Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 29, No: 2, 2020 (133-148)

# Isolation and Diagnosis of *Candida albicans* Yeast From Patients Infected With Oral Candidiasis in Mosul City and Study its Activity in Production of Phospholipase and Hemolycin

**Rafea Qasim Altaee[1*]; Rafia Qader Alzubaidy[2]**

[1, 2] Department of Biology, College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq

Email: [1*] dr.rafeaqm@uomosul.edu.iq, [2] rafiajarjes@yahoo.com

(Received September 24, 2019; Accepted November 21, 2019; Available online June 01, 2020)

DOI: 10.33899/edusj.2019.126122.1020, © 2020, College of Education for Pure Science, University of Mosul. This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## Abstract

In this study, 63 oral swabs were collected . Thirty six yeast isolates were obtained (57.14%) grown on sabouraud dextrose agar medium (SDA). Symbols were given to isolates from RA1 to RA36 in order to differentiate them. The isolates were identified by growth on HiCrome Candida differential agar M1297A and identification by Vitek 2 Compact system.

The identification results showed 5 species of the isolated yeasts belonging to the genus *Candida*, 29 isolates belonging to the species *C. albicans* (80.55%) and one species from *C. famata*, *C. glabrata*, *C. kefyr* and *C. lusitaniae* (2.77% for each species). Moreover one isolate was obtained from each of the following yeasts: *Saccharomyces serevisiae*, *Malassezia furfur* and *Rhodotorula glutinis* (2.77% for each one).

This study included the evaluation of two virulence factors for all *C. albicans* isolates , phospholipase enzyme production on egg yolk agar and hemolytic activity on sugar-enriched sheep blood agar.

.Phospholipase production test showed differences in phospholipase production among the isolates , twenty three isolates (79.31%) were producers and precipitation zone (Opaque zone) was observed around the grown colonies with different Pz values and the isolate RA13 exhibited highest activity (Pz value = 0.53).

The results showed also that all isolates were producers of hemolysin with different hemolytic indexes (Hi). Isolate RA7 represented the highest one in activity (Hi = 2.16). Hemolysis of all isolates involved beta hemolysis.

Keywords : *Candida albicans* , Oral Candidiasis , Phospholipase , Hemolycin

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 29, No: 2, 2020 (133-148)

# من المرضى المصابين بداء المبيضات الفموي في *Candida albicans* عزل وتشخيص خميرة الـ مدينة الموصل ودراسة فعاليتها في إنتاج إنزيم الفوسفولايبيز والهيمولايسين

رافـع قاسـم محمد الطـائي[1*] و رافعـة قادر جرجيس الزبيدي[2]

قسم علوم الحياة, كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة الموصل, الموصل, العراق

**الخلاصة**

تم فى هذه الدراسة جمع 63 مسحة فموية ، وتم الحصول على 36 عزلة خميرية من المجموع الكلى للمرضى أى بنسبة 57.14% ، اعطى لهذه العزلات رموز من RA1-RA36 من اجل التمييز بينها.

تم تشخيص العزلات بقدرتها على النمو على الوسط التفريقى HiCrome Candida differential agar M1297A والتشخيص بنظام Vitek 2 Compact . أظهرت نتائج التشخيص 5 انواع من الخمائر وهى تعود للجنس *Candida* وأن 29 عزلة تعود للنوع *C. albicans* أى بنسبة 80.55% فى حين تم الحصول على عزلة واحدة من كل من *C. famata* و *C. glabrata* و *C. kefyr* و *C. lusitaniae* أى بنسبة 2.77% لكل منها . كما تم الحصول على عزلة واحدة لكل من الخمائر *Saccharomyces cerevisiae* و *Malassezia furfur* و *Rhodotorula glutinis* وبنسبة 2.77% ايضا .

وجرى دراسة عاملى الضراوة لعزلات الـ *C. albicans* وهما فعالية العزلات فى إنتاج انزيم الفوسفولايبيز على وسط مح البيض الصلب وفعالية العزلات فى تحليل الدم على وسط دم الأغنام الصلب الغنى بالسكر وأظهرت النتائج أن هنـاك اختلاف بيـن العزلات فى فعاليـة انتـاج الإنـزيم إذ إن 23 عـزلة من الـ *C. albicans* أى بنسبة 79.31% كانت منتجة للانزيم ، وكانت العـزلات المنتجة متفاوتـة فيمـا بينـها فى معـدلات الانتاج وقد أظهرت العزلة RA13 اعلى انتاجية اذ بلغت قيمة 0.53 Pz.

أظهرت النتائج أن جميع العزلات كانت منتجة للهيمولايسين ومحللة للدم وبدلائل تحليل متفاوتة ، وكانت جميعها تمتلك فعالية تحليل من نوع بيتا وأظهرت العزلة RA7 اعلى فعالية اذ بلغ قيمة دليل التحليل 2.16 .

**الكلمات المفتاحية :** *Candida albicans* ، داء المبيضات ، انزيم الفوسفولايبيز ، الهيمولايسين

## المقدمـــة

إن داء المبيضـات Candidiasis الذي يطلق عليه أيضاً Candidosis او Moniliasis (1) إصـابة انتهازية سطحية تنشأ بسبب عوامل موضعية أو جهازية ويشار إليه بأنه إصابة خميرية أو سلاق Thrush تسببه الخميرة *Candida* (2).

أما داء المبيضـات الفموي Oral candidiasis فهو إصـابة انتهازية موضـعية شـائعة للغشـاء المخاطي الفموي وقابلة للعلاج ، ويحدث عند الأطفال والمسنين والأشـخاص الذين لديهم نقص في المناعة الخلوية Cellular immune deficiency

وتحدث أعراض الإصابة بشكل لويحات بيضاء White plaques على الغشاء المخاطي الفموي والحنك واللسان او البلعوم الفموي (3) وهذا الداء تسببه خميرة *C. albicans* (4) .

