دراسة مقاومة بعض العزلات السريرية لخميرة المبيضات البيضاء *C.albicans* لمضادات الازول وعلاقتها بظاهرة رجوع النمو

أ.د.عدنان حمد عبيد الحمداني [1] وحيدر عبد الحسين عباس[2]
1-كلية الطب / جامعة القادسية
2- كلية التربية / جامعة القادسية

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى للكشف عن مقاومة خميرة المبيضات البيضاء*C.albicans* لمضادات الازول وعلاقته بنشوء عزلات مقاومة اوظاهرة رجوع النمو Trailing growth لهذه الخميرة عند أختبار حساسيتها الدوائية تجاه بعض مضادات الازول (الفلوكونازول والكيتوكونازول) .

تم جمع 120 عينة من المرضى ولكلا الجنسين وبأعمار مختلفة يعانون من داء السلاق الفموي ، داء المبيضات البولي التناسلي الفطري والتهابات المعدة الفطري الذين راجعوا المستشفى العام ومستشفى النسائية والاطفال التعليميان في محافظة الديوانية للمدة من كانون الاول /2012 ولغاية شباط / 2013.

أظهرت نتائج العزل والتشخيص أن نسبة خميرة المبيضات البيضاء *C.albicans* (47.05%) مقارنة بالانواع الاخرى بينما أظهرت نتائج فحص الحساسية الدوائية بطريقة الانتشار بالاقراص ان هناك نسبة مقاومة لمضاد الفلوكونازول (38.89 %) وان العزلات التي حدث بها رجوع للنمو بنسبة (55.56 %). أما بالنسبة للمضاد الفطري الكيتوكونازول فأن عدد العزلات المقاومة كانت (27.78 %) وقد وجد فقط (38.89 %) من العزلات قد حصل بها ظاهرة تراجع بالنمو .اما المضاد الكلوتريمازول كان الاكثر تاثيراً في نمو *C.albicans* وأن العزلات المقاومة كانت نسبتها (5.56%) والتي ظهرت بها ظاهرة التراجع كانت نسبتها (8.33 %) وقد أظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية (0.05 > P).

أظهر أختبار تحديد التركيز المثبط الادنى لمضاد الفلوكونازول تجاه عزلات الخميرة وان ظاهرة اختزال النمو حدثت عندما كانت قيم MIC ≥ 8 مايكروغرام /مل بعد حضن العزلات لمدة 24 ساعة ، بينما عند أستمرار الحضن لمدة 48 ساعة حدث الاختزال عندما MIC ≥ 64 مايكروغرام /مل للمضاد الفطري الفلوكونازول . وقد أظهر التحليل الاحصائي بين العزلات المختبرة عند الحضن خلال 24 ساعة وجود فرق معنوي (p < 0.05). بينما بعد الحضن 48 ساعة لايوجد فرق معنوي (P > 0.05) .

واظهرت النتائج أيضاً انه بعد الحضن المضاد الكيتوكونازول وان ظاهرة التراجع بالنمو حدثت عندما كانت MIC≥ 2 مايكروغرام /مل بعد حضن العزلات لمدة 24 ساعة ، بينما عند أستمرار الحضن لمدة 48 ساعة حدثت الظاهرة عند القيم MIC ≥ 8 مايكروغرام /مل وقد أظهر التحليل الاحصائي بعد 24 ساعة من الحضن وبعد 48 ساعة من الحضن لوجود فرق معنوي (p < 0.05).

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

المقدمة Introduction

ان خميرة المبيضات تعد من النبيت الطبيعي (Nomal flora) التي تعيش بشكل مستعمرات متعايشة على الجلد الغشاء المخاطي للفم والمهبل والجهاز الهضمي و الامعاء ويمكن لهذه الخمائر ان تكون ممرضة عندما تتوافر لها الظروف الملائمة كما في متلازمة العوز المناعي (AIDS) وداء السكري وغيرها من الامراض المزمنة التي تقلل من كفاءة الجهاز المناعي (12). وان امراض المبيضات Candidiasis تعالج بالمضادات الفطرية مثل الازول(Azoles) وبشكل خاص الفلوكونازول (Flouconazole) الذي يعد المضاد الرئيسي كدواء وقائي وعلاجي بالحالات الشديدة لداء المبيضات المنتشر(Dessimenated candidaiasis) (13). ويمتلك نشاط عالي ضد *C.albicans* من خلال كبح الانزيم Lanosterol demethylase الذي يعد الانزيم الرئيسي للاركوستيرول Ergosterol في الغشاء البلازمي للخلية الفطرية(33). تعد ظاهرة trailing growth لوصف النمو المتراجع والمقاومة لعزلات من *C.albicans* الذي يظهر عند معاملة هذه العزلات بالتراكيز العالية للمضادات الفطرية الذي يكون اعلى من التركيز الادنى المثبط للنمو MIC وخاصة المضادات الفطرية الازول هذه المضادات (fluconazole و itraconazole و Ketoconazole و Miconazole). وان حدوث المقاومة الى المضادات الفطرية مرتبطة بعدد من الجينات التي تشفر التي تشفر لانزيمات لها علاقة بالبناء الحيوي للاركوستيرول في الغشاء البلازمي للخلية الفطرية ومنها الجين Erg11. والذي يسبب طفرات اعطت للكائن المجهري الانتقائية بوجود المضاد والتي يمكن ان تؤثر على عوامل الضراوة بالكائن المجهري (39 و40).

بالنظر لأهمية هذه الخمائر التي أصبحت حالياً ممرضات أنتهازية وتسبب تهديد خطير لحياة الاشخاص الضعاف مناعياً وظهور سلالات من خميرة *C.albicans* مقاومة لمضادات الازول مما يتطلب أيجاد وسائل دفاعية (علاجية ووقائية) للحد من خطورتها فضلاً عن دراسة أسباب المقاومة لهذه المضادات وخصوصاً ظاهرة النمو المتراجع trailing growth الناتجة من مقاومة خميرة *C.albicans* لمضادات الفلوكونازول والكيتوكونازول. لذا أرتأينا القيام بهذه الدراسة والتي هدفت الى :

عزل وتشخيص خميرة المبيضات البيضاء(*C.albicans*) المقاومة لمضادات الازول (الفلوكونازول والكيتوكونازول) بالطرق المظهرية والكيموحيوية من عينات سريرية مختلفة وتحديد مديات المقاومة بطريقة الانتشار بالاقراص Disk diffusion method والتخفيف (تحديد التركيز المثبط الادنى للنمو MIC) وعلاقة ذلك بظاهرة النمو المتراجع growth trailing لتلك العزلات.

المواد وطرائق العمل Materials and methods

- جمع العينات collection of samples

تم جمع 120 عينة (40 عينة خروج 40 عينة ادرار و40 مسحة فموية) من مرضى اعمارهم (1-50) سنة لكلا الجنسين يعانون من داء السلاق الفموي ، داء المبيضات البولي والتهابات المعدة والامعاء الذين راجعوا المستشفى التعليمي العام ومستشفى النسائية والاطفال في محافظة والديوانية. للمدة من كانون الاول 2012 ولغاية اذار 2013 .

