جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ميسان/ كلية العلوم
قسم علوم الحياة

عزل وتشخيص بعض الفطريات الإنتهازية لمرضى التهابات الأُذن الخارجية في محافظة ميسان

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية العلوم – جامعة ميسان وهي جزءٌ من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من الطالبة

أزهار ليلو سيد

بكالوريوس علوم الحياة ٢٠١٤

بإشراف

أ.د. علي عبد الواحد قاسم

١٤٤٥ هـ ٢٠٢٣ م

بسم الله الرحمن الرحيم

((وَاللَّهُ أَخْرَجَكُم مِّن بُطُونِ أُمَّهَاتِكُمْ لَا تَعْلَمُونَ شَيْئًا وَجَعَلَ لَكُمُ السَّمْعَ وَالْأَبْصَارَ وَالْأَفْئِدَةَ لَعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ))

صدق الله العلي العظيم

(٧٨ النحل)

المقومون

المقوم اللغوي

قومت الرسالة لغوياً من قبل ( ) جامعة / كلية

التقويم العلمي

قومت الرسالة علمياً من قبل كلاً من :

( ) جامعة /كلية و( ) جامعة / كلية

مصادقة عمادة كلية العلوم

بناء على الصلاحيات المخولة لنا نصادق على ما جاء في قرار لجنة المناقشة في أعلاه.

التوقيع :

الاسم :

العنوان : جامعة ميسان/ كلية العلوم

التاريخ :   /   / ٢٠٢٣ م

الإهداء

لوجهك اللهم خالصاً ....

اقدم عملي قاصداً نيل رضاك وبلوغ عفوك سائلاً أياك القبول الحسن....

وإلى مولاي صاحب العصر والزمان الامام المهدي المنتظر عجل الله فرجه.....

إلى الذين زرعوا فيّ حب العلم وتقديره....

أمي وأبي

إلى الذي ساندني حتى اواصل مسيرتي العلمية ، واضاء في دربي مشاعل الأمل ....

زوجي العزيز

إلى النور الذي اضاء حياتي وبدد ظلمتها إبنتي العزيزتين على قلبي ....

تقى و ريحانة

إلى رفقاء الحياة الى من يسعدهم نجاحي ....

أخوتي وأخواتي

أهدي إليهم هذا الجهد المتواضع

أزهار

شكر وثناء

الحمد لله والصلاة والسلام على سيد الخلق نبينا محمد وعلى اله وصحبه وسلم ...

بعد أن منَّ الله عليّ بفضلهِ في انجاز هذه الرسالة العلمية اتوجه بالشكر والتقدير الى مشرفي (أ..د علي عبد الواحد قاسم) إلى ما قدم لي من توجيهات مهمة طيلة مدة الدراسة.

وأقدم الشكر الى عمادة كلية العلوم جامعة ميسان المتمثلة بالدكتور صبيح جاسم كما أوجه شكري الى رئاسة قسم علوم الحياة المتمثلة بالدكتور ميثم عبد الكاظم دراغ .

كما وأقدم خالص شكري واحترامي إلى أ.د طلال حسين صالح لما قدمة لي...

وأقدم خالص شكري واحترامي أ.م.د. صادق موسى أحمد أخصائي (أنف وإذن وحنجرة) وإلى الكادر الخاص في مستشفى الصدر التعليمي العام لمساعدتهم لي بالحصول على المسحات السريرية أسال الله الشفاء للجميع .

لا انسى كل الشكر إلى من ساندني ووقف بجانبي وتحمل كافة الصعوبات معي الى رفيق دربي (محمد عبد الرضا موسى).

واقدم امتناني الى والدي والى اخواني واخواتي على دعمهم وتشجيعهم المستمر.

أزهار

الخلاصة

يعد مرض فطار الأذن Otomycosis والذي يعرف ايضاً بالتهاب الأذن الخارجي الفطري أحد الالتهابات الفطرية التي تحدث كثيراً في القناة السمعية الخارجية للأذن ، وهو من الامرض الشائعة ، لذلك أجريت هذه الدراسة لأول مرة في محافظة ميسان ، حيث تم جُمع 115 عينة سريرية من المرضى المراجعين لقسم الأستشارية للأنف والأذن والحنجرة في مستشفى الصدر التعليمي العام وبعض العيادات الخاصة في محافظة ميسان خلال الفترة من (2022/11/1) ولغاية (2023/3/20)، وتم اخُذت العينات بأستخدام مسحات قطنية معقمة Sterile swabs وبأشراف مباشر من الطبيب المختص وللأعمار كافة ولكلا الجنسين.

أجريت الدراسة في مختبر الفطريات في كلية العلوم / جامعة ميسان لغرض فحصها وزراعته. وهدفت الدراسة الى عزل وتشخيص بعض أنواع الفطريات والخمائرمن الاشخاص المصابين بالتهاب الأذن الخارجي الفطري Otomycosis ، حيث جمعت العينات من الأشخاص المصابين و بفئات عمرية مختلفة تراوحت بين (1-80) سنة ، تم زراعتها مختبريا على وسط SDA ، ووجد منها 109عينة موجبة وبنسبة 94.8 % ، وتم عزل 112 عزلة في هذه الدراسة 72 عزلة تعود للفطريات الخيطية و 40 عزل تعود الى للخمائر المبيضات *Candida* sp. حيث كان جنس الـ *Aspergillus* spp. هو الاكثر انتشاراً في العينات الموجبة المعزولة اذ كان عدد العينات المعزولة والتي تعود الى جنس الـ *Aspergillus* spp. (57) عزلة وبنسبة (50.9%) وكان النوع السائد والاكثر الانتشاراً *Aspergillus niger* على بقية الانواع 41 عزلة وبنسبة (36.6%) ، تليه الخميرة *C.parapsilosis* 15 عزلة وبنسبة (13.39%) ، بينما كانت الفطريات الخيطية *A.orymzae* و *Alternaria alternata* اقل عدد من عزلات واقل نسبة تردد (عزلة واحد لكل منهما على التوالي) وبنسبة (0.89) .

واظهرت نتائج الدراسة إن نسبة الأناث (55.04%) أعلى مما هي علية في الذكور(44.9%) وكانت الفئة العمرية (21-30) سنة اكثر عرضةً للأصابة بفطريات الأذن وبنسبة (33.02%) ، بينما كانت اقل فئة عمرية معرضة للأصابة بفطريات الأذن الخارجية (11-20) سنة وبنسبة (2.8%).

واظهرت نتائج اختبار انتاج الافرازات الانزيمية للعزلات الفطرية المعزولة من قناة الاذن الخارجية EAC والتي تتمثل بأنزيم الفوسفولايبيزوالعامل المحلل للدم (الهيمولايسين) وانزيم الأستريز اذ سجلت جميع العزلات الفطرية المختبرة والتي يكون عددها 9 فطريات خيطية منتجة

لانزيم الفوسفولايبيز بنسبة 100 % ، و6 عزلات منتجة للهيمولايسين من مجموع 9 عزلات وبنسبة66.7 % ، و8 عزلات منتجة لانزيم الاستريز بنسبة 88.9 % .

واظهرت النتائج إن المستخلص النباتي الثوم اظهر نشاطاً تثبيطياً أعلى ضد الخمائر والفطريات الخيطية المرضية والمعزولة من قناة الاذن الخارجية ، يليه القرنفل والمضادين الفطريين النستاتين و الفلوكونازول.

كما واجريت الدراسة الجزيئية لبعض الأنواع المعزولة بأستخدام تقنية الـ PCR لتعرف على هذه الفطريات ، اذ تم اختيار 14 نوعاً من الفطريات و التي شخصت مظهرياً ودراستها على مستوى الجزيئي ، ومقارنة تتابع قواعدها النيتروجينية مع الفطريات المحفوظة في بنك الجينات ، إذ اوضحت نتائج الدراسة الجزيئية إن هناك تطابقاً تراوحت نسبته بين 96% الى 100% بين عزلاتنا والعزلات المحفوظة في بنك الجينات ، وتم عمل الشجرة الوراثية لهذه الأنواع لمعرفة العلاقات التطورية وتحديد نسبة تطابقها وقربها من العينات الموجودة في بنك الجينات وبإستخدام برنامج MEGA.

قائمة المحتويات

الرقم	العـــــنوان	الصفحة
I	الأهداء	
II	الشكر والتقدير	
III	الخلاصة	
VI	قائمة المحتويات	
IX	قائمة الجداول	
X	قائمة الأشكال	
XII	قائمة المختصرات	
	الفصل الأول- المقدمة	
1	المقدمة Introduction	3-1
	الفصل الثاني- استعراض المراجع	
1-2	الفطريات	4
2-2	التهاب الاذن الخارجي	4
3-2	التهاب الاذن ا الخارجية لفطري	5
4-2	الإمراضية	7-6
5-2	الفطريات المسببة التهاب الاذن الخارجية الفطري	12-7
6-2	الفعالية الانزيمية للفطريات والخمائرالمعزولة من الاذن الخارجية	13
1-6-2	انزيمات الفوسفولايبيز	14
2-6-2	الإستيريز	15
3-6-2	المحللات الدموية البروتينية	15
7-2	المضادات الفطرية	16
1-7-2	مجموعة الأزول	17-16
2-7-2	مجموعة البولين	17
8-2	استخدام النباتات الطبية في علاج الفطريات المرضية.	18
1-8-2	النبات المستخدم في الدراسة	19
1-1-8-2	نبات الثوم	19
2-1-8-2	نبات القرنفل	20
9-2	الطرق الجزيئة في تشخيص الفطريات	22-21
	الفصل الثالث – المواد وطرق العمل	
1-3	المواد وطرائق العمل Materials and methods	23

1-1-3	الاجهزة والادوات المستخدمة في الدراسة	24-23
2-1-3	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة	25
3-1-3	الأوساط الزرعية	26
4-1-3	المضادات الفطرية المستخدمة	27
2-3	طرق العمل Methods	27
1-2-3	جمع العينات	27
2-2-3	تحضير الأوساط الزرعية المستخدمة	27
1-2-2-3	وسط السابرويد دكستروز اكار Sabouraud's Dextrose Agar(SDA)	27
2-2-2-3	وسط البطاطا دكستروز اكار(Potato Dextrose Agar (PDA	27
3-2-2-3	وسط الكروم اكار كانديدا CHROM agar *Candida*	28
4-2-2-3	وسط السابرويد دكستروز اكار مع السايكلوهكسامايد Sabouraud's Dextrose Agar with Cychlohexamide	28
5-2-2-3	وسط الكازئين Casein agar	28
6-2-2-3	وسط Brain Heart Infusion agar	28
7-2-2-3	وسط Phospholipase activey medium	29
8-2-2-3	وسط Hemolysin activey medium	29
9-2-2-3	وسط MediumTween 80 Opacity test	29
3-2-3	التعقيم Sterilization	29
4-2-3	صبغة اللاكتوفينول ازرق المثلين Lactophenol cotton blue stain	30
5-2-3	زرع العينات	30
6-2-3	فحص العينات المزروعة	30
7-2-3	تشخيص الفطريات :	31
1-7-2-3	التشخيص الفطريات الخيطية	31
2-7-2-3	تشخيص الخمائر	31
9-2-3	حساب النسبة المئوية للتردد والظهور	33
10-2-3	قياس الفعالية الانزيمية لبعض انواع الفطرية	33
1-10-2-3	اختبار فعالية انتاج انزيم الفوسفولايبيز Phospholipase	33

3-2-10-2	Esterase activity test اختبار فعالية انزيم الإستريز	34
3-2-10-3	اختبار تحلل الدم (فعالية الهيمولايسين) Hemolysin activity test	34
3-2-11	النباتات المستخدمة في الدراسة	35
3-2-11-1	تحضير المستخلصات النباتية :	35
3-2-11-2	اختبار فعالية المستخلص الكحولي لنبات القرنفل والثوم تجاه الفطريات والخمائر	35
3-2-11-3	اختبار حساسية الفطريات والخمائر للمضادات الفطرية	36
3-2-12	3-2-12:الدراسة الجزيئية للفطريات المعزولة من الاذن الخارجية	36
3-2-12-1	أستخلاص DNA	36
3-2-12-2	الترحيل الكهربائي للـ DNA Electrophoresis of DNA	37
3-2-12-3	اختبار تفاعل سلسلة انزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR)	38
	الفصل الرابع - النتائج والمناقشة	
4-1	عزل وتشخيص فطريات الاذن الخارجية	40
4-2	الاصابة بالفطريات الاذن الخارجية حسب الجنس والعمر	44
4-3	تصنيف فطريات الاذن الخارجية	47-56
4-4	تشخيص المبيضات المعزولة مظهرياً بالزرع المختبري وبالفحص المجهري	58
4-5	الاختبارات التشخيصية لتحديد انواع المبيضات	58
4-5-1	أختبار النمو على وسط Chrome agar *Candida*	58
4-5-2	اختبار تكوين أنبوب الإنبات	59
4-5-3	اختبار النمو على وسط الكازئين اكار	60
4-5-4	اختبار النمو على وسط السابرويد دكستروز اكار مع السايكلوهيكسامايد	61
4-5-5	اختبار نمو العزلات تحت درجة حرارة 45 مْ	61
4-5-6	اختبار فعالية انتاج الغشاء الحيويBiofilm للـ *Candida* sp.	61-62
4-6	قابلية الفطريات الاذن الخارجية على افراز الانزيمات على الاوساط الصلبة	62 -71
4-7	دراسة تأثير المضادات الفطرية Antifungals والمستخلصات النباتية	71-78

	تجاه المبيضات *Candida* sp. والفطريات المعزولة من الـ EAC.	
8-4	استخدام تقنية الـ PCR لتشخيص الفطريات	80-78
9-4	الشجرة الوراثية للفطريات والخمائر المعزولة من الاذن الخارجية المدروسة	97-81
الاستنتاجات والتوصيات		
الاستنتاجات		98
التوصيات		99
المصادر		
المصادر العربية		100
المصادر الأجنبية		137-101

قائمة الجداول

الرقم	عنوان	الصفحة
1	يمثل الاجهزة والادوات المستعملة في الدراسة فضلاً عن الشركات المصنعة والمنشأ	34-23
2	يمثل المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة	25
3	يمثل الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة فضلاً عن الشركة المصنعة والمنشأ	26
4	يمثل مواد التضخيم المستخدمة في تقنية ال PCR	38
5	تتابع القواعد النيتروجينية في البادئين ITS1 وITS4 المستخدمين في عملية التضخيم	38
6	برنامج عملية ال PCR المستخدم في الدراسة الحالية	38
7	الانواع الفطرية المعزولة من الاشخاص المصابين بالتهابات الاذن الخارجية ونسبة ظهورها وترددها%	41
8	النسب المئوية للفئات العمرية للأشخاص المصابين بفطريات الاذن الخارجية	44
9	النسب المئوية الاعراض او الشكاوى الاشخاص المصابين بفطريات الاذن	46
10	النسب المئوية للتوزيع الجغرافي للحالات	46
11	قابلية أنواع خميرة ال *Candida* على النمو تحت درجة حرارة 45 م	61
12	قابلية الفطريات المدروسة على انتاج الانزيمات في الاوساط المختلفة	63
13	التشخيص الجزيئي للفطريات الاذن الخارجية المدروسة	79

قائمة الاشكال

الرقم	العنوان	الصفحة
1	فطر *Alternaria alternate* ،A: المستعمرات على وسط SDA، B: الجهة الخلفية للمستعمرة، C: الكونيدات ،D: كلاميدوسبور	48
2	*Rhizopus oryzae* A : المستعمرات على وسط SDA ،B: الجهة الخلفية للمستعمرة، D،C:الخيوط الفطرية والكونيدات	49
3	*Cladosporium cladosporioides* A: المستعمرات على وسط SDA، B:الجهة الخلفية للمستعمرة ،C: خلايا Shield والكونيدات و الحامل الكونيدي	50
4	*penicillium chrysogenum*A A: المستعمرات على وسط SDA،B: الجهة الخلفية للمستعمرة، C:الحامل الكونيدي والكونيدات	51
5	*Geotrichium candidum* A :المستعمرات على وسط SDA ، B: الجهة الخلفية للمستعمرة ،C:الخيوط الفطرية و الكونيدات	52
6	*Aspergillus terreus*: A المستعمرات على وسط SDA ، B: الجهة الخلفية للمستعمرة، C: الكونيدات والحامل الكونيدي والحويصلة	53
7	*Aspergillus niger* ، :A المستعمرات على وسط PDA ،B: الجهة الخلفية للمستعمرة ، C: الحويصلة والكونيدات والحامل	54
8	*Aspergillus oryzae* ،A: المستعمرات على وسط SDA، B: الجهة الخلفية للمستعمرة،C:الكونيدات والحامل الكونيدي و الحويصلات والخيوط الفطرية	55
9	*Aspergillus flavus*، A: المستعمرات على وسط SDA، B : الجهة الخلفية للمستعمرة، C:الحامل الكونيدي والكونيدات و الحويصلة والخيوط الفطرية	56
10	مستعمرات خميرة نامية على وسط SDA	58
11	A: Candida *albicans* تحت المجهر قوة تكبير 100x،B: تبرعم الخلايا ، C: الخيوط الكاذبة	59
12	أنواع جنس *Candida* sp. المعزولة خلال هذه الدراسة على وسط *Candida* Chrome agar	59
13	أنبوبة الإنبات في الخميرة *Candida albicans*	60
14	الأبواغ الكلاميدية Chlamydospores التي كونتها خميرة *Candida albicans* على وسط الكازئين اكار	60
15	فعالية انتاج الغشاء الحيوي Biofilm لـ *Candida albicans* و *C. parapsilosis*المعزولة من الاذن الخارجية	62
16	قابلية الفطر *Geotrechium candidum* على انتاج انزيمات A: Hemolysin، B:Phospholipase، C: Esteras .	65

17	قابلية الفطر*Aspergillus terreus* على انتاج انزيمات A: Hemolysin، B:Phospholipase، C: Esteras .	66
18	قابلية الفطر *Alternaria alternate* على انتاج انزيمات A: Hemolysin، B:Phospholipase، C: Esteras .	67
19	قابلية الفطر *Rhizopus oryza* على انتاج انزيمات A: Hemolysin، B:Phospholipase، C: Esteras .	68
20	قابلية الفطر *Cladosporium cladosporioides*على انتاج انزيمات A:Hemolysin ، B:Phospholipase، C: Esteras	69
21	قابلية الفطر*Pencillium chrysogenum* على انتاج انزيمات A: Phospholipase، B : Esteras	70
22	قابلية الفطر *A. flavus* على انتاج انزيمات A:Phospholipase ، B: Esteras	70
23	قابلية الفطر Aspergillus *oryzae* على انتاج انزيمات A: Phospholipase ،B: Esterase	71
24	قابلية الفطر على *Aspergillus niger* على انتاج انزيم A: Hemolysin، B:Phospholipase	71
25	Aو B وC: حساسية بعض الخمائر الـ*Candida* spp. اتجاه المضاد الفطري النستاتين والمستخلص النباتي القرنفل والثوم ومقاومته للمضاد الفطري الفلوكونازول بطريقة الانتشار بالأقراص	72
26	A:حساسية الفطر*Aspergillus flavus* ،B:حساسية الفطر *Pencillium chrysogenum* المعزول من قناة الاذن الخارجية أتجاه المضاد الفطري الفلوكونازول والنستاتين والمستخلصين النباتين الثوم والقرنفل	73
27	A:حساسية الفطر*Geotrichum candidum*، B:حساسية الفطر*Cladosporum cladosporoides*:المعزول من قناة الاذن الخارجية أتجاه المضاد الفطري الفلوكونازول والنستاتين والمستخلصين النباتين الثوم والقرنفل.	73
28	حساسية الفطرAspergillus *niger* المعزولة من قناة الاذن الخارجية أتجاه المضاد الفطري الفلوكونازول والمستخلص النباتي الثوم والقرنفل ومقاومة للمضاد الفطري النستاتين وبطريقة الانتشار بالاقراص.	74
29	الشكل (4-30): حساسية الفطرAspergillus *oryzae* المعزولة من قناة الاذن الخارجية أتجاه المضاد الفطري الفلوكونازول والمستخلص النباتي الثوم ومقاومة للمضاد الفطري النستاتين والمستخلص القرنفل وبطريقة الانتشار بالاقراص	74
30	ناتج تقنية الـ PCR للأنواع الفطريات الخيطية المعزولة خلال الدراسة الحالية على هلام الاكاروز باستخدام البادئات (ITS1 و ITS4	78
31	ناتج تقنية الـ PCR للأنواع الخمائر المعزولة خلال الدراسة الحالية على هلام الاكاروز باستخدام البادئات (ITS1 و ITS4	79
32	الشجرة الوراثية للعزلة *Aspergillus flavuas*	83
33	الشجرة الوراثية للعزلة *Aspergillus niger*	84

34	الشجرة الوراثية للعزلة *Aspergillus oryzae*	85
35	الشجرة الوراثية للعزلة *Aspergillus terreus*	86
36	الشجرة الوراثية للعزلة *Alternaria alternate*	87
37	الشجرة الوراثية للعزلة *Cladosporium cladosporioides*	88
38	الشجرة الوراثية للعزلة *Geotrichium candidum*	89
39	الشجرة الوراثية للعزلة *Pencillium Chrysogenum*	90
40	الشجرة الوراثية للعزلة *Rhizopus oryzae*	91
41	الشجرة الوراثية للعزلة *Candida parapsilosis1*	92
42	الشجرة الوراثية للعزلة *C.parapsilosis* 2	93
43	الشجرة الوراثية للعزلة *C.parapsilosis* 3	94
44	الشجرة الوراثية للعزلة *C.parapsilosis* 4	95
45	الشجرة الوراثية للعزلة *C.tropicalis*	96

قائمة المختصرات

المعنى	المختصر
Otitis Externa	OE
External Auditory Canal	EAC
Syzygium aromatticum	Syz
Garlic	Gar
Polymerase Chain Reaction	PCR
Sabouraud Dextrose Agar	SDA
Potato Dextrose Broth	PDA
Brain Heart infusion Agar	BHA
Nystatin	Nys
Fluconazole	Flu
National Center for Biotechnology Information	NCBI

الفصل الأول
المقدمة
Introduction

1-1: المقدمة Introduction

تعد الأصابة بالفطريات الخيطية الممرضة خطر متزايد يواجهه الاشخاص الذين يعانون انخفاض المناعة المستمر ، وتشير الدراسات إلى أن الأنواع الاكثر شيوعاً هي الأنواع العائدة لجنس *Aspergillus spp.* وهي *A.terreus* و *A.fumigatus* و*A.flavus* تكون مسؤولة عن معظم هذه الأصابة ، وعليه يمكن اعتبار هذه الفطريات انها اهم المسببات الامراض الفطرية المحمولة بالهواء ، وأضافةً الى ذلك تمثل معظم الفطريات اللاقحية Zygomycetes منها بعض انواع *Rhizopus* من مسببات الامراض الفطرية السائدة (Antoniadou , 2009). والجدير بالذكر إن الفطريات تضم اكثر من 1.5 مليون نوع متواجد على الارض شخص منها اكثر من 180 الف نوع لحد الان ، الا انه يوجد حوالي 300 نوع تعد من عوامل المسببة للأمراض في الانسان (Gnat *et al*., 2021)

إن الاصابات الفطرية Fungal infection التي تسمى ايضاً بالأخماج الفطرية Mycosis تسبب العديد من الامراض للإنسان والتي تؤدي الى الوفاة ، إذ أن الأمراض الفطرية تحدث تحت ظروف تستطيع من خلالها الفطريات اختراق الحواجز الدفاعية للجسم وبالتالي ينتج عنها عدداً من الامراض ، وصنفت الامراض الفطرية إلى امراض فطرية اولية Primary Mycosis والتي تصيب الاصحاء ، أما اذا كان الشخص يعاني من عدة امراض التي تسبب له ضعف الجهاز المناعي ومن ثم يتسبب عنها الأصابة بالأمراض الفطرية الانتهازية (Opportunistic Mycosis) (Beardsley *et al*., 2018) ، وعليه فان الفطريات الممرضة (Pathogenic fungi) تمتاز بقدرتها على احداث الامراض في الانسان من خلال امتلاكها نظاماً ايضياً و انزيمات خاصة تمكنها للبقاء على قيد الحياة والنمو في ظروف خاصة على سطح او داخل جسم المضيف مثل درجات الحرارة الرطوبة و للتغلب على الاليات الدفاعية الخاصة به (Kohler *et al* ., 2017).

يعتبر داء المبيضات Candidiasis احد انواع الاصابات الفطرية الممرضة للأنسان والتي تتسبب بواسطة الخمائر ومنها انواع جنس *Candida* spp. (Nadeem *et al*., 2010 ; Goncalves *et al* ., 2016) ، التي تعد من اكثر اجناس الخمائر تواجداً وشائعة الحدوث وذلك بسبب امتلاكها عوامل ضراوة عديدة تمكنها من احداث أصابات عديدة للإنسان ومنها التهابات الأذن الخارجية والقناة الهضمية والتنفسية والمسالك البولية والتناسلية وكذلك عند دخولها الى مجرى الدم (Mohammed, 2012) ، وتكون الأصابة بالمبيضات أما سطحية Superficial أوغازية Invasive وعادةً ما تصيب العدوى السطحية الجلد والاغشية المخاطية (Claudia and Dario,

2013) ، وبذلك تعد الأنواع *C.albicans*، C.*glabrata* ، C.*tropicalis* ، *C.krusei*
، *C.parapsilosis* مسؤولة عن حوالي 92% من الأصابة بداء المبيضات (Guinea, 2014)، وتشكل خمائر المبيضات جزءاً من الفلورا الطبيعية Normal flora التي تتواجد في اماكن مختلفة في جسم الانسان بحالتها الطبيعية الرمية ومنها القناة السمعية الخارجية External Auditory Canal (EAC) وتكون غير مرضية في العادة الا انه عندما تحصل تغيرات في الحالة المناعية للجسم او البيئة الداخلية تتغير وتتحول إلى فطريات ممرضة مسببة العديد من الامراض منها التهاب القناة السمعية الخارجية الفطري Otomycosis (Ali *et al*., 2018 ; Kayaser *et al*., 2007)

إن مرض فطار الاذن Otomycosis والذي يعرف ايضاً بالتهاب الأذن الخارجي الفطري احد الالتهابات الفطرية التي تحدث كثيراً في القناة السمعية الخارجية للأذن (Agarwal and Devi, 2017) ، والتي قد تكون التهابات حادة acute أو شبه حادة sub acute اومزمنة chronic وهي اصابة فطرية سطحية في قناة الاذن الخارجية (Dundar and Iynen, 2019) ، إن هذا الالتهاب الفطري أو الأصابة يصيب أحد الاذنيين او كليهما ، هو مرض شائع ويؤثر في الغالب على الاشخاص الذين يرتادون المسابح بكثرة أو الاشخاص ضعيفي المناعة مثل المصابين بمرض السكري ، ويكون اكثر انتشاراً في الاشخاص الذين يعيشون في المناطق الاستوائية والرطبة ، حيث إن هناك عوامل عديدة توفر ظروفاً مثالية لنمو الأنواع الممرضة والاكثر شيوعا والمسببة للالتهاب الأذن الفطري مثل *Aspergillus* spp. و*Penicillium* spp. و*Candida* sp. ومن هذه العوامل العيش في الطقس الرطب والحار، السباحة ، العدوى ، الاجسام الغريبة في قناة الأذن (سدادات الإذن ، وسماعات الاذن)، نقص المناعة و الإستخدامات واسعة النطاق للمضادات الحيوية الموضعية او المنشطات والأدوية الستيرويدية وبالإضافة الى عوامل أخرى منها العمليات الجراحية للاذن او القناة السمعية الخارجية (Huang *et al*., 2021 ; Kiakojuri *et al*., 2015).

تمتاز الفطريات ومنها الخمائر المبيضات *Candida* sp. بأمتلاكها عوامل ضراوة عديدة واستراتيجيات نوعية التي تمكنها من أحداث المرض ومواجهة الوسائل الدفاعية للمضيف البشري ، منها افراز الانزيمات الخارجية Extracellular enzymes وتكوين الغشاء الحيوي Biofilm والتحول الشكلي polymorphism وافراز السموم الفطرية Mycotoxins جميعها تعمل على احداث المرض وبقاء المسبب المرضي وكذلك للتغلب على الاليات الدفاعية للمضيف البشري (Staniszewska, 2020) ، واهم الانزيمات التي لها علاقة بالضراوة في الفطريات ومنها خمائر المبيضات انزيم الاستريز Esterase و انزيم الفوسفولايبيز phospholipase وبروتين الهيمولايسين Hemolysin (Mba and Nweze, 2020 ; Raksha and Urhekar, 2017)

ولكثرة حدوث هذه الأصابات الفطرية وانتشارها فقد استعملت ادوية مضادة لها عديدة ، إلا أن هذه الفطريات اظهرت مقاومة بمرور الزمن تجاه تلك المضادات الفطرية Antifungal ولم تنجح معظم المضادات في علاج عدة حالات (Wisplinghoff *et al*., 2014).

لذلك اتجهت انظار الباحثين في الوقت الحاضر إلى ايجاد بدائل عنها للتقليل أستخدام المضادات الفطرية فقد استخدامت المستخلصات النباتية Plant extracts كأحد البدائل عن هذه المضادات الفطرية (EL-Delasty *et al*., 2013 ; الخفاجي، 2017) ، فالمواد الفعالة المستخلصة من النبات تعتبر افضل من المادة نفسها وذلك عندما يتم تصنيعها كيميائياً (السامرائي ،2009) ، وعليه فان العلاج بأستخدام النباتات الطبية اصبح حملة تطلقها منظمة الصحة العالمية والمعاهد العلمية وذلك لتجنب الاثار السمية والمدمرة للمواد الكيميائية المستخدمة للعلاج ، حيث اثبتت الدراسات أن معظم النباتات الطبية تمتلك دوراً واسعاً كمضاد للميكروبات مقارنةً بالمضادات الحيوية الصناعية (مصطفى ،2007).