لا تسبب خميرة *Candida* في الحالة الطبيعية المرض لكنها تنشط عند تثبيط الجهاز المناعي أو حصول اختلال في توازن النبيت المجهري الطبيعي فان بإمكان الـ *C. albicans* أن تتحول الى كائن ممرض ، إذ تنمو بشكل مفرط مؤدية الى حدوث اصابه في الاطفال الرضع ومرضى السكري ومرضى العلاج الجراحي ومرضى الإيدز (5).

تمتلك خميرة *Candida* عوامل ضراوة واستراتيجيات نوعية تساعدها على التمركز وإحداث المرض والتغلب على الوسائل الدفاعية للعائل ، فهي باستطاعتها النمو بأشكال مظهرية متنوعة تتدرج ما بين خميرة أحادية الخلية متبرعمة (البوغ المتبرعم) (Unicellular budding yeast (Blastospore وخيوط كاذبة Pseudomycelium وخيوط حقيقية True hyphae و يُعد هذا التحول في الشكل من أهم عوامل الضراوة التي تساعدها في اجتياح الأنسجة والهروب من الخلايا البلعمية Phagocyte cells ، وهناك عوامل اخرى لها علاقة بالضراوة مثل انتاج بروتين الهيمولايسين Hemolysin وتكوين أنبوب الإنبات وإنتاج السموم وإنتاج انزيمات مثل الفوسفولايبيز Phospholipase والبروتينيز Proteinase والالتصاق بالخلايا الظهارية والحفاظ على سلامة جدارها الخلوي وتجنب الاستجابة المناعية للعائل (6).

تنتج خميرة *Candida* عوامل ضراوة مهمة تتمثل بافراز انزيمات تحلل مائي خارج خلوي Extracellular hydrolytic enzymes وهي من عوامل الضراوة المهمة لهذه الخميرة (7) . ونظراً لان اغشية خلايا العائل تتكون من بروتينات ودهون فانها تكون هدفا لهذه الانزيمات وتصنف هذه الانزيمات الى نوعين رئيسين (8) انزيم اسبارتيل بروتينيز و مجموعة انزيمات الفوسفولايبيز ويضم الاخير مجموعة من الانزيمات والتي تشترك في قدرتها على التحليل المائي لواحد أو أكثر من روابط الاستر Ester linkages للدهون الكليسيرية المفسفرة Glycerophospholipids (9) تنتج الـ *C. albicans* اربعة انواع من هذا الانزيم هي A و B و C و D وقد صنفت استناداً على نوع رابطة الاستر التي تحللها (10) . تختلف كمية انتاج انزيم الفوسفولايبيز من قبل الـ *C. albicans* باختلاف عزلات الخميرة وكذلك بحسب موقع الإصابة ، إذ ان العزلات المسببة لاصابات مجرى الدم تنتج كميات اكبر من الانزيم مقارنة مع عزلات من الجروح والادرار (8).

أما بروتين الهيمولايسين فهو أحد عوامل الضراوة الذي يؤدي دورا في امراضية الـ *Candida* (11) أذ يمكن الكائن الممرض من ان يبقى حيا ويثبت الاصابة ضمن العائل (12)، و يمكنه من الحصول على الحديد الضروري للنمو ويسهل عملية اجتياح الشكل الخيطي عند الاصابة بداء المبيضات المنتشر Disseminated candidiasis (13) والذي يلعب دوراً مهما في العلاقة بين الكائن الممرض– العائل و في ضراوة البكتريا و الفطريات (14) و لعدم توفره بشكل حر في جسم الانسان لذلك فان معظم الممرضات تكتسب الحديد بشكل غير مباشر من خلال المركبات الحاوية على الحديد والمتوفرة مثل الهيموغلوبين Hemoglobin يمتلك الكائن الممرض آليات لتحطيم جزيئة الهيم Heme واستخلاص عنصر الحديد (15) ومن خلال فعالية تحليل الدم Hemolytic activity تستطيع الـ *C. albicans* الحصول على الحديد من جزيئة الهيموغلوبين المتحررة من كرية الدم الحمراء المنحلة وبالتالي تحافظ على قدرتها على النمو في مصل الإنسان (16) .

نظرا لما ذكر أعلاه ولأهمية خميرة الـ *C. albicans* فإننا نهدف من خلال هذه الدراسة الى :

1- عزل خميرة الـ *C. albicans* من الاصابات الفموية وتشخيصها بطرائق حديثة ودقيقة.

2- دراسة بعض عوامل ضراوتها.

**المـواد وطرائــق العمـــــل**

**1- المحلول الخزين للمضاد البكتيري ستربتومايسين سلفيت Streptomycin sulfate**

تم الحصـول على المضـاد بشـكله التجاري وعلى شـكل مسـحوق وتمت اذابة 1 غم منه في 100 مليلتر من الماء المقطر المعقم . للحصـــول على محلول خزين بتركيز 10000 مايكروغرام / مليلتر من الماء المقطر وحفظ المحلول الخزين عند درجة حرارة -20مْ لحين الاستعمال .

**2 - مستحلب مح البيض Egg yolk emulsion**

اسـتخدم بيض المائدة للحصـول على مح البيض Egg yolk اذ وضـع في انابيب اختبار معقمة ذات اغطية محكمة ، وضـــعت الانابيب في جهاز طرد مركزي Centrifuge (HERMLE , Labnet , U.S.A.) عند قوة جاذبية ارضـــية Gravitational force 500 (500g) ولمدة 15 دقيقة ، بعدها أخذ الجزء الطافي Supernatant من المستحلب وأكمل الى حجمه الاصـلي ( الجزء الطافي مع الراسـب ) بالماء المقطر المعقم . اسـتعمل هذا المسـتحلب مباشـرة في تحضـير وسـط مح البيض الصلب (17).