- عزل وتشخيص خميرة المبيضات البيضاء *Candida albicans*

زرعت العينات على وسط السابروید دكستروز أكار(Sabouraud Dextrose Agar) المضاف له الكلورومفينكول (250 مايكروغرام / مل) وبدرجة حرارة 37 م من 72 24- ساعة . وبعد ظهور المستعمرات النامية على الوسط شخصت العزلات النامية بأجراء

الفحص المجهري للمستعمرات وذلك بأخذ جزء منها بوساطة الناقل الحلقي ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة وثبتت باللهب وصبغت بصبغة كرامGram Stain وصبغة اللاكتوفينول أزرق القطن Lactophenol cotton blue Stain ، ثم بعد ذلك أخذ جزء من المستعمرات التي أظهرت نمو على وسط SDA وزرعت على وسط أنتقائي (الكروم اكار Chrom agar) وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 72 ساعة مع الفحص اليومي للبحث عن اللون الاخضر الفاتح الذي هو اللون المثالي *C.albicans* وبعد ذلك تم اعادة زرع العينات على SDA (41). ثم بعد الاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرات الفطرية النامية على هذه الاوساط تم أجراء بعض الاختبارات التشخيصية لخميرة المبيضات البيضاء *C.albicans* مثل تكوين الانبوب الجرثومي germ tube formation وكذلك تكوين الابواغ الكلاميدية Chlamydospores formation وكذلك القدرة على مقاومة السايكلوهيكسامايد ودرجات الحرارة العالية (45 م).

الاختبارات الكيموحيوية التوكيدية بأستخدام نظام HiCandida system

أستخدم لغرض التشخيص الدقيق لعزلات المبيضات وهذا النظام التشخيصي يتألف من(12) اختبار وهي : (Urea, Melibiose, Lactose, Maltose, Sucrose,Galactose, Cellobiose, Inositol, Xylose, Dulcitol, Raffinose, trehalose). وأجري هذا الفحص كالتالي :-

1) تحضير اللاقحة inocula :

تم أخذ 2-4 مستعمرات من الخميرة بواسطة الناقل الجرثومي (Loop) وأضيفت الى أنبوبة تحوي 5 مل من المحلول الفسلجي الملحي لعمل العالق الخميري بحيث يكون العالق الخميري مساوي الى الانبوبة رقم 0.5 من محلول ماكفرلاند والتي تعادل 1.8×10^8 خلية / مل.

2) الاختبار :

مايكروليتر من العالق الخميري الى كل

- أجري 50حفرة من شريط الاختبار.

الاختباربأضافة

-ثم حضن بدرجة حرارة (37 م) لمدة 24-48 ساعة ، تم قورنت النتائج بالاعتماد على تعليمات الشركة المنتجة.

أختبار الحساسية الدوائية للمضادات الفطرية

1-طريقة الانتشار بالاقراص

أجريت هذه الطريقة وفقاً الى (42) ، أذ بعد تنشيط العزلات المشخصة على وسط السابرويد دكستروز أكار SDA ، أخذت مستعمرات مفردة بواسطة الناقل البكتيري ومزجت في أنبوبة أختبار حاوية على 5 مل من المحلول الفسلجي لضبط العكورة مساوية الى أنبوبة محلول مكفرلاند (0.5) والتي تعادل 1.8×10^6 بعدها أخذ 0.2 مل من العالق ونشر على وسط المولر هنتون أكار وبشكل متجانس بعدها تركت الاطباق نص ساع بدرجة حرارة المختبر ثم وضعت أقراص المضاد بتماس مع الوسط ثم حضنت درجة حرارة(37م) ولمدة 24- 48 ساعة . وقرئت النتائج بعد ذلك من خلال قياس أقطار تثبيط النمو بالمليميتر بواسطة مسطرة رقمية .

2-طريقة تحديد التركيز الادنى المثبط (MIC)

اجري أختبار تحديد التركيز المثبط الادنى للنمو (MIC) للمضادات الفطرية باستخدام طريقة التخفيف بالمرق المغذي Broth dilution methods ،والتي وصفت من قبل (43) والمحورة من قبل (44) وأستخدمت المضادات الاتية بالتراكيز الموصوفة من قبل (6):

- الفلوكونازول بتركيز من 0.125 الى 64 ملغم /مل .
- الكيتوكونازول بتركيز 0.03 الى 16 ملغم /مل .

تحضير المضاد الفطري الفلوكونازول في الوسط السائل

- أخذ 10ملغم من المضاد وذوب في 1مل من الداي مثيل سيلفوكساييد (DMSO) واعطى

تركيز 10.000ملغم /مل كمحلول خزين Stock solution وثم اخذ 1 مل من المحلول الخزين وأضيف الى 14.63 مل من الوسط السائل (SDB) ليعطي تركيز نهائي 64 ملغم /مل.
- حضرت سلسلة من التراكيز في (10) انابيب اختبار تم تعليمها من التركيز 0.125 الى 64 ملغم /مل وهي (, 4, 2, 1 ,0.5 ,0.25,0.125 64 , 32 16 , 8 ملغم/مل)
-نأخذ 5 مل من الوسط السائل ويضاف في الانبوبة (2) ضمن الانبوبة التي تكون قراءتها (10) مل ، ويصبح 10مل في الانبوبة من التركيز 64 للمضاد الفطري الذي يكون موضوع في الانبوبة (1) ، التخفيف المتسلسل كان ي حضر من وضع 5 مل من الوسط من الانبوبة رقم (1) الى الانبوبة رقم (2) ويستمر التخفيف المتسلسل الى الانبوبة رقم (10) .

تحضير المضاد الفطري الكيتوكونازول في الوسط السائل

- أخذ 5 ملغم من المضاد وذوب في 1مل من DMSO واعطت تركيز 5000 ملغم /مل كمحلول خزين Stock solution، وثم اخذ 1 مل من المحلول الخزين ويضاف الى 30.25 مل من الوسط السائل (SDB) حيث يعطينا تركيز نهائي 16ملغم /مل.
- حضرت سلسلة من التراكيز (10) انابيب اختبار تم تعليمها من التركيز 0.03 الى 16ملغم /مل مثلاً (, 0.25 , 0.125 , 0.06 , 0.03 16 , 8 , 4 , 2 , 1 , 0.5ملغم/مل) .
- نأخذ 5 مل من الوسط السائل ويضاف في الانبوبة (2) ضمن الانبوبة التي تكون قراءتها (10) مل ، ويصبح 10مل في الانبوبة من التركيز 16 للمضاد الفطري الذي يكون موضوع في الانبوبة (1) ، التخفيف المتسلسل كان يحضر من وضع 5 مل من الوسط من الانبوبة رقم (1) الى الانبوبة رقم (2) ويستمر التخفيف المتسلسل الى الانبوبة رقم (10). وبعد ذلك تم قياس النمو بالانبوبة بأستخدام جهاز قياس العكورة Density chek الذي يقيس نمو الاحياء المجهرية بالانبوبة.

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج أن النسبة المئوية لعزل خميرة المبيضات البيضاء هي (70% و 62.5% و 80 %) من العينات المأخوذة من حالات السلاق الفموي والتهابات القناة البولية التناسلية والتهاب المعدة والامعاء على التوالي واظهر التحليل الاحصائي وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05 >P) بين النسب المئوية للعزلات (الجدول 1).

الجدول (1): النسبة المئوية لعزل خميرة المبيضات البيضاء من عينات سريرية مختلفة .

