اختبار تأثير تراكيز مختلفة من العسل الطبيعي في نمو انواع المبيضات المعزولة من اطفال مصابين بمرض السلاق الفموي

نيران عبيد جاسم
جامعة القادسية ـ كلية العلوم
قسم علوم الحياة

نبيل ابراهيم ناصر
جامعة القادسية – كلية العلوم
قسم علوم الحياة

الخلاصة :-

خلال المدة الواقعة بين تشرين الثاني 2011 الى كانون الثاني 2012 فحصت 113 مسحة من اطفال مصابين بمرض السلاق الفموي oral thrush لغرض التحري عن انواع المبيضات المسببة للمرض منهم (71) ذكر (63%) و (42) انثى (37%) كما تم اختبار الفعالية البايلوجية لنوعين من العسل الطبيعي و هما عسل السدر و عسل الكالبتوز في تثبيط نمو الانواع المعزولة.
تم عزل خمسة انواع من المبيضات هي*Candida albicans* بنسبة 50.44% , *C.tropicalis* بنسبة 19.46%*C.parapsilosis,* بنسبة 15.04% *C.krusei*, بنسبة 12.38% ثم النوعC.glabrata بنسبة% 2.15
و بينت نتائج اختبار فعالية العسل المستخدم ان التاثير الفعلي لكلا نوعي العسل كان عند التركيزين 75% و 100% بالمقارنة مع معاملة السيطرة و معاملة مضاد النستاتين , و ان عسل السدر كانت له افضلية واضحة على عسل الكالبتوزفي تثبيط نمو انواع المبيضات المعزولة.

المقدمة Introduction

يعد مرض السلاق الفموي Oral Candidiasis من اكثر الامراض الفطرية الانتهازية شيوعا و خاصة في حالة الاشخاص الضعاف مناعياImmunocompromised و تعد المبيضات البيضاء *Candida albicans* من اكثر انواع المبيضات ضراوة , و في الوقت الحاضر ظهرت انواع اخرى اعتبرت مسببات رئيسية لمرض السلاق بعد المبيضات البيضاء مثل *C. krusei* , *C. tropicalis* , *C. parapsilosis* , *C. glabrata* (7) .
و يعد جنس المبيضات من الفطريات الممرضة الانتهازيOpprtunistic Fungi Pathogen حيث يمكن ان تسبب اصابات الفم Oral Candidiasis و المهبل Vaginal Candidiasis و غيرها من الاصابات الفطرية , و هذه الاصابات ازدادت بشكل كبير في الاونة الاخيرة قياسا بالسابق بسب ازدياد حالات نقص المناعة الناتجة من التعرض للاشعاع Irradiation و العلاج الكيميائيChemotherapy و مرض السرطانCancer و مرض السكري Diabetes و تعاطي العلاجات الكابحة للمناعة و الافراط في تناول العلاجات دون مراجعة الاطباء و مرض نقص المناعة المكتسب Acuired Immuno Deficiency Syndrome (1).
و من المعروف ان جنس المبيضات *Candida* species جزء من النبيت الطبيعي لتجويف الفم لدى الاشخاص الاصحاء Healthy Individuals و لكن من الممكن ان يكون مسبب مرضي في 60% من الاشخاص الضعاف مناعيا Immunocompromised (3) (4) .
و نظرا لزيادة المقاومة للمضادات الفطرية من قبل العزلات السريرية للمبيضات البيضاء (12) و امتلاك المضادات الفطرية اثارا جانبية بسبب سميتها لخلايا اللبائن (5) لذلك كان لابد من ايجاد بدائل عن المضادات الفطرية تمتلك فعالية عالية ضد الفطريات الممرضة و امينة الجانب و ذلك للقضاء على الفطريات المقاومة للمضادات الفطرية اذ اشارت العديد من البحوث ان هنالك مصادر طبيعية تمتلك فعالية عالية ضد الفطريات الممرضة (6)
و قد استخدم العسل للعلاج في العديد من الحضارات القديمة و ما زال يستخدم للعلاج في الطب الشعبي و قد اثبت الطب الحديث الخواص العلاجية للعسل و من ثم لقي استخدام العسل كمضاد للاحياء المجهرية قبولا واسعا و خاصة لعلاج القرحة Ulcer و التهابات الجروح Wound infections و التهابات الحروق Burn infections (10) .
و نظرا لخطورة المبيضات و الامراض التي تسببها و اهمها مرض السلاق الفموي و للاسباب المذكورة اعلاه

جاءت هذه الدراسة التي تضمنت عزل و تشخيص الانواع المسببة لداء المبيضات في الاطفال و دراسة تاثير نوعين من العسل الطبيعي عليها.

