بسم الله
الرحمن الرحیم

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای محمد قهری رشته قارچ شناسی رساله دکتری خود را با عنوان: بررسی تنوع ژنتیکی ایزوله های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به انواع مختلف کاندیدیازیس مراجعه کننده به مراکز تشخیصی و درمانی تهران به روش RAPD-PCR در تاریخ ۸۹/۴/۲۷ ارائه کردند. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر سیدحسین میرهندی	
استاد مشاور	دکتر محمدحسین یادگاری	
استاد مشاور	دکتر ابراهیم حاجی زاده	
استاد ناظر	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
استاد ناظر	دکتر پریوش کرد بچه	
استاد ناظر	دکتر ساسان رضایی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر فاطمه غفاری فر	

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 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 محمد قهری دانشجوی رشته قارچ شناسی پزشکی ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۳** 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

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)هاي 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 قارچ شناسی پزشکی است که در سال۱۳۸۹ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکترسید حسین میرهندی، مشاوره دکتر محمد حسین یادگاری و دکتر ابراهیم حاجی زاده 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 را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب محمد قهری دانشجوی رشته قارچ شناسی پزشکی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتري تخصصي (Ph.D.) در رشته قارچ شناسي پزشكي

عنوان

بررسی تنوع ژنتیکی ایزوله های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به انواع مختلف کاندیدیازیس مراجعه کننده به مراکز تشخیصی و درمانی تهران به روش RAPD-PCR

نگارش

محمد قهری

استاد راهنما

دکتر سید حسین میرهندی

اساتید مشاور

دکتر محمد حسین یادگاری – دکتر ابراهیم حاجی زاده

۱۳۸۹

تقدیم به :

معلمین با صداقت و زحمتکش میهنم و استادان متعهد و بزرگوارم بویژه آقای دکتر مسعود امامی، دکتر پریوش کردبچه، دکتر فریده زینی، دکتر محمدرضاشیدفر، دکتر محمد حسین یادگاری و استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر سیدحسین میرهندی و تمامی استادان معظم رشته قارچ شناسی پزشکی در سراسر میهن اسلامی ایران

تقدیم به :

همسر محبوبم که از مشوقین اصلی اینجانب در تحصیلات دانشگاهی بوده و با شکیبائی فراوان، سختی‌ها و نارسائیهای زندگی مشترک را صبورانه تحمل کرده‌اند.

و

فرزندان عزیزم مرضیه و حسام بخاطر لحظات فراوانی که از آنها دریغ کرده‌ام.

و تقدیم به:

مادر ارجمندم و پدر و مادر همسرم

تشکر و قدردانی

خداوند بزرگ و یکتای بی همتا، خداوند رحمن و رحیم، او که واجد کلیه‌ی اسماء نیک است را شاکر و سپاسگزارم که با فرصتی که در اختیارم نهاد توانستم مرحله‌ی دیگری از تحصیل علم و دانش در زندگی‌ام را سپری کنم.

