

عزل وتشخيص بعض انواع الفطريات من حالات التهاب قناة الاذن الخارجية مع فحص حساسية العزلات لبعض انواع المضادات الفطرية

داليا عبد الكريم عبد الشهيد

فرع الاحياء المجهرية - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد - بغداد - العراق

29/11/2008 تاريخ التسليم

27/01/2009 تاريخ القبول

الخلاصة

تضمن البحث عزل بعض انواع الفطريات بنوعها الاعفان والخمائر من حالات التهاب قناة الاذن الخارجية في الانسان من مستشفى اليرموك التعليمي ، حيث تم جمع 50 عينة من كلا الجنسين ومن مختلف الاعمار خلال فصل الصيف ، كما تم اخذ 10 عينات من حالات غير مرضية كسيطرة . وكذلك اجري اختبار الحساسية للعزلات لبعض من اهم واكثر انواع المضادات الفطرية شيوعا واستخدما في علاج حالات التهاب قناة الاذن الخارجية ، وبعد تنمية العزلات على وسط السابروديكسيترور اكار شخصت كما مبيين ادناه:

9 عزلات *Aspergillus niger* , 6 عزلات *Aspergillus fumigatus* , 3 عزلات *Aspergillus flavus* , عزلة واحدة *Aspergillus terrus* , 10 عزلات *Candida albicans* , 5 عزلات *Candida tropicalis* , عزلتين *Candida parapsilosis* .
فيما اظهرت نتائج اختبار حساسية العزلات اتجاه المضادات الفطرية كما يلي :

اظهرت انواع فطر *Aspergillus spp.* حساسية عالية جدا اتجاه المضادين Clotrimazole و Econazole بحيث لم يظهر نمو في الاطباق وحساسية اقل اتجاه Nystatin ، بينما اظهرت انواع خميرة *Candida spp.* حساسية واضحة جدا اتجاه المضادين Nystatin و Econazole حتى في التراكيز الواطئة واظهرت حساسية اقل بكثير اتجاه Clotrimazole .

Summary Isolation and diagnosis of some fungal types from external ear canal infection cases with sensitivity test to some antifungal agents

Dalya abulkareem abdulshaheed

Dept. of microbiology –college of Vet. Med.- Baghdad university – Baghdad - Iraq

Summary

This research included isolation of some types of fungi of molds and yeasts from cases of inflammation of external ear canal in human from AL- yarmouk Teaching Hospital, by collection of 50 samples from males and females and from different ages during summer season , also 10 samples from non infected cases were taken as control. Also sensitivity test of some isolates against some important antifungal agents which commonly used in the treatments of infection of external ear canale cases.

After cultivation of isolates on saboroud dextrose agar, diagnosed as follows :

9 isolates of *Aspergillus niger*, 6 isolates of *Aspergillus fumigatus*, 3 isolates of *Aspergillus flavus*, one isolate of *Aspergillus terrus*, 10 isolates of *Candida albicans*, 5 isolates of *Candida tropicalis*, 2 isolates of *Candida parapsilosis*.

The results of the sensitivity tests of some isolates against the antifungal agents appeared as follows: the isolates of *Aspergillus spp.* were very sensitive to Clotrimazole and Econazole, while were less sensitive against Nystatine.

Whereas the species of *Candida* were very sensitive to Nystatine and Econazole, but less sensitive against Clotrimazole.

المقدمة

تعتبر الاذن احد الاجزاء المهمة والحساسة في الجسم ، حيث تتكون من الصيوان وقناة الاذن الخارجية والاذن الوسطى منتهية بطبلة الاذن وتغطي قناة الاذن الخارجية بالجلد والذي يحتوي على الشعر والغدد الدهنية ، وتقوم الغدد بافراز مادة لزجة ، كما ان الجلد الميت يختلط مع افراز الغدد ليكون ما يسمى شمع الاذن (Cerumen) والذي يشكل حماية للقناة من الالتهاب لانه حامضي ويحتوي كذلك على مستضدات وانزيمات ، لذا فان اي عامل يؤدي الى تحطيم هذه الطبقة او تقليل حموضتها يؤدي الى التهاب القناة، ومنها ازالة الشمع بالتنظيف الزائد باستخدام أعواد القطن (1). وعادة ما تكون الأصابة سطحية و قد تمتد الى داخل القناة وصولا لغشاء الطبلة، وتكون الأصابة بثلاث أشكال (المزمن، الحاد، تحت الحاد) اعتمادا على شدة الأصابة، وقد قسم (1,2) التهاب قناة الأذن الخارجية الفطري الى ثلاث أنواع:

