

عزل وتوصيف خميرة (*Candida glabrata*) من عينات سريرية في بعض مستشفيات مدينة بغداد

ندى صادق صالح¹، محسن هاشم ريسان^{2*}، ثامر عبد الشهيد محسن¹

¹ كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم)، جامعة بغداد، بغداد، العراق.

² كلية التقنيات الأحيائية، جامعة النهرين، بغداد، العراق.

*m_risan@yahoo.com

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تشخيص خميرة *Candida glabrata* وتحديد بعض عوامل الضراوة، وقد أظهر توزيع المرضى المصابين بداء مبيضات الدم أن الفئة العمرية 50-65 سنة سجلت أعلى حالات الإصابة بداء المبيضات عند النساء والرجال المصابين بمرض سرطان الدم بنسبة 50% و37.9% على التوالي مقارنة بحالات إصابة أقل بداء مبيضات الدم عند الفئة العمرية دون 17 سنة عند النساء والرجال بنسبة 8.8% و13.5% على التوالي، في حين كانت حالات الإصابة عند الفئة العمرية 5-8 سنوات مرتفعة، وصلت إلى 18 إصابة بداء مبيضات الفم بنسبة 42% للأطفال المصابين بسرطان الدم مقارنة بالفئة العمرية 8-10 سنوات التي سجلت حالات إصابة أقل بلغت 9 حالات بنسبة 21%. وقد سُجلت أعلى الإصابات بخميرة (*C. glabrata*)، إذ بلغت 59 عذلة بين النساء والرجال المصابين بسرطان الدم، في حين كانت الإصابة بخميرة (*C. kefyer*) أقل بلغت عذلة واحدة فقط، بينما بلغت العزلات الفموية من الأطفال المصابين بسرطان الدم لخميرة (*C. glabrata*) 13 عذلة، في حين سُجلت لخميرة (*C. kefyer*) عزلتان فقط. وأظهرت خميرة *C. Glabrata* أعلى تكوين للغشاء الحيوي (Biofilm) فكانت 48 عذلة توزعت بين 21 إنتاجاً قوياً و27 إنتاجاً ضعيفاً للغشاء، أما أقل الخمائر إنتاجاً للغشاء فكانت خميرة (*C. tropicalis*) في 6 عزلات توزعت بين 4 ذات إنتاج قوي واثنين ضعيفتي الإنتاج للغشاء الحيوي.

الكلمات المفتاحية: مبيضات الدم، سرطان الدم، تشكيل الغشاء الحيوي، مستشفيات مدينة بغداد.

Title

Isolation and characterization of *Candida glabrata* from clinical specimens in some hospitals in Baghdad

Nada Sadaq Salah¹, Mohsen Hashim Risan^{2*}, Thamer A.A. Muhsen¹

¹ College of Education for Pure Science, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.

² College of Biotechnology, Al-Nahrain University, Baghdad, Iraq.

Abstract

This study aimed for isolation and identification of *Candida glabrata* and identifying some virulence factors. The distribution of patients with candidemia thrush showed that the age group 50-65 years old recorded the highest incidence of candidiasis in female and male with leukemia by 50% and 37.9 % respectively compared to the lowest incidence of candidiasis in the age group under 17 years old in female and male 8.8% and 13.5%, respectively. While the age group between 5-8 years was high, reaching 18 cases of oral candidiasis and 42% of children with leukemia compared with the age group, which was the least, that reached 9 cases, 21%. The highest incidence of *C. glabrata* was 59 isolates of females and males with leukemia, while *C. kefyer* was the least which was one isolate. *C. glabrata* was the most isolated from children with leukemia 13 isolates and *C. kefyer* was two isolates. *C. glabrata* showed the highest biofilm formation, 48 isolates were distributed between 21 strong and 27

Received 31 December 2019; accepted 2 February 2020; published 15 November 2020.

© 2020 The Author(s), licensee HBKU Press. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cite this as: Salah NS, Risan MH, Mushen, TAA. Isolation and characterization of *Candida glabrata* from clinical specimens in some hospitals in Baghdad. Arabian Journal of Scientific Research 2020;2.10. <https://doi.org/10.5339/ajsr.2020.10>

weak biofilm production. The least biofilm formation isolates were *C. tropicalis*, which reached six isolates and distributed between four strong and two isolates weak.

Keywords: Candidemia, leukemia, biofilm formation, Baghdad hospitals.

2-1-2 وسط (Candida Chromogenic agar)

حُضِر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة بوزن 45.9 غم من الوسط الجاهز، ووضِع في دورق زجاجي وأُذيب في 1000 مل من الماء المقطر بواسطة التسخين، وتم غليه مدة دقيقة واحدة لمساعد على مزج المادة مع الماء، وبعدها بُرد الوسط ووضِب في أطباق معقمة، واستعمل الوسط لتمييز خمائر المبيضات طبقاً للون المستعمرة.

2-2 جمع العينات (Collections of Samples)

جُمعت 130 عينة سريرية أُخذت من المرضى المصابين بسرطان الدم من مستشفى مدينة الطب/ قسم الكيمياء في محافظة بغداد خلال المدة أيلول/ سبتمبر 2018 - شباط/ فبراير 2019، إذ جمعت 40 عينة دم من الرجال و40 عينة دم من النساء المصابات بسرطان الدم، و50 مسحة فموية من أطفال مصابين بسرطان الدم راقدين في المستشفى تأكد تشخيصهم من مختبر مدينة الطب في بغداد وجمعت العينات بسحب 5 مل من الدم من كل مريض باستعمال (EDTA) لتجنب تخثر الدم. أما العينات الفموية فقد جمعت من لعاب الأطفال باستعمال مسحات قطنية (Swabs)، وسُجلت كافة البيانات المعلوماتية من جميع المرضى وتم تقديم العروض السريرية من قبل أطباء متخصصين وفقاً لبيانات المرضى.