**3- تحضير عالق خلايا الخميرة Yeast cell suspension**

لتحضير العالق لقح الوسط Sabouraud's dextrose agar medium (SDA) بعزلات الخمائر بطريقة التخطيط Streaking ، حضـنت الاطباق في درجة حرارة 37مْ لفترة 18-24 سـاعة ثم أخذ جزء من اللقاح النامي بواسـطة ناقل Loop ووضـع في قنينة زجاجية صـغيرة معقمة تحوي على 5 مليلتر من المحلول الملحي الوظيفي المعقم . مزج العالق جيداً وتم ضـبط عدد الخلايا في العالق عند $10^8$ خلية / مليلتر بإسـتعمال شـريحة عد خلايا الدم Haemocytometer chamber اسـتعمل العالق بصورة آنية في اختبار تحلل الدم وفي قياس الفعالية في إنتاج انزيم الفوسفولايبيز.

**4- الاوساط الزرعية**

**أ- وسط سابرود دكستروز الصلب Sabouraud's dextrose agar medium (SDA)**

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة (LabM, U.K.) باذابة 62 غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر ثم عقم بجهاز المؤصدة .

**ب- وسط دم الاغنام الصلب الغني بالسكر Sugar-enriched sheep blood agar medium**

حضر الوسط حسب طريقة Luo واخرين (18) باضافة 3% من الكلوكوز الى 1 لتر من وسط SDA وضبط الاس الهيدروجيني عند 5.6 ± 0.2 وبعد التعقيم بجهاز المؤصدة ترك ليبرد الى 45-50مْ ثم اضيف اليه (وفي ظروف معقمة) 7 مليلتر من دم الاغنام الطازج Fresh sheep blood (بيت الحيوانات / كلية الطب البيطري / جامعة الموصـــل) لكل 100 مليلتر من الوسط SDA الحاوي على الكلوكوز، و مزج جيداً و وزع في اطباق بتري معقمة وترك ليتصلب واستعمل هذا الوسط في اختبار تحلل الدم Hemolysis test .

**ج - وسط مح البيض الصلب Egg yolk agar medium**

حضـر الوسـط حسـب طريقة Price واخرين (17) بإضـافة 1 مولاري (58.44 غرام) من كلوريد الصـوديوم NaCl و 0.005 مولاري (0.55 غرام) من كلوريد الكالسـيوم $CaCl_2$ الى 1 لتر من الوسـط الغذائيSDA المحضـر كما في الفقرة أ وضـبط الأس الهيدروجيني للوسـط عند 4.3 وعقم بالموصـدة ثم ترك الوسـط ليبرد الى درجة حرارة 45-50مْ ثم أضـيف إليه (وفي ظروف معقمة) مسـتحلب مح البيض والمحضـر كما في الفقرة 1 بمقدار 8% (حجم/حجم) مزج و وزع في اطباق بتري واستعمل هذا الوسط لقياس فعالية العزلات في انتاج انزيم الفوسفولايبيز .

**5- جمع العينات**

تم الحصـول على العزلات الفطرية من المرضـى المصـابين بداء المبيضـات الفموي المراجعين او الراقدين في مستشفى ابن سينا التعليمي ومستشفى ابن الاثير التعليمي ومستشفى السلام العام والمستشفى الجامعي التعليمي / قسم صناعة الاسنان ، من خلال أخذ مسحات فموية بواسطة ممسحات قطنية معقمة Sterile cotton swabs ومررت فوق منطقة الإصابة وتم تدويرها بلطف مع مراعاة عدم لمس الأجزاء غير المصابة لتفادي التداخل مع النبيت الطبيعي Normal flora للفم .

جمعت 63 مسـحة خلال شـهرين ( من 15/ 3 ولغاية 15/ 5/ 2010 ) ومن اعمار مختلفة تراوحت بين 9 ايام – 80 سـنة ومن كلا الجنسـين وكان المرضـى يعانون من حالات مرضـية مختلفة. كانت نسـبة الذكور من عدد المرضـى 39.68% ونسبة الاناث 60.32%.

**6- زرع العينات**

نقلت المسـحات الفموية Swabs الى المختبر مباشـرة وزرعت على الوسـط الغذائي SDA الحاوي على المضـاد البكتيري Streptomycin sulfate بتركيز 100 مايكروغرام / مليلتر من الوسـط . حضـنت الاطباق في درجة حرارة 37مْ لفترة 2-7 ايام ، وأهملت الاطباق التي لم يظهر فيها نمو .

**7- التشخيص بالوسط التفريقي الصلب HiCrome Candida differential agar M1297A**

تم الحصول على الوسط بشكل جاهز من شركة (HiMedia, India) و حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة.

**8- اختبار تشخيص العزلات بنظام Vitek 2 Compact**

أجري هذا الاختبار في مختبر الصحة العامة في محافظة اربيل ، بإستعمال نظام التشخيص Vitek 2 Compact system والمجهز من شركة (France و bioMérieux , Marcy l'Etiole) وهو نظام تشخيص آلي بالكامل Fully automated يستعمل في تشخيص البكتريا والخمائر الطبية (19).

ان تشخيص الخمائر بهذا النظام يستند وبشكل رئيس على نظام التفاعل الكيموحيوي (20) .

**9- اختبار فعالية انتاج انزيم الفوسفولايبيز Phospholipase production activity**

أجري الاختبار حسب طريقة Price واخرين (17) والتي تعرف بطريقة الطبق Plate method ، إذ تم نقل 10 مايكرولتر من العالق الخميري لكل عزلة نامية بعمر 18-24 ساعة وبتركيز $10^8$ خلية / مليلتر ووضعها بشكل قطرات على سطح وسط مح البيض الصلب وتركت لتجف عند درجة حرارة المختبر ، ثم حضنت الاطباق في درجة 37مْ ولفترة 5 ايام .