انواع الخمائر	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية للعزلات (%)
C. albicans	**40**	**47.05**
C. dubliniensis	**10**	**11.76**
C. glabrata	**5**	**5.9**
C. krusei	**13**	**15.3**
C.parapsilosis	**7**	**8.23**
C. tropicalis	**10**	**11.76**
المجموع	**85**	**100**

هذه النتائج كانت قريبة لدراسة (1) التي بينت أن النسبة المئوية للعزلات الموجبة المعزولة من الحالات المشار اليها أعلاه هي(**52 % ، 74 % ، 58 %**) على التوالي . وأثبتت الدراسة الحالية أيضاً أن النسبة المئوية لعزلات للخميرة توزعت على الانواع الاتية خميرة *C.albicans* 40/ 85 (47.05%) و *C. dubliniensis* 85/10 (11.76%) و *C.glabrata* 85/5 (5.9%) و *C.krusei* 85/13 (15.3%) و *C.parapsilosis* 85/7 (8.23%) و *C. tropicalis* 85/10 (11.76%) الجدول (2) .

الجدول(2): النسبة المئوية لتوزيع أنواع الخميرة المعزولة من عينات سريرية مختلفة (العدد= 120).

وهذه النتيجة أكدها (2) بدراسته على العزلات مختلفة وكانت *C.albicans* هي الاكثر سيادة

العينات السريرية	عدد عينات الاختبار	عدد العينات الموجبة	%	عدد العينات السالبة	%
السلاق الفموي	**40**	**28**	**70**	**12**	**30**
التهابات القناة البولية-التناسلية	**40**	**25**	**62.5**	**15**	**37.5**
التهاب المعدة والامعاء	**40**	**32**	**80**	**8**	**20**
المجموع	**120**				

- **قيمة مربع كاي الجدولية(X^2)= 5.99**
- **قيمة مربع كاي المحسوبة(X^2) =8.43**
- **يوجد فرق معنوي عند مستوى أحتمالية P < 0.05**

السريرية للمبيضات والتي اخذت من مصادر بنسبة مئوية 66.5% تلاه *C. tropicalis* بنسبة

14% ، في حين شكلت باقي الأنواع نسبة 19.5 % وهـي *C .krusei* ، *C .parapsilosis* ، *C.glabrata* و*C.dubliniensis* . بينما أشارت نتائج (3) الى عزل *Candida albicans* بنسبة 50.44% تلته الانواع *C. tropicalis* بنسبة 19.46% و *C.parapsilosis*بنسبة 15.05% و *C. krusei* بنسبة 12.38% و *C. glabrata* بنسبة 2.15% .

وبينت دراسة (1) ان العزلات التي اخذت من السلاق الفموي والادرار والمسحات المهبلية تمثلت بعزل *C.albicans* و*C. dubliniensis* 92/58 (63%) و *C.glabrata* 92/13 (14.2%) و*C. krusei* 92/8 (8.69%) و *C. tropicalis* 92/7 (7.6%). وكشفت نتائج (7) ان المبيضات البيضاء والتي عزلت من حالات سريرية مختلفة كانت نسبتها 68.7%. بينما أشار (8) الى ان النوع *C.albicans* شكل النسبة الاكبر من الانواع المعزولة تلته الانواع *C.tropicalis* و *C.parapsilosis* و *C.krusei* و *C.glabrata* .

أما في دراسة (4) فقد عزل خمسة انواع عائدة لجنس المبيضات من تجويف الفم و جاء النوع *C.albicans* في مقدمتها و تلته الانواع التالية *C. tropicalis* و *C.parapsilosis* و *C.krusei* و *C. rugosa* . بينما (9) فقد وجد ان العزلات التي أخذت من حالات الاصابة بالاسهال كانت *C.albicans* تشكل النسبة الاكبر للاصابة وبنسبة (35.6 %).

وان سبب سيادة وأنتشار النوع *C.albicans* عن غيرها من أنواع المبيضات هو قدرتها على التحول الشكلي Dimorphism الذي يمكنها من التحول من شكل الخميرة الى الشكل الخيطي وبالعكس عند أصابتها للآنسان والحيوان فضلاً عن أمتلاكها العديد من عوامل الضراوة منها قدرته على أنتاج أنزيم phospholipiase الذي يحلل الدهون المفسفرة وكذلك مقاومة درجات الحرارة العالية فضلاً عن مقاومته للمضادات الفطرية .

التشخيص المظهري

ان هذا الفحص حيث يتم الفحص من خلال ملاحظة شكل المستعمرات على وسط SDA وقد ظهرت بلون ابيض كريمي ، ملساء وتكون ناعمة والمستعمرات تكون كروية او بيضوية. وان نتيجة الفحص المظهري تتفق مع الباحث (3). وبعد ذلك يأتي **الفحص المجهري** حيث يتم أخذ مستعمرات مفردة من الفطر على الشريحة الزجاجية ويتم صبغها بصبغة كرام او صبغة اللاكتوفينول الزرقاء حيث تظهر الخلايا تحت المجهر ذات شكل أهليليجي الى كروي او يكون بيضوي كما في الشكل(1) وان هذه النتيجة تتفق مع (10).

أظهرت النتائج أن من مجموع (40) من عزلات المبيضات البيضاء المختبرة على وسط كروم اكار كانديدا لمدة 24-48 ساعة بدرجة 37 م ، فقط 24 (60%) من العزلات اظهرت مستعمرات بلون اخضر فاتح، بينما 16 (40 %) أظهرت لون اخضر عشبي (شكل 2) وهذه النتائج متماثلة مع دراسة (11)، وقد يعزى ذلك الى ان هذه المستعمرات ربما تعود الى النوع *C.dubliniesis* والتي تكون صفاتها المظهرية متماثلة الى حد كبير مع و التي لا يمكن التمييز بينهما ألا بالطرق الجزيئية في بعض الاحيان (1) .

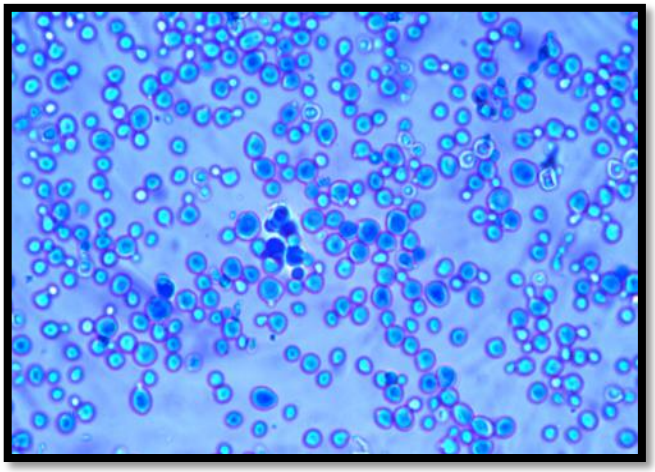
. وكذلك أختبار بوسط التبغ لغرض التفريق مابين *C. albicans* و C.*dublinances* حيث ان التشخيص يعتمد على ظهور الحواف من عدم ظهورها بالفطر كما في الشكل (3) . وان هذه النتيجة متماشية مع الباحث (14). ولغرض التأكيد أكثر تم استخدام عدة **API *Candida*** والذي يعطي نتائج أكثر دقة في تشخيص النوع *C. albicans*. وقد كانت نسبتها 35 (87.5 %) أعطت نتيجة أيجابية. وهذه النتيجة قريبة لدراسته (1) حيث شخصت *C. albicans* بنظام APi candida وكانت نسبتها 58 /92 (%) . 63 وتم أخضاع عزلات *C. albicans* الى

عدد من الاختبارات الفسلجية والكيموحيوية ، والتي تتضمن تكوين أنبوب الانبات germ tube الذي يكون من الصفات المهمة لعزلات *C. albicans* و*C . dublinances* كما في الشكل (4) وأظهرت النتائج أن عدد العزلات التي انتجت أنبوب الانبات أن 36 (90%) من العزلات كانت قادرة على إنتاج أنبوب جرثومة وأعطت نتيجة ايجابية. هذه النتائج تتفق مع (1) التي اظهرت نتائج دراستها ان نسبة تكوين انبوب تاثير مستخلص الشاي الاسود في نمو النوع *C.albicans* فوجد ان هذا المستخلص له تاثير كبير في نمو هذا النوع. دراسات سابقة أشارت الى أن العوامل الوراثية تلعب دوراً في أنتاج الابواغ الكلاميدية وهذا قد يوضح سبب أختلاف العزلات السريرية في قدرتها على أنتاج الابواغ الكلاميدية (16).

