

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد انگل شناسی دامپزشکی

عنوان: طراحی و ارزیابی الیزای غیر مستقیم جهت تشخیص فاسیولوز گاوان

نگارش: جعفر ارجمند یامچی

استاد راهنمای اول

جناب آقای دکتر محمد حسین راضی جلال

استاد راهنمای دوم

جناب آقای دکتر صالح اسماعیل زاده

استاد مشاور

جناب آقای دکتر مسعود قربانپور

داور

جناب آقای دکتر حسین حمیدی نجات

داور

جناب آقای دکتر علیرضا قدردان

دیماه ۱۳۸۹

### چکیده پایان نامه

نام خانوادگی: ارجمند یامچی	نام: جعفر
عنوان پایان نامه: طراحی و ارزیابی الیزای غیر مستقیم جهت تشخیص فاسیولوز گاوان	
استاد راهنما: دکتر محمد حسین راضی جلالی، دکتر صالح اسماعیل زاده	
درجه تحصیلی: کارشناسی ارشد	رشته: دامپزشکی
گرایش: انگل شناسی	
دانشگاه: شهید چمران اهواز	
دانشکده: دامپزشکی	
تاریخ فارغ التحصیلی: ۱۳۸۹/۱۰/۲۶	تعداد صفحه: ۹۲
کلید واژه ها: فاسیولاژیگانیتیکا، گاو، الیزای غیر مستقیم، آنتی ژن خام، آنتی ژن دفعی - ترشحي	
<p>فاسیولوز یک بیماری انگلی مهم در نشخوارکنندگان بوده که فاسیولا ژیگانیتیکا (کرم کبدي گرمسیری) و فاسیولا هیپاتیکا (کرم کبدي معتدل) عوامل ایجاد کننده آن می باشند. آلودگی به این انگل باعث بروز ضایعات فراوان در پارانثیم کبد و مجاری صفراوی، بروز کم خونی، کاهش تولیدات دامی (گوشت، شیر و پشم) و ضبط کبدهای آلوده در کشتارگاه شده و خسارات اقتصادی زیادی را وارد می سازد. تشخیص فاسیولوز با روش آزمایش مدفوع به دلیل حساسیت کم و نیاز به گذراندن دوره باروری در کرم بالغ چالش بر انگیز است. در این مطالعه، با استفاده از آنتی ژن های دفعی - ترشحي و خام، الیزای غیر تجاری به عنوان یکی از حساس ترین آزمایش ها برای تشخیص این بیماری در گاو مورد ارزیابی قرار گرفت. دو گروه از گاوان شامل، ۵۰ راس آلوده و ۵۰ راس غیر آلوده به فاسیولاژیگانیتیکا با این روش مورد ارزیابی قرار گرفتند. همهی سرم های جمع آوری شده به وسیله الیزای غیر تجاری، با غلظت بهینه آنتی ژن (۱ میکروگرم در هر حفره) مورد بررسی قرار گرفتند. در الیزای طراحی شده رقت مناسب سرم ۱/۱۰ و رقت مناسب کونژوگه پراکسیداز ضد IgG گاوی ۱/۸۰۰۰، رقت مناسب آنتی ژن دفعی - ترشحي و خام به ترتیب ۱/۱۷۰ و ۱/۳۶۰۰ به دست آمد. پس از به کار گیری این روش حساسیت، ویژگی، دقت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی برای آنتی ژن دفعی - ترشحي به ترتیب ۸۸٪، ۸۰٪، ۸۵٪، ۸۱/۴۸٪ و ۸۶/۹۵٪ و برای آنتی ژن خام به ترتیب ۹۰٪، ۷۴٪، ۸۲٪، ۷۷/۵٪ و ۸۸٪ محاسبه گردید. در مجموع نتیجه گیری می شود، الیزای غیرمستقیم با استفاده از آنتی ژن های دفعی - ترشحي می تواند به عنوان یک روش تشخیصی سریع سرمی، در تشخیص فاسیولوز در نظر گرفته شود.</p>	

فصل اول (مقدمه و هدف)

