلوژنتیک با استفاده ازروش‌های مولکولی است. تحقیق حاضر برای اولین بار درمورد تعیین شاخص‌های مرفومتریک و تعیین فیلوژنی ایزوله های ایرانی دیکروسلیوم درمیزبانان و مناطق مختلف جغرافیائی ایران می‌باشد. نتایج حاصل از تعیین توالی و الگوهای RFLP نشان داد که تنها گونه دیکروسلیوم که باعث آلودگی درگوسفندان و بزهای ایرانی می‌شود، دیکروسلیوم دندریتیکوم می‌باشد.

کلمات کلیدی: دیکروسلیوم ، مطالعه مرفومتریک، شناسائی مولکولی، 28S & ITS2,rDNA, PCR-RFLP

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ومروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱.مقدمه ۲

۱-۲.تاریخچه کشف دیکروسلیوم ۴

۱-۳.طبقه بندی علمی دیکروسلیوم ۵

۱-۳-۱.راسته پلاژورکی فورم ۵

۱-۳-۲.تحت راسته پلاژورکیاتا ۶

۱-۳-۳.خانواده دیکروسلیئیده ۱۰

۱-۳-۴.جنس دیکروسلیوم ۱۱

۱-۳-۴-۱.دیکروسلیوم دندریتیکوم ۱۲

۱-۳-۴-۲.دیکروسلیوم هاسپس ۱۲

۱-۴.مرفولوژی دیکروسلیوم ۱۲

۱-۵.چرخه زندگی دیکروسلیوم ۱۴

۱-۵-۱.میزبان‌های نهائی دیکروسلیوم ۱۸

۱-۵-۲.میزبان‌های واسط دیکروسلیوم ۱۹

۱-۵-۳.وضعیت آلودگی حیوانات درایران ۲۲

۱-۵-۴.وضعیت آلودگی حیوانات درجهان ۲۳

۱-۵-۵.وضع آلودگی انسان درجهان وایران ۲۴

۱-۶-۵.انتقال آلودگی به انسان وحیوان ۲۵

۱-۶اپیدمیولوژی دیکروسلیازیس ۲۵

۱-۶-۱.عوامل محلی محیط وفاکتورهای اکولوژیکی ۲۷

۱-۶-۲.وجودواکولوژی میزبان های واسط ۲۷

۱-۶-۳.وجود نشخوارکنندگان ۲۹

۱-۷.بیماریزایی وعلائم بالینی دیکروسلیازیس ۳۰

۱-۷-۱.بیماری زائی وعلائم بالینی درانسان ۳۰

۱-۷-۲.بیماری زائی وعلائم بالینی درحیوان ۳۱

۱-۸.روش‌های تشخیص دیکروسلیازیس ۳۲

۱-۸-۱.تشخیص درانسان ۳۲

۱-۸-۲.تشخیص درحیوان ۳۲

۱-۹.درمان وپروفیلاکسی دیکروسلیازیس ۳۶

۱-۱۰.استراتژی‌های پیشگیری ازدیکروسلیازیس ۳۷

۱-۱۱.کاربردروش‌های مولکولی درانگل شناسی ۳۸

۱-۱۱-۱.واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) ۳۸

۱-۱۱-۲.مواد مورد نیاز انجام واکنش PCR ۴۰

۱-۱۱-۲-۱.DNA الگو ۴۰

۱-۱۱-۲-۲.آنزیم DNA پلیمرآز ۴۰

۱-۱۱-۲-۳. dNTPS ۴۱

۱-۱۱-۲-۴.کلرید منیزیم (MgCl2) ۴۲

۱-۱۱-۲-۵. آغازگرها ۴۲

۱-۱۱-۲-۶. بافرها ۴۳

۱ -۱۱- ۳.مراحل انجام سیکل حرارتی ۴۳

۱-۱۱-۳-۱.مرحله واسرشت سازی ۴۳

۱ -۱۱- ۳ -۲. مرحله اتصال ۴۳

۱ -۱۱– ۳-۳: مرحله گسترش ۴۴

۱-۱۱-۴.آشکار سازی محصول PCR ۴۴

۱-۱۱ -۵.RFLP ۴۵

۱-۱۱-۶. آنالیز فیلوژنتیک ۴۵

