بسم الله الرحمن الرحيم

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

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای محمود وحیدی 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 محمدحسین یادگاری (استاد راهنما)

دکتر مختار جلالی جواران (استاد مشاور)

دکتر معصومه شمس (استاد ناظر)

دکتر زهره شریفی (استاد ناظر)

دکتر شهلا رودباری 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 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.

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 / رساله دکتری نگارنده در رشته **قارچ شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۸۸** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر محمدحسین یادگاری** ، مشاوره **جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران** 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 **محمود وحیدی** 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 : **محمود وحیدی**
تاریخ و امضاء : **۱۳۸۸/۴/۳۱**

دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته قارچ شناسی پزشکی

عنوان :

شناسایی سویه های بالینی کاندیدا به روش RAPD - PCR

نگارش :

محمود وحیدی

استاد راهنما :

دکتر محمدحسین یادگاری

استاد مشاور:

دکتر مختار جلالی جواران

تیر ۱۳۸۸

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

همسر مهربانم

و فرزند دلبندم

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 آقای دکتر مختار جلالی جواران، 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 سرکار خانم دکتر معصومه شمس و سرکار خانم دکتر زهره شریفی که داوری این پایان نامه را به عهده داشتند تشکر می نمایم.

از استاد گرامی سرکار خانم دکتر شهلا رودبارمحمدی که در دوره کارشناسی ارشد افتخار کسب دانش از محضرشان میسر گردید، قدردانی می نمایم.

از همکاری و مساعدت استاد ارجمند جناب آقای دکتر میرهندی و همچنین جناب آقای دکتر قهری تشکر می نمایم.

از سرکار خانم مهندس صالحی و سرکارخانم مهندس رزمی 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 سرکار خانم دکتر رجبی و جناب آقای دکتر کچویی که همواره مرا مرهون لطف و محبت خود نمودند سپاسگزاری می نمایم.

از دوستان عزیزم در گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، آقایان مهندس لطیف، اژدری و محب الدینی به خاطر راهنمایی ها و کمک های بی دریغ شان قدردانی می نمایم.

از سرکار خانم زهره سلطنت پور به خاطر کمک های ارزنده ایشان سپاسگزارم و برایشان آرزوی توفیق روز افزون 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 آقای نجیب زاده و سرکارخانم ها حیدری، رودباری، مردانی و طیفوری نیز تشکر می نمایم.

چکیده

مخمرها و در راس آن ها گونه های کاندیدا، معمول ترین قارچ هایی هستند که از عفونت های انسانی جدا می شوند. در سال های اخیر علیرغم پیشرفت در مراقبت های بهداشتی و روش های درمانی، وقوع کاندیدیازیس سیستمیک مهاجم، به طور قابل توجهی افزایش یافته است. افزایش بروز در نتیجه افزایش جمعیت در معرض خطر شامل دریافت کنندگان پیوند، بیماران سرطانی، مبتلایان به ایدز، دریافت کنندگان داروهای تضعیف کننده سیستم ایمنی و آنتی بیوتیک های وسیع الطیف می باشد. اگرچه گونه آلبیکانس، عامل معمول کاندیدیازیس می باشد، وقوع بیماری با دیگر گونه ها که حساسیت کمتری به مشتقات آزول ها دارند با افزایش فراوانی گزارش شده است. لذا شناسایی سریع گونه عامل بیماری، جهت درمان به موقع ضروری است. روش های فنوتیپی رایج برای شناسایی گونه ها نظیر آزمایش های مرفولوژی و روش های بیوشیمیایی، زمان بر بوده و نتایج حاصل از آنها همواره دقیق نیستند. تکنیک های مولکولی مبتنی بر DNA، رویکردهای جدید و موثری را برای حل این مشکل فراهم آورده اند. از این رو در مطالعه حاضر کارایی روش مولکولی RAPD-PCR در شناسایی و ارزیابی تنوع ژنتیکی ۷ استرین استاندارد کاندیدا و ۳۳ سویه بالینی مورد بررسی قرار گرفت. از روش فنوتیپیک کروم آگار کاندیدا به منظور شناسایی اولیه و از روش مولکولی RFLP نیز جهت شناسایی قطعی سویه ها استفاده شد. DNA نمونه ها استخراج گردید و واکنش PCR با استفاده از ۴ آغازگر RAPD انجام شد. در بررسی الگوی باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد مشخص گردید که هر گونه، الگوی متمایزی را از سایر گونه ها ایجاد می کند و می توان از باندهای اختصاصی گونه ها به عنوان ابزاری در شناسایی مستقیم سویه های بالینی مجهول، بدون نیاز به انجام روش های فنوتیپیک و آزمایشات بیوشیمیایی استفاده کرد. به همین منظور وزن مولکولی باندهای اختصاصی استرین های استاندارد با استفاده از نرم افزار UVI doc محاسبه گردید. به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی سویه های مورد مطالعه نیز، باندهای حاصل از RAPD سویه ها، به داده های صفر و یک تبدیل شد و تجزیه خوشه ای داده ها به روش UPGMA و با استفاده از نرم افزار MVSP انجام گرفت. بررسی دندروگرام های حاصل از تجزیه خوشه ای داده ها، فاصله ژنتیکی میان سویه ها را نشان داد. نتایج مطالعه حاضر توانایی روش مولکولی RAPD-PCR را در شناسایی گونه های کاندیدا نشان داد. همچنین آغازگرهای AP3 و T3B به دلیل ایجاد بهترین الگوی باندهای اختصاصی برای گونه ها، جهت شناسایی مستقیم سویه ها، به خصوص شناسایی و افتراق گونه های آلبیکانس و دابلی نینسیس که به لحاظ فنوتیپیک بسیار مشابهند، مناسب می باشند و آغازگرهای OPA-18 و OPE-18 به دلیل ایجاد بیشترین میزان چند شکلی، در ارزیابی تنوع ژنتیکی مفید بوده و امکان شناسایی استرین های بیشتری را فراهم می کنند. در مجموع استفاده از تکنیک RAPD-PCR، به عنوان روشی سریع و ارزان در شناسایی گونه های کاندیدا و همچنین شناسایی استرین ها در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی پیشنهاد گردید.