مقدمه و هدف ..... ۱

فصل دوم (مروری بر منابع موجود)

الف - کلیاتی در مورد گاو ..... ۵

الف - ۱ - جایگاه گاو در رده بندی جانوری ..... ۵

الف - ۱ - ۱ - اهمیت پرورش گاو ..... ۵

الف - ۱ - ۲ - اهمیت بیماری های انگلی در گاو ..... ۶

ب - طبقه بندی کرم های پهن ..... ۷

ب - ۱ - رده ترماتودا ..... ۸

ب - ۱ - ۱ - تحت رده دیژنه آ ..... ۸

ب - ۱ - ۱ - ۱ - جنس فاسیولا ..... ۸

ج - مورفولوژی فاسیولا هیاتیکا و فاسیولا ریگانتیکا ..... ۹

ج - ۱ - فاسیولا هیاتیکا ..... ۹

ج - ۲ - فاسیولا ریگانتیکا ..... ۱۰

د - محل، میزبان ها و پراکندگی جغرافیایی فاسیولا هیاتیکا ..... ۱۱

د - ۱ - وضعیت آلودگی در ایران ..... ۱۱

ه - محل، میزبان ها و پراکندگی جغرافیایی فاسیولا ریگانتیکا ..... ۱۲

- ه- ۱- وضعیت آلودگی در ایران ..... ۱۲
- و - سیر تکامل ..... ۱۲
- و - ۱- فاسیولا هیپاتیکا ..... ۱۲
- و - ۲- فاسیولا ژیگانتیکا ..... ۱۷
- ز - اکولوژی حلزون های میزبان واسط ..... ۱۹
- ز - ۱- فاسیولا هیپاتیکا ..... ۱۹
- ز - ۲- فاسیولا ژیگانتیکا ..... ۲۰
- ح - بیماری زایی فاسیولا ..... ۲۲
- ح - ۱- فاسیولوز حاد ..... ۲۳
- ح - ۲- فاسیولوز تحت حاد ..... ۲۴
- ح - ۳- فاسیولوز مزمن ..... ۲۶
- ح - ۴- بیماری زایی در گاو ..... ۲۷
- ح - ۵- فاسیولا ژیگانتیکا ..... ۲۸
- ط - آسیب شناسی فاسیولوز ..... ۲۸
- ط - ۱- نوزاد های مهاجر ..... ۲۸
- ط - ۲- بالغ ..... ۳۰

- ی - همه گیرشناسی فاسیولوز ..... ۳۱
- ک - تشخیص ..... ۳۲
- ک - ۱ - روش های سرولوژی ..... ۳۴
- ک - ۲ - آزمایش های آنزیمی سرم ..... ۳۴
- ل - ایمنی زایی در برابر فاسیولا ..... ۳۵
- ل - ۱ - گو سفند ..... ۳۵
- ل - ۲ - گاو ..... ۳۵
- م - درمان ..... ۳۶
- ن - پیشگیری ..... ۳۸
- س - کلیاتی پیرامون روش های سرولوژیک والایزا ..... ۳۹
- س - ۱ - روش الایزا ..... ۴۰
- س - ۱ - ۱ - الایزای مستقیم براساس جذب یا پوشش دهی آنتی ژن ..... ۴۱
- س - ۱ - ۲ - الایزای مستقیم براساس جذب یا پوشش دهی آنتی بادی ..... ۴۲
- س - ۱ - ۳ - الایزای غیر مستقیم بر اساس جذب یا پوشش دهی آنتی ژن ..... ۴۳
- س - ۱ - ۴ - الایزای ساندویچ ..... ۴۳
- س - ۱ - ۴ - ۱ - ساندویچ مستقیم ..... ۴۳