بدین وسیله از آقای دکتر سیدحسین میرهندی که زحمت راهنمائی رساله را برعهده داشتند وصبورانه، صمیمانه و صادقانه پاسخگوی سئوالات اینجانب بودند تشکر میکنم.
از آقای دکتر محمد حسین یادگاری استاد علم و اخلاق که زحمت مشاوره‌ی رساله را برعهده داشتند و همواره با چهره‌ی خندان و شکیبائی فراوان گام به گام یار و همدم دانشجویان بوده‌اند سپاسگزاری میکنم. همچنین از آقای دکتر ابراهیم حاجی زاده که با بزرگواری و حلم خود زحمت مشاوره رساله در امور آماری را برعهده داشتند تشکر میکنم.
از آقای دکتر سید احمد حسینی ریاست آزمایشگاه رسالت و نیز آقای رضا داورزنی سوپروایزر آزمایشگاه که امکانات و فضای آزمایشگاهی مورد نیاز را در اختیار اینجانب قرار دادند قدردانی میکنم.
از سرکار خانم نیلوفر جلالی زند (آزمایشگاه زیست شناسی ملکولی مرکز تحقیقات اصفهان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران) و نیز خانم صدیقه بیرقی (آزمایشگاه رسالت تهران) که در کارهای آزمایشگاهی اینجانب را یاری دادند تشکر میکنم.
از آقایان دکتر محمدرضا شیدفر(آزمایشگاه تخصصی قارچ شناسیدکتر شیدفر)، دکتر سلطان پور(آزمایشگاه بیمارستان بقیه ا..الاعظم)، دکتر کتیرائی(انستیتو پاستور)، دکتر زمردیان(دانشگاه علوم پزشکی شیراز) و آقای موسی خانی (دانشگاه علوم پزشکی تبریز)، که در جمع آوری و در اختیار گذاشتن نمونه های مورد نیاز همکاری و مساعدت فراوانی نمودند تشکر و قدردانی میکنم.
از آقای سید سعید موسویان و سرکار خانم دباغی و سراج، کارشناسان پرتلاش و صادق اداره‌ی پژوهش و نیز آقایان سرمدی و سلطانی و سایر کارکنان شریف اداره آموزش دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که با راهنمائی‌های صمیمانه و راهگشای خود دانشجویان را یاری میدهند تشکر و قدردانی میکنم.

چکیده

طی دو دهه‌ی اخیر بدلایل متعددی عفونتهای‌قارچی بیمارستانی‌وغیربیمارستانی و در راس آنها کاندیدیازیس-سیستمیک افزایش جهانی داشته است. شناسائی عوامل‌مخمری در سطح گونه از چند جهت حائز اهمیت است. ۱: برخی از اشکال بالینی خاص با گونه‌های ویژه ای مرتبط هستند، ۲: ویرولانس هر یک از گونه های مخمری با یکدیگر متفاوت بوده و شرط لازم درک پاتوژنز عفونتها، تعیین هویت عامل علیتی بیماری است.