۱-۱۱-۶-۱. مفاهیم اصلی تکامل مولکولی ۴۵

۱-۱۱-۶ -۱-۱. اطلاعات ژنتیکی ۴۵
۱-۱۱-۶ -۱-۲. رمز ژنتیکی ۴۶
۱-۱۱-۷.تحلیل فیلوژنتیک مولکولی ۴۹
۱-۱۱-۸.درخت فیلوژنی ۵۰
۱-۱۱-۸-۱.انواع درخت فیلوژنی ۵۲
۱-۱۱-۸-۲.حالات مختلف یک صفت دردرخت فیلوژنی ۵۳
۱-۱۱-۸-۳.روش‌های ایجاددرخت فیلوژنی ۵۴
۱-۱۱-۸-۴. ارزیابی صحت درخت فیلوژنی ۵۷
۱-۱۲.مروری برمطالعات گذشته ۵۸
فصل دوم: مواد وروش‌ها ۶۲
۲-۱.جمع آوری نمونه‌ها ۶۴
۲-۱-۱. مشخصات اقلیمی وموقعیت جغرافیائی استان‌های مورد مطالعه ۶۴
۲-۱-۱-۱. موقعیت اقلیمی وجغرافیائی استان تهران ۶۴
۲-۱-۱-۲. موقعیت اقلیمی وجغرافیائی استان اصفهان ۶۶
۲-۱-۱-۳. موقعیت اقلیمی وجغرافیائی استان آذربایجان شرقی ۶۷
۲-۱-۱-۴. موقعیت اقلیمی وجغرافیائی استان خوزستان ۶۸
۲-۱-۱-۵. موقعیت اقلیمی وجغرافیائی استان مرکزی ۶۹
۲-۱-۱-۶.موقعیت اقلیمی وجغرافیائی استان خراسان رضوی ۷۰
۲-۱-۱-۷. موقعیت اقلیمی وجغرافیائی استان فارس ۷۱
۲-۱-۱-۸. موقعیت اقلیمی وجغرافیائی استان مازندران ۷۲
۲-۱-۲. روش نمونه گیری ۷۳
۲-۱-۲-۱. وسایل نمونه گیری و آماده سازی نمونه‌ها ۷۳
۲-۱-۲-۲. طرز تهیه بافر فسفات سالین (PBS) ۷۳
۲-۱-۲-۳. نحوه انجام نمونه گیری وآماده سازی نمونه‌ها ۷۴
۲-۲. مطالعه مرفومتریک ۷۵

۲-۲-۱. وسایل تشخیص شاخص‌های مرفومتریک ۷۵
۲-۲-۱-۱. واسنجی میکرومتر ۷۵
۲-۲-۱-۲. شاخص‌ها ونسبت‌های مرفومتریک دیکروسلیوم ۷۷
۲-۲-۱-۳. آنالیز آماری داده‌های مرفومتریک ۷۹
۲-۳. مطالعات مولکولی ۸۰
۲-۳-۱ .استخراج DNA ۸۰
۲-۳-۱-۱. موادووسایل مورد نیاز استخراجDNA ۸۰
۲-۳-۱-۲ . نکات ضروری قبل ازاستخراج DNA ۸۱
۲-۳-۱-۳. استخراج DNA ژنومی بااستفاده ازکیت ۸۱
۲-۳-۱-۵.مراحل استخراج DNA بااستفاده ازکیتAccuPrep® Genomic DNA Extraction ۸۳
۲-۳-۱-۶. اندازه گیری غلظت وکیفیت DNA ۸۴
۲-۳-۲. واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) ۸۵
۲ -۳ -۲- ۱. وسایل وموارد مورد نیاز واکنش PCR ۸۵
۲-۳-۲-۲. پرایمرهای مورد استفاده ۸۶
۲-۳-۲-۳ . برنامه حرارتی PCR برای نواحی ITS2 و 28S ۸۶
۲-۳-۲-۴ . مراحل قبل ازانجام واکنش PCR ۸۷
۲-۳-۲-۵ . روش انجام واکنش PCR ۸۸
۲-۳-۲-۶ . آشکارسازی محصولPCR ۸۸
۲-۳-۳.PCR –RFLP ۸۹
۲-۳-۳-۱.طراحی آنزیم محدودالاثر ۸۹
۲-۳-۳-۲ . مواد ووسایل مورد نیاز انجام PCR-RFLP ۹۰
۲-۳-۳-۳. بهینه سازی PCR-RFLP ۹۱
۲-۳-۳-۴ .نحوه انجام PCR-RFLP ۹۱
۲-۳-۳-۵. آشکار سازی و آنالیز محصولات RFLP ۹۲
۲-۳-۴ . الکتروفورزژل ۹۲