س ۱-۴-۲ ساندویچ الیزای غیرمستقیم..... ۴۴

س ۲- شاخص‌های ارزیابی آزمایش‌های سرولوژیک..... ۴۵

س ۲-۱- دقت..... ۴۵

س ۲-۱-۱- فاکتورهای موثر بر روی دقت..... ۴۶

س ۲-۲- خطاهای احتمالی در طول آزمایش..... ۴۷

س ۲-۲-۱- خطاهای مربوط به مواد اولیه و معرف‌ها..... ۴۷

س ۲-۲-۲- خطاهای ناشی از مرحله جدا سازی..... ۴۷

س ۲-۲-۳- خطاهای ناشی از عدم تعادل..... ۴۸

س ۲-۲-۴- خطاهای ناشی از استانداردها..... ۴۹

س ۲-۲-۵- سایر خطاها..... ۴۹

س ۲-۳- حساسیت..... ۴۹

س ۲-۴- صحت..... ۵۰

س ۳- ویژگی یا واکنشهای متقاطع..... ۵۰

فصل سوم (مواد و روش کار)

الف- مواد مورد استفاده..... ۵۳

ب- وسایل مورد استفاده..... ۵۴

ج- روش کار ..... ۵۷

ج-۱ - تهیه مقاطع پاتولوژیکی ..... ۵۷

ج-۲ - جداسازی و نگهداری سرم ..... ۵۸

ج-۳ - تهیه آنتی ژن خام ..... ۵۸

ج-۴ - روش تهیه آنتی ژن دفعی - ترشچی ..... ۵۹

ج-۵ - سنجش میزان پروتئین ..... ۵۹

ج-۶ - به دست آوردن رقت های مناسب آنتی ژن، سرم، و کونزوگه در آزمایش الیزا ..... ۶۰

ج-۷ - انجام آزمایش الیزا برای نمونه های مورد بررسی ..... ۶۱

ج-۸ - محاسبه شاخص های آزمایش الیزا ..... ۶۴

فصل چهارم (نتایج)

الف- نتایج بررسی کشتارگاهی ..... ۶۷

ب - نتایج آزمایش الیزا ..... ۶۷

ج- بررسی واکنش مقاطع فاسیولا ژیگانتیکا با دیکروسلیوم دندرتیکوم ..... ۷۲

د- بررسی واکنش مقاطع فاسیولا ژیگانتیکا با کیست هیداتیک ..... ۷۲

فصل پنجم (بحث و نتیجه گیری)

بحث و نتیجه گیری ..... ۷۵



پیشنهادات..... ۸۴

منابع..... ۸۵

## فصل دوم

تصویر شماره ۱-۲: شکل ۱-۲: کرم بالغ فاسیولا ژیگانیتیکا ..... ۱۰

تصویر شماره ۲-۲: تخم فاسیولا ژیگانیتیکا ..... ۱۰

تصویر شماره ۳-۲: سیر تکاملی فاسیولا هیپاتیکا ..... ۱۷

تصویر شماره ۴-۲: سیر تکاملی فاسیولا ژیگانیتیکا ..... ۱۷

## فصل سوم

تصویر ۳-۱: پلیت الیزا بعد از اضافه کردن سوبسترا-کروموژن ..... ۶۳

تصویر ۳-۲: توقف واکنش الیزا با اضافه کردن اسید سولفوریک ۲ نرمال ..... ۶۳

## فصل چهارم

تصویر ۴-۳: یکی از محل های مهاجرت انگل در بافت کبد به شکل نکروز، خونریزی و نفوذ سلول-های آماسی (رنگ آمیزی H&E,  $\times 10$ ) ..... ۷۳

تصویر ۴-۴: بخش از تصویر ۴-۳ با بزرگ‌نمایی بیشتر. به نفوذ ائوزینوفیل‌ها با سیتوپلاسم قرمز رنگ و هسته چند قسمتی همراه با ناپدید شدن سلول‌های کبدی توجه شود (رنگ آمیزی H&E,  $\times 40$ ) ..... ۷۳

تصویر ۴-۵: مقطعی از کرم بالغ فاسیولا ژیگانیتیکا در درون مجرای صفراوی داخل کبدی. به خارهای مشخص تگومنتی (↑)، هیپرپلازی غدد موکوسی (↕) دیواره مجرای صفراوی و فیروز اطراف مجرا (↗) توجه شود (رنگ آمیزی H&E,  $\times 10$ ) ..... ۷۴