۳: گونه‌های مختلف نسبت به داروهای ضد قارچی حساسیت متفاوتی دارند و ۴: پیدا کردن منابع عفونت و درک راههای انتقال بیماری بویژه در طغیانهای بیمارستانی مستلزم شناسائی در سطح گونه میباشد. با توجه به گزارشهائی که در آنها تفاوت در بیماریزائی، قدرت تهاجمی و حساسیت داروئی در ژنوتیپهای مختلف کاندیدا آلبیکنس نشان داده شده است، نیز پراکندگی ژنوتیپهای گوناگون در نواحی مختلف بدن و نیز نواحی مختلف جهان، به منظور درک بهتر پاتوژنیسیته و بهبود دادن به روشهای پیشگیری از عفونت و درمان صحیح، توجه دانشمندان به سمت بررسی اختلاف و تنوع ژنتیکی در گونه‌ها و بویژه آلبیکنس معطوف شده است. هدف از مطالعه حاضر شناسائی جدایه‌های کاندیدائی جدا شده از بیماران مبتلا به انواع مختلف کاندیدیازیس در سطح گونه به روش PCR-RFLP و بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های آلبیکنس با استفاده از روش RAPD-PCR بوده است. برای نیل به این هدف در طول ۲۷ ماه اقدام به جمع آوری۸۴۶ نمونه از نواحی آناتومیک مختلف گردید. سویه های مخمری جدا شده با روشهای فنوتیپیک مورد شناسائی اولیه قرار گرفته و سپس با تقویت ناحیه‌ی ITSI-5.8S-ITS2 موجود در DNA ریبوزومال (rDNA) به روش PCR و آنگاه هضم اندونوکلئتزی آنها با آنزیم MspI نمونه‌ها در سطح گونه تعیین هویت شدند. به منظور افتراق ک. آلبیکنس از ک. دابلینینسیس از آنزیم محدودالاثر MboI و برای تائید جدایه‌های ک. پاراپسیلوزیس از آنزیم محدودالاثر ClaI استفاده گردید. برای افتراق زیرگونه ها و مطالعه‌ی ارتباط احتمالی استرینهای خاص با اشکال بالینی اقدام به تایپینگ جدایه‌های آلبیکنس با استفاده از روش RAPD-PCR با کمک آغازگرهای تصادفی AP3 و OPA-18 گردید و نتایج مربوط به هریک از نواحی آناتومیک بصورت مجزا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ک.آلبیکنس همچنان شایع‌ترین‌جدایه‌از ناخن(۴۵/۶٪)، ضایعات پوستی(۸۹/۳٪)، نمونه ادرار بیماران اورولوژیک(۴۲/۹٪)، نمونه‌های واژینال (۶۱/۳٪)، نمونه‌های استوماتیت(۸۰٪)، ضایعات ازوفاگال بیماران HIV مثبت (۸۷ ٪)، نمونه های خلط و ترشحات برونش بیماران بستری در بیمارستان (به ترتیب ۵۸/۳ ٪ و ۵۷/۷ ٪) بوده است. در کشت نمونه ادرار بیماران سرپائی شایع‌ترین جدایه مربوط به ک. گلابراتا (۴۰/۱٪) و شایع-ترین جدایه از کشت خون ک. پاراپسیلوزیس با میزان ۳۳/۳ ٪ بوده اند. نتایج گروه بندی سویه های آلبیکنس در آزمایش RAPD نشان داد که آنها را در ۴ یا ۵ گروه ژنوتیپی میتوان تقسیم بندی نمود. سویه‌های جدا شده از موارد کاندیدمی از ۲ ژنوتیپ و جدایه های ناخن و پوست و مخاطها از ۳ یا ۴ ژنوتیپ تشکیل شده اند.

