Morphological and molecular isolation and diagnosis of *Candida albicans* from mouth and dipers of in fants in hospital of children .

عزل وتشخيص *Candida albicans* مظهريا وجزيئا من منطقتي الفم والحفاظة لأطفال من مستشفى كربلاء التعليمي للاطفال في مدينة كربلاء المقدسة

د.بان طه محمد
جامعة كربلاء –كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

د.ذكرى محمد كاظم المطيري
مستشفى الحسين التعليمي
كربلاء المقدسة

خنساء عبد الحسين عبادي العبودي
جامعة كربلاء –كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثالث

المستخلص

اجريت هذه الدراسة لعزل وتشخيص بعض خمائر المبيضات .*Candida* spp لأطفال يعانون من اعراض سريرية بداء المبيضات Candidasis الذين تتراوح اعمارهم (1يوم - 12سنه) لمنطقتي الحفاظة والفم وتم تشخيص العينات مختبريا وتحديد النسبة المئوية لخميرة *Candida albicans* من العينات المعزولة ومن ثم استعمال تقنية(PCR) Polymerase chain reaction للتشخيص الجزيئي .

استخدم وسط السابروید دكستروز اكارSDA مع الكلورومفنيكول لمنع نمو البكتريا اظهرت النتائج ان النسبة المئوية لخميرة *Candida albicans* كانت الاكثر بين العينات المدروسة اذاظهرت نتائج النمو في درجة حرارة 45ْم ان *Candida albicans* اعطى نسبة 70% والذي يتحمل هذا النوع الدرجات الحرارية العالية وعند استعمال تقنية PCR اعطى نسبة 90% من العينات المختبرة.

ABSTRACT

This Study aims to isolate and diagnose some of *Candida* specious in children who suffered from symptoms of candidiasis at the mouth and diper areas . The children ages ranged between (1 day -12 years)

The samples were examined in the laboratory and the percentage of *candida albicans* was estimated ,then the Polymerase Chain Reaction (PCR) was used for molecular diagnosis .

The Sabouraud Dextrose Agar was used as a media with chloramphenicol to inhibit the growthof bacteria . The results showed that the higher percentage of growth was for *Candida albicans* as it was 70 % at 45c which means it can with stard when higher of temperature. However , When PCR was used a 90 % of tested samples was achieved .

المقدمة

تعد المبيضات *Candida*من أهم الخمائر الانتهازية Opportunistic Yeasts إذ توجد بصورة تعايشية في جسم الإنسان لمناطق الغشاء المخاطي للفم والمهبل والأمعاء كجزء من النبيت الطبيعي للإنسان و تسبب عدد من الأمراض في الظروف غير الاعتيادية للجسم لاسيما عند حدوث ضعف للجهاز المناعي اذ عزلت من مرضى مصابين بداء المبيضات على اختلاف حالاته السريرية (1)

تم عزل 523 حالة سريرية من مرضى يعانون من الاصابة بال *Candida* اذ كان اغلبها من نوع *albicans* (2).

تتميز هذه الخمائر بقدرتها على أصابة التجويف الفموي تسبب مايعرف بداء المبيضات الفموي Oral Candidiasis والذي يتمثل بظهور بقعه جدارية كريمية اللون ملتصقة وعند نزعها تترك مكانا احمر اللون ،وقد توجد بقعة جدارية واحده اواكثر عند الشخص المصاب ويكون مكان الاصابة عادة داخل التجويف الفموي و بالجدار و سقف الفم واللسان واللثة وفي الحالات الصعبة قد تمتد الاصابة الى البلعوم والمرئ مصحوبة احيانا بتأكلات وتقرحات كمضاعفات مرحلية (3).

يعتبرهذا النوع من المبيضات من الامراض الشائعه لدى الاطفال الصغار وحديثي الولاده والذي ينتقل لهم عن طريق المهبل عند اصابة الام بداء المبيضات المهبلي Vaginal candidiasis (4).

