بسم الله
الرحمن الرحیم

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای مجتبی تقی زاده ارمکی رشته: قارچ شناسی گرایش: - ---- تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر محمد حسین یادگاری (استاد راهنما)

دکتر معصومه رجبی بذل (استاد مشاور)

دکتر معصومه شمس (استاد ناظر)

دکتر رضا کچوئی (استاد ناظر)

دکتر شهلا رودبار محمدی (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 تاریخ۸۷/۴/۱ 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 **مجتبی تقی زاده ارمکی** دانشجوی رشته **قارچ شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۸۷** 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:

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 **۸۹** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر محمد حسین یادگاری**، مشاوره **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 ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان 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 **مجتبی تقی زاده ارمکی** 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 : **مجتبی تقی زاده ارمکی**

تاریخ و امضاء :

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته

قارچ شناسی پزشکی

عنوان

ارزیابی حساسیت و ردیابی ژن های مقاوم به فلوکونازول (MDR_1 ، CDR_1)در سویه های بالینی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران ایدزی با روش *RT-PCR*

نگارش

مجتبی تقی زاده ارمکی

استاد راهنما

دکتر محمدحسین یادگاری

استاد مشاور

دکتر معصومه رجبی بذل

زمستان ۱۳۸۹

تقدیم به :

مادرم

که با شمع وجودش روشنی

بخش راهم گردید

پدرم

همیشه نیازمند محبتش هستم

سپاس خداوندی را که نعمت اندیشیدن را در انسان به ودیعه نهاد و به این وسیله او را اشرف مخلوقات گردانید. خداوندی که بر هر نعمت حق و سپاسی بر بندگان مقرر فرمود.

از استاد عزیز و گرامی جناب آقای دکتر محمدحسین یادگاری، که با حمایت های بی دریغ و دلسوزانه خود در طول مراحل مختلف تحصیل و اجرای پایان نامه همواره بنده را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از استاد ارجمندم جناب خانم دکتر معصومه رجبی بذل، که مشاوره اینجانب را در تمامی مراحل پایان نامه بر عهده داشته و از هیچ مساعدتی دریغ نکردند ،کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از هئیت محترم داوران جناب آقای دکتر رضا کچویی و خانم دکتر معصومه شمس که داوری این پایانامه را قبول کردند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از خانم دکتر صفری که همواره مرا مرهون لطف و محبت خود نمودند سپاسگزاری می نمایم.

از همکاری و مساعدت جناب آقای دکتر فرزاد کتیرایی و محمود وحیدی،تشکر می نمایم.

از خانم دکتر شهلا رودبار محمدی به خاطر راهنمایی ها و کمک های بی دریغ شان کمال تشکر را دارم و برایشان آرزوی توفیق روزافزون را از ایزد متعال خواستارم.

از جناب آقای دکتر محمد رضا شکوه امیری و جناب آقای دکتر عقیل تبار ملاحسن به خاطر راهنمایی ها و کمک های بی دریغ شان کمال تشکر را دارم و برایشان آرزوی توفیق روزافزون را از ایزد متعال خواستارم.

از کارشناس محترم آزمایشگاه های گروه قارچ شناسی سرکار خانم رازقی که تلاش مداومی در جهت رفع مشکلات آزمایشگاه و دانشجویان داشتند، قدردانی می نمایم.

از زحمات دوستان خوبم در گروه بیوتکنولوژی پزشکی و همچنین کارشناس محترم گروه جناب آقای کروندیان سپاسگزاری می نمایم.

از دوستان دوران تحصیلم جناب آقایان پیرحاجاتی، فرح بخش، رنجبریان و سرکارخانم ها حسینی، حقیقی و امانی تشکر می نمایم.