1. الالتهاب الفطري الغير مرضي (Non pathogenic mycosis)

حيث عزلت انواع من عفن *Aspergillus spp.* من المناطق العميقة الرطبة للقناة، كما لوحظت خيوط العفن نامية على شمع الاذن وبقايا الخلايا الظهارية الميتة .

2. الالتهاب الفطري السطحي (superficial mycosis)

3. الالتهاب الفطري العميق (Deep (invasive) mycosis)

حيث لوحظ ان النوعين الاخيرين هما الاكثر حدوثا .

كما وبين (3,4) ان هناك عدة عوامل تعتبر مهينة لحدوث الاصابة هي :

الاصابة المزمنة للقناة الخارجية للاذن مع طول فترة استخدام المضادات الحيوية والمركبات الستيرويدية للاذن وبشكل قطرات ، حدوث اصابة فطرية خاصة ببعض انواع الخمائر في بعض اعضاء الجسم، مرض السكري، امراض اخرى تغير من الاستجابة المناعية للجسم. اما (6,10) فقد بين العوامل المهينة للاصابة :

غياب شمع الاذن الرطوبة العالية، زيادة درجات الحرارة، الكلدن الموضعي للاذن (Local truma) ،استخدام المسحات القطنية(عيدان تنظيف الاذن) او قرصات الشعر، كثرة السباحة او التعرض للماء يزيل طبقة الشمع ويؤدي الى جفاف القناة السمعية، الاصابة بالاكزما ، الجيوب الانفية التحسسي (allergic rhinitis) والربو (asthma) ،استخدام المضادات الحيوية لفترات طويلة.

وعزلت انواع من خميرة *Candida spp.* من قناة الاذن الخارجية عند النساء في نفس الوقت كانوا مصابين بالالتهاب المهبلي وكذلك بعضهم مصاب بالالتهاب الاظافر الفطري المزمن (5,6). كما وعزلت انواع من عفن *Aspergillus spp.* من قناة الاذن الخارجية من خلال ملاحظة بقايا الجلد الميت مصبوغة باللون الاسود او الاصفر بينما لوحظت افرازات كريمية بيضاء في حالة الاصابة بخميرة *Candida spp.* (7)، واكدت الكثير من البحوث من ان الاصابة تزداد في المناخ الحار اكثر وكذلك لدى السباحين الرياضيين ، حيث لوحظ ان من بين كل 8 حالات التهاب قناة الاذن الخارجية 3 حالات اصابة فطرية ، وان الفطريات المعزولة منها كانت انواع من *Aspergillus spp.* وخاصة وبالدرجة الاولى *Aspergillus niger* ثم باقي الانواع وانواع من خميرة *Candida spp.* (7,8). ولاحظ (6,9) ان الاصابة تزداد في الاجواء الحارة وكذلك في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية، بينما لوحظ ان الاصابة اكثر في نهاية الصيف خاصة في البلدان الاوربية، بينما تم عزل بعض انواع عفن *Aspergillus spp.* وخميرة *Candida spp.* من حالات التهاب قناة الاذن في اشخاص يعانون من نقص مناعي او اضطرابات مناعية او المتأولين للعلاجات المثبطة للمناعة (1,8,11).

ولاهمية هذا الموضوع فقد هدف هذا البحث الى عزل وتشخيص بعض انواع الفطريات المسببة لمرض التهاب قناة الاذن الخارجية الفطري لانتشاره عند الاطفال والمراهقين خاصة في فصل الصيف وكذلك اجراء فحص الحساسية للعزلات لغرض اختيار المضاد المناسب للعلاج.