وتمتلك المبيضات البيضاء القابلية على النمو بدرجة حرارة 45 م و كذلك تتفق مع (1) التي قادرة على مقاومة التأثيرات الضارة الخارجية (17) . وكذلك قابليتها على النمو في وسط السابرويد دكستروز أكار (SDA) الذي يحتوي على السايكلوهيكسمايد، إذ اظهرت نتائج دراسة الباحث (4) ان النوع *C.albicans* فقط كان مقاوم للمضاد و اعطى نتيجة موجبة لهذا الاختبار إذ اظهرت نتائج دراساتهم ان النوع *C.albicans* فقط كان مقاوم لهذا المضاد الانبات لخميرة المبيضات البيضاء كانت 61(66.30%) بينما 31(33.69%) غير قادرة على تكوينه للانواع الاخرى . وأظهرت النتائج أن 32 عزلات من 40 (80%) كانت ايجابية لإنتاج الابواغ الكلاميدية ، وهذه النتيجة تتفق (3) الذي اظهرت نتائج دراسته ان فطر المبيضات البيضاء يكون قادر على تكوين الابواغ الكلاميدية على وسط الشاي الاسود . وقام(15) بدراسة

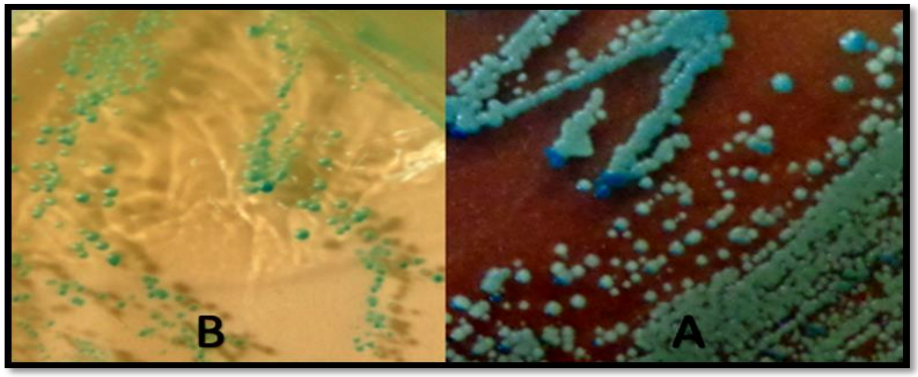
اظهرت نتائج دراستها ان عزلات *C.dublinensis* غير قادرة على النمو بدرجة حرارة 45 م اما عزلات المبيضات البيضاء *C. albicans* تستطيع النمو بتلك الدرجة . ويعزى سبب تحمل *C.albicans* النمو في درجة حرارة 45 م الى عوامل وراثية مرتبطة بجينات عوامل الضراوة ومنها قدرتها على تكوين أبواغ الكلاميدية

واعطى نتيجة موجبة لهذا الاختبار، ويعد مضاد السايكلوهكسامايد من المضادات التي تعمل على تثبيط عملية البناء البروتيني في الخلايا الفطرية ، أذ أن خميرة *C.albicans* لها القدرة على المقاومة ، تأثير هذا المضاد بألية غير واضحة لحد الان لكن يعتقد أنها تعتمد على التخلص من المضاد بطريقة efflux pump وطرده خارج الخلية (18).



شكل (1) خلايا النوع *C.albicans* المصبوغة بصبغة اللاكتوفينول(40x)

(⟶ يشير الى خلايا كروية ذات تبرعم)



الشكل (2) مستعمرات خميرة المبيضات البيضاء النامية على وسط الكروم –أكار (A) مستعمرات ذات لون أخضر فاتح (B) مستعمرات ذات لون أخضر عشبي .

شكل (3) مستعمرات الخميرة النامية على وسط أكار التبغ
***C.albicans*(A)   *C.dubliniesis* (B)**
(⟵ يشير الى البروزات الهدبية في حافة المستعمرة)

الشكل (4) الابواغ الكلاميدية لخميرة *C.albicans* (40x)
(A) وسط مسحوق الذرة. (B) وسط الشاي الاسود.
(⟵ يشير الى الابواغ الكلاميدية)

أختبار الحساسية الدوائية للمضادات الفطرية

1- طريقة الانتشار بالاقراص   Disk diffusion method

تم أختبار (36) عزلة من خميرة *C. albicans* وأظهرت نتائج الدراسة ان خميرة *C. albicans* كانت حساسة sensitive لمضادات الازول على وسط المولر هنتون حيث

أن بعد الحضن لمدة 24 ساعة كانت النتيجة ان الفطر حساس لهذه المضادات بينما عند استمرار الحضن لمدة 48 ساعة لوحظ ان مناطق تثبيط النمو zone of growth inhibion اصبح بها نمو ضعيف ومقاومة متوسطة Moderate senesitive لهذه المضادات ، والجدول الذي يوضح (5) يبين النسبة المئوية والعدد للمضادات الفطرية.

حيث كشفت هذه الدراسة ان هناك نسبة مقاومة لمضاد الفلوكونازول Fluconazole 14 /36 (38.89 %) بمنطقة تثبيطها (inhibion>26 zone) بتركيز (10mg)، بالاضافة لذلك كانت العزلات الحساسة 36/2(5.56 %) بمنطقة تثبيط قطرها (zone inhibion >29) وقد وجد ان اغلب العزلات كان قد حدث بها اختزال للنمو بوجود هذا المضاد وبنسبة 20 /36(55.56 %) . كانت المقاومة نسبة لمضاد الايتروكونازول Itraconazole 9/ 36 (25 %) وبمنطقة تثبيط قطرها (zone inhibion <17)، وقد وجد بان العزلات الحساسة لهذا المضاد كانت نسبتها قليلة 36/5 (13.89 %) ، واكثر العزلات بوجود هذا المضاد حدث بها اختزال للنمو وبنسبة 22 (61.11 %). بينما اظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضاد الفطري الكيتوكونازول Ketoconazole حيث كان نسبة العزلات المقاومة لهذا النوع 10(27.78 %) بمنطقة تثبيط (zone inhibion >25) ، وان العزلات الحساسة كانت نسبتها 12 (33.33%) بمنطقة تثبيط(zone inhibion <28)، وقد وجد انه فقط 14 (38.89 %) من العزلات كان قد حصل بها ظاهرة أختزال للنمو .على اي حال ، فأن المضاد الفطري الكلوتريمازول Clotrimazole اغلب تأثيره على الفطر بحيث كانت نسبة الحساسية لهذا المضاد عالية 31(86.11%) بمنطقة تثبيط (zone inhibion <22) وان تركيز المضاد كان (10mg) ، وأن العزلات المقاومة والتي ظهرت بها ظاهرة الاختزال كانت نسبتها على التوالي 2 ، 3 (5.56% ، 8.33 %) كما هو موضح بالجدول (3) .