چکیده:

کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول عامل کاندیدیازیس دهانی در بیماران با نقص سیستم ایمنی می باشد. هدف این مطالعه ارزیابی حساسیت و ردیابی ژن های مقاومتی (CDR_1 ، MDR_1) نسبت به داروی فلوکونازول در ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران ایدزی می باشد. در شرایط آزمایشگاهی حساسیت ۶۶ ایزوله بالینی کاندیدا آلبیکنس نسبت به فلوکونازول ارزیابی شد. حساسیت به داروی فلوکونازول با استفاده از مایکرودایلوشن براث و دیسک دیفیوژن مطابق روش CLSI انجام شد. از ۶۶ ایزوله کاندیدا آلبیکنس تست شده با روش تعیین حساسیت دیسک دیفیوژن به ترتیب ۴۵ ایزوله (% ۶۸/۱۸) حساس، ۵ ایزوله (% ۷/۵۸) وابسته به دوز و ۱۶ ایزوله (% ۲۴/۲۴) مقاوم به فلوکونازول بودند، در حالیکه با روش مایکرودایلوشن براث ۴۳ ایزوله (% ۶۵/۱۵) حساس، ۸ ایزوله (% ۱۲/۱۲) وابسته به دوز و ۱۵ ایزوله (% ۲۲/۷۳) مقاوم به فلوکونازول تعیین گردید. مکانیسم مولکولی مقاومت به داروهای آزولی در کاندیدا آلبیکنس شامل بیان بیش از اندازه ژن های پمپ انتشار (CDR_1 ، MDR_1) و تغییرات در آنزیم هدف می باشد. در این مطالعه آنالیز مولکولی برای تمامی ایزوله ها انجام شد. RNA تمامی ایزوله ها استخراج و cDNA آنها سنتز شد. سپس با استفاده از پرایمر های MDR_1 ، CDR_1 و ACT_1، RT- PCR انجام شده و آنالیز شدت باند ها با استفاده از نرم افزار تعیین گردید. بیان بیش از اندازه ژن های MDR_1 و CDR_1 به ترتیب برای ۲ و ۸ ایزوله کاندیدا آلبیکنس تعیین گردید. درصد فراوانی برای بیان بیش از اندازه ژن MDR_1 و CDR_1 به ترتیب % ۳/۰۳ و % ۱۲/۱۲ درصد می باشد.

واژگان کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، فلوکونازول، ژن مقاومت، RT-PCR.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه

۱- ۱. تاریخچه ۲
۱- ۲. طبقه بندی ۴
۱- ۳. گونه های بیماری زای جنس کاندیدا ۶
۱-۳-۱. کاندیدا آلبیکنس ۶
۱-۳-۲. کاندیدا تروپیکالیس ۷
۱-۳-۳. کاندیدا گلابراتا ۷
۱-۳-۴. کاندیدا کروزئی ۸
۱-۳-۵. کاندیدا پاراپسیلوزیس ۸
۱-۳-۶ . کاندیدا دابلینینسیس ۹
۱- ۴. عوامل موثر در ویرولانس کاندیدا آلبیکنس ۹
۱- ۴-۱. چسبندگی ۹
۱- ۴-۲. آنزیم های پرتئولیتیک ۱۰
۱- ۴-۳. تبدیل فاز مخمری به میسلیومی ۱۰
۱-۴-۴. تغییر فنوتایپی ۱۰
۱-۴-۵. شاخص های آنتی ژنتیک ۱۱
۱-۵. مکانیسم بیماریزایی کاندیدا آلبیکنس ۱۱
۱-۶. اشکال بالینی کاندیدیازیس ۱۱
۱-۷. کاندیدیازیس دهانی ۱۲
۱-۸. عوامل موثر در کاندیدیازیس دهانی ۱۳
۱-۹. یافته های بالینی کاندیدیازیس دهانی ۱۳
۱-۹-۱. کاندیدیازیس دهانی حاد ۱۳
۱-۹-۱-۱. کاندیدیازیس دهانی حاد با غشای کاذب ۱۳
۱-۹-۱-۲.کاندیدیازیس دهانی حاد آتروفیک ۱۴
۱-۹-۲. کاندیدیازیس دهانی مزمن ۱۴
۱-۹-۲-۱. کاندیدیازیس آتروفیک مزمن ۱۴
۱-۹-۲-۲. کاندیدیازیس هیپرپلاستیک ۱۵
۱-۱۰. کاندیدیازیس جلدی- مخاطی مزمن ۱۶
۱-۱۱. سایر اشکال بالینی کاندیدیازیس ۱۷