کلمات کلیدی:

شناسائی گونه های کاندیدا، PCR-RFLP، گروه بندی ژنوتیپی، RAPD-PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده ۱

۱-۱. کاندیدا و کاندیدیازیس ۲

۱-۱-۱. راههای ورود کاندیدا به بدن انسان ۴

۱-۲. آیا فاکتورهای ویرولانس در گونه های مختلف کاندیدا با یکدیگر متفاوت است؟ ۵

۱-۳. اشکال بالینی کاندیدیازیس ۷

۱-۴. مروری بر گونه های عامل کاندیدیازیس ۱۷

۱-۶. آیا استرینهای مختلف کاندیدا آلبیکانس از نظرقدرت بیماریزائی با یکدیگراختلاف دارند؟ ۲۶

۱-۷. راههای شناسائی گونه ها ۲۷

۱-۷-۱. روشهای فنوتیپیک ۲۸

۱-۷-۱-۱. روشهای مرفولوژیک ۲۸

۱-۷-۱-۱-۱. تست لوله زایا برای تشخیص کاندیدا آلبیکنس ۲۹

۱-۷-۱-۱-۲. کشت خطی در محیط کورن میل آگار ۲۹

۱-۷-۱-۲. روشهای فیزیولوژیک، سرولوژیک و ۳۱

۱-۷-۲. روشهای ملکولی ۳۱

۱-۷-۲-۱. روشهای شناسائی گونه های کاندیدا بر پایهٔ ملکولار بیولوژی ۳۲

۱-۷-۲-۲. روشهای مبتنی بر PCR ۳۲

۱-۷-۲-۲-۱. انتخاب هدف (Target) ۳۲

۱-۷-۲-۲-۲. آماده سازی نمونه ۳۳

۱-۷-۲-۲-۳. شناسایی گونه ها و نشان دادن محصول PCR (Amplimer detection) ۳۵

۱-۷-۲-۲-۴. کنترل ها ۳۶

۱- ۸ . روشهای ملکولی برای تعیین سویه گونه های کاندیدا ۳۷

۱-۹. مروری بر روشهای ملکولی غیر از PCR ۳۹

۱-۹-۱. نسبت AT/GC ۳۹
۱-۹-۲. تعیین توالی بازها در DNA ۳۹
۱-۹-۳. الکتروفورز کاریوتیپ ۴۰
۱-۹-۴. هیبریدسازی ۴۰
۱-۹-۵. تعیین همسانی توالی بازها در دو رشته DNA ۴۱
۱-۹-۶. ردیابی توالی خاص با استفاده از پروب ۴۱
۱-۹-۷. هیبرید سازی ساترن بلات ۴۲
۱-۹-۸ . آنالیز به کمک آنزیم های محدودالاثر ۴۲
۱-۹-۹. آنالیز با کمک آنزیمهای محدودالاثر و پروبهای انگشت نگاری DNA اختصاصی گونه. ۴۳
۱-۹-۱۰. تکنیک انگشت نگاری الیگونوکلئوتیدی ۴۵
۱-۹-۱۱. Pulse- field Gel Electrophoresis ۴۶
۱-۹-۱۲. آنالیز DNA پلی مرفیک تکثیر شده تصادفی (RAPD) ۴۷
۱- ۹-۱۲-۱. اساس مولکولی RAPD ۴۸
۱-۹-۱۲-۲. مزایای تکنیک RAPD ۴۹
۱-۹-۱۲-۳. معایب تکنیک RAPD ۴۹
۱-۹-۱۲-۴. کاربردهای RAPD ۵۰
۱- ۹-۱۳. Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) ۵۰
۱-۹-۱۴. الکتروفورز ۵۱
۱-۹-۱۴-۱. الکتروفورز ژل آگارز ۵۲
۱-۱۰. نواحی ژنی مورد مطالعه در قارچ شناسی ۵۲
۱-۱۰-۱. ناحیه ۱۸SrDNA ۵۳
۱-۱۰-۲. ناحیه 5.8SrDNA ۵۴
۱-۱۰-۳ . ناحیه 28SrDNA ۵۴
۱-۱۰-۴. ناحیه 5'-ETS1/ 18S / ITS1/ 5.8S / ITS2 /28S / ETS2-3' ۵۵

۱-۱۰- ۵. نواحی ITS1 , ITS2 ..... ۵۵
۱-۱۱. اهمیت و ضرورت تایپینگ ۵۶
۱-۱۱-۱. روشهای مختلف تایپینگ ۵۷
۱-۱۲. اپیدمیولوژی ملکولی کاندیدیازیس ۵۸
۱-۱۳. اهمیت انجام تحقیق حاضر ۶۳
۱-۱۴. ضرورت انجام تحقیق ۶۴
۱-۱۵. هدف کلی تحقیق ۶۵
۱-۱۵-۱. اهداف تفصیلی ۶۵
۱-۱۵-۲. اهداف کاربردی ۶۶
۱-۱۶. جنبه های نو آوری تحقیق حاضر ۶۶
۱-۱۷. مروری بر مطالعات مشابه انجام شده ۶۷
۱-۱۷-۱. مروری بر مطالعات انجام شده در ایران ۶۷
۱-۱۷-۲. مروری بر شناسائی گونه های جدا شده از نـواحی آناتومیـک مختلـف در مطالعـات خارجی ۶۹
۱-۱۷-۳. مروری بر مطالعات انجام شده در تعیین ژنوتیپهای کاندیدا آلبیکنس در جهان ۷۳

فصل دوم: مواد و روشها ۷۶
۲-۱. نمونه ها ۷۷
۲-۱-۱. نمونه های استاندارد ۷۸
۲-۲. آماده سازی و کشت نمونه ها ۷۹
۲-۲-۱. آماده سازی نمونه های ادرار جمع آوری شده از بیمارانی که کاتتر ادراری داشتند ۷۹
۲-۲-۲. آماده سازی نمونه های پوست و ناخن ۷۹
۲-۲-۳. آماده سازی نمونه های کشت خون ۸۰
۲-۲-۴. آماده سازی سایر نمونه ها ۸۰

