دانشگاه تربیت مدرس

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

آقای احسان فرح بخش رشته قارچ شناسی پزشکی پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان شناسایی گونه های مقاوم به فلوکونازول در کا ندیدا آلبیکنس های بومی جدا شده از بیماران ایدزی با روشهای فنوتیپی و مولکولی RT-PCR در تاریخ ۸۹/۱۱/۹ 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 محمد حسین یادگاری (استاد راهنما)

دکترمعصومه رجبی بذل (استاد مشاور)

دکتر رضا کچویی (استاد ناظر)

دکتر شهلا رودبار محمدی (استاد ناظر و 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 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 **احسان فرح بخش** دانشجوی رشته **قارچ شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۷** مقطع **کارشناسی ارشد** 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: ۱۳۸۹/۱۱/۹

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 **۱۳۸۹** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر محمد حسین یادگاری** ، مشاوره **سرکار خانم دکتر معصومه رجبی بذل** 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 **احسان فرح بخش** 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:احسان فرح بخش

تاریخ و امضا:۱۳۸۹/۱۱/۹

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته

قارچ شناسی پزشکی

عنوان:

شناسایی گونه های مقاوم به فلوکونازول در*کاندیدا آلبیکنس* های بومی جدا شده از بیماران ایدزی با روش های فنوتیپی و مولکولی RT-PCR

نگارش:

احسان فرح بخش

استاد راهنما:

دکترمحمد حسین یادگاری

استاد مشاور:

دکتر معصومه رجبی بذل

زمستان ۱۳۸۹

به رسم ادب تقدیم به

ساحت مقدس حضرت **بقیة الله** (عج)

تقدیم به **مادر مهربانم**

گوهر یگانه وجودم، بهانه زندگی ام وکسی که نام او معنی عشـق و ایثـار است. سبزی عمرم به فدای یک تار موی تو مادرم

تقدیم به **خواهر عزیزم**

که بهترین خواهر دنیاست و به پاس همه خوبی هایش

تقدیم به **وجدان های پاک**

که در سخت ترین شرایط نیز دست از عقیده و ایمان خود بر نمی دارنـد و براصول خود باقی می مانند و در راه انسانیت قدم می گذارند.

سپاس خدایی را که زیبایی های آفرینش را بر ما برگزید، پاکترین روزی ها را بر ما نازل فرمود.سپاس خدای را، به وسعت همه آن سپاسی که ملائکه مقرب و خلایق مکرّم و ستایندگان پسندیده او را شکر گفته اند. برترین شکر از میان هر شکری، چون برتری پروردگارمان بر هر وجودی، سپاس خدای را که در حاجت آوردن به سوی غیر را بر ما بست و احتیاج مان را فقط به سوی خود گشود، چگونه و چه هنگام شکرش را بجا خواهیم آورد؟

بدین وسیله از استاد راهنمای گرانقدر و بزرگوارم جناب آقای دکتر محمد حسین یادگاری که صمیمانه و صبورانه مرا در انجام تمامی مراحل پایان نامه هدایت نمودند وهمواره از راهنمایی ها و تعالیم ارزشمندشان بهره مند گشتم، سپاسگزاری می نمایم.

از استاد مشاور ارجمندم سرکار خانم دکتر معصومه رجبی بذل که افتخار علم آموزی نزد محضر ارزشمند ایشان را داشته ام، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم وتوفیق روز افزون ایشان را از ایزد منان خواستارم.

از مدیر گروه محترم گروه قارچ شناسی سرکار خانم دکتر شهلا رودبار محمدی بخاطر حمایت های دلسوزانه وهمه جانبه ایشان، تقدیرو تشکر می نمایم و از درگاه خداوند متعال آرزوی سلامتی و موفقیت ایشان را دارم.

