بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته قارچ شناسی پزشکی

عنوان

بررسی حضور ژن BCR1 در نمونه های زنان مبتلا به واژنیت کاندیدایی با تکنیک RT-PCR و بررسی نقش آن در تشکیل بیوفیلم

نگارش

فاطمه نیکومنش

استاد راهنما

دکتر شهلا رودبار محمدی

استاد مشاور

دکترمنصور بیات

شهریور ۱۳۹۲

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از
پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم فاطمه نیکومنش رشته **قارچ شناسی پزشکی** پایان‌نامه **کارشناسی ارشد** خود را با عنوان « **بررسی حضور ژن BCR1 در نمونه های زنان مبتلا به واژنیت کاندیدایی با تکنیک RT-PCR و بررسی نقش آن در تشکیل بیوفیلم** » در تاریخ **۱۳۹۲/۶/۱۷** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر شهلا رودبار محمدی (استاد راهنما)

دکتر منصور بیات (استاد مشاور)

دکتر رضا کچویی (استاد ناظر)

دکتر فاطمه غفاری فر (استاد ناظر)

دکتر محمدحسین یادگاری (نماینده تحصیلات تکمیلی)

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 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 فاطمه نیکومنش دانشجوی رشته قارچ شناسی پزشکی ورودی سال تحصیلی ۹۰ مقطع کارشناسی ارشددانشکده 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 ۹۲/۸/۲۶

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 **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **قارچ شناسی پزشکی**است که در سال **۹۲** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **خانم دکتر شهلا رودبار محمدی** ، مشاوره **اقای دکتر منصور بیات** 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 **فاطمه نیکومنش** دانشجوی رشته **قارچ شناسی پزشکی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

فاطمه نیکومنش

۹۲/۸/۲۶

تقدیم به :

روح شهدای گمنام کشورم ، قهرمانان جاویـد نـام خـاک پـاک مـیهن سربلندم

تقدیم به :

پدرو مادر زحمتکشم که همواره در راه تحصیل پشتیبان وحامی من بودند

تشکر و قدردانی

نخست پروردگار متعال را سپاس می گوییم که توفیق انجام این تحقیق را به من عنایت فرمود.
سپس به حکم وظیفه و ادب بر خود میدانم از بزرگوارانی که در تمامی مراحل تحقیق مرا یاری رسانیدند تشکر کنم.
تشکر ویژه و قدردانی خود را از استاد عزیز و گرامی ام خانم دکتر شهلا رودبار محمدی ابراز می نمایم که با لطف بی پایانش راهنمائی این پایان نامه را بر عهده داشتند.
از اقای دکتر منصور بیات که در مشاوره پایان نامه مرا از تجربیات ارزشمندشان بهره مند نمودند نهایت تشکر را دارم.
از استادان گرانقدرم اقای دکتر یادگاری و خانم دکتر شمس که در طول دوران تحصیل از راهنمائی های ارزشمندشان بهره بردم کمال تشکر را دارم.
از زحمات و همکاری های بی دریغ سرکار خانم رازقی کارشناس محترم گروه قارچ شناسی پزشکی کمال سپاس و تشکر را دارم.
از راهنمائی های خانم دکتر مریم رودباری کمال تشکر را دارم.
دوستان خوبم خانم ها فرنوش حقیقی ، مریم حسین پور و زهرا نصرالهی به خاطر یاری و راهنمایی های بی دریغشان تشکر نموده واز خدای متعال برای تمامی این عزیزان ارزوی موفقیت می نمایم.

چکیده

مقدمه: از انجایکه اتصال از مراحل بحرانی در بیماریزایی کاندیدا البیکنس و تشکیلا بیوفیلم می باشد در این مطالعه به بررسی حضور ژن BCR1 کاندیدا آلبیکنس در ایزوله های بدست امده از زنان مبتلا به واژنیت کاندیدیازیس و تأثیر ان در تشکیل بیوفیلم پرداخته شد .

مواد وروشها: در این مطالعه از ۵۰ ایزوله کاندیدا آلبیکنس که با روش PCR-RFLP تأیید شد ،جهت بررسی مقاومت به داروی ضد قارچی رایج فلوکونازول از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد ، سپس استخراج RNA بوسیله ی پرل شیشه ای و بافر لایز صورت گرفته است و cDNA بوسیله ی انزیم ریورزترانسکریپتاز سنتز شده و در تکنیک RT-PCR جهت بررسی بیان ژن BCR1 استفاده شده است. برای ارزیابی تشکیل بیوفیلم ، از روش MTT بر روی دوگروه ایزوله های دارای بیان ژن BCR1 و ایزوله های فاقد بیان ژن BCR1 انجام گردید سپس داده ها ی حاصل با استفاده از ازمون t-test نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد. تأیید و چگونگی تشکیل بیوفیلم بر روی کاتتر های سیلیکونی توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره نیز انجام شد.