هناك دراسات عديدة في العراق تناولت دراسة التهابات الأذن الخارجية الفطري Otomycosis لغرض عزل الفطريات المسببه لهذا المرض وتشخيصها بطرق عديدة منها المظهرية والجزيئية عزلت وشخصت الفطريات الاذن الخارجية في البصرة من قبل (Al-Abbasi and Al Sadoon , 2011) ، وكذلك الدراسة التي اجريت في سامراء من قبل (Mohammed *et al* ., 2020) ، ولعدم جود دراسة حول فطريات المسببة للالتهاب الأذن الخارجية في محافظة ميسان ارتأينا تنفيذ هذة الدراسة .

الهدف من الدراسة إلى :The aim of the study

١- عزل وتشخيص الفطريات من الاشخاص المصابين بالتهاب الاذن الخارجية (EAO Otomycosis).

٢- دراسة تأثير المضادين الفطريين النستاتتين والفلوكونازول ومستخلصات النباتين القرنفل والثوم على نمو بعض الفطريات المعزولة .

٣- دراسة الفعالية الانزيمية لبعض الفطريات المعزولة.

٤- دراسة تشخيصيه جزيئية لبعض العزلات الفطرية باستعمال تقنية الـPCR.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Reviwe

استعراض المراجع Literature Review

2 –1: الفطريات

الفطريات كائنات حقيقية النواة (Eukaryote) والتي تشكل أنواعها العديدة مملكة الفطريات وتتواجد في بيئات مختلفة ، وهذه المملكة تضم ما يقارب ١.٥ مليون نوع من الفطريات ، وجميعها متباينة التغذية أي لا تستطيع تصنع غذاءها بنفسها وذلك لعدم احتوائها على صبغات الكلوروفيل فغالبيتها مترممة على المواد العضوية والبقايا النباتية والحيوانية وبعضها متطفلة على النباتات فتسبب أمراضاً لها والبعض منها يصيب الأنسان والحيوان ، وبالإضافة الى ان هناك فطريات تكون علاقات تكافلية مع بعض الاحياء مثل علاقة المايكورايزا و الاشنات (Hawksworth , 2001) .

إن الفطريات الممرضة للإنسان هي الأنواع التي تتميز بأمتلاكها القدرة على احداث الأصابة بسبب ما تملكه من انزيمات خاصة ومسارات ايضية تساعدها على العيش والبقاء على قيد الحياة في درجات حرارة الجسم المضيف والتغلب على الاليات الدفاعية له (Chander, 2017)، علاوةً على ذلك فأن الامراض الفطرية Mycosis هي عدوى التي تسببها الفطريات حيث تمتلك القدرة على احداث الاصابة في مواقع مختلفة من جسم الإنسان كالأذن والفم والمناطق التناسلية والرئتين وغيرها ، والتي ازدادت مؤخراً ، وخطورة هذه الاصابة الفطرية تكمن في صعوبة تشخيصها بسبب نموها وتكاثرها البطيء ولذا فهي نادراً ما تستجيب للعلاج (Prescott *et al.*, 2001).

2-2 :التهابات الاذن الخارجي Otitis Externa (OE)

التهاب يصيب القناة السمعية الخارجية External Auditory Canal (EAC) والذي يبدأ من صيوان الأذن منتهياً بطبلة الاذن (Jayachitra, 2018) ، والمرضى المصابون بالتهاب الاذن الخارجية يعانون من الألم وحكة في الاذن واحمرار وخروج افرازات تسبب انسداد في قناة الاذن وبالتالي الصعوبة في السمع وهذه الافرازات قد تكون ذات رائحة كريهة (Allam *et al.*, 2020)، عادةً ما يرافق هذه الاعراض نضح مصلي وطفح جلدي داخل القناة السمعية هذه الاصابة قد تتطور لتشمل الأنسجة الرخوة المحيطة بالقناة السمع الخارجية (Wiegand *et al.* 2019) ، المسببات الشائعة في احداث الإصابة في القناة السمعية الخارجية هي البكتريا والفطريات والفايروسات ، وتعد البكتيريا الاكثر شيوعا لإحداث الأصابة في قناة الأذن الخارجية ، تليها الفطريات واظهرت الدراسات إن الأجناس الفطرية الأكثر شيوعاً *Candida* sp. و *Aspergillus* spp. و *Cladosporium* spp. و *Pnicillium* spp. و *Fusarium* spp. (Gharaghani *et al.*, 2020) ، وتأتي الاصابات الفايروسية بالمرتبة الثالثة (Sander, 2001).

3.2 التهاب الأذن الخارجية الفطري Otomycosis

عبارة عن عدوى فطرية سطحية Superficial mycosis لقناة الأذن الخارجية عند اصابتها بفطريات مترممة في الطبيعة (Tasic-Otasevic *et al.,* 2020) ، واشتق مصطلح الـ Otomycosis من الكلمة اليونانية "oto"و تعني الأذن، وكلمة الـ mycosis تعني اصابات فطرية ، اي انها الاصابة السطحية الفطرية لقناة الأذن الخارجية (Gokale *et al* ., 2013) ، هذا المرض عادةً يحدث في الاشخاص الذين يسبحون في مياه المسابح والبرك الملوثة بالفطريات ، تعد الحرارة والرطوبة العالية من اهم الظروف المشجعة للنمو الفطريات ، وكذلك تحدث الأصابة نتيجة الاستخدام الطويل للمضادات الحيوية الذي يكون ذات تأثير على الاحياء المجهرية والتي تتواجد بصورة طبيعية Normal flora في القناة الاذن الخارجية مما يسمح لنمو وتكاثر الفطريات الاخرى الداخلة للأذن (Kazemi *et al.,* 2015) ، و تحدث الأصابة ايضاً في الأفراد الذين يعانون من ضعف المناعة وبوجود ظروف معينة تساعدها على احداث الاصابة ، ومن اهم الامثلة للذين يعانون من ضعف المناعة ، ويكونون مؤهلين للإصابة بهذا المرض هم مرضى السرطان و مرضى السكر والمصابين بالإيدز (Viswanatha *et al.,* 2012).

اشارت الدراسات إلى إن حوالي 5-30% من حالات التهاب الأذن الخارجية تعود الى التهاب الاذن الفطري Otomycosis (Gokale *et al* ., 2013) ، وتمثل نسبة الاصابة بجنس الـ *Aspergillus spp.* حوالي (60-90%) و نسبة الاصابة بالمبيضات *Candida* sp. (10 - 40%) ، واهم الأنواع التي تكون اكثر شيوعاً و انتشاراً *A.fumigatus ,A.niger ,C. albicans* وعلى الرغم من معدل وفيات فطار الأذن نادر جداً ، إلا أن مسار المرض يمكن ان يكون مرهقاً للغاية وذلك قد يكون بسبب العلاج الغير كامل او المتابعة الغير المنتظمة (Nandyal and Choudhari , 2015).

إن أنتشار التهاب الأذن الفطري يرتبط بالتوزيع الجغرافي ، إذ أن المناطق الاستوائية وشبة الاستوائية تظهر معدلات أعلى للإصابة (Prasad *et al.,* 2014)، وكما لوحظ ارتفاع معدلات إصابة خلال الاشهر الممطرة وبعدها في فصل الصيف ، حيث يوفر عاملا الرطوبة والحرارة بيئة مناسبة ومفضلة لنمو الفطريات المسببة لهذا المرض الفطري (Deshmukh *et al.,* 2014) ، الفطريات المسببة لالتهاب الأذن الفطري عادةً ما تكون مترممة في التربة او الحبوب المتعفنة ، وبقايا الكائنات الحية ، يمكن ان تنتقل للإنسان ومن ثم تحدث الأصابة عندما تكون الظروف مناسبة لها كضعف مناعة الجسم بالإضافة الى اسباب اخرى (Emmons *et al* ., 1970).

4-2: الإمراضية Pathogenicity

أول من لاحظ مرض الالتهاب الأذن الخارجية الفطري (Otomycosis) هو العالم Mayer وفي وقت مبكر من منتصف القرن التاسع عشر ، في عام 1844 وكتب أول مقالة لمرض الالتهاب الأذن الفطري (Chander, 2017). وترتبط الأصابة بالتهاب الأذن الخارجية الفطري بعوامل عديدة منها انسجة و فسلجة وتشريح قناة الاذن الخارجية وتكون اكثر عرضةً وبشكل مستمر للفطريات الممرضة الموجودة ضمن الغلاف الجوي وذلك لكونها مفتوحة من جانب واحد ، على الرغم من ذلك القناة السمعية الخارجية تكون محمية بعوامل وقائية عديدة منها وجود شمع الاذن والذي يساهم بشكل كبير في حمايتها من الأصابة البكتيرية أو الفطرية (Gupta *et al*., 2012) وإن طبيعة تركيب قناة الأذن الخارجية لها دور في الحماية من الجراثيم ، وكذلك طبيعة الجلد المغطى لهذه القناة يساهم في الية التنظيف الذاتي لقناة السمع (Prasad *et al*., 2014) ، إن النمو الفطري في قناة السمع يسبب ضرراً في انسجة الاذن وذلك من خلال ما تملكه من عوامل ضراوة Virulence factors كالافرازات الانزيمية الخارجية Extracellular enzyme (Raksha and Urhekar, 2017)، حيث تعد الانزيمات من عوامل الضراوة التي تستخدمها الفطريات لغزو خلايا المضيف عن طريق تسهيلها عملية التصاق التراكيب التكاثرية Adhesion وأيضاً تساهم في التحلل المائي Hydrolysis لخلايا المضيف (Srivastava *et al*., 2018) ، ومن اهم الانزيمات التي تلعب دور مهم في الأصابة البروتينيز Proteinase و الفوسفولايبيزPhospholipase و الاستيريز Esterase وبروتين الهيمولايسين Hemolysin وغيرها من الافرازات الانزيمية الخارجية التي تستخدمها الفطريات ، وإن السموم الفطرية Mycotoxins كالاوكرا Ochratoxin وسم الافلاتوكسين Aflatoxinلها دورفي تلف انسجة الاذن (Raksha and Urhekar, 2017).

توجد عوامل عديدة تساعد في احداث الاصابة منها عوامل ما قبل الاصابة Predisposing factors هذه العوامل تشجع على حدوث الاصابة بالالتهاب الأذن الخارجية الفطري والتي تشمل: العوامل البيئية مثل الرطوبة و الحرارة والتي تسبب زيادة الاصابة بالمرض (Kaur *et al*., 2000) وايضاً زيادة الاس الهيدروجيني pH في القناة السمعية وغالبا ما يكون الاشخاص السباحين اكثر عرضةً من غيرهم بهذا المرض (Ismail *et al*., 2017)، الاستخدام العشوائي والمفرط للمضادات الحيوية ولفترات طويل ونقص المناعة والاورام الخبيثة وسوء التغذية لدى الاطفال والامراض المزمنة كالسكري تعد من العوامل المساعدة والتي تشجع على احتمالية زيادة في حدوث الاصابة بهذا المرض ، وكذلك استخدام ادوات الغير معقمة لتنظيف الأذن كاستخدام اعواد الاذن القطنية وايضاً استخدام سماعات الأذن (Tasic-Otasevic *et al* ., 2020) وعوامل اجتماعية اخرى مثلا عند ارتداء

اغطية الراس الذي يزيد من الرطوبة وبالتالي يزيد من احتمالية احداث الأصابة (Jyothi *et al*., 2014).

2-5: الفطريات المسببة لألتهاب الأذن الخارجية الفطري Fungal causing Otomycosis

تعرف ايضاً عدوى الأذن الفطرية بإسم فطار الاذن وذلك عندما يكون هناك استعمار فطري في الأذن الخارجية او الأذن الوسطى .وهناك دراسات عديدة اشارة إلى أن مسببات الاصابة بعدوى الأذن الخارجية غالبيتها تعود الى الجنسين *Aspergillus* spp. و*Candida* sp. وهي الاكثر شيوعاً والمسببة لالتهاب الاذن الخارجية الفطري (Vaidya *et al*., 2015 ; Kiakojuria *et al*., 2019)

أما الدراسات التي اجريت في البلدان الأفريقية ، مثل نيجيريا وجنوب أفريقيا اظهرت إن *Aspergillus* spp. *والـ Candida* sp., والـ *Mucor* spp. و*Pencillium* spp. بأنها اكثر الفطريات المعزولة شيوعاً بين الافراد المصابين بعدوى الأذن (Argaw-Denboba *et al* ., 2016 ; Allam *et al*., 2020 ; Ahmed *et al*., 2021).

واشار Pontes *et al*. (2009) خلال دراسته في البرازيل ان جنس *Candida* sp. هو العامل الممرض السائد في حدوث التهاب الاذن الخارجية.

تعد الفطريات التابعة لجنس *Aspergillus* spp. والـ *Candida* sp. من اكثر الاجناس الفطرية شيوعاً والمسببة لالتهاب الاذن الخارجية الفطري بالإضافة الى هذا هناك اجناس اخرى منها الفطريات الخيطية Filamentous fungi والتي تكون خيوطها اما مقسمة Sptate hypha وتشمل الاجناس *Aspergillus flavus* , *A. nidulans* , *A. Versicolor* , *A.niger* , *A. Terreus*, *A.fumigatus* , *Pnicillium* spp. , *Cladosporium* spp. أو التي تكون خيوطها غير مقسمة Asptate hypha التي تشمل:*Rhizopus spp*. و *Mucor spp* (Meenakshi *et al* ., 2020 ; Gharghani *et al* ., 2020).

يعتبر جنس *A. niger* اكثر الفطريات شيوعاً وانتشاراً(Frisvad *et al*,. 2018)، هذا الفطر يهاجم مواقع عديدة في جسم الانسان منها الجلد والرئة وقناة الاذن الخارجية (EAC) ، حيث ان اصابة الاذن بفطر *A. niger* يسبب له العديد من المشاكل في السمع والتي تتمثل بالتهاب الاذن والحكة وطنين الاذن وفقدان السمع (Aremu *et al*., 2020). وفي بعض الدراسات الاخرى اشار الى ان دور هذا النوع من الفطريات يكون اقل شيوعاً في فطار الاذن Otomycosis وبنسبة (39-9.9%)، (Kiakojori *et al*., 2015 ; Barati *et al*., 2011).

صنف جنس .Aspergillus spp استناداً الى(Hibbet *et al* ., 2007) وكمايلي :

Kingdom:Fungi

Phylum:Ascomycota

Class:Eurotiomycetes

Order:Eurotiales

Family:Trichocomaceae

Genus*: Aspergillus*

وعلى مدى السنوات الاخيرة تم تحديد جنس *A.flavus* كأحد العوامل المهمة في احداث التهاب الاذن الفطري (Kiakojori *et al.,* 2015 ; Balouchi *et al*., 2006) وأشارت الدراسات الى ان هذا الفطر قد يتسبب في (4-23.1%) من التهاب الاذن الفطري حيث دوره مشابه لدور الفطر الـ *A.niger* (Kiakojori *et al*., 2015 ; Saki *et al*., 2013) بينما تتراوح نسبة الاصابة من *A.fumigatus* (5.3-20.5%) (Kazemi *et el*., 2015 ; Nowrozi *et al*., 2014)، حيث تعد *A.fumigatus* و *A. flavus* من أهم الأنواع الممرضة فضلاً عن *A. niger* وهي ايضاً من اكثر الفطريات الخيطية انتشاراً وعلى نطاق واسع في البيئات وتعتبر انتهازية ويحدث المرض عند حدوث انخفاض في مناعة المضيف (Raksha and Urhekar , 2017). وتمتلك الفطريات الخيطية عوامل ضراوة عديدة والتي يمكن تعريف الضراوة Virulence بأنها مقياس لدرجة الامراضية Pathogenicity او لشدة الاضرار التي تحدثه الكائنات الممرضة في العائل ، ولا يمكن لأي مسبب مرضي يحدث الأصابة الا اذا كان ضارياً Virulent، اذا تعد الضراوة مرتبطة بجينات تكتسب أو تفقد اثناء مراحل النمو التطوري للكائن الحي ، حيث إن هذه العوامل الضراوة تكون بشكل تراكيب خلوية او سموم فطرية أو انزيمات وغيرها من العوامل الاخرى وهي تساهم في احداث الأصابة وتؤثر في بقاء المسبب المرضي (Staniszewska, 2020)، وتعود قدرة بعض الفطريات على احداث المرض الى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة المختلفة والتي تساعد في بقاء الفطريات واستمرارها في العائل مما يؤدي الى تلف الانسجة واحداث المرض ، وتشمل هذه العوامل القدرة على الالتصاق بأنسجة المضيف ، وانتاج الانزيمات التي تسبب تلف الانسجة والتداخل المباشر مع دفاعات المضيف ، إذ أن بعض الفطريات ولا سيما الفطريات ثنائية الشكل Dimorphism تمتلك القدرة على التحول من شكل الى اخر (Iyalla, 2017 ; Rooney and Klein, 2002).

أما خميرة المبيضات جنس *Candida* sp. والتي تشمل *C. albicans* ، *C.tropicalis*، *C. parapsilosis*، *C.krusi* فهي ايضاً مسببات رئيسية للإصابة بالتهابات الأذن الخارجي الفطري (Meenakshi *et al*., 2020 ; Gharghani *et al*., 2020 ; Abdelazem *et al*., 2015). حيث تعرف الخمائر بأنها كائنات بسيطة حقيقية النواة صنفت ضمن مملكة الفطريات ، وهناك حوالي 1500 نوع يكون مشخص ضمن مملكة الفطريات وبنسبة ١%من هذه مملكة ، ويضم جنس الـ *Candida* sp. اكثر من 200 نوع تم تشخيصهما ووصفها (Tamo, 2020)، بعضها تكون مترممة والبعض الاخر ممرضات انتهازية واهمها واكثرها شيوعاً الـ*C. albicans* وتوجد انواع اخرى مهمة مثل *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.keyfr*, *C.tropicalis*, وبالاضافة الى انواع اخرى مصنفة على أنها أنواعاً ممرضة للانسان Pathogenic fungi (Hameed *et al*., 2018) حيث يكون شكلها كروي او بيضوي ، وقطرها يتراوح من 3-4 مايكرون و تتواجد في معظم البيئات تقريباً في التربة و الأنضمة المائية وعلى النباتات وعلى وداخل جسم الانسان والحيوان ، وتتكاثر لا جنسياً عن طريق تكوين البراعم او عن طريق الأنشطار العرضي وذلك عن طريق انقسام خلية الأم الى خليتين متساويتين ، تمتاز عند زرعها على الأوساط الخاصة بها بتكوين مستعمرات بعد 24-48 ساعة مع ملمس ناعم ورطب يشبه مستعمرة البكتريا(Moris *et al* ., 2008).

وتشكل المبيضات جزء من الفلورا الطبيعية (Normal flora) في جسم المضيف إلا أن يعتبر تواجدها مسيطر علية من قبل الاحياء المجهرية الاخرى ، حيث لا تسبب اصابة عند وجود بكتريا *Lactobacilli* لأن هذة البكتريا تثبط نموالمبيضات ولكون المبيضات من الفطريات الانتهازية Opportunistic fungi فأنها تتحول من كائن متعايش الى كائن ممرضة للإنسان عند غياب هذه البكتريا وفي ظروف معينة تتحول الخميرة من كائن متعايش الى كائن ممرض للإنسان(Pereira *et al* .,2021)، وصنف جنس الـ Candida sp حسب (Webster and Weber, 2007) وكالاتي:

Kingdom :Mycetae

Phylum: Ascomycota

Sub Phylum: Saccharomycotina

Class: Saccharomycetes

Order: Saccharomycetales

Family : Saccharomycetaceae

Genus: *Candida*

بعض أنواع جنس المبيضات ذات الأهمية الطبية حيث يعد نوع *Candid albicans* اكبر أنواع خمائر المبيضات حجماً وكذلك تمتاز بلونها الاخضر الفاتح على وسط الـ Candida chromogenic agar ،(Hameed *et al*., 2018)، وتعد من أهم أنواع جنس الكانديدا ، و أكثر الأنواع المسببة للأمراض الفطرية الانتهازية الخطيرة التي تتواجد ضمن الفلورا الطبيعية على وداخل جسم الأنسان ، و تتحول من كائن متعايش الى كائن ممرض مسببا بعض الأمراض للإنسان وذلك نتيجةً انخفاض المناعة الخلوية وتثبيط الفلورا الطبيعية بعد العلاج بالمضادات الحيوية واسعة الطيف بشكل مفرط وبالتالي يؤدي للقضاء على الفلورا الطبيعية الأخرى مثل بكتيريا العصيات اللبنية *lactobacilli* وتفاقم الكانديدا (Barnes *et al*.,2017). ويعتبر هذا النوع المسبب الرئيسي لداء المبيضات (Vila *et al*., 2020) ، أهم الخصائص التشخيصية لهذا النوع من الخمائر هي القدرة على تكوين أنبوب الإنبات حيث يعد هذا التكوين صفة تشخيصية مهمة لهذا النوع من الخمائر له دور مهم في احداث الإمراضية ، وايضاً له علاقة بالالتصاق وغزو أنسجة المضيف وبالأضافة الى قابليته على انتاج الابواغ الكلاميدية Chlamydospores (Soll, 2014 ; Bhavan *et al*., 2010)، اذ وجد ان خميرة *C.albicans* هي العامل السائد المسبب التهاب الاذن الخارجي الفطري عند عزلها من الاشخاص المصابين(Sangare *et al*., 2021 ; Aboutalebian *et al*., 2021)

ويعد *C.parapsilosis* المسبب الثالث لداء المبيضات المعزولة من المرضى ويشكل جزءاً من الاحياء المتواجدة بصورة طبيعية في الانسان ، التي تحدث الامراض في حالات خاصة كألاضطرابات المناعية والامراض المزمنة ، اي تعد من الفطريات الانتهازية، (Chang *et al*., 2008) هذا النوع يسبب التهابات مختلفة في ظل ظروف بيئة ملائمة منها فطريات الاذن الخارجية (Merad *et al*., 2021) ، فضلاً عن الالتهابات الجهازية ويكون اخطرها التهاب الغشاء المخاطي والتهاب شغاف القلب Endocarditis وتسمم الدم وايضاً عدوى المسالك البولية (Krcmery *et al*., 2002). تمتلك C.*parapsilosis* العديد من عوامل الضراوة منها الالتصاق Adhesion افرازات الانزيمات الخارجية Extracellular hydrolytic enzyme وتكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation (Toth *et al* ., 2019).

اكدت العديد من الدراسات والابحاث التي تم اجراؤها في أمريكا اللاتينية والمحيط الهادي ودول آسيآ ان الخميرة *C.tropicalis* هي ثاني اكبر الخمائر المبيضات انتشاراً بعد الـ C.*albicans* (Chang *et al*., 2008) ، حيث ان هذا النوع من المبيضات يمكن عزلها من اجزاء معينة من الجلد ومن تجويف الفم ككائن متواجد بصورة طبيعية وكذلك متواجدة في الاشخاص الذين يعانون من الاضطرابات المناعية والأمراض المزمنة ،بالإضافة الى ذلك تعد من اهم انواع الخمائر المبيضات التي تنتشر عالمياً والتي تحدث الامراض للأنسان وبذلك تسمى بالمبيضات المدارية او الاستوائية ،(Zuza-Alves *et al*., 2017).

أما الدراسات التي اجريت في اوربا وامريكا و الولايات المتحدة اوضحت ان C. *glabrata* تأتي في المرتبة الثانية الإكثر شيوعاً بعد C.*albicans* (Chang *et al* ., 2008 ; Guinea, 2014) ، و يمكن عزلها من الادرار والجلد والدم (Hernandez-Carreon *et al*., 2021) والأذن (Al-Sharrad *et al* ., 2021 ، وتعتبر أنواع الـ *Candida* sp. من مسببات الأمراض الانتهازية الفطرية والتي تمتاز بقدرتها على التسبب في الالتهابات السطحية والجهازية في المضيف البشري(Cavalheiro and Teixeira, 2018) وفيما يأتي ذكر لأهم عوامل الضراوة للمبيضات:

1- الالتصاق Adhesion

تمتاز بعض أنواع الفطريات ومنها أنواع *C.albicans* بأمتلاكها القدرة على مقاومة وسائل الدفاع والازالة التي يكتسبها المضيف خلال امتلاكها مجموعة من البروتينات الخاصة والتي تلتصق وتتداخل مع خلايا المضيف (Garcia-Agudo *et al*., 2011)، وبذلك فأن عوامل الالتصاق تعمل على الارتباط مع مراكز الاستقبال للخلايا الطلائية والخلايا البلعمية وعليه فأنها تقاوم العوامل الدفاعية للعائل المضيف(Hameed *et al*., 2018) .

2- تعدد الاشكال Polymorphism

تعتبر الخمائر المبيضات الـ*Candida* sp. من الكائنات البسيطة حقيقية النواة ، وتعد من الفطريات ثنائية الشكل Dimorphism او متعددة الاشكال Polymorphism ، و تسمى ثنائية الشكل لإمتلاكها القدرة على النمو بشكل خيوط فطرية form Hyphae أو بشكل خميرة Yeast form حسب البيئة التي تتواجد فيها واعتماداً على الظروف البيئية الي تعيش فيها (Naglik *et al* ., 2011) ، إلا أن ظاهرة تعدد الاشكال للـ *Candida* sp. تساهم في البقاء والأزدهار وبداية ظهور العدوى داخل المضيف وايضاً التكيف مع الظروف البيئية المتغيرة بأستمرار (Shirvani and Fattahi , 2021)، ولظاهرة تعدد الاشكال في الخمائر دوراً مهماً في زيادة الفوعة والتسبب بالمرض ، وجد ان

الشكل الخميري يؤدي الى انتشار خمائر المبيضات في حين ان الشكل الخيطي فيؤدي الى غزو الانسجة ومن ثم موتها (Seman *et al.*, 2018).

3- تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

يعتبر الغشاء االحيوي Biofilm من عوامل الضراوة المهمة لخمائر المبيضات والذي له دور مؤثر في معظم حالات العدوى المرتبطة بالمبيضات ، واثناء تكوين الأغشية الحيوية تتجمع الكائنات الحية الدقيقة وتلتصق خلاياها بالإسطح الحيوية والغير الحيوية وبعد ذلك يتم تكوين الخلايا في مصفوفة خارج الخلية Extracellular matrix (Panariello *et al.*, 2017) ووجد إن المصفوفه خارج الخلية تعمل كمواد واقية لأنواع الخمائر المبيضات المختلفة (العمري واخرون ، 2017)، وتعزز هذه المواد عملية التصاق الخلايا وتكوين الخيوط الفطرية Hypha واختراق خلايا المضيف ، يعتبر تكوين الأغشية الحيوية عاملاً مهماً وضرورياً في ضراوة داء المبيضات ولذلك يعتقد وبشكل عام أن الأغشية الحيوية تعتمد على موقع الاصابة والسلالة المعنية والأنواع والبيئة التي تتطور فيها العدوى (Mba and Nweze, 2020) ، حيث أن الـ C.*albicans* اكثر أنواع المبيضات أهمية وشيوعاً في تكوين الغشاء الحيوي وعلاوةً على ذلك أظهرت الدراسات الحديثة الأخرى أرتفاع معدل القدرة على تكوين الأغشية الحيوية لأنواع المبيضات الاخرى (Subramanya *et al.*, 2017) ، ومن أنواع الخمائر المبيضات *C glabrata* ،*C.tropicalis*،C.*parapsilosis*، (Sherry *et al.*, 2017) C.auris.

4- إفراز الأنزيمات Secretion of Enzymes

أحد أهم العوامل الفعالة في إمراضية المبيضات هو إفرازها أنزيمات خارج خلوية (Extracellular enzymes) التي تسهل عملية تحليل الأغشية الخلوية ، وبالتالي السماح للخلايا الفطرية بإختراق أنسجة المضيف (Kurnatowski *et al.*, 2016) تمتلك المبيضات القدرة على إفراز العديد من الأنزيمات ومنها الأنزيمات المحللة للدم التي لها أهمية في إمراضية المبيضات ، وهذا الأنزيمات هي المسؤولة عن تحطيم وتحليل خلايا الدم الحمراء وتكسير هيموكلوبين المضيف مما يسمح لخلايا المبيضات الحصول على الحديد الضروري الذي يعد مهماً لعملية إحداث الإصابة في المضيف(Nouraei *et al.*, 2021 ;Canela *et al.*, 2018) ، تعد الأنزيمات المحللة للدهون من أهم الأنزيمات المحللة للاواصر الأسترية التي تقلل بدورها من ترابط انسجة الخلايا وبالتالي تساعد المبيضات على الدخول الى خلايا المضيف ومن ثم حدوث الأصابة (Monod and Zepelin, 2002 ; Jafarian *etal.*, 2021)، وجد أيضا أن المبيضات تقوم بإفراز أنزيمات تعمل

على تحطيم الأواصر الببتيدية للبروتينات(Gharaghani *et al*., ; Naglik *etal*., 2003 2022) ، وكذلك أن للمبيضات لها القدرة على إفراز انزيمات أخرى ومنها esterase الذي له دورمهماً في قابليتها الإمراضية ،(Gharaghani *et al*., 2022 ; Nouraei *et al*.,2021).

