Journal of Education and Science
Vol. 27, No.2, 2018, pp. 75-94
ISSN 1812-125X
http://edusj.mosuljournals.com

دراسة التاثير التثبيطي لحليب الام ومقارنته مع اللبأ في عزلات خميرة *Candida albicans* المعزولة من المرضى المصابين بداء المبيضات الفموي في مدينة الموصل وتاثيرهما في انتاجها لانزيم الفوسفولايبيز

رافعة قادر جرجيس الزبيدي **رافع قاسم محمد الطائي**

قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة الموصل

تأريخ الاستلام 2013/08/25 *تأريخ القبول 2014/01/08*

Abstract

The current study was included isolation and identification of the yeast *Candida albicans* from patients infected with oral candidiasis. Thirty six yeast isolates were obtained grown on Sabouraud's dextrose agar medium (SDA) , the colony colour was from white to creamy and it was smooth with curved surface . Symbols were given to isolates from RA1 to RA36 in order to differentiate them. Identification by Vitek 2 Compact system showed that 29 isolates belonging to the species *C. albicans* .

This study included the evaluation of phospholipase enzyme production on egg yolk agar for all *C. albicans* isolates and the results showed that 23 isolates (79.31%) were producers of the enzyme and precipitation zone (Opaque zone) was observed around the grown colonies with different precipitation zones.

Evaluation of the effect of colostrum and mother's milk was carried out on growth of 10 isolates of *C. albicans* exhibiting highest activity in its production of enzyme. There wasn't any inhibitory effect noted on the isolates understudy at the concentrations 1, 2, 4, 8, 16 and 32% of colostrum or milk by agar dilution – streak assay and also by disk diffusion method at the concentration 100% , but the effect on phospholipase production was observed of colostrum at the concentration 32% on three isolates , namely RA4, RA6 and RA13 (30%), whose production was reduced The test also showed that the effect of milk at the concentration 32% reduced the production of isolates RA4 and RA13 (20%) .

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص خميرة الـ *Candida albicans* من المرضى المصابين بداء المبيضات الفموي في مدينة الموصل ، إذ تم الحصول على 36 عزلة خميرية وقد ظهرت العزلات النامية على الوسط SDA في العزل الاولي بشكل مستعمرات بيضاء الى كريمية اللون وناعمة وزبدية وذات شكل محدب ، اعطي لهذه العزلات رموز من RA1-RA36 من اجل التمييز بينها. بعد اجراء تشخيص للعزلات بنظام Vitek 2 Compact تبين ان 29 عزلة فقط تعود للنوع *C. albicans*.

جرى دراسة فعالية العزلات في انتاج انزيم الفوسفولايبيز Phospholipase على وسط مح البيض الصلب Egg yolk agar واظهرت النتائج ان هناك اختلاف بين العزلات في فعالية انتاج الانزيم اذ ان 23 عزلة من الـ *C. albicans* أي بنسبة 79.3 كانت منتجة للانزيم اذ ظهرت منطقة بيضاء كثيفة حول المستعمرات النامية هي منطقة الترسيب وكانت العزلات المنتجة متفاوتة فيما بينها في معدلات الانتاج Pz values.

كما تم دراسة التاثير التثبيطي لكل من اللبأ وحليب الام في نمو 10 عزلات من الـ *C. albicans* والتي اظهرت اعلى انتاجية لانزيم الفوسفولايبيز ولم يظهر أي من اللبأ او الحليب عند التراكيز المدروسة (1 و 2 و 4 و 8 و 16 و 32%) تاثيرا تثبيطيا في العزلات بطريقة التخطيط – تخفيف الاكار وكذلك عند التركيز 100% بطريقة الانتشار بالقرص ولكن عند دراسة تاثيرهما في انتاج الفوسفولايبيز فقد انخفض انتاج 3 عزلات من مجموع العزلات المدروسة عند التركيز 32% من اللبأ وشملت العزلات RA4 و RA6 و RA13 أي بنسبة 30% اما عند دراسة تاثير الحليب عند التركيز 32% فقد انخفض انتاج العزلتين RA4 و RA13 أي بنسبة 20% .

المقدمة

ان داء المبيضات والذي يطلق عليه ايضا Candidosis او Moniliasis (1) هو اصابة انتهازية سطحية تنشأ بسبب عوامل موضعية او جهازية ويشار اليه بانه اصابة خميرية او سلاق Thrush ويتسبب بواسطة الفطر *Candida* ، اما داء المبيضات الفموي Oral candidiasis فهو اصابة انتهازية موضعية شائعة للغشاء المخاطي الفموي وقابلة للعلاج وتظهر عند الاطفال والمسنين والاشخاص الذين لديهم نقص في المناعة الخلوية Cellular immune deficiency وتظهر اعراض الاصابة بشكل لويحات بيضاء White plaques على الغشاء المخاطي الفموي والحنك واللسان او البلعوم الفموي (2,3) وهذا الداء

تسببه خميرة *C. albicans* (2). والكثير من البحوث اشارت الى ان عدم التوازن المناعي النوعي في الاستجابة لخميرة *C. albicans* له دور في نشوء داء المبيضات الفموي (4). وحدد عدد من الباحثين ثلاثة عوامل بشكل عام ممكن ان تؤدي الى الاصابة بداء المبيضات الفموي وهي الحالة المناعية للعائل وبيئة الغشاء المخاطي الفموي وخصوصية عزلة الـ *C. albicans* (5).