كما وتكثراصابات داء المبيضات خاصه عند الاشخاص المصابين بمرض العوز المناعي المكتسب HIV، فيؤدي الى اصابات سطحيه مثل اصابة التجويف الفمي بنسبة ظهور *Candida albicans* حوالي 76.19 %(5)

من جانب اخر تصيب المبيضات منطقة الحفاظة عند الاطفال حيث تكون على شكل طفح جلدي محمر بعد ذلك تتقشر المنطقة المصابة مع ظهور بثرات ((6)، وهناك عددمن العوامل التي تزيد من فرص اصابة هذه المنطقة بهذا الداء مثل التبول حيث انه ذو محتوى عالي من الامونيا وبسبب تواجد كائنات مجهرية لها القدرة على انتاج انزيم اليوريزمثل انواع من *Proteus* مما يؤدي الى تغير في pH المنطقة وتصبح بيئة الحفاظة منطقة مناسبة لنمو الفطريات (6) .

تعتبرخميرة *C.albicans* من اهم انواع الخمائر المنتشرة بشكل كبيراذ تمتلك تكيفات كثيره تستطيع من خلالها الانتشاربشكل كبيرحيث لها القدره على النمو بوسط pHمتعادل مثل الدم 7.4 ويمكنها ان تعيش بوسط حامضي كالاغشيه المهبليه pH لها 4.1 ، ويمكنها العيش خارج جسم الكائن الحي في مدى واسع من تغيرات pH (2.1 - 10) والنمو في الظروف الهوائيه Aerobic condition ،ولاهوائية وبتراكيز عاليه من ثنائي اوكسيد الكاربون Co2 (7) .

وتنمو المبيضات بسهولة خارج جسم الكائن الحي مختبرياً على الاوساط الزرعيهالتي تستخدم لعزل الفطريات مثل السابروبد دكستروز اكارSDA وهو من اكثر الاوساط شيوعا لعزل المبيضات (8)،اذ يسمح بنمو الخمائروبعض انواع البكتريا لكن ليس جميعها بسبب درجة الحموضه المنخفضه ، وتكون شكل مستعمرات المبيضات كريمه محدبه وقد تصبح ذو تجاعيد عند زيادة فترة الحضانة(9).

ويعتبراختبار انبوب الانبات Germ Tube Formation من الطرائق السريعه لتشخيص *C.albicans* عن الانواع الاخرى من المبيضات (2) ، كذلك انتاج الابواغ الكلاميديه Chlamedospore من الاختبارات المهمه لتشخيص *C.albicans* عن الانواع الاخرى من المبيضات المنماة على وسط طحين الذره Cron Meal Medium (10)،ان اختبار النمو في درجه حراره 45 مْ من الاختبارات المهمه لتفريق *C.albicans* عن الانواع الاخرى من المبيضات الاخرى حيث ان *C.albicans* يمثل النوع الوحيد من المبيضات التي تستطيع النمو في هذه الدرجة الحرارية المرتفعه (11).

نظرا لكثرة التعقد في التشخيص الطرز المظهرية ،تم اتباع الطرائق الجزيئة في التشخيص حيث ان التقدم في استعمال تحليل الحامض النووي قد سهل عملية التشخيص على مستوى الانواع (12)واعتمدت منطقة ITS في التشخيص الجزيئي لما تمتلك تلك المنطقة من ثبات عالي تجاة العوامل البيئية واعطيت المنطقة اهمية كبيرة في التشخيص الجزيئي للفطريات Fujita (13).

