تشخيص الفطريات والخمائر المعزولة من المرضى المعتلين مناعيا بالطرق الكيموحيوية والجزيئية

هدى محمد كاظم جواد، وفاء صادق محسن ألوزني، زهير حميد عبود
قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة كربلاء، العراق

تاريخ الاستلام: 11 / Sep / 2015
تاريخ قبول النشر: 11 / Dec / 2016

Abstract

(50) samples were collected from skin infections to Immunodeficiency patients for the period from 01/11/2014 until 01/04/2015 from patients in the city of Hussein Medical and who reviewed the chemotherapy unit , clinic diabetes , The department of artificial kidney and burns unit and the ages ranged from (1-80) years who was both sexes.

The results showed the presence of fungal growth in (20) skin swab as it the diabetic patients more frequency fungal isolates where given 8 swabs as a result of fungal growth positive, followed by the cancer patients, burns and patients with renal failure four isolates for each of them. Where formed yeast *Candida* largest number that percent (50%) and more a repeated in patients with burns ,as well as Aspergillus, followed by (40%). And depending on the biochemical and genetic diagnosis that Diagnosed has two types of Candida yeasts are the C.albicans by seven isolates and C. parapsilosis by three isolates only.

Keywords

C. albicans, Candida, PCR, C. parapsilosis, Immunodeficiency patients

الخلاصة

تم جمع (50)عينة من الاخماج الجلدية للمرضى المعتلين مناعياً للمدة من 1/11/2014 ولغاية 1/4/2015 المراجعين لمدينة الحسين الطبية وممن راجعوا ردهة العلاج الكيمياوي وعيادة السكري وقسم الكلية الصناعية وردهة الحروق ، حيثتراوحت اعمارهم من (1-80) سنة ومن كلا الجنسين.

اظهرت النتائج الحالية وجود نمو فطري في(20) مسحة جلديةفقط اذ كان مرضى السكري اكثر تردد للعزلات الفطرية حيث اعطت (8)مسحات نتيجة نمو فطري موجب يليها في ذلك مرضى السرطان والحروق ومرضى الفشل الكلوي بأربعة عزلات لكل منهم وشكلت خمائر المبيضات Candida العدد الاكبر من نسبة العزل وبنسبة (50 %)والتي كانت الاكثر تكرار لدى مرضى الحـــروق تلاها فطر Aspergillus بنسبة (40 %) . وبالاعتماد على التشخيص الكيموحيوي و الوراثي فقد عزل نوعــين من خمــائر المبيــضات هما الـC.albicans بواقــع سبع عزلات والـ C. parapsilosis بواقع ثلاث عزلات فقط .

الكلمات المفتاحية

المرضى المعتلين مناعياً، خمــائر المبيــضات C.albicans ، خمــائر المبيــضات C. parapsilosis

1. المقدمة

تعد الاخماج الجلدية الفطرية أقل شيوعاً وتنوعاً من الاخماج الجلدية البكتيرية، ومع ذلك فقد ازدادت كثيراً اثناء السنوات الأخيرة نسبة حدوث الأخماج الجلدية الناجمة عن الإصابة بالفطريات Mycoses [1] وتؤدي الفطريات دوراً مهماً في إحداث اخماج للإنسان وتسبب إصابات مختلفة تتراوح من الالتهابات الجلدية السطحية إلى غزو الأعضاء والأنسجة الداخلية في جسم المضيف، وان هذه الاخماج عادة ما تحدث نتيجة للانخفاض في دفاعات المضيف الطبيعية أو التعرض إلى النمو الكثيف للفطريات الانتهازية مسببة أمراض مختلفة للمضيف [2].

وتمتلك الفطريات القابلية على إحداث الاخماج للإنسان بسبب قابليتها على النمو في الدرجة الحرارية لجسم الإنسان (37) مْ وإنتاج ابواغ فطرية صغيرة الحجم مما يسهل دخولها والتصاقها بالخلايا الطلائية لأنسجة المضيف فضلاً عن إنتاجها مواد مساعدة مثل السموم والإنزيمات التي يمكنها أن تتغلب على ميكانيكية الدفاع المناعي في جسم المضيف [3].

تبدأ الاخماج الفطرية بشكل مفاجئ وتتطور بسرعة وتبقى لمدد طويلة وقد يكون بعضها مهدداً للحياة إذا لم يعالج في المراحل المبكرة من حدوث الخمج، ويعد السبب الرئيس في زيادة الاخماج الفطريات في السنوات الاخيرة هو تزايد اعداد المرضى المثبطين مناعيا مثل مرضيالسرطان (Cancers) والسكري (Diabetes) و الفشل الكلوي (Kidney failure) والأيدز (AIDS) وامراض الامناعة الذاتية، فضلا عن الأشخاص الذين يتلقون ادوية مضعفة اوكابحة للجهاز المناعي مثل مرضى نقل الأعضاء (Transplantation) وغيرها من امراض الاعتلال المناعي او الامراض المضعفة للجهاز المناعي (Immunconpramized patients) وتعد الفطريات بأحدى المشاكل الصحية المرافقة للمرضى المعتلين مناعيا والتي قد تهدد حياة المريض، وتعد الاصابة بداء المبيضات (Candidiasis) والرشاشيات (Aspergillosis) والمستخفيات (Cryptococcosis) اكثر انتشارا بين المرضى المعتلين مناعيا مقارنة بغيرهم من المرضى[1,4] . وقد زادت حالات الاخماج الفطرية الانتهازية في الآونة الاخيرة نتيجةلقدرة الخمائر والفطريات الاخرى لأحداث اخماج متعددة للإنسان من جهة وبالتزامن مع الحالة المناعية للمضيف و العوامل البيئية الاخرى من جهة اخرى.

