بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم مریم رودباری رشته **قارچ شناسی پزشکی** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جداشده از واژینیت کاندیدایی زنان مراجعه - کننده به مراکز درمانی شهر تهران با استفاده از تکنیک Multi Locus Sequence Typing** » در تاریخ **۱۳۹۲/۷/۲۸** ارائه کردند.

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

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر شهلا رودبار محمدی	
استاد مشاور	دکتر بی تا بخشی	
استاد مشاور	دکتر فرزاد کتیرایی	
استاد ناظر	دکتر شیرین شهبازی	
استاد ناظر	دکتر فاطمه فلاح	
استاد ناظر	دکتر منصور بیات	
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 پایان‌نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می‌باشد 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 پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می‌باشد.

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 یافته‌ها 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 **مریم رودباری** دانشجوی رشته **قارچ‌شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۸** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان‌نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم 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 ».

نام و نام خانوادگی مریم رودباری

تاریخ و امضا ۹۲/۹/۱۰

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 رساله دکتری نگارنده در رشته **قارچ‌شناسی پزشکی** است که در سال۱۳۹۲ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکترشهلا رودبارمحمدی**، مشاوره **دکتر بیتا بخشی و فرزاد کتیرایی** 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.

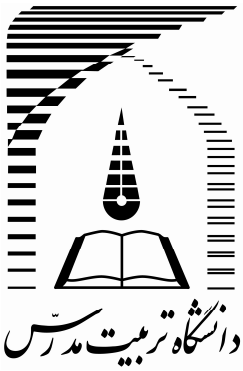
ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

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 **مریم رودباری** ردانشجوی رشته **قارچ‌شناسی پزشکی** مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی مریم رودباری

تاریخ و امضا ۹۲/۹/۱۰



دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته قارچ‌شناسی پزشکی

عنوان

بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از واژنیت کاندیدیایی زنان مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر تهران با استفاده از تکنیک Multi Locus Sequence Typing

نگارش

مریم رودباری

استاد راهنما

دکتر شهلا رودبار محمدی

اساتید مشاور

دکتربی تا بخشی

دکتر فرزاد کتیرایی

مهر ۱۳۹۲

تقدیم به:

مادر مهربانم

که همواره دعای خیرش روشنی بخش مسیر زندگیم است؛

همسرم

که همواره یاریگرم بوده است؛

پسرم

که لبخندهای کودکانه و پاکی وجودش مایه آرامش و دلگرمیم است؛

و

به همه کسانی که لحظه ای بعد انسانی و وجدانی خود را فراموش نمی کنند و بر آستان گران سنگ انسانیت سر فرود می آورند و انسان را با همه تفاوت هایش ارج می نهند.

تشکر و قدردانی

«علم خویش را به جهل و یقین خود را به شک مبدل نکنید، آنگاه که به علم رسیدید عمل کنید و آنگاه که به یقین دست یافتید، اقدام نمایید»

حضرت علی (ع)

سپاس بی‌کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.
اکنون که به لطف پروردگار توانستم پایان‌نامه خود را به اتمام برسانم بر خود وظیفه میدانم از تمامی اساتید محترم و بزرگوارانی که در این مسیر همواره مرا مساعدت نمودند کمال تشکر و قدردانی خویش را ابراز نمایم.