نتایج و یافته ها: از ۵۰ ایزوله کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول، (۹۴٪) ۴۷ نمونه حضور ژن BCR1 را با تکنیک PCR نشان داده اند. پس از انجام RT-PCR (۹۵٪)۴۵ نمونه از ۴۷ نمونه بیان ژن BCR1 بوده است. پس از انجام تست MTT برای ارزیابی تشکیل بیوفیلم دو گروه ایزوله های دارای بیان ژن BCR1 و ایزوله های فاقد بیان ژن BCR1 انجام شده است ، اختلاف معنی داری (P>0.05) P-value:0.014 و t=8.485 را نشان داده است.بررسی های میکروسکوپ الکترونی نتایج فوق را تأیید نمودند.

بحث و نتیجه گیری: نتایج در این تحقیق نشان می دهد که تمامی ایزوله های دارای بیان ژن BCR1 دارای مقاومت به فلوکونازول ، قابلیت اتصال و توانایی تشکیل بیوفیلم را در مقایسه با گروه فاقد بیان ژن BCR1 داشتند و لذا میتوان ارتباط بین بیان ژن BCR1 و تشکیل بیوفیلم را عنوان کرد.

کلمات کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، بیان ژن BCR1 ، RT-PCR

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. عفونت قارچی کاندیدیازیس و شیوع ان در کشورهای مختلف ۲

۱-۲. ریسک فاکتورهای میزبان ۳

۱-۳. مکانیسم بیماریزایی کاندیدا البیکنس ۵

۱-۳-۱. کلونیزاسیون ۵

۱-۳-۲. تهاجم ۵

۱-۳-۳.واکنش سلولهای ایمنی ۶

۱-۴.فاکتورهای بیماریزایی کاندیدا البیکنس ۶

۱-۴-۱.مورفوژنز تحت تأثیر تغییرات محیطی اطراف کاندیدا البیکنس ۷

۱-۴-۲.تغییرات فنوتایپی ۸

۱-۴-۳.فسفولیپاز ها ۹

۱-۴-۴.پروتئنازها ۹

۱-۴-۵.فعالیت همولیتیک ۱۰

۱-۴-۶.اتصال ۱۱

۱-۴-۷.تشکیل بیوفیلم ۱۱

۱-۵.ژن BCR1 ..... ۱۲

۱-۵-۱.ساختار و عملکرد ژن BCR1 ..... ۱۲

۱-۵-۲.نقش BCR1 در اتصال ۱۳

۱-۵-۳.نقش BCR1 در تشکیل بیوفیلم ۱۳

۱-۶.مروری بر مطالعات گذشته ۱۵

فصل دوم: مواد و روشها ۱۸

۲-۱.جمع اوری نمونه ۱۹

۲-۲.ازمون دیسک دیفیوژن جهت بررسی مقاومت به فلوکونازول ۱۹

۲-۳.کشت ایزوله ها جهت اماده سازی استخراج RNA ۲۰
۲-۳-۱.تهیه محیط کشت سابورو دکستروز اگار ۲۰
۲-۳-۲.نگهداری ایزوله های کاندیدا البیکنس برای طولانی مدت ۲۰
۲-۴.استخراج RNA ۲۱
۲-۵.حذف DNA ژنومی از Total RNA استراج ۲۳
۲-۶.تیمار کردن Total RNA یا مرحله DNase Treatment ۲۳
۲-۷.قرائت غلظت نمونه های RNA استخراج شده ۲۳
۲-۸.تکنیک PCR جهت مشاهده حضور ژن BCR1 در نمونه ها ۲۴
۲-۸-۱.الکتروفورز محصول PCR ۲۶
۲-۸-۱-۱.مواد وسایل لازم ۲۶
۲-۸-۱-۲.تهیه بافر TBE 10X ۲۷
۲-۹.سنتز c DNA ۲۸
۲-۱۰. تکنیک RT-PCR ۲۹
۲-۱۱.الکتروفورز محصول RT-PCR ۳۱
۲-۱۲.بهینه نمودن شرایط رشد سویه های کاندیدا البیکنس ۳۱
۲-۱۲-۱.روش تهیه محیط Yeast Nitrogen Base ۳۲
۲-۱۳.تشکیل بیوفیلم در پلیتهای ۹۶ خانه ای ۳۲
۲-۱۴.ارزیابی بیوفیلم باروش MTT ۳۳
۲-۱۴-۱.روشMTT ۳۳
۲-۱۴-۲.روش تهیه رنگ MTT ۳۳
۲-۱۴-۳.نحوه انجام روش MTT ۳۴
۲-۱۴-۴.روش تهیه بافرPBS ۳۴
۲-۱۴-۵.انالیز اماری نتایج روش MTT ۳۴
۲-۱۵.تشکیل بیوفیلم بر روی قطعات کاتتر سیلیکونی ۳۵