واژه های کلیدی : شناسایی، کاندیدا، تنوع ژنتیکی، RAPD-PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده

۱- ۱. تاریخچه ۲
۱- ۲. طبقه بندی ۳
۱- ۳. گونه های بیماری زای جنس کاندیدا ۴
۱-۳-۱. کاندیدا آلبیکانس ۴
۱-۳-۲. کاندیدا دابلی نینسیس ۵
۱-۳-۳. کاندیدا تروپیکالیس ۵
۱-۳-۴. کاندیدا گلابراتا ۶
۱-۳-۵. کاندیدا کروزه ای ۷
۱-۳-۶ . کاندیدا پاراپسیلوزیس ۸
۱- ۴. بیماری زایی کاندیدا ۸
۱- ۵. شناسایی گونه های کاندیدا و تشخیص کاندیدیازیس ۹
۱- ۵-۱. بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی مرفولوژی ۹
۱- ۵-۲. بررسی ویژگی های فیزیولوژی و بیوشیمیایی ۱۰
۱- ۵-۳. تشخیص آزمایشگاهی کاندیدیازیس سیستمیک ۱۱
۱- ۶ . تکنیک های زیست شناسی مولکولی ۱۳
۱- ۶- ۱. اصول روشهای زیست شناسی ملکولی ۱۳
۱- ۷. نواحی ژنی مورد مطالعه در شناسایی قارچ ها ۱۴
۱-۷-۱. ناحیه 18S ۱۵
۱-۷-۲. ناحیه 5.8S ۱۵
۱-۷-۳. ناحیه 28S rDNA ۱۵
۱-۷-۴. نواحی ITS1 وITS2 ۱۷
۱-۸. انواع روش های مولکولی ۱۸
۱-۸-۱. نسبت AT/GC ۱۸
۱-۸-۲. تعیین توالی بازها در DNA ۱۸
۱-۸-۳. الکتروفورز کاریوتیپ ۱۹
۱-۸-۴. هیبرید سازی ۲۰
۱-۸-۴-۱. تعیین همسانی توالی بازها در دو رشته DNA ۲۱
۱-۸-۴-۲. ردیابی توالی خاص بااستفاده از پروب ۲۱
۱-۸-۵ . هیبرید سازی ساترن بلات ۲۱