المواد وطرائق العمل Materials and methods

جمع العينات

تم جمع 113 مسحة فم من الاطفال الذين راجعو مستشفى الاطفال و الولادة التعليمي في محافظة القادسية للمدة من تشرين الثاني/ 2011 الى كانون الثاني / 2012 و الذين شخص اصابتهم بمرض السلاق الفموي الطبيب الاختصاص حامد شاكر المهجة بواسطة مسحات قطنية معقمة و نقلت الى المختبر لغرض تنميتها و تشخيصها و اجراء الاختبارات عليها .

العزل و التشخيص

شخصت جميع العزلات قيد الدرس بالاعتماد على الفحوصات الاعتيادية المستخدمة في التشخيص كالفحص المباشر و الصفات المظهرية للمستعمرة و تكوين الانبوب الجرثومي و تكوين الابواغ الكلاميدية و الكشف عن وجود المحفظة و اختبار النمو في 37C و اختبار تخمر السكريات و اختبار اليوريز و المقاومة للسايكلوهيكسيماید كما اجري اختبار النمو على وسط كروم- اكار كانديدا (Chromagar candida)حيث نقلت خمائر بعمر 24 ساعة الى وسط كروم اكار كانديدا و حضنت بدرجة حرارة 37C لمدة 24-48 ساعة .

تحليل عينات العسل

اجريت عدة اختبارات للكشف عن مكونات عينات العسل قيد الدراسة مثل الكشف عن Hydroxy Methyl Furfural , PH , Proline , Protien , Total sugar , Sucrose حسب ما ذكره (2,9,10) .

اختبار التاثير البايولوجي لانواع العسل المستخدم

اجري اختبار التأثير البايلوجي لنوعي العسل المستخدم في الدراسة تم اتباع طريقة الانتشار بالحفر agar well diffusion method الواردة في (11) و كما يلي:-

تم تحضير عالق فطري بتركيز ($5X10^8$) خلية\مليلتر و نقل منه (0.1) مليلتر الى سطح وسط السابرود ديكستروز الصلب و تم نشره بوساطة الناشر و تركت الاطباق ليجف العالق ثم تم عمل حفر بقطر (6) مليمتر في الوسط المزروع باستخدام الثاقب الفليني ثم غلقت الحفر باضافة (0.05) مليلتر من وسط السابرود ديكستروز الصلب المعقم قبل تصلبه لمنع تسرب العسل اسفل الحفر و تم عمل تحضير تراكيز من نوعي العسل (100%,75%,50%,25%) و بواقع مكررين لكل تركيز ثم تمت اضافة (0.1) مليلتر من كل تركيز لكل حفرة و علمت الاطباق و حضنت بدرجة 30C لمدة 24ساعة ثم تم تحديد فعالية كل تركيز من عينات العسل بقياس منطقة التثبيط (Inhibition zone) حول كل حفرة. و قورنت النتائج بنتيجة المضاد الفطري النستاتين الذي اختبرت فعاليته بنفس الطريقة السابقة .

التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات احصائيا على مستوى معنوية $P \leq 0.05$ و باستخدام جدول ANOVA للتاكد من وجود فروق معنوية بين المعالجات المختبرة .

النتائج و المناقشة Results & Discussion

العزل و التشخيص

يوضح الجدول (1) انواع المبيضات المعزولة و نسب ظهورها من العينات التي تم الحصول عليها حيث تم تشخيص خمسة انواع تابعة لجنس المبيضات وهي*C. albicans*، *C. tropicalis*، *C. parapsilosis* ، *C. krusei* بالاضافة الى *C. glabrata* و بالنسب 2.15% , 12.38 , 15.04% , 19.46% , 50.44% على التوالي وهذه القيمة تتفق مع ما وجده (15,16) اما الجدول (2،3.) فتبين نتائج الفحوصات البايوكيميائية و الفسيولوجية و بعض عوامل الضراوة للانواع المعزولة و التي ساعدت في تشخيص هذه الانواع و هذه النتائج تتفق مع ما وجده (15,16) اما الشكل (1) فيوضح نمو انواع المبيضات المعزولة على وسط Chromagar candida و الذي يبين ان النوع *C. albicans* ظهر بلون اخضر و النوع *C. tropicalis* ضهر بلون ازرق معدني و النوع *C. parapsilosis* ضهر بلون ابيض الى كريمي و النوع *C. krusei* ضهر بلون وردي و النوع *C. glabrata* ضهر بلون بنفسجي و هذه النتائج تتفق مع ما وجده (3).