۲-۳. ذخیره سازی نمونه ها ۸۱
۲-۴. آزمونهای فنوتیپی ۸۱
۲-۴-۱. آزمون های مرفولوژیک ۸۱
۲-۴-۱-۱. تهیه محیط کورن میل آگار محتوی توین ۸۰ ..... ۸۱
۲-۴-۱-۲. آزمایش کشت در محیط کورن میل آگار حاوی توین ۸۰ (تست تولید کلامیدوسپور) ۸۱
۲-۴-۱-۳. آزمون ایجاد لوله زایا ۸۲
۲-۴-۱-۴. تهیه محیط کروم آگارکاندیدا ۸۲
۲-۴-۱-۵. کشت روی محیط رنگ زا (کروم آگارکاندیدا) ۸۲
۲-۴-۲. آزمونهای فیزیولوژیک ۸۳
۲-۴-۲-۱. شناسائی گونه ها با کمکAPI 20 C AUX ۸۳
۲-۵. آزمون های مولکولی ۸۴
۲-۵-۱. استخراج و نگهداری DNA ۸۴
۲-۵-۱-۱. روش استخراج شیمیائی (استخراج DNA با روش فنل کلروفورم) ۸۴
۲-۵-۱-۱-۱. مراحل استخراج DNA ۸۵
۲-۵-۱-۲. استخراج DNA برای نگهداری طولانی مدت ۸۶
۲-۵-۱-۳. روش مستقیم یا Direct PCR ۸۷
۲-۵-۱-۴. تهیه DNA با روش جوشاندن ۸۷
۲-۶. واکنش زنجیره ای پلیمراز ۸۷
۲-۶-۱. انتخاب آغازگرها و DNA هدف ۸۷
۲-۶-۱-۱. تهیه و آماده سازی آغازگرها ۸۸
۲-۶-۲. کلرورمنیزیم ۸۸
۲-۶-۳. نوکلئوتیدها ۸۹
۲-۶-۴. Taq DNA Polymerase ۸۹

۲-۷. اجرای آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۸۹
۲-۷-۱. برنامه واکنش PCR ۹۰
۲-۷-۲. تهیه بافر TBE ۹۰
۲-۷-۳. تهیه ژل آگارز ۹۰
۲-۸. الکتروفورز محصول PCR ۹۱
۲-۹. بررسی پلیمرفیسم طولی قطعه محدود(RFLP) ۹۱
۲-۹-۱. واکنش هضم آنزیم PCR-RFLP با استفاده از MspI ۹۲
۲-۹-۲. واکنش هضم آنزیم PCR-RFLP با استفاده از MboI ۹۲
۲-۹-۳. واکنش هضم آنزیم PCR-RFLP با استفاده از ClaI ۹۳
۲-۱۰. واکنش RAPD- PCR ۹۴
۲-۱۰-۱ آغازگر AP3 ۹۴
۲-۱۰-۱-۱. اجزاء واکنش PCR برای واکنش ۲۵ میکرولیتری با آغازگر AP3 ۹۴
۲-۱۰-۱-۲. برنامه دستگاه ترموسایکلر برای انجام واکنش PCR با آغازگر AP3 ۹۴
۲-۱۰-۲. آغازگر OPA-18 ۹۵
۲-۱۰-۲-۱. اجزائ واکنش PCR برای آغازگر OPA-18 ۹۵
۲-۱۰-۲-۲. برنامه دستگاه ترموسایکلر برای انجام واکنش PCR با آغازگر OPA-18 ۹۵
۲-۱۱. الکتروفورز محصول RAPD ۹۵
۲-۱۲. تجزیه و تحلیل داده ها ۹۶