3-2 عزل الخميرة (Isolation of yeast)

حضر الوسط (SDA) وعقم بالمؤودة عند درجة حرارة 121°م تحت ضغط 15 رطل/بوصة² مدة 15 دقيقة، ثم بُرد إلى 45°م وأضيف إليه 250 ملغم/لتر من المضاد الحيوي الكلورامفينيكول (Chloramphenicol). ووضِع 100 ميكرو لتر من الدم على وسط (SDA)، وأضيف (Barafilm) لحمايته من التلوث، ثم حُضنت عند درجة حرارة 37°م مدة سبعة أيام، وأخذت مسحة من لعاب الأطفال ووضعت على الوسط نفسه.^{11,10}

4-2 تشخيص المبيضات (Identification of Candida)

1-4-2 خصائص الشكل (Characteristics of Morphological)

لتحديد خصائص الشكل الظاهري للخميرة، جُمعت العينات ووضعت على وسط (SDA) ثم حُضنت بدرجة حرارة 37°م مدة 24-48 ساعة، وفُحصت المستعمرات لتحديد شكلها، ولونها، وحجمها وملمسها.¹²

2-4-2 تنقية المستعمرات (Purification of Colonies)

بعد التأكد من أن المستعمرات تنتمي إلى المبيضات، نُقيت المستعمرات عن طريق إضافتها إلى وسط (SDA) وحُضنت عند درجة حرارة 37°م مدة 48 ساعة للحصول على مستعمرات نقية، غلفت بـ (Barafilm) لتجنب التلوث وحُفظت في التلاجة إلى حين الاستعمال.¹³

3-4-2 تحضير محلول معيار التعكر (Macfarland)

حُضِر عالق خميرة (*Candida*) على وسط (SDB) ثم حُضِر معيار التعكر (macfarlane) رقم 0.5 وفقاً لزيمبرو وآخرين¹⁴ بإضافة 1.175 غم من كلوريد

1- المقدمة

تعدّ الفطريات من أهم الكائنات الحية انتشاراً في معظم البيئات، وتنقسم إلى أعفان Mould وخمائر Yeast. أما الخمائر فهي كائنات حية أحادية الخلية تتكاثر بالتبرعم، ويوجد منها عدة أقسام؛ قسم منها نافعة للإنسان وأخرى مَرَضِيَّة مثل جنس المبيضات *Candida*. ويعدّ جنس المبيضات أكثر انتشاراً لامتلاكه عدة عوامل ضراوة، وكذلك لقدرتها على إحداث إصابات داخلية في القناة التنفسية والهضمية وقناة المجاري البولية والتناسلية، فضلاً عن دخولها في بعض الحالات إلى مجرى الدم.^{1, 2} وأشار بابون وآخرون³ أن المبيضات حوالي 150 نوعاً، تتضمن 20 نوعاً مرضية للإنسان، وأن 90% من الإصابات تسببها المبيضات البيض (*C. albicans*). كما توجد أنواع أخرى مرضية مثل (*C. glabrata*) و(*C. krusei*) و(*C. tropicalis*) و(*C. parapsilosis*). ويبيّن تشو وآخرون⁴ زيادة حدوث الإصابة بالمبيضات لأسباب عديدة، منها: ضعف المناعة بسبب الإصابة بفيروس العوز المناعي البشري (HIV) والاستعمال الطويل للأدوية المثبطة للمناعة وزرع الأعضاء، وتصيب الأطفال حديثي الولادة وكبار السن أيضاً. وتشكل الإصابة التي تسببها المبيضات عبئاً ثقيلاً على الصحة العامة، وذلك لارتفاع معدل الوفيات.⁵ وتعدّ خميرة (*C. glabrata*) من أهم أنواع المبيضات من حيث قوتها الإراضية بعد المبيضات البيض (*C. albicans*)، وتتميز خميرة (*C. glabrata*) بعدم قدرتها على تكوين خيوط فطرية كاذبة (Pseudohyphae) وليس لها القدرة على التحول الثنائي (Dimorphic)، إلا أنها تُكوّن أبواغاً برعمية (Blastospore)، وتتميز مستعمراتها بأنها ملساء ناعمة وذات لون أبيض كريمي.⁶ ويبيّن تيمرمانس وآخرون⁷ ورسن⁸ أن خميرة (*C. glabrata*) تعدّ المسبب المرضي الفطري الذي يهدد حياة المرضى ويسبب المزيد من المشاكل في المستشفيات بسبب إظهارها مقاومة ذاتية للأدوية المضادة للفطريات. لذلك تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص خميرة (*C. glabrata*) من عينات سريرية في بعض مستشفيات مدينة بغداد وتحديد الغشاء الحيوي.

2- المواد وطرائق العمل

1-2 تحضير الأوساط الزرعية الجاهزة

حُضِر الوسطان السابرويد دكستروز أكار (Sabouraud Dextrose Agar) و(SDA)، و(SDB) Sabouraud Dextrose Broth حسب تعليمات الشركة المجهزة، وعُقمت جميع الأوساط الزرعية المستعملة بالمؤودة (Autoclave) بدرجة حرارة 121°م تحت ضغط 15 رطل/بوصة² لمدة 15 دقيقة.⁹

1-1-2 وسط (Brain heart infusion broth)

حُضِر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة بوزن 37 غم من الوسط الجاهز، ووضِع في دورق زجاجي وأُذيب في مقدار معين من الماء المقطر، وأُكمل الحجم إلى 1000 مل من الماء المقطر، بعدها عُقِم الوسط بالمؤودة بدرجة حرارة 121°م تحت ضغط 15 رطل/بوصة² مدة 15 دقيقة، واستعمل لتكوين الغشاء الحيوي لخميرة (*C. glabrata*).

وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار أقل فرق معنوي (LSD) واستعمل اختبار مربع كاي (Chi-Square) لمقارنة الفروق بين النسب المئوية، على مستوى احتمالية 0.05 و 0.10.

3- النتائج والمناقشة

3-1 توزيع المرضى المصابين بداء مبيضات الدم والفم

3-1-1 توزيع المرضى المصابين بداء مبيضات الدم

أظهرت نتائج جمع 80 عينة من دم المرضى المصابين بسرطان الدم من الرجال والنساء وجود 71 عذلة مرضية لأنواع جنس المبيضات (*Candida spp.*)، إذ بلغت 34 حالة مرضية سريرية لمرضى النساء وسجلت الفئة العمرية 50-65 سنة 17 حالة مرضية بنسبة 50% أما الفئة العمرية 20-30 سنة فسجلت 9 حالات مرضية بنسبة 26.5%، في حين سجلت الفئة العمرية 40-50 سنة 5 حالات بنسبة 14.7%، وأخيراً سجلت الفئة العمرية دون 17 سنة أقل الحالات؛ 3 حالات مرضية سريرية بنسبة 8.8% كما في الجدول (1)، وأظهرت النتائج وجود فروق معنوية جداً، وتم تسجيل جميع المعلومات لكل مريض.