تعد خميرة المبيضات Candida من اهم واكثر الفطريات الانتهازية المرضة التي تسبب اخماج جلدية وجهازية لامتلاكها الكثير من عوامل الضراوةوتمكنها من غزو انسجة المضيف، وتعدمنالفطريات ثنائية الشكل التي لها القابلية على تكوين خيوط فطرية حقيقية (True hyphae) وخيوط فطرية كاذبة (Pseudo hyphae) [5,6] وتسبب المبيضات أمراضاً مختلفة ولكنها أمراض حميدة نسبياً تصيب الغشاء المخاطي أو الجلدي في الانسان السليم، ولكنها قد تكون مصدراً مهماً للاخماج والوفاة في المرضى الذين يعانون من الاعتلال المناعي بصورة خاصةوتسبب الأنواع العائدة إلى جنس الـ Candida، ولاسيّما الـ C. albicans الذي يعد من اكثر الانواع عزلا من المرضى مجموعة من الإصابات تعرف بداء المبيِّضات (Candidiasis)، إذ يعد هذا النوع المسبب الرئيس لهذا المرض كما تعد الـ C. albicans من المرضات الانتهازية التي تتواجد بصورة طبيعية عند الأشخاص الاصحاء حيث توجد في القناة الهضمية والفم و المهبل والجلد [7,8,9] .

ويعرف الاعتلال المناعي بانه الحالة التي تضعف فيها

قدرة جهاز المناعة على مقاومة الأمراض او الدفاع عن الجسم عند مهاجمة الاحياء المجهرية والخلايا الغريبة، وتحدث تلك الحالة اما بسبب خلل او ضعف في احد مكونات الجهاز المناعي الخلوية (الخلايا البلعمية واللمفاوية التائية والبائية) والخلطية (المتمم والاجسام المضادة). وان هذا الخلل سيزيد من حساسية المرضى للإصابة بتلك الخمائر نتيجة لفقدان العائل للعديد من الوسائل الدفاعية ، و ان الاخماج الجلدية تترافق مع حدوث الاعتلالات المناعية مثل امرض نقص المناعة (Immunodeficiency) وأمراض المناعة الذاتية Autoimmune)) وان المرضى الذين يعانون من امرض الاعتلال المناعي غالبا ما يكون الجلد لديهم غير طبيعي ويصاب بعدد من الامراض [10,11] كالشيء الذي يحصل لمرضى السرطان الذين خضعوا للعلاج الكيمياوي والذي يؤدي إلى انخفاض في اعداد الـ WBC وبذلك نلاحظ هبوط في الجهاز المناعي وتغاير في العديد من المعايير المناعية لديالمرضى الذين يتعالجون كيماوياً حيث ان خلايا الدم البيض تعتبرمن الخطوط الدفاعية الاولى في مكافحة الاخماج والالتهابات البكتيرية والفطرية و ذلك يؤدي بدوره إلى الإصابة بالمرضات الانتهازية [12] وان الخلل في هرمون الانسولين لمرضى السكري المؤدي إلى ارتفاع نسبة السكر في الدم يؤثر على الجهاز المناعي ونشاطاته اذ يتميز مرضى السكري بكونهم اكثر حساسية للاصابات المختلفة وذلك نتيجة لتحويرات المناعية الكبيرة التي يعاني منها المصاب بمرض السكري [13,14,15] . ويعاني مرضى الفشل الكلوي في المراحل النهائية من خلل في الجهاز المناعي ، وايضا يحصل ضعف في الدفاعات وزيادة حدوث الاخماج وعلى الرغم من الية الخلل المناعي غير مفهومة بصورة كاملة ، ولكنها قد تتعلق بالخلل الذي يحصل في عملية الأيض والتغذية الناتجة بسبب الوسط اليوريمي(Uremic milieu) حيث يحصل الخلل في كلا من المناعة الخلوية والخلطية. ويتضمن الخلل في المناعة الخلوية قلة اعداد الخلايا اللمفاوية اضافة إلى حدوث خلل في كميات وأنشطة مجموعة الخلايا اللمفاوي التائية ، ولذلك تنخفض استجابة الخلايا اللمفاوية لمضادات الجينات المحفزة ، وضعف عملية البلعمة، اما الخلل الذي يحصل في المناعة الخلطية يعود معظمها إلى ضعف في وظيفة خلايا التائية المساعدة وذلك يؤثر على عملية إنتاج الأجسام المضادة [16] . وتظهر الكريات البيض ضعف في النشاط في المرضى الذين يعانون من الفشل الكلوي حيث ان خلايا الدم البيضاء متعددة الانوية تفشل في بالهجرة بشكل صحيح وتظهر خللاً في عملية البلعمة التي تكون سببا في زيادة القابلية للالتهابات في المرضى الفشل الكلوي المزمن [17] . و تنتج الحروق تغيرات في نمط الاستجابة المناعية للمريض ومؤدية إلى ضعف في الاستجابة المناعية وتزيد حساسية المرضى للاخماج [18] أن الاستجابة المناعية الأولية (Primary immune response) التي تظهر حالاً بعد الاصابة والتي يعقبها انخفاض في النشاط الخلوي المناعي دور مرتبط باحتمال زيادة الحساسية للخمج بالعوامل المسببة للأمراض المتنوعة [19] ، وان الجهاز المناعي العفوي يستجيب حالاً عقب الحرق بتحفيز التفاعلات الالتهابية الموضعية والجهازية للجسم، وان هذه الاستجابة تساهم في تنشيط الاستجابة المناعية التكيفية، وان التغيرات التي تحصل في المناعة التكيفية عقب حالة الحروق تتمثل في انخفاض العدد الكلي للخلايا التائية اثناء الاسبوع الاول وخاصة في حالة الحروق الشديدة، وبذلك تتأثر الوظائف المناعية المعتمدة على الخلايا التائية التي قد تكون مرتبطة بانخفاض انتاج الحركيات الخلوية و سوف ينخفض بعد