كذلك اوضحت عدة دراساتِ اهمية منطقة Ribosomal RNA والتي تحتوي على منطقة ITS وعدد من المناطق هي 5.8S , 18S , 28S في عملية التشخيص الجزيئي للفطريات (14) ، اضافة الى كل ذلك فهي تتميز بسهولة وسرعة تضخيمها من منطقه متعدده النسخ الى مكان حاوي على جميع تغايرات الانواع (15)

فأصبح التشخيص الجزيئي المستخدم في تشخيص الفطريات من الاعمال الروتينه في مختبرات علم الفطريات ضمن تقنيه ال PCR وبأستخدام بوادئ متخصصه لكل نوع (16).ولغرض الحصول على نتيجه دقيقه درست مناطق ITS1, ITS4 وهذه المناطق تسهل رسم الشجره التطوريه للانواع المختبريه وتحديد الصفات التشخيصيه الجزيئيه بسرعه كبيره ودقه فائقه (17).

هدفت الدراسة الحالية الى عزل وتشخيص المبيضات من منطقتي الفم والحفاظة للأطفال من عمر (1يوم- 12سنه) :-

الموادوطرائق العمل

جمعت 120 عينة من مستشفى كربلاء التعليمي للاطفال للفترة 2014/10/15 الى 2015/4/15 شخصت سريريا من قبل الطبيب المختص و زرعت العينات على وسط السابروبد دكستروز اكارSDA مع كلورومفنيكول 0.05 غم لمنع نمو البكترياوحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24-48 ساعة وتم دراسة نمو وشكل المستعمرات .

اذ تم تحضير شريحه زجاجيه من المستعرات الناميه على وسط SDA مع قطره من المحلول الملحي Normal Saline وغطيت بغطاء الشريحه الزجاجيه وفحصت بالمحهر الضوئي على قوة X40. تم تصبيغ خلايا بصبغة كَرام لملاحظة الخلايا المتبرعمه وخميرة *Candida albicans* موجبه لصبغة كرام (18).

ومن ثم تم تخطيط عينات الخميره على سطح الوسط المحضر من استخدام 50غم من التبغ Tobacco تم غليه لمدة 30 دقيقه بعدها تم ترشيحها بواسطة عدة طبقات من الشاش . جمع الراشح واضيف له 20 غم من الاكار و50 ملغم من المضاد الحيوي الكلورا مفنيكول (19)واكمل الحجم الى 1000مل من D.W. وعقم بالموصدة ،صب الوسط في اطباق بتري معقمه وحفظ بالثلاجه لحين الاستخدام ، اذاستخدم هذا الوسط للتفريق بين النوعين Candida albicans C. dubliniesis اعتمادا على الصفات الشكليه للفطر(20) وحضنت بدرجة حراره 28مْ وتمت مراقبة النمو 24 -96 ساعه حيث ظهرت اختلافات مظهريه واضحه في المزارع الناميه مثل طبيعة السطح خشن او املس ولون المستعمرات الناميه (21).

اجري اختبارتكوين انبوب الانبات Germ Tube Formation للتميز بين الانواع التابعه لجنس .*candida* spp حيث تتميزخميرتي *C.albicans* و*C.dubliniensis* بتكوينها الانبوب الجرثومي ،يكون على شكل امتداد طويل من سطح خلية الخميره وتكون قاعدة ارتباطه بالخليه عريضه ويمكن تميزه عن الخيوط الكاذبه التي تكون نقطة اتصالها ضيقه (22).

اجري الاختبار بأخذ جزء من المستعمره الناميه على سطح الوسط ومزجها مع 0.5مل من مصل دم الانسان الذي تم فصله بأستعمال جهاز النبذ المركزي لمدة عشر دقائق وعلى سرعة 1500دوره /دقيقه ووضع العالق بأنابيب معقمه بدرجه حراره 37مْ ولمدة 2 -3 ساعه ،اخذ قليل من العالق وضع على شريحه زجاجيه نظيفه وغطيت بغطاء الشريحه وفحص بقوه 10Xوبعدها بقوة40X(6)