إن منطقة الترسيب Precipitation zone (Pz) (المعتمة) والتي تظهر بشكل منطقة بيضاء كثيفة حول المستعمرات تمثل النتيجة الموجبة في إنتاج انزيم الفوسفولايبيز. إن المعدل الناتج من تقسيم قطر المستعمرة على مجموع قطر المستعمرة زائدا قطر منطقة الترسيب والذي يرمز له $P_Z$ يمثل وحدة قياس فعالية إنتاج انزيم الفوسفولايبيز .

$$P_Z = \frac{\text{قطر المستعمرة}}{\text{قطر المستعمرة + قطر منطقة الترسيب}}$$

**10- اختبار تحلل الدم Hemolysis**

تم اختبار فعالية العزلات في تحليل الدم وإنتاج بروتين الهيمولايسين باستعمال طريقة تحلل الطبق Plate assay method والتي وصفها Luo وآخرون (18) والمحورة عن الطريقة التي وصفها Manns وآخرون (21) ، تضمنت الطريقة نقل 10 مايكرولتر من العالق الخميري لكل عزلة نامية بعمر 18-24 ساعة وبتركيز $10^8$ خلية/ مليلتر ووضعها بشكل قطرات لتكون بقعا Spots على سطح وسط دم الأغنام الصلب الغني بالسكر ثم تركت لتجف عند درجة حرارة المختبر ثم حضنت في درجة 37مْ ولفترة 48 ساعة وبوجود 5% من غاز $CO_2$ واستخدمت جرة الشمعة Candle jar عند التحضين في هذه التجربة. يستدل على النتيجة الموجبة بظهور هالة نصف شفافة Translucent halo و/ أو سوداء مخضرة Greenish-black حول المستعمرة والتي يمكن رؤيتها بإستعمال ضوء نفاذ Transmitted light.

استخدمت المسطرة في قياس اقطار المستعمرات النامية ، والمعدل الناتج من تقسيم مجموع قطر المستعمرة زائدا الهالة على قطر المستعمرة وحدها يعطي دليلاً للتحليل Hemolytic index (Hi) وهذا المعدل يساوي او اكبر من 1.

$$Hi = \frac{\text{قطر (المستعمرة + الهالـة)}}{\text{قطر المستعمـرة}}$$

وهذا المعدل يمثـل قـوة أو شدة Intensity انتـاج الهيمولايسين بواسـطة العـزلات المختـلفة لخميـرة الـ *C. albicans* ( 22).

**النتائــج والمناقشــة**

**1- الصفات الزرعية**

ظهرت العزلات النامية على وسـط سـابرود دكسـتروز الصـلب SDA في العزل الأولي بشـكل مسـتعمرات بيضـاء الى كريمية Creamy اللون وناعمة Smooth وزبدية القوام Butyrous وذات شكل محدب Convex وهذه الصـفات هي مطابقة لصفات الخمائر التي وصفها Kurtzman و Fell (23).

ويستعمل الوسط SDA بشكل واسع لعزل أنواع الخمائر المختلفة باعتباره وسط نموذجي لعزل الــ *Candida* يسمح بنموها ويكبح نمو أنواع كثيرة من البكتريا الفموية وذلك لانخفاض الأس الهيدروجيني لهذا الوسـط كما أن إضـافة المضـاد البكتيري يزيد من انتقائيته (24) .

**2- تشخيص العزلات بالوسط التفريقــي**

**HiCrome Candida differential agar M1297A**

أظهرت نتائج هذا الاختبار أن جميع العزلات ( 36 عزلة ) استطاعت النمو بصورة جيدة على الوسط التفريقي 100% ، ظهرت المسـتعمرات النامية بألوان مختلفة بعضـها كان مطابقاً والبعض الآخر يختلف عن تعليمات الشـركة المجهزة للوسـط التفريقي HiCrome Candida differential agar التي تبين ان هذا الوســط يميز بين أربعة أنواع من الخمائر التابعة للجنس *Candida* وهي الــ *C. albicans* التي تنمو مستعمراتها بلون اخضر فاتح Light green والــ *C. glabrata* والتي تنمو بلون كريمي الى أبيض والــ *C. krusei* والتي تنمو بلون ارجواني ، زغبي Purple, fuzzy والــ *C. tropicalis* التي تنمو بلون أزرق الى ارجواني Blue to purple.

وقد أظهرت نتائج هذا الاختبار كما هو مبين في الجدول (1) إن 30 عزلة كانت موجبة لهذا الاختبار أي بنســبة 83.33% ومنها 29 عزلة (80.55%) شـخصـت على أنها الخميرة *C. albicans* إذ ظهرت مسـتعمراتها بلون أخضـر فاتح ذات أشكال ملساء محدبة ، وعـزلة واحـدة ونسبتها 2.77% شـخصت على أنهــا الخميـرة *C. glabrata* وظهرت مستعمراتها

بلون أبيض ، اما العزلات الست الباقية التي نسبتها 16.67 % فكانت سالبة لهذا الاختبار وظهرت مستعمراتها بلون وردي فاتح Light pink ولم نتمكن من تشخيصها ، لأن هذا اللون غير موجود ضمن تعليمات الشركة المجهزة .

**الجدول (1) : ألوان المستعمرات النامية على الوسط التفريقي HiCrome Candida differential agar M1297A**

| نوع العزلة | لون المستعمرات النامية على الوسط التفريقي | العدد | رمز العزلة |
|---|---|---|---|
| *Candida albicans* | اخضر فاتح | 29 | RA16، RA14–RA4، RA1 ،RA19، RA17، ، RA27–RA21 RA36، RA34–RA29 |
| *Candida glabrata* | ابيض | 1 | RA3 |
| غير مشخصة | وردي فاتح | 6 | RA20 ،RA18، RA15، RA2 RA35، RA28، |

**3 – تشخيص العزلات بنظام Vitek 2 Compact**

ازدادت خلال العقد الأخير الإصابات المخاطية والجهازية بأنواع الـ *Candida* غير النوع *C. albicans* وأن الاصابات بهذه الأنواع أصبح لها تأثير مباشر في العلاج، لذلك فإن التشخيص على مستوى النوع له دور في اختيار المضاد الفطري المناسب مما يقلل من نسبة الإمراضية والوفيات بين المرضى المصابين بهذه الانواع من الاصابات (25).