۲-۱۶.اماده سازی نمونه جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره SEM ۳۵
فصل سوم: نتایج ۳۶
۳-۱.بررسی سوابق جمعیت بیماران تحت مطالعه ۳۷
۳-۲.نتیجه ازمون دیسک دیفیوژن ۳۸
۳-۳.نتایج مربوط به استخراج RNA و بررسی کیفی ان توسط ژل الکتروفورز ۳۸
۳-۴.نتایج حاصل از بررسی کمی غلظت RNA توسط اسپکتوفتومتر ۳۹
۳-۵.نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمر BCR1 ..... ۴۰
۳-۶.ارزیابی بیان ژن BCR1 با تکنیکRT-PCR ۴۱
۳-۷.روشMTT جهت ارزیابی تشکیل بیوفیلم نمونه های دارای بیان ژن BCR1 و نمونه های فاقد بیان ژن BCR1 ..... ۴۳
۳-۷-۱.نتایج انالیز اماری بدست امده از روش MTT ۴۴
۳-۸.نتایج حاصل از بررسی بیوفیلم با روش میکروسکوپ الکترونی نگاره ۴۴
۳-۸-۱.بررسی تشکیل بیوفیلم ایزوله های دارای بیان ژن BCR1 بر روی کاتتر سیلیکونی توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره SEM ۴۵
۳-۸-۲. بررسی تشکیل بیوفیلم ایزوله های فاقد بیان ژن BCR1 بر روی کاتتر سیلیکونی توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره ۴۵
فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری، پیشنهاد ها ۴۶
فهرست منابع ۵۵
چکیده انگلیسی **۶۶**

فهرست جداول

جدول۲-۱ ترکیب RNA بافر..... ۲۲
جدول ۲-۲ اجزای فرایند PCR با پرایمر های BCR1 ..... ۲۴
جدول۲-۳ توالی پرایمرهای BCR1 و درجه حرارت اتصال اغازگر به DNA الگو..... ۲۵
جدول۲-۴ برنامه داده شده به دستگاه PCR جهت تکثیر ناحیه ی BCR1 ..... ۲۵
جدول۲-۵ مقادیر ومواد مورد نیاز مرحله اول سنتز cDNA ۲۸
جدول۲-۶ مقادیر و مواد مورد استفاده جهت مرحله دوم سنتزcDNA ۲۸
جدول۲-۷ مقادیر و ترکیبات PCR master Mix ۲۹
جدول۲-۸اجزای فرایند RT-PCR با پرایمر BCR1 ..... ۳۰
جدول۲-۹ چرخه دمایی دستگاه تر موسایکل جهت انجام PCR با پرایمر BCR1..... ۳۱
جدول۳-۱.فراوانی اشکال بالینی..... ۳۷
جدول۳-۲.جذب نوری RNAهای را استخراج شده..... ۳۹
جدول۳-۳.نتایج حاصل از روش MTT ۴۳
جدول۳-۴.تشکیل بیوفیلم بر روی کاتتر سیلیکونی..... ۴۴

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱.فراوانی نسبی بیماران دیابتیک مبتلا به واژنیت کاندیدیایی..... ۳۷
نمودار۳-۲.ارزیابی حضور ژن BCR1 با تکنیک PCR ۴۱
نمودار۳-۳. پراکندگی بیان ژن BCR1 ..... ۴۲
نمودار۳-۴.فراوانی OD های حاصل از روش MTT ۴۴