۱-۸-۶. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۲۳
۱-۸-۶-۱. اجزاء PCR ۲۴
۱-۸-۷. استفاده از آنزیم های محدودالاثر (REA) ۲۷
۱-۸-۸. RAPD-PCR ۲۷
۱-۸-۸-۱. انگشت نگاری RAPD ۲۸
۱-۸-۸-۲. اساس مولکولیRAPD ۲۹
۱-۸-۸-۳. مزایای تکنیک RAPD ۳۰
۱-۸-۸-۴. معایب تکنیک RAPD ۳۰
۱-۸-۸-۵. کاربردهای RAPD ۳۰
۱-۹. الکتروفورز ۳۱
۱-۹-۱. الکتروفورز ژل آگارز ۳۲
۱-۱۰. مروری بر پژوهش های مولکولی در رابطه با شناسایی و تشخیص گونه های کاندیدا ۳۳

فصل دوم : مواد و روش ها

۲- ۱. جمع آوری نمونه ها ۴۰
۲- ۲. کشت نمونه ها ۴۰
۲- ۳. استخراج DNA ۴۲
۲- ۴ . تعیین کمیت و کیفیت DNA ۴۴
۲- ۵ . واکنش RFLP ۴۴
۲- ۵- ۱. برنامه واکنش PCR ۴۵
۲- ۵ -۲. واکنش هضم آنزیم ۴۶
۲- ۵- ۳. الکتروفورز محصول هضم آنزیم های *Msp*I و *Bln*I ۴۷
۲- ۶ . واکنش RAPD-PCR ۴۷
۲- ۶- ۱ . مواد مورد نیاز ۴۷
۲- ۶- ۲. برنامه واکنش RAPD-PCR ۴۹
۲- ۶- ۳. الکتروفورز محصول PCR ۵۱
۲- ۷- تجزیه و تحلیل داده ها ۵۲

فصل سوم : نتایج

۳- ۱. نتایج کشت سویه ها ۵۴
۳- ۲. شناسایی سویه ها به روش RFLP ۵۶
۳- ۳. شناسایی سویه ها به روش RAPD-PCR ۵۸
۳- ۳- ۱. تجزیه خوشه ای داده ها ۵۸

۳- ۳- ۱-۲. تجزیه خوشه ای استرین های استاندارد کاندیدا ۵۸
۳- ۳- ۱-۳. تجزیه خوشه ای سویه های بالینی ۶۷

فصل چهارم : بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها

۴-۱ . بحث ۹۲
۴-۲ . پیشنهادها ۹۹

منابع ۱۰۱
چکیده انگلیسی ۱۱۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲- ۱. استرین های استاندارد مورد استفاده ۴۰
جدول ۲- ۲. فراوانی و محل جداسازی سویه ها ۴۱
جدول ۲- ۳. ترکیب بافر لیز کننده ۴۲
جدول ۲- ۴. ترکیب بافر TE ۴۳
جدول ۲- ۵. توالی آغازگرهای ITS و درجه حرارت اتصال آغازگر به DNA الگو ۴۵
جدول ۲- ۶. اجزاء واکنش PCR برای واکنش ۵۰ میکرولیتری آغازگرهای ۴۵
جدول ۲- ۷. برنامه داده شده به دستگاه PCR جهت تکثیر ناحیه ITS ۴۶
جدول ۲- ۸. ترکیبات واکنش هضم آنزیم های *Msp*I و *Bln*I ۴۶
جدول ۲- ۹. توالی آغازگرهای RAPD و مطلوب ترین درجه حرارت برای اتصال آغازگر به DNA الگو ۴۷
جدول ۲- ۱۰. اجزاء واکنش PCR برای واکنش ۲۵ میکرولیتری آغازگرهای T3B و AP3 ..... ۴۸
جدول ۲- ۱۱. اجزاء واکنش PCR برای واکنش ۲۵ میکرولیتری آغازگرهای OPA-18 و OPE-18 ..... ۴۸
جدول ۲- ۱۲. برنامه داده شده به دستگاه PCR جهت تکثیر DNA با آغازگر T3B ۵۰
جدول ۲- ۱۳ برنامه داده شده به دستگاه PCR جهت تکثیر DNA با آغازگر AP3 ..... ۵۰
جدول ۲- ۱۴. برنامه داده شده به دستگاه PCR جهت تکثیر DNA با آغازگر OPA-18 و OPE-18 ..... ۵۱
جدول ۲- ۱۵. طرز تهیه TBE 5X ۵۲
جدول ۳- ۱. فراوانی سویه ها و رنگ ایجاد شده در محیط کشت کروم آگار ۵۵
جدول ۳- ۲. اندازه محصول PCR گونه های کاندیدا قبل و بعد از هضم با آنزیم *Msp*I ۵۷
جدول ۳- ۳. مشخصات باندهای حاصل از ۴ آغازگر RAPD ۵۸
جدول ۳- ۴. اندازه باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد کاندیدا با آغازگر AP3 ..... ۵۹
جدول ۳- ۵. میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳- ۳ با روش تطابق ساده ۶۰
جدول ۳- ۶. اندازه باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد کاندیدا با آغازگر T3B ۶۱
جدول ۳- ۷. میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳- ۵ با روش تطابق ساده ۶۲
جدول ۳- ۸. اندازه باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد کاندیدا با آغازگر OPA-18 ..... ۶۳
جدول ۳- ۹. میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳- ۷ با روش تطابق ساده ۶۴
جدول ۳- ۱۰. اندازه باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد کاندیدا با آغازگرOPE-18 ..... ۶۵
جدول ۳- ۱۱. میزان تشابه شاخه های ایجاد شده در دندروگرام ۳- ۹ با روش تطابق ساده ۶۶