۱-۱۲.نقش ایمنی در کاندیدیازیس ۱۷
۱-۱۲-۱.سیستم ایمنی ذاتی ۱۷
۱-۱۲-۲.سیستم ایمنی اختصاصی ۱۷
۱-۱۳. درمان کاندیدیازیس دهانی ۱۸
۱-۱۳-۱. فلوکونازول ۱۸
۱-۱۳-۲. مکانیسم اثر ۱۹
۱-۱۳-۳. فارماکوکینتیک ۲۰
۱-۱۳-۴. عوارض جانبی ۲۰
۱-۱۴. مقاومت دارویی ۲۰
۱-۱۵. روشهای تعیین مقاومت به داروی فلوکونازول ۲۱
۱-۱۵-۱. مایکرودایلوشن ۲۱
۱-۱۵-۲.میکرودایلوشن ۲۱
۱-۱۵-۳. دیسک دیفیوژن ۲۱
۱-۱۶. مکانیسم های مولکولی مقاومت آزولی ۲۲
۱-۱۶-۱. انتقال دارو ۲۲
۱-۱۶-۲. تجزیه ارگوسترول در مسیر بیوسنتزی ۲۲
۱-۱۶-۳. افزایش میزان بیان هدف سلولی داروهای آزولی ۲۳
۱-۱۶-۴. افزایش انتشار دارو توسط پمپ های غشایی ۲۳
۱-۱۶-۴-۱. ABCT ۲۳
۱-۱۶-۴-۲. MF ۲۴
۱-۱۷. افزایش بیان ژن های مقاومتی در سطح mRNA ۲۶
۱-۱۸. تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در یک گونه مقاوم ۲۷
۱-۱۹. تغییرات در نوع سلول ۲۸
۱-۲۰. کاربرد روش های مولکولی در تشخیص مقاومت دارویی ۲۸
۱-۲۱. واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR ۲۹
۱-۲۲. روش های مولکولی در تشخیص مقاومت دارویی ۳۰
۱-۲۲-۱.RAPD PCR ۳۰
۱-۲۲-۲.MLEE ۳۰
۱-۲۲-۳. RT-PCR ۳۰
۱-۲۲-۳. سایر روشهای مولکولی ۳۱
۱-۲۳. انواع روش های RT-PCR ۳۱
۱-۲۳-۱.Quantitative RT-PCR ۳۱
۱-۲۳-۲.Multiplex RT-PCR ۳۱

۱-۲۳-۳. روشRT-PCR نیمه کمی ۳۱
۱-۲۴. مراحل انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس نیمه کمی ۳۲

فصل دوم: مروری بر مطالعات گذشته

۲-۱. مروری بر مطالعات انجام شده ۳۵

فصل سوم : مواد و روش ها

۳- ۱. جمع آوری نمونه ها ۴۵
۳- ۲. انجام تست های فنوتایپی ۴۵
۳-۲- ۱. تست کروم آگار ۴۵
۳-۲- ۲. تست تولید کلامیدیوسپور ۴۶
۳-۲- ۳. تست تولید لوله زایا ۴۷
۳-۳. روش های تعیین حساسیت به آنتی بیوتیک های ضد قارچی ۴۷
۳-۳-۱. ارزیابی حساسیت دارویی به روش دیسک دیفیوژن ۴۷
۳- ۳-۲. ارزیابی حساسیت دارویی به روش مایکرودایلوشن ۴۹
۳-۳-۲-۱. تهیه سوسپانسیون قارچی ۵۰
۳-۳-۲-۲. تهیه استوک محلول دارویی ۵۰
۳-۳-۲-۳. تهیه محیط کشت سابورو ۵۰
۳-۳-۲-۴. ارزیابی حساسیت دارویی ایزوله ها ۵۰
۳-۴. استخراج RNA توسط روش پرل شیشه ای و ترکیب ۳ تایی ۵۱
۳-۵. قرائت غلظت نمونه های RNA استخراج شده ۵۳
۳-۶. حذف DNA ژنومی از Total RNA استخراج شده ۵۴
۳-۷. تیمار کردن Total RNA یا مرحله DNase Treatment ۵۴
۳-۸. سنتز cDNA ۵۵
۳-۹. پرایمر ۵۷
۳-۱۰. انجام PCR بر روی Total RNA و Total RNA تیمار شده ۵۹
۳-۱۱. بهینه سازی شرایط تکثیر قطعات مورد نظر با PCR ۶۱
۳-۱۲. الکتروفورز محصول PCR ۶۲
۳-۱۳. طرز تهیه بافر TBE ۵X ۶۳