فهرست شکل ها

عکس۳-۱.استخراج RNA ایزوله های بالینی..... ۳۹
عکس۳-۲.محصول PCR ایزوله های بالینی و نمونه استاندارد کاندیدا البیکنس ATCC ۴۰
عکس۳-۳.محصول PCR ایزوله بالینی وژن Act1..... ۴۰
عکس۳-۴.انجام تکنیک RT-PCR بااستفاده از پرایمر اختصاصی Bcr1 ایزوله های کاندیدا البیکـنس و نمونه استاندارد ۴۲
عکس۳-۵.ارزیابی تشکیل بیوفیلم توسط روش MTT ۴۳
عکس۳-۶.اتصال ایزوله کاندیدا البیکنس دارای بیان ژن BCR1 به سطح کاتتر سلیکونی..... ۴۵
عکس۳-۷.عدم اتصال و تشکیل بیوفیلم ایزوله ی فاقد بیان ژن BCR1 ..... ۴۵

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. عفونت قارچی کاندیدیازیس و شیوع آن در کشورهای مختلف:

عفونتهای کاندیدایی یک مشکل جدی واساسی درجوامع امروز چه در افراد با ضعف سیستم ایمنی[۱] و چه در افرادی با صلاحیت ایمنی[۲] می باشد، به همین دلیل امروزه کاندیدا البیکنس در زمره قارچهای بیماریزای مهم مانند هیستوپلاسما کپسولاتوم ، اسپرژیلوس فومیگاتوس و کریپتوکوکوس نئوفورمنس به قرار گرفته است [۱]. عفونت حاصل از کاندیدا البیکنس به عنوان یک عفونت درونزا[۳] مشخص گردیده است ، چرا که توانسته اند کاندیدا را از حفره دهانی ، دستگاه گوارش ، آنوس ، کشاله ران ، کانال واژن در افراد سالم به عنوان فلور نرمال جداسازی کنند بطوری که ۷۰٪ از این ایزوله ها را گونه البیکنس شامل میشود[۲].

کاندیدیازیس به عنوان دومین عفونت فرصت طلب قارچی قادر به ایجاد بیماریهای حاد ، تحت حاد و مزمن جدی میباشد . عفونت می تواند از طریق کلنیزه شدن در دهان ، گلو ، پوست ، واژن ، ناخن ، برنش و ریه دستگاه گوارش ایجاد شود و در بعضی مواقع به صورت کاندیدمیا ، اندوکاردیت و مننژیت دیده می شود [۱].

بدنبال استفاده وسیع از تجهیزات پزشکی[۴] مانند کاتترهای وریدی , دریچه های مصنوعی قلب در طی دو دهه ی اخیر بیماریهای قارچی سیستمیک افزایش یافته است . دریچه های مصنوعی قلب ، پروتزهای سلیکونی ، لوله های تراش داخل نای ، شانتهای مایع مغزی نخاعی و سوندهای ادراری می تواند توسط میکرو ارگانیسم ها از جمله گونه های کاندیدا کلونیزه شوند و موجب عفونت کاندیدمی و انتشار ان به بافتهای داخلی وسایر ارگانها می شود .

1-Immunocompromised
2-Immunocompotenety
3-endogenus
4-Medical Devices

طی تحقیقات به عمل امده عفونتهای خونی کاندیـدایی در بیمارسـتانهای امریکـا ۱۰٪ عفونتهـا را در برمی گیرد که ۴۰٪ از این عفونتها ناشی از کاتترهای داخل وریدی است [۳] . در امریکا طی سـالهای ۲۰۰۴-۲۰۰۸ از ۲۰۱۹ ایزوله کشت خون ، ۴۶٪ کاندیدا البیکنس جدا گردیده است [۴] . همچنـین در فرانسه طی سالهای ۲۰۰۵- ۲۰۰۶از ۳۰۰ نمونه کشت خون حدودا ۵۷٪ گونه البیکـنس جداشـده است [۵] . در امریکای مرکزی در مطالعات انجام شده بین سالهای ۱۹۹۳-۲۰۰۳ از میان ۶۳۷ بیمار ، کاندیدا البیکنس عامل ۳۶ ٪ عفونتهای خونی در افراد مبتلا با تومورهای بـدخیم بـوده اسـت [۶]. در هند بررسی های انجام شده در سالهای ۱۹۹۹-۲۰۰۴ از نمونه های مایعـات بـدن ۲۵۵ بیمـار ماننـد خون ، مایع آسیت ، مایع مغزی نخاعی و لاواژ ریه حدود ۸۹/۷٪ کاندیدا البیکنس جدا گردیـده اسـت که بیشترین مـوارد جـدا شـده از نمونـه هـای کشـت خـون ۷۵/۹٪ بـوده و یـا در بررسـی بـر روی ۱۰۵۰نمونه واژینال درهند ۲۱۵ (۲۰/۴۷٪) انها درگیری کاندیدایی تشخیص داده شد که از این میان ۴۶/۹٪ کاندیدا البیکنس جدا شده [۷و۸]. در عربستان سعودی درمطالعـاتی کـه در سـالهای ۱۹۹۶-۲۰۰۴ در رابطه با کاندیدمی صورت گرفت شیوع کاندیدمی با عامل کاندیدا البیکنس در ایـن ۹ سـال ۵۲٪ تخمین زده اند[۹] . لذا کاندیدیازیس کماکان به عنوان یک معضل بهداشتی - پزشکی در جوامع مختلف وجود دارد .