ومن أجل ذلك استخدم في هذه الدراسة نظام التشخيص Vitek 2 Compact الذي يمتاز بالدقة والسرعة في تشخيص العزلات الى مستوى النوع (19) وقد أظهرت النتائج قدرة هذا النظام على تشخيص جميع عزلات الخمائر قيد الدراسة أي بنسبة 100% وقد ظهرت الخميرة *C. albicans* بنسبة 77.77% وبواقع 28 عزلة في حين كانت الثمان عزلات الباقية تعود لأنواع أخرى من الخمائر والتي ظهرت كل منها بواقع عزلة واحدة أي بنسبة 2.77% لكل منها، كماهو مبين في الجدول (2) . كما أظهرت نتائج الاختبار نسبة الاحتمالية Probability في تشخيص العزلات إذ يعمل نظام التشخيص على المقارنة ما بين نتائج التفاعلات الكيموحيوية مع المعلومات المتوفرة في قاعدة بيانات النظام ثم تحسب النسبة المئوية لاحتمالية التشخيص لكل عزلة والتي تراوحت بين 87 الى 99% كما هو موضح في الجدول (2).

وقد اختلفت نتائج هذا الاختبار في تشخيص الـــ *C. albicans* مع نتائج اختبار النمو على الوسط التفريقي إذ ظهرت الـ *C. albicans* في هذا الاختبار بواقع 28 عزلة بالمقارنة مع نتائج اختبار النمو على الوســط التفريقي التي ظهرت فيها هذه الخميرة بواقع 29 عزلة أي ظهرت بنســـبة 96.55% من مجمـــوع عزلات الـ *C. albicans* إذ شخص نظام التشخيص Vitek 2 العزلة RA16 على أنها الخميرة *Cryptococcus neoformans* وبذلك كانت نســبة التشـــخيص الخاطئ Misidentification لخميرة الـــ *C. albicans* هي 3.44% وهذا يتفق مع الدراســات الســابقة التي أظهرت أن معدلات التشـــخيص الصـــحيح تتراوح ما بين 84 الى 99% وهذا يعزى الى الاختلافات الواضـــحة بين الدراســات فيما يتعلق بالأنواع المدروسة وعدد العزلات قيد الاختبار، وكذلك الاختلافات في الموقع الجغرافي لإجراء الدراسة (26) .

وجـاءت نتـائج هـذه الـدراســـة متفقـة مع الكثير من الـدراســـات والتي تشـــير الى ســـيـادة الـــ *C. albicans* في إصابات داء المبيضات ، إذ تُعد من اكثر انواع الخمائر التي تعزل بصورة متكررة من التجويف الفموي (27) ، فهي مسـؤولة عن 80% من إصـابات داء المبيضـات و أن تشـخيص الـــ *Candida* على مسـتوى النوع له أهمية لاختلاف أنواع هذه الخميرة فيما بينها بشكل واسع من حيث قدرتها على إحداث الإصـابة وكذلك حساسيتها للمضـادات الفطرية (24)

**الجدول (2): نتائج تشخيص العزلات الخميرية قيد الدراسة بنظام Vitek 2 Compact**

| رمز العزلة | نوع الخميرة | الاحتمالية (%) |
|---|---|---|
| RA1 | *Candida albicans* | 87 |
| RA2 | *Candida famata* | 89 |
| RA3 | *Candida glabrata* | 99 |
| RA4 | *Candida albicnas* | 97 |
| RA5 | *Candida albicans* | 99 |
| RA6 | *Candida albicans* | 99 |
| RA7 | *Candida albicans* | 99 |
| RA8 | *Candida albicans* | 99 |
| RA9 | *Candida albicans* | 97 |
| RA10 | *Candida albicans* | 95 |
| RA11 | *Candida albicans* | 98 |
| RA12 | *Candida albicans* | 99 |
| RA13 | *Candida albicans* | 98 |
| RA14 | *Candida albicans* | 98 |
| RA15 | *Candida kefyr* | 94 |
| RA16 | *Cryptococcus neoformans* | 87 |
| RA17 | *Candida albicans* | 99 |
| RA18 | *Candida lusitaniae* | 93 |
| RA19 | *Candida albicans* | 95 |
| RA20 | *Saccharomyces cerevisiae* | 98 |
| RA21 | *Candida albicans* | 99 |
| RA22 | *Candida albicans* | 99 |
| RA23 | *Candida albicans* | 94 |
| RA24 | *Candida albicans* | 99 |
| RA25 | *Candida albicans* | 99 |
| RA26 | *Candida albicans* | 98 |
| RA27 | *Candida albicans* | 99 |
| RA28 | *Malassezia furfur* | 87 |
| RA29 | *Candida albicans* | 99 |
| RA30 | *Candida albicans* | 91 |
| RA31 | *Candida albicans* | 95 |
| RA32 | *Candida albicans* | 92 |
| RA33 | *Candida albicans* | 98 |
| RA34 | *Candida albicans* | 94 |
| RA35 | *Rhodotorula glutinis* | 87 |
| RA36 | *Candida albicans* | 98 |