اجري اختبارتكوين الابواغ الاكلاميدية Clamydo Spores بزرع جزء من مستعمرة المبيضات على وسط طحين الذره Cron Meal Agar وهو وسط جاهز معد من قبل شركة Himedia حضر من اذابة 17غم من طحين الذره في 1000مل من D.W. ووسط اكار الشاي الاسود المحضر تم استخدام هذا الوسط للتحري عن الانواع المنتجه للابواغ الكلاميديه Clamydo

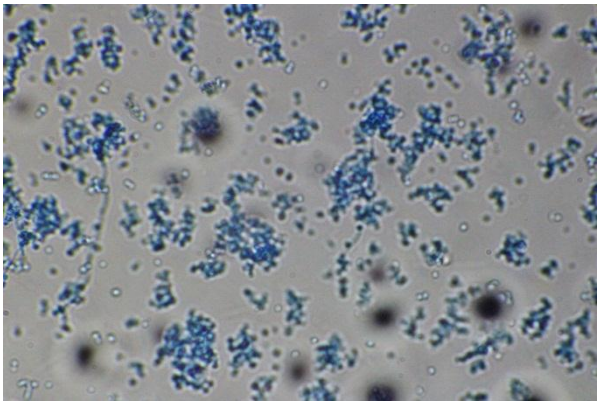
Spores حيث تم وضع 50غم من اوراق الشاي المجففه Tea Leaves في 1000مل من الماء المقطر وان تم غليه لمدة 15دقيقه تم ترشيحه بأوراق الترشيح ، وبعد ذلك اضافة 20غم من الاكار وعقم بالموصده لغرض التعقيم على درجة حرارة 121مْ، وضغط 15 جو لمدة 20 دقيقه (11) حيث خطط سطح الوسط وغطيه بغطاء شريحه زجاجيه معقمه وحظنت الاطباق بدرجة حراره 28م ولمدة 72-48ساعه ،تم فحص الشريحه الزجاجيه لمشاهدة الابواغ الكلاميديه و الخيوط الكاذبه Pseudo hypha ان وجدت تحت المجهر بقوة x40 (6).

تم اجراءاختبارالنمو بدرجة حرارة 45 مْ حسب طريقة (23).تمت الزراعه بطريقة التخطيط على وسط SDA وحضنت الاطباق بدرجة حراره 45 مْ وتم مراقبة النمو لمدة عشرة ايام إذ ان *C.albicans* هو النوع الوحيد الذي ينمو بهذه الحراره المرتفعه .

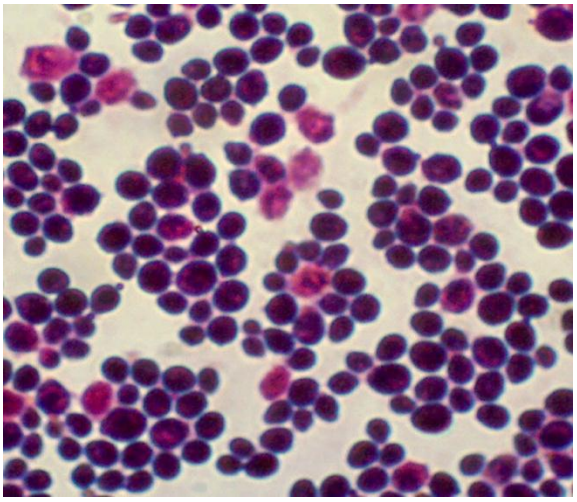
ومن ثم تم أجراء فحص PCR وذلك لتحري عن خمائر *Candida albicans* وذلك باستخدام البادئات الخاصة بجين ال 18S rDNA gene الخاصة بتشخيص الخمائر وحسب طريقة (24).

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج الفحص المجهري ان جميع العزلات العائدة لخميرة المبيضات البيضاء تتكون من خلايا احاديه متبرعمه تصطبغ بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء وهي موجبة لصبغة كرام صورة (1) ، وهذة النتيجة تتفق مع (25).