جدول(1) الصفات الزرعية و المجهرية لأنواع المبيضات المعزولة .

الأنواع	النسب المؤية للظهور
Candida albicans	**50.44 %**
Candida tropicalis	**19.46 %**
Candida parapsilosis	**15.04 %**
Candida krusei	**12.38 %**
Candida glabrata	**2.15 %**

النسبة المئوية للظهور = عدد العزلات لكل نوع ÷ العدد الكلي ×100

جدول (2) نتائج الاختبارات البايوكيميائية والفسيولوجية لأنواع المبيضات المعزولة.

الصفات المدروسة		الأنواع				
		Candida albicans	*Candida tropicalis*	*Candida parapsilosis*	*Candida krusei*	*Candida glabrata*
الصفات الفسيولوجية	Capsul	-	-	-	-	-
	Growth at 37C	+	+	+	+	+
	Uraese	□	-	-	±	-
تخمر السكريات	Glucose	+	-	+	+	+
	Maltose	+	-	-	-	-
	Galctose	±	-	-	±	-
	Lactose	-	-	-	-	-
	Sucrose	-	±	-	-	-

± متغاير

+ موجب

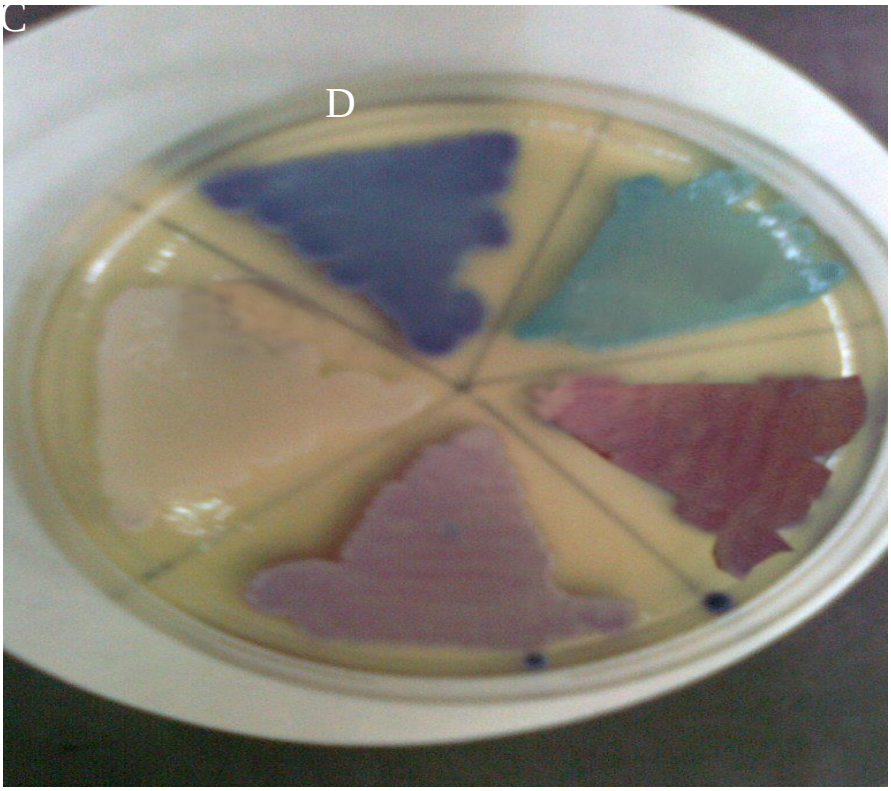
_ سالب

جدول (3) يبين عوامل الضراوة للانواع التابعة لجنس المبيضات المعزولة

Vrulnce Factores			*Candida species*
Cyclohximide	**Chlamydospores**	**Germ tube**	
+	+	+	***Candida albicans***
-	-	-	***Candida tropicalis***
-	-	-	***Candida parapsilosis***
-	-	-	***Candida krusei***
-	-	-	***Candida glabrata***

+ موجب

_ سالب



الشكل (1) يبين نمو المبيضات المعزولة على وسط Chromagar Candida
 بعد 24 ساعه من الحضن بدرجة 37C