ان النوع *C. albicans* يتواجد في التجويف الفموي بالشكل التعايشي Commensal غير المؤذي في 50% من الاشخاص الاصحاء ، فضلا عن ان هناك انواعاً اخرى تم عزلها من الفم بصورة متكررة مثل *C. parapsilosis* و *C. tropicalis* و *C. krusei* و *C. glabrata* والنوع المعزول حديثاً *C. dubliniensis* (6) . ولكن معظم اصابات الجنس *Candida* تسببها عزلات *C. albicans* وتعد اكثر الانواع امراضية (7). ان خميرة *C. albicans* لديها عوامل ضراوة Virulence factors واستراتيجيات نوعية تساعدها على التمركز واحداث المرض والتغلب على الوسائل الدفاعية للعائل ، فهي باستطاعتها النمو باشكال مظهرية متنوعة Polymorphism تتدرج ما بين خميرة احادية الخلية متبرعمة (البوغ المتبرعم) (Blastospore) Unicellular budding yeast وخيوط كاذبة Pseudohyphae وخيوط حقيقية True hyphae وهذا التحول في الشكل يُعد من اهم عوامل الضراوة لانها تساعدها في اجتياح الانسجة والهروب من الخلايا البلعمية Phagocyte cells ، وهناك عوامل اخرى لها علاقة بالضراوة مثل انتاج بروتين الهيمولايسين Hemolysin وتكوين انبوب الانبات وانتاج السموم وانتاج انزيمات مثل الفوسفولايبيز Phospholipase والبروتينيز Proteinase والالتصاق بالخلايا الظهارية والحفاظ على سلامة جدارها الخلوي وتجنب الاستجابة المناعية للعائل (8 , 9 , 10) نشرت في السنوات الاخيرة الكثير من البحوث حول انزيم الفوسفولايبيز بوصفه عامل امراضية مهما في الـ *C. albicans* (11) ويسهم في ضراوة الـ *C. albicans* فهو يعمل على تحلل خلية العائل او يغير من مواصفات سطح خلية العائل وبالتالي تزيد من قابلية خلايا الـ *Candida* على الالتصاق بها، وكذلك يسهل من عملية الاختراق وبالتالي اجتياح خلايا العائل (12).

لقد لوحظ انه خلال فترة الرضاعة ان حليب الام يؤدي دورا مهما في حماية الطفل الرضيع من الامراض وتشير الدراسات ان حدوث الاصابات المرضية في الجهاز التنفسي والجهاز المعدي المعوي يكون اقل في الاطفال الذين يتناولون حليب الام بالمقارنة مع اخرين لا يعتمدون على حليب الام في تغذيتهم ، ومن المحتمل ان يكون هذا التاثير طويل الامد في الوقاية من الامراض المزمنة، كما اثبتت الدراسات ان لحليب الام تاثيرات مضادة للاحياء المجهرية (13)، ان المكونات الفعالة للحليب والتي تشمل عدة بروتينات تظهر كلا التأثيرين المثبط

Bacteriostatic والقاتل Bactericidal للبكتريا ومن هذه المكونات الكلوبين المناعي A Immunoglobin و لاكتوفرين Lactoferrin و لاكتوبيروكسديز Lactoperoxidase ومركبات اخرى مثل السكريات قليلة الوحدات Oligosaccharides والتي تثبط التصاق الخلايا البكتيرية بسطوح الخلايا الظهارية (14 , 15).

فضلا عن تاثيراته المضادة للبكتريا فان لحليب الام ايضا تاثيرات مضادة للفايروسات Antiviral وللطفيليات Antiparasitic داخل *In vivo* وخارج الجسم الحي *In vitro* ، ولكن قليل من الدراسات تهتم بالتاثيرات المضادة للفطريات Antifungal إذ لوحظ ان الخلايا البلعمية Macrophages في حليب الام بامكانها بلعمة وقتل خميرة الـ *C. albicans* (15). وعليه فحليب الام ليس فقط الغذاء الامثل لطفل الرضيع بل يحميه ايضا من الاصابات الفطرية والحساسية للفطريات وكذلك يحافظ على العلاقة المناعية بين الام والطفل بعد الولادة (16).

تهدف الدراسة الحالية الى :

1. عزل خميرة الـ *C. albicans* من الاصابات الفموية وتشخيصها .
2. دراسة فعالية العزلات في انتاج انزيم الفوسفولايبيز .
3. دراسة التاثير التثبيطي لحليب الام ومقارنته مع اللبأ على نمو عزلات خميرة الـ *C. albicans* وقابليتها في انتاج انزيم الفوسفولايبيز .

المواد وطرائق العمل

1-الاوساط الزرعية

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

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة (LabM, U.K.) .

ب - وسط مح البيض الصلب Egg yolk agar medium

حضر الوسط حسب طريقة Price واخرين (17) .

ج - وسط مولر – هنتون الصلب Mueller-Hinton agar medium

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة (HiMedia, India) وبحسب ما ذكره Espinel-Ingroff و Cantón (18) فقد تمت اضافة 2% من الكلوكوز (تركيز نهائي وزن / حجم) الى الوسط .

2- المحاليل الخزينة

أ- المحلول الخزين للمضاد البكتيري ستربتومايسين سلفيت Streptomycin sulfate

تـم الحصـول علـى المضـاد بشـكله التجـاري (**TROGE MEDICAL GMBH, HAMBURG, GERMANY**) وعلـى شكل مسـحوق وتمـت اذابـة 1 غـم منـه فـي 100 مليلتر من الماء المقطر المعقم . كان التركيز النهائي للمحلول الخزين 10000 مايكروغرام / مليلتـر مـن المـاء المقطـر وحفظ المحلـول الخـزين عنـد درجـة حـرارة −20مْ لحـين الاسـتعمال (19).

ب- المحلول الخزين لصبغة ازرق المثيلين Methylene blue

تم تحضيره بإذابة 0.1 غرام من صبغة ازرق المثيلين في 20 مليلتر من الماء المقطر مع التسخين عند درجة حرارة واطئة لحين الذوبان الكامل للصبغة ، لنحصل على محلول خزين للصبغة بتركيز 5000 مايكروغرام / مليلتر وتم اضافة 100 مايكرولتر منه لكل واحد لتر من الوسط مولر−هنتون الصلب (18).

ج- المحلول الملحي الوظيفي Normal saline

تم تحضيره بإذابة 8.5 غرام من كلوريد الصوديوم NaCl في 1 لتر من الماء المقطر وضبط الاس الهيدروجيني للمحلول عند 7.2 وحفظ في الثلاجة عند 4مْ لحين الاستعمال (20).

د- محلول 0.5 ماكفرلاند القياسي 0.5 McFarland standard

تم تحضيره أستنادا الى Espinel−Ingroff و Cantón (18) .