الحروق الشديدة انتاج الكلوبيولين المناعي Ig G استجابة إلى المستضدات المعتمدة على الخلايا التائية [20] .

ونتيجة لانتشار حالات الاخماج الجلدية الفطرية المرافقة لحالات الاعتلال المناعي لذا هدفت هذه الدراسة إلى بيان علاقة نوع المرض المناعي المسؤول عن حالة الاعتلال المناعي وحدة الخمج الجلدي الفطري وذلك بعزل وتشخيص الفطريات المسؤولة عن الاخماج الجلدية الظاهرة في المرضى معتلي الجهاز المناعي وذلك بالطرق الكيموحيوية والجزيئية.

2. طرائق العمل

- جمع العينات: تم جمع (50) مسحة جلدية من (50) مريض يعانون من حالة الاعتلال المناعي وهم المراجعون لمدينة الحسين الطبية وبالأخص من المراجعين لردهة العلاج الكيمياوي وعيادة السكري وقسم الكلية الصناعية وردهة الحروق حيث تراوحت اعمارهم من (1-80) سنة ومن كلا الجنسين، حيث تم جمع المسحات الجلدية وزراعتها على الاوساط الزرعية الخاصة بالفطريات(وسط سابرويد دكستروز اكار ووسط البطاطا دكستروز اكار المضاف له المضاد البكتيري الـ (Chloramphenicol) و حضنت الاطباق هوائياً في الحاضنة لمدة من يومين إلى اربعة اسابيع في درجة حرارة(28) م°.ثم شخصت العزلات الفطرية والخمائر بالاعتماد على الصفات الزرعية للمستعمرات الفطرية النامية من حيث شكل المستعمرة، لونها و قطرها و رائحتها و لزوجتها و ارتفاعها عن سطح الوسط و شكل حافة المستعمرة وغيرها من الصفات الأخرى.وأجري الفحص المجهري للعزلات وذلك بنقل جزء من المستعمرة النامية على الوسط الصلب بوساطة الناقل (Loop) بالنسبة للخمائر اما باقي الفطريات الخيطية فيكون بالإبرة (Needle) إلى شريحة زجاجية نظيفة تم وضع عليها مسبقاً قطرة من صبغة اللاكتوفينول الزرقاء(Lactophenol cotton blue) ووضع غطاء الشريحة (Cover slip)،عندها فحصت تحت المجهر بقوة (X40) لملاحظة شكل الخلايا المتبرعمة للخميرة (Budding cells) وطريقة اتصالها ببعضها [21] .

1.2. الاختبارات الخاصة بتشخيص خميرة Candida

1.1.2. فحص تكوين أنبوب الإنبات Germ tube formation test

وضع(0.5)مل من مصل الانسان في انبوبة اختبار معقمة ولقحت بخميرة الـ **Candida**، ثم حضن العالق بدرجة حرارة (37)م° لمدة(3) ساعات، بعد الحضن تم وضع قطرة من هذا العالق على شريحة زجاجية ووضع فوقها غطاء الشريحة وفحصت تحت المجهر بقوة X40 لملاحظة تكوين أنبوب الإنبات [22] .

2.1.2. النمو على درجة حرارة 45م° Growth at a temperature of 45 °

تم هذا الفحص حسب طريقة Pinjon وجماعته (1998) [23] .

3.1.2. اختبار انزيم اليوريز Urease test

تم هذا الفحص حسب طريقة Collins وجماعته (2004)[22].

4.1.2. النمو على وسط الكرومو اكار CHROM agar

زرعت الخمائر على وسط الكرومو اكار [24] وقراءة نتائج الزرع من خلال التغاير اللوني و وفقا للجدول الاتي:

جدول رقم (1): يبين نتائج الزرع للخمائر على وسط الكروموآكار من خلال التغاير اللوني

العزلة	اللون
C.albicans	اللون الاخضر الفاتح
C.tropicalis	اللون الازرق المعدني
C.parapsilosis	اللون الابيض
C.kruse ، *C.gabratai*	اللون الارجواني او الوردي

2.2. التشخيص باعتماد تفاعل البلمرة التسلسلي

1.2.2. استخلاص وتنقية الـDNA

استخلص DNA خميرة المبيضات Candidasp وفقا لتعليمات الشركة الكندية bio-basic .