از استاد گرامی سرکار خانم دکتر معصومه شمس بخاطر راهنمایی ها و کمک های بی دریغ شان، کمال تشکروسپاسگزاری را دارم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر رضا کچویی که بر بنده منت نهادند و داوری این پایان نامه را پذیرفتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

از همکاری و مساعدت جناب آقای دکتر فرزاد کتیرایی که مرا در انجام این تحقیق یاری رساندند، صمیمانه تقدیر و تشکر می نمایم.

از خانواده ام که همواره در کنارم بودند و توفیق انجام این تحقیق را مرهون زحمات وحمایت های بی دریغ شان می دانم و مراتب قدردانی خود را به پاس همدلی ها و همراهی شان ابراز می دارم.

از کارشناس محترم گروه قارچ شناسی سرکار خانم رازقی که تلاشی مداوم در جهت رفع مشکلات آزمایشگاه و دانشجویان دارند، قدردانی می نمایم.

از دوستانم آقایان تقی زاده، رنجبریان و خانم ها حقیقی، سعادت، حسینی و امانی که طی دوران تحصیل روزهای خاطره انگیزی در کنار یکدیگر داشتیم، صمیمانه تشکر می کنم و آرزوی توفیق روز افزون برایشان دارم.

از کلیه عزیزان اداره پژوهش دانشکده پزشکی بویژه جناب آقای موسویان و سرکار خانم دباغی صمیمانه تشکر می نمایم.

چکیده

امروزه قارچهای بیماریزای فرصت طلب جزء عفونت های تهدید کننده زندگی در بیماران با نقص سیستم ایمنی می باشند. بیماری های قارچی در بیماران ایدزی اغلب به صورت کاندیدیازیس دهانی حلقی تظاهر می یابد وعوامل ایجاد کننده آن از قارچهای مخمری کاندیدایی می باشد که شایعترین آنها *کاندیدا آلبیکنس* است.کاندیدیازیس دهانی از عفونت های شایع در بیماران ایدزی است واز اولین یافته های بالینی ویروس HIV می باشد.درمان توسط عوامل ضد قارچی آزولی بویژه فلوکونازول به عنوان راه کاری موثر جهت درمان عفونت های ناشی از مخمر *کاندیدا آلبیکنس* معرفی می شود،اما بروز مقاومت های دارویی این روش درمان را با مشکلات جدی روبرو ساخته است.لذا شناسایی گونه های مقاوم به عوامل ضد قارچی جهت درمان کارآمد وجلوگیری از مصرف بی رویه داروها بسیارضروری می باشد. هدف از این مطالعه شناسایی گونه های مقاوم به فلوکونازول در *کاندیدا آلبیکنس* های بومی جداشده از ضایعات دهانی افراد ایدزی با روش های فنوتیپی و مولکولی RT-PCR با تاکید بر دو ژن عامل مقاومت به داروی فلوکونازول(CDR2وERG11) می باشد.در این مطالعه جهت تایید نمونه های مورد بررسی، ابتدا از کشت نمونه ها برروی محیط کروم آگارکاندیدا،آزمایش های کلامیدوسپور و لوله زایا استفاده شد.با روش دیسک دیفیوژن میزان حساسیت ایزوله ها به فلوکونازول تعیین گردید.پس از استخراج RNA و تبدیل آن به cDNA با پرایمرهای اختصاصی ژن های CDR2وERG11 واکنش RT-PCR انجام شد.پس از انجام الکتروفورز محصول PCR، الگوی باندهای حاصله با الگوی باندهای حاصل از گونه های استاندارد حساس ومقاوم به فلوکونازول بررسی وجهت اندازه گیری میزان بیان ژن ERG11، نسبت این ژن به House Keeping ACT1 توسط نرم افزار Uvitec Analyze محاسبه گردید. با استفاده از روش دیسک دیفیوژن ۶۸/۱۸٪ نمونه ها حساس،۷/۵۸٪ وابسته به دوز و۲۴/۲۴٪ مقاوم به فلوکونازول بودند.در تمامی روش های ژنوتیپی نقطه هدف (DNA یاRNA) از تغییر ناپذیری بالایی برخوردارند،امروزه تکنیک های مولکولی به علت حساسیت بالا بسیارمورد توجه می باشند، با بررسی نمونه ها توسط روش RT-PCR، ۴ ایزوله دارای بیان ژن CDR2 و۶ ایزوله دارای بیان بیش از اندازه ژن ERG11 بودند. شیوع عفونت های کاندیدایی ومتعاقب آن درمان توسط عوامل ضد قارچی به خصوص ترکیبات آزولی ومقاومت نسبت به این ترکیبات، ضرورت استفاده از روش های تعیین حساسیت دارویی را بیش از پیش آشکار ساخته است. به هر حال مطلوب آن است که از روش های فنوتیپی مانند دیسک دیفیوژن که هزینه کمتری داشته همراه با روش های ژنوتیپی مانند RT-PCR که امکان بررسی مکانیسم های مقاومت دارویی و ژن های دخیل درآن را ایجاد می کند، استفاده شود.