## فصل چهارم (نتایج)

جدول ۴-۱: شاخص‌های آزمایش الیزا با آنتی‌ژن خام فاسیولا ژیگانیتیکا جهت تشخیص فاسیولا

ژیگانیتیکا (جستجوی آنتی‌بادی) در گاو به روش الیزای غیرمستقیم..... ۶۸

جدول ۴-۲: شاخص‌های آزمایش الیزا با آنتی‌ژن دفعی - ترش‌حی فاسیولا ژیگانیتیکا جهت تشخیص

فاسیولا ژیگانیتیکا (جستجوی آنتی‌بادی) در گاو به روش الیزای غیرمستقیم .. ۶۹

جدول ۴-۳: نتایج تفکیکی آزمایش الیزای غیرمستقیم و هیستوپاتولوژی گاوان آلوده به فاسیولا

ژیگانیتیکا در کشتارگاه اهواز..... ۷۰

## فصل اول

---

---

### مقدمه و هدف

---

---

## فصل اول (مقدمه و هدف)

افزایش روز افزون جمعیت انسانی و احتیاج هر چه بیشتر به مواد پروتئینی به خصوص پروتئین حیوانی، توجه بیشتر به امر دامپروری را اجتناب ناپذیر نموده است. برای جلوگیری از خروج ارز از کشور و پیشبرد اقتصاد در امر دامپروری و جلوگیری از صرف هزینه‌های هنگفت درمانی بیماری‌های دام‌ها لازم است مطالعات دقیقی در مورد بیماری‌های دامی صورت گیرد (۷).

فرآورده‌های دامی نظیر شیر، گوشت و تخم مرغ مهم‌ترین و با ارزش‌ترین مواد غذایی مورد مصرف انسان هستند. در شرایط کنونی جامعه ایران، این فرآورده‌ها قسمت زیادی از احتیاجات پروتئینی مورد نیاز جامعه را تامین می‌کنند (۷).

بنابراین با توجه به نیاز مردم به پروتئین حیوانی می‌بایست با تشخیص به موقع و درمان بیماری‌هایی که باعث ضبط کلی و یا موضعی لاشه می‌شود، از خسارات اقتصادی فراوانی که وارد می‌سازند، جلوگیری نمود. این امر مهم با تحقیقات اساسی و کاربردی بر روی بیماری‌های دامی ممکن می‌شود (۷).

فاسیولوز<sup>۱</sup> یک بیماری انگلی مهم در نشخوارکنندگان بوده که فاسیولاژیگانتیکا<sup>۲</sup> (کرم کبدی گرمسیری)<sup>۳</sup> و فاسیولا هپاتیکا<sup>۴</sup> (کرم کبدی معتدل)<sup>۵</sup> عوامل ایجادکننده آن می‌باشند (۵۶ و ۲۷). آلودگی به این انگل باعث بروز ضایعات فراوان در پارانیشیم کبد و مجاری صفراوی، بروز کم خونی، کاهش تولیدات دامی (گوشت، شیر و پشم) و ضبط کبدهای آلوده در کشتارگاه شده و خسارات اقتصادی زیادی را وارد می‌سازد. فاسیولوز به عنوان یک بیماری مشترک مهم نیز مطرح است. تشخیص قطعی آلودگی به این انگل از طریق آزمایش مدفوع امکان پذیراست، لیکن در زمان ظهور تخم در مدفوع عمده ضایعات ظاهر شده و تشخیص در آن زمان کمک چندانی به درمان نمی‌کند (۲۸، ۲۹، ۵۹).

این مطالعه برآنست تا روشی جهت تشخیص زودرس این بیماری ارایه نماید تا امکان درمان به موقع در گاوهای آلوده به فاسیولا میسر گردد.

---

1- Fasciolosis.  
2- *Fasciola gigantica*.  
3-Tropical liver fluke.  
4- *Fasciola hepatica*.  
5- Temperate liver fluke.