2.2.2. ظروف البلمرة PCR Condition

استخدمت تقنية (PCR) لتضخيم الـ(DNA) المستخلص من العزلات الفطرية باستخدام البادئ(ITS1) الذي تتابعه (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) وبطول bp (19) والبادئ (ITS4) الذي تتابعه (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) وبطول pb (20). وتم سحب (0.8) ميكروليتر من كل بادئ مع اخذ 1 (مايكروليتر) من (DNA) الخميرة وأضيف إلى خليط التفاعل(Master mix) المجهز من شركة(Promega) واكمل الحجم إلى (20) مايكروليتر بالماء المقطر، مزجت المواد في انبوبة (PCR) وبعد الانتهاء من جميع الاضافات مزجت جيدا ونقلت إلى جهاز البلمرة (PCR thermal cycler) حيث تم تضبط الجهاز كما في الجدول الآتي:

جدول رقم (2): خطوات تقنية الـ (PCR) الخاصة بالمبيضات

ت	الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
1	Initial Denaturation	94 م°	4 دقيقة	1
2	Denaturation	94 م°	30 ثانية	30
3	Annealing	55 م°	30 ثانية	
4	Extension	72 م°	1 دقيقة	
5	Final Extension	72 م°	4 دقيقة	1
6	درجة حرارة التبريد	4 م°		

3.2.2. تقييم نتائج البلمرة بالترحيل الكهربائي Gel-Electrophoresis :

1- وضع(100) مل من الدرائ(TBE) في بيكر واضيف اليه(1.2) غم من مسحوق الاكاروز ثم اضيف إلى المزيج السابق (10) مايكروليتر من صبغة (Ethidium bromide) وبعدها سخن البكر إلى درجة الغليان بحيث تذوب جميع مكوناته وبعدها ترك ليبرد إلى درجة حرارة (60-50) م°.

2- حضرت صفيحة اسناد الاكاروز (Tray) وثبت مشط تكوين الحفر (Comb) على بعد (1)سم من احد طرفي الصفيحة ثم صب هلام الاكاروز في الصفيحة وترك ليتصلب لمدة (30)دقيقة.

3- نقل الهلام المتصلب إلى حوض الترحيل الكهربائي (Electrophoresis tank) وغطي بدرائ (TBE) بارتفاع (3) ملم (حتى ينغمر سطح الهلام) ثم يرفع مشط تكوين الحفر.

4- وبعد انتهاء عملية بلمرة العينات حملت (5) مايكرو ليتر من ناتج البلمرة لكل عينة في حفر هلام الاكازو الموضوع في حوض الترحيل وتركت الحفرة رقم واحد للمعلمة

الجزيئية (حملت الحفرة الاولى بـ(7) مللتر) معلمة جزيئيا M ووضعت في ظروف ترحيل (100) فولت و (30) دقيقة وربطت الاقطاب بصورة مناسبة بحيث يربط القطب الموجب بالموجب الموجود بمجهز الطاقة لجهاز الترحيل الكهربائي والقطب السالب بالسالب .

5- اجريت عملية الترحيل بفولتية مقدراها(100) فولت و لمدة (30) دقيقة لحين وصول الصبغة الزرقاء إلى نهاية الهلام ثم ايقاف عملية الترحيل، بعدها تم فحص الهلام تحت الاشعة فوق البنفسجية بطول موجي(320) نانوميتر و الكاميرا المحمولة على جهاز الطيف الضوئي وصورت النتائج ووثقت .

3. النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج الدراسة الحالية وكما موضح في الجدول (3) عزل بعض الاجناس الفطرية والخمائر من المرضى معتلي الجهاز المناعي فقد توزعت العزلات الفطرية بين المرضى المعتلين مناعيا حيث كانت نسبة الاصابة الاعلى بين مرضى السكري بنسبة (40%) وبواقع (8) عزلات مقارنة ببقية حالات الاعلال المناعي ثم كل من مرضى السرطان والحروق ومرضى الفشل الكلوي(4) عزلات وبنسبة (20%) لكل منهم و أظهرت جليا ان خمائر المبيضات (Candida)حققت اعلى نسبة عزل وبواقع (10) عزلات وبنسبة (50%) و(8) عزلات من فطر (Aspergillus) وبنسبة (40%) وفطر (Penicillium) بعزلتين وبنسبة (10%) وبالاعتماد على التشخيص الوراثي فقد شخص نوعين من خمائر المبيضات هما الـ (C.albicans) بواقع سبع عزلات والـ (C. parapsilosis) بواقع ثلاث عزلات. حيث تعود ثلاث عزلات الـ (C.albicans) إلى مرضى الحروق وعزلتين إلى مرضى السكري وعزلة واحدة لكل من مرضى السرطان والفشل الكلوي بينما تعود خميرة الـ(C. parapsilosis) إلى مرضى الحروق والسرطان والفشل الكلوي بعزلة واحدة لكل منهم.

جدول(3): تردد العزلات الفطرية المعزولة من مرضى الاخماج الجلدية معتلي الجهاز المناعي.

مجاميع الدراسة من المرضى معتلي الجهاز المناعي	العزلات الفطرية			مجموع الفطريات المعزولة
	Candida	*Aspergillus*	*Penicillium*	
مرضى السرطان n =13	2	2	-	(20%) 4
مرضى السكري n= 11	2	4	2	(40%) 8
الفشل الكلوي n =11	2	2	-	(20%) 4
مرضى الحروق n =15	4	-	-	(20%) 4
المجموع n =50	10 (50%)	8 (40%)	2 (10%)	20

تقاربت نسبة العزل بالنسبة لخمائر المبيضات لدراسة Mohammadi وجماعته (2015) [25] المعزولة من اخماج الاظافر حيث عُزلت خميرة (C.albicans) بنسبة (41.1%) وخميرة (parapsilosis.C)بنسبة (21.4%) و(C. tropicalis) (12.8%)و(C. kefyr)(9.4%) بالإضافة إلى انواع اخرى. كما ان (C. parapsilosis) لديها قابلية لإنتاج طبقة مخاطية من مواد سكرية خارج خلوية ولديها قدرة للالتصاق وتكوين الاغشية الحيوية(Bio film) وهذا ما يجعلها اكثر عزلا من جروح المرضى الذين يخضعون للأدوات في المستشفى من قسطرات وريدية وجهاز الديلزة الدموية لمرضى الغسل الكلوي كما يعتبر احد الانواع التي تتواجد بصورة طبيعية في الجسم ضمن النسبة الطبيعية في الأشخاص الأصحاء على الجلد والاظافر والاغشية المخاطية[26] .