کلمات کلیدی: کاندیدیازیس، ERG11، CDR2، RT-PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. تاریخچه..... ۲

۱-۲. طبقه بندی *کاندیدا*..... ۳

۱-۳. بیولوژی مولکولی *کاندیدا*..... ۳

۱-۴. اپیدمیولوژی و بیماریزایی..... ۴

۱-۴-۱. فاکتورهای بیماریزایی..... ۵

۱-۵. کاندیدیازیس دهانی..... ۷

۱-۵-۱. کاندیدیازیس غشای کاذب..... ۹

۱-۵-۲. کاندیدیازیس اریتماتوز..... ۹

۱-۵-۳. کاندیدیازیس هیپرپلاستیک..... ۱۰

۱-۵-۴. استوماتیت کاندیدایی مرتبط با دندان مصنوعی..... ۱۱

۱-۵-۵. ترک گوشه لب..... ۱۱

۱-۵-۶. التهاب لوزی شکل وسط زبان..... ۱۱

۱-۵-۷. کاندیدیازیس جلدی مخاطی مزمن..... ۱۲

۱-۶. بیماری های قارچی در بیماران مبتلا به ایدز..... ۱۳

۱-۶-۱. کاندیدیازیس دهانی حلقی..... ۱۴

۱-۶-۲. کاندیدیازیس مری..... ۱۵

۱-۶-۳. ولوواژینال کاندیدایی..... ۱۶

۱-۷. عوامل ضد قارچی آزولی..... ۱۶

۱-۷-۱. مقاومت در برابر عوامل ضد قارچی آزولی ۱۹
۱-۷-۲. مکانیسم های مولکولی مقاومت در برابر آزول ها ۲۱
۱-۷-۳. تغییرات در آنزیم هدف ۲۱
۱-۷-۴. افزایش انتشار دارو به خارج ۲۲
۱-۷-۵. جهش در سایر ژن ها در مسیر بیوسنتتیک ارگوسترول ۲۴
۱-۷-۶. تعدد مکانیسم های مولکولی مقاومت در برابر آزول ها ۲۵
۱-۷-۷. غیر یکنواختی مکانیسم های مولکولی مقاومت ۲۵
۱-۷-۸. مقاومت بیوفیلم ۲۶
۱-۷-۹. روش های ژنومی و پروتئومیک در مطالعه مقاومت آزولی ۲۷
۱-۸. روش های زیست شناسی مولکولی ۲۸
۱-۸-۱. واکنش زنجیره ای پلیمراز ۲۹
۱-۸-۱-۱. اساس کار PCR ۳۰
۱-۸-۱-۲. اجزاء PCR ۳۱
۱-۸-۲. واکنش PCR به همراه نسخه برداری معکوس (RT- PCR) ۳۳
۱-۹. مروری بر مطالعات انجام گرفته ۳۴
فصل دوم: مواد و روش ها ۳۸
۲-۱. جمع آوری ایزوله های بالینی ۳۹
۲-۲. کشت نمونه ها ۳۹
۲-۳. نگهداری مخمرهای *کاندیدا* ۳۹
۲-۴. تشخیص فنوتیپی گونه های مخمری ۴۰
۲-۴-۱. کروم آگار کاندیدا ۴۰
۲-۴-۲. آزمایش ایجاد لوله زایا ۴۱