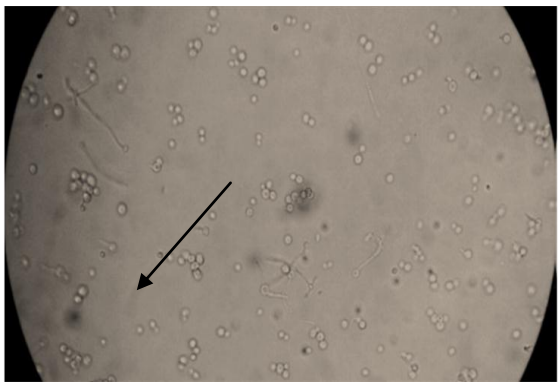
صورة 1 : خلايا الخميرة المتبرعمه تصطبغ بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء تحت قوة 40X



صورة 2 : المظهر العام لخميرة *C.albicans* مصطبغة بصبغة كرام تحت قوة X40

اظهرت نتائج النمو على وسط اكار التبغ The Growth on Tobacco agar media ان *C.albicans* تكون مستعمرات بيضاء ملساء دون ان تتلون بلون الوسط اما *C.dublieninsi* تكون صفراء خشنة مع امتدادات خيطية جانبية وهذه النتائج تتفق مع .(11, 26)

وكذلك اظهرت نتائج تكوين الانبوب الجرثومي Germ tube Formation ان جميع عزلات النوع العائد لخميرة *C.albicans* التي شكلت 44عزلة من اصل 70 عزلة للفم بما يعادل 62.85% ،اما عزلات منطقة الحفاظة شكلت 31 عزلة من اصل 50عزلة بمايعادل 62% . وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره (22) من ان *C.albicans* و*C.dublinesis* يمتازان بأنهما يكونان الانبوب الجرثومي الذي يكون على شكل امتداد طويل من سطح الخلية والتي من الممكن تميزها عن الخيوط الكاذبة التي تكون نقطة اتصالها ضعيفة.تتفق كذلك مع (2).يعد انتاج انبوب الانبات من اهم عوامل الضراوة لخميرة المبيضات البيضاء لانه يساعد الخميرة في غزو الانسجة و النمو بداخلها بشكل خيوط فطرية كاذبة محدثة الاصابة في الاشخاص ضعفاء المناعة (27).

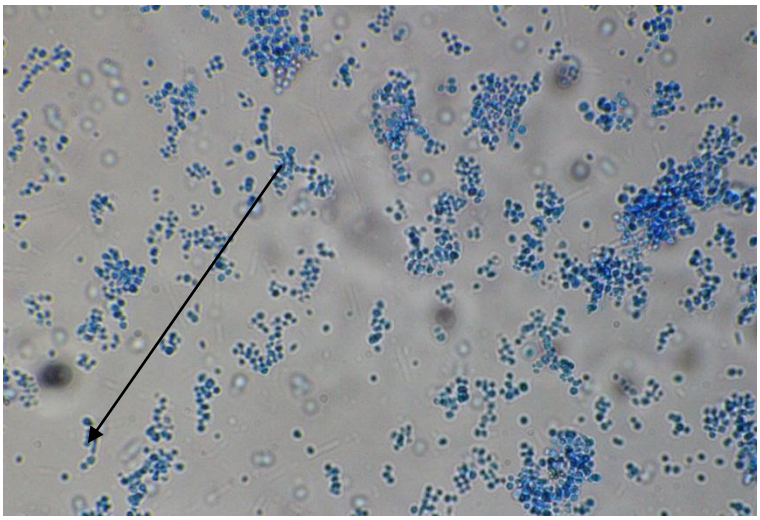


صورة 3 : تكوين انبوب الانبات في *C.albicans* تحت قوة X40

اظهرت نتائج النمو على وسط اكار طحين الذره cron meal agar ، ووسط اكار الشاي ان جميع عزلات *C .albicans* كونت الابواغ الكلاميدية والخيوط الكاذبة ، حيث حضنت بدرجة حراره 28 مُ لمدة 48-72 ساعة صورة (4).