الجدول (3): النسبة المئوية للحساسية الدوائية لعزلات خميرة *C.albicans* تجاه بعض المضادات الفطرية المختبرة (N=36).

نوع المضاد	الاختزال (T)	%	المقاومة (R)	%	الحساسية (S)	%
Fluconazole	**20**	**55.56**	**14**	**38.89**	**2**	**5.56**
Itraconazole	**22**	**61.11**	**9**	**25**	**5**	**13.89**
Ketoconazole	**14**	**38.89**	**10**	**27.78**	**12**	**33.33**
Clotrimazole	**3**	**8.33**	**2**	**5.56**	**31**	**86.11**
قيمة مربع كاي الجدولية (X^2) = 12.59						
قيمة مربع كاي المحسوبة (X^2) = 64.09						
يوجد فرق معنوي عند مستوى احتمالية P< 0.05						

ومتماشية مع (5) من حيث معدلات التثبيط للخميرة حيث ثبط الكيتوكونازول (90 %) من العزلات ، بينما المضاد الفلوكونازول ثبط (25 %). وانها متماشية مع (19) من حيث ان المضادات Ketoconazole وClotrimazole و Itraconazole قد بلغت نسبة تثبيطها للعزلات 81 % و 65.4 % و 61.5% ، وان المضاد الفلوكونازول يكون اقل فعالية بنسبة 43.3 %. وان ظاهرة الاختزال التي تحدث بعزلات *C.albicans* هي أكثر تكراراً

مع مضادات الازول(19). وقريبة لدراسة 20 (11,) الذي قام باجراء اختبار الحساسية بطريقة الانتشار بالاقراص حيث توصل الى ان الاختزال بالنمو يكون عبارة عن نمو خلفي يمحي منطقة التثبيط .من حيث ان عزلات *C.albicans* أظهرت ظاهرة الاختزال بالنمو بوجود هذه المضادات.

2- تحديد التركيز الادنى المثبط للنمو (MIC) Minimum Inhibitory concentrations

الجدول (4) يوضح النسبة المئوية والعدد لعزلات *C.albicans* المقاومة والحساسة وفقاً الى مدى التركيز الادنى المثبط للنمو . وأن عدد العزلات التي تم أجراء فحص الحساسية الدوائية لها بطريقة التخفيف بالمرق المغذي هي (30 عزلة) ،حيث كانت نتائج الفحص MIC للمضاد الفلوكونازول انه بعد 24 ساعة من الحضن كانت التراكيز (64 ، 32 ، 16 ، 8 مايكروغرام /مل) الاكثر تثبيطاً للفطر . وان العزلات الحساسة للتركيز 64 مكغم/مل عددها 21 (70%) ، وبالتركيز 32 كانت نسبة العزلات الحساسة 18 (60%) ، بينما العزلات الحساسة للتركيز 16 نسبتها 17 (56.67 %)، وان التركيز 8 نسبة العزلات الحساسة (50 %) . واما بالنسبة للعزلات الاكثر مقاومة كانت بالتراكيز (0.128 ,2,1,0.5 مايكروغرام /مل) كماهو موضح بالجدول . واظهرت النتيجة انه بعد الحضن لمدة 48 ساعة مع الفلوكونازول حيث ان العزلات بالتراكيز(16 ,32, 64 مايكروغرام /مل) حيث زادت نسبة مقاومة الفطر للمضاد بهذه التراكيز .وان الجدول (4) يوضح الاختلاف بعدد العزلات المقاومة و الحساسة بين 24 -48 ساعة . وقد لوحظ ان التراكيز (8, 16, 32, 64 مايكروغرام /مل) كان الفطر حساس لهذا المضاد وبهذه التراكيز (0.128 ,0.5 مايكروغرام /مل) كانت مقاومة الفطر عالية ، والنتيجة تدل على ان استمرارية الحضن لمدة 48 ساعة حيث ينمو الفطر بهذه التراكيز لكن يكون نمو جزئي بالتالي فان ظاهرة اختزال النمو تحدث عندما يكون تركيز المضاد الفلوكونازول عالي.حيث وجد الاختزال حدث عندما (MIC ≥ 8 مايكروغرام/مل) بعد حضن العزلات لمدة 24 ساعة ، بينما عند أستمرار الحضن لمدة 48 ساعة حدث الاختزال عندما (MIC ≥ 64 مايكروغرام/مل) للمضاد الفطري الفلوكونازول . وقد أظهر التحليل الاحصائي بالنسبة لمجموعة 24 ساعة انه يوجد فرق معنوي عند مستوى أحتمالية ($p < 0.05$). بينما مجموعة 48 ساعة لايوجد فرق معنوي عند مستوى أحتمالية (0.05 > P).

الجـدول (4) : عـدد العـزلات المقاومــة الحساســة والمتراجعــة النمــو ونسـبتها المئويــة مــن خميـرة *C.albicans* للمضــاد الفطــري الفلوكونــازول بعـد 24 -48 ســاعة مــن الحضــن فــي

تركيز المضاد مايكروغرام/ مل	الحضن في 24 ساعة						الحضن في 48ساعة					
	(R)	%	(T)	%	(S)	%	(R)	%	(T)	%	(S)	%
64	6	20	3	10	21	70	14	46.67	15	50	1	3.33
32	7	23.33	5	16.67	18	60	16	53.33	14	46.67	0	0
16	9	30	4	13.33	17	56.67	17	56.67	12	40	1	3.33
8	9	30	6	20	15	50	18	60	11	36.67	1	3.33
4	10	33.33	6	20	14	46.67	21	70	9	30	0	0
2	12	40	8	26.67	10	33.33	21	70	9	30	0	0
1	15	50	7	23.33	8	26.67	22	73.33	8	26.67	0	0
0.5	13	43.33	8	26.67	9	30	24	80	6	20	0	0
0.25	16	53.33	8	26.67	6	20	25	83.33	5	16.67	0	0
0.128	15	50	8	26.67	7	23.33	26	86.67	4	13.33	0	0

ساسة ، T= النمو المختزل أو رجوع النمو ، R = مقاومة).
قيمة مربع كاي الجدولية (X^2) = 28.87.
قيمة مربع كاي المحسوبة (X^2) = 34.14 .
يوجد فرق معنوي ($p < 0.05$)

قيمة مربع كاي الجدولية (X^2) = . 28.87
قيمة مربع كاي المحسوبة (X^2) = 27.52 .
لايوجد فرق معنوي ($P > 0.05$)

درجة حرارة 37 م المأخوذة من عينات سريرية مختلفة.

بينما كانت نتائج الفحص MIC للمضاد الكيتوكونازول انه بعد 24 ساعة من الحضن كانت التراكيز(16 ، 8 ، 4 ، 2 مايكروغرام /مل) الاكثر تثبيطاً للفطر. وان العزلات الحساسة للتركيز(16 مايكروغرام /مل) عددها 27/ 30(90%) ، والتركيز 8 كانت نسبة العزلات الحساسة 28/ 30 (93.33%) ،بينما العزلات الحساسة للتركيز(4) نسبتها 24 / 30 (80 %) ، وان التركيز (2) نسبة العزلات الحساسة 20/ 30 (66.67%) . واما بالنسبة للعزلات الاكثر مقاومة كانت بالتراكيز (0.25, 0.125، 0.06 ، 0.03 مايكروغرام /مل) كماهو موضح بالجدول (10). واظهرت النتيجة انه بعد الحضن لمدة 48 ساعة مع الكيتوكونازول حيث ان العزلات بالتراكيز(4 ، 2 ، 1 ، 0.5 مايكروغرام /مل) حيث زادت نسبة مقاومة الفطر للمضاد بهذه التراكيز . الجدول (5) يوضح الاختلاف بعدد العزلات المقاومة و الحساسة بين 24 - 48 ساعة .