- از استاد راهنمای عزیز وبزرگوارم سرکار خانم دکتر شهلا رودبار محمدی که همواره افتخار شاگردی در محضرشان را داشتم و در تمامی مراحل انجام این تحقیق در کنارم بودند واز هیچ کمک مادی و معنوی دریغ ننمودند و به معنای واقعی کلمه، استاد علم و اخلاق هستند تشکر ویژه نموده و از خداوند متعال طول عمر روز افزون برای ایشان خواستارم.
- ازاستاد مشاور عزیزم سرکار خانم دکتر بی تا بخشی که همواره با مشاوره‌های ارزشمند خود راهگشای مشکلات این تحقیق بودند و در طول دوران اجرای این رساله، با شکیبایی و صبر فراوان، زحمات فوق العاده‌ای متقبل شدند، کمال سپاسگزاری و قدردانی را دارم.و از پروردگار متعال موفقیت‌های روز افزون برایشان خواستارم.
- از جناب آقای دکتر فرزاد کتیرایی که مشاور دوم این تحقیق را بر عهده داشتند کمال تشکر و قدردانی را دارم.
- از جناب آقای دکتر محمد حسین یادگاری مدیر محترم گروه قارچشناسی پزشکی به خاطر رهنمودها و الطاف بی دریغشان سپاسگزارم.
- از استاتید ارجمندم، سرکار خانم دکتر فاطمه غفاری فر و خانم دکتر شیرین شهبازی، ناظرین داخلی محترم پایان‌نامه به خاطر تقبل زحمت و نظرات ارزششمندشان سپاسگزارم.
- از استاتید ارجمندم، سرکار خانم دکتر فاطمه فلاح و آقای دکتر منصور بیات، ناظرین خارجی محترم پایان‌نامه به خاطر تقبل زحمت و نظرات ارزششمندشان سپاسگزارم.
- از کارشناس محترم و دلسوز گروه قارچشناسی سرکار خانم رازقی به خاطر تمامی دلسوزیها و راهگشایی‌های مشکلات مسیر تحقیق و کمک‌های بی شائبه شان کمال قدردانی را دارم.
- در پایان از تمامی دوستان عزیزم خانم‌ها دکتر معصومه نویدی نیا، صفورا درخشان، فاطمه نیکومنش، مریم حسینی و آقای دکتر قربانعلی زادگا ن وسید علی معلم زاده سپاسگزارم و از خداوند متعال موفقیت و بهروزی را برایشان آرزومندم.

چکیده:

واژینیت کاندیدیایی یک مشکل ژنیکولوژی مهم در پزشکی می‌باشد تقریباً ۷۵٪ از زنان در طول زندگی خود حداقل یک بار مبتلا به کاندیدیازیس واژینال می‌شوند. در ۹۵-۸۵٪ موارد، عامل اصلی کاندیدیازیس واژینال کاندیدا آلبیکنس می‌باشد.از ژن‌های مهم که در بیماری زایی کاندیدا نقش دارند می‌توان به *Agglutinin Like Sequence Genes* اشاره نمود که پروتئین‌های موثر در چسبندگی و اتصال کاندیدا آلبیکنس را کد میکنند. MLST یک تکنیک مفید با قدرت افتراق پذیری بالا جهت مطالعه و بررسی اپیدمیولوژی و بررسی ارتباط ژنتیکی در بین پاتوژن‌های قارچی از طریق تعیین توالی در کل ژنوم میباشد. در این تکنیک به طور معمول شش تا هشت ژن کروموزومی غیر وابسته تعیین توالی میشود و اطلاعاتی راجع به شباهتها و اختلافات بین ایزوله در اختیار ما قرار میدهد.در این مطالعه سویه‌های کاندیدا آلبیکنس از نمونه‌های واژنیت کاندیدیایی زنان مراجعه کننده به کلینیک زنان جدا سازی شد، پس از کشت روی محیط سابورو دکستروزآگار و شناسایی قطعی با PCR-RFLP، به منظور ارزیابی مقاومت ایزوله‌ها به فلوکونازول، تست دیسک دیفوژن مطابق استاندارد CLSI برای آنها انجام شد.سپس بیان نیمه کمی ژن‌های ALS1,3 کاندیدا و میزان تنوع ژنیتیکی سویه‌ها به ترتیب با تکنیک RT-PCR و MLSTمورد ارزیابی قرار گرفت.