المواد وطرائق العمل

* جمع النماذج : تم جمع 50 عينة من حالات التهاب الاذن الخارجية في الانسان وبمختلف الاعمار ومن كلا الجنسين وبهيئة مسحات قطنية بالتعاون مع مجموعة من اخصائين انف واذن وحجرة في مستشفى اليرموك التعليمي خلال الفترة الممتدة ما بين شهر اذار وحتى شهر اب من عام 2008, كما تم جمع 10 عينات اخرى من حالات غير مرضية كنماذج سيطرة.

* عزل الفطريات: زرعت العينات على وسط السابورد ديستروز اكار SDA وبمعدل طبقين لكل نموذج وحضنت الاطباق بدرجة 37 م° و 25 م° ولمدة اسبوع مع ملاحظة النمو كل يومين وفي حالة عدم ظهور النموخلال المدة اعلاه تركت لاسبوع اخر فعند عدم ملاحظة النمو اعتبرت النتيجة سالبة, كما تم عمل مسحة من كل نموذج على شريحة زجاجية مع اضافة هيدروكسيد البوتاسيوم 10 % وباستخدام صبغة اللاكتوفينول الازرق لغرض الفحص المجهرى.

* الفحوص التشخيصية: Diagnostic test

- الفحص العياني (Macroscopic test) : فحصت المستعمرات الفطرية من حيث شكلها,لونها,قطرها.
- الفحص المجهرى(Microscopic) : فحصت مجهريا باخذ جزء صغير من المستعمرة ووضعت على شريحة زجاجية وصبغت بصبغة اللاكتوفينول الازرق مع وضع غطاء الشريحة وتركت لمدة قليلة لتتبع بالصبغة وفحصت تحت المجهر بقوة تكبير 40x .
* اختبار حساسية الفطريات المعزولة لبعض المضادات الفطرية :

استخدم ثلاثة انواع من اكثر انواع المضادات الفطرية استخداما لمعالجة حالات التهاب قناة الاذن الخارجية Nystatin ، Clotrimazole ، Econazole وبعد تحضير المحاليل القياسية لها مزجت مع الوسط المستخدم وبتلات تراكيز 0.25% , 1% , 3% لكل مضاد فطري وحسب طريقة (12).

النتائج

- اظهرت نتائج البحث عزل مجموعة من الاعفان والخمائر وكما موضح في الجدول (جدول 1).

جدول (1) : نوع وعدد الفطريات المعزولة من حالات التهاب قناة الاذن الخارجية في الانسان

نوع العزلة	عدد العزلات الموجبة	نسبة الاصابة%
<i>Aspergillus niger</i>	9	25
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6	16.66
<i>Aspergillus flavus</i>	3	8.33
<i>Aspergillus terreus</i>	1	2.77
<i>Candida albicans</i>	10	27.77
<i>Candida tropicalis</i>	5	13.88
<i>Candida parapsilosis</i>	2	5.55
المجموع	36	100

كما واطهرت النتائج ان ارتفاع درجات الحرارة والرطوبة اثرت بشكل واضح على زيادة معدلات الاصابة, وتبين ان اكثر نسبة للاصابة كانت عند الاطفال والمراهقين بينما الاعمار الكبيرة كانت اقل نسبة للاصابة, وكذلك اظهرت النتائج ان اصابة قناة الاذن الخارجية بالفطريات تصيب كلا من الاناث والذكور الا ان نسبة اصابة الذكور اكثر من الاناث (الجدول 2).

جدول (2): الفئات العمرية الأكثر إصابة مع نسبة الإصابة المئوية للذكور والاناث وتاريخ الحالة المرضية

تاريخ الحالة المرضية	الاناث		الذكور		الفئات العمرية (سنة)
	نسبة الإصابة %	عدد النماذج الموجبة	نسبة الإصابة %	عدد النماذج الموجبة	
الارتداد للمساح مع استخدام عيدان تنظيف الاذن باستمرار	20	2	26.92	7	10 - 1
	50	5	34.61	9	20 - 11
اصابة جهازية بالفطريات	-	-	3.84	1	30 - 21
اصابة بمرض السكري واصابة مهبلية	20	2	7.69	2	40 - 31
بعضهم مصاب بالسكري والبعض الآخر يتعاطى ادوية مثبطة للمناعة والقسم الاخر يتناولون المضادات الحياتية لفترات طويلة	10	1	19.23	5	50 - 41
	-	-	7.69	2	60 - 51
	100	10	100	26	المجموع

*نتائج فحص الحساسية للمضادات الفطرية:

اعتمدت النتائج على قياس قطر المستعمرة النامية باختلاف تراكيز المضاد الفطري .