الجدول 1. النسب المئوية لتوزيع النساء المصابات بداء مبيضات الدم نتيجة الإصابة بمرض سرطان الدم (Leukemia) حسب الفئات العمرية.

العمر	عدد النساء المصابات	النسبة المئوية لإصابة النساء (%)
65-50 سنة	17	50
50-40 سنة	5	14.7
30-20 سنة	9	26.5
دون 17 سنة	3	8.8
العدد الكلي	34	100%
Chi-Square (χ^2)	---	13.594*
P-value		0.0036

(P<0.05)*

أما الحالات المرضية لفئة الرجال فبلغت 37 حالة مرضية سريرية وإيجابية من ناحية وجود خميرة (*Candida spp.*)، وأظهرت النتائج ان الخميرة ايجابية لمرضى سرطان الدم للفئة العمرية 50-65 سنة في 14 حالة بنسبة 37.9%، تلتها الفئة العمرية 40-50 سنة بـ 11 حالة وبنسبة 29.7%، أما الفئة العمرية 20-30 سنة فوجد 7 حالات بنسبة 18.9%، وأخيراً الفئة العمرية دون 17 سنة فسجلت أقل الحالات؛ 5 حالات مرضية سريرية بنسبة 13.5%، ووجدت فروق معنوية بين المعاملات كما في جدول (2).

الباريوم ($BaCl_2$) في 1000 مل من الماء المقطر (المحلول الأول) وإضافة 1 مل من حامض الكبريتيك المركز (H_2SO_4) إلى 99 مل من الماء المقطر (المحلول الثاني)، وبعدها أضيف (0.05) من المحلول الأول إلى 9.95 مل من المحلول الثاني، وخلط جيداً، ووضع المحلول في أنابيب زجاجية محكمة الإغلاق لمنع التبخر، وحفظت في الظلام بدرجة حرارة الغرفة.

4-4-2 تحضير محلول بفر الفوسفات (Phosphate Buffer Saline, PBS)

حضر محلول بفر الفوسفات من 0.144 غم من فوسفات البوتاسيوم الأحادية (K_2HPO_4) و9 غم من كلوريد الصوديوم (NaCl) و0.795 غم من فوسفات ثنائي الصوديوم (Na_2HPO_4) ثم أذيبت هذه المكونات في 1000 مل من الماء المقطر) وضبطت درجة الحموضة على 7.2 وعُقدت مدة 15 دقيقة. ثم خزنت في الثلاجة عند 4 درجات مئوية إلى حين الاستعمال. استعمل هذا المحلول في دراسة أنواع (*Candida*) وتشخيصها، وفي اختبار تحضير عالق خميرة (*Candida*) وتثبيت الغشاء الحيوي لـ *Candida*.¹⁵

4-4-5 النمو على وسط كروم آكار (*Candida Chromogenic agar*)

بعد الحصول على عدة عزلات من خميرة (*Candida*) استعمل وسط (Chrom agar) لفصل أنواع *Candida* استناداً إلى لون المستعمرات؛ إذ أخذت العزلات ونُميت على الوسط المذكور أعلاه مدة 48 ساعة عند درجة حرارة 37°م، وسُجلت النتائج وحُسب لون المستعمرات لخميرة (*Candida*).¹⁶

4-4-6 اختبار تشخيص العزلات بجهاز (The Vitek2 Compact System)

استعمل نظام (Vitek2 Compact) لتأكيد تشخيص أنواع المبيضات المهمة سريرياً، وذلك حسب التعليمات التي وصفتها الشركة المصنعة (Biomérieux U.S.A)، واستعمل هذا الجهاز لتأكيد تشخيص أغلب أنواع *Candida* من خلال عدد تشخيصية خاصة بالجهاز.

5-2 اختبار عوامل الضراوة (Virulence factors test)

5-2-1 اختبار الأنبوب الجرثومي (Germ tube test)

وُضع في أنبوب الاختبار 0.5 مل من مصل دم إنسان، وأضيفت إليه مستعمرات الخميرة بعد يوم وحُضنت في درجة حرارة 37°م مدة 2-3 ساعات، بعدها وُضعت قطرة من العالق على شريحة زجاجية نظيفة وُضع عليها غطاء وفُحصت تحت المجهر الضوئي لملاحظة الأنبوب الجرثومي بشكل خيوط خيالية قصيرة.¹⁷

5-2-2 اختبار تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm formation test)

تم اختبار تكوين الغشاء الحيوي لخميرة (*Candida spp.*) باستعمال وسط (Brian heart infusion, BHI) بمقدار 37 غم/لتر وسكر الغلوكوز بمقدار 80 غم/لتر وآكار بمقدار 10 غم/لتر وصبغة الكونغو الحمراء (Gongo red stain) بمقدار 0.8 غم/لتر، وأذيبت هذه المكونات في 1000 مل من الماء المقطر وعُقدت ثم وُضعت في أطباق وتُركت لتبرد. نُميت خميرة (*Candida spp.*) على هذا الوسط وحُضنت مدة 24-48 ساعة في درجة حرارة 37°م وبثلاثة مكررات، استعملت صبغة (Gongo red) للكشف عن المبيضات المنتجة للغشاء الحيوي في المختبرات.¹⁸

6-2 التحليل الإحصائي

استعمل البرنامج الإحصائي (Statistical Analysis System, SAS)¹⁹ في تحليل البيانات لدراسة تأثير العوامل المختلفة في الصفات المدروسة،

الجدول 2. النسب المئوية لتوزيع الرجال المصابين بداء مبيضات الدم نتيجة الإصابة بمرض سرطان الدم (Leukemia) حسب الفئات العمرية

العمر	عدد الرجال المصابين	النسبة المئوية لإصابة الرجال (%)
65-50 سنة	14	37.9
50-40 سنة	11	29.7
30-20 سنة	7	18.9
دون 17 سنة	5	13.5
العدد الكلي	37	100%
Chi-Square (χ^2)	---	5.270*
P-value	---	0.0530