3 - مستحلب مح البيض Egg yolk emulsion

تم الحصول على مح البيض Egg yolk من بيض المائدة وفي ظروف معقمة ثم وضع في انابيب اختبار معقمة ذات اغطية محكمة ثم وضعت الانابيب الحاوية على مح البيض في جهاز طرد مركزي Centrifuge (U.S.A. , Labnet , HERMLE) عند قوة جاذبية ارضية Gravitational force 500 (500g) ولفترة 15 دقيقة ، بعدها اخذ الجزء الطافي Supernatan من المستحلب واكمل الى حجمه الاصلي بالماء المقطر المعقم . استعمل هذا المستحلب مباشرة في تحضير وسط مح البيض الصلب (17).

4- جمع العينات

تم الحصول على العزلات الفطرية من المرضى المصابين بداء المبيضات الفموي المراجعين او الراقدين في مستشفى ابن سينا التعليمي ومستشفى ابن الاثير التعليمي ومستشفى السلام العام والمستشفى الجامعي التعليمي / قسم صناعة الاسنان ، من خلال اخذ مسحات فموية بواسطة ممسحات قطنية معقمة Sterile cotton swabs وذلك بامرار الممسحة فوق منطقة الاصابة وتدويرها بلطف مع مراعاة عدم لمس الاجزاء غير المصابة لتفادي التداخل مع النبيت الطبيعي Normal flora للفم .

تم جمع 63 مسحة للفترة من 2010/3/15 ولغاية 2010/5/17 ومن اعمار مختلفة تراوحت بين 9 ايام – 80 سنة ومن كلا الجنسين وكان المرضى يعانون من حالات مرضية مختلفة. كانت نسبة الذكور من مجموع عدد المرضى 39.68% ونسبة الاناث 60.32%.

5- زرع العينات

نقلت المسحات الفموية الى المختبر مباشرة وزرعت على الوسط SDA الحاوي على المضاد البكتيري Streptomycin sulfate بتركيز 100 مايكروغرام / مليلتر من الوسط . حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37مْ لفترة 2-7 ايام (21). اهملت الاطباق التي لم يظهر فيها نمو.

6- تنقية العزلات

تمت تنقية العزلات وزرعها على الوسط SDA الحاوي على المضاد Streptomycin sulfate وحضنت عند درجة حرارة 37مْ لفترة 48 ساعة وحفظت في الثلاجة عند درجة 4مْ . مع مراعاة تجديدها كل 3 اسابيع . اما حفظ العزلات لفترات زمنية اطول فكان يتم بزرع العينات على الوسط SDA المتصلب بشكل مائل في قنانٍ زجاجية صغيرة وحضنت ايضا عند درجة 37مْ لفترة 48 ساعة ثم حفظت في الثلاجة عند 4مْ وكان يتم تجديدها كل 3 اشهر.

7- تحضير عالق خلايا الخميرة Yeast cell suspension

لتحضير العالق تم تلقيح الوسط SDA بالعزلات الفطرية وبطريقة التخطيط Streaking ثم حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37مْ لفترة 18-24 ساعة ثم اخذ جزء من اللقاح النامي بواسطة الناقل ذي العروة Loop ووضع في قنينة زجاجية صغيرة معقمة تحوي على 5 مليلتر من المحلول الملحي الوظيفي المعقم . مزج العالق جيدا وتم ضبط عدد الخلايا في العالق عند 10^8 خلية / مليلتر من العالق بإستعمال شريحة عد خلايا الدم Haemocytometer chamber واستعمل هذا العالق بصورة آنية في اختبار تحلل الدم وفي قياس الفعالية في انتاج انزيم الفوسفولايبيز.

8- التعقيم

عقمت الاوساط الزرعية والمحلول الملحي الوظيفي بجهاز المؤصدة عند درجة حرارة 121مْ وضغط 15 باوند/ انج^2 ولفترة 15 دقيقة ، اما المحاليل التي تتأثر بالحرارة (المحلول الخزين للمضاد البكتيري ستربتومايسين سلفيت Streptomycin sulfate) فقد تم تعقيمها بوحدة الترشيح الدقيق Millipore filter unit فتحاتها ذات قطر 0.22 مايكرومتر (GEMA MEDICAL S.L. , Spain).

9- اختبار تشخيص العزلات بنظام Vitek 2 Compact

اجري هذا الاختبار في مختبر الصحة العامة في محافظة اربيل ، بإستعمال نظام التشخيص Vitek 2 Compact system والمجهز من شركة (bioMérieux , Marcy l'Etiole و France) وهو نظام تشخيص آلي بالكامل Fully automated يستعمل في تشخيص البكتريا والخمائر الطبية (22).

ان تشخيص الخمائر بهذا النظام يستند وبشكل رئيس على نظام التفاعل الكيموحيوي (23) .

10- اختبار فعالية انتاج انزيم الفوسفولايبيز Phospholipase production activity

اجري الاختبار حسب طريقة Price واخرين (17) والتي تعرف بطريقة الطبق Plate method ، إذ تم نقل 10 مايكرولتر من العالق الخميري لكل عزلة نامية بعمر 18-24 ساعة وبتركيز 10^8 خلية / مليلتر ووضعها بشكل قطرات على سطح وسط مح البيض الصلب وتركت لتجف عند درجة حرارة المختبر ، ثم حضنت الاطباق عند درجة 37مْ ولفترة 5 ايام. ان منطقة الترسيب Precipitation zone (Pz) (المعتمة) والتي تظهر بشكل منطقة بيضاء كثيفة حول المستعمرات تمثل النتيجة الموجبة في انتاج انزيم الفوسفولايبيز. ان المعدل الناتج من تقسيم قطر المستعمرة على مجموع قطر المستعمرة زائدا قطر منطقة الترسيب والذي يرمز له P_Z يمثل وحدة قياس فعالية انتاج انزيم الفوسفولايبيز .

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

بحسب طريقة Price واخرين (17) فان فعالية انتاج انزيم الفوسفولايبيز تتدرج في اربعة اصناف فضلا عن معاملة السيطرة :

قيمة P_Z = 1.00 تكون النتيجة سالبة (-) .

قيمة P_Z = 0.90-0.99 تكون الفعالية ضعيفة Weak (+1).