01 نتائج حساسية انواع عفن *Aspergillus spp.* للمضادات الفطرية :

لوحظ حساسية عالية جدا للمضادين Clotrimazole و Econazole خاصة في التراكيز العالية بحيث لم يظهر نمو في الاطباق على العكس

من قلة حساسية للمضاد الفطري Nystatin فقد كان اقل حساسية (الجدول 3).

02 نتائج حساسية انواع خميرة *Candida spp.* للمضادات الفطرية :

اظهرت عزلات الخميرة حساسية قليلة اتجاه Clotrimazole ، بينما كانت حساسة جدا حتى في التراكيز الواطئة اتجاه Econazole و Nystatin

(الجدول 3).

جدول (3): اقطار المستعمرات ب(ملم) بعد اضافة المضادات الفطرية الثلاثة المستعملة للوسط الزراعي بثلاث تراكيز مختلفة

نوع العزلة	تراكيز Econazole			تراكيز Clotrimazole			تراكيز Nystatin			اطباق سيطرة ملم
	%3	%1	%0.25	%3	%1	%0.25	%3	%1	%0.25	
<i>Aspergillus niger</i>	-	7	20	-	2	21	-	36	40	45
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	5	22	-	4	24	-	38	43	49
<i>Aspergillus flavus</i>	-	6	19	-	3	15	-	31	38	42
<i>Aspergillus terrus</i>	-	7	19	-	6	17	-	34	41	47
<i>Candida albicans</i>	-	1	2.1	0.8	2	2.7	-	-	1	3
<i>Candida tropicalis</i>	-	1.4	2	1	1.8	2.5	-	-	0.5	3.5
<i>Candida parapsilosis</i>	-	1	1.7	0.5	1.5	2	-	-	0.8	2.5

المناقشة

يعتبر التهاب قناة الاذن الخارجية الفطري من الامراض الشائعة الحدوث، فقد لوحظ زيادة الاصابة بالمرض في موسم الصيف وذلك لرغبة الناس على ارتياد المسابح او استخدام المسابح في المنزل ونتيجة لارتفاع درجات الحرارة والرطوبة العاليتين والتي تعتبر من العوامل المهيبة للاصابة. فقد تحدثت الاصابة نتيجة دخول الماء للاذن وهذا ما بينه (3,4) فقد اوضح ان احد اهم العوامل المهيبة للاصابة بالمرض هو زيادة درجات الحرارة والرطوبة العالية مع زيادة الاصابة في البلدان الحارة و الاستوائية وشبه الاستوائية، بينما وجد ان زيادة نسبة الاصابة لدى الذكور الاطفال منهم والمراهقين عنه في الاناث وذلك لرغبة الذكور في هذه الاعمار على السباحة اكثر من الاناث خاصة في مجتمعاتنا ، فيما كانت الاعمار الاكثر سنا اي ما بين 30 فما فوق هم الاقل نسبة للاصابة وذلك لقله اقبالهم على المسابح او استخدامها منزليا . ووضحت نتائج هذا البحث عن زيادة نسبة الاصابة لدى الاشخاص المصابين بمرض السكري وكذلك الاشخاص المتناولين لعلاجات تؤدي لاضطرابات مناعية وهذا ما بينه (1,4) الذي اكد ان من العوامل المهمة التي تؤدي الى زيادة الاصابة بالمرض هي الاصابة بمرض السكري واكد عند استخدام العلاج لهؤلاء الاشخاص يجب ان تحدد نسبة السكر في الدم لمعرفة اختيار العلاج المناسب لمثل هذا الالتهاب ، ووضح (2,14) ان المصابين بامراض مناعية او المتناولين لعلاجات تؤدي الى اضطرابات او تثبيط مناعي تلاحظ عندهم زيادة في نسبة الاصابة بالمرض . ومن خلال هذا البحث ايضا تبين ان الاستخدام المفرط للمسحات القطنية (عيدان تنظيف الاذن) وازالة شمع الاذن بشكل مستمر يؤدي الى زيادة الاصابة وذلك كون ان شمع الاذن ويقاها الانسجة الظهارية الميتة لجلد قناة الاذن الخارجية يعتبران حماية لها من الاصابة بالفطريات او الجراثيم الاخرى مما يؤدي الى تغير في الاس الهيدروجيني الوسط ، حيث يعتبر الشمع وسط حامضي يقتل او يقلل من فرصة نمو الفطريات والجراثيم الاخرى ، فعند تغير الاس الهيدروجيني يؤدي الى زيادة احتمالية نمو الفطريات اكثر (3,6) ، كذلك الاصابة بالامراض الجلدية مثل الاكزما او الاصابة بالتهاب الجيوب الانفية التحسسي وكذلك الكدم تؤدي جميعها لزيادة نسبة الاصابة وهذا ما بينه ووضحه (1,10) الذي اعتبر هذه الاصابات اعلاه من العوامل التي تساعد في حدوث وزيادة الاصابة