اما جنس (Aspergillus) فيعد من الفطريات الانتهازية والتي تؤدي إلى امراض خطيرة وجهازية في حالات الاعتلال المناعي ، وقد شكّل في الآونة الأخيرة نسبة متزايدة من حالات الإصابات الفطرية في مرض السرطان خصوصاً في حالات(Acute leukemia) حيث وصلت النسبة إلى (20-50%) وكان (A.fumigutus) هو اكثر فطر معزول .

وفي دراسة اجريت من قبل الشمري (2003)[27]في بغداد على الأنواع الفطرية المصاحبة لمرضى السرطان وجد ان خميرة الـ (Candida spp) شكلت النسبة العظمى من العزلات وقد بلغت نسبتها (66.7%) تلاها الفطر (Aspergillus spp) بنسبه بلغت (8.3%)وكما سجل انواع اخرى من الفطريات بنسب مختلفة إذ تمثلت بـ (Cryptococcus spp) بنسبة (6.25%) و(Geotricumspp و (Rhodotorulaspp)، و(Saccharomyces spp و (Alternariaspp) بنسبة(4.1%) لكل منهم، وأخيرا جنس (Cladosporiumspp) بنسبة (2.1%)، كما وجد ان خميرة الـ (C. albicans) تمثل الغالبية العظمى من عزلات هذه الخمائر تلاها النوع (C.krusi) و النوع(C. parapsilosis). إذ كان تأثير انخفاض اعداد خلايا الدم البيضاء وخصوصا الخلايا العدلة (Neutrophil) نتيجة العلاج الكيمياوي(Chemotheropy) واضحاً في زيادة حصول الاخماج الفطرية وشمل هذا التأثير جميع انواع السرطانات، اي ان الخلل في الجهاز المناعي مهد لحصول الخمج الفطري وكذلك لبقية الانواع من الاعتلال المناعي. تختلف نسبة حدوث الاخماج الجلدية من مكان إلى اخر باختلاف الطبيعة الجغرافية والثقافية والاقتصادية بالإضافة إلى الاختلافات العرقية (Races)، كما تتأثر إصابة الفرد بالاخماج الجلدية بعوامل كثيرة منها عوامل خاصة بالفرد وتشمل عوامل مناعية وبيئية، وايضا ترجع إلى طبيعة الجراثيم المسببة ووبائيتها في ذلك المجتمع [28].

1.3. تشخيص العزلات الفطرية Diagnosis of fungal isolates

1.1.3. التشخيص المختبري والكيموحيوي Diagnosis and Biochemical laboratory

تم تشخيص الانواع الفطرية المعزولة بشكل اولي اعتمادا على الصفات الزرعية للمستعمرات النامية على الاوساط الزرعية الخاصة بالفطريات مثل شكل ولون المستعمرة وكذلك اعتمادا على عدد من الاختبارات الكيموحيوية. حيث ظهرت مستعمرات خميرة المبيضات C.albicans النامية على وسط السابرويد اكار (SDA) بعد (24-48) ساعة من الحضن في درجة (30) مْ والتي تتميز بشكلها الدائري ذات قطر

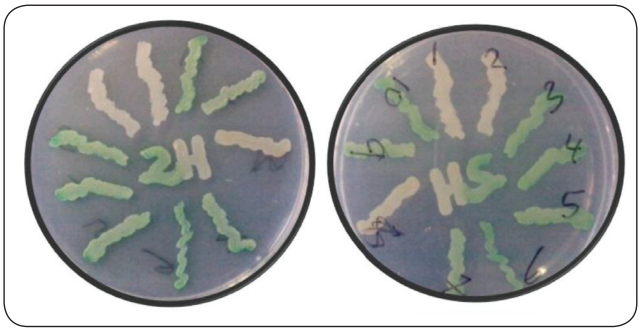
يتراوح بين (0.5-3) ملم وتكون كريمية اللون ناعمة وملساء و مرتفعة عن سطح الوسط رطبة أو مخاطية ذات حواف محددة، مع رائحة مميزة كما مبين بالشكل (1).

شكل(1): خمائر المبيضات البيضاء (C.albicans) النامية على وسط (SDA) و تحت درجة(30) م° ولمدة (24 –48)ساعة.

وقد تبين من اجراء اختبار تكوين انبوبة الانبات ان لهذه الخميرة القابلية على تكوينه حيث يظهر بشكل بروز خيطي رفيع وطويل من خلايا الخميرة وبدون حواجز او تخصرات . ويعد فحص تكوين أنبوب الإنبات من الفحوصات المهمة والسهلة و التي تستخدم في التشخيص السريع لخميرةالمبيضات البيضاءوان قابلية تكوين الانبوبة الجرثومية تعد من احد عوامل الضراوة للمبيضات البيضاء [6].