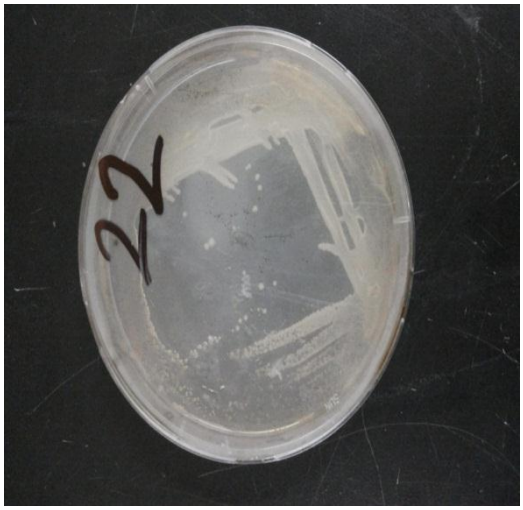
وكان عدد العزلات الموجبة 43 عزلة من اصل 70 عزلة في عزلات الفم اي بنسبة 61.42% ،اما عدد العزلات الموجبه لمنطقة الحفاظة كانت 30 عزله من اصل 50 عزله بنسبة 60% .

تتفق هذه النتائج مع(10).حيث يمتاز البوغ الكلاميدي الذي تكونه *C.albicans*بأنة كبير الحجم محاط بجدار سميك واما ان يكون مفرد او محاط بعدد صغير من الابواغ وكذلك اظهرت النتائج ان *C.albicans* لها القدره على تكوين الابواغ الكلاميدية عند زراعتها على وسط الشاي الاسود ومما يميز هذا الوسط انه غير مكلف وبسيط جدا وله نتائج مماثلة لما لنتائج وسط طحين الذره.



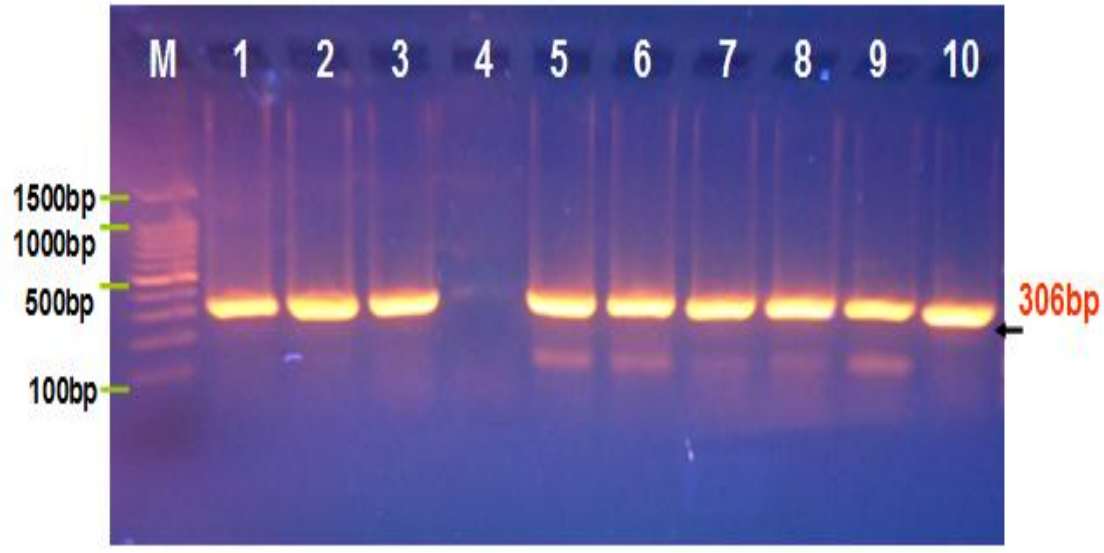
صورة 4 : تكوين الابواغ الكلاميدية على وسط طحين الذرة تحت قوة X40