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱- ۱. جایگاه طبقه بندی جنس کاندیدا ۳
شکل ۱- ۲. نواحی ژنی 28S rDNA ۱۶
شکل ۱- ۳. تعیین توالی بازها در DNA ۱۹
شکل ۱- ۴. هیبرید سازی ساترن بلات ۲۵
شکل ۱- ۵. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۲۷
شکل ۳-۱. الگوی باندی محصولات PCR و هضم استرین های استاندارد کاندیدا با آنزیم های *Msp*I ، *Bln*I ۵۷
شکل ۳-۲ . باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد کاندیدا با آغازگر AP3 ..... ۵۹
شکل ۳-۳ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد کاندیدا با آغازگر AP3 ..... ۶۰
شکل ۳-۴ . باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد کاندیدا با آغازگر T3B ۶۱
شکل ۳-۵ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد کاندیدا با آغازگر T3B ۶۲
شکل ۳-۶ . باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد کاندیدا با آغازگر OPA-18 ..... ۶۳
شکل ۳-۷ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد کاندیدا با آغازگر OPA-18 ..... ۶۴
شکل ۳-۸ . باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد کاندیدا با آغازگر OPE-18 ..... ۶۵
شکل ۳-۹ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد کاندیدا با آغازگر OPE-18 ..... ۶۶
شکل ۳-۱۰ . باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکانس با آغازگر AP3 ..... ۶۷
شکل ۳-۱۱ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکانس با آغازگر AP3 ..... ۶۷
شکل ۳-۱۲ . باندهای حاصل از RAPD ایزوله های آلبیکانس با آغازگر T3B ۶۸
شکل ۳-۱۳ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD ایزوله های آلبیکانس با آغازگر T3B ۶۸
شکل ۳-۱۴ . باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکانس با آغازگر OPA-18 ..... ۶۹
شکل ۳-۱۵ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD ایزوله های آلبیکانس با آغازگر OPA-18 ..... ۶۹
شکل ۳-۱۶ . باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکانس با آغازگر OPE-18 ..... ۷۰
شکل ۳-۱۷ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های آلبیکانس با آغازگر OPE-18 ..... ۷۰
شکل ۳-۱۸ . باندهای حاصل از RAPD سویه های تروپیکالیس با آغازگر AP3 ..... ۷۱
شکل ۳-۱۹ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های تروپیکالیس با آغازگر AP3 ..... ۷۱
شکل ۳-۲۰ . باندهای حاصل از RAPD سویه های تروپیکالیس با آغازگر T3B ۷۲