2- 6 : الفعالية الانزيمية للفطريات والخمائرالمعزولة من الاذن الخارجية

Enzymatic activity of fungi and yeasts isolated from the external ear

تؤدي عوامل الضراوة Virulence factors التي تضمن الافرازات الانزيمية الخارجية كالفوسفولايبيز والهيمولايسين والاستريز دورا بارزاً في امراضية الفطريات الـ *Aspergillus* spp. و *Candidia*. sp. ، وفضلاً عن الحالة المناعية للمضيف ، وبعض العوامل الفيزيائية كالأس الهيدروجيني pH ودرجة الحرارة (Dupont *et al* ., 2000)، وينتج من عوامل الضراوة المذكورة وفضلاً عن السموم اختلال في وظائف خلايا المضيف في أول الأمر ومن ثم تتطور بالتدريج إلى إن تحلل الخلايا والأنسجة من ثم فشل الأعضاء(Raksha and Urhekar , 2017) من المعروف أن الفطريات تنتج العديد من الأنزيمات خارج الخلية وبناءً على مادة الاساس Substrateالتي تستخدمها في النمو ، تم وصف الأنزيمات المنتجة خارج الخلية في بعض الفطريات مثل *Candidia* sp. و*Aspergillus* spp. (Aboul-Nasr *et al*., 2013) ، ويعد أنتاج وأفراز الأنزيمات المحللة مثل أنزيم phospholipases و proteases وLipases وEsterase و Hemolysin، من العوامل المهمة جدا للضراوة ، هذه الأنزيمات تلعب دوراً مهماً في التغذية Nutrition، وتلف الأنسجة وانتشار الفطريات داخل جسم المضيف ، واكتساب الحديد والتغلب على الجهاز المناعي للمضيف والذي يؤثر و بقوة على مسببات الأمراض الفطرية (Pawar *et al*., 2014)، وبناءً على ذلك ، قد يكون افراز الانزيمات في البيئات خارج الخلية آلية تكيفية مهمة خلال دورة حياة الفطريات(Monod and Borg-von Zepelin, 2002) ، هدفت الدراسات السابقة على الانشطة الانزيمية الفطرية الى تحديد دور الانزيمات في امراضية الفطريات وكذلك قدرتها على احداث تفاعلات التهابية في انسجة العائل(Yike, 2011) ، وبالاضافة الى ذلك ان هذه الانزيمات يمكن ان تعمل عن طريق تمكين غزو الانسجة بشكل اسهل ، ولكنها يمكن ان تشارك في التسبب في العدوى عن طريق اضعاف بعض اليات الجهاز المناعي او المساعدة في الحصول على العناصر الغذائية وبالتالي التسبب في اصابة المضيف(DaSilva *et al*., 2005 ; Birch *et al* ., 2004).

تفرز فطريات الأذن مجموعة واسعة ومتنوعة من الانزيمات مثل انزيم phospholipases وproteases و Lipases وEsterase وHemolysin فقد تم اختيار عزلات من جنس

الـ .*Aspergillus* spp المعزولة من الاذن الخارجية لاختبار قدرتها على انتاج انزيم Lipases فوجد ان اظهرت انتاج عالي لهذا الانزيم Lipases ، في حين اظهرت عزلات اخرى تنتمي للاجناس للـ .*Aspergillus* spp و.*Candida* sp و .*Penicillium* spp و .*Scopulariopsis* spp نشاطاً منخفضاً لانزيم Lipases اذ اكد العديد من الباحثين على قدرة العديد من السلالات الـ *Aspergillus* spp. التي تعود الى الانواع *A.niger* و*A. terreus* و *A.flavus* و*A. parasiticus* على انتاج الانزيم Lipases خارج الخلية ووجدوا ان هذا الانزيم يلعب دورا اثناء العدوى الميكروبية واقترحوا إن دوره هو هضم الدهون وهذا الانزيم يساعد الفطريات على النمو في البيئات التي تكون فيها الدهون هي المصدر الوحيد للكاربون (Contesini *et al*., 2010 ; Stehr *et al*., 2003).

واشار (Aboul-Nasr *et al*., 2013) الى قدرة بعض العزلات التي تنتمي الى الاجناس.*Cladosporium* spp و.*Aspergillus* spp و.*Fusarium* spp و *Stachybotrys* spp. تمتلك القدرة على انتاج انزيم Protease.

وذكر (Salyers and witt, 1994) ، إن الخلايا الميكروبية تفرز انزيمات تحلل الماء التي تدمر مكونات من أغشية الخلايا وبالتالي تؤدي الى خلل وظيفي في الغشاء ، واضطرابات جسدية ، بالإضافة الى غزو الأنسجة المضيف .

2-6-1: انزيم الفوسفولايبيز Phospholipase

ان انزيمات الفوسفولايبيزعبارة عن مجموعة غير متجانسة من أنزيمات Hydrolase التي تتحلل الدهون المفسفرة Phospholipidsالى احماض دهنية Fatty acids ومواد أخرى محبة للدهون، حيث تعمل على تكسر الاواصر الأستر Ester bond للدهون الفوسفاتيةPhospholipids مما يؤدي الى اختراق خلايا المضيف و تحلل الخلايا بواسطة الكائنات الحية الدقيقة والتي تنتج هذا الانزيم كالفطريات، (Bandana et al., 2018 ; Deepa *et al* ., 2015)، حيث يساهم بشكل كبير في العدوى الجهازية للمبيضات Systemic infection وبالاضافة الى ذلك يمكن اعتبار انتاج هذا الانزيم احد المعايير الرئيسية المهمة لتمييز السلالات الغازية الضارية Virulent invasive strains عن السلالات غير الغازية Noninvasive strains في انواع فطريات والخمائر المبيضات (Mba and Nweze, 2020).

2-6-2 :الإستيريزEsterase

يتميز انزيم الاستيريز والذي يسمى بـ(Monoacylglycerol Lipase) بقدرته على التحلل المائي Hydrolase الاواصر الاستر من الدهون الفوسفاتية Phospholipids وكذلك الجلسرين الاحادي وثلاثي الأسيل Triacylglycerol(Schaller *et al.*, 2005)، وعليه يمكن القول ان وظيفة انزيم الإستيريز Esterase العمل على التحلل المائي للـ Monoacylglycerol مع السلاسل الطويلة للاحماض الدهنية التي تحتوي على 12 ذرة كاربون او اكثر (Aktas *et al.*, 2002)، وانزيم الاستريزEsterase يعتبر أحد الأنزيمات التي تنتجها الفطريات الممرضة ، حيث يعد من العوامل الضراوة المهمة لعديد من أنواع الفطريات والمبيضات ، والذي يعمل على هضم الدهون في المضيف وبالتالي يستغلها الفطر الممرض كمصدر للتغذية ، وكذلك يسبب هذا الأنزيم السمية الخلوية Cytotoxicity و يجعل الدهون تترسب في الخلايا المناعية ، وايضاً تحطيم أنسجة المضيف (Mba and Nweze, 2020).

3-6-2: المحللات الدموية البروتينية Hemolysin

يعتبر العامل المحلل للدم الهيمولايسين أحد أهم عوامل الضراوة المهمة الذي يؤدي دوراً بارزاً في امراضية الفطريات ، حيث يسهل هذا البروتين للكائنات الحية كالفطريات على أكتساب الحديد Iron حيث يعتبر هذا العنصر ضروري جداً ومهم للكائنات الدقيقة وذلك لتكيفها وبقائها على قيد الحياة ، حيث إن معظم الكائنات الممرضة (الفطريات والخمائر) تحصل على الحديد من الهيموغلوبين Hemoglobin الذي يعد مركب شائع يحتوي على الحديد ، وهذا يعني ان المضيف لا يحتوي على جزيئات حديد حرة (Malcok *et al.*, 2009)، وعلاوةً على ذلك فأن القيام بهذا الأمر يجب إن تكون لدى الكائنات الحية الدقيقة الية تمكنها من تحليل الهيموغلوبين وتحرير الحديد، وهذه الآلية تضمن انتاج بروتين تحللي يسمى الهيمولايسين Hemolysin (Linares *et al.*, 2007 ; Malcok *et al.*, 2009) وبناءً على ذلك فأن الهيمولايسين يمتلك القدرة المعروفة على تسهيل بقاء الممرض واستمراره وذلك بسبب غزو الخيط الفطري واكتساب الحديد ، كما في حالات داء المبيضات الجهازية ، وبذلك يعد احد عوامل الضراوة المهمة جداً (Rossoni *et al.*, 2013) ، ان الاشارة الى هذا الانزيم وعلى العكس من الانزيمات الاخرى ، فان دور الهيمولايسين الدقيق في العدوى الفطرية غير مفهوم جيداً(Wan *et al.*, 2015).

2-7: المضادات الفطرية Antifungals

يمثل مصطلح المضادات الفطرية Antifungals جميع المركبات الكيميائية والمنتجات الطبيعية والعقاقير الدوائية التي تستخدم في علاج الاصابات الفطرية (Sangaré *et al*., 2021)، و تتطلب الاصابات الفطرية كالتهاب الأذن الخارجية الفطري Otomycosis علاجاً فعالاً ومضاداً للفطريات الممرضة ، وكذلك تستخدم لعلاج الاصابات الناتجة من الفطريات الانتهازية كما في بعض الفطريات مثل جنس *Aspergillus* spp. وكذلك المبيضات *Candida* spp. (Perlin *et al*., 2017 ; Chappe *et al*., 2018) ، يوجد العديد من اوجه التشابه بين خلايا اللبائن والخلية الفطرية فالخلية الفطرية تمتلك عمليات أيضية و بنية تركيبية مماثلة لما موجودة في الانسان ، وبناءً على ذلك يعد تطور المضادات الفطرية امراً صعباً وبالإضافة الى ما تمتلكه من القدرة على تحطيم خلايا الفطريات الممرضة للبائن و تؤثر أيضاً على خلايا المضيف ، وبالرغم من تشابه الخلايا الفطرية وخلايا لبائن في الكثير من العمليات الحياتية المعقدة ألا انه يوجد بعض الاختلافات الكيموحيوية بينهما ومنها غشاء البلازما للخلايا الفطرية يحتوي على الأركوستيرول Ergosterol في حين غشاء الخلية اللبائن يحتوي على الكوليسترولCholesterol ، و إن الخلايا الفطرية تمتلك جدار خلوي في حين لا تمتلك اللبائن مثل هذا الجدار ، (Caudle, 2010) .

يكون تأثير المضادات الفطرية بشكل مباشر أو غير مباشر في الفطريات الممرضة والمسببة التهاباً ، فهي تؤثر على الجدار الخلوي Cell wall أو الغشاء البلازمي Plasma membrane او البناء الحيوي للأحماض النووية Nuclic acid (Perlin *et al*., 2017 ; Chapee *et al*., 2018) ، بالاضافة الى ان هذة المضادات الفطرية لها تأثيرات جانبية متعددة منها التأثير السمي على الانسان (Peyclit *et al*., 2021)، ولوحظ في السنوات الاخيرة ازدياد حالات المقاومة للمضادات الفطرية من قبل الفطريات الممرضة حيث شكل هذا قلقاً للمختصين (Lestrade *et al*., 2019) ، وبناءً على ذلك وجب على المختصين العمل على زيادة الاساليب العلاجية المتطورة للأمراض الفطرية وذلك عن طريق اختيار نوع المضاد الفطري الصحيح والمطلوب في الوقت الملائم والتي تؤدي الى نتائج جيدة تعكس على التحسن والشفاء السريع (Bassetti *et al*., 2016)، واهم المضادات الفطرية هي:

2-7-1: مجموعة الأزول Azoles group

تعتبر مجموعة الأزول من اكبر مجاميع المضادات الفطرية حيث تؤثر على تصنيع الأركوستيرول وهو أحد مكونات اغشية الخلايا الفطرية (Hof, 2006)، وتستخدم في علاج بعض الالتهابات الفطرية fungal infection والفطار الجلدي Dermatomycosios

(Salvo, 2009)، وتضم مجموعة من المضادات الفطرية ومن أهمها الفلوكونازول (Romsaithong *et al*., 2016)، الفلوكونازول وهو أكثر أنواع المضادات الفطرية أستخداماً حيث يستخدم لعلاج التهابات منها الالتهابات الأذن (Cheesbrough, 2005) ، والداء المبيضات الفموي والبلعومي وعدوى المبيضات الجهازية بأنواعها (Berkow and Lockhart, 2017)، ويعتبر أستعمال الفلوكونازول آمناً في علاج الاطفال مع وجود قليل من الأثار جانبية (Egunsola *et al*., 2013)، و تتمثل ميكانيكية عمل هذا المضاد من خلال تفاعله مع مركب– demethylase14α هو انزيم Cytochrome P- 450 المسؤول عن العملية المحفزة لتحويل مركب Lanosterol إلى Ergosterol المتواجد في تركيب اغشية الخلية الفطرية ،و ان المضاد الفلوكونازول يعمل على تثبيط تصنيع مركب الـ Ergosterol وبالتالي يزيد من نفاذية الخلية الفطرية Cell Permeability وهذا يؤدي الى موت الخلية بالاضافة الى منع عملية التنفس الخلوي لدى الخلية الفطرية (Berkow and Lockhart, 2017).

ومن الجدير بالذكر إن فقدان الستيرولات Sterols قد يحدث بالترافق مع تراكم مركب الـ 14-Methylsterols المتواجد في الفطريات ، وهذا يعد سبباً في تحسس الفطريات لهذا المضاد ، ووجد ان للفلوكونازول فعالية عالية أتجاه أنواع المبيضات .*Candida* spp ، فلوحظ إن له فعالية أتجاه الخميرة *C.glabrata* وليس لديه اي فعالية اتجاه الخميرة C.krusei (Hornik *et al* ., 2021 ; Spampinato and Leonardi, 2013).

2-7- 2: مجموعة البولين Polyenes group

تعتبر مجموعة البولين من المجاميع المهمة للمضادات الفطرية ، حيث تتفاعل هذه المجموعة مع الاركوستيرول Ergosterol في اغشية الخلايا الفطرية مما يؤدي الى زيادة نفاذيتها ومن ثم تسرب محتوياتها وبالتالي موت الخلايا الفطرية ، وتمتاز مضادات مجموعة البولين بكونها اقل سمية مقارنة بالمضادات الفطرية الاخرى ، ومن اهم انواعها Nystatin (Szomek *et al* ., 2021)، حيث يتميز عقار النستاتين بفعالية عالية ضد الفطريات الممرضة وفي الاغلب الفطريات التي تصيب الاطفال الذين تكون اعمارهم اقل من 33اسبوعاً (Ganesan *et al*., 2009). واستخدم المضاد الفطري النستاتين في علاج فطار الأذن ، حيث أظهرت *Candida* .sp حساسية عالية اتجاه هذا المضاد (Warriso *et al*., 2022) ، وكذلك تم أستخدمه ضد الفطريات الخيطية المرضية التي عزلت من الأذن الخارجية والتي أظهرت معظمها حساسية اتجاها هذا المضاد (Ali *et al*., 2018).

2-8: استخدام النباتات الطبية في علاج الفطريات المرضية.

The use of medicinal plants in the treatment of fungi pathogenic

تشكل النباتات جزءاً اساسي من التنوع الحيوي في العالم ، فهي مورد حياتي لرفاهية الانسان ، والعديد منها يمتلك اهمية اقتصادية وتشكل مصدراً غذائياً اساسياً في الطب (Mercado and Vessuri, 2015)، تعد النباتات الطبية مصدراً مهماً للمواد الكيميائية التي لها دور صيدلاني (Ayyanar and Ignacimuthu, 2009)، وذلك من خلال استخدامها كبدائل للأدوية (Gallegos -Zurita, 2016).

ولاحظ Nawrot *et al.* (2014) ، إن أزدياد مقاومة الفطريات للأدوية المضادة المتاحة أدى للحد من الخيارات العلاجية والتي اصبحت الان مصدراً قلقاً للصحة العامة ، و اثبتت الدراسات الحديثة إن النباتات تعد مصادر طبيعية للمركبات المضادة للميكروبات وذات امكانية متعددة (Tang *et al* ., 2018) ، وبالتالي يعد العلاج بالنباتات الطبيعية هو البديل الامثل الى حداً ما (Avila *et al* ., 2016) ، وإن انتشار الامراض ومحدودية الوصول الى الادوية ساهم في ترجيح استخدام النباتات الطبية (Ruiz *et al*., 2018)، وبالتالي يشكل طريقة علاج سهلة المنال واقتصادية (Bussman and Sharon, 2015) ، و تستخدم المستخلصات النباتية هذه بدورها كمنتجات بديلة او تكميلية للطب الصيدلاني (Gallegos- Zurita, 2016)، ويعتبر الملايين من الأشخاص إن الطب التقليدي هو الخيار الوحيد للعلاج الصحي ، وكذلك بالنسبة لاولئك الذين يستخدمون النباتات لمجموعة متنوعة من الاغراض في حياتهم اليومية ، وتعتبر النباتات الطبية مهمة كما انها حيوية كمصدر للأدوية الجديدة (Abad *et al*., 2007 ; Montagna *et al*., 2015)

ويعكس استخدام النباتات الطبية تأريخاً طويلاً من المشاركة البيئية للبشر، ويمكن استخدام مجموعة كبيرة من المواد الكيميائية الموجودة في النباتات المستخدمة في الطب التقليدي لعلاج العديد من الاضطرابات المرضية المعدية ، ونظراً لتوفر تنوع كيميائي لا مثيل له فأن المنتجات الطبيعية سواء كانت مواد كيميائية نقية او مستخلصات نباتية تقدم عددا من الفرص لتطوير ادوية جديدة ، تم اجراء العديد من الدراسات حول الخصائص المضادة للفطريات للمركبات الفينولية الطبيعية وهي مركبات فينولية بسيطة و الفلافونات ، و الزيوت العطرية التي تمثل احدى اهم المركبات ذات الاصل الطبيعي بسبب قوتها العالية في مضادات الميكروبات ، حيث تتمتع الزيوت بمجموعة واسعة من الانشطة المضادة للميكروبات والتي يعود في معظم الحالات الى المحتوى العالي للتربينات (Angiolella *et al*., 2010) .

2-8 -1 النبات المستخدم في الدراسة The plant used in the study

2-8-1- 1 : نبات الثوم Garlic

ينتمي الثوم الى عائلة Lillaceae ، واسمه العلمي *Allium sativum* موطنه اسيا الوسطى لكنه ينمو حالياً في العديد من البلدان حول العالم (De Greef *et al*., 2021) ، الثوم هو احد النباتات الطبية التي تتم استخدامها لسنوات عديدة في اغراض الطهي واغراض الطب ،حيث ان المركبات النشطة بيولوجياً المعزولة من النباتات بما في ذلك الثوم ، تستخدم بشكل خاص في الصناعات الدوائية والغذائية ومستحضرات التجميل (Krakowska-Sieprawska *et al*., 2022).

ويحتوي الثوم على مركب الاليسين وهو مضاد حيوي طبيعي قوي ذو الفوائد الصحية الكبيرة منها تأثيراته المضادة للأكسدة و مضاد للميكروبات ومضاد للالتهابات ومضاد للاورام ومضاد للفطريات (White , 2021)

وشار Garba *et al*. (2013) إن الثوم يحتوي على مركبات حاوية على الكبريت ومنها الاليسين allicin و ajoene و مركبات غير حاوية على الكبريت منها phytoalexin(alliixin) ، إذ تعود الرائحة القوية للثوم الى المركبات الحاوية على الكبريت ، اظهرت العديد من الدراسات ان مستخلص الثوم يمنع نمو العديد من الفطريات مثل *Coccidioides immitis* ، والخمائر بما في ذلك المبيضات *Candida* sp. (Aala *et al*., 2014)

ذكر Pai *et al*. (1995) الفعالية التثبيطية العالية لمستخلص الثوم ضد الفطريات *Aspergillus* spp. الذي يعد المسبب الرئيسي لحدوث لاصابة بالتهاب الاذن والتي تضم بعض الانواع منها *A.niger* و *A.terreus* و*A.fumigatus* ، وكذلك يمكن استخدام الثوم ومركب الاليسين النقي كبديل لعلاج الفطريات الجلدية (Aala *et al*., 2013) ،ومنها *Trichophyton rubrum* و *T.mentagraphytes* و*Microsporum canis* (Aala *et al*.,2010) ، ويعد مركب الاليسين مكون فعال وقوي ضد المبيضات *Candida* sp. (Lemar *et al*., 2002 ; Kim *et al*., 2004) ، وتم دراسة تأثير المضاد الفطري لزيت الثوم وبتراكيز مختلفة ضد بعض المسببات الامراض الفطرية المصاحبة لتعفن ثمار الموز فلوحظ ان جميع التراكيز المستخدمة للزيت الثوم ادت وبشكل كبير الى تثبيط نمو الفطريات (Muazu *et al*., 2018).

2-1-8-2: نبات القرنفل *Syzygium aromatticum*

ينتمي نبات القرنفل الى عائلة Myrtaceae ، حيث يكون موطنها الأصلي في اندونيسيا ولكن تم زراعته مؤخراً في اماكن مختلفة في العالم (Cortes-rojas *et al.*, 2014 ; Batiha *et al.*, 2020) ، ويحتوي نبات القرنفل على مجموعة متنوعة من المواد الكيميائية المضادة وذات الفوائد الكبيرة ، منها الأوجينول eugenol ، trans-caryophyllene ، eugenol acetate وغيرها (Prianto *et al.*, 2013).

ووفقا (Towaha , 2012) فإن الأوجينول ومركباته المشتقة لها تأثير دوائي مثل المسكنات والعوامل المضادة للألتهابات ، العوامل المضادة للفطريات ، العوامل المضادة للبكتريا والفيروسات ، العوامل المطهرة والمضادة للقيء والمنشطات والمخدرات الموضعية. وبالرغم من تطور العلاج بالمضادات الفطرية الا ان معدلات مقاومة الفطريات في تزايد وبالتالي ادى الى فشلها (Wiederhold, 2017)، لذا تم تسليط الضوء لتطوير علاجات بديلة ضد هذه الاصابات الفطرية (Tang *et al.*, 2018)، اجريت عدة دراسات في هذا لشأن منها الدراسة اجريت في جامعة بغداد حيث وجد ان المركبات الفعالة التانينات Tannins والفينولات Phenols والزيوت الطيارة Volatile oils المستخلصة من النبات القرنفل *Syzygium aromatticum* حيث له فعالية تثبيطية عالية اتجاه بعض العزلات البكتيرية مثل *Staphylococcous aureus* وكذلك اتجاه الفطريات الجلدية (الظويهري ،2007).

أذ لاحظ Aslam and Roy. (2013) في دراسته فعالية تثبيطية عالية ضد نوعين من الفطريات *Aspergillus niger* و *Penicillium notatum* عند استخدامه المستخلصات القرنفل *Syzygium aromaticum* .

وفي دراسة Febriyanti & Aldi. (2012) وجدوا ان الزيت العطري للقرنفل يمكن ان يثبط بشكل فعال نمو الـ *C.albicans*.وقد ذكر Yassin *et al.* (2020) الفعالية التثبيطية العالية للمستخلص القرنفل اتجاه عدة عزلات من داء المبيضات المهبلي منها *C.albicans* و *C.glabrata* و*C.tropicalis* .

2-9: الطرق الجزيئة في تشخيص الفطريات

Molecular methods for the diagnosis of fungi

إن تغيير الخصائص المظهرية والفسيولوجية للفطريات يتم من خلال تأثرها بعوامل خارجية كالعوامل الغذائية والبيئية والكيميائية ، في الغالب يفضل الباحثون الاعتماد على الطرق الجزيئية لتصنيف الفطريات اذ تعد الاختلافات الوراثية اكثر دقة من الاعتماد على الخصائص المظهرية في التصنيف (Faggi *et al.*, 2001)، هناك صعوبة في تشخيص الفطريات الممرضة للأنسان مظهرياً وذلك بسبب تداخل علامات المرض والاعراض مع الاصابات الاخرى (Martins *et al.*, 2014) ، مع ذلك لا تزل تستخدم الطرق التقليدية مع التقنيات الجزيئية في تشخيص الفطريات (Mohammed *et al.*, 2013)، حيث تعد الطرق التقليدية ضرورية لفهم الفطريات وتفاعلاتها البيئية وبالاضافة الى الحصول على نتائج دقيقة وذلك من خلال التحليل الجزيئي للاختلافات الجينية وتعديلاتها (Kurtzman *et al* ., 2011).

وبفضل تطور تقنية الـPCR(Polymerase Chain Reaction) اصبح العلماء يمتلكون معلومات عن تتابع القواعد النتروجينية للكائنات الحية ، وفي الوقت الحاضر فأن المعلومات الوراثية لآلاف الفطريات مخزنة في بنك الجينات Gene bank، التي لها دوراً مهم في الدراسات الجينية (Khan and Bhadanria , 2019).

و تعد تقنية الـPCR احد التقنيات المهمة التي لا يمكن الاستغناء عنها والمستخدمة في تصنيف الفطريات ، وأكتشفت هذه التقنية من قبل العالم Karry Mullis مع Michelle Smith في عام1985(Weile and Knabbe, 2009)، هذه التقنية لا تزال تستخدم في وقتنا الحالي ،وبسبب قلة تكلفتها من ناحية الاجهزة والمواد المستعملة في المختبرات وعلى الرغم من اكتشاف العديد من التقنيات (Bretagne and Costa, 2006) .

تستخدم هذه تقنية في عدة مجالات خاصة ولا سيما بمجالات تشخيص الفايروسات والبكتريا والفطريات والطفيليات اذ تعد فحوصات واعدة لتمييز الفطريات الممرضة وانواع الخميرة (Wellinghausen *et al.*, 2004).

اظهرت العديد من الطرق المعتمدة على تقنية PCR كفاءة عالية (Shin *et al.*, 1997). أذ انها تعتمد على الحامض النووي DNA و تتميز بالدقة العالية في التشخيص (White *et al.*, 2006) اذ يتم من خلال الطرق الجزيئية المعتمدة على PCR تضخيم جزء صغير جداً من DNA ومن ثم اعادة

ربطه بأشرطة اخرى ويتم ذلك عن طريق التحكم بدرجات الحرارة (Mothershed and Whitney, 2006)

وتعد تقنية الـPCR افضل الطرق في تشخيص الفطريات الممرضة(Thomas, 2003)، ومن ثم صنفت عدة أنواع من الفطريات بأستخدام الطرق الجزيئية ،أذ تم التصنيف بأستخدام الموقع Inter Transecrept spacer(ITS) ويعد هذا الموقع مهماً في تصنيف الفطريات وذلك لوجود أختلافات عديدة بتتابع القواعد بين الأنواع الجنس الواحد (Bugni and Ireland ,2004).

وصف الباحث White *et al.* (1990) العديد من البواديء المستعملة في تصنيف الفطريات . وكذلك تهدف التقنيات الجزيئية لرفع كفاءة التصنيف ومعرفة الارتباط التطوري بين الرتب التصنيفية الجديدة خاصة بالنسبة للنوع والجنس والسلالة (Putignani *et al*., 2010)، في الاوان الاخيرة تم بذل محاولات لتطوير طرق التشخيص لأنواع المبيضات عن طريق استكشاف بعض الاختلافات في المنطقة المحفوضة في جينومها وذلك لتحديد العلاقة بين الأنواع ، وكذلك لحل مشكلة زيادة مقاومة المضادات الفطرية يتم أستخدام التقنيات الجزيئية لمعرفة التحورات الجينية والتي تقاوم عمل المضادات الفطرية(Al-Laaeiby *et al* ., 2019). وبذلك يكون التشخيص الدقيق للامراض الناجمة عن الفطريات الممرضة هو دليلاً مهماً في اختيار العلاج المناسب (Mohammadali *et al*., 2017).

وأستخدمت تقنية الـ PCR في تشخيص فطريات الاذن الخارجية ، حيث يوفر تسلسل ITS معلومات شاملة حول المجتمع الفطري في فطار الاذن اذ وجد Gu *et al.* (2022) ان جنس الـ *Aspergillus* spp. هو العامل المسبب الرئيس للإلتهاب الأذن الخارجي الفطري في الصين ، بينما في ايران شخص Aboutalebian *et al.* (2021) أنواع جنس الـ *Candida* sp. والمسببة التهاب الأذن الخارجي ومنها *C.albicans* و *C. parapsilosis* و كذلك انواع جنس الـ *Aspergillu* spp. ومنها *A.niger* و *A.flavus* و *A.terrues*.

الفصل الثالث

المواد وطرق العمل

Materials and method

3- 1 المواد وطرائق العمل Materials and methods

3-1 -1 الاجهزة والادوات المستخدمة في الدراسة Instruments and Tools

استعملت في هذه الدراسة العديد من الأجهزة والأدوات كما موضحة في الجدول ادناه:

الجدول (1.3)الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة فضلاً عن الشركات المصنعة والمنشأ.

الشركة المصنعة/ المنشأ		الأجهزة والأدوات المختبرية
Bio neer(Korea)	ml2Epindroff	ابندروف (انابيب)
Iso lab (Germany)	Cylinder	اسطوانات مدرجة بأحجام مختلفة
Bio zekmedical(Holland)	Petri Dishes	أطباق بتري
ALS (Canada)	tubes Test	أنابيب اختبار
Whatman No. (UK)	Filter PaPers	أوراق ترشيح
Pall life (USA)	Milipore filter	أوراق ترشيح دقيقة
China	Sterile cork borer	ثاقب فليني معقم
Vistal (Poland)	Refrigerator	ثلاجة
Fortuna W.G.(Germany)	Soxhlet	جهاز
Shimadzu(Japan)	UV-visible Spectroscop	جهاز الاشعة فوق البنفسجية
GFR(Germany)	Water Distall	جهاز التقطير
Hettich (Germnay)	Centrifuge	جهاز الطرد المركز
Vilber lourmat (France)	Gel Documentation	جهاز تصوير الهلام
Epindroff (Germany)	Eppendorf centrifuge	جهاز طرد مركزي
Sartorius (U.K.)	pH -Meter	جهاز قياس الحموضة

Zenith lab (China)	Shaking Incubator	حاضنة هزازة
Human Lab(Korea)	Incubator	حاضنه
Memmert (Germnay)	Water path	الحمام المائي
Consort (Belgium)	flask	دوارق مختلفة
Superestar (India)	Slides and cover slides	شرائح زجاجية وغطاء الشريحة
memmert (Germany)	oven	فرن كهربائي
Pyrex(England)	Screw Cap bottles	قناني محكمة الغلق
Lab Tech(France)	Biosafety cabinet	كابينة الزرع
Broche(Malaysia)	Cloves	كفوف
Heidolph (Germany)	Magnatic stirrers	مازج مغناطيسي
Olympus (Japan)	Light Microscope	مجهر ضوئي
Agilent (USA)	Disposable Sryinges	محاقن طبية
Iraq	Sterile cottons wabs	مسحات قطنية معقمة
Shownic(Korea)	Microwave	جهاز مايكرويف
Iraq	Benzen burner	مصباح بنزن
Knf laboport(USA)	Vaccum pump	مضخة ضغط
Hirayama(Japan)	Autoclave	مؤصدة
Sartorius (Germany)	Sensitive Balance	ميزان حساس
Hi- Media (India)	Standard Wire loop(1m)	ناقل الزرعي

3-1-2:المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة

جدول(3-2)المواد الكيميائية التي استخدمت أثناء مدة الدراسة مع الشركة المصنعة والمنشأ:

المنشأ	المادة
RBL(spain)	Absolute ethanol كحول الايثانول المطلق
KR(Chile)	Agar اكار
Bio basic(Canada)	Agaros اكاروز
SCR(China)	Calcium chlorid كلوريد الكالسيوم
LOBA(India)	Congo red stan صبغة
Promega(USA)	DNA Ladder
Bio neer (Korea)	Free nuclease water
Scharlau(spain)	Glucose
Bio neer (Korea)	Ladder 100bp
Bio neer (Korea)	Master mix مزيج التفاعل
BDH(England)	Pepton ببتون
Bio neer (Korea)	Primers بادئات
French	Skim milk
SCR (China)	Sodium chlorid كلوريد الصوديوم
Bio basic(Canada)	TBE buffer
Panreac(spain)	Tween 80
Mumbai (India)	Cychlohexamide السايكلو هكسامايد

Bio neer (Korea)	Lactophenol الاكتوفينول
Alpha (Turkey)	كحول الاثيلي (70%)
AQUA(Turky)	كحول الاثيلي(95 %)
Samarra company(Iraq)	Chloramphenicol كلورامفينيكول

3-1-3 الأوساط الزرعية Culture media

جدول(3-3) يمثل الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة فضلاً عن الشركة المصنعة والمنشأ.