اجري اختبار النمو بدرجة حرارة 45 مْ للتفريق *C.albicans* عن الانواع الاخرى من المبيضات فأظهرت النتائج ان *C. albicans* هي النوع الوحيد من المبيضات التي تنمو بهذه الدرجة الحرارية حيث ان بقيت المبيضات لم تستطيع النمو في نفس الظروف ، تتفق هذه النتائج مع ماجاء به (11) صورة(5).



صورة 5 : نمو خميرة المبيضات البيض على وسط SDA بدرجة حرارة 45مْ

تم اجراء الاختبار بأستخدام تقنية PCR لتأكيد التشخيص بانها *C. albicans* صورة (6) اظهرت النتائج ان 90% من العينات المختبره كانت عائد لنوع *C . albicans* ، يتفق مع (28)علما ان الاختبار شمل عينات من الفم وعينات من منطقة الحفاظة ويثبت من خلال الشكل ان العينه 4 والمعزولة من منطقة الحفاظة بأنها غير عائدة لجنس *Candida albicans* .



صورة 6 :الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز،والذي يظهر نتائج فحص PCR لجين (18S rRNA gene ITS region) والخاص بتشخيص ال *Candida albicans* حيث يمثل (M. Marker(100pb-1500pb الحفر من (1-10)عزلات للفطر

المصادر

1- Mayer, F.L. ;Wilson D.and Hube, B.(2013)*Candida albicans* pathogenicity mechanism .Landes Bioscience V:4(2)P:119-128.

2- Deorukhkar, S.C. ;Saini, S.;Mathew,S.(2014) non –*albicans Candida* infaection An Emerging threat interdisciplinarg perspectives on infectous Diseaes V:2014 Article ID 615958 pages ,http://dx.doi.org/10.1155/2014/615958.

3 - الخفاجي،كريمه امين حسين والمعموري، زيدان خليف عمران (2013) أهم الفطريات الطبيه وامراضها . الطبعه الاولى مطبعة البصائر للنشر: 283 .

4- Mallory ,S.B.;Bree,A. and Chern , P .(2005)Illustrated Manual of Pediatric Dermatology Diagnosis and Management.PP: 149-162 .

5- Okonkwo E. C. ;Alo M. N.; Nworie O.; Orji J. O. ;Agah M. V.(2013) Prevalence of oral candida albicans infection in HIV.

6- Ellis,D.H. (1994) "Clinical Mycology : The Human Opportunistic Mycosis.Gillingham printers PTY Ltd .Australia.

7- Dumitru, R.; Hronby, M.and Nickerson, K.W.(2004).Defined Anaerobic Growth Medium for Studying Candida albicans .Basic Biology and Resistance to Eight Antifungal Drugs.Antimicrobial Agants Chemother, 48(7):2350-2354.

8- Odds, F.C.(1988).*Candida* and Candidasis . Areview and bibliography2nd (ed.) Baillieve Tindall, London.42-59.

9- Samoranayake, L. P. ; Reaside, M. & Macfarlane, T.(1984). Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* spp. in vitro. Sabouraudia. 22: 201 - 207.

10-Golia S.K. Mallika Reddy ;K. Sujatha ;H. V.(2013) Speciation of *Candida* using chromogenic and cornmeal agar withdetermination of fluconazole sensitivity. US National Library of Medicine enlisted journal. 6(2) :163-166.

11- عباس ،حيدرعبد الحسين.(2013) مقاومة خميرة المبيضات البيض *Candida albicans* للمضادات الفطرية وعلاقتها بظاهرة اختزال النمو. رسالة ماجستير . جامعة القادسية .كلية التربية . قسم علوم الحياة .