وقد لوحظ ان التراكيز(16 ، 8 ، 4 مايكروغرام /مل) كان الفطر حساس لهذا المضاد وبهذه

التراكيز(1 ، 0.5 ,0.25, 0.125 مايكروغرام /مل) كانت مقاومة الفطر عالية ، والنتيجة تدل على ان استمرارية الحضن لمدة 48 ساعة حيث ينمو الفطر بهذه التراكيز بالتالي فان ظاهرة اختزال النمو تحدث عندما يكون تركيز المضاد مرتفع . بينما المضاد الكيتوكونازول وجد ظاهرة الاختزال حدثت عندما (MIC ≥ 2 مايكروغرام/مل) بعد حضن العزلات لمدة 24 ساعة ، بينما عند أستمرار الحضن لمدة 48 ساعة حدثت الظاهرة عندما (MIC ≥ 8 مايكروغرام/مل) . وقد أظهر التحليل الاحصائي بالنسبة لمجموعة 24 ساعة انه يوجد فرق معنوي عالي عند مستوى أحتمالية ($p < 0.05$). بينما مجموعة 48 ساعة يوجد فرق معنوي عالي جداً عند مستوى أحتمالية ($P < 0.05$) .

الجدول (5): عدد العزلات المقاومة الحساسة والمتراجعة النمو ونسبتها المئوية من الخميرة للمضاد الفطري الكيتوكونازول بعد 24 -48 ساعة من الحضن في درجة حرارة 37 م المأخوذة من عينات سريرية مختلفة.

تركيز المضاد مايكروغرام/مل	الحضن في 24 ساعة						الحضن 48 ساعة					
	(R)	%	(T)	%	(S)	%	(R)	%	(T)	%	(S)	%
16	3	10	0	0	27	90	4	13.33	1	3.33	25	83.3
8	2	6.67	0	0	28	93.33	5	16.67	2	6.67	23	76.6
4	4	13.33	2	6.67	24	80	8	26.67	6	20	16	53.3
2	7	23.33	3	10	20	66.67	10	33.33	7	23.33	13	43.3
1	10	33.33	6	20	14	46.67	11	36.67	13	43.33	6	20
0.5	10	33.33	8	26.67	12	40	12	40	11	36.67	7	23.3
0.25	11	36.67	9	30	10	33.3	14	46.67	12	40	4	13.33
0.128	12	40	10	33.33	8	26.6	15	50	12	40	3	10
0.06	12	40	9	30	9	30	15	50	11	36.67	4	13.33
0.03	11	36.67	8	26.67	11	36.6	16	53.33	12	40	2	6.67
=حساسة ، T= النمو المختزل (رجوع النمو) ، R = مقاومة). قيمة مربع كاي الجدولية (X^2) = 28.87. قيمة مربع كاي المحسوبة (X^2) = 95.73 . يوجد فرق معنوي ($P< 0.05$) .							**قيمة مربع كاي الجدولية (X^2) = 28.87 . قيمة مربع كاي المحسوبة (X^2) =78.03 . يوجد فرق معنوي ($P< 0.05$) .**					

تعد الازولات من المضادات الفطرية الاكثر استخداماً وبنطاق واسع ، وتكون مهمة بمعالجة الاصابات الفطرية السطحية الجلدية (Superficial-cutaneone mycosis) وبشكل خاص الفلوكونازول ،حيث أنه قليل السمية ، وذو وفرة حيوية عالية (Bioavailibilty) في الموقع المستهدف(Target site) في جسم الانسان وهو يمتلك مستوى عالي من الفعالية ضد الخمائر وبالأخص *C.albicans*. وعلى أي حال فأن اغلب مركبات الازول المستخدمة للعلاجات يكون تأثيرها تثبيطي Fungistatic وليس قاتل Fungicidal ، ويكون مبدأ عمل هذه المضادات بشكل متخصص من خلال تثبيط انزيم 14 α demethylase في *C.albicans* ، والانزيم الرئيسي الذي يثبطه الازول 14 α demethylase الذي هو المسؤول عن تحويل Lanosterol الى Ergosterol الذي يكون

المركب الرئيسي بالغشاء البلازمي للفطر (21 و 22) . أوضحت الدراسات السابقة بأن فحص الحساسية الدوائية في المختبر (in vitro) لعزلات *C.albicans* تشكل مشكلة لكونها مرتبطة بظاهرة رجوع النمو Trailing growth (23). وبأنه لايوجد نقطة نهاية تفاعل cut-point مقبولة لمعظم المضادات الفطرية (24). لذلك توجد أختلافات كبيرة في قيم MIC yeast من قبل NCCLS عام 1992، وان المقاومة الى لمضادات الا زول سوف تتطور تدريجياً اثناء العلاج بهذه المضادات (21 و 27). ان المقاومة لمضادات الازول من قبل الخميرة بدأت بالازدياد وسبب المقاومة يرجع الى العلاج الغير الكامل incomplete therapy ، وظهور سلالات مقاومة resistance starin وحث مقاومة العقار لانواع معينة واستعمار واصابة متكررة للكائن المقاوم (28).

مما يؤدي الى حدوث المقاومة العرضية Cross- resistance. أن مضاد الفلوكونازول يستخدم عادة لعلاج داء المبيضات الجلدي– المخاطي (mucocutananeouse candidiasis) وخصوصاً في الضعاف مناعياً (29). وان (5) أشارت الى (25%) من العزلات كانت قد تثبط بوجود الفلوكونازول. أما (30)أشار الى ان عزلات *C.albicans* التي أخذت من المرضى الضعاف مناعياً تكون ذات حساسية منخفضة للفلوكونازول. وانه في حالات التعرض الطويل الامد لمضادات الازول عادة ما تسبب حدوث تغيير بالنمط المظهري وان المقاومة في هذه العزلات لمضاد الفلوكونازول قد تصل الى 35 %. وأعزي السبب الى التعبير المتزايد over expression للمورثات Erg11 ، CDR1 والتي بالتالي تؤدي الى المقومة العرضية لمضادات الازول الاخرى(31 و 32). واشار (34) الى ان 7-10 % من عزلات خميرة *C.albicans* التي أخذت من مصادر عزل مختلفة كانت مقاومة للكيتوكونازول . وان عمل هذا المضاد مشابه للفلوكونازول والتي تكون من خلال زيادة انتاجية المورثات (Erg11 ، Erg3) بين الدراسات المختلفة (25 و 26). لغرض حل هذه المشكلة هذه الدراسات المتعددة أدت الى تطوير وثيقة M27 والمعنونة " الطريقة المرجعية لفحص الحساسية الدوائية للخميرة بطريقة التخفيف بالمرق المغذي Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of

والذي يكون عمله انتقائي للأنزيمات الخلية الفطرية (27). وان (5) أشارت الى ان 50 % من عزلات *C.albicans* كانت مقاومة للكيتوكونازول ، وأظهرت ان بعض عزلات الخميرة مقومة عرضية لمضادات الازول . وفي دراسة ذات صلة بالهند بينت ان المقاومة العرضية للازول لوحظ باربع سلالات من *C.albicans* (7.3%) اثنين منها كانت مقاومة لثلاث أنواع من مضادات الازول (itraconazole و voriconazole و fluconazole) واثنين كانت مقاومة الى نوعين من مضادات الازول (itraconazole و voriconazole) (35) . ولاحظت (36) ان انواع المبيضات التي ابدت مقاومة لاحد مضادات الازول أظهرت مقاومة العرضية للانواع الاخرى من الازولات .

