

University of Mosul  
College of Dentistry



# **Phenotypic and Genotypic Diagnosis of *Candida species* Isolated from Denture Stomatitis**

A Thesis Submitted by

**Haifa Abdul Ghani Abdullah**

To

**The Council of Dentistry College/Mosul University**

**As a Partial Fulfillment of the Requirements**

**For the Degree of Master of Science**

In

**Microbiology / Oral Microbiology**

**Supervised by**

**Assis.Prof. Eman Abdul-Aziz Mustafa**

---

**2020/ A.D**

**1442/ A.H**

## ***Abstract***

*Candida species* are regarded as the most common isolates and the frequent etiological factor of denture stomatitis (DS). This study was carried out to detect and identify the isolates of different *Candida species* from denture stomatitis patients using phenotypic and genotypic methods and to investigate the environmental factors associated with DS.

Sixty two isolates of *Candida species* yielded from 43 denture wearer samples with clinically diagnosed denture induced stomatitis (19 males and 24 females) their ages ranged (50- 85) years old, wearing complete denture, the age of denture range (5-20) years. All samples processed by traditional methods including primarily culture on Sabouraud dextrose agar (SDA) at 37°C for 24- 48 hrs. The identification to species level was carried out by gram staining reaction for all specimens, production of germ tube and chlamyospore to differentiate *C. albicans* from non albicans groups followed by culturing on HiCHROM agar candida and incubating at 37°C for 24- 48 hrs. The biochemical tests (urease and carbohydrate fermentation tests were done for each sample).

Polymerase chain reaction was used for rapid detection of different *C. species*. This assay used universal primer for amplification of ribosomal DNA of internal transcribed spacer (ITS) and species specific primer to detect each of *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*. All these species were cultured on nutrient broth and their DNA were extracted by using (DNA extraction mini kit, South Korea iNtRON Bio Com.) the gel electrophoresis was carried out to screen and determine the presence of species isolated from DS.

The results showed that the environmental factors included in the study (gender and diabetes) had no significant effects on denture induced stomatitis. As for age groups there were significant differences between both gender who have disease within the age group (66-70) years. Also the study found that night wearing increased the cases of DS compare with patients that did wearing the denture at night and there was positive relation between age of denture and rate of DS as well as good hygiene decrease the cases of DS.

All isolates were accurately diagnosed to the species level among the total of 62 *Candida species*, the study found that the predominant type was the *C.albicans* which accounted for (46.8%) followed by *C.glabrata* (33.9%), *C.tropicalis* (17.7%) and finally *C.krusei* accounted for (1.6%). Our study showed that some species of *candida* can't be documented by using HiCHROM agar candida only, *C. glabrata*, sometimes falsely identified as *C.parapsilosis* on Hi CHROM Candida Differential Agar . According to the result of our study, the PCR products for the universal primer of *C. albicans*, *C. glabrata* and *C.tropicalis* on agarose gel gave bands at the position 530 bp , 870 bp and 520 bp respectively and for specific primer gave the bands at the position 273bp ,404 bp and 501bp respectively.

Its concluded that *C. albicans* was the most prevalent species found in DS patients followed by *C.glabrata* . Continuous and nocturnal denture wearing, old denture and poor denture hygiene might contribute the DIS. The yeast identification today and in the future are undoubtedly going to combine both phenotypic and molecular methods. But, traditional methods that are used to identify clinical isolates of *C.species* are time consuming and not appropriate for rapid , accurate and reliable identification while PCR technology is more specific, less time consuming than conventional methods. The detection of fungal DNA by

polymerase chain reaction is one of the most powerful and popular tools for the early detection and the phospholipase B gene provides a novel target that could be used for the identification of *both C. glabrata and C.tropicalis* from clinical samples.



جامعة الموصل  
كلية طب الأسنان

**التشخيص المظهري والوراثي لأنواع  
المبيضات المعزولة من حالات  
التهاب الفم المصاحب لقاعدة الطقم**

رساله تقدمت بها

**هيفاء عبد الغني عبد الله**

الى مجلس كلية طب الاسنان

جامعة الموصل

كجزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

علم الاحياء المجهرية/ أحياء مجهرية فموية

بإشراف

**الاستاذ المساعد: ايمان عبد العزيز مصطفى**

## الخلاصة

يعتبر جنس المبيضات العامل المسبب الاكثر شيوعا لالتهاب الفم المصاحب لقاعدة الطخم، اجريت هذه الدراسة لغرض كشف وتحديد عزلات المبيضات المعزولة من مرضى التهاب الفم المصاحب لقاعدة الطخم باستخدام الطرق المظهرية والجزيئية وكذلك للتحقق من العوامل البيئية المرتبطة بهذه الحالة المرضية .