الشركة المصنعة	الوسط الزرعي
Hi- Media (lndia)	**Sabouraud's Dextrose Agar وسط السابرويد دكستروز اكار**
Hi- Media (lndia)	Potato Dextrose Agar وسط البطاطا دكستروز اكار
Hi-Media(lndia)	CHROM agar *Candida* الوسط التفريقي اكار
حضر مختبريا	Casein agar وسط الكازئين اكار
حضر مختبريا	وسط السابرويد دكستروز اكار مع السايكلوهيكسمايد
NEOGEN(UK)	Brain Heart infusion Agar(BHA)
حضر مختبريا	Egg Yolk Agar
حضر مختبريا	Tween 80 Agar
حضر مختبريا	Sheep blood Agar

3-1- 4المضادات الفطرية المستخدمة

الجدول (3-4):المضادات الفطرية المستخدمة في الدراسة الحالية

المضادات	الشركة المصنعة / المنشأ
Nystatin	Sapha Co. Iraq
Fluconazole	Pfizer (USA)

3-2: طرق العمل Methods

3-2-1: جمع العينات Samples Collection

جُمعت 115 عينة سريرية من المرضى المراجعين لقسم الاستشارية للأنف والأذن والحنجرة في مستشفى الصدر التعليمي العام وبعض العيادات الخاصة في محافظة ميسان خلال الفترة من (2022/11/1) ولغاية (2023/3/20)، وللأعمار(1-80)سنة ولكلا الجنسين حيث اخُذت العينات بأستخدام مسحات قطنية معقمة Sterile swabs وبأشراف مباشر من الطبيب المختص وبمعدل مسحتين لكل عينة وجمعت بيانات عن كل مريض في استمارة خاصة (استمارة جمع العينات) وكما مبينة في الملحق(1). ونقلت العينات الى مختبر الفطريات في كلية العلوم / جامعة ميسان لغرض فحصها وزراعتها.

3-2-2: تحضير الأوساط الزرعية المستخدمة

3-2-2-1: وسط السابرويد دكستروز اكار Sabouraud's Dextrose Agar (SDA)

حضّر الوسط حسب توصيات الشركة المجهزة وذلك بإذابة 65 غم من مسحوق الوسط SDA في لترمن الماء المقطر ، وبعد التعقيم ترك ليبرد الى ما قبل التصلب ، واضيف إلية المضاد الحيوي (الكلورامفينيكول) بمقدار250 ملغم/ لتر لكل من الوسط الزرعي ، وصب في أطباق بلاستيكية ذات القطر 9سم ، واستخدم هذا الوسط لتنمية الفطريات الخيطية والمعزولة من القناة الأذن الخارجية وكذلك أستخدم هذا الوسط في العزل الأولي والتشخيص للفطريات المعزولة من قناة الأذن الخارجية. (Lyon *et al*., 2008).

3-2-2-2 : وسط البطاطا دكستروز اكار(PDA) Potato Dextrose Agar

حضّر الوسط الزرعي تبعا لتعليمات الشركة المصنعة وذلك بإذابة 39غم من مسحوق الوسط في لترمن الماء المقطر، وبعد التعقيم ترك ليبرد الى ما قبل التصلب ، واضيف إلية المضاد الحيوي

(الكلورامفينيكول) بمقدار250 ملغم لكل لتر من الوسط الزرعي وصب في أطباق بلاستيكية ذات القطر 9 سم ، واستخدم هذا الوسط لتنمية الفطريات الخيطية والمعزولة من القناة الأذن الخارجية (McGinnis, 1980).

3-2-2-3: وسط الكروم اكار كانديدا CHROM agar *Candida*

حضر الوسط التشخيصي المذكور حسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة 42.72 غم من الكروم اكار في لتر من الماء المقطر المعقم ثم بعدها وضع على الصفيحة الساخنة مع التحريك بين فترة واخرى لكي تمتزج المادة مع الماء وبعد اكمال ذوبانه يبرد الوسط ويصب في اطباق بلاستيكية ، استعمل هذا الوسط لتمييز الخمائر بالاعتماد على اللون (Hajjeh *et al*., 2004).

4-2-2-3: وسط السابرويد دكستروز اكار مع السايكلوهكسامايد

Sabouraud's Dextrose Agar with Cychlohexamide

حضر هذا الوسط كما في الفقرة رقم (1) واضيف إليه 0.5 غراماً لكل لتر من السايكلوهكسامايد بعد التعقيم ، أستعمل هذا الوسط لمنع نمو الفطريات الانتهازية و لاختبار قابلية الخمائر على النمو بوجود السايكلوهكسامايد (Ellis,1994).

5-2-2-3: وسط الكازئين Casein agar

حضر هذا الوسط بإذابة 10غرام من Skim Milk في 90 مل من الماء المقطر وإذابة 3غرام من الاكار في 97 مل من الماء المقطر ، عقم المحلولين كلا على حده ، وبعد التعقيم مزجا معا ، ترك المزيج ليبرد وبعدها صب في أطباق بتري بلاستيكية أستعمل هذا الوسط للكشف عن تكوين السبورات الكلاميدية (Larone , 1994).

6-2-2-3 : وسط Brain Heart Infusion agar

حضّر الوسط حسب توصيات الشركة المجهزة وذلك بإذابة 52غراماً من مسحوق الوسط في لترمن الماء المقطر واضيف إلية الصبغة الكونغو الحمراء Congo red stain بمقدار 0.8 غم/ لتر، و بعد التعقيم ترك ليبرد ، وبعدها صب في أطباق بتري معقمة أستعمل هذا الوسط للكشف عن الخمائر المبيضات المنتجة الغشاء الحيوي (Janakiram *et al* ., 2017).

7-2-2-3 : وسط Phospholipase activey medium

حضر هذا الوسط حسب الطريقة الموصوفة من قبل Samaranyake *et al.*(1984) وذلك بأذابة 13غم من SDA ، 11.7 غم منNacl ،0.11غم من $Cacl_2$ ، 10%من صفار البيض المعقم في 184مل ماء مقطر.

تم تحصير صفار البيض كمسحوق كالاتي :أخذت بيضة طازجة ، فصل المح عن الزلال بواسطة حقنة معقمة ، وضع المح في وعاء زجاجي معقم ، ووضع الوعاء في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 40 مْ لمدة ساعة واحدة لكي يجف المح ، خلط 8غم من المادة الجافة مع 50مل ماء مقطر معقم ومزجت جيداً بأستخدام الهاون الخزفي وضع الخليط في جهاز طرد مركزي وبسرعة 500 rpm لمدة 15 دقيقة ، أخذ الراسب وخفف مع 100مل ماء مقطر معقم واضيف الى الوسط الاختبار المعقم وضبط قيمة الـ (pH 5) واستخدم هذا الوسط لغرض الكشف عن قدرة الفطريات على افراز انزيم Phospholipase.

8-2-2-3: وسط Hemolysin activey medium

حضر هذ الوسط تبعاً للطريقة الموصوفة بواسطة (Luo *et al.*, 2001) بأذابة 62 غم منSDA ، 30 غم من كلوكوز Glucous ، 70مل من Fresh Sheep blood ، في 1لتر من الماء المقطر المعقم ، استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية الفطريات المعزولة على تحليل الدم Hemolysin

9-2-2-3 : وسط Tween 80 Opacity test medium

حضر هذ الوسط تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل Schoofs *et al.*(1997) وذلك بأذابة 10غم من البيتون ، 5غم من Nacl ، 0.1 غم من $Cacl_2$ ، 15غم من الاكار، 5مل من Tween 80 في 1 لتر من الماء المقطر المعقم ، استعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة الفطريات المعزولة على افراز انزيم Esterase.

3-2-3: التعقيم Sterilization

1-التعقيم بالحرارة الرطبة Sterilization wet hot

عقمت جميع الاوساط الزرعية بجهاز المؤصدة الحراري (Autoclave) وبدرجة حرارة 121 مْ وضغط 15باوند/ أنج ولمدة 15 دقيقة ، ماعدا الوسط *Candida* CHROM agar .

2- التعقيم بالحرارة الجافة Sterilization Dry hot

عقمت الزجاجيات والأدوات التي استخدمت في التجارب بواسطة الفرن الكهربائي (Electric oven) وذلك عند درجة حرارة 160مْ ولمدة 90 دقيقة .

3- التعقيم بالترشيح Sterilization by Filteration

عقمت المستخلصات النباتية بأستخدام وحدة الترشيح الدقيق Millipore عبر اوراق ترشيح قطر 0.22µ (Harley and Prescott, 1996)

3-2-4 : صبغة اللاكتوفينول ازرق المثلين Lactophenol cotton blue stain

حضرت هذه الصبغة وفقاً لطريقة الموصوفة من قبل (Ellis ,1994) من المواد الاتية :

المثيلين الأزرق 0.05غم

كليسرول 20مل

فينول 10غم

حامض اللاكتيك 20مل

ماء مقطر 20مل

أستخدم هذا المحلول للفحص المجهري من خلال تصبيغ الفطريات وتثبيتها.

3-2-5: زرع العينات Samples of Culture

نُقلت العينات المأخوذة بالمسحات القطنية بعد جمعها الى مختبر الفطريات /كلية العلوم /جامعة ميسان ، وزرعت على وسط SDA و PDA وحضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة (25مْ) وعدت العينات التي لا يظهر فيها اي نمو سالبة بعد اسبوعين من الحضن (Olds, 1975) .

3-2-6: فحص العينات المزروعة

فُحصت الاطباق بعد يومين من عملية الزرع ، واهملت الاطباق التي لا تحتوي على نمو فطري ، تم الفحص تحت المجهر الضوئي Light microscope لتشخيص الفطريات والخمائر وذلك من خلال تحضير شريحة نظيفة ومعقمة ووضعت عليها قطرة من الصبغة اللاكتوفينول ازرق القطن ثم

نقل جزء صغير من المستعمرة النامية الى الشريحة الزجاجية بإستخدام الحلقة المعقمة Inoculating loop ووضع عليها غطاء الشريحة Cover slid ، وبعد تشخيص الفطريات عمل لها مزارع نقية Pure Cultures وكذلك مزارع مائلة Slant حيث أستخدمت قناني معقمة ونظيفة وتوضع في الحاضنة لغرض النمو و بعدها تحفظت في الثلاجة بدرجة 4 مْ لحين الاستعمال مع مراعاة التنشيط .(Milan and Zaror , 2004).

3-2-7: تشخيص الفطريات : Identification Fungi

3-2-7-1: التشخيص الفطريات الخيطية Identification Fungi Filamentous

شخصت الفطريات بالاعتماد على الخصائص المظهرية مثل ولون وشكل وحواف المستعمرات والخصائص المجهرية مثل شكل التراكيب الاصبعية Phialid ووجود الحوامل الكونيدي Conidiophore (LARONE, 1994) .

3-2-8: تشخيص الخمائر Identification Candida

أما خمائر المبيضات *Candida* sp. فقد تم تشخيصها بالأعتماد الصفات المجهرية ومن خلال اختبارات عديدة ، وتم اجراء الفحص المظهري لمستعمرات خمائر المبيضات على الوسط SDA وتم تسجيل عدد الايام لظهور النمو الفطري ،حيث فحص شكل المستعمرة وسطحها Surface ولونها في الجهة العليا Obverse والجهة المعاكسة Reverses ونسجة المستعمرة Texture واعتمد في التشخيص العينات على عدة مصادرة منها (Baron *et al*., 1994 ; Olds ,1975)، شخصت عزلات الخميرة على مستوى النوع باستعمال الاختبارات الاتية:

أ- أختبار النمو على وسط الكروم اكار كانديدا

بعد تنشيط العينات الخميرية على الوسط الزرعي SDA ولمدة (24-48) ساعة ، حُضر وسط الكروم اكار كانديدة حسب تعليمات الشركة المجهزة والذي تم ذكره سابقاً . وبعدها يصب الوسط في اطباق بلاستيكية مقسمة الى عدة اجزاء وزرع كل نوع في جزء معين وذلك باخذ جزء صغير من هذة العينات المنشطة و زرعها بطريقة التخطيط على هذا الوسط التفريقي وحضنت في الحاضنة لمدة (24-48) ساعة وبدرجة حرارة 37مْ وشخصت على مستوى النوع وبالأعتماد على لون المستعمرة على الوسط (Kaup *et al*., 2016).

ب- أختبار النمو على وسط الكازئين اكار

يعتبر أحد الأختبارات المهمة للكشف عن تكوين الأبواغ الكلاميدية حيث خطط وسط الكازئين اكار بثلاث أخاديد متوازية باستخدام الـ Loop المعقم ثم لقحت هذه الأخاديد بالخميرة المراد تشخيصها ، حضنت الأطباق تحت درجه حراره 37 مْ ولمدة 24-48 ساعة ، وبعد الحضن اخذ جزء بسيط من المستعمرة ووضعت على شرائح زجاجية نظيفة ووضعة معها قطرة من صبغة اللاكتوفينول الزرقاء وفحصت بالمجهر الضوئي للكشف عن وجود الابواغ الكلاميدية او عدم وجودها فضلاً عن الخيوط الفطرية (Sullivan *et al*., 1995).

ج- أختبار النمو على وسط السابرويد دكستروز اكار مع السايكلوهيكسامايد

تم هذا الأختبار بواسطة أخذ جزء صغير من مستعمرة النامية على وسط SDA لمدة 24 - 48 ساعة وزرعت بالتخطيط على وسط ال SDA الحاوي على السايكلوهكسامايد ، وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24- 48 ساعه بعد ذلك نلاحظ نمو العزلات (McGinnis, 1980**)**.

د- اختبار تكوين أنبوب الانبات

لأجراء هذا الاختبار تم وضع 0.5 ملليتر من مصل دم الانسان الطازج سحباً مباشرةً (Fresh) في أنابيب اختبار معقمة بعد ما عمل له طرد مركزي ، ولقح كل أنبوب بجزء صغير من المستعمرة النامية على وسط SDA ومزجه مع المصل، وحضنت الأنابيب بدرجة 37 مْ ولمدة ثلاث ساعات ، وبعد الحضن أخذت بعد ذلك قطرة من العالق بواسطة استخدام ماصة باستور Pasteur pipette ووضعت على شريحة زجاجية جافة ونظيفة وغطيت بغطاء الشريحة وفحصت تحت المجهر تحت قوة 40x لملاحظة تكوين أنبوب الانبات والذي هوعبارة عن أنبوب اسطواني قصير ينشأ من خلية الخميرة الام ولا يوجد تخصر عند منطقة الاتصال (Yakasiri and Siddabathuni, 2020).

هـ - اختبار نمو العزلات تحت درجه حرارة 45 مْ

لأجراء هذا الاختبار أخذ جزء صغير من مستعمرة نامية على وسط SDA وزعت بالتخطيط على اطباق حاوية على وسط SDA ، حضنت هذه الاطباق تحت درجة حرارة 45 مْ لمدة 24- 48 ساعة ، فالنمو بدرجة الحرارة هذه يعد صفة تشخيصية لبعض أنواع الخمائر (Gales *et al*.,1999**)**.

و- اختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

تم أجراء هذا الاختبار لخميرة *Candida* spp. وفقاً لما وصفه (Janakiram *et al*., 2017) ، وذلك بطريقة الطبق Plate method وبأستخدام وسط Brain Heart Infusion broth بوزن 37غم/لتر وصبغة الكونغو الحمراء Congo red stain بمقدار 0.8غم /لتر وسكر الكلوكوز بمقدار 80غم/لتر وآكار بمقدار 10غم /لتر، وأذيبت هذه المواد في لتر من الماء المقطر ، وبعد التعقيم ترك ليبرد الى ما قبل التصلب ، صبت في اطباق بلاستيكية ذات القطر9 سم ،ونميت الخمائر *Candida* spp. على الوسط وحضنت لمدة 24-48 ساعة ، بدرجة حرارة 37مْ ، واستخدمت الصبغة الكونغو الحمراء للكشف عن الخمائر *Candida* spp, المنتجة للغشاء الحيوي في المختبر

3-2-9: حساب النسبة المئوية للتردد والظهور

Frequency and Occurrence Percentage

تحسب النسبة المئوية لتردد Frequency وظهور Occurrence الفطريات المعزولة من قناة الأذن الخارجية بتطبيق المعادلة ادناه (Krebs ,1972):

النسبة المئوية للتردد (%) = (عدد عزلات النوع الواحد / عدد العزلات الكلي) ×100

النسبة المئوية للظهور (%)= (عدد عزلات النوع الواحد / العدد الكلي للعينات)×100

3-2-10: قياس الفعالية الانزيمية لبعض أنواع الفطرية

تم اختبار قابلية الفطريات *Aspergillus flavuas, A.niger, A.oryzae, A.terreus, Alternaria alternate, Cladosporium cladosporioides* والتي عزلت خلال هذه الدراسة قابليتها على افراز الأنزيمات على الأوساط الزرعية الصلبة وهذه الأنزيمات هي Phospholipase و Esterase وHemolysin .

3-2-10-1: أختبار فعالية انتاج انزيم الفوسفولاييز Phospholipase production

أجري الاختبار وفقاً لطريقة Samaranyake *et al*.(1984) وذلك بأستعمال وسط مح البيض اكار Egg yolk agar medium والمحضر بأذابة 13غم من SDA ، 11.7 غم من Nacl، 0.11غم من $Cacl_2$ ، 10%من صفار البيض المعقم في 184مل ماء مقطر وضبط الاس الهيدروجيني pH الوسط عند (3.4- 5) وعقم بالمؤصدة Autoclave وترك الوسط ليبرد الى درجة

حرارة 45-50 ثم اضيف الية مستحلب البيض في ظروف معقمة بمقدار10% ثم مزج ووزع في اطباق بيتري ثم نقل جزء من المستعمرة على شكل قرص بقطر 6 ملم بأستخدام الثاقب الفليني الى وسط الطبق ، بعدها حضنت الاطباق بدرجة حرارة 26مْ ولمدة خمسة ايام بعد ذلك فحصت الاطباق للكشف عن الفعالية الانزيمية من خلال ظهور منطقة كثيفة بيضاء هي منطقة الترسيب حول المستعمرات النامية على وسط مح البيض الصلب.

3-2-10-2: اختبار فعالية انزيم الإستريز Esterase activity test

تم اختبار فعالية عزلات الفطريات في أنتاج إنزيم الإستريزEsterase وذلك بأستخدام مادة Tween 80 تبعاً لطريقة Fatahinia *et al*.(2015) ، اذ حضر هذا الوسط Tween 80 Opacity test medium بأضافة 10 غم من الببتون و5غم من NaCl و0.1 من CaCl2 و 15غم من الآكار واذيب في 1000مل من الماء المقطر وضبط الاس الهيدروجين pH للوسط عند 6.8 وعقم الوسط بالمؤصدة Autoclave ثم برد لحوالي 50مْ ، بعد ذلك اضيف مادة Tween 80 المعقمة بالمؤصدة لوحدها الى الوسط مزج وصب الوسط في اطباق بتري معقمة ، ثم نقل قرص بقطر6ملم من المستعمرة الفطرية الفتية وبأستخدام الثاقب الفليني الى وسط الطبق ، بعدها حضنت الاطباق بدرجة حرارة 26مْ ولمدة 5-10 ايام بعد ذلك فحصت الاطباق للكشف عن الفعالية الانزيمية من خلال ظهور هالة بيضاء وشفافة حول المستعمرات النامية على وسط Tween 80 Agar.

3-2-10-3: اختبار تحلل الدم (فعالية الهيمولايسين) Hemolysin activity test

تم اجرى هذا الاختبار وفقاً لطريقة (Luo *et al* ., 2001) ، لاختبار فعالية الفطريات في تحلل الدم وانتاج بروتين الهيمولايسين ، وذلك من خلال نقل قرص بقطر6 ملم من المستعمرة الفتية للفطريات الخيطية و بإستخدام الثاقب الفليني الى وسط الطبق الحاوية على وسط دم الاغنام اكار الغني بالسكر Sugar –enriched sheep blood agar والمحضر من اضافة 3% من الكلوكوز الى 1 لتر من وسط SDA وضبط الاس الهيدروجيني pHعند 6.5 وبعد التعقيم بالمؤصدة Autoclave ثم برد الى 45-50مْ واضيف الية (في ظروف معقمة) 7 مليلتر من دم الاغنام الطازج Fresh sheep blood لكل /55 مليلتر من وسط SDA الحاوي على الكلوكوز ومزج جيدا ووزع في اطباق بيتري معقمة وترك ليتصلب ، بعدها حضنت الاطباق بدرجة حرارة 26مْ ولمدة 5 ايام بعد ذلك فحصت الاطباق للكشف عن الفعالية الانزيمية من خلال ظهور هالة سوداء مخضرة Greenish –blak اوهالة نصف شفافة halo. Translucent

3-2-11: النباتات المستخدمة في الدراسة Study plant

جمعت ازهار نبات القرنفل و فصوص الثوم من الاسواق المحلية لغرض اختبار فعالية مستخلصاتها الكحولية ضد نمو العزلات الفطرية والخميرة ، بعد تنظيفها من الاتربة والشوائب ثم طحنت بمطحنة كهربائية وحفظت في اوعية بلاستيكية جافة ونظيفة ومحكمة الغلق واستخدمت في نفس يوم اجراء التجربة .

3-2-11-1: تحضير المستخلصات النباتية Preparation of plant extracts

جُهز المستخلص الكحولي حسب الطريقة الموصوفة من قبل (Harborne,1984)، وذلك عن طريق وضع 10 غم من المسحوق النباتي لازهار القرنفل وفصوص الثوم كلا على حدا والمجفف في اوعية استخلاص ورقية Thumbles في جهاز Soxhelt extractor بأستعمال 200 مل من الكحول الاثيلي تركيز 99% كمذيب قطبي ، وتم اجراء الاستخلاص بدرجة حرارة 40مْ لمدة 24 ساعة ، وبعد ذلك جفف المستخلص بواسطة المبخر الدوار وذلك للتخلص من المذيب المستخدم ، كررت العملية لعدة مرات للحصول على الكمية المناسبة من الرغوة او الثمالة الجافة ، ومن ثم حُضر المحلول الاساس بخلط 1غم من الرغوة الجافة في 3 مل من المذيب(الكحول الايثانول) واكمل الحجم بالماء الى 10 مل بالماء المقطر ليصبح المحلول الاساس بتركيز 10%، وبعدها مرر الراشح عبر ورق ترشيح الدقيقة Millipore التي قطرها0.45µ بأستعمال مضخة التفريغ لغرض التعقيم .

3-2-11-2: أختبار فعالية المستخلص الكحولي لنبات القرنفل والثوم تجاه الفطريات والخمائر

لغرض تقييم فعالية المستخلص الكحولي لنبات القرنفل والثوم تجاه الفطريات والخمائر حيث استعملت عزلات من الفطريات *Geotrechium candidum, A.oryzae ,A.terreus* *Aspergillus , Pencillium* chr*ysogenum Cladosporium cladosporioides,* *flavuas, A.niger* و3 أنواع من الخمائر *Candida albican*s و *C.parapsilosis* و *C.tropicalis* ، إذ تم أستخدام طريقة الانتشار بالأقراص Disc diffusion method وفقاً الى ما ذكره (Espinel –Ingroff and Canton , 2007)

وتتلخص الطريقة كما هو موضح ادناه:

تم تنشيط العزلات الفطرية المستخدمة في الدراسة على وسط SDA ونقلت المستعمرة الفطرية الخيطية المحضرة على شكل قرص بأستخدام الثاقب فليني الى منتصف الوسط الـSDA المحضر

سابقاً. أما الخمائر خطط الوسط بالكامل بالخميرة دون ترك اي جزء بدون تخطيط ، ومن ثم نقلت اقراص المستخلص النباتي المحضر من ورق الترشيح بقطر 5ملم بواسطة آلة ثاقب الورق والمشربة بالمستخلص الكحولي للنباتات المختبرة لمدة 10دقائق الى سطح الوسط ، وبعد ذلك حضنت الأطباق لمدة (5-7) ايام للفطريات و (2-3) أيام للخمائر وعند درجة حرارة 25مْ ثم فحصت الأطباق لملاحظة النمو.

3-2-11-3:أختبار حساسية الفطريات والخمائر للمضادات الفطرية

Antifungal susceptibility

لغرض تقييم فعالية المضادات الفطرية الصيدلانية اتجاه الفطريات المعزولة من قناة الأذن الخارجية ، حيث تم اختبار نوعين من المضادات الفطرية وهي النستاتين والفلوكونازول واستعملت 7 عزلات من الفطريات و3 من الخمائر ، اذ تم استخدام طريقة الانتشار بالأقراص Disc diffusion method وفقاً الى ما ذكره (Espinel –Ingroff and Canton , 2007) اتبعت الطريقة نفسها المشار اليها في الفقرة(**3-2-11-2**) لكن بأستبدال المستخلص النباتي بمضاد فطري الفلوكونازول والنستاتين.

3-2-12:الدراسة الجزيئية للفطريات المعزولة من الاذن الخارجية

Molecular study of external otitis

3-2-12-1 :أستخلاص DNA

استخلاص الـ DNA من الفطريات والخمائر المعزولة من قناة الاذن الخارجية اثناء الدراسة:

تم الاستخلاص بإتباع طريقة (Mirhendi *et al.* (2006 وكما يلي :

1– تم وضع 300µlمن الدارىء المحلل للخلايا في انبوبة إبندروف معقمة حجم1.5مل.

2–يؤخذ مقدار ناقل مملوء Loop full من مستعمرة الفطرية وعلق في الدارئ أعلاه.

3– أُضيف300µl من مزيج كلورامفينيكول:فينول (1:1) والذي حضر انيا.

4- تم استخدام جهاز ال Vortex لمدة 5 دقائق وذلك لتكسير الخلايا بصورة تامة ، وتحرر الـDNA خارجها.

5- توضع الأنبوب في جهاز الطرد المركزي 10000دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق وذلك لترسيب حطام الخلايا.

6- بعد ذلك تؤخذ الطبقة المائية العليا بواسطة ماصة دقيقة وتوضع في أنبوب إبندروف جديد.

7- يضاف لها حجم مساو من الكلوروفورم وكرر عملية الطرد المركزي مرة أخرى.

8- تؤخذ الطبقة العليا وتوضع في أنبوب إبندروف جديد ويضاف لها حجم مساو من ISO- Propanol وعمل لها طرد مركزي اخر.

9- التخلص من السائل الموجود في الأنبوب ، بعدها غسل الراسب بواسطة 200µl كحول أثيلي 70% وكرر عملية الطرد المركزي.

10- وأخيراً يتم التخلص من الكحول الأثيلي وترك الأنبوب ليجف بالهواء لمدة 10-15 دقيقة ، ثم أضيف له100µlمن الدارئ TE وحفظت في الثلاجة .

2-12-2-3: الترحيل الكهربائي للـ DNA Electrophoresis of DNA

تم أجراء الترحيل الكهربائي حسب طريقة (Sambrook *et al.*, 1989) وكما يلي:

1- وزن 1غم من الاكاروز وتم إذابته في 100مل من TBE ليصبح بتركيز 1x.

2- سخن الخليط باستخدام جهاز Microwaveحتى أذيب الاكاروز بصورة تامة ، بعد ذلك ترك الخليط ليبرد 40-50مْ ثم اضيف اليه صبغة Ethidium bromide وبمقدار0.5µl.

3- حُضر قالب الترحيل الكهربائي بوضع المشط في أحد نهايتيه لعمل الحفر في الاكاروز ومن بعدها صب الخليط المحضر في القالب وترك ليبرد ويتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، وبعد ذلك رفع المشط والقطع المطاطية بحذر ودقة وأعيد القالب الى موضعه في جهاز الترحيل وغمر بمحلول TBE حتى وصل الى ارتفاع 2-3 ملم تقريبا.

4- مزج 2µl من صبغة BromophenolBlue5µl من عينة الـDNA المستخلصة جيداً ثم وضع الخليط في حفر الاكاروز .

5- ربطت الأقطاب جهاز الترحيل بمجهز القدرة وتثبيت قوة التيار الكهربائي 75 فولت وترك الهلام لمدة 30 دقيقة ،و يدل خروج الفقاعات الهوائية من حوض الترحيل الكهربائي على بدء عملية الترحيل.