ان الاشخاص الضعاف مناعياً immunocompromised الذين يعالجون بالمضادات الفطرية لفترة طويلة ، سوف يؤدي بمرور الوقت الى تكون سلالات من *C.albicans* مقاومة الى مضادات الازول . وفي المختبر ، فأن النشاط الغير المثبط للفطر بالنسبة للازولات يكون واضح وبسهولة في حالة ظاهرة اختزال النمو في تجربة أختبار التخفيف المتسلسل.(24). وأشار (37) الى ان تحديد نهاية MIC لمعظم مضادات الازول الفطرية من الصعوبة تحديده بسبب طبيعته المثبطة للنمو (fungistatic nature) والذي قد يؤدي الى حدوث اعادة للنمو والمقاومة بعد اجراء فحص الحساسية الدوائية بطريقة التخفيف microdilution methods .

وان اختزال النمو معروف بانه التثبيط الجزئي للنمو والذي يمتد لمدى من تراكيز المضاد الفطري والذي عند اجراء فحص الحساسية للمضادات على الخميرة ، وان هذه الظاهرة جعلت دقة تحديد MIC بصورة مضبوطة تحديدها بعزلات *C.albicans* التي كانت حساسة لمضادات الازول والتي جعلت قراءة نقطة النهاية صعبة وتسبب مشكلة، حيث ان 80 أقل تركيز من المضاد يسبب تثبيط (80 %) من النمو نسبياً للسيطرة(6). وهذه قريبة لدراسة (33) التي اشارت الى ان عزلات *C.albicans* التي حدثت بها ظاهرة الاختزال بالنمو بوجود الفلوكونازول ، حيث عندما يكون التركيز(MIC اقل من 1مايكروغرام/مل) يكون النمو منخفض صعب، والتي تؤدي بالنهاية الى مقاومة كاذبة false resistance خصوصاً عندما تكون فترة الحضن مستمرة ، لذلك فأن تحديد قيم MIC يجب توخي شيء من الدقة والحذر (38). وان ظاهرة الاختزال بالنمو يتم % من النمو تراجع بعد الحضن لمدة 48 ساعة (24). وطبقاً لطريقة MIC فهو

بعد الحضن لمدة 24 ساعة لكن عند الاستمرار بالحضن لمدة 48 ساعة حيث ان النمو يصبح كثيف عندما يكون (MIC اقل 64 مايكروغرام/مل) وان العزلات التي تمتلك هذا النوع من النمو وصفت بانه يحدث بها تغيير بالشكل المظهري للخلية الفطرية .

المصادر

1-العبيدي ، منى عقيل حميد(2012). الكشف عن الجين المشفر لبروتين الانتكرين باستعمال تفاعل السلسلة المتبلمر و علاقته بالصفات المظهرية لانواع المبيضات. رسالة ماجستير. كلية الطب-جامعة القادسية.

2-الشبلي ، ماجد كاظم عبود .(2006). تأثير العزلات السريرية لخميرة المبيضات *Candida* spp. : دراسة بايلوجية ونسيجية مرضية في محافظة الديوانية . أطروحة دكتوراه . كلية التربية . جامعة القادسية**.**

3-الايدامي ، نبيل أبراهيم نصر (2012) . عزل وتشخيص أنواع Candida spp المسببة لمرض السلاق الفموي ودراسة تأثير أنواع من العسل المحلي للسيطرة عليها . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة القادسية.

4-حسين، رائد علي(2011). مقارنة التغيرات الحيوية و الجزيئية لبعض انواع الخميرة *Candida* (الحساسة و المقاومة) لبعض المضادات الفطرية. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم-جامعة الكوفة.

5-ناصر ، نور إسماعيل (2010) . معدل تأثير عزلات خميرة المبيضات البيضاء المعزولة من داء المبيضات الفموي والمهبلي ودراسة حساسيتها ومقاومتها العرضية لبعض المضادات الفطرية. رسالة ماجستير. كلية الطب - جامعة القادسية.

6-CLSI (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts approved standard, 2nd edn, M27–A2. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute**.**

7-Xu, Yonghao., Lamei , C., and Chunyang, L., (2008). Susceptibility of clinical isolates of Candida species to fluconazole and detection of Candida albicans ERG11 mutations**.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy**.,** 61**,** 798–804**.**

8-Hamester, M., Lilian, W.J., and Alexander, M.F.(2010). Incidens of Candida spp. In oral cavity of elderly with removable total or patial, dental

Description Of Medical Fungi. Second Edition.

11-Samaka ., hayder M.(2012). Genotyping of Candida albicans isolates from Najaf hospitals .university of kufa ,2012.

12-Moris, S.A.; Bailey, C.J. and Cartledge, J.Mep. (2008) Neonatal renal candidiasis.

17-Tamura, M.; Watanabe, K.; Mikami, Y.; Yazawa, K. and Nishimura K.(2001) Molecular Characterization of New Clinical Isolates of Candida albicans and C. dubliniensis in Japan: Analysis Reveals a New Genotype of C. albicans with Group I Intron. J. Clin.Microbiol**,** 39(12)**:**4309-4315**.**

18- Ellis, D. H. (1994). Clinical Mycology:The human opportunistic Mycosis. Gillingham printers. Pty. Ltd. Australia.

19-Luis Ostrosky-Zeichner, John H. Rex, Peter G. Pappas, Richard J. Hamill, *,et al* .(2003). Antifungal Susceptibility Survey of 2,000 Bloodstream *Candida* Isolates in the United States . Antimicrobial agents and Chemotherapy, Oct., p. 3149–3154**.**

20-Ruhnke, M.; Schmidt, A. W.; Engelmann, E.and Trautmann, M.(1996). Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazole therapy. J . Clin .icrobiol. **34:**3208–3211.

prosthesis in the city of Coronel Freites**.** state of Santa Catarina **,** Brazil**.** Rev**.** Panam**.** Infectol**.,** 12(1) : 17-22.

9-Theresa, K.; Nkuo , Akenji .; Roland ,N. N. *et al* . (2002) . The Prevalence of Candida albicans associated Diarrhoea in Buea **,** south West Cameroon **.** Afr **.** J**.** Health Sci **.** 9:153– 157**.**

10-Ellis, D.; Stephen, D.; Helen, A.; Rosemary, H. and Roben, B.(2007). J. of pediatrics and Chil. Health, Vol. 30 No. 2:Pp186-188.

13- Charlier C, Hart E, Lefort A et al (.2006) fluconazole for the management of invasive candidiasis : where do we stand after 15 yeasrs **.** J Antimicrob chemother . 57 **:**384-410**.**

14-Isogai , A.; Mulu , A.; Diro , E.; Teklesselassisie , H .; Kassu, A.; kimura , K .; Nishikawa, T. and Isogai , E. (2010). Identification of Candida species from human immunodeficiency virus – infected patients in Ethiopia by combination of CHROM agar , Tabacco agar and PCR of amplified internally transcribed rDNA spacer region . J. Appl ., 10 : 2-8 **.**

15-Freidman, M.(2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral and antifungal activities of tea flavonoids and tea **.** Mol**.** Nutr**.** Food research**, 51:** 116-134.