۲-۴-۳. آزمایش ایجاد کلامیدوکونیدی ۴۱
۲-۵. آزمایش تعیین حساسیت به فلوکونازول توسط روش انتشار دیسک ۴۲
۲-۶. استخراج RNA ۴۴
۲-۷. بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده ۴۶
۲-۷-۲. اندازه گیری کمی غلظت RNA به روش اسپکتروفتومتری ۴۶
۲-۷-۳. بررسی کیفی RNA به روش الکتروفورزی ۴۷
۲-۸. تیمار RNA ۴۷
۲-۹. سنتز cDNA ۴۸
۲-۱۰. واکنش RT-PCR ۴۹
۲-۱۰-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۴۹
۲-۱۰-۲. الکتروفورز محصول PCR ۵۳
۲-۱۰-۲-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۵۳
۲-۱۰-۲-۲. تهیه بافر TBE5X ۵۵
۲-۱۱. تجزیه و تحلیل داده ها ۵۵
فصل سوم: نتایج ۵۶
۳-۱. نتایج کشت نمونه ها در محیط کروم آگار کاندیدا ۵۷
۳-۲. نتایج کشت بر روی محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ ..... ۶۰
۳-۳. نتایج آزمایش تولید لوله زایا ۶۱
۳-۴. نتایج حاصل از ارزیابی میزان حساسیت جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* به فلوکونازول توسط روش انتشار دیسک ۶۴
۳-۵. نتایج مربوط به استخراج RNA و بررسی کیفی آن توسط الکتروفورز ۶۹
۳-۵-۱. نتایج حاصل از بررسی کمی غلظت RNA توسط روش اسپکتروفتومتری ۷۰
۳-۶. نتایج مربوط به تیمار RNA ۷۳

۳-۷. نتایج مربوط به بررسی پرایمر در NCBI BLAST ۷۴
۳-۸. نتایج آزمون RT-PCR ژن های ACT1, CDR2 ..... ۷۷
۳-۸-۱. نتایج آزمون RT-PCR ژن های ACT1, ERG11 ..... ۷۸
فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها ۸۵
۴-۱. بحث ۸۶
۴-۲. پیشنهادها ۹۳
منابع ۹۴
چکیده انگلیسی ۱۰۵

فهرست جداول

جدول ۱-۱. مروری بر انواع عفونت های کاندیدایی و عوامل مستعد کننده آنها ۶

جدول ۱-۲. طبقه بندی اشکال بالینی کاندیدیازیس دهانی ۸

جدول ۲-۱. ترکیب RNA بافر ۴۵

جدول ۲-۲. مقادیر مورد استفاده جهت مرحله اول سنتز cDNA ۴۸

جدول ۲-۳. مقادیر مورد استفاده جهت مرحله دوم سنتز cDNA ۴۹

جدول ۲-۴. ترکیبات و مقادیر PCR Master Mix ۴۹

جدول ۲-۵. توالی پرایمرها و میزان حجم مورد نیاز هر یک از پرایمرها ۵۰

جدول ۲-۶. مطلوب ترین دمای اتصال پرایمرها به DNA الگو و طول پرایمرها ۵۱

جدول ۲-۷. اجزاء فرآیند RT-PCR برای واکنش ۱۲/۵ میکرولیتری با پرایمرهای ACT1, CDR2, ERG11 ..... ۵۱

جدول ۲-۸. چرخه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت انجام PCR با پرایمرهای ACT1, ERG11 ..... ۵۲

جدول ۹-۲. چرخه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت انجام PCR با پرایمر CDR2 ..... ۵۲