6- بعد انتهاء عملية الترحيل ،فحص هلام الاكاروز تحت الأشعة فوق البنفسجية لملاحظة وجود الـDNA وصورت النتيجة النهائية بكاميرا رقمية.

3-12-2-3 :اختبار تفاعل سلسلة انزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR)

تم أجراء أختبار تفاعل سلسلة البلمرة حسب طريقة (Mirhendi *et al*., 2006)،وذلك بخلط مواد التفاعل في انبوبة ابندروف حجم 100µl جدول (7) وبألاعتماد على النشرة المرفقة مع Green Master Mixواستعمال البادئين(ITS1 و ITS4)هي بادئات عامة تستعمل لتضخيم منطقة Internal Transcribe sequences (ITS) لعينات DNA التي تم استخلاصها من بعض العزلات الخميرة و فطريات الاذن الخارجية المستعملة في الدراسة الحالية وكما موضح في الجدول رقم (8) وبعد ذلك أضيف للخليط Mineral oil 25µL ، ومن ثم طردت العينات مركزيا بجهازالطرد المركزي الدقيق 10000 دورة / الدقيقة لمدة 30 ثانية ولضمان تجانس جميع المواد ، وبعدها وضعت العينات في جهاز المضخم الحراري PCR Sprint Thermo cycler وشغل الجهاز وفق البرنامج الموضح في الجدول (9) هذه العملية استغرقت ساعة واحدة وخمس وعشرين دقيقة ، وبعد الإنتهاء منها أجريت عملية الترحيل الكهربائي بعد أن حُضّر هلام الاكاروز بخلط 1 غم مع 100مل من محلول TBE ثم سخن على الصفيحة الساخنة وبعد ان ترك ليبرد الى درجة حرارة 40-50مْ أضيف له صبغة Ethedium Bromide بمقدار 0.5µL وصب الخليط في قالب الترحيل ،وبعد ذلك أخذ 2µlمن الصبغة 5µl من Ladder وخلط الأثنان ثم وضعا في الحفرة الأولى لهلام الاكاروز وأخذ 9µlمن الـ DNA ووضع في الحفرة الثانية وهكذا لبقية العينات بعد ذلك مرر تيار كهربائي في قالب الترحيل وبعد60 دقيقة أجري الكشف عن الحزم الناتجة من عملية التضخيم بأستعمال جهازالأشعة فوق البنفسجية وتم تصويرها ، وأرسلت عينات الـDNA الى مركز psomagen في الولايات المتحدة لمعرفة تسلسل القواعد النيتروجينية للعينات وبعد ظهور النتائج أرسلت الى بنك الجينات NCBI وتم تسجيلها وعمل شجرة وراثية باستعمال برنامج MEGA لكل عينة لمعرفة مدى تطابقها مع العزلات المحفوظة في البنك.

جدول (7) يمثل مواد التضخيم المستخدمة في تقنية ال PCR

المواد المستخدمة	التركيز	الحجم
Go Taq Green Master Mix	-	12.5مايكرو ليتر
Primer Forward	10 p mole	1مايكرو ليتر
Primer Revers	10 p mole	1مايكرو ليتر
DNA template	20 ng	5مايكرو ليتر
Nuclease free water	-	5.5مايكرو ليتر
Mineral oil	-	25مايكرو ليتر
Total reaction volume	50 مايكرو ليتر	

جدول (8) تتابع القواعد النيتروجينية في البادئين ITS1 وITS4 المستخدمين في عملية التضخيم

Primer	Primer Sequences(5-3)	Length	Tm	Ta
ITS1	**F-5-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3**	19 base	62C°	57C°
ITS4	**R-5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3**	20 base	58C°	53C°

جدول (9) برنامج عملية ال PCR المستخدم في الدراسة الحالية

Sr. No.	Steps	Temperature	Time	No.of cycles
L	Denaturation1	94C°	5 min.	1
Ll	Denaturation2	94C°	30 Sec.	25
Lll	Annealing	56C°	45 Sec.	25
Lv	Extension	72C°	1 min.	25
V	Final Extension	72C°	7 min.	1

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Result & Discussion

4: النتائج والمناقشة

1-4: عزل وتشخيص فطريات التهاب الاذن الخارجية

Isolation and Identification of external otitis

تم خلال الدراسة الحالية جمع 115 عينة من المرضى المصابين بفطريات الأذن الخارجية في محافظة ميسان الذين راجعوا مستشفى الصدر التعليمي العام وبعض العيادات الخاصة والذي يعانون من التهابات الاذن الخارجية ، واعتمادا على التشخيص المظهري والجزيئي Phenotypic identification ، واختير 14 نوع لغرض التشخيص الجزيئي Molecular identification.

فقد شخصت الفطريات الخيطية بالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرة مثل لون وشكل وحواف المستعمرة والخصائص المجهرية كشكل التراكيب الأصبعية Phialids وجود الحوامل الكونيديا Conidiophores ، و شخصت الأنواع التابعة لجسن المبيضات *Candida* sp. بالأعتماد على الصفات المجهرية و الزرعية والأختبارات الكيموحيوية والالوان التي أنتجتها على وسط Candida chromogenic agar ، وبالاضافة إلى اختبار اخر لتميز بين انواع الخمائر المبيضات يتمثل بتكوين انبوب الانبات Germ tube خلال (2-3) ساعات ، إذ تم جمع 115عينة من اشخاص مصابين بداء الأذن ووجد منها 109عينة موجبة وبنسبة 94.8 % ، وتم عزل 112عزلة في هذه الدراسة 72 عزلة تعود للفطريات الخيطية و 40 عزلة تعود إلى اللخمائر المبيضات*Candida* sp. حيث كان جنس الـ*Aspergillus* spp. هو الأكثر انتشاراً في العينات الموجبة المعزولة وكما مبين في الجدول (4-1) إذ كان عدد العزلات المعزولة والتي تعود الى جنس الـ *Aspergillus* spp. (57) عزلة وبنسبة (50.9%) وكان النوع السائد والاكثر الانتشاراً لجنس *Aspergillus niger* على بقية الانواع 41 عزلة وبنسبة ظهور (35.7%) وتردد (36.6%)، بينما ظهر جنس *A.oryzae* اقل عدد من عزلات واقل نسبة ظهور بلغت (0.86%) وتردد(0.89%) (عزلة واحد). ، وبينما سجلت الفطريات الخيطية الأخرى(15)عزلة ، اذ أظهرت *Rhizops oryzae* 6 عزلات وبنسبة ظهور بلغت (5.2%) وتردد (5.4%) وعزلة واحدة بنسبة ظهور (0.86%) و بتردد 0.89 % لفطر*Alternaria alternate* وكما في الجدول الموضح (4-1).

أما جنس الخمائر المبيضات *Candida* sp. فسجل في هذه الدراسة 40 عزلة تعود الى 5 أنواع من جنس المبيضات فكان النوع السائد والاكثر ظهوراً و تردداً فيها هو خميرة *C.parapsilosis* حيث عزل 15عزلة بنسبة ظهور (13.04) وتردد (13.4%)، ، بينما اظهرت

خميرة *C.glabarata* و *C.dubliniensis* 3 عزلات لكل منهما وبنسبة ظهور بلغت (2.6%) وتردد (2.67%)،وكما في الجدول الموضح (4-1).

جدول (4-1): الانواع الفطرية المعزولة من الاشخاص المصابين بالتهابات الاذن الخارجية ونسبة ظهورها وترددها%

أسم الفطر	عدد العزلات	نسبة الظهور%	النسبةالتردد%
Aspergillus flavuas	13	11.3	11.6
A.niger	41	35.7	36.6
A.oryzae	1	0.86	0.89
A.terreus	2	1.7	1.8
Alternaria alternate	1	0.86	0.89
Cladosporium cladosporioides	4	3.4	3.5
Geotrichium candidium	2	1.7	1.8
Pencillium chrysogenum	2	1.7	1.8
Rhizopus oryzae	6	5.2	5.4
Candida albicans	12	10.4	10.7
C.glabarata	3	2.6	2.7
C.parapsilosis	15	13.04	13.4
C.tropicalis	7	6.08	6.25
C.dubliniensis	3	2.6	2.7
Total	112		%100

واستنادا الى ما توصلت اليها الدراسة الحالية الى وجود نتائج سالبة للزرع بعض العينات وقد يعزى ذلك الى عدة أسباب منها التشخيص السريري قد يكون غير دقيق او كمية العينة التي تم جمعها من الأشخاص المصابين قد تكون قليلة و غير كافية لإعطاء نتيجة موجبة او نوع الوسط الزرعي المستخدم (Milne, 1996) ، او بسبب تناول الأشخاص المصابين بفطريات الأذن أحدى المضادات الفطرية دون أخذ أستشارة الطبيب المختص (والتي تؤثر على نمو الفطريات بعد الزرع) وذلك لتخلص من الأعراض المؤلمة المصاحبة للأصابة بفطريات الأذن الخارجية (Collee *et al*., 1996).

وقد أظهرت نتائج الدراستنا الحالية حدوث التباين بين النتائج فقد وجدت هذه الحالة في العديد من الدراسات التي اجريت ضمن هذا المجال ، إذ وجد (Abbas, 2000) ، في دراسته التي قام بها ان 60 عينة كانت موجبة للزرع المختبري من أصل 125 عينة مشخصة سريرياً ، و يرجع سبب انخفاض النسبة في دراستنا الى اسباب عديدة منها مكان الذي جمعت منها العينات الدراسة والعوامل المناخية

لمنطقة الدراسة والاختلاف الثقافي للأشخاص المصابين وقد يرجع سبب ذلك ايضاً الى وقت جمع العينات وما يرافقها من تبدلات فصلية (Havlickova *et al.*, 2008)، وفي دراسة قام بها (Yang *et al.*,2021) ظهور125عزلة موجبة للزرع المختبري من اصل 459عينة مشخصة سريرياً.

وتعد الأنواع العائدة للجنسين الـ *Aspergillus pp* و *Candida* sp. انهما اكثر العزلات الفطرية المنتشرة والمسببة لفطار الأذن الخارجي في جميع انحاء العالم وهذا يتفق مع دراسات عديد منها دراسة **(**Hagiwara *et al*., 2019 ; Agarwal and Devi , 2017**)**.

وشار Ashop *et al*. (2020) في دراسته إن أنواع *Aspergillus* spp. وأنواع الـ *Candida* spp. هي من المسببات الامراض الفطرية الأكثر شيوعاً والمعزولة من قناة الأذن الخارجية وهذا مايتفق مع دراستنا .

وفي دراسة التي توصلت اليها (الخزعلي ،2021) إذ اكدت في دراستها إلى ظهور 75% من العينات الموجبة بالزرع المختبري على وسط الـSDA من المجموع الكلي للعينات ، أما نتائج الفحص المجهري فكانت النسبة 50% من العينات ، والتي تباينت هذه النتيجة مع ما توصل اليه (Ali *et al*., 2018) ، إذ لاحظ ان نسبة 10% من العينات كانت موجبة بالفحص المجهري المباشر ، أما نتائج الفحص المختبري بالزرع المختبري فوجد النسبة 83.61% ولهذا السبب يتم الأعتماد بشكل أساسي في نتائج الفحص المختبري على الوسط الزرعي .

واتفقت دراستنا الحالية مع ما ذكره (Allam *et al* ., 2020)، اذ وجد ان جنس الـ *Aspergillus* spp. هو السائد وبنسبة 52 % على بقية الاجناس من الخمائر المبيضات والفطريات الخيطية الاخرى ، وايضا ذكر (Gharaghani *et al* .,2020) من خلال دراسته عن التهاب الأذن الفطري في مدينة الاحواز في إيران سيادة جنس *Aspergillus* spp. وبنسبة 88.3% أما الخمائر المبيضات فكانت نسبتها 11.7%.

وذكر(Bojanovic *et al* ., 2022) عند دراسته لالتهاب الأذن الفطري المتسبب عن الفطريات الخيطية ان جنس *A.niger* العامل المسبب الرئيسي بنسبة 66.7% يليه *A.flavus* بنسبة 33% وهو متوافق مع دراستنا.

و تعود سيادة جنس الـ*Aspergillus* spp. على الخمائر المبيضات *Candida* sp. في بعض الحالات إلى امتلاك هذا النوع لأبواغ تكون موجودة في الهواء وتنتقل بأستمرار ويمكن انتشارها في كل البيئات (Gandhi *et al* ., 2016)، وكذلك يرجع الى ان *Aspergillus* spp. ومنها *A.niger*

انه يمتلك دوراً مميز ومهم في انتاج العديد من الانزيمات والفيتامينات وغيرها بالإضافة الى تأثيرها السلبي على صحة الانسان وذلك عن طريق انتاج السموم الفطرية او التسبب بالعدوى (Balajee *et al.*, 2009 ; D'hooge *et al.*, 2019).

وذكر Merad *et al.* (2021) ، ان خميرة *C.parapsilosis* اظهرت اكبر عدد للعزلات عند دراسة الاشخاص المصابين بالتهاب الاذن الخارجية الفطري ، وكذلك شار (Aboutalebian *et al.* 2019) ، في نتائجه ان خميرة *C.parapsilosis* شكلت اكثر الأنواع الخمائر المبيضات انتشاراً للاشخاص المصابين بالتهاب الأذن الخارجي الفطري ، حيث كان عدد العزلات 22 عزلة وبنسبة 22.7%.

في حين لا توافق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره (Aboutalebian *et al.*, 2021 ; Sangare *et al.*, 2021) ، اذ وجدوا سيادة النوع *C.albicans* وتتبعها خميرة *C.parapsilosis* وذلك عند عزلهم للفطريات الاذن من الاشخاص المصابين .

وبينت نتائج دراسة (Merad *et al.*, 2021) الى ان خميرة *C. parapsilosis* من اكثر الخمائر المبيضات ظهورا وتكراراً اذ يعزى سبب ذلك الى ان هذا النوع من الخمائر يمتلك عوامل ضراوة كالالتصاق وتكوين الأغشية الحيوية Biofilm وافراز الانزيمات بكونها عوامل ضراوة للخميرة التي لها دور في زيادة الامراضية).

واختلفت دراستنا الحالية مع ما ذكره (Pontes *et al* ., 2009) ، اذ وجد ان جنس *Candida* sp. هو المسبب الرئيسي للإصابة وكان عدد العينات الموجبة 9 عينات من مجموع 20 عينة وبنسبة 45% ، اما جنس *Aspergillus* spp. فكانت عدد العينات الموجبة 6 بنسبة 30% توزعت بين 4 عينات للنوع *A.niger* بنسبة 20% عينتان للنوع *A. flavus* بنسبة 10%.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية عن وجود أصابات مشتركة بين جنسي *Candida* sp. و*Aspergillus* spp. بواقع 2 عينات وبنسبة 1.7 % ، وفي دراسة (Tasic –Otasevic *et al.*, 2020)، إذ لاحظوا ان نسبة الأصابة المشتركة بين جنسي *Candida* sp. و*Aspergillus* spp. وصلت الى 5.5% لمرضى المصابين بالتهاب الأذن الخارجية الفطري في صربيا وذكر ايضاً (Aboutalebian *et al* ., 2019) في دراسته ان نسبة الأصابة المشتركة بين جنسي *Candida* sp. و *Aspergillus* spp. 11 أصابة بنسبة 13.6% عند دراستهم لمرضى مصابين بالتهاب الأذن الخارجي في مدينة اصفهان في إيران.

2-4: الأصابة بالفطريات الأذن الخارجية حسب الجنس والعمر

من خلال الدراسة الحالية وجد 109عينة موجبة 49 عينة للذكور و 60 عينة للأناث ، فيلاحظ إن نسبة الأناث المصابات اكثر من نسبة الذكور إذ وجد أعلى نسبة للأناث المصابات بفطريات الأذن الخارجية تقع ضمن فئة عمرية بين (21-30) سنة وبنسبة (33.02%) ، أما في الذكور فوجد أعلى نسبة تقع ضمن الفئة العمرية (31-40) سنة وبنسبة (15.6%)، والموضح بالجدول (4-2).

كذلك بينت النتائج الدراسة الحالية إن الفئة العمرية (21-30) سنة هي اكثر عرضة للأصابة بفطريات الأذن الخارجية وبنسبة (33.02%) ، تليها الفئة العمرية (31-40) سنة وبنسبة (15.6%) ، وكانت الفئة العمرية (11-20) سنة اقل عرضة للإصابة وبنسبة (2.8%) وكما مبين في الجدول (4-2). وهذه تتفق مع الدراسات عديدة منها دراسة التي اجريت في الهند حيث تشير الى ارتفاع معدل الأصابة بفطريات الأذن بين الفئة العمرية (21-30) سنة (Gokale *et al* ., 2013 ; Satish *et al*., 2013 ; Prasad *et al*., 2014)

ويعود سبب زيادة نسبة الأصابة بالفئة العمرية (21-30) سنة إلى أن الاشخاص من الفئات العمرية هذه يقضون وقتاً اطول في الخارج ويكونون اكثر عرضةً للهواء والغبار الذي يحتوي على جراثيم من الفطريات المنتشرة محلياً أو بسبب ظروف عملهم (Kaur *et al*., 2000).

جدول (4-2)النسب المئوية للفئات العمرية للأشخاص المصابين بفطريات الاذن الخارجية

الفئة العمرية	الجنس		المجموع	النسبة المئوية %		المجموع
	ذكر	انثى		ذكر	انثى	
1 -10سنة	3	7	10	2.7	6.4	9.1
20-11	1	2	3	0.9	1.8	2.8
30 -21	12	24	36	11.009	22.01	33.02
40-31	13	4	17	11.9	3.7	15.6
50-41	5	7	12	4.6	6.4	11.009
60-51	6	5	11	5.5	4.6	10.1
70-61	5	4	9	4.5	3.7	8.2
80-71	4	7	11	3.7	6.4	10.1
المجموع	49	60	109			%100

يتضح من النتائج التي حصل عليها أثناء الدراسة الحالية بأن هناك أختلاف في نسبة الأصابة بفطريات الأذن الخارجية بين الأناث والذكور، وقد ظهرت النتائج زيادة في نسبة اصابة الأناث مقارنةً

بالذكور اذ بلغ عدد الأصابات في الأناث 60 عينة وبنسبة (55.04%) بينما أصابات الذكور بلغت 49عينة وبنسبة (44.9%)، ويرجع سبب أرتفاع نسبة الأصابة في الأناث الى طبيعة عمل الأناث في المنزل طوال اليوم وهذا يجعلها اكثر عرضةً للأصابة بفطريات الأذن وذلك نتيجة أنتشار الفطريات وأبواغها في كل ارجاء وزوايا المنزل ، أو يعود ذلك الى ارتداء الأناث غطاء الرأس الذي يؤفر الحرارة والظلام والبيئة الرطبة وهي عوامل مشجعة لنمو الفطريات ، او يعود سبب ذلك الى عمل الاناث في جو مليئ بالغبار والدخان أو تغيرات هرمونية (Desai *et al*., 2010 ; Aneja *et al*., 2012 ; Kazem *et al*., 2015).

وبالمقارنة مع دراسات اخرى حيث تكون نسبة الاصابة اكثر لدى الرجال في دول كأسبانيا ومصر وباكستان (Abdelazeem *et al*., 2015 ; Anwar and Gohar, 2014). في حين لا تتفق نتائج دراستنا مع ما ذكره (Ahuja, 2017) إذ وجدوا نسبة الأصابة في الذكور أعلى من الأناث بنسبة 51% و 4% على التوالي .

وفي حالة اخرى سجل بعض الباحثين عدد من الأصابات بفطريات الأذن أعلى لدى الاناث (Golshiri *et al*., 2017 ; Kiakojuri *et al*., 2016 ; Jia *et al*., 2012)

وهذه النتائج الحالية تتفق مع دراسات عديدة منها دراسة (Mofatteh *et al*., 2018 ; Tasić-Otašević *et al*., 2020 ; محمد ،2020) ، ذكروا إن نسبة اصابة الاناث اعلى من الذكور .

ظهرت النتائج التي تم الحصول عليها وجود اختلافات في نسبة الأصابة بالفطريات الأذن الخارجية بإختلاف الفئات العمرية فقد وجد أعلى نسبة للأصابة في هذه الدراسة تقع ضمن الفئة العمرية (21-30) سنة وبالمقارنة مع دراسات أخرى منها دراسة Panchal *et al*. (2013) و(Nazeer *et al*. (2015 و دراسة Ray *et al*. (2015).

في جميع مرضى فطريات التهابات الأذن الخارجية ، كانت الأعراض او الشكاوى الأكثر شيوعاً هي الحكة (71مريضاً) وبنسبة (65.13%) إذ يكون بسبب التفاعل المناعي وتليها الم الأذن (30مريضاً) وبنسبة (27.5%) الذي يعزى إلى غزو طبقات الجلد وتنشيط مستقبلات الأذن ، بينما سجل ضعف الاذن(5) وبنسبة (4.6%)، في حين الحد الادنى للشكوى كان لطنين الأذن (3 مريضاً) بنسبة (2.8%) وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (Pontes *et al*., 2009 ; Gupta and Mahajan, 2015 ; Sangavi *et al*., 2018) .

وكذلك تتفق مع دراسة (Jia *et al.*, 2012) إذ ذكر أن الأعراض الاكثر شيوعاً هي الحكة والتي تعد احد اهم العوامل الخطرة لداء فطار الأذن الخارجي وبنسبة (57.41%) في حين كان الحد الأدنى لشكوى طنين الأذن بنسبة (11.11%).

جدول (4-3) النسب المئوية الاعراض او الشكاوى الاشخاص المصابين بفطريات الاذن

الاعراض	العدد	النسبة %
الحكة	71	%65.13
الم الاذن	30	%27.5
ضعف السمع	5	%4.6
طنين الاذن	3	%2.8

ومن بين 109 مصاب بداء الأذن الفطري بلغ عدد الأشخاص في سكان الحضر (92) و بنسبة 84. (4%) من مرضى سكان الحضر مقارنة بسكان الريف 17 مريضاً بنسبة (15.6%) ، في هذه الدراسة وكانت الأناث في سكان الحضر اكثر تأثراً مقارنة بالذكور كما موضح في الجدول (4-4)، وقد يرتبط انتشار عدوى الأذن الفطري هذا بعوامل عديدة منها نمط الحياة وحالة النظافة والمنطقة الدراسة التي جمعت منها العينات (التوزيع الجغرافي) والظروف المناخية للمنطقة (حرارة ورطوبة) والكثافة السكانية (Nipa *et al.*, 2020).

وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه دراسة (Ashopa *et al* ., 2020)، إذ وجد (117مريضاً) بنسبة 78% من سكان الحضر مقارنة بسكان الريف (33مريضاً) بنسبة 22%.

في حين لا يتفق مع نتائج الدراسة (Mahdavi *et al* ., 2015)، حيث كان سكان الريف اكثر تأثيراً من سكان الحضر وبنسبة (17.19%).

جدول (4-4) النسب المئوية للتوزيع الجغرافي للحالات

	سكان الحضر	%	سكان الريف	%	Total
ذكر	42	38.5	5	4.5	47
إناث	50	45.8	12	11.01	62
Total	92	84.3	17	15.6	109

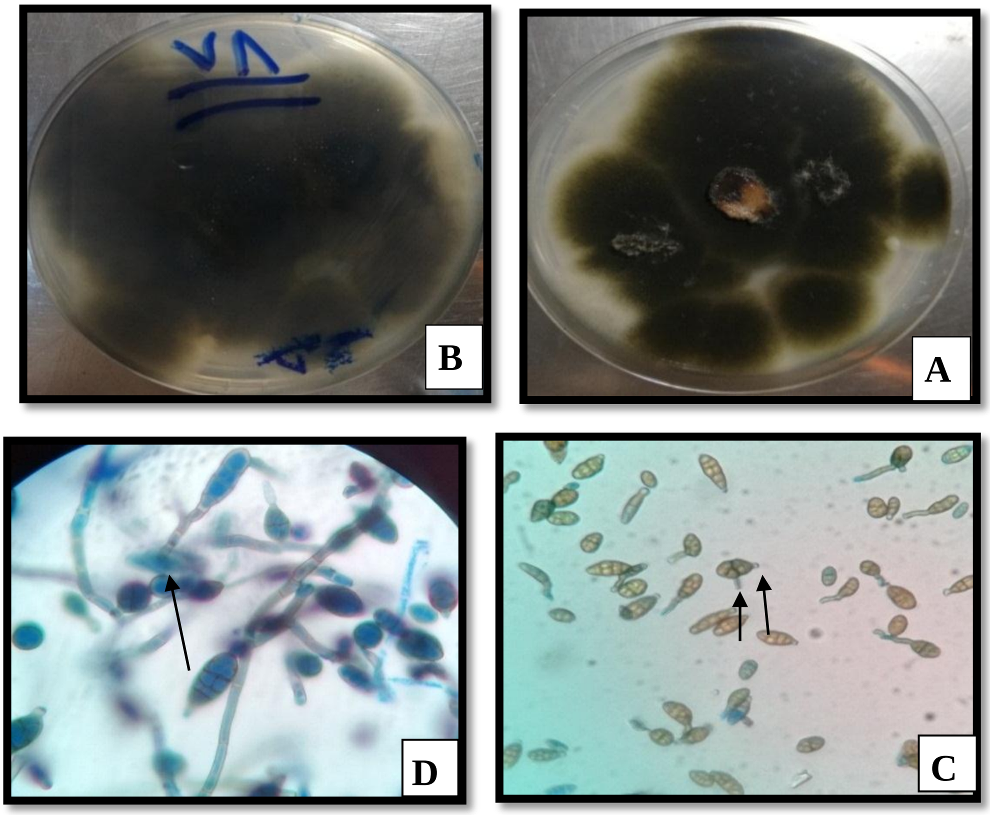
3-4: تصنيف فطريات الاذن الخارجية Classification of otomycosis

1-*Alternaria alternate* (Fr.) Keissler., Beihefter Zum Botanischen Centtralbatt 29:433(1912).

تنمو المستعمرات خلال 5-7 ايام ، بنية اللون ، صوفية ، مسطحة ، حوافها منتظمة الخيوط الفطرية Hyphae مقسمة ، ذات اللون البني ، سمكها يتراوح بين 2.5-5 مايكرون ، الحامل الكونيدي Conidiophore قائم ، ذات لون بني الشاحب ، بسيط او متفرع ، مقسم ، أبعاده 80-3-5×70 مايكرون ، يحمل في نهايته سلسلة مكونة من 2-6 كونيدات ، الفتية منها تكون في طرف السلسلة البعيد عن الحامل ، الكونيدات ذات لون بني داكن ، هراوية الشكل ، أبعادها -5.5×16-28 14.5 مايكرون ، نهايتها العليا ضيقة وحاوية على عنق Beak قصير، وبعضها تكون انبوب انبات GermTube ، تحتوي على حواجز طولية عددها من 1-2 وعرضية عددها 3-4 ، ويتميز هذا النوع بوجود Chlamydospore ، خلاياه شفافة ، كروية الشكل ، قطرها 8.5 -4.5 مايكرون.

يطابق هذا الوصف مع ماتم وصفه من قبل Keissler(1912) ويتميزهذا النوع عن الأنواع الاخرى كونيداتة اكثرعدداً واصغر حجماً والحواجز العرضية والطولية أقل ، قد وجد بأن هناك تقارب واضح جدا وكبير بين هذا النوع *A.citri* ، لكنه عند استعمال المجهر الماسح لوحظ بأن هناك فرق في زخرفة جدار كونيدات كل نوع ، وكان جدار*A.citri* اكثر خشونة (عبدالله ، 2015).

شكل (1-4). رقم الشريحة (2) ، تأريخ الجمع 3-2-2023



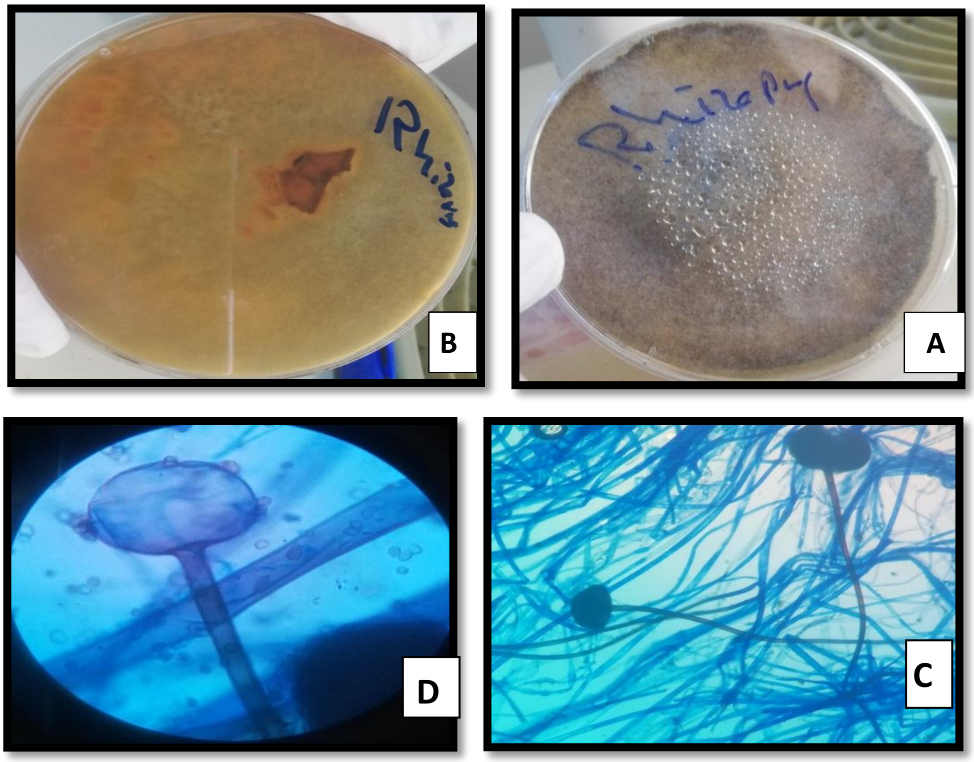
الشكل (1-4) ***Alternaria alternate***، A: المستعمرات على وسط SDA، B: الجهة الخلفية للمستعمرة، C: الكونيدات ،D: كلاميدوسبور **(40X)**

2-Rhizopus oryzae Went and Prnisen Geerligs,in Verh.k. Akad. We tweed sect., 4(2): 16 (1895).