16-Nobile, C.J.; Bruno, V.M.; Richard, M.L.; Davis, D.A.; and Mitchell, A.P. (2003). Genetic control of chlamydospore formation in Candida albicans. Microbiology, 149:3629-3637**.**

Populations in Taiwan. Mycopathologia, 172:131-139.

24- Rex, J. H., P. W. Nelson, V. L. Paetznick, M. Lozano-Chiu, A. Espinel-Ingroff, and E. J. Anaissie. (1998). Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. Antimicrob Agents Chemother. **42:**129–134**.**
infection isolated in Benin City, Edo state, Nigeria. African J.Microbiol. Res, 3(11):694-699.

29-Pons, V.; Greenspan, D. and Debruin, M. (1993) Therapy for oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients: a randomized, prospective multicenter study of oral fluconazole versus clotrimazole troches. J. Acquir. Immune. Defic. Syndr., 6:1311-1316.

30-Fadda, M.E.; Podda, G.S.; Pisano, M.B.; Deplano, M. and Cosentino, S. (2008) Prevalence of *Candida* species in different hospital wards and their susceptibility to antifungal agents: results of a three year survey. J. Preven. Med. Hygiene, 49(2):69-74.

31-White, T. C., Marr, K. A., and Bowden, R. A. (1998). Clinical**,** cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance**.** Clin**.** Microbiol**.**Rev**. 11:**382–402.

32-Akbar, D.H. and Tahawi, A.T. (2001) Candidemia at a university hospital: epidemiology, risk factors and predictors of mortality. Ann. Saudi. Med. 21: 178-182.

21- Sheehan, D.J.; Hitchcock, C.A.; and Sibley, C.M. (1999) Current and Emerging Azole Antifungal Agents**.** J**.** Clin**..**Microbiol. Rev**,** 12(1):40-79**.**

22-Henry, K. W.; Nickels, J. T. & Edlind, T. D. (2000). Upregulation of ERG genes in Candida species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 44:** 2693–2700**.**

23-Yang, Y.L.; Hsieh, L.Y.; Wang, A. and Lo, H. (2011) Characterization of Candida Species from Different

25-Galgiani, J.N.; Reiser, J.; Brass, C.; Espinel-Ingroff, A.; Gordon, M.A.; Kerkering, T.M. (1987) Comparison of relative susceptibilities of Candida species to three antifungal agents as determined by unstandardized methods. Antimicrob. Agents Chemother.,31:1343-1347.

26-Barry, A.L.; Pfaller, M.A.; Brown, S.D.; Espinel-Ingroff, A.;Ghannoum, M.A.; Knapp, C. and Rennie, R.P. (2000) Quality control limits for broth microdulution susceptibility tests of ten antifungal agents. J. Clin. Microbiol., 38:3457-3459.

27-Muller, C.; Weig, M.; Peter, J. and Walsh, J. (2000) Azole cross resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in clinical *Candida albicans* isolated from HIVinfected children with oropharyngeal candidosis. J. Antimicro.Chemother., 46:323-342.

28-Akortha, E.E.; Nwaugo, V.O. and Chikwe, N.O. (2009) Antifungal resistance among *Candida* species from patients with genitourinary tract

35-Kumar, C.P.; Hanafy, A.M.; Katsu, M.; Mikami, Y. and Menon, T.(2006) Molecular analysis and susceptibility profiling of *Candida albicans* isolates from immunocompromised patients in South India. Mycopathologia, 161:153-159.

36- Odds, F.C. (1993) Resistance of yeasts to azole derivative antifungal. J. Antimicrob. chemother., 31:463-471.

33-Marr, K. A., T. R. Rustad, J. H. Rex, and T. C. White. (1999). The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. Antimicrob Agents .Chemother. 43:1383–1386.

34-Satana, D.; Erkose Genc, G. and Erturan, Z. (2010) The antifungal susceptibilities of oral *Candida* spp. isolates from HIV-infected patients. African J. Microbiol. Res., 4(6):466-470.

37- Skaggs, B. A.; H. Jradi .; T.,Desai, and C. J. Morrison.(1999) Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans***.** J**.** Clin**.** Microbiol**., 37:**3332–3337**.**

38- Canton, E.; Espinel-Ingroff, A.; Pemán, J. (2009). Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods**.** Expert Rev**.** Anti Infect**.** Ther**,** 7 **:**107-119**.**

39-De Backer M D, Ilyina T, Ma X J, Vandoninck S, Luyten W H, Vanden Bossche H .(2001) Genomic profiling of the response of Candida albicans to itraconazole treatment using a DNA microarray. Antimicrob Agents Chemother 45:1660–1670**.**

40-Graybill, J. R., Montalbo, E., Kirkpatrick, W. R. et al. (1998) Fluconazole versus Candida albicans: a complex relationship. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **42**, 2938–42**.**

41-Odds, F.C. and Bernaerts, R. (1994) CHROMagar-Candida, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important Candida Species J. Clin. Microbiol 32(8):1923-1929**.**

42-Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004) . Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: approved guideline M 44 – A . National Committee for Clinical Laboratory Standards **.** Wayne **.** Pennsylvania **.,**19087-1898**,** USA **.**

43-McGinnis, M. R.(1980). Laboratory hand book of medical Mycology. Academic press. New Yorck**.**

44-Okeke , C. N . and Gugnani , H . C . (1987) . In vitro sensitivity of environmental isolates of pathogenic dematiaceous fungi to azole compounds and a phenylpropyl morphooline derivative . **Mycopathologia ., 99 (3) : 175 – 181.**

Test of the resistance of some clinical isolates of C.albicans against azoles and its relation with trailing growth phenomena

Dr. Adnan H. AL-Hamadani
Hayder abid al-Hussein Abbas

Summary

The current study aimed to detect role of Erg11 gene in the resistant of Candida albicans toward azole antifungals , and its relationship with the emergence of resistant or Trailing growth isolates when testing their drugs susceptibility against azole (fluconazole, ketoconazole).

A total of 120 specimens were collected from patients of both gender with different source of admitted the general Hospital Hospital and Teaching materinaty and children in Diwaniyah city during the period from December / 2012 to February / 2013.

The isolation and identification result revealed that the isolation percent of *C .albicans* was 47.05 % incomparison with other different Candida species .

The antibiotic susceptibity tests of *C. albicans* showed the presence of resistance (38.89%) to fluconazole the most of sensitive isolates revealed a trailing growth phenomena in the zone of growth inhibition of floconazole in a ratio 55.56% . While the resistance percent to ketoconazole was 27.78 % and the sensitive isolates showed the trailing growth in a ratio (38.89%) . The statistical analysis showed a significant different ($P<0.05$) among testes treatment.

The MICs values of fluconazole against C.*albicans* isolates were for resistance isolates and the trailing growth phenomena occurred at MICs value ≤ 8 Mg/mL within 24 hours of incubation while the values became ≥ 64 Mg/mL after 48 hours of incubation .There was a significant differences ($p< 0.05$) among tested treatments isolates incubated at 24 hours while there was no significant difference ($P>0.05$) at 48 hours of incubation.

In respect with Ketoconazole , the resistance of *C.albicans* is increased after 48 hours of incubation at MICs values the trailing growth phenomena occurred when the MICs ≥ 2 Mg/mL after 24 hrs of incubation , while it reached to ≥ 8 Mg/mL after 48 hrs of incubation . There was a significant differences ($p< 0.05$) among tested treatments isolates incubated of 24 hours while there was no significant difference ($P>0.05$) among treatments of 48 hours of incubation .