شکل ۳-۲۱ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های تروپیکالیس با آغازگر T3B..... ۷۲
شکل ۳-۲۲ . باندهای حاصل از RAPD سویه های تروپیکالیس با آغازگر OPA-18..... ۷۳
شکل ۳-۲۳ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD ایزوله های تروپیکالیس با آغازگر OPA-18 ..... ۷۳
شکل ۳-۲۴ . باندهای حاصل از RAPD سویه های تروپیکالیس با آغازگر OPE-18 ..... ۷۴
شکل ۳-۲۵ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD ایزوله های تروپیکالیس با آغازگر OPE-18 ..... ۷۴
شکل ۳-۲۶ . باندهای حاصل از RAPD سویه های گلابراتا با آغازگر AP3 ..... ۷۵
شکل ۳-۲۷ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های گلابراتا با آغازگر AP3 ..... ۷۵
شکل ۳-۲۸ . باندهای حاصل از RAPD سویه های گلابراتا با آغازگر T3B ۷۶
شکل ۳-۲۹ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های گلابراتا با آغازگر T3B ۷۶
شکل ۳-۳۰ . باندهای حاصل از RAPD سویه های گلابراتا با آغازگر OPA-18 ..... ۷۷
شکل ۳-۳۱ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های گلابراتا با آغازگر OPA-18 ..... ۷۷
شکل ۳-۳۲ . باندهای حاصل از RAPD سویه های گلابراتا با آغازگر OPE-18 ..... ۷۸
شکل ۳-۳۳ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های گلابراتا با آغازگر OPE-18 ..... ۷۸
شکل ۳-۳۴ . باندهای حاصل از RAPD سویه های کروزه ای با آغازگر AP3 ..... ۷۹
شکل ۳-۳۵ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های کروزه ای با آغازگر AP3 ..... ۷۹
شکل ۳-۳۶ . باندهای حاصل از RAPD سویه های کروزه ای با آغازگر T3B ۸۰
شکل ۳-۳۷ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های کروزه ای با آغازگر T3B..... ۸۰
شکل ۳-۳۸ . باندهای حاصل از RAPD سویه های کروزه ای با آغازگر OPA-18..... ۸۱
شکل ۳-۳۹ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های کروزه ای با آغازگر OPA-18 ..... ۸۱
شکل ۳-۴۰ . باندهای حاصل از RAPD سویه های کروزه ای با آغازگر OPE-18 ..... ۸۲
شکل ۳-۴۱ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های کروزه ای با آغازگر OPE-18 ..... ۸۲
شکل ۳-۴۲ . باندهای حاصل از RAPD سویه های پاراپسیلوزیس با آغازگر AP3 ..... ۸۳
شکل ۳-۴۳ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های پاراپسیلوزیس ۸۳
با آغازگر AP3
شکل ۳-۴۴ . باندهای حاصل از RAPD سویه های پاراپسیلوزیس با آغازگر T3B ۸۴
شکل ۳-۴۵ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD ایزوله های پاراپسیلوزیس ۸۴
با آغازگر T3B
شکل ۳-۴۶ . باندهای حاصل از RAPD ایزوله های پاراپسیلوزیس با آغازگر OPA-18 ..... ۸۵
شکل ۳-۴۷ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های پاراپسیلوزیس ۸۵
با آغازگر OPA-18
شکل ۳-۴۸ . باندهای حاصل از RAPD ایزوله های پاراپسیلوزیس با آغازگر OPE-18 ..... ۸۶
شکل ۳-۴۹ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD سویه های پاراپسیلوزیس ۸۶
با آغازگر OPE-18
شکل ۳-۵۰ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد و سویه های بالینی ۸۷
با آغازگر AP3

شکل ۳-۵۱ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد و سویه های بالینی..... ۸۸
با آغازگر T3B
شکل ۳-۵۲ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد و سویه های بالینی..... ۸۹
با آغازگر OPA-18
شکل ۳-۵۳ . دندروگرام تجزیه باندهای حاصل از RAPD استرین های استاندارد و سویه های بالینی..... ۹۰
با آغازگر OPE-18