۲-۳-۴-۱ . مواد ووسایل موردنیازالکتروفورزژل آگارز ۹۲
۲-۳-۴-۲. طرز تهیه محلول‌ها و بافرهای الکتروفورز ژل ۹۳
۲-۳-۴-۳. طرز تهیه ژل آگارز برای الکتروفورز ۹۳
۲-۳-۴-۴. بارگذاری نمونه درچاهک‌های ژل وانجام الکتروفورز ۹۴
۲-۳-۵. تعیین توالی ۹۵
۲-۳-۵-۱. مواد ووسایل مورد نیاز تخلیص محصول PCR ازژل آگارز ۹۵
۲-۳-۵-۲.روش انجام تخلیص محصول PCR ازژل آگارز ۹۶
۲-۳-۶ . آنالیز فیلوژنتیک ۹۷
فصل سوم: نتایج ویافته‌ها ۹۹
۳ -۱.یافته های بررسی شیوع وشدت آلودگی به دیکروسلیازیس درگوسفندوبز ۱۰۰
۳-۲.یافته های بررسی مرفومتریک ۱۱۰
۳-۳. یافته های بررسی های مولکولی ۱۳۴
۳-۳- ۱.نتایج PCR ناحیه ITS2 انگل دیکروسلیوم ۱۳۵
۳-۳-۲. نتایج PCR ناحیه28S دیکروسلیوم ۱۳۸
۳-۳ -۳.نتایج PCR ناحیهITS1دیکروسلیوم ۱۴۰
۳-۳-۴. نتایج PCR – RFLP ناحیه ITS2 ۱۴۲
۳-۳-۵. نتایج PCR–RFLP ناحیه 28S ۱۴۵
۳-۳-۶. نتایج تعیین توالی ناحیه ITS2 ۱۴۸
۳-۳-۷. نتایج تعیین توالی ناحیه 28S ۱۴۸
۳-۳-۸: نتایج همردیفی چند گانه (MULTIP ALIGNMENT) ۱۴۹
۳-۳-۸-۱. نتیجه همترازی چندگانه توالی های ناحیهITS2 ایزوله های گوسفندی وبزی دیکروسلیوم دندریتیکوم جمع آوری شده از۸ استان کشور ۱۵۱
۳-۳-۸-۲. نتیجه همترازی چندگانه توالی‌های ناحیه28S ایزوله‌های گوسفندی وبزی دیکروسلیوم دندریتیکوم جمع آوری شده از ۸ استان کشور ۱۵۳
۳-۳-۸-۳.مقایسه میزان تشابه ژنتیکی ناحیه ITS2 بین ایزوله‌های دیکروسلیوم دندریتیکوم جمع آوری شده از ۸