مستعمرات تنمو بسرعة ، وتملأ الطبق خلال 3ايام ، رمادية اللون ، صوفية ، الخيوط الفطرية تكون شفافة وغير مقسمة ، وسمكها يتراوح من 4.5-10 مايكرون ، حامل الحافظة البوغية قائم ذات لون رمادي داكن ، غير مقسم وغير متفرع ، يرتبط كل حامل مع الاخر عن طريق امتدادات stolon طوله اكثر من 1500مايكرون ، ويتراوح سمكه من 14-20 مايكرون ، يحمل في نهايتة تركيب يدعى الحافظة البوغية لونها رمادي ، ذات الشكل الكروي ، قطرها 75-150 مايكرون ، تحمل بداخلها أبواغ حافظية كروية ، رمادية شاحبة ، ذات الجدران ناعمة ، احادية الخلية ، قطرها يتراوح 4.5-10 مايكرون ، يفصل الحامل عن الحافظة البوغية تركيب ذو لون بني يدعى العويمد ، عند النضج يندفع العويمد داخل الحافظة ومن ثم يؤدي الى تمزقها وتحرير الاسبورات للخارج وتوجد عند منطقة التقاءالمدادات معالحامل تركيب اشباه الجذورRhizoids الذي يقع اسفل الحامل مباشرةً.

يطابق الوصف السابق مع ماتم وصفه من قبل(Went and Prnisen (1895، ويمكن تميزه عن جنس *Mucor* بوجود Rhizoid فيه ، وعن Lichtheimia بكون Rhizoid ينشأ من نقطة مقابل الحامل ، هذا النوع يشبه الى حداً ما النوع *R.*stolonife لكنه يتميز عنه بصغر كلا من الحافظة البوغية والابواغ (Schipper and Stalpers, 1984).

الشكل (4-2) رقم الشريحة(5) ، تأريخ الجمع1-12-2022



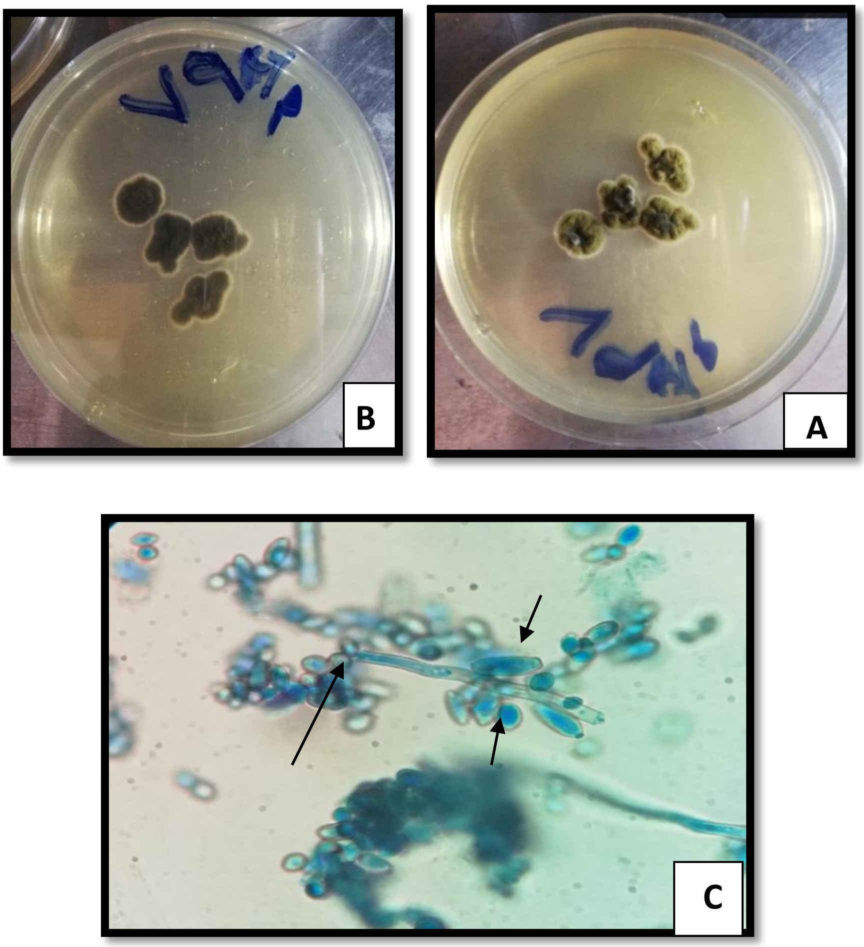
الشكل (4-2) *R.oryzae* A : المستعمرات على وسط SDA،B: الجهة الخلفية للمستعمرة C،D:الخيوط الفطرية والكونيدات (40X).

3-*Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A.De vries ,contr. Know.Of the genus *Cladosporium*: 57:(1952).

المستعمرات تنمو ببطىء 7-10ايام ، زيتونية الى الخظراء اللون ، مسطحة ، قطنية ، حوافها غير منتظمة ، الخيوط الفطرية مقسمة ، ذات لون اخضر فاتح ، سمكها 1.5-3 مايكرون ، الحامل الكونيدي قائم ، لونه اخضر فاتح ومتفرع الى 2-3 فرع ، مقسم بعدد من الحواجز ، أبعاده من 99-200×4-2.5 مايكرون ، وكل فرع أبعاده 1.5- 2.5×8-20 مايكرون ، يحمل خلايا Shiled cell ، الكونيدات محمولة على تراكيب تسمى الذنيبات Sterigmata في سلسلة مكونة من اكثر من 10 كونيدات ، الكونيدات بيضوية الشكل ، ذات لون اخضر داكن ، وابعادها تتراوح بين 2.5 -6.5×-3 1.5مايكرون.

تتطابق صفات هذه العزلة مع ماذكره DeVries (1952) قد وصف جنس هذا النوع أولاً على انه Penicilliumعام 1880 من قبل Fresenius ، ولكن بعد ذلك تم نقله الى جنس *Cladosporium* ، والذي يتميز بأن كونيداته صغيرة الحجم ، وكثيرة العدد ، ومتكيفة للانتقال وهذا ساعده على الانتشار(Park *et al*., 2004) ، حاليا تم استخدام الطرق الجزيئية للتمييز بين أنواع هذا الجنس(Bensch *et al*., 2012).

الشكل(3-4).رقم الشريحة (7) ، تاريخ الجمع 12-3-2023



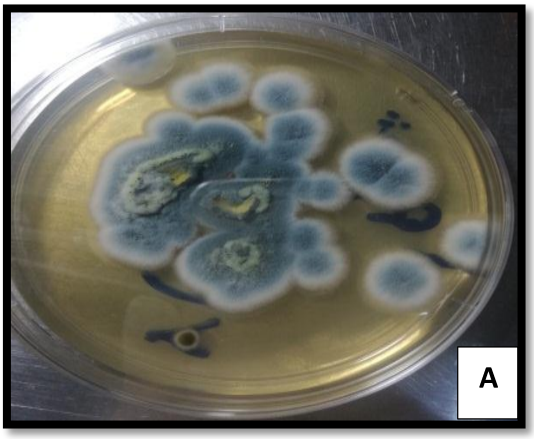
شكل (3-4) *Cladosporium cladosporioides* **A:** المستعمرات على وسط SDA، B:الجهة الخلفية للمستعمرة ،C: خلايا Shield والكونيدات و الحامل الكونيدي.40X .

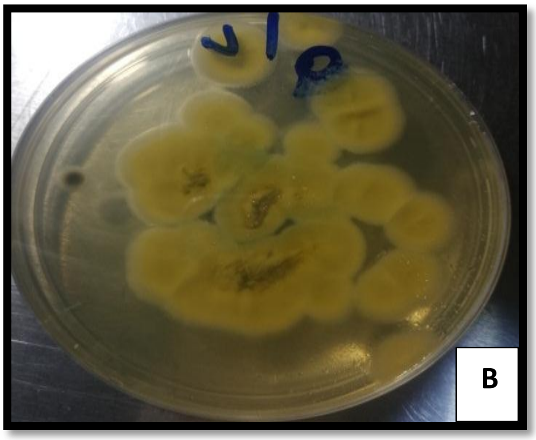
4- *Penicillium chrysogenum* Thom var. *brevisterigma* Forster - Brit. Pat. 691: 242.1953.

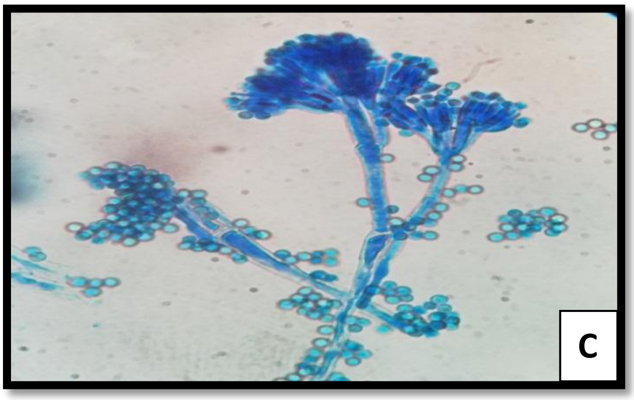
المستعمرات ذات لون أخضرمزرق ، مخملية او ناعمة ، وغالبا ماتكون غشائية ، الجانب العكسي للمستعمرات ذات لون اصفر تنمو المستعمرات ببطأ خلال 10 ايام ، عند درجة حرارة 25 م ْ، حيث يصل قطر المستعمرة 4-5سم ، الخيوط الفطرية مقسمة وقطرها (1-4.5) مايكرومتر ، الحامل

الكونيدي متفرع أو غير متفرع منفرد ومنتصب التي له فروع ثانوية تعرف بـ metulae ، وعلى الـ metulae تترتب الفاليدات ، قارورية الشكل ، تتراوح (7-4 الى 2-10) تحمل سلاسل غير متفرعة من الكونيدات ، كروية او بيضوية او مستديرة الشكل ، لون الكونيدات أخضر ، ذات جدران خشنة ، قطرها (2-4.5 مايكرومتر) تشكل البنية باكملها مظهر Pencillus المميز .

الشكل (4-4)، رقم الشريحة (9)، تأريخ الجمع 8-3-2023





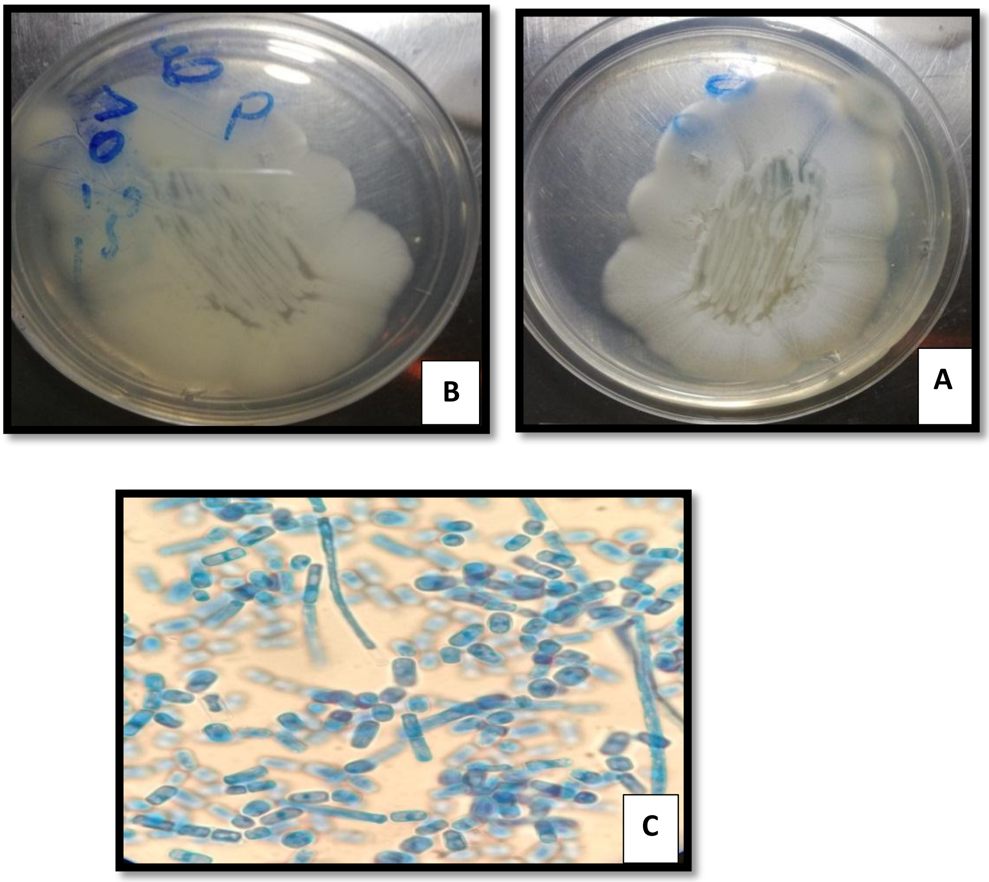


الشكل (4-4): *penicillium chrysogenum* A: المستعمرات على وسط SDA، B: الجهة الخلفية للمستعمرة، C: الحامل الكونيدي والكونيدات (X 100)

5- Geotrichium candidum Link de Hoog and M.Th.Smith, (2004,2011a,2011b,2011c).

المستعمرات بيضاء الى كريمية اللون ، مسطحة ، سريعة النمو ، جافة ، تشبه الخميرة لانها تظهر شكلاً ثنائي الشكل تفتقر الى الحامل الكونيدي ، الكونيدات ابعادها (5-2.5×10-5.5) مايكرون، تتكشف بطريقة مفصلية طرفية او وسطية ، الخيوط الفطرية شفافة ، مقسمة بحواجز ، متفرعة ، اسطوانية او برميلية الشكل وسرعان ما تتحول الى arthrospores ، وحيدة الخلية ، البوغ الكلاميدي ابعاده (4.3-6.1) مايكرون ، مفرد ، تتولد على ذنيبات على الغزل الفطري.

الشكل (4-5) رقم الشريحة (8) ، تأريخ الجمع 7-5-2023



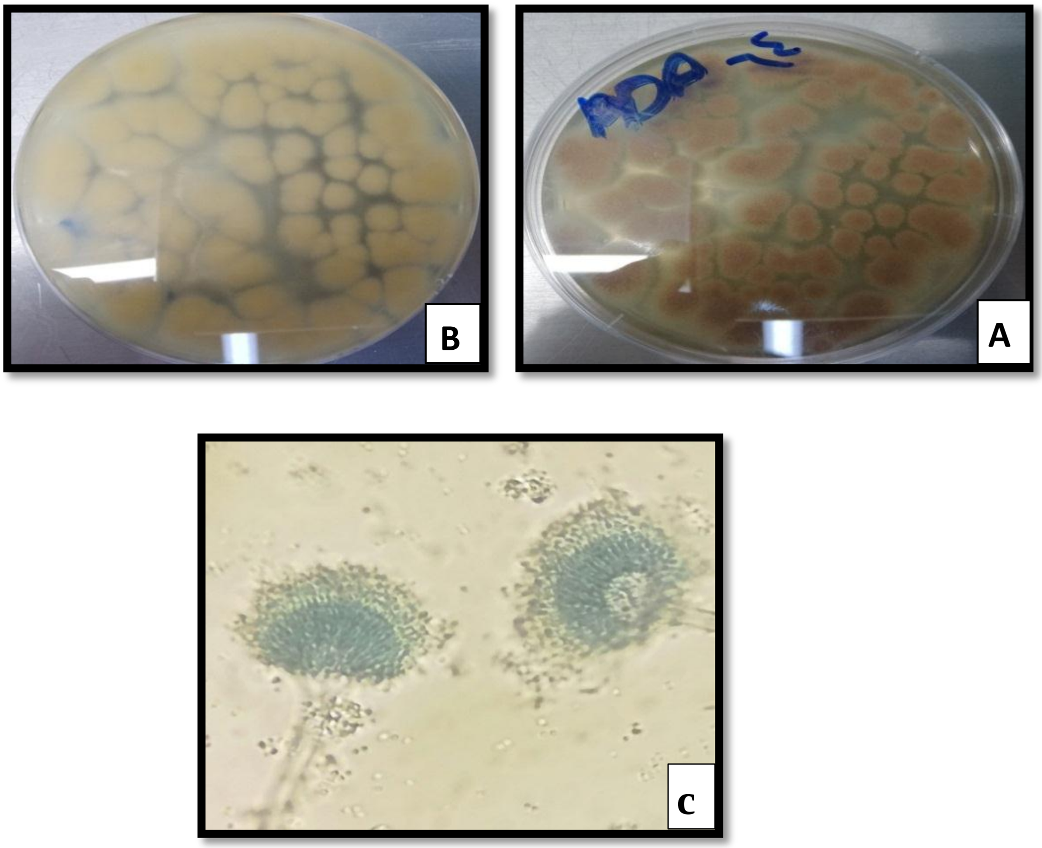
الشكل (4-5): *Geotrichium candidum*. A: المستعمرات على وسط SDA ،B: الجهة الخلفية للمستعمرة،C:الخيوطالفطرية و الكونيدات .40X.

هذا الوصف مطابق لما تم وصفه من قبل de Hoog and Smith. (2011) ، ويمكن تميزه عن جنس *Trichosporon* بعدم احتواه على balstoconidia والتي عادة ماينتجه جنس *Trichosporon*.

6-*Aspergillus terreus* var. aureus Thom & Raper A manual of the Aspergilli:198 (1945).

المستعمرات ذات لون بنية أو بنية كريمي ، مستوية ، ذات ملمس مخملي كثيف او بودري ، سريعة النمو ، الخيوط الفطرية مقسمة ، الحامل الكونيدي ناعمة وقصيرة نسبياً ، وعديمة اللون ابعاده (100-240) مايكرون ، الحويصلات صغيرة نسبياً بقطر 10-20 مايكرون ، ذات شكل يشبه القبة ، phialides ثنائية (صفين) ، (4.5-7.5) مايكرون يشكلان فقط على النصف العلوي من الحويصلة ، الكونيدات أبعادها (1- 2.5) مايكرون ، بيضاوية ، ملساء في سلسلة طويلة .

الشكل (4-6) رقم الشريحة (9)، تأريخ الجمع 8-4-2023

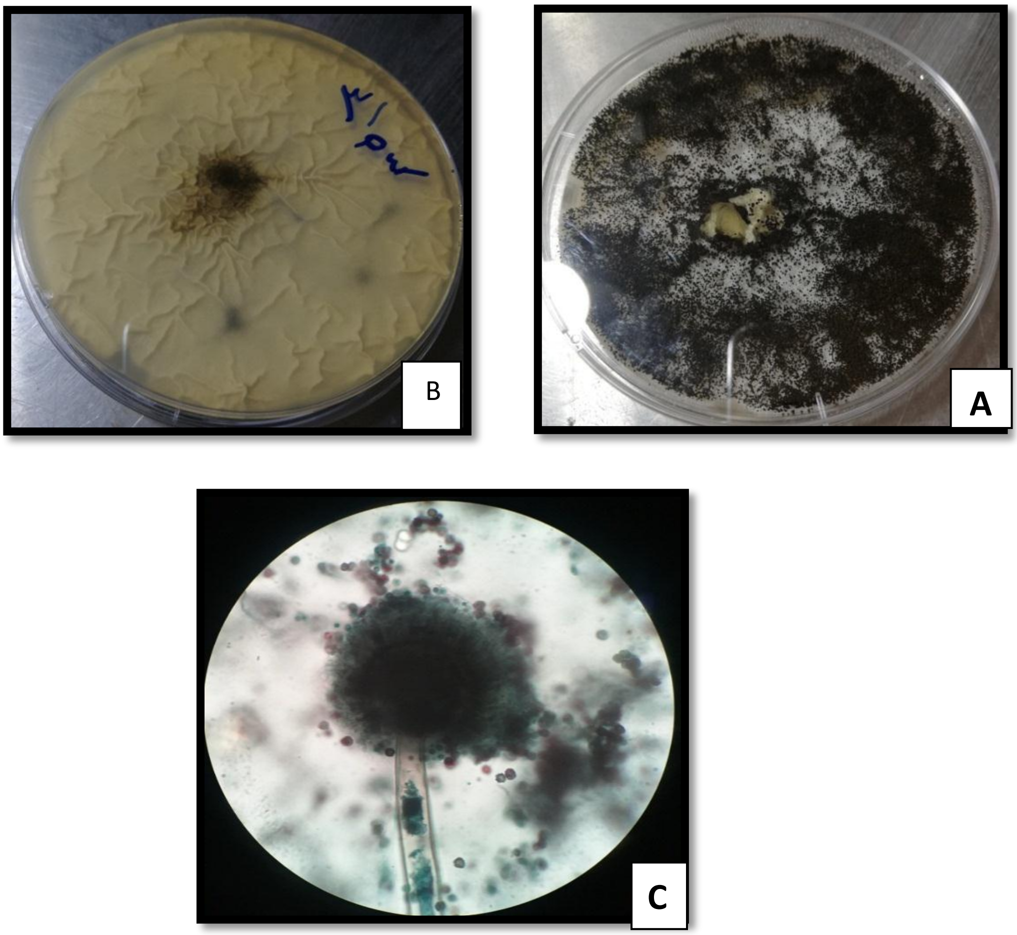


الشكل (4-6) *A.terreus* :A المستعمرات على وسط SDA، B : الجهة الخلفية للمستعمرة، C: الكونيدات والحامل الكونيدي والحويصلة (40X) .

هذا الوصف مطابق لما ذكره (Thom & Raper, 1945)، ويتميز هذا النوع بأن الكونيدات تظهر بشكل بيضوي او اهليجي ملساء في سلسلة طويلة وهي صفة فريدة يتميز بها هذا النوع A.terreus ، والـ conidiophores يكون قصير(Hashim, 2007).

7 -*A*spergillus *niger* Tiegh. Ann.Sci. Nat. Bot. 8: 240(1867)

المستعمرات سريعة النمو ، ذات اللون الابيض والتي سرعان ما تتحول الى صفراء ، والتي تحمل كونيدات سوداء اللون ، تتميز رؤوس الكونيدات بكبر حجمها ، لونها الأسود ، كروية ، الخيوط الفطرية مقسمة ، الحوامل الكونيدية طويلة ، بني أوعديم اللون ، ذات جدران ناعمة ، أبعادها (-10 13.5µ ×730µ) ، والكونيدات عنقودية الشكل أبعادها (phialides 5-2.5µ) ثنائية (صفين) وتتراوح (4.5- 12.5) ، الحويصلة كروية الشكل ، تتراوح بين(55.5-74.4µ).الشكل (4-7) رقم الشريحة (9) ، تأريخ الجمع 23-12-2022



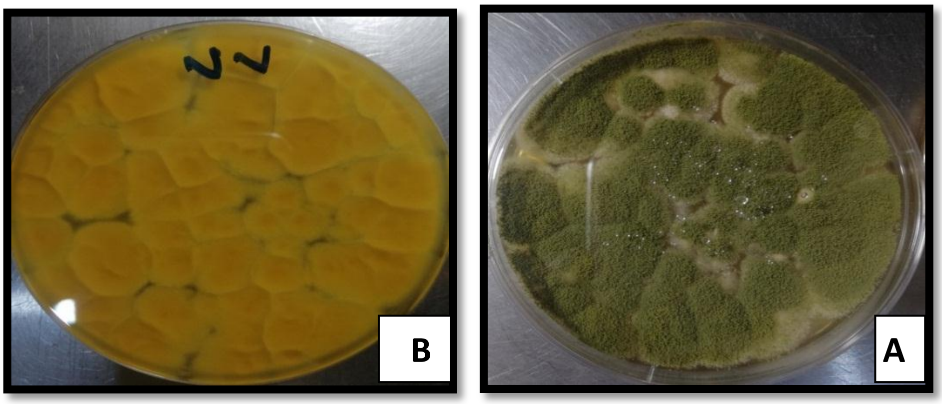
الشكل (7-4) A: *A.niger* المستعمرات على وسط PDA ، B: الجهة الخلفية للمستعمرة ، C : الحويصلة والكونيدات والحامل الكونيدي(**40X**)

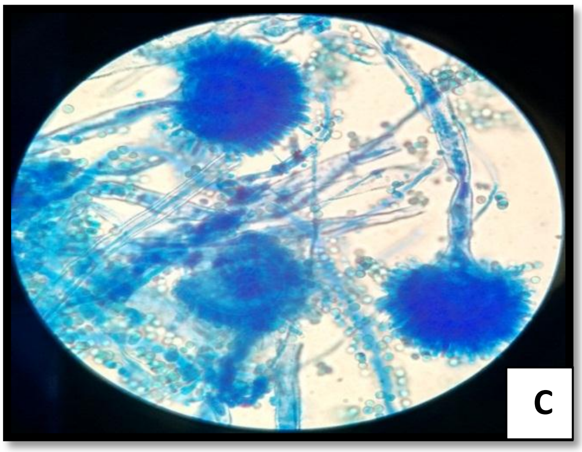
وهذا الوصف مطابق مع (Raper and Fennell ,1965; Watanaabe *et al* ., 1986a) والتي عادةً ما تظهر المستعمرات على الاوساط الزرعية الصلبة سوداء بشكل متجانس ، وتظهر الفياليدات ثنائية الصف تغطي الحويصلة بالكامل وتشكل رأس شعاعي .

8-Aspergillus oryzae (Ahlburg) Cohn 1884.

المستعمرات ذات لون اصفر مخضر ، ويستغرق نموها 5-7 ايام وفي درجة حرارة 25مْ ، الحامل البوغي ينمو بصورة عمودية ، عديم اللون ، ذات جدران ملساء ، يتراوح قطرها بين 3.5 -4.5 مايكرون ، الحويصلات ذات شكل كروي متفرع ، الـ phialides التي تكون قارورية الشكل ، التي تكون احادية الصف Uniserate في بادىء الامر ، ولكن تصبح ثنائية الصف Biseriate بتقدم العمر، الأبواغ بيضوية او كروية الشكل ، ذات جدران ملساء ، ذات لون ابيض ، ولكن تصبح بنية إلى خظراء اللون عند تقدمها بالعمر، أبعادها (4-6.5×4-8.5) مايكرون. يتفق هذا مع ماتوصل اليه (Hedayati *et al* ., 2007).