۱-۲.ریسک فاکتورها میزبان:

در طی دو دهه ی اخیر بیماریهای قارچی سیستمیک افزایش چشم گیری داشته است . با توجه بـه استفاده کلینیکی از انتی بیوتیکهای وسیع الطیف برای مدت طولانی و داروهای سرکوب کننده ایمنی برای بیماران دریافت کننده پیوند و همچنین انجام شیمی درمانی و جراحـی هـای گسـترده احتمـال عفونتهای قارچی افزایش یافته است[۱] . از جمله ریسک فاکتورهایی که برای احتمـال کاندیـدیازیس سیستمیک و یا کاندیدمی می توان نام برد : الف- دریافت انتی بیوتیکهای وسیع الطیف ، به طوریکـه استفاده دراز مدت از این انتی بیوتیکها جمعیت میکروب های بی هـوازی فلـور نرمـال روده را مختـل

نموده و مخمرهای کاندیدا فرصت تهاجم به عروق مزانتریک را پیدا کرده و از ایـن طریـق وارد خـون میگردند .

ب- در افراد تحت شیمی درمانی ، داروهای شیمی درمانی موجب سـرکوب سیسـتم ایمنـی و ایجـاد نوتروپنی میشوند و از آنجایی که نوتروفیلها سلولهای موثر در مقابله با عفونتهای کاندیدایی می باشند موجب کاهش مقاومت میزبان در مقابل عفونت کاندیدایی می گردد[۱۰-۱۳] .

از دیگر ریسک فاکتورهای مهم در رابطه با کاندیدمی حضور کاتتر های داخل وریـدی مـی باشـد کـه طبق مطالعات انجام شده حدود ۸۳٪ ابتلا به کاندیدمی در این رابطه گزارش گردیده اسـت . کلـونیزه شدن کاتترهای داخل وریدی توسط کاندیدا البیکنس موجب عفونت خون کاندیدایی می شود و انتشار ارگانیسم از طریق جریان خون به سایر ارگانها و موجب عفونت سیستمیک میشود [۹،۱،۳].

بدخیمی های خونی، نوتروپنی ، جراحی های شکمی ، نارسایی حاد کلیوی ، نقـص سیسـتم ایمنـی و استفاده از استروئید هااز دیگر عوامل خطرزا در ایجاد کاندیدیازیس هستند [۹] .

تحقیقات بدست امده در امریکا ،فاکتورهای وابسته به بروز کاندیدمی از جمله کاتتر های داخل وریدی تا ۳۰/۴٪، بدخیمی ها ۴٪ ، استفاده از داروی ونکومایسین به مدت بیش از ۳ روز ۳/۵٪را تخمین زده اند[۱۳] . به همین دلیل در مطالعات انجام شده در هند میزان تأثیر ریسک فاکتورهایی مانند : کاتتر ها ی داخل وریدی و شانتهای مغزی نخاعی ۶۲/۱٪طول مدت استفاده از انتی بیوتیکها ۳۴/۵٪ و نقص سیستم ایمنی اکتسابی (HIV) ۲۴/۱٪را به عنوان عامل کاندیدیازیس مهاجم وکاندیدمی مشخص نموده اند [۷] . همچنین در این راستا ،بررسی ها در بیمارستانهای عربستان صعودی نشان میدهند ۸۳٪ استفاده کنندگان از کاتترهای وریدی ،۹۶٪ دریافت کنندگان انتی بیوتیکهای وسیع الطیف ، ۲۲٪ جراحی های شکمی ، ۹٪ نوتروپنی ، ۲۴٪ ناراسایی حاد کلیوی ، ۲۶٪ بدخیمی ها ، ۱۵٪ سوختگی ها موجب کاندیدمی شده اند[۹] .