فصل چهارم : نتایج

۴- ۱. نتایج حاصل از تست های فنوتایپی ۶۵
۴- ۲. نتایج حاصل از ارزیابی میزان حساسیت گونه های استاندارد و بالینی کاندیدا آلبیکنس نسبت به دارو فلوکونازول با استفاده از روشهای دیسک دیفیوژن و مایکرودایلوشن براث ۶۷
۴-۳. نتایج حاصل از استخراج Total RNA و تیمار Total RNA ۷۶
۴-۴. نتایج حاصل از چک کردن پرایمر در نرم افزار Gene Runner و NCBI Blast ۷۷
۴-۵. نتایج PCR بر روی Total RNA قبل و بعد از تیمار با آنزیم DNase ۷۹
۴-۶. نتایج حاصل از قرائت OD، Total RNA به منظور سنتز cDNA ۸۰
۴-۷. نتایج حاصل از بهینه شدن شرایط PCR ۸۴
۴-۸. نتایج آزمون RT-PCR ژن های MDR_1، CDR_1 و ACT_1 ..... ۸۶

فصل پنجم : بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها

۵-۱ . بحث ۹۵
۵-۲ . پیشنهادها ۱۰۱
منابع ۱۰۲
چکیده انگلیسی ۱۱۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱- ۱. جایگاه طبقه بندی جنس کاندیدا ۵
جدول ۳- ۱. ترکیب RNA بافر ۵۲
جدول ۳- ۲. تریتمنت Total RNA ۵۵
جدول ۳- ۳-الف. سنتز cDNA ۵۶
جدول ۳- ۳-ب. سنتز cDNA ۵۷
جدول ۳- ۴. پرایمر های مورد استفاده در PCR ۵۸
جدول ۳- ۵. برنامه داده شده به دستگاه PCR جهت تکثیر ناحیه CDR_1 و MDR_1 ..... ۶۰
جدول ۳- ۶. اجزاء واکنش PCR برای Set up با پرایمر های CDR_1، MDR_1 و ACT_1 ..... ۶۱
جدول ۳- ۷. برنامه داده شده به دستگاه جهت تکثیر ناحیه CDR_1، MDR_1 و ACT_1 ..... ۶۲
جدول ۳- ۸. طرز تهیه بافر TBE 5X ۶۳
جدول ۴- ۱-الف. نتایج حاصل از تعیین میزان حساسیت داروی فلوکونازول بر روی ایزوله های استاندارد و بالینی کاندیدا آلبیکنس ۶۸
جدول ۴-۱-ب. تعداد و درصد فراوانی حاصل از تعیین میزان حساسیت داروی فلوکونازول بر روی ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس ۷۲
جدول ۴- ۲. غلظت RNA های استخراج شده نمونه ها به منظور سنتز cDNA ۸۰
جدول ۴- ۳. بهینه ترین میزان و غلظت مواد بکار گرفته شده در PCR ۸۵
جدول ۴- ۴-الف. نسبت بیان ژن CDR_1 و MDR_1 نسبت به ACT_1 ..... ۸۹
جدول ۴- ۴-ب. تعداد و درصد فراوانی بیان ژن های CDR_1 و MDR_1 ..... ۹۳