قيمة P_Z = 0.80-0.89 تكون الفعالية معتدلة Mild (+2).

قيمة P_Z = 0.70-0.79 تكون الفعالية قوية نسبيا Relatively strong (+3).

قيمة $P_Z \geq 0.69$ تكون الفعالية قوية جدا Very strong (+4).

11- جمع عينات اللبأ والحليب

جمعت عينات اللبأ والحليب من 21 امرأة مرضعة تتراوح اعمارهن بين 17-25 سنة ، وللفترة من 2012/4/1 ولغاية 2012/5/15 ومن مستشفى الخنساء التعليمي في مدينة الموصل. وقد جمعت عينات اللبأ بعد 3-6 ساعات من عملية الولادة ، اما الحليب فتم جمعه من

امهات مرضعات تراوحت اعمار اطفالهن بين 6–9 اشهر ، وكانت عملية جمع العينات تتم خلال ساعات الصباح وبواسطة مضخة ثدي معقمة Sterile breast pump ثم توضع العينات في انابيب اختبار بلاستيكية معقمة وتنقل الى المختبر مباشرة. حفظت العينات عند درجة حرارة

–18 مْ لحين الاستعمال (24).

12– دراسة التاثير التثبيطي لكل من اللبأ Colostrum والحليب Milk في عزلات خميرة الـ *C. albicans*

لدراسة التاثير التثبيطي لكل من اللبأ والحليب فقد تم اختيار 10 عزلات من خميرة الـ *C. albicans* والتي اظهرت اعلى انتاجية لانزيم الفوسفولايبيز استنادا الى الفقرة (10) والعزلات هي RA4 و RA5 و RA6 و RA7 و RA11 و RA13 و RA24 و RA25 و RA26 و RA33 .

اولا – اختبار التاثير التثبيطي بطريقة التخطيط – تخفيف الاكار Agar dilution-streak assay

اجري الاختبار حسب طريقة Mitscher واخرين (25) وذلك بطريقة التخطيط – تخفيف الاكار. فبعد تعقيم الوسط مولر–هنتون الصلب والحاوي على 2% كلوكوز وزع الوسط الى دوارق زجاجية معقمة ذات حجم 50 مليلتر وبعد ان تركت لتبرد الى درجة 45–50مْ اضيف الى كل منها تركيز معين من اللبأ او الحليب (حجم / حجم) بعد تعقيمه بطريقة الترشيح ورجت جيدا ثم وزع الوسط في اطباق بتري معقمة وترك ليتصلب.

كانت التراكيز المستعملة لكل من اللبأ والحليب هي 1 و 2 و 4 و 8 و 16 و 32% ، كما تم تحضير اطباق سيطرة تحوي على الوسط بدون أية اضافة ولقح سطح كل طبق بطريقة التخطيط باربع عزلات من خميرة الـ *C. albicans* النامية بعمر 24 ساعة على الوسط SDA ، ثم حضنت الاطباق عند درجة 37مْ ولفترة 48 ساعة ، وبعدها تمت قراءة النتائج لتحديد التركيز المثبط الادنى.

ثانيا – اختبار التاثير التثبيطي بطريقة الانتشار بالقرص Disk diffusion

اجري الاختبار بحسب طريقة Espinel–Ingroff و Cantón (18) وذلك بنقل 5 مستعمرات من الـ *C. albicans* نامية على الوسط SDA بعمر 24 ساعة وتكون هذه المستعمرات متشابهة في الشكل المظهري وذات قطر 1 مليمتر وبواسطة الناقل ذو العروة الى 5 مليلتر من

المحلول الملحي المعقم مزج العالق جيدا وتم ضبط كثافة العالق بمقارنته مع محلول 0.5 ماكفرلاند القياسي والمحضر كما في الفقرة (د) وهذه الكثافة تعادل 1-5 ×10^6 خلية/ مليلتر من العالق الخميري ، وتم غمر ممسحة قطنية معقمة في العالق الخميري وحركت الممسحة داخل العالق حركة دائرية ثم ازيل الزائد منها بالضغط على جوانب الانبوبة فوق مستوى العالق للتخلص من الكميات الزائدة منه، ثم نشر العالق فوق سطح وسط مولر-هنتون الصلب والحاوي على صبغة ازرق المثيلين وبتركيز 0.5 مايكروغرام/ مليلتر من الوسط، وتم تحريك الممسحة القطنية بشكل تخطيطي ومتقاطع . وتركت الاطباق فترة 10 دقائق كي يحصل التشرب. ثم تم تثبيت الاقراص المشبعة باللبأ او الحليب الخام بواسطة ملقط معقم بحيث يحوي كل طبق 3 اقراص ، احداها مشبعة باللبأ والاخرى بالحليب اما الثالثة فتمثل عينة سيطرة مشبعة بالمحلول الملحي المعقم.

هذه الاقراص تم تحضيرها حسب طريقة Esimone واخرين (26) .

13- اختبار تاثير اللبأ والحليب في انتاج خميرة الـ *C. albicans* لانزيم الفوسفولايبيز

اجري الاختبار على 10 عزلات من الـ *C. albicans* قيد الدراسة والتي تم اختبارها في الفقرة (12) . إذ تم تحضير عالق خميري لكل عزلة نامية بعمر 48 ساعة على الوسط SDA الحاوي على اعلى تركيز من اللبأ او الحليب وقدره 32% ، وكان تركيز العالق 10^8 خلية/ مليلتر من العالق .

اخذ 10 مايكرولتر من هذا العالق ولكل عزلة واضيف بشكل قطرات على سطح وسط مح البيض الصلب ، كما تمت اضافة 10 مايكرولتر من عالق تم تحضيره لكل عزلة نامية بعمر 48 ساعة على الوسط SDA الخالي من أية اضافة وتمثل هذه عينة السيطرة ، ثم تركت الاطباق في ظروف المختبر لتجف ، ومن ثم حضنت عند درجة حرارة 37مْ ولفترة 5 ايام ، وتمت قراءة النتائج كما موضح في الفقرة (10).