۱-۳.مکانیسم بیماریزایی ارگانیسم الوده کننده:

بیماریزایی کاندیدا البیکنس به عنوان یک میکروارگانیسم حداقل از سه مرحله اساسی زیر می گذرد:

۱-۳-۱.کلونیزاسیون:

اتصال به سلولهای میزبان برای ساکن شدن میکروارگانیسم چه به صورت فلور نرمال و یا جهت ایجاد بیماری ، ضروری می باشد [۱۴]. بیان مولکولهای مشخص چسبندگی به میکروارگانیسم توانایی اتصال به سلولهای میزبان را می دهد و انها را در مقابل مکانیسمهای ضد میکروبی میزبان محافظت می کنند . این اتصال برای تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح زنده و غیر زنده[۱] نیز ضروری می باشد . کاندیداالبیکنس دارای خانواده بزرگی از پروتینهای اتصالی در دیواره سلولی خود می باشد .از جمله ALS[۲] اشاره کرد که از پروتینهای چسبندگی[۳]مهم وضروری است ،بخصوص می توان به بیان ژن Als3 که نقش حیاتی رادر اتصال دارد[۱۵و۱۶]. از دیگر پروتیئنهای چسبندگی می توان HWP1[۴] را نام برد که نقش برجسته ای را در اتصال بر عهده دارد[۱۷] . بنابراین در اولین و اصلی ترین مرحله یعنی اتصال نیاز است که میکروارگانیسم (کاندیدا البیکنس) دارای فاکتورهای ویرولانس از جمله دارای پروتیئن های چسبنده باشد .

۱-۳-۲.تهاجم[۵] :

بعد از اتصال ، قدم بعدی جهت بیماریزایی تهاجم کاندیدا البیکنس به لایه سلولهای اپیتلیال می باشد . تهاجم کاندیدا البیکنس با دو مکانیسم اتفاق می افتد : اندوسیتوز شدن توسط سلولهای میزبان و دیگری نفوذ به وسیله ی تشکیل هایف[۱۸] .

1-Abiotic
2-Agglutinin like sequence
3-Adherence
4-Hyphe wall protein
5-Invesive

در این مرحله از بیماریزایی بیان ژن Als3 موجب القای اندوسیتوز بوسیله ی بازارایی سیتواسکلتال سلول میزبان می شود . این پروسه اغاز تهاجم ارگانیسم به سلولهای میزبان است [۱۹]. هایفها بوسیله ی نیروی فیزیکی که اعمال می کنند و نیز ترشح انزیمهای هیدرولیز کننده به سلولهای میزبان نفوذ می کنند و سرانجام منجر به اختلال در نظم و انسجام سلولهای میزبان می شوند . سلولهای اپیتلیال با ترشح سایتوکاینهای التهابی نسبت به دیواره هایفها واکنش نشان می دهند و این عمل باعث جذب ماکروفاژ ها و نوتروفیلها به موضع عفونت می شوند[۲۰-۲۳] .

۱-۳-۳. واکنش سلولهای ایمنی :

ماکروفاژها اولین خط دفاعی سیستم دفاعی ذاتی هستند که فاگوسیتوز قارچهای مهاجم را در بافتها از طریق شناسایی رسپتور تشخیص الگو PRRs [۱] و با اتصال به PAMPs [۲] از طریق بتا گلوکان ، مانان و یا کیتین ، قارچها را فاگوسیت می کنند و بدین ترتیب فاگوزوم از طریق ادغام با گرانولهای لیزوزوم شکل گرفته و ارگانیسم در فاگوزوم بالغ کشته می شوند سپس از طریق ترشح سایتوکاینها بر روی پاتوژن شناخته شده پاسخ ایمنی را تنظیم می نمایند . مقابله قارچ و سیستم ایمنی میزبان از مقولات بسیار جذاب تحقیقی است[۲٤-۲٦] .

۱-۴.فاکتورهای بیماریزایی کاندیدا البیکنس:

همانند دیگر قارچهای پاتوژن ،کاندیدا البیکنس ژنهایی را تنظیم وبیان می نماید که به عنوان فاکتورهای بیماریزا می تواند ایجاد بیماری می نماید . از جمله فاکتورهای بیماریزای این قارچ می توان به اتصال ، مورفوژنز ،ترشح پروتئینازها وفسفولیپازها ، تغییرات فنوتایپی و تشکیل بیوفیلم می توان اشاره نمود .

1- Patttern recognition receptors
2-Pathogen associated molecular pattern