استان کشور ۱۵۸
۳-۳-۸-۴.مقایسه میزان تشابه ژنتیکی ناحیه 28S بین ایزوله‌های دیکروسلیوم دندریتیکوم جمع آوری شده از ۸ استان مورد مطالعه ۱۶۲
۳-۳-۹. ترسیم درخت فیلوژنی ۱۶۵
فصل چهارم : بحث ، نتیجه گیری وپیشنهادها ۱۷۲
۴ - ۱.بحث ۱۷۳
۴-۲ . نتیجه گیری نهائی ۱۸۵
۴-۳. پیشنهادها ۱۸۷
فهرست منابع ۱۸۸
ضمائم ۲۰۱
چکیده انگلیسی ۲۰۹

فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۱. خانواده‌ها، جنس‌ها وگونه‌های راسته پلاژیورکیدا ۷

جدول ۱-۲ . گونه‌های حلزون میزبان واسط دیکروسلیوم دندریتیکوم ۲۰

جدول ۱-۳. گونه‌های مورچه میزبان واسط دیکروسلیوم دندریتیکوم ۲۱

جدول ۱-۴. وضعیت آلودگی به دیکروسلیوم در دام‌های ایران ۲۲

جدول ۱-۵ . وضعیت آلودگی به دیکروسلیوم حیوانات مناطق مختلف ۲۳

جدول ۱-۶ . موارد آلودگی انسان به ترماتودکبدی دیکروسلیوم ازنقاط مختلف جهان..... ۲۴

جدول ۲-۱. اندازه میکرومتر چشمی ، عدسی شیئی با بزرگ نمائی ۴ ، ۱۰ و۴۰..... ۷۷

جدول ۲-۲. ثبت مشخصات واندازه شاخص‌های مرفومتریک ایزوله‌های ایرانی دیکروسلیوم..... ۷۹

جدول۲-۳. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده دراین تحقیق..... ۸۶

جدول ۲-۴. برنامه حرارتی PCR برای تکثیرنواحی ITS2،28S و ITS1..... ۸۷

جدول ۲-۵ . مقادیر مورد نیاز برای واکنش PCR..... ۸۷

جدول ۲-۶. مراحل آماده سازی Master mixture برای یک واکنشRFLP..... ۹۱

جدول ۳-۱ . توزیع فراوانی دیکروسلیازیس گوسفندی وبزی در مناطق مختلف جغرافیائی کشور..... ۱۰۰