C. albicans : A
C. tropicalis : B
C. parapsilosis : C
C. krusei : D
C. glabra : E

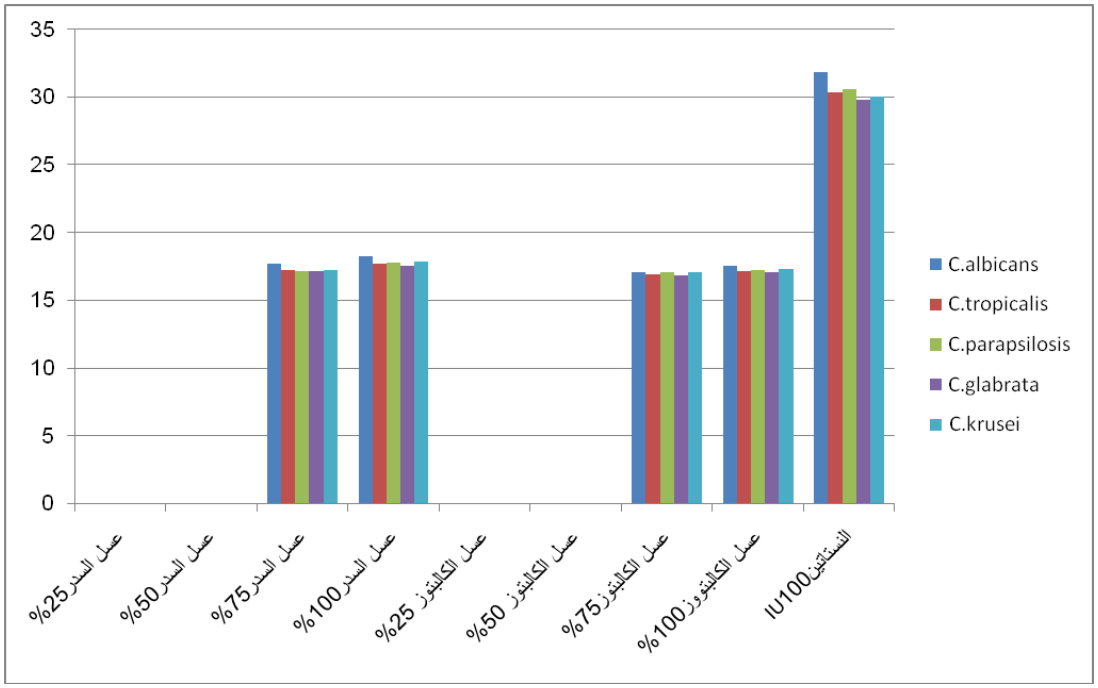
التاثير البايلوجي لانواع العسل المستخدم
أ- التحليل النوعي للعسل
اظهرت نتائج تحليل العسل بنوعيه (عسل السدر و عسل الكالبتوز) ان كلا النوعين طبيعيين و خاليين من الغش و يمكن ان يستخدما في هذه الدراسة الجدول(5) و هذه النتائج تتفق مع (9). و يعتبر الكشف عن المكونات الكيميائية مثل السكروز (Sucrose) و البرولين (Proline) و البروتين الكلي (Total protien) كذلك بعض الصفات الفيزيائية و اهمها الPH من اهم الطرق المتبعة لتقييم الفعالية البايلوجية للعسل حيث ذكر (2) ان العسل التايلندي Apis Dorsata) اكثر كفاءة من العسل النيوزلندي
(Apis Mellifera) في تثبيط نمو الاحياء المجهرية لان محتوى البرولين فيه اعلى من العسل النيوزلندي و كذلك لانه اكثر حامضية من العسل النيوزلندي ، و كذلك اشار (13) ان المحتوى البروتيني للعسل و بشكل خاص البروتينات Flavone pinocembrines, Flavonol galangin ,Cafeic acid phenethylمهم جدا في فعالية العسل البايلوجية حيث ان هذه البروتينات تثبط عمل الانزيمRNA Polymeraseالبكتيري ، و كذلك ذكر (8) ان هذه البروتينات لها القدرة على زيادة نفاذية الغشاء البلازمي و بذلك تمنع عملية بناء(ATP) .