(P<0.05) *

تجوييف الفم عند الأطفال الذين يتلقون العلاج من مرض السرطان.²³ وأشار كاونوشافين²⁴ إلى اختراق الغشاء المخاطي للفم من قبل جنس *Candida* هو عامل خطر للإصابة بداء مبيضات الفم. وتتمثل أعراض الإصابة بظهور بقع بيضاء على سطوح الأغشية المخاطية المبطنة لتجوييف الفم واللسان والحنجرة، وتزداد هذه الحالة لدى الأطفال وتظهر أيضًا لدى البالغين. واتفقت دراستنا الحالية مع مارتينز وآخرين²⁵ الذين أوضحوا أن الأنواع تستعمر الغشاء المخاطي في الجهاز الهضمي 50% والممرات التنفسية وكذلك الفم والبلعوم والحنجرة. وأظهرت 7 عينات أعطت نتيجة إيجابية للفحص المجهرى من مسحات الفم للأطفال الذين يعانون من مرض القلاع الفموي (Oral thrush).²⁶ وبين¹⁷ أن خميرة (*C. glabrata*) و (*C. albicans*) هما أكثر الأنواع انتشارًا في اختراق الغشاء المخاطي للفم. وكذلك أجريت دراسة على 110 مريض يعانون من مرض القلاع الفموي، ووجد أن 24% من الحالات تسببها خميرة (*C. glabrata*).²⁷

2-3 تشخيص الخميرة (Identification of yeast)

1-2-3 الخصائص الزرعية (Cultural Characteristics)

شكلت المستعمرات لأنواع المبيضات على وسط (SDA) شكلًا بيضويًا إلى بيضاوي مستدير، محدبة ولسسة مع رائحة خميرة مميزة (الشكلان 2و1). وتمتاز الخميرة بسرعة نموها ونضوجها خلال 48-72 ساعة. وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه إيمونز وآخرون²⁸ الذين أوضحوا أن خميرة (*C. glabrata*) تشكل مستعمرات ناعمة ولامعة وكريمية اللون. كما أظهرت دراستنا الحالية أن خميرة (*C. glabrata*) هي المبيضات الوحيدة التي لا تشكل خيوطا فطرية كاذبة (Pseudohypha) في درجات حرارة أعلى من 37°م وهذه النتائج تتفق مع كالديرون وكلانسي²⁹ اللذين بيّنا أن مستعمرات خميرة (*C. glabrata*) ذات لون كريمي ويبلغ قطر خلاياها 4-1 ميكرونات وتكون أصغر من خلايا (*C. albicans*). كذلك أشار محمد³⁰ إلى أن خميرة (*C. glabrata*) شكلت مستعمرات ناعمة ولامعة ويمكن تمييزها تقريبًا عن تلك المبيضات الأخرى بحجمها النسبي الصغير جدًا.



الشكل 1. مستعمرات خميرة (*Candida glabrata*) بعد زراعتها على وسط (SDA) في درجة حرارة 37°م بعد 24 ساعة

تشكل إصابات مجرى الدم (Blood Stream infection) التي يسببها جنس *Candida* خطورة وتهديدًا للحياة المرضى في جميع أنحاء العالم التي ترتبط بمعدل وفيات يصل إلى 38% خلال إطالة البقاء في المستشفى.²⁰ وهذا يتفق مع زاوتيس وآخرين²¹ الذين وضحو أن أنواع المبيضات رابع أكثر الأنواع شيوعًا والمسببة للتهاب مجرى الدم وتسبب داء المبيضات (Candidiasis) للمرضى المقيمين في المستشفى، ويبتنوا سبب زيادة الإصابة في هذه الفئات العمرية بسبب توفر ظروف مناسبة مثل نقص المناعة واستعمال المضادات الحيوية على المدى الطويل والإصابة بالأورام الخبيثة وهذا يتفق مع شلينز²² الذي بيّن أن التناول المتكرر للمضادات الحيوية والقسطرة الوريدية المركزية والأجهزة الغازية وجراحة البطن والإقامة في وحدة العناية المركزة يعرض المرضى للإصابة بداء المبيضات.

2-1-3 توزيع داء المبيضات الفموي عند الأطفال حسب الفئات العمرية

لوحظ في الجدول (3) عدم وجود فروق معنوية، وسُجلت 43 إصابة للأطفال بداء المبيضات الفموية من أصل 50 طفلًا مصابًا بسرطان الدم، إذ سجلت الفئة العمرية 5-8 سنوات 18 حالة بنسبة 42%، تلتها الفئة العمرية 10-12 سنة فسجلت 16 حالة بنسبة 37%، وبعدها الفئة العمرية 8-10 سنوات التي سجلت أقل حالات الإصابات بلغت 9 حالات بنسبة 21%.

الجدول 3. النسب المئوية لتوزيع الأطفال المصابين بالمبيضات الفموية حسب الفئات العمرية

العمر	عدد الإصابات في الأطفال	النسبة المئوية لإصابة الأطفال (%)
8-5 سنوات	18	42
10-8 سنوات	9	21
12-10 سنة	16	37
العدد الكلي	43	100%
Chi-Square (χ^2)	---	3.152 NS
P-value	---	0.206

NS: Non-Significant

المبيضات الفموية واحدة من أكثر الأمراض الفطرية الانتهازية شيوعًا في

الجدول 4. تشخيص أنواع المبيضات على وسط (Candida Chromagar)

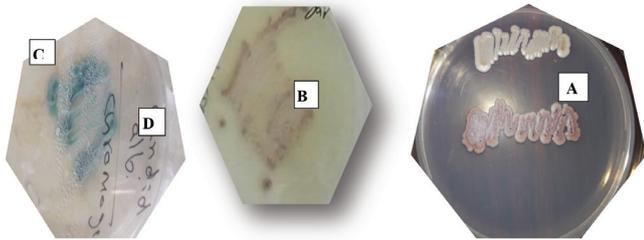
أنواع جنس المبيضات	مكان جمع العينات	نتائج الألوان للمستعمرات	عدد العزلات
<i>C.glabrata</i>	مستشفى مدينة الطب/محافظة بغداد	وردي فاتح أرجواني Light White-Purple	72
<i>C.albicans</i>	مستشفى مدينة الطب/محافظة بغداد	أخضر Green	27
<i>C.tropicalis</i>	مستشفى مدينة الطب/محافظة بغداد	أزرق Blue	8
<i>C.krusei</i>	مستشفى مدينة الطب/محافظة بغداد	بنفسجي-وردي purple-pink	4
<i>C.kefyer</i>	مستشفى مدينة الطب/محافظة بغداد	أبيض White	3