ان جميع عزلات المبيضات اعطت نتيجة سالبة لفحص انزيم اليوريز (Urease test) وذلك لان جنس المبيضات ضعيف التحلل لليوريا على عكس انواع جنس (Cruptococcus) التي يعتبر محلل قوي لليوريا [29] . وعند اجراء فحص النمو على درجة حرارة (45)م° تبين قدرة عزلات الـ (C.albicans)على النمو بدرجة حرارة(45) م° خلال يومين من الحضن مقارنة بالانواع الاخرى للمبيضات.

ولتاكيد تشخيص المبيضات المعزوله من الجلد اجري فحص النمو على وسط الكروم اكار (CHROMagar)، ويعتمد هذا الاختبار على التغاير اللوني بين انواع المبيضات ممايسهل عملية التميز بين الانواع المختلفة حيث انالية هذاالاختبار تعتمد على احتواء هذا الوسط على مواد اساس مولدة للون(Chromogenic substrates)والتي تتفاعل مع الانزيمات المختلفة التي تفرزها انواع المبيضات ممايؤدي إلى انتاج مستعمرات ملونة وبالتالي ممكن تشخيص انواع المبيضات بالاعتماد على التغاير اللوني[30,31,32,33] . وقد اظهرت النتائج بالاعتماد على وسط الكروم اكار اللون الاخضر المميز للنوع (C.albicans) بينما ظهر الـ (C. parapsilosis) باللون الابيض كما موضح في الشكل (2)



شكل(2): الخمائر المبيضات على وسط الكرومو أكار العزلات 1و2 و8 (C.parapsilosis) و العزلات البقية تعود إلى خميرة (C.albicans) نامية تحت درجة (30) م°ولمدة (24) ساعة .

وقد استنتج Baradkar وجماعته (2010) [34] إلى ان استخدام هذا الوسط يعد طريقة سهلة وموثوقة لتشخيص اغلب الانواع الشائعة للمبيضات وخاصة (C. albicans و C. glabrataparapsilosis C. و C. tropicalis)وبحساسية كافية، ويمكن ان يستخدم هذا الوسط كوسط انتخابي لتشخيص المباشر للانواع السريرية من المبيضات من خلال التغاير اللوني بين انواع المبيضات المختلفة كما اصبح هذا الوسط بديلا لوسط طحين الذرة واختبار تكوين الانبوبة الجرثومية وطرق التشخيص

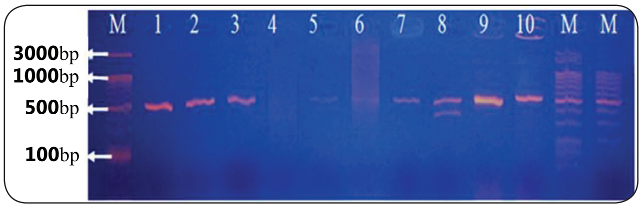
الكيموحيوية التقليدية مثل تخمي وتمثيل السكريات،وعلى الرغم من ذلك لايمكن ان يكون بديلا للطرق التقليدية للتشخيص بل مكمل لها، وذلك لكون محدد في تشخيص الانواع الثلاثة (C. albicans وC. Tropicalis و C.krusei) بدرجة عالية من الدقة مقارنة مع التنوع الهائل للمبيضات التي اخذت تبرز كمسببات مرضية مهمة وخصوصا في مرضى الاعتلال المناعي[35] .

تم تشخيص العفن (Aspergillus) اعتماداً على لون المستعمرات وشكلها الخارجي وتركية خيوطها سواء كانت مقسمة او غير مقسمة وللأبواغ دور مهم في تشخيص الفطريات من حيث الشكل واللون والموقع حيث ظهرت مستعمرات جنس(Aspergillus fumigatus) النامية على وسط(SDA) مع المضاد الحيوي الكلورمفنيكول بلون اخضر شاحب محاط من الخارج بالأبيض.

2.1.3. تشخيص الخمائر باستعمال الطرق الجزيئية

Yeasts diagnosis by using molecular methods

تم اجراء التشخيص الجزيئي لجنس المبيضات بالاعتماد على تفاعل البلمرة المتسلسل لتاكيد التشخيص لعزلات المبيضات حيث اظهرت الدراسة الحالية القابلية العالية لتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل بالاعتماد على البوادئ (ITS1,ITS4) لتضخيم منطقة(Internal transcribed spacer) (ITS) التي تحتوي على منطقة(SrDNA- 5.8-ITS1 ITS2) لعشرة عزلات من خميرة المبيضات و المعزولة من الجلد بدقة وسعة عالية مقارنة مع الطرق التقليدية المتبعة فقد بينت النتائج وجود احجام تراوحت بين bp (530-550) وذلك بالاعتماد على الاختلاف في الاطوال بين مناطق (ITS1 وITS4) في(DNA) لأنواع المبيضات لذا فأنها تنتج قطع من(DNA) ذات احجام مختلفة باستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي ومن خلال الشكل (3) يتبين بان نـواتج تفاعل البلمرة المتسلسل لنـوع(C.albicans) كانت ذات حـجم حوالـي bp (550) بينما كان الحجم بالنسبة للنوع (C.parapsilosis)حوالي bp (530). اي تم الحصول على سبعة عزلات من(C.albicans) وثلاث عزلات من (C.parapsilosis).