در این مطالعه ۵۳ ایزوله بالینی کاندیدا آلبیکنس از میان ۱۵۰ سویه، باروش PCR-RFLP شناسایی شد و ۵۰ ایزوله مقاوم و ۳ ایزوله حساس جدا سازی شد.نتایج حاصل از بررسی بیان ژن نشان داد که ۳۹ ایزوله (۷۳/۵٪) هر دوژن ALS1 وALS3 را بیان نمودندو ۳ ایزوله یکی از ژن‌های ALS را بیان نموده در حالیکه ۱۱ ایزوله (۲۰/۵٪)هیچ کدام از ژن‌ها را بیان نکردند و ارتباطی مستقیم بین بیان این ژن‌ها در ایزوله‌ها و مقاومت به فلوکونازول وجود داشت.. نتایج حاصل از تعیین توالی DNA در سویه‌های مورد مطالعه نشان داد که شماره آللیک جدیدی در بین ایزوله‌ها پیدا نشد ولی ۱۵ استرین تایپ جدید شناسایی شد. همچنین بیشترین تعداد تغییرات نوکلئوتیدی(جایگاه پلی مورفیسم) و بیشترین تعداد اسیدهای آمینه پلی مورفیک مربوط به لوکوس‌های VPS13 و ADP1 بوده است. ایزوله‌هایی حساس به فلوکونازول که فاقد بیان ژن‌های ALS1,3 بودند و همچنین ایزوله‌هایی بیمارانی که دارای بیماری زمینه‌ای بوده یا هورمون تراپی داشتند ارتباط ژنتیکی نزدیکی با هم داشتند. با توجه به نتایج به دست آمده، ایزوله‌های مورد بررسی در جمعیت زنان مبتلا به واژینال کاندیدیازیس دارای تنوع ژنتیکی بوده و ارتباط ژنتیکی نزدیکی به هم داشتند که نشان دهنده این است که کلونال کلاسترهای‌های جدیدی توسط کاندیدا آلبیکنس‌های عامل واژینیت در ایران در حال شکل‌گیری است که میتواند در بین بیماران قابل انتقال باشدودر ایجاد واژینیت مزمن و عودکننده مقاوم به فلوکونازول نقش مهمی داشته باشدشیوع بالای عفونت‌های واژینال کاندیدیایی و در پی آن عودهای مکرر آن و مقاومت‌های بالای دارویی ضرورت استفاده از روشهای شناسایی ژن‌های ویرولانس دخیل در آن و تعیین الگویی ژنوتایپی و همچنین تنوع ژنتیکی سویه‌های کاندیدا آلبیکنس را بیشتر آشکار میسازد.

واژگان‌کلیدی: واژینیت کاندیدیایی، بیان ژن‌های ALS1,ALS3، مقاومت به فلوکونازول، تنوع ژنتیکی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. کاندیدا وعفونت‌های کاندیدیایی ۲

۱-۲. واژینیت کاندیدیایی و فاکتورهای مستعد کننده آن ۳

۱-۳. فاکتورهای بیماریزایی کاندیدا آلبیکنس ۴

۱-۴. اتصال کاندیدا به بافت میزبان ۴

۱-۵.خانواده ژنی ALS ۶

۱-۶. ژن‌های ALS و نقش آنها در تشکیل بیوفیلم و مقاومت دارویی ۷

۱-۶-۱. بیوفیلم ۷

۱-۶-۲. ژن‌های موثر در تشکیل بیوفیلم ۸

۱-۷. شناسایی گونه‌های کاندیدا و تشخیص کاندیدیازیس ۱۰

۱-۷-۱. بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی مرفولوژی ۱۰

۱-۸. تکنیک‌های زیست‌شناسی مولکولی ۱۱

۱-۸-۱. نواحی ژنی مورد مطالعه در شناسایی قارچها ۱۱

۱-۸-۲. ناحیه 18S ۱۲

۱-۸-۳. ناحیه 5.8S ۱۳

۱-۸-۴. ناحیه 28S rDNA ۱۳

۱-۸-۵. نواحی ITS1 وITS2 ..... ۱۴

۱-۹. تکنیک‌های ژنوتایپینگ ۱۵

۱-۱۰. تعیین توالی بازها در DNA ۱۸

۱-۱۱. تایپینگ بروش تعیین توالی چند لوکوسی MLST.11-1 ..... ۱۸

۱-۱۲. مروری بر مطالعات گذشته ۱۹

۱-۱۴. اهداف این مطالعه ۲۳

۱-۱۵. فرضیه‌های مطالعه ۲۳

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲۴

۲-۱. جمع‌آوری ایزوله‌های بالینی ۲۵

۲-۲. کشت ایزوله‌های بالینی و نمونه‌های استانداردگونه‌های کاندیدا ۲۶

۲-۲-۱. تهیه محیط کشت سابور دکستروز آگار ۲۶

۲-۲-۲. نگهداری طولانی مدت ایزوله‌های کاندیدا جدا شده از واژن ۲۷

۲-۳. تشخیص فنوتیپی ایزوله‌های کاندیدای جدا شده از واژینال کاندیدیازیس ۲۷

۲-۳-۱. محیط کروم آگار ۲۷

۲-۳-۱-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۲۷

۲-۴. ارزیابی حساسیت ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس با روش دیسک دیفیوژن ۲۸