جدول (5) الصفات الفيزياوية و الكيمياوية لنوعي العسل المستخدمين في الدراسة

انواع العسل	الصفات الكيميائية والـPH						
	Proline mg/k	Protein mg/k	Invert sugar g/100g	Sucrose g/100g	Total sugar g/100g	Hydroxy methy1 fur fural mg/k	PH
عسل السدر	□□□□□	□□□□	□□□□□	□□□	□□□□□	□□□□□	□□□
عسل الكالبتوز	□□□□□	□□□□	□□□□□	□□□□	□□□□□	□□□□□	□□□

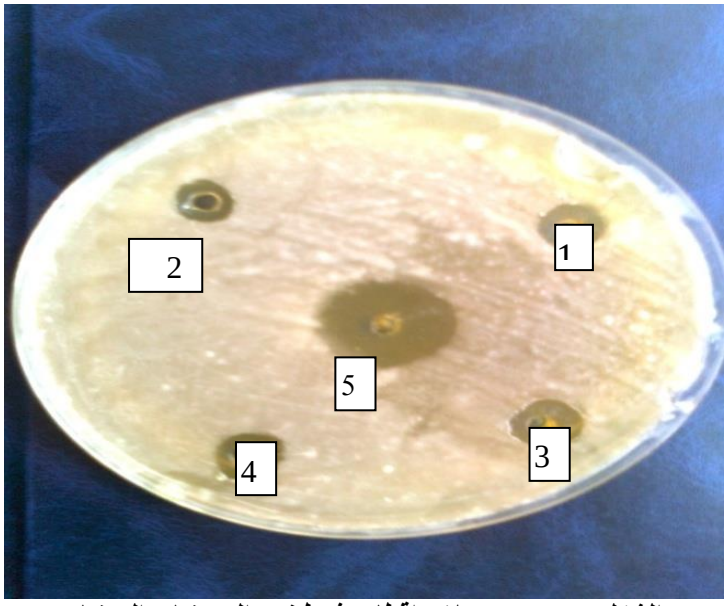
ب- طريقة الانتشار بالحفر AGAR WELL DIFFUSION METHOD

استخدم الماء المقطر في تحضير التراكيز المختلفة 25%□ □ 50% □□ 75% لكلا نوعي العسل (عسل السدر و عسل الكالبتوز) و كذلك في اذابة المضاد الفطري (NYSTATIN) حيث اتضح ان الماء المقطر لا يؤثر في كفاءة العسل و المضاد الفطري □ و يبين□الشكل (2) والشكل (3) معدلات اقطار مناطق تثبيط نمو خميرة C .SPECIES الناتجة من استخدام المضاد الفطري بتركيز IU 100و نوعي العسل بتركيز 25% □ 50% □ 75% □ 100%□□□□□ (طريقة الانتشار بالحفر) اذ ظهر ان المضاد الفطري ثبط نمو خميرة المبيضات البيضاء بنسبة 100% و هذه النتيجة تتفق(14)□ في حين كانت التراكيز 25%□ 50% غير مؤثرة في نمو المبيضات البيضاء و كانت التراكيز 75%□ 100% هي المؤثرة لكلا نوعي العسل و بنسبة 100% و لكن بافضلية نسبية لعسل السدر شكل (3)لان عسل السدر له محتوى من البروتينات و البرولين و السكريات اعلى من عسل الكالبتوز و كذلك حامضي اكثر من عسل الكالبتوز وهذه النتيجة تتفق مع (9) و (2) □



الشكل (2) معدل أقطار تثبيط نمو أنواع المبيضات لتراكيز العسل المختلفة ومضاد النستاتين

**** تم قياس أقطار تثبيط النمو بوحدة mm**
قيمة LSDعند مستوى أحتمال 5% بين انواع المبيضات 0.19
قيمة LSDعند مستوى أحتمال 5% بين تراكيز نوعي العسل المختلفة و مضاد النستاتين 0.19



الشكل (3) يبين معدلات اقطار تثبيط نمو المبيضات البيضاء

1- عسل السدر بتركيز 75%
2- عسل الكالبتوز بتركيز 75%
3- عسل السدر بتركيز 100%
4- عسل الكالبتوز بتركيز 100%
5- مضاد النستاتين بتركيز 100 وحدة دولية International Unit (IU)

وعليه فاننا من خلال النتائج التي تم ذكرها يمكن ان نستنتج ان هنالك عدة انواع من خميرة المبيضات يمكن ان تسبب مرض السلاق الفموي وان العسل الطبيعي الخالي من أي شوائب ممكن ان يكون علاجاً طبيعيا لداء المبيضات وخصوصا عسل السدر لفعاليته البايلوجية العالية في المختبر ضد انواع المبيضات .
واننا نوصي باجراء دراسات اوسع حول تاثير العسل على انواع المبيضات تشمل هذه الدراسات دراسات وراثية وفسلجية حول تاثيره بالاضافة الى استخدام الطرق الوراثية الحديثة لتحديد التاثير الفعلي للعسل .