## فصل دوم

---

### مروری بر منابع موجود

---

## الف - کلیاتی در مورد گاو:

### الف-۱- جایگاه گاو در رده بندی جانوری:

گاو در رده پستانداران<sup>۱</sup>، راسته سم داران<sup>۲</sup>، زیر راسته زوج سمان<sup>۳</sup>، جزء نشخوارکنندگان حقیقی<sup>۴</sup>، خانواده گاوسانان<sup>۵</sup>، تحت خانواده بومینه<sup>۶</sup> و جنس بوس<sup>۷</sup> قرار دارد (۳۹).

### الف-۱-۱- اهمیت پرورش گاو:

پرورش و نگهداری گاو از دیرباز مورد توجه انسان قرار گرفته و این توجه به هر شکل و صورتی برای انسان مفید و سودمند بوده است. امروزه در تمام نقاط دنیا گاوداری به خاطر اهمیتی که از لحاظ تنوع محصول و بهره دارد، از اهمیت بالایی برخوردار است و این خود می‌رساند که انسان تا چه میزان به پرورش این حیوان مفید نسبت به سایر حیوانات اهمیت داده و بدان علاقه‌مند است (۹).

هرگز گاو اهمیت شایان و برجسته خود را در زندگی انسان از دست نداده، بلکه پیوسته دامنه توجه و مراقبت از این حیوان وسیع‌تر شده و نگهداری از آن مبتنی بر اصول تازه علمی و موازین جدیدتری شده است به طوری که موفقیت در دامپروری امروزه از آن کسانی خواهد بود که در کار

<sup>1</sup>- Mammalia.

<sup>2</sup>- Ungulata.

<sup>3</sup>- Artiodactyles.

<sup>4</sup>-Ruminantia.

<sup>5</sup>- Bovidae.

<sup>6</sup>- Bovinae.

<sup>7</sup>- Bos.



پرورش، نگهداری، بهداشت، تغذیه، تکثیر و اصلاح نژاد گاو بصیر بوده و دانش عمیق در این راه بر دارند(۱۱).

محصولات حاصله از گاو چه از شیر و فرآورده‌های به دست آمده از آن و چه از گوشت، پوست، کود، شاخ و یا بهره برداری از کار، دارای اهمیت فراوانی بوده و یکی از منابع سرشار تولیدی محسوب می‌گردد. گوشت گاو نیز در دنیا دارای ارزش فراوانی بوده و مصرف کنندگان فراوانی دارد(۱۱).

#### الف-۱-۲- اهمیت بیماری‌های انگلی در گاو:

اهمیت اقتصادی بیماری‌های انگلی را به طور دقیق نمی‌توان تخمین زد زیرا در کشورها و مناطق مختلف بطور فاحشی مختلف است و بستگی به آب و هوا و تراکم دام در دامداری‌های آن منطقه دارد. بررسی‌های مقدماتی درباره‌ی خسارات اقتصادی فاسیولوز در گاو نشان می‌دهد که در آلودگی‌های خفیف ۸٪ و در آلودگی‌های شدید ۲۰٪ از میزان تولید حیوان کاسته می‌شود(۱۰).

از میان بیماری‌های متفاوت و انگلی گاو، فاسیولوز به عنوان یک بیماری کرمی از اهمیت به سزایی برخوردار است. فاسیولوز با انتشار وسیع در حیوانات اهلی و وحشی از طریق ایجاد عوارض بالینی از قبیل آنمی، کاهش وزن و مرگ حیوان و نیز ضبط و اصلاح لاشه در کشتارگاه، خسارات فراوانی را باعث می‌شود(۱۰).

## ب- طبقه‌بندی کرم‌های پهن:

کرم‌های پهن به چهار رده تقسیم بندی می‌شوند:

۱ - توربیلاریا<sup>۱</sup>

۲ - ترماتودا<sup>۲</sup>

۳ - اوسستودا<sup>۳</sup>

۴ - کوتیلودا<sup>۴</sup> (۵۴).

نظر به اینکه در این پایان نامه هدف طراحی الیزای غیرمستقیم برای فاسیولا ژیگانتیکا می‌باشد لذا

طبقه‌بندی و مشخصات آن به این صورت شرح داده می‌شود.