الشكل 2. مستعمرات خميرة (*Candida glabrata*) بعد زراعتها على وسط (SDB) في درجة حرارة 37°م بعد 24 ساعة

2-2-3 تشخيص خميرة (*C. glabrata*) بواسطة وسط كروم آكار (Identification of *Candida glabrata* by Chromagar)

تُميت المبيضات المعزولة من عينات سرطان الدم على الوسط الاختباري (*Candida chromagar*) بعد حضانها مدة 48 ساعة في درجة حرارة 37°م (جدول 4). وشخصت الخميرة بالاعتماد على لون المستعمرات وحسب الشركة المصنعة للوسط، إذ ظهر لون وردي فاتح على وسط (Chrom agar) لمستعمرات خميرة (*C.glabrata*) الشكلان (3 و 4) وتوافقت النتائج مع ما توصل إليه مانيكاندان وأمسات³¹ بظهور المستعمرات بلون وردي فاتح عند تنميتها على الوسط (*Candida chrom agar*).



الشكل 4. مستعمرات (*Candida spp.*) على وسط (Candida Chrom agar) (A)- *C.kefyer*, (B)- *C.albicans*, (C)- *C.Parasilosis*, (D)- *C.krusei*

3-3 توزيع النسب المئوية لأنواع المبيضات المعزولة من عينات سريرية

شخصت 114 عزلة خميرة (*Candida*) من مجموع 130 عينة سريرية، وشخصت الأنواع التابعة لجنس المبيضات الحالية بالاعتماد على الخصائص الزرعية والمظهرية، وتم الحصول على 71 عزلة من عينات سريرية من مرضى سرطان الدم من النساء والرجال، حيث أظهرت النتائج عزل خميرة (*C. glabrata*) من مجموع 71 عزلة بنسبة 83.1%، في حين بلغت أعداد العزلات لخميرة (*C. albicans*) و(*C. tropicalis*) و(*C. krusei*) و(*C.kefyer*)، على التوالي ووجدت فروق معنوية جداً بين المعاملات كما في الجدول (5).



الشكل 3. مستعمرات خميرة (*Candida glabrata*) على وسط (*Candida Chromagar*) في درجة حرارة 37°م بعد 24 ساعة

الجدول 5. النسب المئوية لتوزيع المبيضات المعزولة من مرضى سرطان الدم من النساء والرجال.

أنواع جنس المبيضات	أعداد العزلات لمرضى سرطان الدم للنساء والرجال	النسبة المئوية لإصابة النساء والرجال (%)
<i>C.glabrata</i>	59	83.1
<i>C.albicans</i>	6	8.5
<i>C.tropicalis</i>	3	4.2
<i>C.krusei</i>	2	2.8
<i>C.kefyer</i>	1	1.4
العدد الكلي	71	100
Chi-Square (χ^2)	---	177.662**
P-value	---	0.0001

(P<0.01)**

الجدول 6. توزيع النسبة المئوية للمبيضات المعزولة من فم الأطفال المصابين بمرض سرطان الدم.

أنواع جنس المبيضات	أعداد العزلات لمرضى سرطان دم من الأطفال	النسبة المئوية لإصابة الأطفال (%)
<i>C.albicans</i>	21	48.8
<i>C.glabrata</i>	13	30.2
<i>C.tropicalis</i>	5	11.6
<i>C.krusei</i>	2	4.7
<i>C.kefyer</i>	2	4.7
العدد الكلي	43	100
Chi-Square (χ^2)	---	31.767**
P-value	---	0.0001

(P<0.01)**

عينات سريرية مختلفة، وصلت نسبة المبيضات البيض إلى 52%، وهي من أكثر الأنواع شيوعاً والمعزولة من الفم. وتتفق هذه النتائج كذلك مع العبادي³⁹ الذي أشار إلى أن نسبة العزلة للمبيضات البيض من الفم كانت 63%، بينما تم عزل الأنواع الأخرى مثل (*C.glabrata*) و(*C.krusei*) بنسبة 14.2% و 8.69% على التوالي. وكذلك اتفقت هذه النتائج مع حسين⁴⁰ إذ عزل 5 أنواع عائدة لجنس المبيضات من تجويف الفم وقد جاء النوع (*C.albicans*) في مقدمتها وتلتها الأنواع التالية (*C.tropicalis*) و(*C.krusei*) و(*C.glabrata*).

4-3 تشخيص خميرة (*Candida glabrata*) بواسطة نظام (Vitek2Compact System)

تم الحصول على 71 عزلة من خميرة (*C.glabrata*) التي شخصت بطرائق زرعية ومظهرية ومجهرية باستعمال الوسط الاختباري (*Candida chrom agar*)، وقد بينت النتائج من خلال استعمال نظام (Vitek2Compact) أن العزلات كانت مطابقة وأن جميعها يعود إلى خميرة (*C.glabrata*).

5-3 تحديد عوامل الضراوة لخميرة (*Candida glabrata*)

1-5-3 تكوين الأنبوب الجرثومي (Germtube formation)

أظهرت نتائج الاختبار أن جميع العزلات العائدة للنوع (*C.glabrata*) قد كوّنت الأنبوب الجرثومي لكن ليس بوضوح إذ ظهر الأنبوب الجرثومي ضعيفاً، وأعطت نتيجة إيجابية عند حضنها في درجة حرارة 37 م° مدة 3 ساعات في 0.5 مل من مصل دم الإنسان (الشكل 5)، لكن جميع الأنواع الأخرى لم تكوّن الأنبوب الجرثومي تحت الظروف نفسها، وتتفق النتائج مع أكوثرنا وزميلي⁴¹ الذين وضحو أن الأنبوب الجرثومي في هذا الاختبار وبإضافة المحفز (المصل) قد عمل على تكوينه حول خلية الخميرة. فضلاً عن دوره المهم في عملية اختراق طبقة الخلايا الطلائية المبطنة للجسم والأنسجة والوصول إلى مجرى الدم فضلاً عن ذلك يعتقد أنه ضروري لتغذية الخميرة.⁴²