Test of effect of different concentration of natural hony *Candida* species isolated from children were infected by oral thrush

Niran obaid jassim
AL-Qadissia University/College of Science
Biology Department

Nabeel Ibrahim Nasser
AL-Qadissia University/College of Science
Biology Department

Abstract

During the period between November 2011 to January 2012 examined 113 swabs from children with oral thrush for the purpose of investigating the species of Candida that causing for this disease , the children was (71) male (63%) and (42) female (37%) . Has also been tested the biological activity for two types of honey (Sidr honey and Eucalyptuse honey) in the inhibition of growth of the isolated species .

Five species of *Candida* was isolated is ***Candida albicans* (50.44%) , *C. tropicalis* (19.46%) , *C. parapsilosis* (15.04%) , *C. krusei* (12.38%) and *C. glabrata* (2.15%) .**

Results of twsting the activity honey user show that the actual impact of both types of honey were at concentration 75% and 100% compared with the control treatment and the treatment of antifungal (Nystatin) , and the Sidr honey hada bigger activity than Eucalyptuse honey in the inhibition of growth of Candida species isolated .

المصادر

1. **Batool, S.N.; Albollah, R. and Fereshteh, M.(2011). Prevelence of Candida species in the oral cavity of patient with periodenititis. African J. Biotech. Vol. 10(15),Pp.2987-2990.**
2. **Chanpen, C.(2009). Proprties and antimicrobial activity of Apis Dorsata hony from Thailand. Pak. Med. Sci. Vol. 25 No. 2313-318.**
3. **David, E.; Stephen, D.; Helen, A.; Rosemary, H. and Roben, B.(2007). Description Of Medical Fungi. Second Edition.**
4. **Hamester, M.; Lilian, W.J.B. and Alexander, M.F.(2010). Incidens of Candida spp. In oral cavity of elderly with removable total or patial, dental prosthesis in the city of Coronel Freites , state of Santa Catarina , Brazil. Rev. Panam. Infectol; 12(1) : 17-22.**
5. **Haylen, G.G.; Evelyn, G.M.; Olga, Z.; Maria, L.C.; Sofia, R.V.; Sandra, R. and Luz, M.(2007). Oral candidiasis in children and adolescents with cancer. Identification of Candida species. Med. Oral Patol. Oral Cil. 1,12(6), Pp 23-419.**
6. **Martin, M.V.(1999). The use of fluconazol and itraconazol in the treatment of Candida albicans infections :a review. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44: 429-37.**
7. **Mirzoeva, O.K.; Grsjanin, R.N. and Calder, P.C.(1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth , membrane potential and motility of bacteria. Microbial res. 152:239-46.**

8. **Mondello, F.; Deberandis, F. and Girolamo, A.(2003). In vitro and in vivo activity of tea tree oil against azol- susceptibile – resistant human pathogenic yeasts. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44: 429-37.**
9. **Muhammed, G.; Farida, I.; Shazia, R.; Sara, A.; Sagjid, M.; Zahid, A. and Ghazal, K.(2010). Quality assessment antimicrobial activity of various honey types of Pakistan. African J. Biotech. Vol. 9(41),Pp.6902-6906.**
10. **Noman, M.; Faid, M.; and Chakib, EL.A.(2004). Antimicrobial activities of natural honey from aromatic and medicinal plants on antibioresistat strains of bacteria. Internationational J. Agriculture Biology 1560-8530 06-2-289-293.**
11. **Nothan, P.; Law, E.J. and Murph, D.F.(1978). A laboratory methods for selection of topical antimicrobial agents to treat ifected burn wounds. J. Burns, 4:177-187.**
12. **Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. and Jones, R.N.(2000). Ternds in antifungal susceptibility of Candida spp. Isolated from perdiatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. J. Clin. Microbial., 40:852-6.**
13. **Takaisi, N.B. and Scjoncer, H.(1994). Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propole provenace. Planta Med. 60:222-7.**

14. **حسين ، رائد علي.(2011). مقارنة التغيرات الحيوية والجزيئية لبعض انواع خميرة *Candida* (الحساسة والمقاومة) لبعض المضادات الفطرية. اطروحة دكتوراه /كلية العلوم - جامعة الكوفة.**

15. **الشبلي، ماجدكاظم عبود(2006).تأثير العزلات السريرية لخميرة المبيضات Candida spp : دراسة بايلوجية و نسيجية مرضية في محافظة الديوانية. أطروحة دكتوراه / كلية التربية – جامعة القادسية.**