شكل(3): هلام الاكاروز للأنماط الوراثية للخمائر لمنتج البلمرة **bp**(530-550) باستخدام الزوج البادئ(**ITS4/ ITS1**) لعزلات الخمائر حيث ان العزلات (1و2و 8) تعود لـ(**C.prapsilosis**)والعزلات البقية تعود لـ(**C.albicans**)، **M**= المعلمة الجزيئية **bp**(100) وذلك بفولتية مقدارها (100) فولت.

وجد الباحثين في الآونة الأخيرة ان الفطريات تختلف في أحجام منطقة(ITS) من(DNA) وان اجراء تفاعل البلمرة مع البوادئ المخصصة للنوع الفطري يمكن ان تستهدف هذه المنطقة التي تضم S (5.8) وS (28) من (rDNAs) وكذلك S (18) S (28) من (rDNAs) التي تؤدي إلى تضـخيم منطقة (ITS)، وقد اعتـبرت هذه الطريقـة من الطـرق السـريع والدقـيقة في تشـخيص خمـائر المــبيضات وبـاقل وقـت مـمكن. [36]

كما جاءت هذه النتائج مقاربة مع نتائج دراسة(Harmal) وجماعته (2012) [37] حيث استخدم الـزوج البادئ العام (ITS1 /ITS4)في تضخيم منطـقة الـITS) لأنــواع المبيضات (C.albicans وC.glabrata

وC.prapsilosis وC.tropicalis) اذ اعطت احجام تراوحت(530، 870، 515، 520)زوج قاعدي على التوالي. تعد هذه الطريقة من الطرق التشخيصية السريعة التي يمكن ان تستعمل في تشخيص اكثر من نوع واحد في وقت واحد وتقلل من الوقت[38]. كما اكدت نتائج دراستنا الحالية الدراسة التي اجراها (Farasat) وجماعته (2012) [39] لأنواع المبيضات بتقنية البلمرة التسلسلي التي تم عزلها من المرضى الذين يستخدمون القسطرات والتي استخدمت البوادئ(ITS1 وITS4) لتضخيم (ITS) حيث كانت احجام النوع (C.albicans) bp (535) و(C.prapsilosis)حوالي bp (520) بالإضافة للأنواع الاخرى التي تم عزها وهي C.krusei بحجم bp (510) و(C.tropicalis)بحجم bp (524) و (C.glabrata) بحجم bp (870).

المصادر

[1] Limper,A. H., Knox,K. S.; Sarosi,G. A.; Ampel,N. M.; Bennett,J. E.;Catanzaro, A.; Davies,S. F.; Dismukes، W. E.; Hage, C. A.; Marr, K.A.; Mody،C. H.; Perfect, J. R. and Stevens, D. A.AnOfficial American Thoracic Society Statement: Treatment ofFungal Infections in Adult Pulmonary and Critical Care Patients. Am. J .RespirCrit Care Med. 183: 96–128, (2011).

[2] Kauffman, C. A. Fungal infections in older adults. Clin. Infect. Dis. 33(4):550-5, (2001).

[3] Virella, G. Microbiology and infectious diseases. 3rd.Ed.Williams & Wilkins Comp. USA. 343-7, (1997).

[4] Michael, A. P.; Peter, G. P.AND John, R. W. Invasive fungalpathogens: Current epidemiological trends. Clinical Infectious-Diseases 43: 3-14, (2006).

[5] Gordana,M.;Bojic,M.;Momir,M.;Svetlana,M.andGolocorbin,K.The importance of genus Candida in human samples .114:79-95, (2008).

[6] Yang,Y.L. Virulence factors of Candida species. J. Microbiol. Immunol . Infect. Dec.,36(4):223-8, (2003).

[7] Senna, P.M.; da, S.W.J.andCury, A.A. Denture disinfection bymicrowave energy: Influence of Candida albicans biofilm.Gerodontology 29: 186-191, (2012).

[8] Pfaller, M.A. and Diekema, D.J. Epidemiology of invasivecandidiasis: A persistent public health problem. Clin. Microbiol. Rev., 20: 133-163, (2007).

[9] Calderone, R.A.; Fonz,i W.A. Virulence factors of Candidaalbicans. Trends Microbiol 9: 327-335, (2001).

[10] Buckley, R.H.Primary immunodeficiency diseases due to defects in lymphocytes. New England Journal of Medicine.343(18): 1313 – 1324, (2000).

[11] Braun-Falco, M.andRuzicka, T.Skin manifestations in autoinflammatory syndromes. J. Dtsch. Dermatol .Ges.9:232-46, (2011).

[12] Chessells, J. M.; Bailey, C.; Richards, S. M. Intensification oftreatment and survival in all children with lymphoblastic Leukemia:result of U. K. medical Research council trail UKALLX. Lancet;345 : 143-148, (1995).

[13] Laura, M.; Serkirk, C.and Darlen,

C. Clinical concept of diseaseprocess. Catherine AlbrighJakson. Publ. USA, (2003).

[14] Kelly, M.K.; Brown, J.K. &Thony, Y.H. Neutrophil andmonocyte adherence in diabetes mellitus, alkoholic cirrhosis, uraemia and elderly patients. Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol, 78: 132-138, (1985).

[15] Naghibie, M. ; Smith, R.P. ; Baltch, A. L. & Hammer, M.C.The effect of diabetes mellitus on chemotaxic andbactericidal activity of human polymorphonuclear leucocytes. Diabetes Res. Clin. Pract., 4: 27-35, (1987).

[16] Gandhi, B.V.; Bahadur, M.M.; Dodeja, H.; Aggrwal, V.;Thamba, A.and Mali, M.Systemic fungal infections in renal diseases.J. Postgrad. Med .Vol 51 Suppl 1:30-36,(2005).