الشكل (4-8) رقم الشريحة 2 ، تاريخ الجمع 18-1-2022

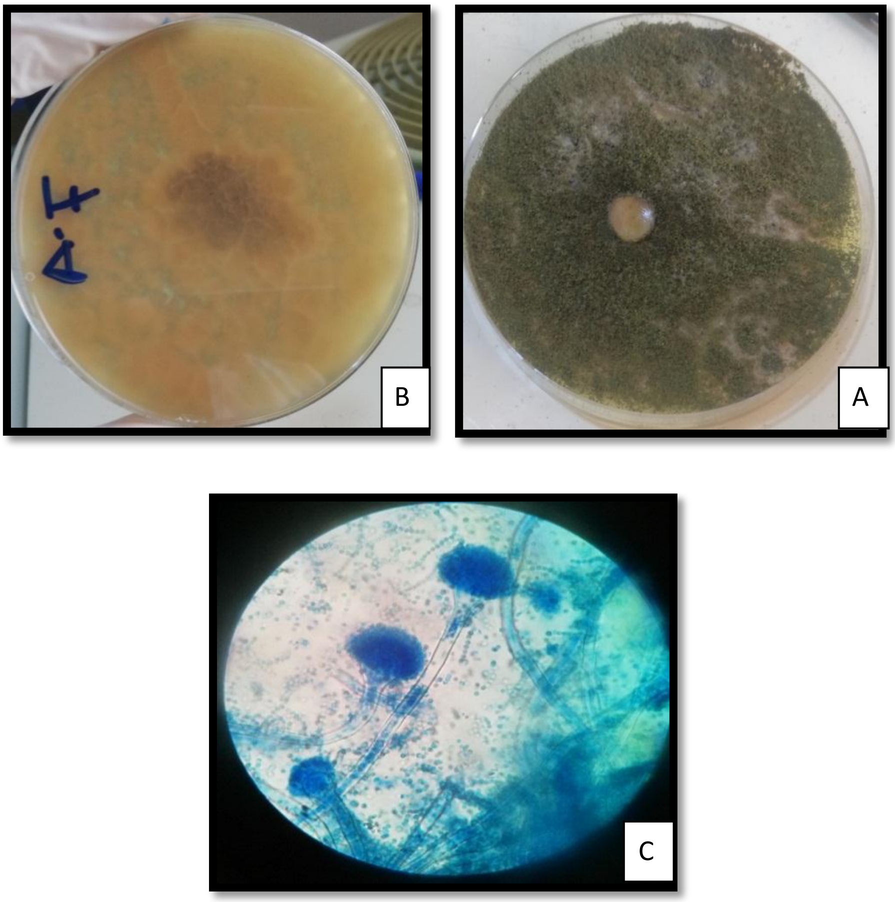




الشكل (4-8) A.oryzae ‏،A: المستعمرات على وسط SDA ، B:الجهة الخلفية للمستعمرة ،C:الكونيدات والحامل الكونيدي و الحويصلات والخيوط الفطرية(40x)

9-*A.flavus* Link Mag. Ges. Naturf. Freunde Berlin 3 (1): 16 (1809)

تمتاز المستعمرات بكونها حبيبية ومسطحة ، ذات لون اصفر لكن عند تقدم العمر تظهر بالون أصفر مخضر ، اما الجهة الخلفية للمستعمرة تظهر بالون الأصفر باهت ، الحوامل الكونيدي تكون مقسمة ، ذات جدران متخنة ، ابعاده (100- 400مايكرون)، الحويصلات كروية الشكل ، تغطي التراكيب القارورية سطحها بالكامل ، أبعادها (15-40) مايكرون يلاحظ وجود صف واحد من التراكيب القارورية في الحويصلات حديثة التكوين ، يتضاعف عند التقدم بالعمر ، الكونيدات كروية الشكل ، رقيقة الجدران نسبياً ، تتراوح بين (2.5-5.5) مايكرون وتكون الذنيبات مرتبة وبشكل سلاسل . الشكل (4-9) رقم الشريحة (15) ،تأريخ الجمع 17-12-2022



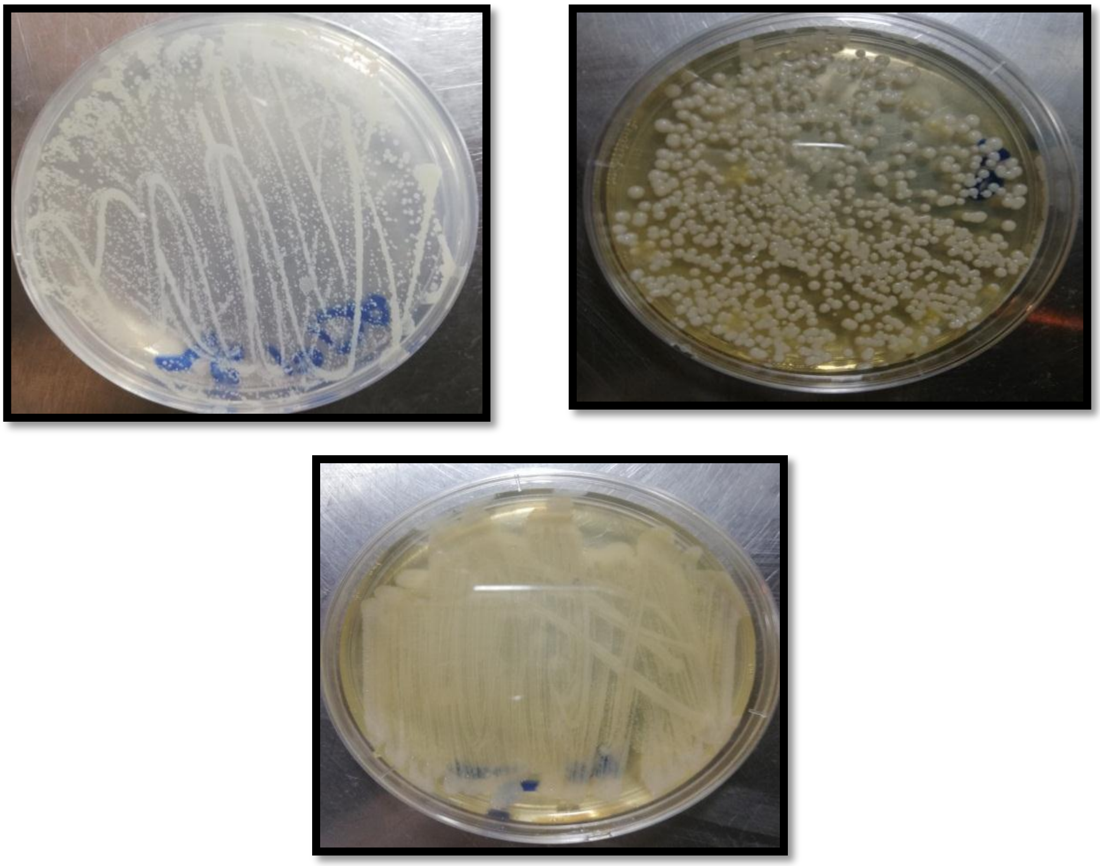
الشكل (4-9): *A.flavus* ، A: المستعمرات على وسط SDA ، B : الجهة الخلفية للمستعمرة ، C:الحامل الكونيدي والكونيدات والحويصلة والخيوط الفطرية (40x).

صفات هذه العزلة تتفق مع ما ذكره (Hedayati *et al*., 2007 ; Ellis *et al* ., 2007)، والذي يمكن تميزه عن الفطريات الاخرى من خلال مستعمراته المنتشرة ذات اللون الاصفر والاخضر و الحوامل الكونيدية ذات الجدران الخشنة والحويصلات الناضجة تحمل الفياليدات على سطحها بالكامل وتشكل الكونيدات بشكل واضح .

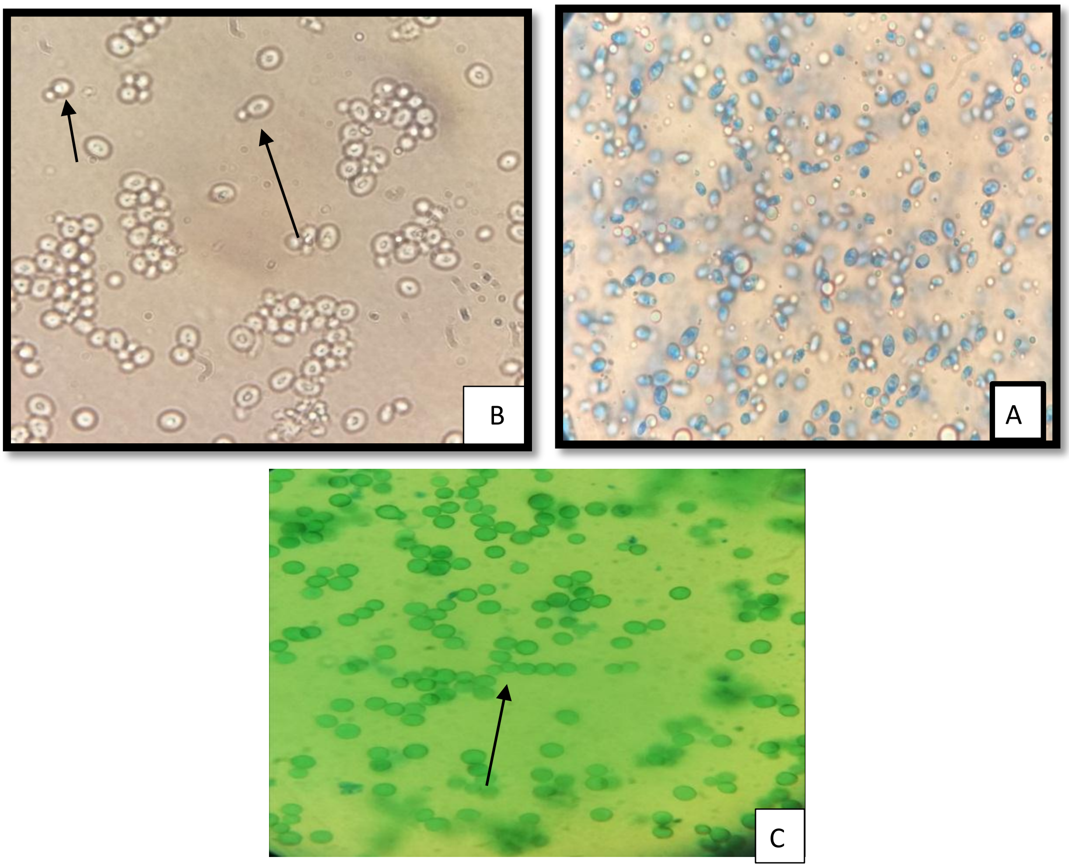
4-4:تشخيص المبيضات المعزولة مظهرياً بالزرع المختبري وبالفحص المجهري

تم عزل أنواع عديدة من مرضى يعانون من التهابات الأذن الخارجية الفطري Otomycosis التابعة لجنس الـ *Candida* sp. وخلال هذه الدراسة وبالأعتماد على الصفات الزرعية والمجهرية كما في الشكلين (4-10) و(4-11) ، وشخصت المبيضات بعد نموها على وسط SDA مع الكلورامفينيكول بدرجة 25 مْ لمدة 24-48 ساعة ، حيث أظهرت العزلات النامية على هذا الوسط ، بشكل مستعمرات ، براقة بيضاء إلى كريميه ، دائرية محدبة ، ملساء ذات قوام زبدي وهذا يتفق مع صفات الخمائر التي تم وصفها من قبل(Zafar *et al*., 2017) ، وأظهرت تحت المجهر بعد تصبيغها بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء بأشكال كروية الى بيضوية مفردة أو متبرعمه أو اسطوانية

متطاولة ، كما يلاحظ أحيانا وجود التراكيب التكاثرية الخضرية وغزل فطري كاذب لبعض العزلات كما موضح بالشكل (4-11) وهذه الصفات هي التي وصفت بهاالخمائر من قبل (kurtzman *et al.*, 2011) .



شكل (4-10) ، مستعمرات خميرة نامية على وسط SDA



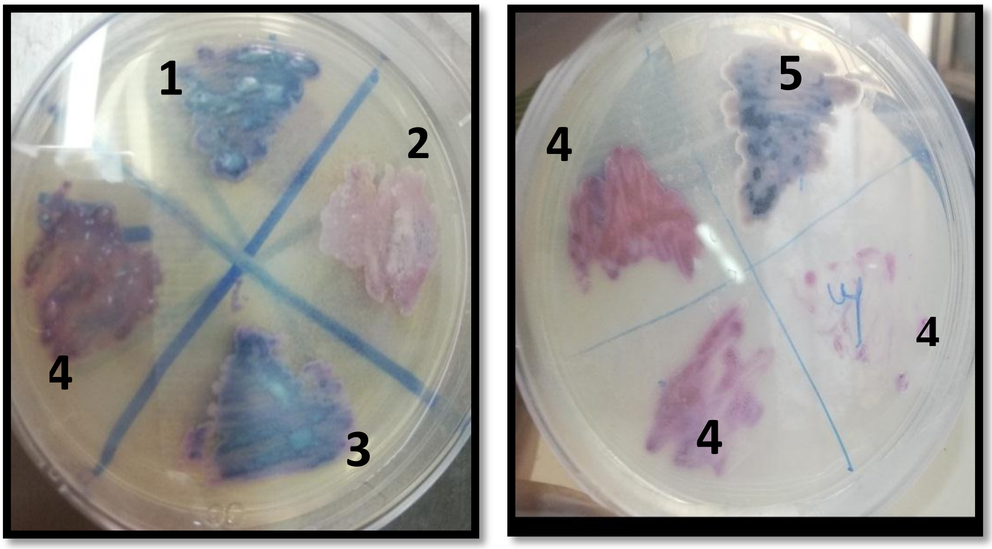
شكل(4 -11):(A) *C.albicans* تحت المجهر قوة تكبير 100x،(B): تبرعم الخلايا ، (C): الخيوط الكاذبة 100x

4-5: الأختبارات التشخيصية لتحديد أنواع المبيضات

4-5 -1: أختبار النمو على وسط Chrome agar *Candida*

يعد هذا الأختبار من الأختبارات الكيميوحيوية السريعة والفعالة في تشخيص انواع المبيضات ، بدلالة اللون وبعد زراعت هذه العزلات على هذا الوسط وحضنها عند درجة الحرارة 37مْ ولفترة يوم او يومين او ثلاثة ايام ، إذ تصبح المستعمرة اكثر وضوحاً بعد يومين ، وحسب تعليمات الشركة المصنعة لذلك ، إذ يستخدم كوسط انتقائي للتشخيص المباشر للأنواع المبيضات ، حيث تمكنت العزلات النامية على هذا الوسط من النمو بشكل جيد ، وأظهرت الواناً مختلفة ، اذ أظهرت 12 عزلة تعود إلى النوع *C. albicans* باللون الاخضر الفاتح ، واظهرت3 عزلات تعود الى نوع *C.glabrata* باللون الوردي- بنفسجي و7عزلات تعود الى النوع *C.tropicalis* باللون الازرق ، في حين أظهرت 15عينة تعود لنوع *C.parapsilosi* باللون البنفسجي ، واظهرت 3 عزلات باللون الاخضر الغامق التي تعود الى النوع *C. dubliniensis* وكما في الشكل (4-12) ، ويعود سبب ظهور الألوان المختلفة لأنواع المبيضات وذلك لكون هذا الوسط يحتوي على مادة الـ Chromogenic mix و هي المادة الأساس التي تعمل عليها الانزيمات التي ينتجها كل نوع ، وإفراز

هذه الأنزيمات سوف يؤدي الى فصل المواد الأساس الموجودة في الوسط ومن ثم ظهور مستعمرات العزلات بالوان مختلفة (Beighton *et al.*, 1995;Jabra-Rizk *et al.*, 2001) .



شكل (4-12): أنواع جنس *Candida* المعزولة خلال هذه الدراسة على وسط Chrome agar

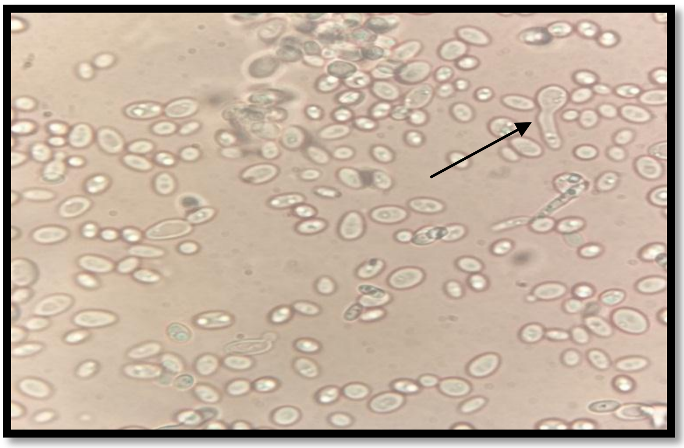
1 - *C.albicans* 2-*C. glabrata* 3-*C.tropicalis* 4- *C. parapsilosis* 5-*C. dubliniensis*

ويعد استخدام الوسط التفريقي Candida chromogenic agar طريقة سهلة لتشخيص أنواع المبيضات الاكثر شيوعاً و ذلك بالاعتماد على دليل اللوني. ويمكن ان يكون هذا الوسط التفريقي وسيلة عزل وتمييز بدائي للعينات السريرية و التي يحتمل إن تكون محتوية على المبيضات (Mulet Bayona *et al.*, 2022)

4-5-2- اختبار تكوين أنبوب الإنبات

يستخدم اختبار تكوين أنبوب الإنبات وذلك للتميز بين أنواع المبيضات عند حضنها في وسط بروتيني في درجة 37مْ لمدة (2-3ساعة) ، و يرتبط تكوين أنبوب الإنبات بوجود المادة المحفزة وهي مصل الدم ، وأنبوب الإنبات عبارة عن نتوء طويل يشبه الانبوب ويمتد خلال خلية الخميرة إذ يمثل هذا النتوء مرحلة مبكرة لتكوين خيوط فطرية ، قد أظهرت نتائج هذا الاختبار قدرة *C. dubliniensis* و *C. albicans* على تكوين أنبوب الإنبات بالمقارنة مع الأنواع الأخرى كما موضح بالشكل (4-13) لذا يعد من الصفات التشخيصية المميزة لكلا لنوعين في جنس المبيضات وبالإضافة الى انه يعد اختباراً تشخيصياً سريعاً وسهلاً وغير مكلف ومعتمد علية في معظم الاختبارات وتتفق نتائج دراستنا مع (Moya-Salzar and Rojas, 2018) و (Wang and Liu, 2021) (Alshaikh and Perveen, 2021) إذ لاحظوا إن الخميرة *C.albicans* تكون انبوب الانبات Germ tube.

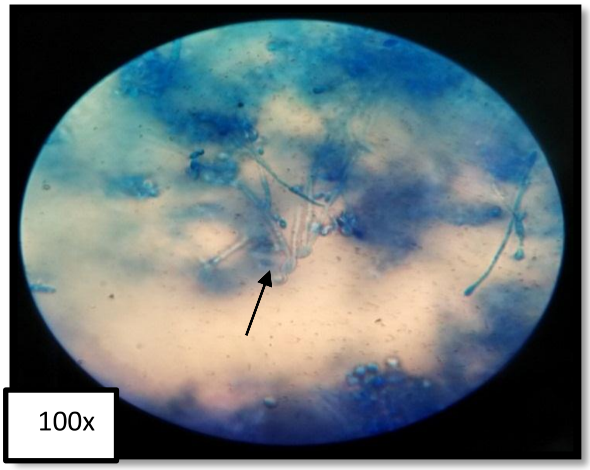
وذكر (Jung *et al*.,2020). أن أنبوب الإنبات يعزز حدوث الإمراضية لكونه يساهم في عمليه أختراق طبقة الخلايا المبطنة للجسم والانسجة ومن بعدها الوصول لمجرى الدم وكذلك يعتقد بأنه ضروري لتغذية الخميرة.



شكل(4-13) : أنبوبة الإنبات في الخميرة *C.albicans*(100x)

4-5-3:اختبار النمو على وسط الكازئين اكار

بينت نتائج هذا الاختبار بأن العزلات التي تعود للنوع *C.dubliniensis* و *C.albicans* كونت أبواغ كلاميدية Chlamydospores بالمقارنة مع بقية الأنواع التابعة لجنس *Candida* sp. التي لم تمتلك القابلية على تكوين هذه الأبواغ ومن ثم تعد صفه تشخيصيه لهذين النوعين ، كما موضح بالشكل (4-14) ، ويعود سبب تكون هذا النوع من الأبواغ بسبب الظروف البيئية غير الملائمة ، والمعروف أن هذه الابواغ هي تراكيب مثخنة الجدار تمتلك القدرة على تحمل الظروف البيئية غير الملائمة لنمو الخمائر للقيام بفاعلياتها الحيوية ومن ثم استمرارها بالحياة لذا تلجأ هذه الأنواع من الخمائر إلى تكوين الأبواغ الكلاميدية لتستعيد نشاطها عند عودة الظروف البيئية الملائمة (Al-Rubyae *et al*., 2013)



شكل (4 -14) : يوضح الأبواغ الكلاميدية Chlamydospores التي كونتها خميرة *C. albicans* على وسط الكازئين اكار

4-5-4:اختبار النمو على وسط السابرويد دكستروز اكار مع السايكلوهيكسامايد

أظهرت نتائج هذا الاختبار ان العزلات التي تعود إلى النوع *C. albicans* و*C.dubliniensis* تملك القابلية من النمو على هذا الوسط وبالمقارنة مع عزلات الأنواع الأخرى و التي لم تستطيع النمو لعدم قدرتها على مقاومة السايكلوهيسامايد وكذلك لا تستطيع تخليق البروتين كون السايكلوهسامايد يمتاز بقدرتة على تثبيط تخليق البروتين (Dal Pizzol *et al.*,2021).

5-5-4: اختبار نمو العزلات تحت درجة حرارة 45 مْ

أظهرت نتائج النمو على وسط SDA تحت درجة حراره 45 مْ أن العزلات التي تعود للأنواع *C. albicans.* و *C. glabrata* و*C.tropicalis* ، نمت بصوره جيده تحت هذه الدرجة في حين العزلات التي تمثل النوع *C. parapsilosis* كان نموها ضعيفاً بينما عزلات النوع *C. dubliniensis* لم تنمو عند هذه الدرجة ، كما موضح في جدول (4-5)، ويعود سبب ذلك كون درجة الحرارة العالية تؤثر على البروتينات الداخلة في تركيب غشاء الخلية ، والذي بدوره يتكون من طبقتين من البروتينات ومن ثم عند ارتفاع درجة الحرارة يحصل تخثر للبروتين وهذا بدوره يؤدي الى تغير طبيعته ومن ثم يؤدي الى تأثير على نفاذية الغشاء الخلوي وبالتالي يؤثر على جميع العمليات الحيوية ومن ثم يؤدي ذلك الى موت الخميرة او توقف النمو (AI-Mosaid *etal*., 2001 ; Raut and Varaiya, 2009)

جدول (4-5) قابلية أنواع خميرة ال *Candida* على النمو تحت درجة حرارة 45 م

النوع	قابلية النمو
C. albicans	++
C.tropicalis	++
C. glabrata	++
C. parapsilosis	+
C. dubliniensis	-

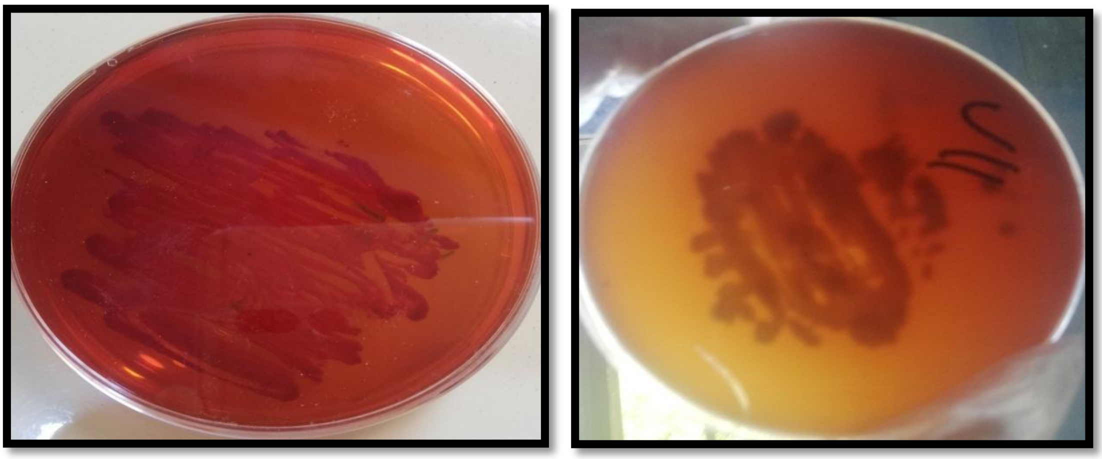
++ نمو جيد ، + نمو ضعيف، - لم تستطيع النمو

6-5-4- اختبار فعالية انتاج الغشاء الحيويBiofilm للـ *Candida* sp.

تم اجراء هذا الأختبار ووفقاً لما وصفه (Janakiram *et al.*, 2017)، وذلك بأستخدام طريقة الطبق Plate method عن طريق تنمية عزلات الـ*Candida* sp. على وسط Brain Heart infusion Agar(BHA) ، وكانت نتائج هذا الأختبار إن جميع عزلات *C. albicans* منتجة للغشاء

الحيوي وبنسبة 100% وكذلك بالنسبة للعزلات *C. tropicalis* و*C.parapsilosis* و *C.dubliniensis* و*C. glabrata* منتجة للغشاء الحيوي وبنسبة 100% وكما في الشكل(4-15).

يؤدي الغشاء الحيوي دورا مهماً وضرورياً في حدوث الأصابة بداء المبيضات Candidiasis ، وهو من اهم العوامل الضراوة للـ *Candida* sp. ولهذه الأغشية دورا فعالاً و حيوياً في مقاومة الجهاز المناعي للمضيف وكذلك مقاومة تأثير المضادات الحيوية (Atiencia-Carrera *et al.*, 2022) ، إن القدرة على تكوين الغشاء الحيوي في الفطريات تختلف بأختلاف الانواع Species والسلالات Strains وموقع الاصابة Site of infection ، اذ اظهرت عزلات *Candida* sp. والمكونه للغشاء الحيوي على الوسط(BHA) ، (Rewak- Soroczynska *et al.*, 2021) ، وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع (Marak and Dhanashree, 2018) ، حيث أظهرت إن معظم عزلات *Candida*. sp والتي عزلت من مناطق مختلفة من الجسم انها منتجة للغشاء الحيوي ومنها عزلات *C. albicans* وكذلك تتفق مع ماذكره (Alshaikh and Perveen, 2021)، والتي بينت إن عزلات *C. albicans* أعلى انتاجية للغشاء الحيوي .



الشكل (4- 15) ، فعالية انتاج الغشاء الحيوي Biofilm للـ *Candida albicans* و*C. parapsilosis* المعزولة من الاذن الخارجية .

4-6: قابلية الفطريات الأذن الخارجية على افراز الأنزيمات على الاوساط الصلبة

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أثناء الدراسة إن قابلية الفطريات المختبرة على إنتاج الأنزيمات تختلف حسب نوع الفطر والمبينة في الجدول (4-6) ، حيث وجد ان هذه الفطريات في الشكل

16-4: *Geotrechium candidum*

17-4 : *A.terreus*

18-4: *Alternaria alternate*

19-4: *Rhizopus oryzae*

20-4: Cladosporium cladosporioide

تمتلك القدرة على انتاج الانزيمات الثلاثة التي تم اختبارها، اما الفطريات

Pencillum chrysogenum

A.flavus

A.oryzae

فقد أظهرت القدرة على انتاج الانزيمين Esterase و Phospholipase وكما في الشكل (21-4, 22-4, 23-4 وعلى التوالي)، بينما اظهر الفطر A.niger القدرة على انتاج الانزيمين Hemolysin وPhospholipase وكما في الشكل (24-4).

الجدول (6-4):قابلية الفطريات المدروسة على انتاج الانزيمات في الاوساط المختلفة

Hemolysin	Phospholipase	Esterase	*نوع الفطر*
-	+	+	*Aspergillus flavus*
+	+	-	*A. niger*
-	+	+	*A. oryzae*
+	+	+	*A.terreus*
+	+	+	*Alternaria alternata*
+	+	+	*Cladosporium cladosporioids*
+	+	+	*Geotrechium candidum*
-	+	+	*Pencillium chrysogenum*
+	+	+	*Rhizopus oryzae*

+القابلية على الافراز - لا تستطيع الافراز

وبصورة عامة يعود سبب عدم أنتاج الانزيمات أو قلة انتاجها إلى عدة اسباب منها نوع العزلة ومكان عزلها وطبيعة وسط الأختبار أو عدم توفر المواد الغذائية الضرورية لنمو الفطريات (Raju and Divakar, 2013)، أو إلى فترة الحضن كونها عاملاً مهماً ومسؤولاً عند تكوين الأنزيم وهذا يختلف من فطر إلى أخر(Bhatti *et al.*, 2007)، وإن درجة الحرارة و الأس الهيدروجيني من العوامل المهمة في انتاج الانزيمات(Darah and ; Hankin and Anagonostakis, 1975 Lim, 2013)

وأظهرت النتائج إن جميع فطريات الأذن المختبرة تمتلك قدرة مختلفة على انتاج الأنزيمات المختبرة حيث فيما يخص أنزيم الفوسفولايبيز فأظهرت جميع الفطريات القدرة على انتاج هذا الانزيم وتم الأستدلال على افراز الانزيم من خلال تكون منطقة بيضاء كثيفة حول المستعمرات وهي تمثل

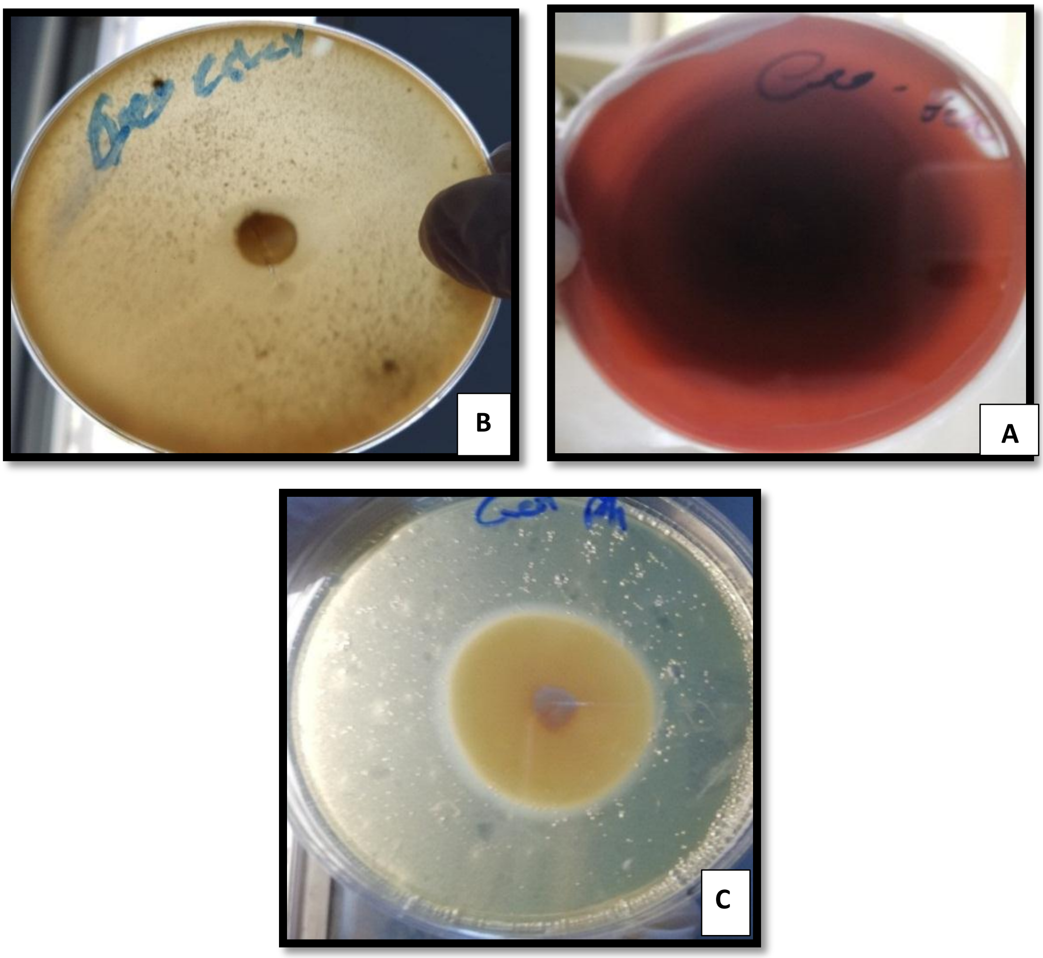
منطقة ترسيب لمعقد الكالسيوم Calciium Complex التي تنتج من ارتباط ايونات الكالسيوم مع الاحماض الدهنية المتحررة من الدهون المفسفرة لمح البيض Egg yolk بفعل انزيم الفوسفولايبيز(الجبوري ، 2022) .

وأوضحت دراسة التي أجريت من قبل (Birinci and Bilgin, 2014)، عدم قدرة الفطر *A. flavus* المعزول من قناة الاذن الخارجية على انتاج هذا الانزيم وبنسبة (25%) وهذا متباين مع نتائج الدراسة الحالية .