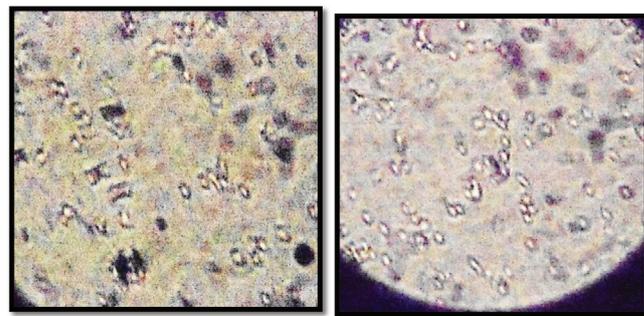
وتوافقت هذه النتائج مع ليوزميلي³² إذ أوضحوا أن خميرة (*C.glabrata*) تعدّ ثاني أكثر الأسباب شيوعاً بنسبة 24% من مجموع مبيضات الدم (Candidemia) في الولايات المتحدة الأمريكية، وفي عام 2004 تم عدّ خميرة (*C.glabrata*) المسبب الرئيس لداء مبيضات الدم، وتم الكشف عن معدلات وفيات للمرضى المصابين بداء مبيضات الدم بسبب خميرة (*C.glabrata*) بنسبة 50% في مرضى السرطان ونسبة 100% في مرضى نخاع العظم، على الرغم من أن (*C.albicans*) هي الأكثر شيوعاً والمعزولة من الدم، إلا أن (*C.glabrata*) لها تأثير خطير بين أنواع المبيضات وترتبط بمعدل وفيات مرتفع، وذلك لأنها أهمية خاصة بسبب مقاومتها المتزايدة للمضادات الفطرية وبالتحديد "الأزولات" (Azoles).³³ وهذا يتوافق مع ما وجده فيديل وزميله³⁴ الذين أشاروا إلى وجود نمط ظاهري رئيس وعامل ضراوة محتملة تمتلكه (*C.glabrata*) وهو مقاومة ذاتية منخفضة المستوى لأدوية "الأزول" وهي أدوية مضادة للفطريات والأكثر شيوعاً بما في ذلك أدوية الفلوكانازول والكيبتوكونازول التي تعدّ غير فعالة في 15-20% ضد *C.glabrata*، في حين أن المضادات مثل الأمفوتريسن B والنيستاتين لها تأثير فعال.

ويوضح الجدول (6) العزلات الفموية من الأطفال المصابين بمرض سرطان الدم؛ وجود 43 عزلة لجنس المبيضات وكانت 13 عزلة لخميرة (*C.glabrata*) بنسبة 30.2%، في حين بلغت أعداد العزلات (*C.albicans*) و(*C.tropicalis*) و(*C.krusei*) و(*C.kefyer*) 5، 21، 2، و 2 على التوالي وسجلت فروق معنوية جداً بين المعاملات.

كان نوع المبيضات البيض (*C.albicans*) في هذه الدراسة أكثر العوامل المسببة لمرض القلاع الفموي (oral thrush) التي سجلت 21 عزلة بنسبة 48.8% من إصابة المبيضات. وهذه النتائج مماثلة لما توصل إليه أوغبا وآخرون³⁵ الذين أظهر أن نسبة عزلات المبيضات البيض كانت 74% على التوالي تقريباً، ونتائج محمد والأحمدي³⁶ اللذين بينوا أن نسبة المبيضات البيض 61% عند الإصابة بمرض القلاع الفموي. في حين أن (*C.glabrata*) كانت أكثر الأنواع انتشاراً بعد المبيضات البيض في دراستنا الحالية. وتتفق هذه النتائج مع نتائج محمد³⁷ الذي وجد أن (*C.glabrata*) و(*C.albicans*) كانت أكثر أنواع الخميرة شيوعاً المعزولة من فم المرضى المصابين بداء مبيضات الفم بنسبة 45% و 5.44% على التوالي. في حين ذكر ديفي وماهيشواري³⁸ أن من بين 60 عزلة من المبيضات المعزولة تم عزلها من

red agar) لتحديد قدرة خميرة (*Candida*) على تكوين الغشاء الحيوي، إذ تعد هذه الطريقة بسيطة وموثوقة لتحديد الغشاء الحيوي. وظهر تباين في النتائج بين العزلات في إنتاجها للغشاء الحيوي ما بين القوي والضعيف. وأظهرت 24 عزلة لخميرة (*C. glabrata*) عدم إنتاجها للغشاء الحيوي من مجموع 72 عزلة، في حين تفاوتت العزلات الأخرى ما بين القوية 21 عزلة، والضعيفة 27 عزلة لإنتاجها للغشاء الحيوي. أما خميرة (*C. albicans*) فكانت 11 عزلة لم تنتج الغشاء الحيوي من مجموع 27 عزلة و7.9 عزلات أظهرت إنتاجاً قوياً وضعيفاً على التوالي. ووجد لخميرة (*C. krusei*) عزلة واحدة لم تنتج الغشاء الحيوي من مجموع 4 عزلات و1.2 عزلات أظهرت إنتاجاً قوياً وضعيفاً على التوالي. وسجلت خميرة (*C. kefyer*) إنتاج جميع عزلاتها للغشاء الحيوي وبالغلة 3 عزلات، وأظهرت 1.2 إنتاجاً قوياً وضعيفاً على التوالي، وأخيراً وُجدت عزلتان من خميرة (*C. tropicalis*) لم تنتج الغشاء الحيوي من أصل 8 عزلات، وتوزعت بين 2 إنتاج قوي و4 إنتاج ضعيف، ووجدت فروق معنوية جداً بين الغشاء الحيوي وأنواع المبيضات المختلفة.

الجدول 7. تشكيل الغشاء الحيوي من 114 عزلة لجنس المبيضات بواسطة (Gongo red agar).