جدول ۳-۱. راهنمای تشخیص اولیه گونه های *کاندیدا* بر روی محیط کروم آگار کاندیدا ۵۸

جدول ۳-۲. شناسایی گونه های *کاندیدا* با استفاده از روش های مورفولوژیک ۶۲

جدول ۳-۳. نتیجه آزمون دیسک دیفیوژن بر روی *کاندیدا آلبیکنس* استاندارد مقاوم ۶۴

جدول ۳-۴. نتایج حاصل از تعیین میزان حساسیت ایزوله های استاندارد و بالینی *کاندیدا آلبیکنس* توسط روش دیسک دیفیوژن.. ۶۷

جدول ۳-۵. تعداد و درصد فراوانی تعیین میزان حساسیت ایزوله های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به فلوکونازول..... ۶۸

جدول ۳-۶. جذب نوری RNAهای استخراج شده و یکسان نمودن غلظت آنها ۷۱

جدول ۳-۷. میزان افزایش بیان ژن ERG11 نسبت به ACT1 و بیان ژن CDR2 ..... ۷۹

جدول ۳-۸. مقایسه نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی ایزوله های مورد مطالعه ۸۲

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱. مکانیسم عملکرد آزول ها..... ۱۸

شکل ۱-۲. مکانیسم های شناخته شده مقاومت به آزول..... ۲۴

شکل ۱-۳. واکنش PCR..... ۲۹

شکل ۳-۱. *کاندیدا آلبیکنس* استاندارد (ATCC76615) که بر روی کروم آگار رنگ سبز روشن ایجاد می کند..... ۵۹

شکل ۳-۲. *کاندیدا کروزئی* که بر روی کروم آگار رنگ صورتی ایجاد می کند..... ۵۹

شکل ۳-۳. ایجاد کلامیدوسپور توسط گونه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* بر روی محیط CMT..... ۶۰

شکل ۳-۴. عدم ایجاد کلامیدوسپور توسط *کاندیدا کروزئی* بر روی محیط CMT..... ۶۰

شکل ۳-۵. تولید لوله زایا توسط گونه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس*..... ۶۱

شکل ۳-۶. عدم تولید لوله زایا توسط *کاندیدا کروزئی*..... ۶۱

شکل ۳-۷. *کاندیدا آلبیکنس* استاندارد مقاوم به فلوکونازول (ATCC76615)..... ۶۵

شکل ۳-۸. یک ایزوله بالینی وابسته به دوز..... ۶۵

شکل ۳-۹. *کاندیدا آلبیکنس* استاندارد حساس به فلوکونازول (ATCC10231)..... ۶۵

شکل ۳-۱۰. نمایش RNAهای استخراج شده بر روی ژل رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید..... ۶۹

شکل ۳-۱۱. تیمار RNAهای استخراج شده توسط آنزیم DNase..... ۷۳

شکل ۳-۱۲. توالی پرایمر یافت شده ژن ERG11 توسط Gene Runner..... ۷۵

شکل ۳-۱۳. توالی پرایمر یافت شده ژن CDR2 توسط Gene Runner..... ۷۵

شکل ۳-۱۴. بلاست پرایمر CDR2..... ۷۶

شکل ۳-۱۵. بلاست پرایمرERG11..... ۷۶

شکل ۳-۱۶. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول RT-PCR ژن های ACT1, CDR2..... ۷۷

شکل ۳-۱۷. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول RT-PCR ژن های ACT1, ERG11..... ۷۹