فصل اول

مقدمه

و مروری بر مطالعات انجام شده

۱- ۱. تاریخچه

اولین شواهد دال بر بیماری کاندیدیازیس به قرن چهارم قبل از میلاد بر می گردد و آن مربوط به دو مورد کاندیدیازیس دهان است که درکتاب اپیدمیک بقراط درج شده و آفت دهانی (تراش) را توضیح داده است [۱]. Rosenstien در سال ۱۷۷۱ و Wood درسال ۱۷۸۳ تراش[1] را به عنوان بیماری در نوزادان توضیح دادند. Veron در سال ۱۸۳۵، اولین مورد کاندیدیازیس مری را تو ضیح داد. Bennet در سال ۱۸۴۴ و Robin در سال ۱۸۵۳ عفونت کاندیدایی را توضیح دادند. Berg در سال۱۸۴۱ وBennet در سال ۱۸۴۴ عامل قارچی را در تراش مشاهده کردند. Robin در سال ۱۸۵۳، عامل بیماری تراش را اوئیدیوم آلبیکانس[2] نامید. در گذشته کاندیدا را مونیلیا می نامیدند که بوسیله Saccardo درسال ۱۸۸۶ بیان شده بود. Grawitz در سال ۱۸۷۷، حالت دو شکلی کاندیدا را مورد توجه قرار داد و Audrey در سال ۱۸۸۷ رشد مخمری – میسلیال آن را به عنوان یک پاسخ محیطی دانست [۲]. در طی سالهای متمادی اسامی متفاوتی برای کاندیدا در نظر گرفته شد ولیکن اولین نام گذاری که به طور وسیع و در یک مدت طولانی پذیرفته شد، واژه مونیلیا آلبیکانس[3] بود [۳]. Zopf درسال ۱۸۹۰ قارچهای عامل تراش را مونیلیا آلبیکانس نامید که بر گرفته از نام ابتدایی کاندیدیازیس می باشد [۱]. بعد از سردرگمی های زیاد سرانجام Berkhout در سال۱۹۲۳ پس از بررسی بین گونه مونیلیا که از گیاهان و میوه ها جدا می شود و مخمر جدا شده از موارد پزشکی، گونه کاندیدا را پایه گذاری کرد [۳] و سرانجام این نام در هشتمین کنگره بوتانیکال در سال ۱۹۵۴ در شهر پاریس به عنوان Nomen Conservandum پذیرفته شد [۲].

---

[1] - Trush
[2] - *Oidium albicans*
[3] - *Monilia albicans*

۱- ۲. طبقه بندی

در حالی که اغلب گونه های کاندیدا تولید مثل غیر جنسی[1] دارند، در بعضی گونه ها مرحله جنسی هم شناخته شده است و اسپور جنسی تولید می کنند. گونه هایی از جنس کاندیدا که فاقد مرحله جنسی هستند، در دوترومایست ها قرار می گیرند. از طرف دیگر گونه های بیماری زا و غیر بیماری زای کاندیدا که مرحله جنسی در آنها شناخته شده است، جزء آسکومایست ها قرار می گیرند. خصوصیات گونه های کاندیدا با رده آسکومایست مطابقت دارد به عنوان مثال آنها اوره آز منفی و بدون کپسول هستند، عمل تخمیر انجام می دهند، اینوزیتول را جذب نمی کنند، در دیواره سلولیβ گلوکان دارند و پیگمان نشاسته یا کاروتنوئید تولید نمی کنند. در گونه های کاندیدا جوانه به صورت تک قطبی می باشد، که خاص آسکومایست ها است [۴].

در حال حاضر با توجه به تغییرات وسیع در طبقه بندی قارچها به ویژه کاندیدا که عمدتاً در نتیجه دستیابی به روشهای ژنتیک و بیولوژی ملکولی حاصل شده است، توافق همگانی بین قارچ شناسان در رابطه با جایگاه طبقه بندی این مخمر وجود ندارد. شکل ۱- ۱ جایگاه طبقه بندی کاندیداها را نشان می دهد [۴].

Kingdom : fungi
Phylum : Ascomycota
Subphylum : Ascomycotina
Clas : Hemiascomycetes
Order : Saccharomycetales
Family : Metschnikowiaceae
Genus : Clavispora
Famliy : Sacharomycetaceae
Genus : Debaryomyces
Issatchenkia
Pichia
Kluyveromyces
Saccharomyces
Family : Candidacaeae (Anamorphic)
Genus : Candida

شکل ۱- ۱ جایگاه طبقه بندی جنس کاندیدا

[1] - Mitosporic

۱- ۳. گونه های بیماری زای جنس کاندیدا

۱-۳- ۱. کاندیدا آلبیکانس[1]

کاندیدا آلبیکانس، یک قارچ فرصت طلب است که به صورت همزیست در حفره دهانی، لوله گوارش و واژن کلونیزه شده و ایجاد عفونت می نماید [۵]. گونه آلبیکانس، مهمترین گونه کاندیدا است و بیشتر سویه های بیماران را شامل می شود. با روش های زیست شناسی مولکولی تائید شده است که آنچه قبلاً تحت عناوین کاندیدا آلبیکانس، کاندیدا لانژرونی[2]، کاندیدا کلاسری[3] و کاندیدا استلاتوئیده[4] توصیف شده اند، همگی درگونه واحد کاندیدا آلبیکانس جای می گیرند [۶].