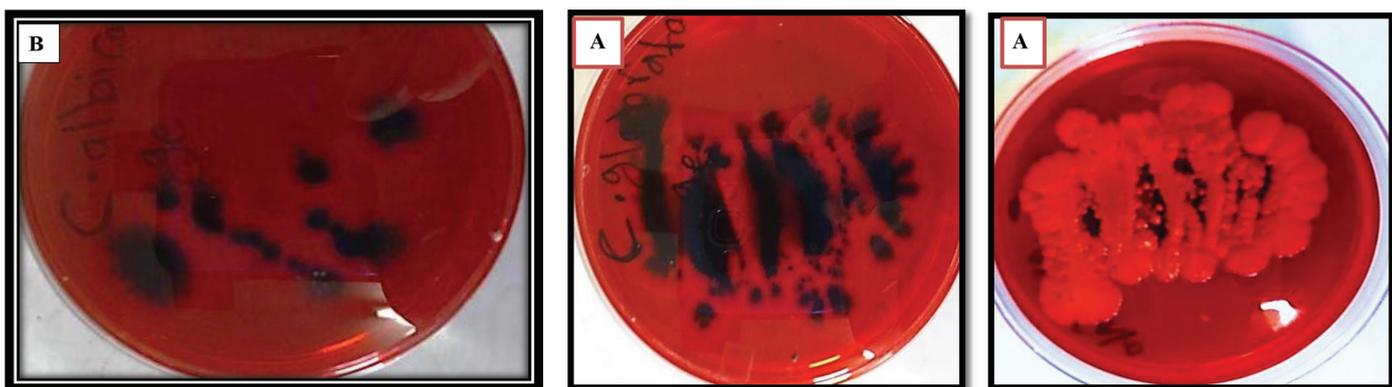
الشكل 5. الأنبوب الجرثومي لخميرة (*Candida glabrata*) على مصل دم الإنسان عند درجة 37 م° مدة 3 ساعات (40X)

2-5-3 تحديد الغشاء الحيوي لخميرة (*Candida spp.*)

أظهرت تجارب تحديد الغشاء الحيوي (Biofilm) بوجود 114 عزلة من المبيضات، وكانت 76 عزلة إيجابية و38 أخرى سلبية للغشاء الحيوي لمرضى سرطان الدم من النساء والرجال وفم الأطفال المصابين بداء مبيضات الفم كما في الجدول (7) والشكل (6)، واستعملت طريقة كونغو أكار (Gongo)

Candida spp.	عدد العزلات	النسبة المئوية للعزلات (%)	عدد العزلات السالبة للغشاء الحيوي	قوي	ضعيف	عدد العزلات الموجبة للغشاء الحيوي
<i>C. glabrata</i>	72	63.2	24	21	27	48
<i>C. albicans</i>	27	23.7	11	9	7	16
<i>C. krusei</i>	4	3.5	1	2	1	3
<i>C. kefyer</i>	3	2.6	0	1	2	3
<i>C. tropicalis</i>	8	7	2	4	2	6
العدد الكلي	114	100	38	37	39	76
Chi-Square (χ^2)	**21.548		**10.063	---	---	**11.437
P-value	0.0001		0.0026			0.0003

** (P<0.01)



الشكل 6. تشكيل الغشاء الحيوي (Biofilm) بواسطة طريقة (Gongo red agar) (*C. glabrata*, (A)- *C. albicans*, (B)-

لجهاز المناعي للمضيف والمضادات الحيوية. كما تتفق دراستنا مع ساتيا وآخرين⁴⁴ الذين بينوا أن خميرة (*C. glabrata*) أعطت نتيجة إيجابية لإنتاج الغشاء الحيوي بين 40 عزلة لأنواع (*Candida*) بنسبة 80%، تلتها خميرة (*C. tropicalis*) بنسبة 38.8%. وهذا يتوافق مع سيلفا وآخرين⁴⁵ الذين بينوا

يعدّ الغشاء الحيوي (Biofilm) من أهم عوامل الضراوة للمبيضات التي تؤدي دوراً رئيساً في الإصابة بداء المبيضات، وهذا يؤكد ما توصل إليه ماريوسفراز⁴³ اللذان أشارا إلى أن 60% من الإصابات المرضية للإنسان مرتبطة بالغشاء الحيوي الذي تكوّنه الكائنات الدقيقة التي تكوّن مقاومة

أن مجموعة العزلات التي حصلنا عليها 81 عزلة من مجموع 111 عزلة من المبيضات أنتجت الغشاء الحيوي وأعطت نتيجة إيجابية. وبين داغوزميلاه⁴⁸ أن إنتاج الغشاء الحيوي هو سمة خاصة بالمبيضات الإمرضية حسب دراسة أجروها، إذ أعطت (*C. albicans*) و(*C. glabrata*) إيجابية أعلى لإنتاج الغشاء الحيوي مقارنة بأنواع المبيضات الأخرى.

أن خميرة (*C. glabrata*) لها القدرة على تشكيل الغشاء الحيوي بنسبة كبيرة ولها أهمية بيئية، إذ تساعد على بقاء الخميرة على قيد الحياة كمرضات للإنسان من خلال السماح لها للهروب من آليات مناعة المضيف ومقاومة المضادات الفطرية، كما أن تشكيل الغشاء الحيوي في خميرة (*C. glabrata*) يعدّ عاملاً أساسياً في بقاء النوع. ووجد خاطر والنوري⁴⁶ أن 41 عزلة من أصل 75 من المبيضات أنتجت الغشاء الحيوي. كما أشار مهندس وبلال⁴⁷ إلى