۲-۵. استخراج DNA از نمونه‌های بالینی و سویه‌های استاندارد کاندیدا ۲۹

۲-۶. تعیین کمیت و کیفیت DNA ۳۰

۲-۷. واکنش PCR با پرایمرهای ITS1,4 ۳۱

۲-۸. تعیین الگوی هضم آنزیمی محصولات PCR با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر ویژه یا RFLP ۳۲

۲-۹. الکتروفورز ژل آگاروز محصولPCR و PCR-RFLP ۳۳

۲-۹-۱. تهیه بافر TBE5X ۳۳

۲-۱۰-۱. بررسی کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده ۳۵

۲-۱۰-۲. تیمار کردن Total RNA یا مرحله DNase Treatment به منظور حذف DNA ژنومی ۳۵

۲-۱۱. مراحل ساخت cDNA ۳۶

۲-۱۲. انجام PCR با پرایمرهای ژن‌های ALS1, ALS3 ۳۷

۲-۱۳. مراحل انجام RT-PCR ۳۸

۲-۱۴. ژنوتایپینگ ایزوله‌های بالینی با استفاده از تکنیک MLST ۳۹

۲-۱۴-۱. استرین‌های قارچی ۳۹

۲-۱۴-۲. استخراج DNA از نمونه‌های کاندیدا آلبیکنس ۳۹
۲-۱۵. تکثیر ژن‌های مورد نظر برای MLST با استفاده از PCR ۳۹
۲-۱۵. مواد و وسایل لازم برای انجام PCR: ۴۱
۲-۱۶. الکتروفورز محصولات MLST-PCR ایزوله‌های کاندیدا ۴۲

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۴۴
۳-۱. نتایج کشت سویه‌ها ۴۵
۳-۲. نتایج حاصل از تست حساسیت به دیسک فلوکونازول ۲۵ میکروگرمی ۴۶
۳-۳. نتایج حاصل از استخراج DNA از کاندیدا آلبیکنس ۴۷
۳-۴. نتایج شناسایی سویه‌ها با تکنیک PCR-RFLP ۴۸
۳-۵. نتایج حاصل از استخراج RNA تام ۵۱
۳-۶. نتایج حاصل از حضور ژن‌های ALS1, ALS3 در سویه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس ۵۲
۳-۷. نتایج حاصل از بیان ژن‌های ALS1,ALS3 در سویه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس ۵۳
۳-۸. نتایج الکتروفورز محصولات MLST-PCR کاندیدا برای ۷ ژن ۵۷
۳-۹. نتایج حاصل از تعیین توالی نوکلئوتیدها ۵۸

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۷۲
۴-۱. بحث و نتیجه‌گیری ۷۳
۴-۲. پیشنهادها ۸۶

فهرست منابع و ماخذ ۸۷
چکیده انگلیسی ۹۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول (۲-۱) استرین‌های استاندارد مورد استفاده..... ۲۶

جدول (۲-۲) ترکیب بافر لیزیس..... ۲۹

جدول (۲-۳) اجزاء مواد شرکت کننده در واکنش PCR با آغازگرهای ITS..... ۳۱

جدول (۲-۴) توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR..... ۳۱

جدول (۲-۵) برنامه PCR مورد استفاده..... ۳۲

جدول (۲-۶) ترکیبات واکنش هضم آنزیم‌های MspI و BlnI..... ۳۲

جدول (۲-۷) ترکیب RNA بافر..... ۳۴

جدول (۲-۸) مقادیر مورد استفاده جهت سنتز مرحله اول cDNA..... ۳۶

جدول (۲-۹) مقادیر مورد استفاده جهت سنتز مرحله دوم سنتز cDNA..... ۳۷

جدول (۲-۱۰) مقادیر مورد استفاده جهت PCR ژن‌های ALS1,ALS3..... ۳۷

جدول (۲-۱۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش RT-PCR..... ۳۸

جدول (۲-۱۲) آماده سازی نمونه‌های RT-PCR با پرایمرهای ALS۳ و ALS۱..... ۳۸

جدول (۲-۱۳) شرایط انجام RT-PCR..... ۳۹

جدول (۲-۱۴) پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام MLST برای ۷ ژن Houskeeping در کاندیدا آلبیکنس بر اساس پایگاه اطلاعاتی سایت MLST..... ۴۰