تم الحصول على اثنان وستون عزلة من ثلاثة واربعون مريضا ممن يرتدون طقوم الاسنان والمشخص اصابتهم سريريا بالتهاب الفم المصاحب لقاعدة الطخم ( 19 ذكر و 24 انثى ) تراوحت اعمارهم ما بين ( 50 - 85 ) سنة , يرتدون الطقم الكامل , تراوح عمر الطقم بين ( 5 - 20 ) سنة وقد تمت معالجة جميع العينات بالطرق التقليدية والتي تضمنت اولاً زراعتها على وسط السابرويد دكستروز اكار وحضنت بدرجة 37م° ولمدة ( 24 - 48 ) ساعة وتم التشخيص على مستوى النوع باستخدام تقنية صبغة كرام لجميع العينات , انتاج الانبوب الجرثومي والكلاميدو سبور للتفريق بين المبيضات البيضاء عن غيرها من المبيضات تلتها زراعة العينات على وسط الكروم اكار وحضنت بدرجة 37م° ولمدة ( 24 - 48 ) ساعة . وتم اجراء الفحوصات البايوكيميائية ( فحص اليوريز و فحص تخمر السكريات ) لكل عينة .

استخدمت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف السريع عن اجناس المبيضات عن طريق استخدام البادئ العالمي و البادئ الخاص بالفطر لتحديد كل من *C.albicans* , *C.tropicalis* , *C.glabrata* وزرعت جميع هذه العينات على الوسط المغذي السائل ثم استخلص الحامض النووي DNA منها باستخدام ( DNA Extraction Mini Kit ) واجري الترحيل الكهربائي لغرض تحديد وجود الحزم الخاصة بهذه الاجناس .

اشارت النتائج ان العوامل البيئية التي تضمنت ( الجنس ومرض السكري ) لم يكن لها تأثيرا معنويا مسببا لالتهاب الفم المصاحب لقاعدة الطقم وفيما يخص الفئات العمريه فان هناك فروقات معنويه بين المرضى من كلا الجنسين عند الفئه العمريه 66 الى 70 سنه ووجدت الدراسه ان ( ارتداء الطقم ليلا و قدم عمر الطقم ) كان لهما تأثيرا معنويا مفاقما لهذه الحالة كما ان الاهتمام بنظافة الفم والطقم ادى الى تناقص حالات الالتهاب، ان جميع العزلات شخصت

بدقة على مستوى النوع حيث وجدت الدراسة ان النوع السائد هو المبيضات البيضاء *C.albicans* وان من بين ما مجموعه 62 عزلة من المبيضات كانت نسبة المبيضات البيضاء 46.8% تبعها *C.glabrata* بنسبة 33.9% ثم *C.tropicalis* بنسبة 17.7% واخيرا *C.krusei* حيث شكلت نسبة 1.6% كما اشارت الدراسة الى ان القله من عزلات المبيضات لايمكن تشخيصها بدقة باستخدام وسط الكروم اكار فهذا الوسط لايستطيع تمييز بعض انواع المبيضات بسهولة ففي بعض الاحيان شخصت *C.glabrata* بصورة خاطئة على انها *C.parapsilosis*، كانت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل للبادئ العالمي المخصص للفطريات قد اعطت حزما عند المواقع 520 bp, 870 bp , 530 bp للانواع *C.albicans* , *C.glabrata* و *C.tropicalis* على التوالي في حين اعطت الانواع الثلاثة حزما عند المواقع 273 bp , 404 bp و 501 bp عند استخدام البادئ الخاص بكل نوع.

وخلصت الدراسة الى ان المبيضات البيضاء *C.albicans* كانت النوع السائد في مرضى التهاب الفم المصاحب لقاعدة الطقم تبعها نوع *C.glabrata* وان ارتداء الطقم ليلا وبصورة مستمرة , قدم عمر الطقم والعادات الصحية السيئة قد تزيد في حالات التهاب الفم المصاحب لقاعدة الطقم كما انه مما لا شك فيه ان تحديد الفطريات اليوم وفي المستقبل يدعم بكلا الطريقتين المظهرية والجزيئية غير ان تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل يعتبر اكثر دقة وسرعة من الطرق التقليدية واكثر خصوصية وتستغرق وقت اقل وان استخدام هذه التقنية يعد من اقوى الادوات واكثرها شيوعا للكشف والتعريف المبكر للفطريات عن طريق تحديد الحامض النووي كما قدمت الدراسة جين الفوسفولايبيز B كهدف حاسم لتشخيص المبيضات في العينات السريرية .