14- التحليل الإحصائي

تم تحليل البيانات وفق نظام التجارب العاملية والبسيطة باستعمال التصميم العشوائي الكامل ، وتمت المقارنة بين المتوسطات باختبار دنكن Duncan's test المتعدد المدى ، إذ ميزت المعاملات المختلفة معنويا بأحرف مختلفة عند مستوى احتمال 1%.

النتائج والمناقشة

تم الحصول على 36 عزلة خميرية نامية على الوسط SDA أي بنسبة 57.14% من المجموع الكلي للمسحات الفموية والبالغ عددها 63 مسحة , ونظرا لزيادة الاصابات المخاطية والجهازية بانواع الـ *Candida* غير النوع *C. albicans* وان الاصابات بهذه الانواع اصبح لها تاثير مباشر في العلاج، لذلك فان التشخيص على مستوى النوع له دور في اختيار المضاد الفطري المناسب مما يقلل من نسبة الامراضية والوفيات بين المرضى المصابين بهذه الانواع من الاصابات (27) ومن اجل ذلك فقد استعملنا في دراستنا الحالية نظام التشخيص Vitek 2 Compact الذي يمتاز بالدقة والسرعة في تشخيص العزلات الى مستوى النوع (22) وقد اظهرت النتائج قدرة هذا النظام على تشخيص جميع عزلات الخمائر قيد الدراسة أي بنسبة 100% وقد ظهرت الخميرة *C. albicans* بنسبة 77.77% وبواقع 28 عزلة في حين كانت الثمان عزلات الباقية تعود لانواع اخرى من الخمائر والتي ظهرت كل منها بواقع عزلة واحدة أي بنسبة 2.77% لكل منها وكما مبين في الجدول (1) .

اظهرت النتائج تشخيص 5 انواع تابعة للجنس *Candida* وكانت 29 عزلة تعود للنوع *C. albicans* أي بنسبة 80.55% في حين تم الحصول على عزلة واحدة من كل من *C. famata* و *C. glabrata* و *C. kefyr* و *C. lusitaniae* أي بنسبة 2.77% لكل منها. كما تم الحصول على عزلة واحدة لكل من الخمائر *Saccharomyces cerevisiae* و *Malassezia furfur* و *Rhodotorula glutinis* وبنسبة 2.77% ايضا لكل منها وكما في الجدول (1).

الجدول (1): انواع العزلات الخميرية المشخصة والمعزولة من اعمار وحالات مختلفة ولكلا الجنسين من المرضى قيد الدراسة

تسلسل	رمز العزلة	نوع العزلة	عمر المريض	جنس المريض	حالة المريض
1	RA1	*Candida albicans*	9 ايام	اثنى	ولادة مبكرة

2	RA2	*Candida famata*	50 سنة	ذكر	عملية جراحية في الحنك اللين
3	RA3	*Candida glabrata*	55 سنة	ذكر	استعمال طقم اسنان
4	RA4	*Candida albicnas*	63 سنة	ذكر	استعمال طقم اسنان
5	RA5	*Candida albicans*	60 سنة	ذكر	استعمال طقم اسنان
6	RA6	*Candida albicans*	60 سنة	ذكر	استعمال طقم اسنان
7	RA7	*Candida albicans*	3 اشهر	انثى	اصابة باليرقان
8	RA8	*Candida albicans*	1.6 سنة	ذكر	رقود في المستشفى
9	RA9	*Candida albicans*	1.6 سنة	انثى	رقود في المستشفى
10	RA10	*Candida albicans*	10 اشهر	ذكر	رقود في المستشفى
11	RA11	*Candida albicans*	11 سنة	انثى	اصابة بمرض فايروسي
12	RA12	*Candida albicans*	3 اشهر	ذكر	رقود في المستشفى
13	RA13	*Candida albicans*	5 اشهر	ذكر	رقود في المستشفى
14	RA14	*Candida albicans*	1.5سنة	انثى	رقود في المستشفى
15	RA15	*Candida kefyr*	57 سنة	ذكر	عملية جراحية
16	RA16	*Candida albicans*	9 سنوات	انثى	اصابة باللوكيميا
17	RA17	*Candida albicans*	8 ايام	انثى	ولادة مبكرة
18	RA18	*Candida lusitaniae*	10 اشهر	انثى	رقود في المستشفى

19	RA19	*Candida albicans*	7 اشهر	انثى	رقود في المستشفى
20	RA20	*Saccharomyces cerevisiae*	3 اشهر	انثى	رقود في المستشفى
21	RA21	*Candida albicans*	8 اشهر	انثى	رقود في المستشفى
22	RA22	*Candida albicans*	24 سنة	انثى	التهاب وتقرحات في بطانة الفم
23	RA23	*Candida albicans*	35 يوم	انثى	رقود في المستشفى
24	RA24	*Candida albicans*	50 سنة	انثى	استعمال طقم اسنان
25	RA25	*Candida albicans*	41 يوم	ذكر	رقود في المستشفى
26	RA26	*Candida albicans*	5 اشهر	ذكر	رقود في المستشفى
27	RA27	*Candida albicans*	25 سنة	انثى	اصابة باللوكيميا
28	RA28	*Malassezia furfur*	3 اشهر	ذكر	رقود في المستشفى
29	RA29	*Candida albicans*	9 اشهر	ذكر	رقود في المستشفى
30	RA30	*Candida albicans*	50 سنة	انثى	استعمال طقم اسنان
31	RA31	*Candida albicans*	61 سنة	انثى	اصابة بالانيميا
32	RA32	*Candida albicans*	15 سنة	انثى	اصابة باللوكيميا
33	RA33	*Candida albicans*	30 سنة	انثى	اعتلال الغدد اللمفاوية
34	RA34	*Candida albicans*	54 سنة	انثى	اصابة باللوكيميا
35	RA35	*Rhodotorula glutinis*	5 اشهر	ذكر	رقود في المستشفى
36	RA36	*Candida albicans*	32 سنة	انثى	استعمال طقم

					اسنان

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

اظهرت نتائج هذا الاختبار ان 23 عزلة من مجموع 29 عزلة من عزلات خميرة الـ *C. albicans* كانت موجبة لهذا الاختبار أي بنسبة 79.31% إذ اظهرت فعالية في انتاج انزيم الفوسفولايبيز من خلال ظهور منطقة كثيفة بيضاء هي منطقة الترسيب حول المستعمرات النامية على وسط مح البيض الصلب وتظهر منطقة الترسيب نتيجة تكوين معقد الكالسيوم Calcium complex مع الاحماض الدهنية المتحررة من الدهون المفسفرة الموجودة في مح البيض بفعل تاثير انزيم الفوسفولايبيز (17). في حين اظهرت 6 عزلات أي بنسبة 20.69% نتيجة سالبة لهذا الاختبار اذ لم تظهر منطقة الترسيب حول المستعمرات النامية .