جدول (۲-۱۵) اجزای واکنش PCR جهت انجام MLST..... ۴۱

جدول (۲-۱۶) برنامه واکنش PCR با پرایمرهای مورد نظردر دستگاه ترموسایکلر..... ۴۱

جدول (۳-۱) تشخیص اولیه گونه های کاندیدا بر روی محیط کروم آگار کاندیدا براساس افتراق رنگ..... ۴۵

جدول (۳-۲) سایز محصول PCR گونه های کاندیدا قبل از هضم آنزیمی و بعد از هضو توسط آنزیم MSP1..... ۴۹

جدول (۳-۳) پروفایل طبقه بندی ایزوله‌های بیماران به همراه میزان حضور و بیان ژن‌های ALS1,ALS3و ارتباط آنها با مقاومت به فلوکونازول..... ۵۴

جدول (۳-۴) تعداد و مکانهای نوکلئوتیدی و تعداد آمینواسید های پلی مرفیک را برای ۷ لوکـوس مورد بررسی در ۲۰ جدایه بالینی کاندیدا البیکنس نشان میدهد. ۵۹

جدول (۳-۵) جایگاههای های پلی مورفیک نوکلئوتیدی را برای هر کدام از ژنوتایپ‌هـای لوکـوس AAT در ۲۰ جدایه کاندیدا البیکنس نشان می‌دهد. ۵۹

جدول (۳-۶) جایگاه‌های پلی مورفیک نوکلئوتیدی را برای هر کدام از ژنوتایپ‌های لوکـوس ACC در ۲۰ جدایه کاندیدا البیکنس نشان می‌دهد. ۶۰

جدول (۳-۷) نوع و جایگاههای پلی مورفیک نوکلئوتیدی را برای هر کدام از ژنوتایپ های لوکوس ADP2 در ۲۰ جدایه کاندیدا البیکنس نشان می‌دهد. ۶۰

جدول (۳-۸) نوع و جایگاههای پلی مورفیک نوکلئوتیدی را برای هر کدام از ژنوتایپ‌های لوکـوس SYA1 در ۲۰ جدایه کاندیدا البیکنس نشان می‌دهد. ۶۱

جدول (۳-۹) نوع و جایگاه‌های پلی مورفیک نوکلئوتیدی را برای هر کدام از ژنوتایپ‌های لوکـوس ZWF12 در ۲۰ جدایه کاندیدا البیکنس نشان می‌دهد. ۶۱

جدول (۳-۱۰) نوع و جایگاه‌های پلی مورفیـک نوکلئوتیـدی را بـرای هـر کـدام از ژنوتایـپ‌هـای لوکوس MPI14 در ۲۰ جدایه کاندیدا البیکنس نشان می‌دهد. ۶۲

جدول (۳-۱۱) نوع وجایگاه‌های پلـی مورفیـک نوکلئوتیـدی را بـرای هـر کـدام از ژنوتایـپ‌هـای لوکوس VPS13 در ۲۰ جدایه کاندیدا البیکنس نشان می‌دهد. ۶۳

جدول (۳-۱۲) انواع شماره آللیک به دست آمده از هر یک از ژن‌های ۷ تایی مورد بررسی را بـرای ۲۰ ایزوله کاندیدا البیکنس جدا شده از واژینیـت کاندیـدیایی را در سـایتMLST.net بـه همـراه تاریخچه بیماران نشان میدهد. ۷۰

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار (۱-۱) نواحی ژنی 28S rDNA ۱۳

نمودار (۱-۲) سطوح وابستگی که باید با روش تایپینگ مشخص شود ۱۷

نمودار (۱-۳) تعیین توالی بازها در DNA ۱۸

نمودار (۳-۱) نمودار حاصل از درصد ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس حساس و مقاوم به فلوکونازول ۴۷

نمودار (۳-۲) نتایج حاصل از در صد میزان حضور ژن‌های ALS1,ALS3 با PCR ۵۴

نمودار (۳-۳) نتایج حاصل از در صد میزان بیان نیمه کمی ژن‌های ALS1,ALS3 با RT-PCR ۵۴