فصل اول

مقدمه و
مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. تاریخچه

تا حدود ۲۰۰ سال عامل بیماری تراش [۱]، اولین شکل بیماری کاندیدیازیس،[۲] ناشناخته بود. اولین اشاره به لفظ تراش توسط Pepys بوده است، همچنین در منابع اشاره شده است که این بیماری مربوط به زمان بقراط می باشد که درحدود چهارصد سال قبل از میلاد مسیح آن را در دو بیمار توضیح داده است[۱].در سال ۱۸۴۶ Berg در یک مطالعه علمی بر روی بیماری، ارتباط بیماری تراش را با قارچها نشان داد، در سال ۱۸۴۷ Robin آن را تحت عنوان *اوئیدیوم آلبیکنس*[۳] طبقه بندی کرد. لفظ آلبیکنس (به معنای سفید کردن یا سفید شدن) اولین بار توسط Robin بکار برده شد. در سال ۱۸۸۸ Hansen عامل بیماری را در گروه مونیلیا[۴] قرار داد. در سال ۱۹۲۳ Berkhout بدلیل آنکه این موجود زنده بوضوح با گونه های مونیلیا تفاوت داشت، نام ژنریک *کاندیدا* (برگرفته از یک لغت لاتین به معنای لباس سفیدی که کاندیداهای مجلس سنا در روم باستان بر تن می کردند)، را برای آن پیشنهاد داد.

در سال ۱۹۵۴ در هشتمین کنگره گیاه شناسی رسما *کاندیدا آلبیکنس* [۵] به عنوان عامل بیماری پذیرفته شد. در سال های ۱۹۵۰ تا ۱۹۹۰ مطالعات آغازین انجام شده به خصوص در زمینه تاکسونومی، بیوشیمی و میکروسکوپی بسط یافت[۲].

1- Thrush
2- Candidiasis
3- *Oidium albicans*
4- Monilia
5- *Candida albicans*

در طـی دهـه ۸۰ مـیلادی جنبـه هـای بیولـوژی مولکـولی بـا کشـف دیپلوئیـد بـودن ژنـوم *کاندیدا آلبیکنس* مورد بررسی قرار گرفت[۳].

۱-۲.طبقه بندی *کاندیدا*

در حالیکه اغلب گونه های *کاندیدا* تولید مثل غیرجنسی دارند، در بعضی گونه ها مرحله جنسـی نیز شناخته شده است و اسپور جنسی تولید می کنند، اما با این وجود همچنان از نظـر تاکسـونومیک در دسته قارچهای ناقص قرار می گیرند. گونه های بیماریزا و غیر بیماریزای *کاندیدا* که مرحله جنسی در آنها شناخته شده است، جزء آسکومیست ها قرار می گیرند و بررسی توالی های DNA ارتباط ایـن قارچ را با آسکومیست ها ثابت می کند. همچنین برخی از خصوصیات درباره گونه های *کاندیدا* وجـود دارد که نشان می دهد به آسکومیست ها تعلق دارند به عنـوان مثـال اوره آز منفـی و فاقـد کپسـول هستند، عمل تخمیرانجام می دهند، اینوزیتول منفی هستند، در دیواره سلولی بتاگلوکان می سازند و توانایی تولید نشاسته و پیگمان کاروتنوئید را بر خلاف بازیدیومیست ها ندارند[۴].

۱-۳. بیولوژی مولکولی *کاندیدا*

مطالعه در سطح ژنوم و DNA *کاندیدا آلبیکنس*، به دلیل این حقیقت که این مخمر بطـور ثابـت دارای ژنوم دیپلوئید و بدون مرحله جنسی است، دچار اشکال است زیرا ایجـاد یـک موتانـت نیازمنـد تخریب یا حذف ژن یا ژن های مشابه در هر دو آلل در ژنوم است، که باعث مشکلات و پیچیـدگی در تمام مطالعات بیان ژن در این موجود زنده گردیده است. علیرغم این مشکلات، اطلاعات کاملی درباره بیولوژی این مخمر بدست آمده است و صدها توالی DNA در سـایت هـای مختلـف مربوطـه موجـود است. پیچیدگی های زیادی در ژنوم *کاندیدا* وجود دارد، کدون سه تایی CUG کـه بـه طـور طبیعـی لوسین را کد می کند در گونه های *کاندیدا* سرین را نیز کد می نماید. این اختلاف در اثر تغییـرات در ساختارهای حلقوی tRNA سرین در *کاندیدا* می باشد[۵].