[17] Sarabandi,A.; Shabestari,R.M;Farshi,A ;Tabibian,S;Dorgalaleh,A;Reykande,S.E; Kia,S.H;Varmaghani,B.andRashidpanah،J. International Journal of Medical Laboratory ,2(1):21-24, (2015).

[18] Noronha, S.A.A. C.;Noronha, S.M.R.; Lanziani, L. E.;Ferreira, L.M.andGragnani, A. Innate and adaptive immunity gene expressionofhumankeratinocytesculturedof severe burn injury.ActaCirúrgicaBrasileira. 29 (3):60-67، (2014).

[19] Sheridan, R.L. Sepsis in pediatric burn patients predisposition tosepsis . Pediatric critical care medicine, 6(3): 5112-5119, (2005).

[20] Loomis, W.H.; Namiki, S.; Hoyt, D.B. and Junger, W.G. Hyper-tonicity rescues Tcells from suppression by trauma- induced anti-inflammatory mediators. Am. J. physiol. cell physiol., 281:840-848, (2001).

[21] Baron, E. J. and Finegold, S. M.Diagnostic Microbiology. 8th ed The C. V. Mosby company, Baltimore, (1990).

[22] Collins, C.H.;Lyne, J.M.G.andFalkinham J.O.Microbiologicalmethods Eighth Edition .Arnold.London, (2004).

[23] Pinjon, E. Sullivan, D. Salkin, I. Shanley, D. and Coleman, D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of Candida dubliniensis from Candida albicas. J.Clin. Microbiol., 36:2093-95, (1998).

[24] Horvath,L.L.;Hospenthal,D.R.; Murray,C.K.and Dooley, D.P.Direct isolation of Candida spp. From blood culture on the chromogenic medium CHROMagar Candida . J. Clin.Microbiol.,41:2629-2632, (2003).

[25] Mohammadi, R.; Badiee, P.; Badali, H.; Abastabar, M.; Safa ,A.H.;Hadipour, M.; Yazdani, H. and Heshmat, F. Use of restriction fragment length polymorphism to identify Candida species, related to onychomycosis. Adv. Biomed. Res. 4: 95, (2015).

[26] Asbeck, E.C.V. Clemons, K.V.; Steven, D. A.Candidaparapsilosis: a review of its epidemiology,pathogenesis,clinicalaspects, typing andantimicrobial susceptibility .Crit. Rev. Mic. 35(4):283-309, (2009).

[27] الشمري، محمد حسين مشرف. دراسة في أنواع الفطريات

المصاحبة لمرضى السرطان في بغداد. رسالة ماجستير. كلية العلوم .جامعة بغداد، (2003).

[28] نايف، إيمان مبدر .تأثير مستخلص العكبر (Propolis) على نمو البكتريا الموجبة لصبغة غرام المعزولة من الاصابات الجلدية. رسالة ماجستير. كلية العلوم . جامعة بابل،(2011).

[29] Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Mjarmion , B.P. and Simmons, A. Mackie and McCartney paractical medical microbiology .(14th ed.) Chrchill. Livingston . USA.(1996).

[30] Peng, C.F; Lee, K.M.and Lee, S.H. Characterization of twochromogenic media of Candida ID 2 and CHROMagar Candida for preliminary identification of yeasts. J. Biomed Lab. Sci., 19(5):63-8, (2007).

[31] Murray, C.K.; Beckius, M.L.; Green، J.A.; Hospenthal, D.R. Use of chromogenic medium for the isolation of yeasts from clinical specimens. J. Med. Microbiol.,54 (4): 981 - 5, (2005).

[32] Yucesoy, M.; Esen, N.and Yulung, N. Use of chromogenic agar for the identification of Candida albicans strains. Kobe. J .Med. Sci., 47 (3):161 - 7, (2001).

[33] Yucesoy, M.and Marol, S.Performance of CHROMagar Candidaand BIGGY agar for identification of yeast species. Annals. Clin .Microbiol Antimicrobiol, 2(6) :1-8, (2003).

[34] Baradkar, V.P; Mathur, M.; Kumar, S. Hichrom candida agar for identification of Candida species.Indian. J.Pathol. Microbiol;53:93 - 5, (2010).

[35] Odds, F.C.andBernaerts, R. CHROMagar Candida, a newdifferential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species.H.Clin. microbiol.32:1923-1929.(1994).

[36] Fujita, S.I. ;Senda, Y.; Nakaguchi،S. and Hashimoto, T. 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, (2001).

[37] Harmal, N.S.;Khodavadi, A.;Alsh, M.A.;Jamal, F.;Sekawi, Z.;Peng, N.Kand Chong, P.P.Simplex and triplex polymerase chain reaction (PCR)for identification of three medically important Candidaspecies. African J.of Bioltechnology 11(65):12895 -12902, (2012).

[38] Alam, M.Z.; Alam, Q.; Fatani, A. J.; Kamal, M. A.; Abuzenadah،A. M.; Chaudhary, A.G .M and Haque،A.Candida identification: a journey from conventional to molecular methodsin medical mycology. World J MicrobiolBiotechnol, 30 (5):1437-51, (2014).

[39] Farasat, A. Ghahri, M. Mirhendi, h. and Beiraghi, S. Identificat of Candida Species Screened from Catherter Using Patients with PCR-RELP Method. European J. Exp .Bio, 2(3):651-656, (2012).