جدول۳-۲. شیوع دیکروسلیازیس گوسفندی دراستان‌های مورد مطالعه ۱۰۱

جدول ۳–۳. شیوع دیکروسلیازیس بزی دراستان‌های مورد مطالعه..... ۱۰۲

جدول ۳-۴. تعداد دیکروسلیوم جداشده درگوسفند ۸ استان کشور..... ۱۰۲

جدول ۳–۵ . تعداددیکروسلیوم جداشده در بز ۸استان کشور..... ۱۰۳

جدول ۳-۶ . مقایسه تعداد دیکروسلیوم جدا شده درگوسفند وبز ۱۰۴

جدول ۳-۷. توزیع شدت آلودگی به دیکروسلیوم در ایزوله‌های گوسفندی نروماده ۱۰۴

جدول ۳-۸. توزیع شدت آلودگی به دیکروسلیوم در ایزوله‌های بزی نروماده ۱۰۵
جدول۳-۹. مقایسه آماری تعداد دیکروسلیوم درگوسفندان مناطق تحت مطالعه ۱۰۵
جدول۳– ۱۰. مقایسه آماری تعداددیکروسلیوم دربزهای مناطق تحت مطالعه..... ۱۰۶
جدول ۳-۱۱ . توزیع فراوانی نسبی ومطلق کبدهای ضبطی دراثر آلودگی به دیکروسلیوم ۱۰۷
جدول ۳-۱۲ . زیان اقتصادی ناشی از دیکروسلیازیس گوسفندی وبزی در ۸ استان مورد مطالعه..... ۱۰۸
جدول ۳-۱۳ . زیان اقتصادی سالیانه ناشی از دیکروسلیازیس گوسفندی وبزی در۸ استان کشور ۱۰۹
جدول ۳-۱۴ . زیان اقتصادی سالیانه ناشی از دیکروسلیازیس گوسفندی در ۸ استان کشور..... ۱۰۹
جدول ۳–۱۵. زیان اقتصادی ناشی از دیکروسلیازیس بزی در ۸ استان کشور..... ۱۱۰
جدول ۳–۱۶. توزیع فراوانی دیکروسلیوم جمع آوری شده در۸ استان کشوربه تفکیک میزبان..... ۱۱۰
جدول۳-۱۷. نتایج شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم در ۸ استان ایران ۱۱۳
جدول۳-۱۸. مقایسه شاخص‌های مرفومتریک ایزوله های گوسفندی و ایزوله‌های بزی..... ۱۱۴
جدول۳-۱۹. نتایج شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم دراستان مرکزی ۱۱۵
جدول۳-۲۰. نتایج شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم دراستان اصفهان ۱۱۶
جدول۳-۲۱. نتایج شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم دراستان خوزستان..... ۱۱۷
جدول۳-۲۲. نتایج شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم دراستان آذربایجان شرقی ۱۱۸
جدول۳-۲۳. نتایج شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم دراستان مازندران..... ۱۱۹
جدول۳-۲۴. نتایج شاخص های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم دراستان فارس ۱۲۰
جدول۳-۲۵. نتایج شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم دراستان خراسان رضوی ۱۲۱
جدول۳-۲۶. نتایج شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم دراستان تهران..... ۱۲۲
جدول۳-۲۷ . نتایج شاخص‌های مرفومتریک دیکروسلیوم دندریتیکوم در۸ استان ایران ۱۲۳
جدول۳-۲۸. مقایسه آماری طول وعرض بدن ، نسبت طول به عرض بدن و قطر داخلی بادکش دهانی دیکروسلیوم دندریتیکوم گوسفندی ۱۲۴

جدول۳-۲۹. مقایسه آماری قطر خارجی بادکش دهانی، قطرداخلی وخارجی بادکش شکمی، نسبت بادکش شکمی به بادکش دهانی‌گوسفندی ۱۲۵

جدول۳-۳۰. مقایسه آماری طول و عرض بیضه ، طول غدد زرده و نسبت طول بدن به طول غدد زرده گوسفندی ۱۲۶

جدول۳-۳۱. مقایسه آماری فاصله بین بادکش شکمی تا انتهای بدن، طول وعرض تخمدان وطول کیسه سیر گوسفندی ۱۲۷

جدول۳-۳۲. مقایسه فاصله بین بادکش شکمی وبادکش دهانی‌گوسفندی ۱۲۸

جدول۳-۳۳. مقایسه طول و عرض بدن ، نسبت طول به عرض بدن وقطر داخلی بادکش دهانی بزی..... ۱۲۸

جدول۳-۳۴. مقایسه قطرخارجی بادکش دهانی ، قطرداخلی وخارجی بادکش شکمی ، نسبت بادکش شکمی به بادکش دهانی بزی..... ۱۲۹

جدول۳-۳۵. مقایسه طول وعرض بیضه ، طول غدد زرده ونسبت طول بدن به طول غدد زرده بزی..... ۱۳۰

جدول۳-۳۶. مقایسه فاصله بین بادکش شکمی تاانتهای بدن ، طول کیسه سیر،طول وعرض تخمدان بزی ۱۳۱

جدول۳-۳۷. مقایسه فاصله بین بادکش شکمی تا بادکش دهانی بزی..... ۱۳۲

جدول۳-۳۸. توزیع نرمال طول وعرض دیکروسلیوم دندریتیکوم درایران..... ۱۳۲

جدول۳-۳۹. مقایسه میانگین شاخص‌های مرفومتریک ایزوله‌های گوسفندی وبزی با ایزوله‌های گوسفندی و گاوی دراسپانیا..... ۱۳۳

جدول۳-۴۰. مقایسه میانگین شاخص‌های مرفومتریک ایزوله‌های گوسفندی وبزی در ۸ استان ایران با دیکروسلیوم چایننسیس آهوئی دراسپانیا وژاپن..... ۱۳۴