نمودار (۳-۴) دندروگرام حاصل از لوکوس AAT ۶۶

نمودار (۳-۵) دندروگرام حاصل از لوکوس ACC1 ..... ۶۶

نمودار (۳-۶) دندروگرام حاصل از لوکوس ADP1 ..... ۶۷

نمودار (۳-۷) دندروگرام حاصل از لوکوس MPI1 ..... ۶۷

نمودار (۳-۸) دندروگرام حاصل از لوکوس SYA1 ..... ۶۸

نمودار (۳-۹) دندروگرام حاصل از لوکوس VPS13 ..... ۶۸

نمودار (۳-۱۰) دندروگرام حاصل ازادغام ۷ لوکوس ۶۹

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

تصویر (۲-۱) مراحل واکنش PCR به صورت شماتیک نشان داده شده است. ۴۲

تصویر (۳-۱) رنگ کلنی‌های ایجاد شده توسط سویه‌های بالینی در امحیط سابورو و کروم آگـار را نشان میدهد؛ شماره ۱:کاندیدا گلابراتا و شماره ۶-۲: کاندیدا آلبیکنس ۴۶

تصویر (۳-۲) نتایج حاصل از ارزیابی حساسیت ایزوله‌های بالینی و استاندارد کاندیدا آلبیکـنس بـا روش دیسک دیفیوژن ۴۷

تصویر (۳-۳) باندهای بالایی، DNA استخراج شده از ایزوله‌ها میباشد. ۴۸

تصویر (۳-۴) ۲-۶ باندهای حاصل از PCR سویه‌های استاندارد گونه‌هـای کاندیـدا قبـل و بعـد از هضم آنزیمی ۴۹

تصویر (۳-۵) الگوی باندی حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR سـویه‌هـای اسـتاندارد بـا آنـزیم MSP1. مارکر ۱۰۰bp ۵۰

تصویر (۳-۶) باندهای حاصل از PCRایزوله‌های بالینی و استانداردکاندیدا آلبیکنس با پرایمرهـای ITS1-4(535bp) ۵۰

تصویر (۳-۷) نتایج هضم آنزیمی محصول PCR ایزوله های کاندیدا آلبیکنس بـاآنزیم محـدودالاثر MSP1 ۵۱

تصویر (۳-۸) نتایج هضم آنزیمی محصـول PCR ایزولـه‌هـای بـالینی کاندیـدا آلبیکـنس و سـویه اسـتاندارد کاندیـدا دابلینسـیس بـاآنزیم محـدودالاثر .Bln1 بانـدهای حاصـل در هـر دوگونـه ۲۹۷و۳۳۸bp میباشد. مارکر ۱۰۰bp ۵۱

تصویر (۳-۹) لاین ۴-۱: باندهای RNA استخراج شده از ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس، لاین ۸-۵ حذف DNA و خالص سازی RNAبا آنزیم DNase که DNAبه طور کامل از نمونـه‌هـا حـذف شده است. ۵۲

تصویر (۳-۱۰-الف) محصول PCRحاصل از حضور ژن‌های ALS3در ایزوله‌های کاندیـدا آلبیکـنس به همراه ژن ACT1 ۵۵

تصویر (۳-۱۰-ب) محصول PCR حاصل از حضور ژن‌های ALS1در ایزوله‌های کاندیـدا آلبیکـنس به همراه ژن ACT1(کنترل داخلی) ۵۵

تصویر (۳-۱۱) محصول باندهای حاصل از بیان نیمه کمی ژن‌های ALS1,ALS3 در ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس با تکنیک RT-PCR..... ۵۶
تصویر (۳-۱۲-الف) محصول باندهای حاصل از بیان نیمه کمی ژن های ALS3 با تکنیک RT-PCR..... ۵۶
تصویر (۳-۱۲-ب) محصول باندهای حاصل از بیان نیمه کمی ژن‌های ALS1 با تکنیک RT-PCR.... ۵۷
تصویر (۳-۱۳) الکتروفورز محصول MLST-PCRهفت ژن کاندیدا آلبیکنس بر روی ژل آگارز ۱٪..... ۵۷
تصویر (۳-۱۴) سایتwww.mlst.net جهت آنالیز داده‌های تعیین توالی قطعات ژنی مورد نظر..... ۵۸