**4 – فعالية عزلات الـ *C. albicans* في انتاج انزيم الفوسفولايبيز**

أظهرت نتائج هذا الاختبار أن 23 عزلة من مجموع 29 عزلة من عزلات خميرة الـ *C. albicans* كانت موجبة لهذا الاختبار أي بنسبة 79.31% إذ أظهرت فعالية في انتاج انزيم الفوسفولايبيز من خلال ظهور منطقة كثيفة بيضاء هي منطقة الترسيب حول المستعمرات النامية على وسط مح البيض الصلب، وتظهر منطقة الترسيب نتيجة تكوين معقد الكالسيوم Calcium complex مع الأحماض الدهنية المتحررة من الدهون المفسفرة الموجودة في مح البيض بفعل تاثير انزيم الفوسفولايبيز (17) . من خلال الجدول **(3)** نلاحظ أن هناك تفاوتاً بين العزلات في فعالية انتاج الانزيم من خلال التفاوت في أقطار مناطق الترسيب، وبالتالي تبايناً في قيم Pz والتي تراوحت من 0.53 الى 0.80 ، وبحسب التصنيف الذي وضعه Price واخرون (17) في تقييم فعالية إنتاج الإنزيم فإن نتائج دراستنا أظهرت أن 10 من العزلات المنتجة (43.47%) كانت ذات فعالية قوية جداً في إنتاج الإنزيم إذ تراوحت قيم Pz من 0.53 الى 0.69 ، وان 12 عزلة (52.17%) كانت ذات فعالية قوية نسبياً إذ تراوحت قيم Pz من 0.72 الى 0.77 اما العزلة RA19 (4.34%) فقد أظهرت فعالية معتدلة إذ كانت قيمة Pz لها 0.80.

ومن خلال إجراء التحليل الاحصائي باختبار دنكن المتعدد المدى عند مستوى احتمال 1% نلاحظ أن هناك تفاوتاً في قدرة العزلات على إنتاج الانزيم ، وقد أظهرت العزلة RA13 اعلى انتاجية من بين جميع العزلات المنتجة إذ اخذت قيمة الانتاج Pz لها الحرف h ، وتباينت بقية العزلات فيما بينها في قيم Pz والتي انخفضت حتى وصلت 0.80 للعزلة RA19 التي أظهرت أقل إنتاجية بالمقارنة مع العزلات المنتجة الأخرى وأخذت قيمة Pz لها الحرف a إحصائياً. استعملنا في دراستنا طريقة الطبق التي اقترحها Price واخرون (17) في تقييم فعالية انتاج انزيم الفوسفولايبيز وهي طريقة سهلة وسريعة في تحديد وقياس فعالية إنتاج انزيم الفوسفولايبيز في الـ *C. albicans* (28).

تتفق نتائج دراستنا مع نتائج دراسات سابقة التي أشارت الى أن هناك تبايناً كبيراً في فعالية إنتاج الانزيم بين العزلات المختلفة من خميرة الـ *C. albicans* ففي دراسة اجراها Borst و Fluit (29) على 186 عزلة من الـ *C. albicans* والمعزولة من مصادر مختلفة (الدم والقناة التنفسية والقناة البولية والجروح) والتي اظهرت ان 72% من مجموع العزلات كانت منتجة للانزيم وبنسب متفاوتة وحسب موقع الإصابة فقد كانت 87% من عزلات القناة التنفسية و 72% من عزلات القناة البولية و 71% من الدم و 29% من عزلات الجروح .

وهذا يخالف النتائج التي توصل إليها Tsang وآخرون (30) التي أظهرت أن جميع عزلات الـ *C. albicans* والبالغ عددها 76 عزلة والمعزولة من فم المرضى المصابين بداء السكري كانت منتجة للانزيم وقد تراوحت قيم Pz لها من 0.68 الى 0.89.

وفي دراسة أجراها Sachin وآخرون (31)على انواع من الـ *Candida* والمعزولة من مصادر مختلفة (الدم ومسحات فموية ومسحات مهبلية وادرار) والتي أظهرت أن 36 عزلة من مجموع 39 عزلة أي بنسبة 92.3% كانت منتجة لانزيم

الفوسفولايبيز، وكانت هذه النسبة عالية بالمقارنة مع نسب العزلات الموجبة للأنواع الأخرى من الـــ *Candida* التي شملتها الدراسة، إن هذا الاختلاف في نسب العزلات الموجبة لكل دراسة ربما يعتمد على عدة عوامل منها مواصفات العزلة نفسها وموقع الاصابة ، كما أن الجين المسؤول عن تشفير هذا الانزيم يتأثر بظروف النمو، وربما قد يكون لعدد العزلات المدروسة في كل دراسة تاثير (بشكل جزئي) على التباين في نتائج الدراسات المختلفة (30).

**5- فعالية عزلات الـ *C. albicans* في انتاج الهيمولايسين**

أظهرت نتائج هذا الأختبار أن جميع عزلات الـ *C. albicans* في دراستنا الحالية (100%) كانت منتجة للهيمولايسين إذ أظهرت فعالية في تحليل الدم ، وكانت هذه الفعالية من نوع بيتا ، إذ تم ملاحظة التحلل الكامل للدم والذي ظهر بشكل منطقة نصف شفافة حول المستعمرات النامية على وسط سابرود دكستروز الصلب الحاوي على دم الاغنام والغني بسكر الكلوكوز بتركيز 3% ومن خلال الجدول (3) نلاحظ أن هناك اختلافاً في قدرة عزلات الـــ *C. albicans* على إنتاج الهيمولايسين ، إذ تراوحت قيم دلائل التحليل (Hi) لهذا العامل من 1.48 الى 2.16 ومعظم العزلات ذات فعالية في إنتاج هذا العامل ، ومن خلال إجراء التحليل الاحصائي باختبار دنكن المتعدد المدى عند مستوى احتمال 1% لاحظنا أن هناك فروقاً معنوية بين قيم دلائل التحليل للعزلات، إذ إخذت العزلة RA7 الحرف a و تفوقت على جميع العزلات وقد بلغت قيمة الإنتاج 2.16 والتي لم تختلف معنويا عن العزلتين

RA10 و RA19 إذ كانت قيم إنتاجهما لهذا العامل 2.00 لكل منهما ثم تدرجت بقية العزلات في قيم دلائل تحليلها انخفاضاً الى أن وصلت 1.48 للعزلة RA31 والتي أظهرت أدنى فعالية في انتاج الهيمولايسين .