الفطرية لقناة الاذن الخارجية، ووضحت الدراسة ايضا ان زيادة نسبة الاصابة تكون واضحة اكثر لدى الاشخاص المتعاطين للمركبات الاستيرودية وللمضادات الحياتية ولفترات طويلة وقد بين (2,9) من ان استخدام هذه العلاجات لفترات زمنية طويلة تؤدي لزيادة الاصابة الفطرية لقناة الاذن الخارجية كونها قد تقلل من مناعة الجسم .

وبينت النتائج عزل انواع من عفن *Aspergillus spp.* من قناة الاذن الخارجية ، حيث كانت نسبة الاصابة بعفن *Aspergillus niger* اكثر حدوثا ثم *Aspergillus fumigatus* ثم *Aspergillus flavus* ويليهما عفن *Aspergillus terrus* وهذا ما اكده (7,8) ، حيث لاحظ نمو الخيوط الفطرية على او بين شمع الاذن وكذلك على الجلد المبطن لقناة الاذن الخارجية .

فيما عزلت حالات اصابة بانواع من خميرة *Candida spp.* ، فقد عزلت بالدرجة الاولى *Candida albicans* ثم *Candida tropicalis* ثم *Candida parapsilosis* وهذا ما يؤكد (4,5) ، حيث عزل بعض انواع من هذه الخميرة من حالات التهاب قناة الاذن الخارجية منها *Candida albicans* ، *Candida tropicalis* ، *Candida parapsilosis* ، *Candida famata* ، *Candida kefyr* ، *Candida guilliermondii* ، حيث لاحظ ظهور افرازات بيضاء من قناة الاذن وكذلك بقع بيضاء داخل جلد قناة الاذن الخارجية، ووضح (13,14) ان الاصابة بانواع خميرة *Candida spp.* ناتجة عن افرازها لانزيمات محللة تساعد في الاختراق وغزو انسجة المضيف ومن هذه الانزيمات *protease* ، *phospholipases* ، *phosphatases* ، *estesase* ، حيث بين اهمية هذه الانزيمات في زيادة نسبة الاصابة والتي تعتبر من اهم عوامل الضراوة لدى انواع هذه الخميرة ، ولهذا السبب كانت الاصابة والاعراض شديدة لدى الاشخاص المصابين بها وقل شدة لدى المصابين بفطر *Aspergillus spp.* .