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱. مرفولوژی ترماتودکبدی دیکروسلیوم دندریتکوم.. ۱۴

شکل ۱-۲. چرخه زندگی انگل‌های دیکروسلیوم ۱۸

شکل۱-۳. انتشار جغرافیائی گونه‌های دیکروسلیوم درجهان..... ۲۶

شکل ۱-۴. آنزیم DNA پلیمراز..... ۴۱

شکل ۱-۵. باکتری ترموس آکواتیکوس..... ۴۱

شکل ۲-۱. موقعیت جغرافیایی استان تهران..... ۶۵

شکل ۲-۲. موقعیت جغرافیایی استان اصفهان..... ۶۶

شکل ۲-۳. موقعیت جغرافیایی استان آذربایجان شرقی ۶۷

شکل ۲-۴. موقعیت جغرافیایی استان خوزستان..... ۶۹

شکل ۲-۵. موقعیت جغرافیایی استان مرکزی..... ۶۹

شکل ۲-۶. موقعیت جغرافیایی استان خراسان رضوی ۷۰

شکل ۲-۷. موقعیت جغرافیایی استان فارس..... ۷۱

شکل ۲-۸. موقعیت جغرافیایی استان مازندران..... ۷۲

شکل۲-۹. شکل شماتیک فلوک کبدی دیکروسلیوم..... ۷۸

شکل۳-۱. کبد غیر طبیعی آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم ۱۰۶

شکل۳- ۲. تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد آلوده به دیکروسلیوم دندریتیکوم ۱۰۷

شکل ۳-۳. تصویر شماتیک ناحیه ITS2 از DNA ریبوزومی ۱۳۵

شکل۳-۴. الکتروفورزمحصولPCR-Gradient اول ناحیه ITS2 دردماهای مختلف ۱۳۵

شکل۳-۵ . الکتروفورز محصولPCR-Gradient دوم ناحیه ITS2دردماهای مختلف..... ۱۳۵

شکل۳-۶ . الکتروفورز محصول PCR ناحیه ITS2 بااستفاده از پرایمرهای DdF1 وDdR1 ، نمونه‌های استان تهران ۱۳۶

شکل۳-۷. الکتروفورز محصول PCR ناحیه ITS2 بااستفاده ازپرایمرهایDdF1 وDdR1 ، نمونه‌های استان اصفهان ۱۳۷

شکل۳-۸ . الکتروفورز محصولPCR ناحیه ITS2 بااستفاده ازپرایمرهایDdF1 و DdR1 ، نمونه‌های استان آذربایجان شرقی ۱۳۷

شکل۳-۹. الکتروفورز محصولPCR ناحیه ITS2 بااستفاده ازپرایمرهایDdF1 وDdR1 ، نمونه‌های استان خوزستان ۱۳۷

شکل ۳-۱۰. تصویر شماتیک ناحیه 28S از DNA ریبوزومی..... ۱۳۸

شکل۳-۱۱. الکتروفورز محصولPCR-Gradient ناحیه 28S دردماهای مختلف ۱۳۸

شکل۳-۲ . الکتروفورز محصولPCR ناحیه 28S بااستفاده از پرایمرهای DdF2 و DdR2 ، نمونه‌های استان تهران ۱۳۹

شکل۳-۱۳. الکتروفورز محصولPCR ناحیه 28S بااستفاده از پرایمرهای DdF2 و DdR2، نمونه‌های استان اصفهان..... ۱۳۹

شکل۳-۱۴ . الکتروفورز محصولPCR ناحیه 28S بااستفاده از پرایمرهای DdF2 و DdR2 ، نمونه‌های استان آذربایجان شرقی..... ۱۳۹

شکل۳-۱۵. الکتروفورز محصولPCR ناحیه 28S بااستفاده از پرایمرهای DdF2 و DdR2 ، نمونه‌های استان خوزستان ۱۴۰