رده ترماتودا، تحت رده دیژنه‌آ<sup>۵</sup>، تحت راسته پروزوستوماتا<sup>۶</sup>، خانواده فاسیولیده<sup>۷</sup>، جنس فاسیولا و

گونه فاسیولا ژیگانتیکا می‌باشد (۵۴).

---

<sup>1</sup> - Turbellaria.  
<sup>2</sup> - Tremamatoda.  
<sup>3</sup> - Eucestoda.  
<sup>4</sup> - Cotiloda.  
<sup>5</sup> - Digenea.  
<sup>6</sup> - Porosostomata.  
<sup>7</sup> - Fasciolidae.

## ب-۱- رده ترماتودا:

ترماتودا از سطح پشتی شکمی پهن بوده و فاقد ساختمان بند بند می‌باشند. بدن آنها معمولاً برگه‌ای شکل، دارای تقارن دو طرفی و از تگومنت پوشیده است. کلیه اندام‌های درونی آنها در نسج پارانشیم قرار گرفته و فاقد محوطه بطنی عمومی یا شکمی هستند. این کرم‌ها توسط باد کش‌ها و چنگک‌ها، خود را به جدار مجاری اعضای داخلی میزبان اصلی می‌چسبانند. دهان در وسط باد کش قدامی یا دهانی واقع شده و لوله گوارش به صورت روده کور می‌باشد (۲۳۵).

## ب - ۱-۱- تحت رده دیژنه‌آ:

کلیه ترماتودهای دیژنه‌آ انگل داخلی حیوانات و انسان هستند و در مسیر تکاملی آنها حداقل یک میزبان واسط دخالت دارد. رحم آنها ماریپیچ و حاوی تعداد زیادی تخم می‌باشد. منفذ دفعی در انتهای خلفی قرار دارد. (۲).

## ب - ۱-۱-۱- جنس فاسیولا:

از مهم‌ترین گونه‌های این جنس فاسیولا هیپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا است که در انسان و حیوانات بیماری‌زا می‌باشند. برای فاسیولا، گونه‌هایی مانند ایندیکا<sup>۱</sup>، فاسیولا کالیفرنیکا<sup>۲</sup> و فاسیولا هالی<sup>۳</sup> از آمریکای شمالی گزارش شده‌اند که نمی‌توان آنها را گونه‌های جدیدی دانست. ولی گونه‌های معتبر و کم‌اهمیت‌تری مانند فاسیولا تراجلافی<sup>۴</sup> از بز کوهی از آفریقای شرقی گزارش شده‌اند. این فاسیولا دارای بدنی بسیار نازک و طویل به طول ۷۰-۱۳۰ میلی‌متر می‌باشند. به علاوه فاسیولا جاکسونی<sup>۵</sup> ترماتود بسیار کوچکی با ابعاد ۱۰×۱۴ میلی‌متر است که در کبد فیل‌های هندوستان دیده شده و آلودگی با آن علایمی شبیه به فاسیولوز گوسفند به وجود می‌آورد (۲۳۵).

### ج- مورفولوژی فاسیولا هیپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا:

#### ج- ۱- فاسیولا هیپاتیکا:

بدن کرم بالغ به طول ۳۰ میلی‌متر و حداکثر عرض آن ۱۳ میلی‌متر می‌باشد. رنگ آن خاکستری مایل به قهوه‌ای بوده و بعد از ثابت شدن در الکل به رنگ خاکستری در می‌آید. انتهای قدامی انگل دارای یک برآمدگی مخروطی شکل می‌باشد که به یک شانه عریض متصل بوده و به تدریج باریک شده و در انتها به صورت نقطه در آمده است. تگومنت به ویژه در کرم‌های جوان پوشیده از خار می‌-

<sup>۱</sup>-*Fasciola indica*.

<sup>۲</sup>-*F. californica*.

<sup>۳</sup>- *F. halli*.

<sup>۴</sup>-*Fasciola. tragalaphi*.

<sup>۵</sup>-*F. jaksuni*.