إن نتائج دراستنا الحالية جاءت متفقة مع دراسات اخرى كالدراسة التي قامت بها Şeker (32) على 207 عزلة مختلفة من انواع الـــ *Candida* ، ان جميع عزلات الـــ *C. albicans* كانت منتجة للهيمولايسين وكانت من بين الأنواع التي أظهرت فعالية عالية ومن النوع بيتا وبمعدل 2.22 وبحسب اختبار دنكن المتعدد الحدود فقد اخذت هذه القيمة الحرف a بالمقارنة مع قيم دلائل التحلل للانواع الاخرى التي اخذت بالانخفاض الى أن وصلت 1.37 للنوع *C. krusei* وأخذت هذه القيمة احصائيا الحرف d في حين كانت جميع عزلات النوع *C. parapsilosis* في هذه الدراسة سالبة لهذا الاختبار .

في حين أظهرت نتائج دراسة حديثة قام بها Sachin وآخرون (31) على انواع مختلفة من الـــ *Candida* والمعزولة من مصادر مختلفة (دم و ادرار ومسحات فموية ومسحات مهبلية) ومن بينها 39 عزلة من الـــ *C. albicans* ،كانت فقط 37 عزلة منتجة للهيمولايسين أي بنسبة 94.8% في حين أظهرت عزلتان نتيجة سالبة لهذا الاختبار.

إن قدرة العزلات على انتاج الهيمولايسين تختلف باختلاف أنواع الـــ *Candida* وكذلك تختلف ضمن افراد النوع الواحد وذلك اعتمادا على مصادر العزل (33) ، كما يجب أن نضع بنظر الاعتبار انه ربما هناك انواع من الهيمولايسين خاصة بكل نوع Species– specific hemolysins (34) .

ان المعلومات المتوفرة عن عامل الضراوة الهممولايسين مازالت قليلة ، وهناك حاجة الى المزيد من الدراسات من اجل الكشف عن طبيعة هذا العامل المحلل للدم Hemolytic factor في الـــ *C. albicans* وعن فائدته في التشخيص والكشف بشكل رئيس عن تاثيره على خلايا العائل ، وقد يشبه هذا العامل الانزيمات خارج خلوية ، وبذلك يساعد في تمييز العزلات (13). كما أن الدراسات حول انتاج الهيمولايسين من قبل عزلات الـــ *Candida* والمعزولة من الفم مازالت محدودة ، وإن أول دراسة أجريت حول فعالية تحليل الدم لعزلات من الـــ *C. albicans* والمعزولة من التجويف الفموي كانت من قبل Tsang وآخرين (30) الذين لاحظوا أن الـــ *C. albicans* المعزولة من فم المرضى المصابين بمرض السكري ذات إنتاجية أعلى للهيمولايسين بالمقارنة مع عزلات السيطرة والتي مصدرها أشخاص أصحاء (34) وربما قد يكون لزيادة تركيز الكلوكوز في اللعاب تأثير على إنتاجية الهيمولايسين في عزلات الـ *C. albicans* (30) ، وهذا ما أكده Manns وآخرون (21) في دراستهم التي لاحظوا فيها عدم وجود فعالية إنتاج الهيمولايسين في عزلات الـ *C. albicans* النامية على الوسط الخالي من الكلوكوز.

إن العامل المحلل للدم هو أحد عوامل الضراوة في أنواع الـ *Candida* والذي يسهم في إمراضية الـ *Candida* ولأهميته فهو يتطلب دراسات جديدة وأكثر جدية (13).

**الجدول (3) : فعالية عزلات الـ *C. albicans* في انتاج انزيم الفوسفولايبيز و الهيمولايسين**

| رمز العزلة | معدل قيم Pz | معدل قيم Hi |
|---|---|---|
| RA1 | *i 0.00 | *bcd 1.88 |
| RA4 | fgh 0.56 | b-e 1.83 |
| RA5 | efg 0.63 | b-g 1.74 |
| RA6 | b-e 0.69 | d-g 1.66 |
| RA7 | cde 0.67 | a 2.16 |
| RA8 | a-e 0.72 | fg 1.55 |
| RA9 | a-d 0.73 | abc 1.93 |
| RA10 | i 0.00 | ab 2.00 |
| RA11 | gh 0.54 | c-g 1.71 |
| RA12 | i 0.00 | b-f 1.76 |
| RA13 | h 0.53 | bcd 1.88 |
| RA14 | i 0.00 | bcd 1.88 |
| RA16 | a-e 0.72 | efg 1.56 |
| RA17 | abc 0.76 | d-g 1.64 |
| RA19 | a 0.80 | ab 2.00 |
| RA21 | ab 0.78 | b-f 1.76 |
| RA22 | abc 0.77 | b-f 1.83 |
| RA23 | a-e 0.72 | b-f 1.83 |
| RA24 | def 0.65 | b-f 1.77 |
| RA25 | b-e 0.69 | b-f 1.81 |
| RA26 | cde 0.67 | efg 1.59 |
| RA27 | abc 0.77 | g 1.49 |
| RA29 | a-d 0.73 | d-g 1.63 |
| RA30 | abc 0.77 | b-f 1.81 |
| RA31 | abc 0.76 | g 1.48 |
| RA32 | i 0.00 | efg 1.57 |
| RA33 | cde 0.67 | d-g 1.64 |
| RA34 | i 0.00 | efg 1.59 |
| RA36 | a-d 0.74 | b-g 1.74 |