من خلال الجدول (2) نلاحظ ان هناك تفاوتاً بين العزلات في فعالية انتاج الانزيم من خلال التفاوت في اقطار مناطق الترسيب وبالتالي تباين في قيم Pz والتي تراوحت من 0.53 الى 0.80 ، وبحسب التصنيف الذي وضعه Price واخرون (17) في تقييم فعالية انتاج الانزيم كما موضح في الفقرة (10) فان نتائج دراستنا اظهرت ان 10 من العزلات المنتجة (43.47%) كانت ذات فعالية قوية جدا في انتاج الانزيم اذ تراوحت قيم Pz من 0.53 الى 0.69 ، وان 12 عزلة (52.17%) كانت ذات فعالية قوية نسبيا اذ تراوحت قيم Pz من 0.72 الى 0.77 اما العزلة RA19 (4.34%) فقد اظهرت فعالية معتدلة اذ كانت قيمة Pz لها 0.80.

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

الجدول (2) : فعالية عزلات الـ C. albicans في انتاج انزيم الفوسفولايبيز

رمز العزلة	معدل قيم Pz

i* 0.00	RA1
fgh 0.56	RA4
efg 0.63	RA5
b-e 0.69	RA6
cde 0.67	RA7
a-e 0.72	RA8
a-d 0.73	RA9
i 0.00	RA10
gh 0.54	RA11
i 0.00	RA12
h 0.53	RA13
i 0.00	RA14
a-e 0.72	RA16
abc 0.76	RA17
a 0.80	RA19
ab 0.78	RA21
abc 0.77	RA22
a-e 0.72	RA23
def 0.65	RA24
b-e 0.69	RA25
cde 0.67	RA26
abc 0.77	RA27
a-d 0.73	RA29
abc 0.77	RA30
abc 0.76	RA31
i 0.00	RA32
cde 0.67	RA33
i 0.00	RA34
a-d 0.74	RA36

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

دراسة التاثير التثبيطي لكل من اللبأ والحليب في عزلات الـ *C. albicans*

اجريت الدراسة بطريقتي التخطيط – تخفيف الاكار والانتشار بالقرص ، ومن خلال النتائج نلاحظ ان جميع التراكيز المدروسة (1 و 2 و 4 و 8 و 16 و 32%) من اللبأ او الحليب لم تظهر تاثيرا تثبيطيا في نمو العزلات المدروسة والتي رمز لها RA4 و RA5 و RA6 و RA7 و RA11 و RA13 و RA24 و RA25 و RA26 و RA33 وبطريقة التخطيط – تخفيف الاكار كما نلاحظ ايضا من خلال النتائج ان التركيز 100% من اللبأ او الحليب وبطريقة الانتشار بالقرص لم يظهر ايضا تاثيرا تثبيطيا في نمو العزلات المدروسة من الـ *C. albicans* .

بينما العديد من الدراسات تركز على تاثيرات الحليب او مكوناته المضادة للبكتريا والمضادة للفايروسات ، هناك فقط القليل من الدراسات التي تهتم بدراسة تاثيرات الحليب المضادة للفطريات (28,29) . اما فيما يخص تاثير الحليب المضاد لخميرة الـ *C. albicans* فالدراسات قليلة في هذا المجال ومنها الدراسة التي اجراها Andersson واخرون (28) والتي اظهرت ان لحليب الام تاثير مثبط في نمو الـ *C. albicans* والـ *R. rubra* عند اضافة تراكيز متصاعدة منه الى وسط النمو ، وان هذا التاثير يعزى الى المركب لاكتوفرين من خلال قدرته على الارتباط بالحديد وقد اشار الباحثون في دراستهم الى ان هذا التاثير هو تاثير مثبط Fungistatic وليس قاتلا للفطريات ، اذ لوحظ ان زيادة تركيز الحديد في وسط النمو يبطل التاثير التثبيطي للحليب ، كما لوحظ ان زيادة فترة التحضين الى 48 و 72 ساعة يشجع نمو الخميرة ويتحول الحليب الى عامل مغذٍ .

ان عدم حساسية عزلات الـ *C. albicans* في دراستنا الحالية على الرغم من استعمال تراكيز عالية فضلا عن استعمالها بالشكل الخام، وبطريقتين في الاختبار ربما يعزى الى ان مركب اللاكتوفرين الذي تحتويه عينات اللبأ والحليب المدروسة قد يكون من النوع المشبع بالحديد Holo– lactoferrin (Iron – saturated) وليس من النوع غير المشبع والذي يدعى Apo–lactoferrin (Iron – unsaturated) (30) لذا لم يظهر أي تاثير في نمو العزلات انما كان اللبأ والحليب مصدرين غذائيين لعزلات الـ *C. albicans* ، كما قد يعزى سبب عدم الحساسية الى طبيعة المادة الوراثية للعزلات ، اذ ان مقاومتها للمضادات الفطرية قد يكون له دور في مقاومة التاثير التثبيطي للبأ والحليب ، كما ان الضراوة العالية التي تمتلكها العزلات قيد الدراسة من حيث انتاج الهيمولايسين وانزيم الفوسفولايبيز ربما قد يكون لها ايضا دور في هذه المقاومة .