کاندیدا آلبیکنس دارای هشت کروموزوم دو تایی است که از یک تا هفت نامگذاری شده اند، بعلاوه یک کروموزوم R که از نظر اندازه بسیار متغیر است. تعداد کروموزوم در بعضی گونه های دیگر *کاندیدا* به صورت زیر تعیین شده اند، در *کاندیدا گلابراتا*[1] و *کاندیدا پاراپسیلوزیس*[2] ۱۴، در *کاندیدا تروپیکالیس*[3] که یک مخمر دیپلوئید است، مانند *کاندیدا آلبیکنس* ، ۱۲ کروموزوم آن به صورت ۶ جفت مشاهده می شود، در *کاندیدا گیلرموندی* و *کاندیدا کروزئی* ۸ [4]، و در *کاندیدا کفیر*[5] ۱۸ می باشد. اندازه کروموزوم محدوده ای از ۰/۵ تا ۴/۵ مگا باز را در همه گونه ها در بر می گیرد، بجز *کاندیدا گلابراتا* که کروموزوم هایی بزرگتر از *ساکارومیسس سرویزیه* دارد[۶].

۱-۴. اپیدمیولوژی و بیماریزایی

در رابطه با گونه های *کاندیدا* باید اشاره نمود که شایع ترین عوامل عفونت های قارچی در انسان، شایع ترین قارچهای عامل عفونت های بیمارستانی و چهارمین علت ایجاد عفونت های خونی در بین تمام عوامل ایجاد عفونت هستند. گونه های *کاندیدا* که به عنوان بیماریزاهای انسانی شناخته شده اند، فلور بدن انسان و حیوانات خونگرم هستند. آنها بطور اولیه در مجاری گوارشی مستقر می شوند اما به صورت همزیست در واژن و پیشابراه[6]، پوست و لای انگشتان پا یافت می شوند. *کاندیدا آلبیکنس* که اغلب عفونت های قارچی انسانی را سبب می شود از منابع مختلفی شامل آب شیرین، آب دریا، خاک و هوا جدا شده است[۷]. به طور کلی شیوع گونه های *کاندیدا* در دهان ۲۵ تا ۵۰ درصد است که در ۷۰ تا ۸۰ موارد *کاندیدا آلبیکنس*جدا شده است. در بیماران مبتلا به ایدز، افرادی که دندان مصنوعی دارند و یا به عللی به بیماری های دهانی مبتلا هستند، افراد دیابتی، شیمی درمانی، بدخیمی و در کودکان میزان شیوع بالاتر گزارش شده است. در بیمارانی که در بیمارستان بستری هستند میزان شیوع *کاندیدا* در دهان ۵۰ تا ۷۰ درصد است[۸].

1- C. glabrata
2- C. tropicalis
3- C. parapsilosis
4- C.krusei
5- C. kefyr
6- Urethra

۱-۴-۱. فاکتورهای بیماریزایی

چسبندگی[1] گونه های *کاندیدا* به انواع بافت ها و نیز سطوح اجسام بی جان در مرحله اول کلونیزاسیون و تهاجم بافتی امری ضروری است. *کاندیدا آلبیکنس* در اتصال به سلولهای اپی تلیال نسبت به سایر گونه ها دارای قدرت بیشتری است، این توانایی در چسبندگی دراثر واکنش اختصاصی(لیگاند- رسپتور) و عوامل غیر اختصاصی (شارژ الکتروستاتیک و پیوند واندروالسی) بدست آمده است[۹]. دی‌مورفیسم(دوشکلی بودن) نیز در بیماریزایی نقش مهمی ایفا می‌کند. و ارگانیسم در انسان ممکن است در فنوتیپ های مختلف ظاهر شود[۱۰]. خاصیت آبگریزی[2] دیواره سلولی *کاندیدا آلبیکنس* در اتصال این ارگانیسم نقش مهمی ایفا می‌کند، که این خاصیت به گلیکوزیلاسیون مانوپروتئین های سطح سلول بر می گردد. البته بر خلاف سلولهای زایا، بلاستوکونیدی های *کاندیدا آلبیکنس* خاصیت آبدوستی[3] دارند[۱۱].گلیکومانو پروتئین با دو مکانیسم در بیماریزایی نقش دارد[۱۲].