فصل سوم: نتایج ۹۷

۳-۱. شناسائی و کنترل سویه های استاندارد ۹۷
۳-۱-۱. نتایج حاصل از شناسائی سویه های استاندارد با روش PCR ۹۷
۳-۲. نتایج کلی مربوط به جمع آوری نمونه ها ۱۰۱
۳-۳. نتیجه شناسائی گونه های مختلف جدا شده از انواع ضایعات کاندیدیازیس ۱۰۳

۳-۴. نتایج شناسائی گونه های مخمری جدا شده به تفکیک محل نمونه..... ۱۰۴
۳-۴-۱. نتایج مربوط به نمونه های ناخن..... ۱۰۴
۳-۴-۱-۱. نتایج تشخیص به کمک سه روش فنوتایپی..... ۱۰۵
۳-۴-۱-۲. نتایج تشخیص با کمک روش PCR-RFLP و تعیین توالی..... ۱۰۶
۳-۵. نتایج مربوط به کشت خون..... ۱۱۱
۳-۵-۱. نتایج شناسائی مخمرها..... ۱۱۲
۳-۵-۱-۱. شناسائی با روشهای مرفولوژیک..... ۱۱۲
۳-۵-۱-۲. آزمایشهای ملکولی..... ۱۱۲
۳-۶. نتایج شناسائی مخمرهای جدا شده از بیمارانیکه بعلل مشکلات دستگاه ادراری در یمارستان بستری بوده و سوند ادراری داشته اند..... ۱۱۸
۳-۷. شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از ضایعات استوماتیت..... ۱۲۰
۳-۸. شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از خلط بیماران بستری..... ۱۲۲
۳-۹. شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از ضایعات پوستی..... ۱۲۲
۳-۱۰. شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از کشت لاواژبرونکوآلوئلار در بیماران بستری در بیمارستان..... ۱۲۳
۳-۱۱. شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از ضایعات ازوفاگال بیماران مبتلا به ایدز..... ۱۲۳
۳-۱۲. شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از کشت ترشحات واژینال جمع آوری شده..... ۱۲۴
۳-۱۳. شناسائی گونه‌های کاندیدا جدا شده از کشت رسوب ادرار در افراد سالم سرپائی..... ۱۲۶
۳-۱۴. شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از کشت ادرار در بیماران سرپائی..... ۱۲۶
۳-۱۵. نمونه های مربوط به کشت زخم..... ۱۲۷
۳-۱۶. نمونه های مربوط به ترشحات گوش..... ۱۲۷
۳-۱۷. نتایج مربوط به آزمایش RAPD-PCR..... ۱۲۷

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهاد ها ۱۵۶

۴-۱- بحث ۱۵۷

۴-۱-۱- عفونت‌های زخم جراحی ۱۶۳

۴-۱-۲- عفونت‌های پوستی در بیماران درمانگاهی ۱۶۴

۴-۱-۳- عفونت‌های ریه ۱۶۴

۴-۱-۴- عفونت‌های دهانی ۱۶۵

۴-۱-۵- عفونت‌های جریان خون ۱۶۵

۴-۱-۶- عفونت‌های مخمری با تریکوسپورون و رودوتورولا ۱۶۷

۴-۱-۷- عفونت‌های کاندیدایی ناخن ۱۶۸

۴-۱-۸- عفونتهای مجاری ادراری ۱۷۳

۴-۱-۹- تایپینگ کاندیدا آلبیکنس ۱۷۹

۴-۲- پیشنهادها ۱۸۷

منابع ۱۸۹

ضمائم ۲۰۷

چکیده انگلیسی ۲۰۹

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱: سویه های مخمری استاندارد تهیه شده از مراکز کلکسیونهای بین المللی مورد استفاده ۷۸