ان تاثير الحليب خارج الجسم الحي يحصل بشكل يختلف عما هو عليه في داخل الجسم الحي اذ تشير الدراسات الى ان الفعالية الدفاعية للحليب تجاه الاصابات المرضية تكون بآليتين رئيستين الاولى الالية المناعية التقليدية Classical immune protection والتي تحصل بفعل الكلوبيولينات المناعية A و G و M ، والالية الثانية هي آلية غير مناعية Non immune protection والتي يقوم بها عدد كبير من المكونات مثل اللاكتوفرين وغيره من المكونات التي تؤثر بشكل غير نوعي وبذلك تكون ذات فعالية واسعة الطيف كما انها تعمل بشكل تأزري وتكون فعالة داخل جسم الرضيع ومتكيفة للبيئة القاسية للقناة المعدية المعوية (30).

دراسة تاثير كل من اللبأ والحليب في انتاج خميرة الـ *C. albicans* لانزيم الفوسفولايبيز

تم اختبار تاثير كل من اللبأ والحليب وعند التركيز 32% في انتاج عزلات خميرة الـ *C. albicans* (RA4 و RA5 و RA6 و RA7 و RA11 و RA13 و RA24 و RA25 و RA26 و RA33) لانزيم الفوسفولايبيز ، علما ان التركيز 32% من اللبأ او الحليب لم يظهر أي تاثير تثبيطي في نمو عزلات الـ *C. albicans* وكما اشير الى ذلك في الفقرة السابقة . في هذا الاختبار وكما نلاحظ من الجدول (3) ان اللبأ اظهر تاثيرا عند التركيز المدروس (32%) في انتاج بعض العزلات لانزيم الفوسفولايبيز، فقد انخفض انتاج 3 عزلات من مجموع العزلات المدروسة أي بنسبة 30% والتي شملت العزلات RA4 و RA6 و RA13 بينما العزلات RA11 و RA24 و RA25 و RA26 و RA33 أي بنسبة 50% لم يتاثر انتاجها للانزيم عند التركيز المدروس من اللبأ ، اما العزلتان RA5 و RA7 فقد ازداد انتاجهما بالمقارنة مع عزلة السيطرة لكل منهما . ومن خلال اجراء التحليل الاحصائي باختبار دنكن المتعدد المدى عند مستوى احتمال 1% نلاحظ ان تاثير اللبأ في العزلتين RA6 و RA13 لم يكن معنويا على الرغم من انخفاض انتاجهما للانزيم في حين كان التاثير معنويا في العزلة RA4 اذ اخذت قيمة انتاج العزلة المعاملة الحرف a احصائيا بينما اخذت قيمة انتاج العزلة غير المعاملة (سيطرة) الحرف b .

اما بالنسبة للعزلة RA5 فعلى الرغم من زيادة انتاجها للانزيم الا ان هذه الزيادة لم تكن معنوية بحسب اختبار دنكن ، وهذه الزيادة في الانتاج لهذه العزلة قد يعزى الى تغير في الظروف التجريبية لاحد المكررات مما ادى الى زيادة في معدلات قيم الانتاج ، بينما الزيادة في انتاج العزلة RA7 فقد كانت معنوية وكما مبين في الجدول (3). اما بالنسبة لتاثير الحليب وعند التركيز 32% في انتاج العزلات لانزيم الفوسفولايبيز فقد اظهر الاختبار وكما في الجدول (3) ان للحليب وعند التركيز المدروس تاثيرا في انتاج الانزيم اذ انخفض انتاج العزلتين RA4 و

RA13 أي بنسبة 20% من مجموع العزلات المدروسة في حين لم يتاثر انتاج العزلات RA5 و RA6 و RA11 و RA24 و RA25 و RA26 و RA33 أي بنسبة 70% اما العزلة RA7 فقد ازداد انتاجها للانزيم.

ومن خلال اجراء التحليل الاحصائي باختبار دنكن المتعدد المدى عند مستوى احتمال 1% نلاحظ ان تاثير الحليب في العزلتين RA4 و RA13 كان معنويا اذ اخذت قيم الانتاج للعزلات المعاملة بالحليب احرف مختلفة عن قيم انتاج عزلات السيطرة ، اما العزلة RA7 فان زيادة انتاجها للانزيم كان معنويا وكما مبين في الجدول (3) .ان السبب في زيادة انتاج العزلة RA7 عند معاملتها باللبأ او الحليب قد يعزى الى ضراوة هذه العزلة في انتاج الهيمولايسين وهذا يعني قدرتها العالية في استخلاص الحديد وبذلك فهي ربما قد تمكنت من استخلاص عنصر الحديد من بروتين اللاكتوفرين المتوفر في اللبأ والحليب والذي بدوره حفز نمو الخميرة مما ادى الى زيادة في انتاج الانزيم .

نلاحظ من دراستنا الحالية وعلى الرغم من عدم امتلاك اللبأ والحليب تاثيرا تثبيطيا في نمو عزلات الـ *C. albicans* ، الا انهما اظهرا فعالية في تثبيط انتاج الانزيم في 30 و 20% لكل من اللبأ والحليب على التوالي وربما يكون لكل منهما تاثير في انتاج باقي العزلات ولكن عند تراكيز اعلى من التركيز المدروس في هذا الاختبار ، وهذا يبين اهمية اللبأ والحليب كمثبطين لاحد اهم عوامل الضراوة في الـ *C. albicans* وبذلك قد يكون لهما دور غير مباشر في تثبيط الـ *C. albicans* وخفض نسبة الاصابة بداء المبيضات الفموي عند الاطفال الرضع . ولا توجد هناك دراسة مماثلة في هذا المجال لذا فنحن لا نعلم بالضبط الالية (او الاليات) التي يمتلكها اللبأ والحليب في تثبيط انتاج انزيم الفوسفولايبيز . ولكن يبقى حليب الام مصدر الحماية والتعديل المناعي وهذه الفعاليات مفقودة حتى في افضل انواع الحليب الاصطناعي (16).