فيما يخص اختبار الحساسية فقد استخدمت ثلاثة من اهم انواع المضادات الفطرية والاكثر شيوعا في علاج حالات التهاب قناة الاذن ، فقد كان المضاد الفطري Econazole هو الاكثر تأثيرا على فطر *Aspergillus spp.* وخميرة *Candida spp.* حتى في التراكيز الواطئة وذلك لتركيبه الكيميائي كونه ينتمي لمجموعة Azoles التي تعمل على تثبيط سايتوكروم الخلية الفطرية وبثبط الانزيم المسؤول عن تصنيع الاروكستيرول ergosterol لغشاء الخلية ويساعد على تراكم الدهون الفوسفاتية داخل الخلية الفطرية مما يؤدي الى موتها (15,16) ، بينما كان تاثير Clotrimazole على فطر *Aspergillus spp.* اكثر منه على خميرة *Candida spp.* ويعود سبب هذا الاختلاف في التثبيط الى قلة التركيز المطلوب لتقليل نمو وقتل الخميرة بالرغم من كونه ينتمي لمجموعة Azoles (16) ، اما تأثير Nystatin فقد كان واضحا على خميرة *Candida spp.* على عكس من فطر *Aspergillus spp.* فكان اقل تأثيرا بقليل عن الخميرة وقد يعود السبب الى قلة التركيز المطلوب في تثبيط نمو الفطر على الرغم من كون هذه المضاد يرتبط مع الاروكستيرول ergosterol لغشاء الخلية الفطرية مما يؤدي الى تغير النفوذية وتسريب محتويات الخلية الى الخارج ثم موت الخلية (3,16) .

المصادر

- 1- Kaur, R.; N. Mittal; M. Kakkar; A. K. Aggarwal and M. D. Mathur. (2005). Otomycosis : A clinicomycologic study Ear Nose Throat J. 79: 606-9.
- 2- 2-Chander J; Maini S and Subrahmanyam S.(2004). Otomycosis clinicmycological study and efficacy of mercurochrome in its treatment.Mycopathologia; 35:9 - 12.
- 3- Garry JP. (2007). Otitis externa. Clinics in Dermatology. 15:22-25.
- 4- Irina and Vennewald. (2008). otomycosis. Clinics in Dermatology. 23:565- 571.
- 5- Ghannum MA and Abu Elteen KH. (2007). Pathogenicity determinants of *Candida*. Mycoses; 33: 265–82.
- 6- Amigot SL; Gomez CR;Luque AG and Ebner G. (2003). Microbiological study of external otitis in Rosario City, Argentina.Mycoses; 46: 312–5
- 7- Supiyaphun P;Sampatanukul P and Sukumalpaiboon P.(2007). Aspergillus Colonization in external ear canal. Otolaryngol Head Neck Surg;125:281 - 2.
- 8- Bellini C;Antonini P and Ermanni S.(2007). Otitis externa due to Aspergillus spp. Scand J Infect Dis.;35:284-8.
- 9- Rowlands S; Devalia H and Smith Cl . (2007). Otitis externa in UK . Br J Gen Pract. Jul;51(468):533-8.
- 10- Vennewald I; Schfnlebe J and Klemm E. (2003). Mycological and histological investigations in humans with external ear infections. Mycoses; 46: 12- 8.

11- Stern; J. C.; M. K. Shah; and F.E. Lucente.(2001). In vitro effectiveness of 13 agents in otomycosis and review of the literature. Laryngoscope. 98:1173-7.

012 الجبوري ، سيناء وليد (2000) دراسة خمج الفطريات الانتقالية في الردهات الباطنية في مستشفى البرموك التعليمي – رسالة ماجستير في الاحياء المجهرية –كلية الطب – الجامعة المستنصرية.

- 13- Macdonald F and Odds FC. . (2004). Purified *Candida albicans* proteinase in the serological diagnosis of systemic candidosis; 243: 2409 –11.
- 14- Valentina A.;Nenad A. and Aleksandar D .(2008).Protease activities of *Candida* spp. Isolated from immunocompeten patients with otomycosis.;23:171-174.
- 15- Ho T; Vrabec JT and Yoo DI. (2006). Otomycosis: clinical features and treatment implications. Otolaryngol Head Neck Surg. Nov;135(5):787-91.
- 16- Bassiouny A.; T. Kamel; M. K. Moawad and D. S. Hindawy.(2007). Broad spectrum antifungal agents in otomycosis. J Laryngol Otol. 100:867-73.