المراجع

- Dota KFD, Consolaro MEL, Svidzinski TIE, Bruschi ML. Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011;8.
- Mahmoudabadi AZ, Zarrin M, Fard MB. Antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from candiduria. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(1):24–28.
- Papon, N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: Beyond the *Candida albicans* paradigm. PLOS Pathogens. 2013;9(9):1–4.
- Chu JH, Feudtner C, Heydon K, Walsh TJ, Zaoutis TE. Hospitalizations for endemic mycoses: A population-based national study. Clinical Infectious Diseases. 2006;42(6):822–825.
- Liu X, Ma Z, Zhang J, Yang L. Antifungal compounds against *Candida* infections from traditional Chinese medicine. BioMed Research International. 2017;12.
- Lipperheide V, Bikandi J, Garcia-Fernandez JF, Quindós G, Pontón J. Colony variation in *Candida glabrata* isolates from patients with vaginitis. Revista Iberoamericana de Micología. 2002;19(3):161–164.
- Timmermans B, De Las Peñas A, Castaño I, Van Dijck P. Adhesins in *Candida glabrata*. Journal of Fungi. 2018;4(2):60.
- Risan MH. Molecular identification of yeast *Candida glabrata* from candidemia patients in Iraq. Iraqi Journal of Science. 2016;57(2A):808–813.
- Olaniyi OO, Adebawale O. Production and partial purification of beta-mannanase from *Aspergillus niger* associated with Ilaje Lake, Ondo State, Nigeria. Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access. 2017;5(3):281–285.
- Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A. A practical medical microbiology. 14th ed. New York: Churchill Livingstone; 1996.
- Vandeppitte J, Engbaek K, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. Geneva: World Health Organization; 1991. V. 85.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 1999.
- Milan EP, Zaror L. Laboratory diagnosis of some types of fungi: Medical mycology. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004.
- Zimbro M, Power DA. Difco and BBL manual: Manual of microbiological culture media. 2nd ed. Sparks, MD: Becton, Dickinson and Company; 2009.
- Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, Root RK. Laboratory manual of neutrophil function. New York: Raven Press; 1986.
- Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar Candida. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2006;5:1.
- Yan LJ, Thangthaeng N, Sumien N, Forster MJ. Serum dihydrolipoamide dehydrogenase is a labile enzyme. Journal of Biochemical and Pharmacological Research. 2013;1(1):30–42.
- Saxena N, Maheshwari D, Dadhich D, Singh S. Evaluation of Congo Red Agar for detection of biofilm production by various clinical *Candida* isolates. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences. 2014;3(59):13234–13238.
- SAS. Statistical analysis system: User's guide. Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 2012.
- Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-acquired candidemia: The attributable mortality and excess length of stay. Archives of Internal Medicine. 1988;148(12):2642–2645.
- Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: A propensity analysis. Clinical Infectious Diseases. 2005;41(9):1232–1239.
- Schelenz S. Management of candidiasis in the intensive care unit. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008;61(Suppl. 1):31–34.
- Sonis ST, Fey EG. Oral complications of cancer therapy. Oncology (Williston Park). 2002;16(5):680–686.
- Cannon RD, Chaffin WL. Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. Journal of Dental Education. 2001;65(8):785–787.
- Martins N, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Henriques M. Candidiasis: Predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. Mycopathologia. 2014;177(5–6):223–240.
- Mohamed BJ, AL-Hussain RA, AL-Thwani AN. Study the inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus* isolated from yoghurt as probiotics on *Candida albicans* growth *in vitro* and *in vivo*. Iraqi Journal of Biotechnology. 2010;9(2):167–179.
- Meurman JH, Siikala E, Richardson M, Rautemaa R. Non-*Candida albicans* *Candida* yeasts of the oral cavity. In Méndez-Vilas A, editor. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. Badajoz, Spain: Formatex Research Center; 2007. pp. 719–731.
- Emmons CW, Binford CH, Utz JP, Chung KJ. Candidiasis. In: Medical mycology. 2nd ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1974. Ch. 14. pp. 167–182.

29. Calderone RA, Clancy CJ. (2002). *Candida and candidiasis*. Washington, DC: ASM Press.
30. Mohammed NA. Detection of *Candida* spp. and other pathogens responsible for vulvovaginitis in women with contraceptive methods. MSc thesis. College of Science, University of Baghdad, Iraq; 2012.
31. Manikandan C, Amsath A. Isolation and rapid identification of *Candida* species from the oral cavity. International Journal of Pure & Applied Bioscience. 2013;1(3):23–27.
32. Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: An emerging oral opportunistic pathogen. Journal of Dental Research. 2007;86(3):204–215.
33. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Miller CB, Karp JE, Saral R. Association of *Torulopsis glabrata* infections with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patients. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1993;37(9):1847–1849.
34. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clinical Microbiology Reviews. 1999;12(1):80–96.
35. Ogba OM, Abia-Bassey LN, Epoke J, Mandor BI, Iwatt GD. Characterization of *Candida* species isolated from cases of lower respiratory tract infection among HIV/AIDS patients in Calabar, Nigeria. World Journal of AIDS. 2013;3(3):201–206.
36. Mohamed SAA, Al-Ahmady ZZ. Biofilm formation and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from various clinical specimens. Microbiology Research Journal International. 2013;3(4):590–601.
37. Mohammed NA. Molecular detection of biofilm encoding genes in *Candida albicans* isolated from different sources. PhD thesis. College of Science, Baghdad University, Iraq; 2017.
38. Devi LS, Maheshwari M. Speciation of *Candida* species isolated from clinical specimens by using Chrom agar and conventional methods. International Journal of Scientific and Research Publications. 2014;4(3):1–5.
39. Al-Oebady MAH. Isolation and identification of *Candida* species from vaginal, urine and oral swabs by chromagar *Candida*. International Journal of Advanced Research. 2015;3(1):948–956.
40. Hussain RA. A comparison of biological and molecular parameters of some *Candida* species sensitive and resistant to some antifungal agents. PhD thesis. College of Science, Kufa University, Iraq; 2011.
41. Akortha EE, Nawaugo VO, Chikwe NO. Antifungal resistance among *Candida* species from patient with genitourinary tract infection isolated in Benin City, Edo State, Nigeria. African Journal of Microbiology Research. 2009;3(11):694–699.
42. Sudbery P, Gow N, Berman J. Biodiversity of clinical *Candida albicans*. Trends in Microbiology. 2004;38(6):869–881.
43. Maric S, Vranes J. Characteristics and significance of microbial biofilm formation. Periodicum Bilogorum. 2007;109(2):115–121.
44. Sathya T, Sheeba MA, Moorthy K, Punitha T, Vinodhini R, Saranya AS. *Candida albicans* non-*albicans* species: A study of biofilm production and putative virulence properties. Journal of Harmonized Research in Pharmacy. 2015;4(1):64–75.
45. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. *In vitro* biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. Current Microbiology. 2010;61(6):534–540.
46. Khater ES, Al-Nory MH. Exoenzymes activity and biofilm production in *Candida* species isolated from various clinical specimens in Benha University Hospital, Egypt. Microbiology Research Journal International. 2014;4(6):654–667.
47. Mohandas V, Ballal M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production: A study on hospitalized patients in Southern India. Journal of Global Infectious Diseases. 2011;3(1):4–8.
48. Dag I, Kiraz N, Oz Y. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinical *Candida* isolates. African Journal of Microbiology Research. 2010;4(24):2763–2768.