الجدول (3) : تأثير كل من اللبأ والحليب عند التركيز 32% في انتاج عزلات الـ *C. albicans* لانزيم الفوسفولايبيز

رمز العزلة	عينات السيطرة والمعاملة	معدلات قيم Pz	
		اللبأ	الحليب
RA4	سيطرة	0.73 b*	0.73 b*
	معاملة	0.81 a	0.83 a
RA5	سيطرة	0.65 a	0.65 a

معاملة	a 0.61	a 0.66	
سيطرة	a 0.69	a 0.69	RA6
معاملة	a 0.72	a 0.70	
سيطرة	a 0.70	a 0.70	RA7
معاملة	b 0.64	b 0.63	
سيطرة	a 0.68	a 0.68	RA11
معاملة	a 0.68	a 0.65	
سيطرة	a 0.64	b 0.64	RA13
معاملة	a 0.68	a 0.68	
سيطرة	a 0.78	a 0.78	RA24
معاملة	a 0.79	a 0.77	
سيطرة	a 0.64	a 0.64	RA25
معاملة	a 0.66	a 0.66	
سيطرة	a 0.69	a 0.69	RA26
معاملة	a 0.69	a 0.67	
سيطرة	a 0.76	a 0.76	RA33
معاملة	a 0.75	a 0.74	

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

References

1. Barnett, J. A. (2008). Yeast, 25: 385-417.
2. Dangi, Y. S. ; Soni, M. L. and Namdeo, K. P. (2010). Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 2(4): 36-41.

3. Shibata, T. ; Yamashita, D. ; Hasegawa, Sh. ; Saito, M. ; Otsuki, N. ; Hashikawa, K. ; Tahara, S. and Nibu, K. (2011). Auris Nasus Larynx, 38: 418-420.
4. Epstein, J. B. ; Truelove, E. L. and Izutzu, K. T. (1984). Rev. Infect. Dis., 6(1): 96-106.
5. Scardina, G. A. ; Fucá, G. ; Ruggieri, A. ; Carini, F. ; Cacioppo, A. ; Valenza, V. and Messina, P. (2007). Res. J., Biol. Sci., 2(4): 408-412.
6. Kumar, M. A. and Rajsekhar, S. (2011). Inter. J. Res., Ayurveda Pharm., 2(6): 1722-1725.
7. Simona, E. ; Diana, P. ; Robertina, I. ; Ionela, A. ; Ileana, S. and Tatiana, V. (2009). Roma. Biotechnol. Lett., 14(1): 4180-4186.
8. Abaci, O. ; Haliki-Uztan, A. ; Ozturk, B. ; Toksavul, S. ; Ulusoy, M. and Boyacioglu, H. (2010). Mycopathologia, 169: 365-372.
9. Ferreira, C. ; Silva, S. ; Faria-Oliveira, F. ; Pinho, E. ; Henriques, M. and Lucas, C. (2010). BMC Microbiology, 10: 238-252.
10. Favero, D. ; França, E. J. G. ; Furlaneto-Maia, L. ; Quesada, R. M. B. and Furlaneto, M. C. (2011). Mycoses, 54(6): 816-820.
11. Niewerth, M. and Korting, H. C. (2001).Mycoses, 44:361-367.
12. Mane, A. ; Gaikwad, S. ; Bembalkar, S. and Risbud, A. (2012). J. Med. Microbiol., 61: 285-290.
13. Martinez-Costa, C. ; Silvestre, M. D. ; López, M. C. ; Plaza, A. ; Miranda, M. and Guijarro, R. (2007). J. Pediatr. Gastro. Nutr., 45: 275-277.
14. Chirico, G. and Gasparoni, A. (2006). Haematologica Reports, 2(10): 27-30.
15. Mete, E. ; Bavbek, N. ; Dayi, S. ; Erkmen, M. and Andiran, F. (2006). Allergy Asthma Proc., 27: 412-414.
16. Mete, E. ; çatal, F. ; Tayman, C.; Uras, N. ; Akça, H. ; Ulukanligil, M. and Özkaraġoz, F. (2009). Turk. J. Med. Sci., 39(1): 67-72.
17. Price, M. F. ; Wilkinson, I. D. and Gentry, L. O. (1982). Sabouraudia, 20: 7-14.
18. Espinel-Ingroff, A. and Cantón, E. (2007). Antifungal susceptibility testing of yeasts. pp. 200-201. In: Schwalbe, R. ; Steele-Moore, L. and Goodwin. A.C. (eds.). Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. CRC Press, Taylor and Francis Group, U.S.A.
19. Kennedy, E. M. ; Snowden, N. ; Westenfelder, G. and Phair, J. P. (1983). J. Antimicrob. Chemother., 12, Suppl. C : 69-74.
20. Hay, F. C. and Westwood, O. M. R. (2002). Practical Immunology. 4th ed., Blackwell Science Ltd., U.K., pp. 349-350.
21. Gravina, H. G. ; de Morán, E. G. ; Zambrano, O. ; Chourio, M. L. ; de Valero, S. R. ; Robertis, S. and Mesa, L. (2007). Med. Oral Pathol. Oral Cir bucal., 12(6): E 419-23.
22. Aubertine, C. L. ; Rivera, M. ; Rohan, S. M. and Larone, D. H. (2006). J. Clin. Microbiol., 44(1): 227-228.
23. Valenza, G. ; Strasen, J. ; Schäfer, F. ; Frosch, M. ; Kurzai, O. and Abele-Horn, M. (2008). J. Clin. Microbiol., 46(11): 3784-3787.
24. Chan, G. M. (2003). J. Perinatol.,23:620-623.

25. Mitscher, L. A. ; Leu, R. ; Bathala, M. S. ; Wu, W. and Beal, J. (1972). Lloydia, 35(2): 157-166.
26. Esimone, C. O. ; Iroha, I. R. ; Ibezim, E. C. ; Okeh, C. O. and Okpana, E. M. (2006). Afr. J. Biotechnol., 5(11): 1082-1086.
27. Agarwal, S. ; Manchanda, V., Verma, N. and Bhalla, P. (2011). Ind. J. Med. Microbiol.,29(2): 172-177.
28. Andersson, Y. ; Lindquist, S. ; Lagerqvist, C. and Hernell, O. (2000).Early Human Development, 59: 95-105.
29. Al-Sheikh, H. (2009). . Pak. J. Boil. Sci., 12(1): 91-94.
30. Steijns , J. M. and van Hooijdonk , A. C. M. (2000) . British J. Nutr., 84, Suppl. 1, S11-S17.
31. Akujobi, C. N. ; Egbuonu, I. ; Ezechukwu, C. C. and Ogunsola, F. T. (2009). Niger. Med. J., 50(3): 58-60.