اسید لاکتیک به میزان زیادی از رشد کاندیدا آلبیکانس ممانعت می کند و رابطه ای میان تعداد لاکتوباسیل ها و دیگر ارگانیسم های تولید کننده اسید لاکتیک و تعداد مخمر وجود دارد. این ارگانسیم به ندرت از خاک جدا می شود و درصورت مشاهده آن ممکن است نشانه آلودگی خاک با مدفوع باشد. باکتری هایی به عنوان انگل برای کاندیدا آلبیکانس گزارش شده اند که ممکن است این مورد دلیل حذف کاندیدا از خاک باشد. کاندیدا آلبیکانس در پوست سالم کلونیزه نمی شود ولی در صورت هرگونه آسیب یا تغییر شرایط محیط، به سرعت در آن کلونیزه می شود [۲]. این ارگانیسم بیماری زا در طیف وسیعی از بیماری های انسان شامل آلرژی، بیماری های شدید مخاطی، جلدی و عفونت خونی دخالت دارد.

اسامی مترادف زیادی برای گونه آلبیکانس ذکر شده که از آن جمله اوئیدیوم آلبیکانس و مونیلیا آلبیکانس را می توان نام برد. بر اساس اختلاف بین ترکیبات مانان دیواره سلولی، دو سروتیپ A و B برای آلبیکانس در نظر گرفته اند. سروتیپA از لحاظ آنتی ژنی با کاندیدا تروپیکالیس و سروتیپ B با کاندیدا استلاتوئیده (که اکنون به عنوان کاندیدا آلبیکانس در نظرگرفته می شود) تشابه دارد. سروتیپA در نمونه های بالینی شایع تر ازB است، هر چند در بعضی مناطق جغرافیایی در بیماران

[1] - *Candida albicans*
[2] - *C. langeronii*
[3] - *C. clauserii*
[4] - *C. stellatoidea*

دچار ضعف ایمنی سروتیپ B شایع تر است. سروتیپ B نسبت به ۵- فلوروسیتوزین حساسیت کمتری دارد.

در محیط کورن میل آگار[1] پس از سه روز انکوباسیون، کاندیدا آلبیکانس میسلیوم های حقیقی و کاذب و خوشه های انگور مانند موسوم به بلاستوکنیدی ایجاد می کند. کلامیدوکونیدی ها که در انتهای هیف ها یا انتهای شاخه های جانبی کوتاه ایجاد می شوند، مختص این گونه می باشند. کاندیدا آلبیکانس بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در سرم ۱۰٪ در $37^{\circ}C$ ایجاد لوله زایا[2] می کند . تفاوت لوله زایا در گونه آلبیکانس با گونه های دیگر، این است که در پایه لوله زایا در آلبیکانس انقباض وجود ندارد [۶].

۱-۳-۲. کاندیدا دابلی نینسیس[3]

در سال ۱۹۹۵ از عفونت دهانی مبتلایان به ایدز، گونه جدید کاندیدا به نام دابلی نینسیس جدا شد. بعضی خصوصیات این گونه شبیه به آلبیکانس می باشد، مثلاً لوله زایا ایجاد کرده و اغلب کلامیدوسپورهای گرد فراوان تولید می کند [۷]. این گونه در حرارتهای $42^{\circ}C$ یا بالاتر، رشد نکرده و یا ضعیف رشد می کند. برای افتراق آن از آلبیکانس، ارگانیسم را در $45^{\circ}C$ قرارمی دهند که عدم رشد آن مشخص کننده گونه دابلی نینسیس می باشد. بررسی پروب های اختصاصی انگشت نگاری DNA[4] اختلاف این ارگانیسم را با آلبیکانس نشان داده است. کاندیدا دابلی نینسیس را می توان از خلط، واژن، مدفوع و کشت خون جدا نمود. این ارگانیسم نسبت به فلوکونازول مقاوم می باشد [۴،۸].

۱-۳-۳. کاندیدا تروپیکالیس[5]

بعد از آلبیکانس شایع ترین عامل عفونتهای حفره دهانی کاندیدا تروپیکالیس می باشد. این ارگانسیم می تواند در بیماران مبتلا به نوتروپنی، بیماری شدید و تهاجمی را همزمان در چند ارگان ایجاد کند

[1] - Corn meal agar
[2] - Germ tube
[3] - *C. dubliniensis*
[4] - Fingerprinting
[5] - *C. tropicalis*