فصل اول:

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. کاندیدا وعفونت‌های کاندیدیایی

قارچ فرصت طلب کاندیدا آلبیکنس، عامل طیف وسیعی از عفونت‌های قارچی در افراد سالم و دچار نقص سیستم ایمنی می‌باشد.[1] زیرا این مخمر، فلور نرمال پوست و سطوح مخاطی بدن از قبیل حفره دهانی، دستگاه گوارش، کشاله ران و واژن در افراد سالم میباشد بطوری که۷۰٪ از مخمرهای جدا شده از این نواحی را گونه آلبیکنس شامل میشود[۱، ۲]

کاندیدا آلبیکنس به عنوان دومین عامل در ایجاد عفونت‌های فرصت طلب قارچی، درایجاد بیماریهای حاد، تحت حاد و مزمن نقش مهمی را ایفا میکند. عفونت می‌تواند از طریق کلونیزه شدن در دهان، گلو، پوست، واژن، ناخن، برونش و ریه و دستگاه گوارش ایجاد شود و یا به صورت سیستمیک مانند کاندیدمیا، اندوکاردیت و مننژیت تظاهر یابد. این عفونت‌ها اغلب در پی جراحیها، استفاده از کاتترهای داخل وریدی، جایگیری دریچه‌های مصنوعی قلب، شانتهای مایع مغزی نخاعی و سوندهای ادراری تظاهر می‌یابند که در اغلب موارد کشنده هستند[۳]. در تحقیقات انجام شده در امریکای مرکزی در سالهای ۱۹۹۳-۲۰۰۳ در۶۳۷ بیمار تحت مطالعه، کاندیدا آلبیکنس عامل ۳۶ ٪ عفونت‌های خونی در افراد مبتلا با تومورهای بدخیم بوده است[۴] از طرف دیگر کاندیدا آلبیکنس میتواند عفونت‌های سطحی و یا مزمن را در افراد سالم نیز سبب شود که مثال بارز آن واژینال کاندیدیازیس میباشد. در بررسیهای انجام شده بر روی ۱۰۵۰نمونه واژینال درهند، حدود ۲۱۵ بیمار (۲۰/۴۷٪) مبتلا به واژینیت کاندیدیایی بودند که در ۴۶/۹٪ موارد کاندیدا آلبیکنس به عنوان عامل بیماری زا جداسازی شد[۵، ۶].

1- Immunocmpromised

۱-۲. واژینیت کاندیدیایی و فاکتورهای مستعد کننده آن

گونه‌های کاندیدا مسئول طیف وسیعی از عفونت‌های واژینال زنان، در سنین باروری می‌باشند. کاندیدیازیس ولوواژینال[1] یک مشکل ژنیکولوژی مهم در زمینه پزشکی می‌باشد. تقریباً ۷۵٪ از زنان حداقل یک بار درسال در طول زندگی خود مبتلا به کاندیدیازیس واژینال می‌شوند که این امراز نظر مراقبت‌های بهداشتی قابل توجه می‌باشد [۷] واژینال کاندیدیازیس بعد از عفونت‌های باکتریایی دومین عامل واژنیت بوده و افزایش تجویز داروهای مربوط به عفونت‌های مخمری از سال ۱۹۸۰ تا ۱۹۹۰ نشان دهنده افزایش دو برابری واژینیت کاندیدیایی بوده است[۸].

در سال مطابق گزارشی از کشور هلند، از هر هزار زن مراجعه کننده به متخصص بیماری‌های زنان، ۵۰ مورد به دلیل واژینیت بوده است. در این میان بین ۲۵ تا ۳۵٪ درصد از عفونت‌های واژینال مربوط به عفونت‌های قارچی بوده و ۲۰٪ ناشی از عوامل باکتریایی وتنها بین ۵ تا ۱۰٪ نیز مربوط به تریکوموناس واژینالیس[2] بوده است[۷].