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱- ۱.جایگاه اثر برخی از داروهای ضد قارچی ۱۹
شکل ۱- ۲.اثر داروهای ضد قارچی آزولی بر مسیر بیوسنتز ارگوسترول..... ۲۵
شکل ۴- ۱-الف.تست تولید لوله زایا..... ۶۵
شکل ۴- ۱-ب.تست تولید کلامیدیوسپور ۶۶
شکل ۴- ۱-ج.تست محیط کروم آگار ۶۶
شکل۴-۲. نتیجه دیسک برای ایزوله های کاندیدا آلبیکنس..... ۷۲
شکل ۴-۳.الکتروفورز استخراج RNA و Total RNA تیمار شده ۷۶
شکل ۴-۴-الف.پرایمر یافت شده CDR_1 را بر روی cDNA کاندیدا آلبیکنس ۷۷
شکل ۴-۴-ب. پرایمر یافت شده MDR_1 را بر روی cDNA کاندیدا آلبیکنس..... ۷۷
شکل ۴-۴-ج. نتایج حاصل از بلاست پرایمر MDR۱ ..... ۷۸
شکل ۴-۴-د.نتایج حاصل از بلاست پرایمر CDR۱..... ۷۸
شکل ۴-۵. باند حاصل از الکتروفورز محصول PCR..... ۷۹
شکل ۴-۶-الف. نتایج حاصل از گرادینت $mgcl_2$..... ۸۴
شکل ۴-۶-ب. نتایج حاصل از گرادینت دما..... ۸۴
شکل۴-۶-ج. نتایج حاصل از گرادینت cDNA..... ۸۵
شکل۴-۷-الف. نتایج حاصل از الکتروفورز آزمون RT-PCR ژن هایACT_1 و MDR_1..... ۸۷
شکل۴-۷-ب. نتایج حاصل از الکتروفورز آزمون RT-PCR ژن هایACT_1 و CDR_1..... ۸۸
شکل۴-۷-ج. نتایج حاصل از الکتروفورز آزمون RT-PCR ژن هایACT_1 و CDR_1..... ۸۸
شکل۴-۷-د. آنالیز باند های الکتروفورز شدهMDR_1 ، CDR_1 و ACT_1..... ۸۹

فهرست نمودار ها

عنوان **صفحه**

نمودار۴-۱-الف. تعداد ارگانیسم در $MIC_{۵۰}$ بدست آمده از رقت های مختلف دارویی تهیه شده در روش مایکرودایلوشن براث.....۷۳

نمودار ۴-۱-ب. درصد فراوانی حاصل از تعیین میزان حساسیت ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس نسبت به داروی فلوکونازول با روش دیسک دیفیوژن.....۷۳

نمودار ۴-۱-ج. درصد فراوانی حاصل از تعیین میزان حساسیت ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس نسبت به داروی فلوکونازول با روش مایکرودایلوشن براث.....۷۴

نمودار ۴-۱-د. تعداد ارگانیسم در MFC بدست آمده از رقت های مختلف دارویی تهیه شده در روش مایکرودایلوشن براث.....۷۴

نمودار۴-۱-ه. تعداد کاندیدا آلبیکنس در دامنه حساسیت های مختلف با روش دیسک دیفیوژن.....۷۵

فصل اول

مقدمه

۱-۱. تاریخچه

کاندیدیازیس[1] طیفی از بیماری هاست که بصورت فرصت طلب در افراد مستعد بیماری های مختلف و متنوع، از عفونت های سطحی ساده تا عفونت های سیستمیک و منتشره کشنده را ایجاد می کند[۱]. بیماری کاندیدیازیس به شکل حاد، تحت حاد و مزمن در سطوح مختلف نظیر پوست، ناخن و مخاط و یا سایر اندام های احشایی دیده می شود[۲]. شیوع کاندیدیازیس حدود ۲۵ تا ۵۰ % عفونت های بیمارستانی در بخش مراقبتهای ویژه و ۸ تا ۱۵% کل عفونتهای بیمارستانی را تشکیل می دهد [۳]. اولین مورد گزارش کاندیدیازیس دهانی در پزشکی نوین مربوط به سال ۱۷۷۱ و ۱۷۸۴ است. در آن سالها این بیماری به عنوان یک مسئله در کودکان مطرح شده و از آن به بعد طی سالها اشکال پاتولوژیک متعددی در ارتباط با قارچ کاندیدا مطرح گردیده است. در قرن چهارم قبل از میلاد فردی به نام بقراط در کتاب خود تحت عنوان اپیدمیک آفت دهانی یا برفک[2] را مطرح کرده بود[۴]. Rosenstien در سال ۱۷۷۱ و Wood در سال ۱۷۸۳ برفک دهانی را به عنوان بیماری در نوزادان توضیح دادند. Berg در سال ۱۸۴۱ و Bennet در سال ۱۸۴۴ عامل قارچی را در برفک مشاهده کردند. در سال ۱۸۵۳ شخصی به نام Robin مطرح کرد که عامل