جدول ۳-۱: اندازه محصول PCR (قطعات تکثیر شده ITS1- ITS4) مربوط به گونه های مختلف کاندیدا قبل و بعد از هضم آنزیمی با MspI ۹۹

جدول ۳-۲ تنوع و پراکندگی نمونه های جمع آوری شده ۱۰۲

جدول ۳-۳ فراوانی و پراکندگی گونه های کاندیدا در نمونه های مختلف ۱۰۳

جدول ۳-۴ فراوانی اونیکومایکوزیس در گروههای سنی مختلف ۱۰۵

جدول۳-۵ مقایسه نتایج شناسائی گونه های کاندیدا در ضایعات ناخن با روش های ملکولی و غیر ملکولی ۱۰۷

جدول ۳-۶ : مشخصات بیماران (بستری در بیمارستان) و جدایه های مخمری از موارد کاندیدمی ۱۱۴

جدول ۳-۷ نتایج شناسائی جدایه های مخمری از موارد کاندیدمی با آزمونهای مرفولوژی و ملکولی ۱۱۵

جدول۳-۸ فراوانی گونه های کاندیدای عامل کاندیدمی در برخی از بیمارستانهای تهران ۱۱۶

جدول۳-۹ گونه های کاندیدای جداشده از بیماران اورولوژیک واجد کاتتر ادراری بستری در مرکز ۱۱۸

جدول۳-۱۰ فراوانی کاندیدوری در مردان به تفکیک گونه های کاندیدا ۱۱۹

جدول۳-۱۱ فراوانی کاندیدوری در زنان به تفکیک گونه های کاندیدا ۱۱۹

جدول۳-۱۳ فراوانی مطلق و فراوانی نسبی بیماران تحت مطالعه به تفکیک جنسی و میزان شیوع کاندیدوری ۱۲۰

جدول۳-۱۴ شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از ضایعات استوماتیت ۱۲۰

جدول۳-۱۵ نتایج شناسائی جدایه های کاندیدای بدست آمده در کشت خلط بیماران بستری در بیمارستان ۱۲۲

جدول ۳-۱۶ شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از ضایعات مختلف پوستی در بیماران سرپائی ۱۲۲

جدول۳-۱۷ شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از کشت لاواژبرونکوآلوئلار در بیماران بستری در بیمارستان ۱۲۳

جدول۳-۱۸ شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از ضایعات ازوفاگال بیماران مبتلا به ایدز..... ۱۲۳

جدول۳-۱۹ شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از کشت ترشحات واژینال..... ۱۲۴

جدول۳-۲۰ شناسائی مخمرهای جدا شده از رسوب ادرار بیماران سرپائی.....۱۲۶

جدول۳-۲۱ شناسائی گونه های کاندیدا جدا شده از کشت ادرار بیماران سرپائی.....۱۲۶

جدول ۳-۲۲ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از ناخن با آغازگر AP3..... ۱۲۸

جدول۳-۲۳ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۱ با روش تطابق ساده..... ۱۲۸

جدول۳-۲۴ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از ناخن با آغازگر OPA-18..... ۱۲۹

جدول ۳-۲۵ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۲ با روش تطابق ساده..... ۱۳۰

جدول ۳-۲۶ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از کشاله ران با آغازگر AP3..... ۱۳۰

جدول۳-۲۷ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۳ با روش تطابق ساده..... ۱۳۱

جدول۳-۲۸ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از کشاله ران با آغازگرOPA-18 ..... ۱۳۲

جدول۳-۲۹ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۴ با روش تطابق ساده..... ۱۳۳

جدول۳-۳۰ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جـدا شـده از کـشت خون با آغازگرAP3..... ۱۳۴

جدول ۳-۳۱ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۵ با روش تطابق ساده..... ۱۳۵

جدول۳-۳۲ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جـدا شـده از کـشت خون با آغازگرOPA-18..... ۱۳۶

جدول ۳-۳۳ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۶ با روش تطابق ساده..... ۱۳۷