اگر چه کاندیدا آلبیکنس[3]، معمول ترین پاتوژن در ایجاد واژینیت کاندیدیایی میباشد، ولی در سالهای اخیر سایر گونه‌های کاندیدا نیز به عنوان عوامل ایجاد کننده عفونت در بیماریها مطرح میباشند[۱۴]. .به طوریکه ٪۹۵-۸۵ موارد، عامل اصلی واژینیت کاندیدیایی، *کاندیدا آلبیکنس* و کمتر از ٪۵ کاندیدا *گلابراتا*[4] *و سایرگونه‌ها* می‌باشند[۹]. فاکتورهای متعددی از قبیل استفاده وسیع الطیف از آنتی‌بیوتیکها و داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی، حاملگی، قرص‌های ضدباروری، دیابت ملیتوس، استروژن بالا از عوامل مستعدکننده ابتلا به کاندیدیازیس واژینال می‌باشد[۱۳-۱۰]. احتمال ابتلا به واژینیت در زنانی که به دیابت ملیتوس مبتلا هستند و در افرادی که از آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف استفاده می‌کنند، بیشتر است. میزان زیاد گلوکز باعث افزایش اتصال[5] کاندیدا آلبیکنس به اپیتلیوم واژن می‌شود وهمچنین مصرف زیاد آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف باعث از بین رفتن فلور باکتریایی محیط واژن و حذف رقابت تغذیه‌ای و تکثیر مخمرها می‌شود. در زنان باردار نیز به دلیل افزایش هورمون‌های جنسی، تکثیر کاندیدا افزایش یافته وشیوع واژینال کاندیدیازیس نیز در آنها بالاتر میباشد.

1- Vulvovaginal Candidiasis
2- Trichomonas Vaginalis
3- Candida albicans
4- Candida glabrata
5- Adherence

کاندیدیازیس واژینال اغلب در فاز لوتئال[1] در سیکل قاعدگی که میزان استروژن بالاست دیده می‌شود. در حالی که در زنان یائسه و یا قبل از فاز قاعدگی که میزان استروژن پایین است شیوع کاندیدیازیس واژینال نیز اندک و نادر می‌باشد. تبدیل سلولهای Columnar به سلولهای اسکواموس سبب می‌شود که این سلولها، برای چسبندگی و اتصال مخمرها و رشد و تکثیرشان مناسبتر گردند. در این حالت سلولهای مخمری دارای گیرنده‌هایی[2] برای استروژن می‌باشند که تبدیل آنها را به فرم مسیلیال و در نهایت بیماریزایی[3] افزایش می‌دهد[۱۱]. ژنتیک نیز از دیگر عوامل دخیل در ابتلا به واژینیت میباشد در مطالعات، ذکر شده است که نژاد آفریقایی- آمریکایی و افراد با گروه خونی *AB* نسبت به سایر نژادها مستعد تر میباشد[۱۵-۱۷].

۱-۳. فاکتورهای بیماریزایی کاندیدا آلبیکنس

همانند دیگر قارچهای پاتوژن، کاندیدا البیکنس ژن‌هایی را تنظیم وبیان می‌نماید که به عنوان فاکتورهای بیماریزا برای این قارچ مطرح هستند. از جمله فاکتورهای بیماریزای این قارچ می‌توان به عوامل اتصال و چسبندگی، تغییر فرم مخمری به هایفی (تغییرات فنوتایپی)[4]، ترشح پروتئینازها از قبیل آسپارتیل پروتئازها وفسفولیپازها و تشکیل بیوفیلم[5] می‌توان اشاره نمود[۱۸-۲۲].

۱-۴. اتصال کاندیدا به بافت میزبان

قدرت اتصال و تشکیل فرم هایفی از فاکتورهای ویرولانس مهم در مراحل ابتدایی عفونت‌های کاندیدیایی می‌باشد. اتصال به سلولهای میزبان جهت استقرار گونه‌های کاندیدا هم به شکل فلور نرمال و هم در شکل پاتوژن، ضروری می‌باشد. بیان مولکولهای مشخص چسبندگی در سطح پاتوژن توانایی اتصال آنها را به سلولهای میزبان افزایش می‌دهد و سبب محافظتشان در مقابل مکانیسم‌های ضد میکروبی میزبان شده و جزء فاکتورهای مهم در ایجاد بیماری زایی میباشد. از طرفی دیگر این اتصال اولین گام برای تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح زنده و غیر زنده می‌باشد[۲۳-۲۶]. یکی از عوامل اصلی که در این اتصال موثر نقش

1- Luteal Phase
2- Receptor
3- Pathogenesis
4- phenotypic switching
5- Biofilm formationm