12- Taylor, John B., \A Historical Analysis of Monetary Policy Rules," in J.B. Taylor,ed., *Monetary Policy Rules,* Chicago: U. of Chicago Press, 1999.

13- Fujita, S. I., Senda, Y., Nakaguchi, S. and Hashimoto, T.(2001). Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains. *J. Clin. Microbiol.* 39(10):3617-3622.

14- Nilsson R. H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N. and Larsson K. (2008). Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification, Evol Bioinform Online 4: 193–201.

15- Hershkovitz M. A. and Lewis L. A. (1996). Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. Mol Biol Evol.,13:1276–1295.

16- Imran , Z.K. and Hasan , K.M.A.(2012). Identification of fungi in Gizzard of meat chickens in Babylon province by Chromagar and PCR technique Basrah .J.of veterinary research. 11(4) :318-325.

17- DeHoog, G. S. and Vitale, R. G. (2007). Bipolaris, Exophiala, Scedosporium, Sporothrix, and other dematiaceous fungi. In: Murray, P.R. et al. (eds.), Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. ASM Press, Washington Pp. 1898 .

18 – الشبيلي ،ماجد كاظم عبود (2006) تأثير العزلات السريرية لخميرة المبيضات .*Candida* spp : دراسة بايلوجية ونسيجية مرضية في محافظة الديوانية .اطروحة دكتوراه .جامعة الديوانية.

19- سرحان ،عبد الرضا طه (2012) علم الفطريات العملي .الطبعة الاولى مطبعة :

20- Isogai , A.;Mulu, A.; Diro, E.; Teklesselassisie ,H. and *et al*. (2010) Identification of *Candida species* from human immunodeficiency virus infected patients in Ethiopiia by combination of CHROM agar,Tabacco agar and PCR of amplified internally transcribed rDNA spacer region .J. Appl, 10:2-8.

21- Khan , Z.U.; Mokaddas ,E. and Chandy ,R.(2004).Tobacco agar ,anew medium for differentiating *candida dubliniesis* from *candida albicans* .J.Clinc .Microbial ,42(10):2796-4798.

22- Chin,C.S . and Ismall ,S .(1983). Do germ-tube positive Candida tropicalis occur Malaysian J Pathol1:983, 6:51-53.

23- Pinjon ,E;Sullivan, D.;Salkin,D.and Coleman , D.(1998).Simple inexpensive reliable method for differentiation of *Candida dubliniesis* from *Candida albicans* . Journal Clin. Microbiology ,36:2093-95.

24- Al-Ahmer, Saife D.(2015) MOLECULAR DETECTION OF 18SrRNA GENE OF *CANDIDA ALBICANS*ISOLATED FROM PREGNANT WOMEN WITH CLINICAL DIAGNOSIS OF VULVOVAGINITIS . *International Journal of Current Research. Vol. 7, Issue, 01, pp.11852-11857.*

25- Ellis,D .; Davis ,S .; Alexion ,H.; Handke ,R .and Bartlet , R.(2007) .Descripition of Medical Fungi section edition Mycology unit women's and childrn's hospital Unr of Adelaide . Australia

26- Silveira-Gomes . Faiola; Sarmento. Dayse Nogueira ; Espirito-Santo . Elaine Patricia Tavares ; Souza. Nadia de Oliveira ; Pinto . Thifany Mendes and Marques-da-Silva. Silvia Helena(2011) Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using hypertonic Sabouraud broth and tobacco agar . Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(4):457-460.

27- Consolaro A.(2005) Reabsorcoes dentarias nas especialidadesclínicas. 2ª ed. Maringa: Dental Press .

28- Tarini. Ni Made A.; Wahid. Mardiastuti H.; Ibrahim. Fera; Yasmon. Andi andDjauzi . Samsuridjal(2010) Development of multiplex-PCR assay for rapid detection of Candida spp. Multiplex-PCR assay for Candida spp. Detection. Vol. 19, No. 2.