جدول۳-۳۴ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از ضـایعات استوماتیت با آغازگرAP3..... ۱۳۷

جدول۳-۳۵ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام۳-۷ با روش تطابق ساده..... ۱۳۸

جدول۳-۳۶ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از ضـایعات استوماتیت با آغازگر OPA-18..... ۱۳۹

جدول۳-۳۷ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۸ با روش تطابق ساده..... ۱۴۰

جدول۳-۳۸ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از ضـایعات ازوفاگال بیماران HIV مثبت آغازگرAP3 ..... ۱۴۰

جدول ۳-۳۹ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۹ با روش تطابق ساده..... ۱۴۱

جدول۳-۴۰ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از ضـایعات ازوفاگال بیماران HIV مثبت آغازگر OPA-18..... ۱۴۲

جدول۳-۴۱ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۱۰ با روش تطابق ساده..... ۱۴۳

جدول۳-۴۲ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جـدا شـده از نمونـه خلط بیماران بستری در بیمارستان با آغازگر AP3..... ۱۴۴

جدول۳-۴۳ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۱۱ با روش تطابق ساده..... ۱۴۵

جدول۳-۴۴ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جـدا شـده از نمونـه خلط بیماران بستری در بیمارستان با آغازگر OPA-18..... ۱۴۵

جدول۳-۴۵ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۱۲ با روش تطابق ساده.....۱۴۶

جدول۳-۴۶ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از نمونه کشت ترشحات واژن با آغازگرAP3..... ۱۴۷

جدول۳-۴۷ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۱۳ با روش تطابق ساده..... ۱۴۸

جدول۳-۴۸ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از نمونه کشت ترشحات واژن با آغازگرOPA-18 ..... ۱۴۹

جدول۳-۴۹ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام۳-۱۴ با روش تطابق ساده..... ۱۵۰

جدول۳-۵۰ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس نمونه کشت ادرار با آغازگرAP3 ..... ۱۵۱

جدول۳-۵۱ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۱۵ با روش تطابق ساده..... ۱۵۲

جدول۳-۵۲ اندازه باندهای حاصل از RAPD سویه های کاندیدا آلبیکنس نمونه کشت ادرار با آغازگر OPA-18..... ۱۵۳

جدول۳-۵۳ میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳-۱۶ با روش تطابق ساده..... ۱۵۴

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار۳-۱دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکنس جدا شده از ناخن با آغازگر AP3 ..... ۱۲۸

نمودار ۳-۲ دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکنس جدا شده از ناخن با آغازگر OPA-18 ..... ۱۲۹

نمودار ۳-۳ دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکنس جدا شده از کشاله ران با آغازگرAP3 ..... ۱۳۱

نمودار۳-۴ دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکنس جدا شده از کشاله ران با آغازگر OPA-18 ..... ۱۳۳

نمودار۳-۵ دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکنس جدا شده از کشت خون با آغازگر AP3 ..... ۱۳۴

نمودار۳-۶ دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکنس جدا شده از کشت خون با آغازگر OPA-18 نمودار۳-۷ دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکنس جدا شده از ضایعات استوماتیت با آغازگر AP3 ..... ۱۳۶

نمودار ۳-۷- دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکنس جدا شده از استوماتیت با آغازگر AP3 ..... ۱۳۷

نمودار۳-۸ دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکنس جدا شده از ضایعات استوماتیت با آغازگر OPA-18 ..... ۱۳۹

نمودار۳-۹ دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکنس جدا شده از ضایعات ازوفاگال بیماران HIV مثبت با آغازگرAP3 ..... ۱۴۱

نمودار۳-۱۰ دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکنس جدا شده از ضایعات ازوفاگال بیماران HIV مثبت با آغازگرOPA-18 ..... ۱۴۲

نمودار۳-۱۱ دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکنس جدا شده از نمونه خلط بیماران بستری در بیمارستان با آغازگر AP3 ..... ۱۴۴