شکل ۳-۱۶. تصویر شماتیک ناحیه ITS1 از DNA ریبوزومی..... ۱۴۰

شکل۳-۱۷ . الکتروفورزمحصولPCR-Gradient اول ناحیه ITS1 دردماهای مختلف..... ۱۴۱

شکل۳-۱۸. الکتروفورزمحصولPCR-Gradient دوم ناحیه ITS1 دردماهای مختلف..... ۱۴۱

شکل۳-۱۹. الکتروفورزمحصول ناحیه ITS1 ، بهینه شده دردمای ۷۰°C ۱۴۱

شکل ۳-۲۰. الکتروفورز محصول PCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان تهران..... ۱۴۲

شکل ۳-۲۱. الکتروفورز محصول PCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی استان مرکزی..... ۱۴۲

شکل ۳-۲۲. الکتروفورز محصول PCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی استان اصفهان..... ۱۴۳

شکل ۳-۲۳. الکتروفورز محصول PCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان فارس..... ۱۴۳

شکل ۳-۲۴: الکتروفورز محصول PCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان خوزستان..... ۱۴۳

شکل ۳-۲۵: الکتروفورز محصول PCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان آذربایجان شرقی ۱۴۳

شکل ۳-۲۶. الکتروفورز محصول PCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان مازندران..... ۱۴۴

شکل ۳-۲۷. الکتروفورز محصولPCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی و بزی استان خراسان رضوی..... ۱۴۴

شکل ۳-۲۸. الکتروفورز محصولPCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان تهران..... ۱۴۵

شکل ۳-۲۹. الکتروفورز محصولPCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان مرکزی ۱۴۵

شکل ۳-۳۰. الکتروفورز محصول PCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان اصفهان ۱۴۶

شکل ۳-۳۱. الکتروفورز محصولPCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان فارس ۱۴۶

شکل ۳-۳۲ . الکتروفورز محصولPCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان خوزستان..... ۱۴۶

شکل ۳-۳۳ . الکتروفورز محصولPCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان آذربایجان شرقی ۱۴۷

شکل ۳-۳۴ . الکتروفورز محصولPCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان مازندران..... ۱۴۷

شکل ۳-۳۵. الکتروفورز محصولPCR – RFLP ایزوله‌های گوسفندی وبزی استان خراسان رضوی ۱۴۷

شکل ۳-۳۶. درخت فیلوژنی ایزوله‌های ایرانی دیکروسلیوم دندریتیکوم براساس ناحیه 28S..... ۱۶۶

شکل ۳-۳۷. درخت فیلوژنی ایزوله‌های ایرانی دیکروسلیوم دندریتیکوم براساس ناحیه 28S ومقایسه آن‌ها با ترماتودهای راسته پلاژیورکیدا..... ۱۶۷

شکل ۳-۳۸. درخت فیلوژنی ایزوله‌های ایرانی دیکروسلیوم دندریتیکوم بزی براساس ناحیه 28S..... ۱۶۸

شکل ۳-۳۹. درخت فیلوژنی ایزوله‌های ایرانی دیکروسلیوم دندریتیکوم گوسفندی براساس ناحیه 28S..... ۱۶۸

شکل ۳-۴۰. درخت فیلوژنی ایزوله‌های ایرانی دیکروسلیوم دندریتیکوم براساس ناحیه ITS2..... ۱۶۹

شکل ۳-۴۱. درخت فیلوژنی ایزوله‌های ایرانی دیکروسلیوم دندریتیکوم براساس ناحیه ITS2 ومقایسه آن‌ها با ترماتودهای راسته پلاژیورکیدا..... ۱۷۰

شکل ۳-۴۲. درخت فیلوژنی ایزوله‌های ایرانی دیکروسلیوم دندریتیکوم بزی براساس ناحیه ITS2..... ۱۷۱

شکل۳-۴۳. درخت فیلوژنی ایزوله‌های ایرانی دیکروسلیوم دندریتیکوم گوسفندی براساس ناحیه ITS2 .۱۷۱