***المعدلات ذات الاحرف المتشابهة لا تختلف معنويا عند مستوى احتمال 1% بحسب اختبار دنكن المتعدد المدى.**

**المصـــادر**


1. Barnett, J. A., Yeast, 25: 385-417, (2008).
2. Kumar, M. A. and Rajsekhar, S., Inter. J. Res., Ayurveda Pharm., 2(6): 1722-1725, (2011).
3. Shibata, T. ; Yamashita, D. ; Hasegawa, S. ; Saito, M. ; Otsuki, N. ; Hashikawa, K. ; Tahara, S. and Nibu, K., Auris Nasus Larynx, 38: 418-420, (2011).
4. Dangi, Y. S. ; Soni, M. L. and Namdeo, K. P. , Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 2(4): 36-41, (2010).
5. Pires-Gonçalves, R. H. ; Miranda, E. T. ; Baeza, L. C. ; Matsumoto, M. T. ; Zaia, J. E. and Mendes-Giannini, M. J. S. , Mycopathologia, 164: 255-263, (2007).

6. Tarçin, B. G. , J. Mar. Uni. Inst. Health Sci., 1(2): 140-148, (2011).
7. Ge, Y. P. ; Lu, G. X. ; Shen, Y. N. and Liu, W. D. , Mycopathologia, 172:429-438, (2011).
8. Ghannoum, M. A. , Clin. Microbiol. Rev.,13(1):22-143, (2000).
9. Yang, Y. , J. Microbiol. Immunol. Infect., 36:223-228, (2003).
10. Abu-Elteen, K. H. ; Elkarmi, A. Z. and Hamad, M. A., Jpn. J. Infect. Dis., 54: 229-236, (2001).
11. Sardi, J. C. O. ; Duque, C. ; Mariano, F. S. ; Peixoto, I. T. A. ; Höfling, J. F. and Gonçalves, R. B. , J. Oral Sci., 52(2): 177-185, (2010).
12. Silva, S. ; Negri, M. ; Henriques, M. ; Oliveira, R. ; Williams, D. W. and Azeredo, J., FEMS Microbiol. Rev., 36: 288-305, (2012).
13. Yigit, N. and Aktas, E. , J. Med. Mycol., 19: 110-115, (2009).
14. Santos, R. ; Buisson, N. ; Knight, S. ; Dancis, A. ; Camadro, J. and Lesuisse, E. , Microbiology, 149: 579-588, (2003).
15. Furlaneto-Maia, L. ; Specian, A. F. ; Bizerra, F. C. ; de Oliveira, M. T. and Furlaneto, M. C., Mycopathologia, 166: 209-217, (2008).
16. Chaffin, W. L. ; López-ribot, J. L. ; Casanova, M. ; Gosalbo, D. and Martinez, J. P. , Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62(1):130-180, (1998).
17. Price, M. F. ; Wilkinson, I. D. and Gentry, L. O. , Sabouraudia, 20: 7-14, (1982).
18. Luo, G. ; Samaranayake, L. P. and Yau, J. Y. Y. , J. Clin. Microbiol., 39(8): 2971-2974, (2001).
19. Aubertine, C. L. ; Rivera, M. ; Rohan, S. M. and Larone, D. H. , J. Clin. Microbiol., 44(1): 227-228, (2006).
20. Valenza, G. ; Strasen, J. ; Schäfer, F. ; Frosch, M. ; Kurzai, O. and Abele-Horn, M. , J. Clin. Microbiol., 46(11): 3784-3787, (2008).
21. Manns, J. M. ; Mosser, D. M. and Buckley, H. R. , Infect. Immun., 62(11): 5154-5156 , (1994).
22. Favero, D. ; França, E. J. G. ; Furlaneto-Maia, L. ; Quesada, R. M. B. and Furlaneto, M. C. , Mycoses, 54(6): 816-820 , (2011).
23. Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. , The Yeasts, A Taxonomic Study. 4th ed., Elsevier Science B.V., The Netherland, (1998).
24. Raju, S. B. and Rajappa, S. , Int. Scholarly Res. Network, 2011: 1-7, (2011).
25. Agarwal, S. ; Manchanda, V., Verma, N. and Bhalla, P. , Ind. J. Med. Microbiol.,29(2): 172-177, (2011).
26. Meletiadis, J. ; Arabatzis, M. ; Bompola, M. ; Tsiveriotis, K. ; Hini, S. ; Petinaki, E. ; Velegraki, A. and Zerva, L. J. Clin. Microbiol., 49(7): 2722-2727, (2011).

27. Mardegan, R. ; Klein, M.I. ; Golvea, M. B. ; Rodrigues, J. A. O. ; Gonçalves, R. B. and Höfling, J. F. , Braz. J. Microbiol., 37: 26-32, (2006).
28. Niewerth, M. and Korting, H. C. ,Mycoses, 44:361-367, (2001).
29. Borst, A. and Fluit, Ad. C. , J. Med. Microbiol., 52:971-974, (2003).
30. Tsang, C. S. P. ; Chu, F. C. S. ; Leung, W. K. ; Jin, L. J. ; Samaranayake, L. P. and Siu, S. C. , J. Med. Microbiol., 56: 1393-1398, (2007).
31. Sachin, C. D. ; Ruchi, K. and Santosh, S. , Intr. J. Med. Biomed. Res., 1(2): 153-157, (2012).
32. Şeker, E. , Mycopathologia, 169: 303-308, (2010).
33. Shehabi, A. A. ; Nazzal, S. A. and Dajani, N., Microb. Ecol. Health Dis., 16: 214-216 , (2004).
34. Yigit, N. ; Aktas, E. ; Dagistan, S. and Ayyildiz, A., Eura. J. Med., 43: 27-32, (2011).