- تاثیر برآبگریزی سطح سلول که در اتصال و چسبندگی آن دخالت دارد.
- سرکوب سیستم ایمنی میزبان که البته نحوه اثر آن به درستی شناخته نشده است.

آسپارتیل پروتئیناز ترشحی (SAP) در *کاندیدا آلبیکنس*،*کاندیدا دابلی نینسیس*، *کاندیدا گیلرموندی*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و*کاندیدا تروپیکالیس* ترشح می شود و پوشش بافت پیوندی را برای ورود *کاندیدا* تحت اثر پروتئازی قرار می‌دهد[۱۳].

پدیده فنوتایپ سوئیچینگ نیز در بیماریزایی موثر است. در کنار عوامل مذکور می توان به بیان گلیکوپروتئین های سطح دیواره سلول، میزان حساسیت به خاصیت کشندگی نوتروفیل ها و سایر اکسیدان ها و مقاومت به داروهای ضد قارچی به عنوان عوامل بیماریزایی اشاره نمود[۱۴] .

1- Adherence
2- Hydrophobicity
3- Hydrophilic

جدول ۱-۱ مروری بر انواع عفونت های کاندیدایی و عوامل مستعد کننده آنها

نوع بیماری	فاکتور مستعد کننده	نوع بیماری	فاکتور مستعد کننده
عفونتهای دهانی و حلقی	افزایش سن، دندان مصنوعی، دیابت، آنتی بیوتیک درمانی، سرطان سر و گردن، کورتیکواستروئید درمانی، شیمی درمانی، ایدز، بدخیمی های خونی، سوء تغذیه، پیوندهای بافتی و سلول بنیادی	**عفونت مجاری ادراری**	سوندهای ادراری انسداد ادراری جراحی مجاری ادراری دیابت ملیتوس
ازوفاژیت	کورتیکواستروئید درمانی سیستمیک ، ایدز، سرطان، پیوندهای بافتی و سلول بنیادی	**اندروکاردیت**	جراحی وسیع اندوکاردیت یا بیماری دریچه ای باکتریایی قبلی، اعتیاد تزریقی کاتتر اعصاب مرکزی بلند مدت
عفونتهای تحتانی دستگاه گوارش	سرطان ، جراحی	**پریکاردیت**	جراحی تروماتیک، سرکوب ایمنی
ولوواژنیت	داروهای ضد بارداری خوراکی، دیابت، حاملگی، آنتی بیوتیک درمانی، کورتیکواستروئید درمانی	**عفونت منتشره از خون**	پیوند عضو، استفاده بلند مدت از آنتی بیوتیک، جراحی شکمی، تغذیه تزریقی، همودیالیز، سرکوب ایمنی، بستری بودن در ICU، پیوند کبد و سلول بنیادی
عفونت پوست و ناخن	رطوبت موضعی، شستشو و برخورد زیاد با آب	**عفونت دستگاه اعصاب مرکزی**	جراحی CNG، شانت
کاندیدیازیس جلدی مادرزادی	اجسام خارجی داخل رحمی، نارس بودن نوزاد	**عفونت استخوان و مفاصل**	تروما، پای دیا بتیک ، تزریق درون مفصلی
کاندیدیازیس جلدی و مخاطی مزمن	نقص در سلولهای T لنفوسیت	**عفونت شکمی**	جراحی شکمی، پانکراتیت، دیالیز پریتونئال گردشی مداوم
پنومونی	آسپیراسیون	**عفونت چشمی**	تروما و جراحی