1 -Candidiasis
2- Trush

برفک می تواند عامل ایجاد بیماری سیستمیک باشد و در آن زمان آنرا *اوئیدوم آلبیکنس*[1] نامید. بدلیل اینکه سلولهای قارچی به صورت متورم و بدنبال هم قرار گرفته بودند. در سال ۱۸۷۵ با جدا کردن عامل یکسان برفک دهان نوزاد واژن مادر آلوده آن مطرح کردند که برفک دهان نوزادان می تواند در طی عبور از کانال زایمانی آلوده ایجاد شود. دو سال بعد در سال ۱۸۷۷ نام *سیرنگا آلبیکنس*[2] به نام *ساکارومایسس آلبیکنس*[3] تغییر پیدا کرد. در همان سال شخصی به نام Grawitz توضیح داد که این قارچ دو شکلی است و دارای خصوصیات سلول جوانه زن، میسلیال فرم و کلامیدوسپور می باشد[۵]. در سال ۱۸۹۰ Zopf نام *مونیلیا آلبیکنس*[4] را جایگزین نام قبلی کرد که این نام تا سالهای متمادی باقی ماند[۴]. در سال ۱۹۲۳ شخصی به نام Berkhout جنس کاندیدا را جایگزین مونیلیا کرد و توضیح داد که این جنس می تواند تولید سودوهیف کند[۶]. سرانجام این نام در هشتمین کنگره بوتانیکال در سال ۱۹۵۴ در شهر پاریس به عنوان کاندیدا آلبیکنس[5] پذیرفته شد[۵]. اخیراً کاندیدیازیس مخاطی- دهانی با ظهور عفونت نقص سیستم ایمنی انسان HIV[6] مورد توجه زیادی قرار گرفته است و معلوم شده است که بیشتر از ۹۰% اشخاص آلوده به ایدز از ضایعات کاندیدیازیس دهانی- حلقی رنج می برند[۷]. بیماران آلوده HIV به بیشتر از اشخاص طبیعی، به علت کاهش سلولهای TCD_4 مستعد کاندیدیازیس دهانی حلقی[7] هستند در صورتی که در مورد کاندیدیازیس واژینال و منتشره اینطور نیست[۸]. در میان عوامل کاندیدیازیس دهانی گونه کاندیدا آلبیکنس نسبت به سایر گونه های کاندیدا از شیوع بیشتری در افراد ایدزی برخوردار است[۹].

1-Oidium albicans
2- Syringospora albicans
3 -Saccharomyces albicans
4- Monilia albicans
5- Candida albicans
6 -Human Immunodeficincy Virus
7-Oral Candidiasis

۱-۲. طبقه بندی

اغلب گونه های کاندیدا دارای خصوصیات بیوشیمیایی مشابه قارچ های رده آسکومیست[۱] می باشند. این درحالیست که اغلب گونه های کاندیدا تولید مثل غیر جنسی[۲] داشته، اما برخی از دانشمندان برای برخی از گونه های کاندیدا مرحله جنسی شناسایی کردند و این گونه ها قادر به تولید اسپور جنسی هستند و در فاز تکثیر جنسی گونه های کاندیدا را متعلق به رده آسکومیست می دانند و گونه هایی از جنس کاندیدا که فاقد مرحله جنسی هستند یا در آنها مرحله جنسی شناخته نشده است، را متعلق به رده بلاستومیست[۳] از دوترومایست ها[۴] می دانند. در مجموع گونه های بیماری زا و غیر بیماری زای کاندیدا که مرحله جنسی در آنها شناخته شده است، جزء آسکومیست ها قرار می گیرند [۱۰].توافق همگانی بین قارچ شناسان در رابطه با جایگاه طبقه بندی این مخمر وجود ندارد. جدول ۱- ۱ جایگاه طبقه بندی کاندیداها را نشان می دهد [۱۰].

1-Ascomycetes
2-Mitosporic
3-Blastomycetes
4-Deutromycetes

جدول ۱- ۱ جایگاه طبقه بندی جنس کاندیدا

Kingdom	*Fungi*
Phylum	*Ascomycota*
SubPhylum	*Ascomycotina*
Class	*Hemiascomycetes*
Order	*Saccharomycetales*
Family	*Metschnikowiaceae*
Genus	*Clavispora*
Family	*Candidaceae(Anamorphic)*
Genus	*Candida*
Family	*Saccharomycetaceae*
Genus	*Debaryomyces* *Pichia* *Kluyveromyces* *Saccharomyces*