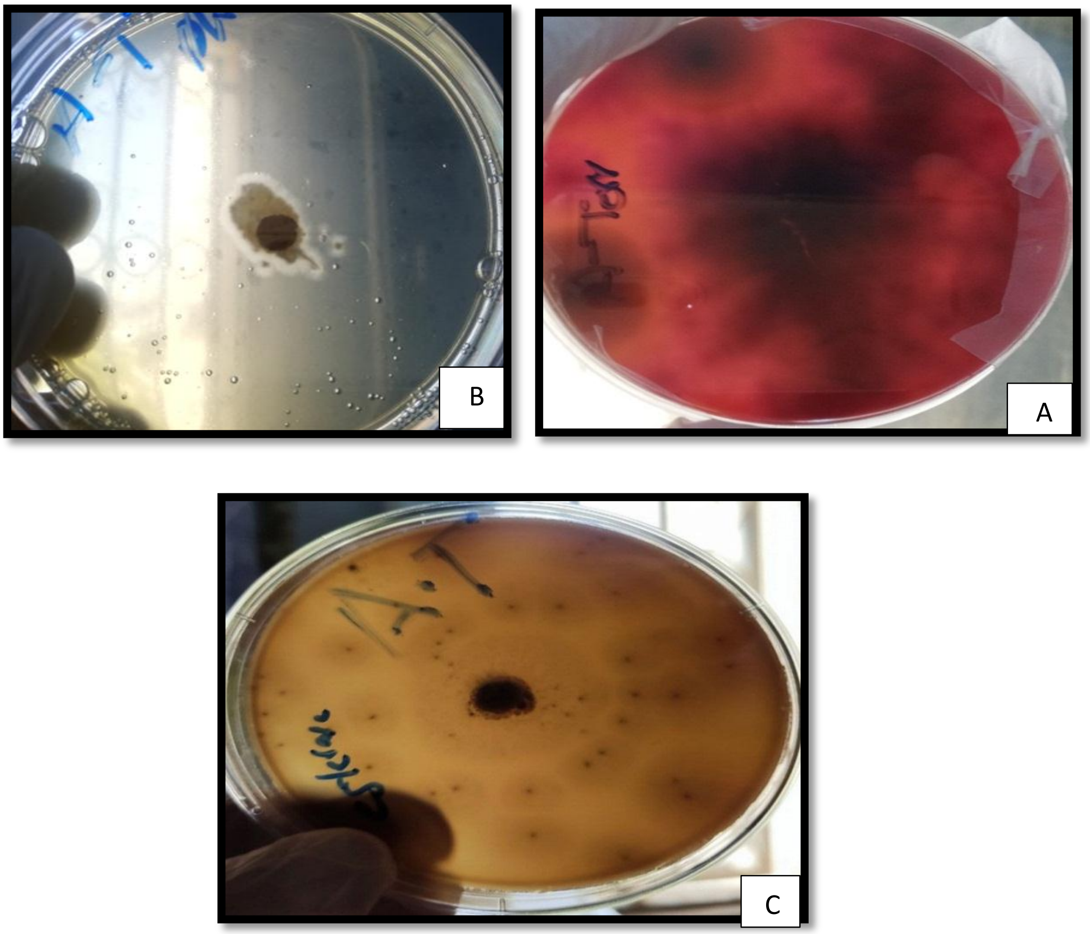
أشارت النتائج بأن أنزيم الإستريز أفرز من جميع الفطريات المختبرة ماعدا فطر واحد *A.niger* ، وقد تم الاستدلال على افراز الانزيم من خلال ظهور هالة بيضاء وشفافة حول المستعمرات ،والذي تمثل ترسيب لمعقد الكالسيوم ، وينتج منطقة الترسيب هذه في وسط اختبار انزيم الاستريز Tween 80 opcity test medium من تفاعل الاحماض الدهنية Fatty acid المتحللة من المركب Tween 80 بفعل انزيم الاستريز وبوجود ايونات الكالسيوم (Aktas *et al* ., 2002)، حيث ان الارتباط بين الاحماض الدهنية وايونات الكالسيوم ، ينتج معقدة الكالسيوم والذي يظهر بهيئة هالة حول المستعمرات الفطرية (Slifkin , 2000)، وإن عدم قدرة الفطر *A.niger* على افراز الانزيم لا يعني انه غير قادر على انتاج الانزيم لكن قد يحتاج إلى وقت حضانة اكثر من ذلك ، او قد يكون الانزيم الذي تم انتاجه غير قادر وبشكل كافي على تحلل مادة الاساس في وسط الاختبار، وتعد المغذيات والعوامل الفيزيائية كألاس الهيدروجيني pH والحرارة والرطوبة ومصادر الكاربون عوامل مؤثرة ومحددة لإفراز هذا الانزيم (Abdel- Raheemand and Shearer, 2002) ، ويعتقد (Borst and Fluit , 2003) ، إن عوامل الضراوة يمكن إن ترتبط بالمنطقة الجغرافية و نوع العدوى.

أما انزيم Hemolysin فقد اظهرت النتائج بأن تم افرازه من قبل بعض الفطريات بأستثناء الفطريات *Pencillium chrysogenum* و*A.flavuas* و*A.oryzae* تم الاستدلال عن افراز هذا الانزيم من خلال تكوين هالة نصف شفافة او سوداء مخضرة حول المستعمرات الفطرية ، وذكر Aboul-Nasr *et al.* (2013) خلال دراستهم على قدرة بعض فطريات المعزولة من الأذن الخارجية على انتاج انزيم الهيمولايسين فوجدوا *A. flavus* بنسبة 95% و *A. niger* بنسبة (68.5%)، وبينت الدراسات التي أجرها (Rossoni *et al*., 2013)، قدرة الفطر *P. chrysogenum* على انتاج انزيم الهيمولايسين بنسبة 100% وهذا مخالف لنتائج دراستنا .

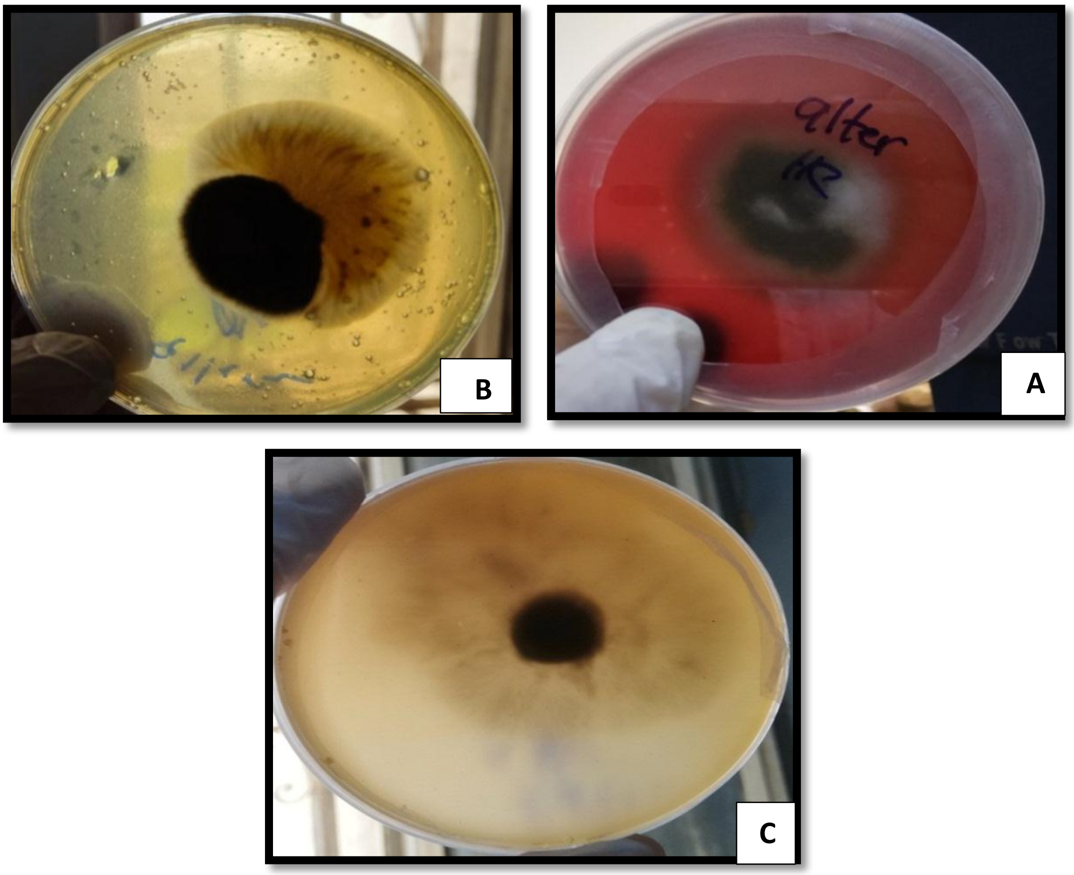
ومن الممكن إن تكون هذه الاختلافات في النتائج بسبب الظروف البيئية ، مصدر العزل ، او طريقة الكشف التي يتم استخدامها في الكشف عن الانزيم ، يحلل Hemolysin كريات الدم الحمراء وذلك عن طريق عمل مسام او ثقوب في اغشية الخلايا الدم الحمراء وبالتالي يؤدي الى اطلاق الحديد الذي يعد ضرورياً لنمو الفطريات(Almeida *et al*., 2009).



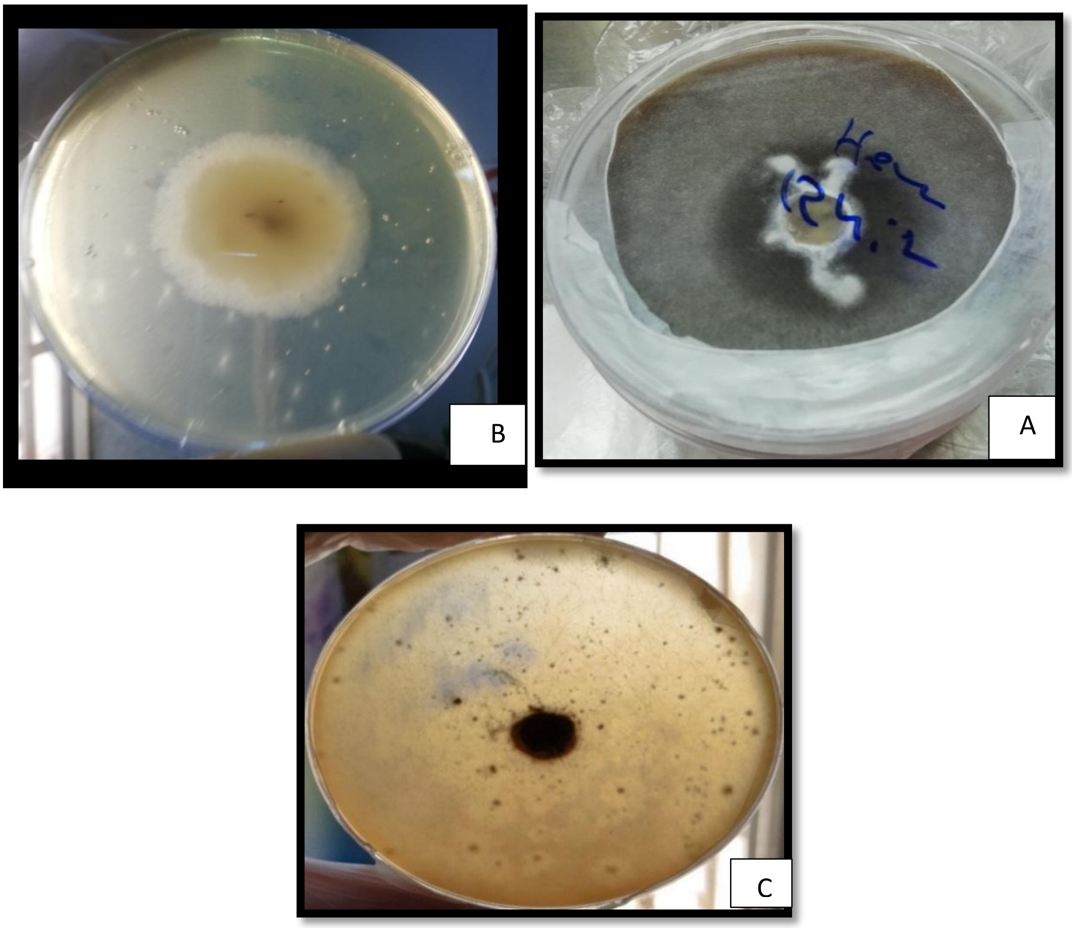
الشكل (4-16): قابلية الفطر *Geotrechium candidum* على انتاج انزيمات A: Hemolysin ، B: Phospholipase ،C: Esteras .



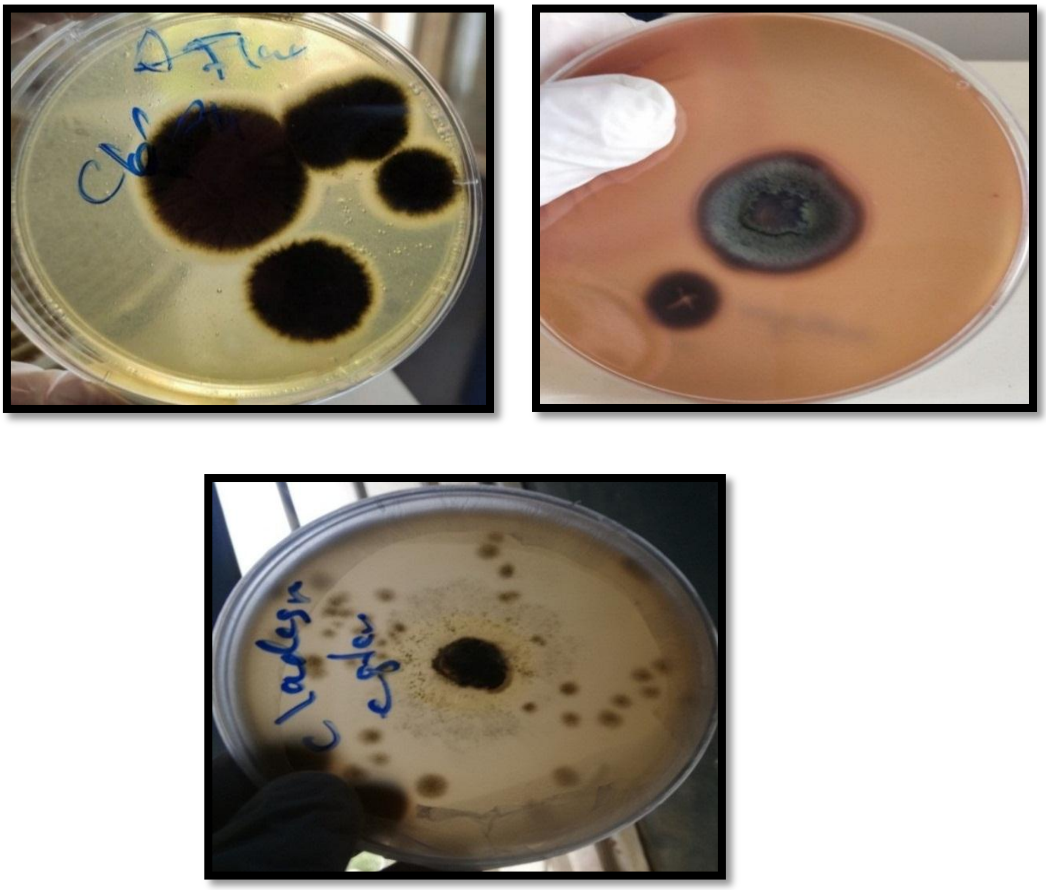
الشكل (4-17): قابلية الفطر *A.terreus* على انتاج انزيمات A: Hemolysin ، B:Phospholipase ،C: Esteras



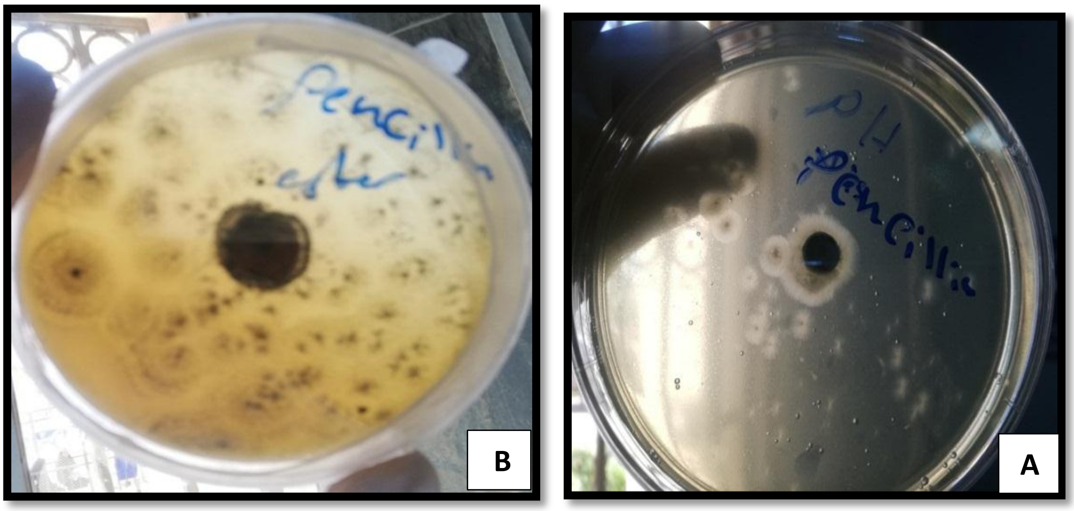
شكل (4-18): قابلية الفطر *Alternaria alternate* على انتاج انزيمات **Hemolysin:A** ، **:B Phospholipase**،**C: Esteras** .



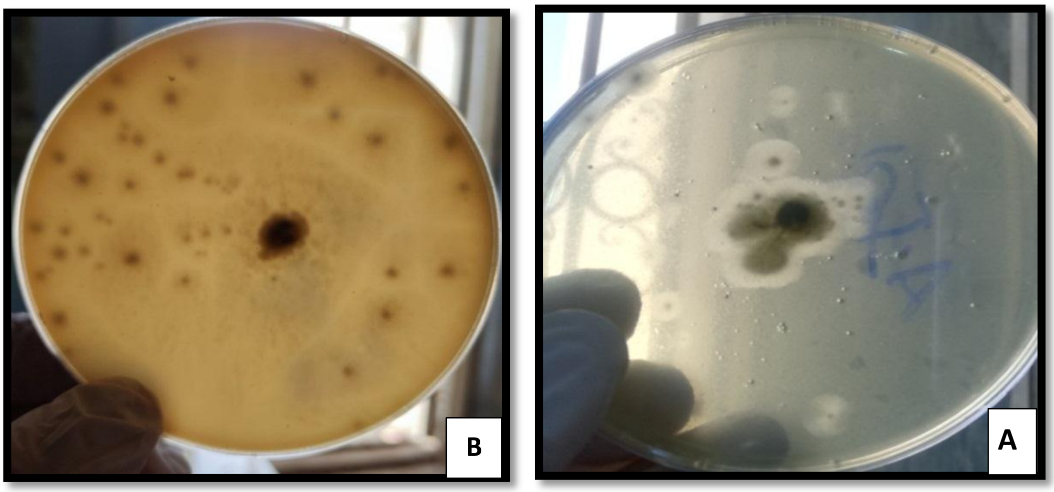
الشكل (4-19) : قابلية الفطر *Rhizopus oryza* على انتاج انزيمات A :Hemolysin ، B: Phospholipase ،C: Esteras .



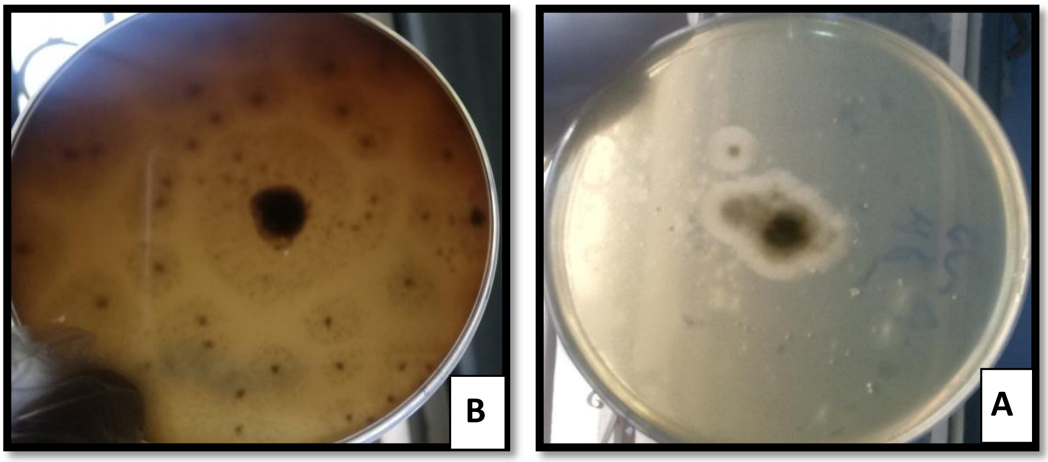
الشكل (4-20): قابلية الفطر *Cladosporium cladosporioides* على انتاج انزيمات **A: Hemolysin ، B: Phospholipase ، C: Esteras .**



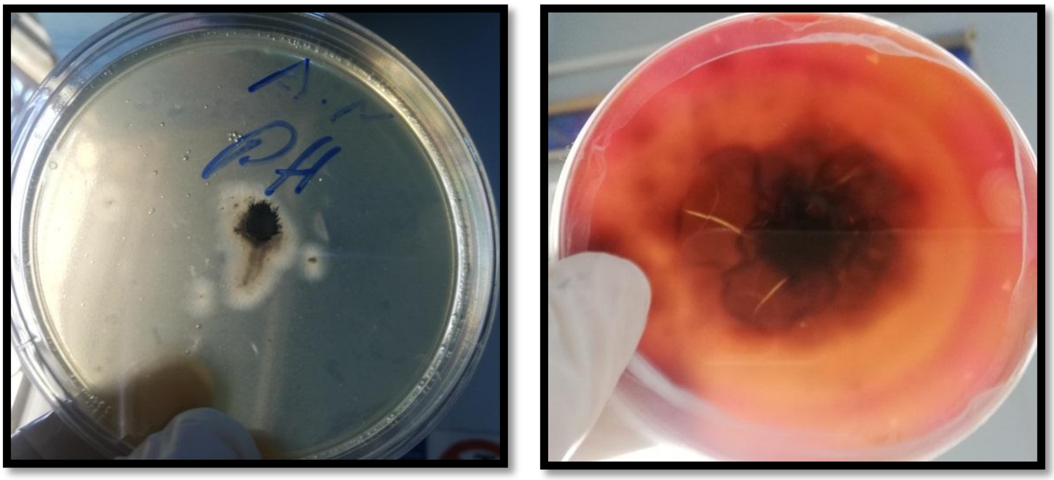
الشكل (21-4): قابلية الفطر *Pencillium chrysogenum* على انتاج انزيمات A: Phospholipase ، B: Esterase



الشكل (22-4): قابلية الفطر *A. flavus* على انتاج انزيمات A: Phospholipase، B:Esteras



الشكل (4- 23): قابلية الفطر *A. oryzae* على انتاج انزيمات A: **Phospholipase** ، **B:Esterase**

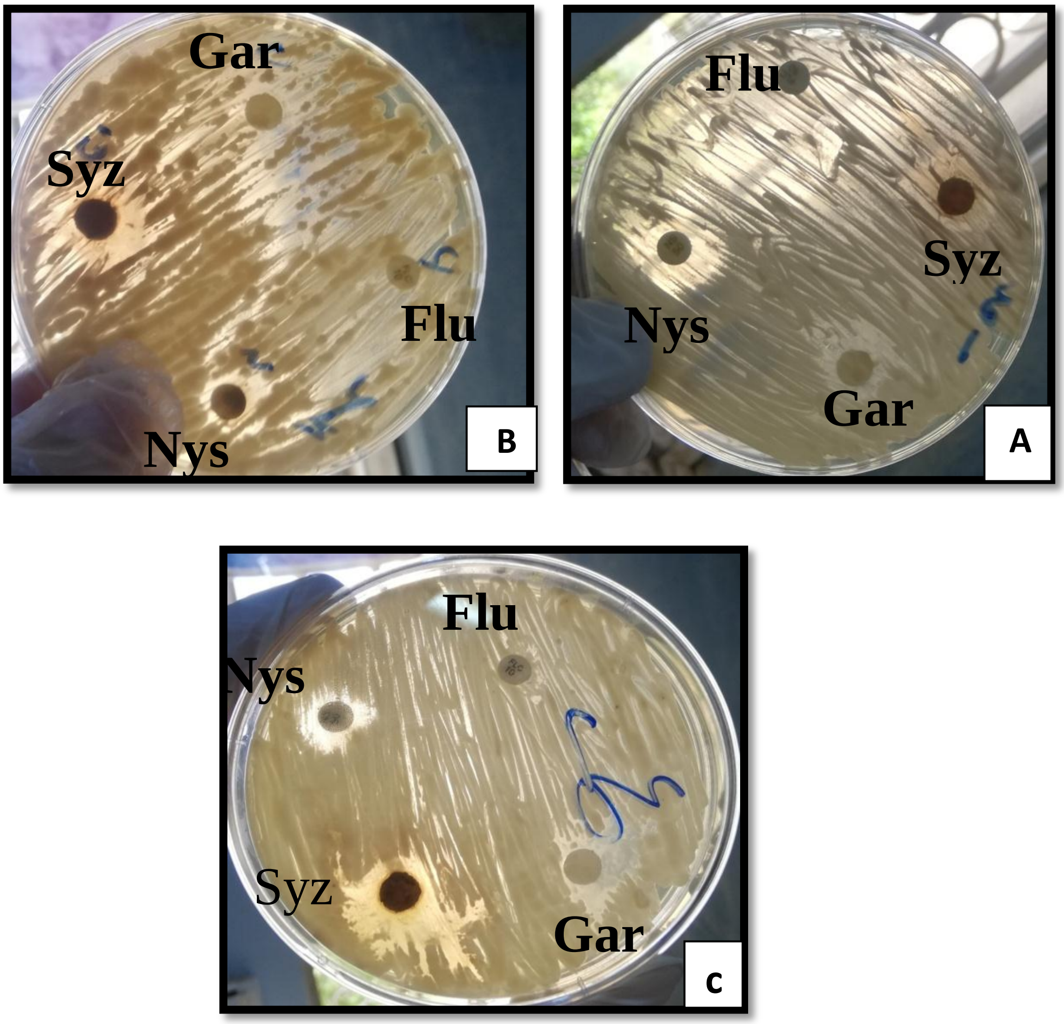


الشكل (4-24): قابلية الفطر على *A.niger* على انتاج انزيم : A **Hemolysin** ، **Phospholipase:B**

4-7: دراسة تأثير المضادات الفطرية Antifungals والمستخلصات النباتية تجاه المبيضات *Candida* sp. والفطريات المعزولة من الـ EAC.

تم اختبار نوعين من المضادات الفطرية Antifungals وهي الفلوكونازول Fluconazole والنستاتين Nystatin فضلا عن أستخدام المستخلصات النباتية الثوم والقرنفل لـ3 عزلات من الخمائر *Candida* sp. و7 عزلات للفطريات ، وبطريقة الأنتشار بالأقراص Disk diffusion method وذلك لمعرفة تأثير المضادات الفطرية والمستخلصات النباتية الثوم والقرنفل اتجاه العزلات الفطرية.

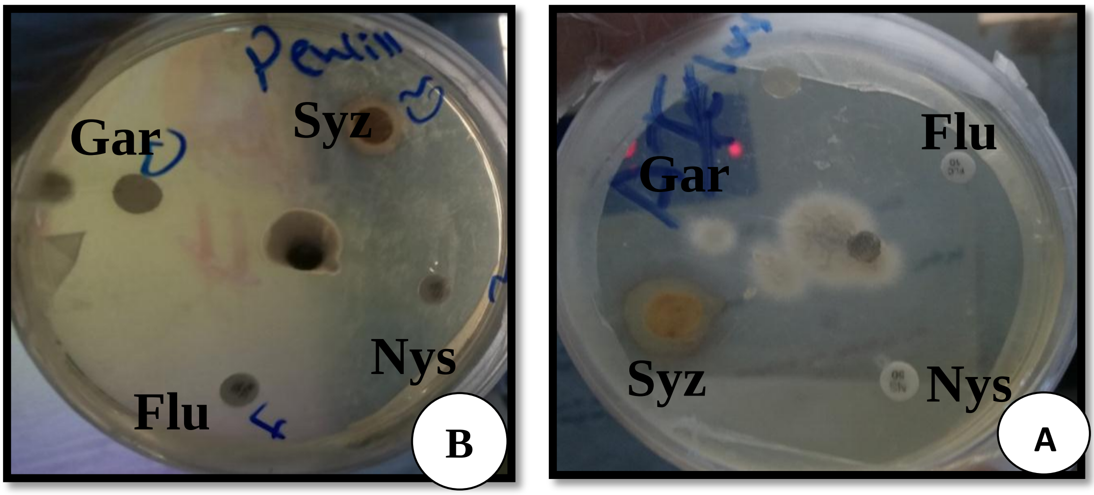
اظهرت نتائج الدراسة الحالية لتأثير المضاد الفطري النستاتين على الخمائر الـ *C. albicans* و*C.parapsilosis* و*C.tropicalis* إذ كانت جميع عينات الخمائر حساسة للنستاتين Nystatin كما في الشكل (4- 25) ، أما المضاد الفطري الفلوكونازول Fluconazole فكانت جميع عينات الـ*Candida* sp. مقاومة له وكما موضحة في الشكل (4-25) ، اما المستخلصات النباتية فأظهرت النتائج الدراسة الحالية إن جميع العزلات المبيضات *Candida* sp. كانت حساسة اتجاه هذه المستخلصات القرنفل والثوم وكما موضح في الشكل (4- 25).



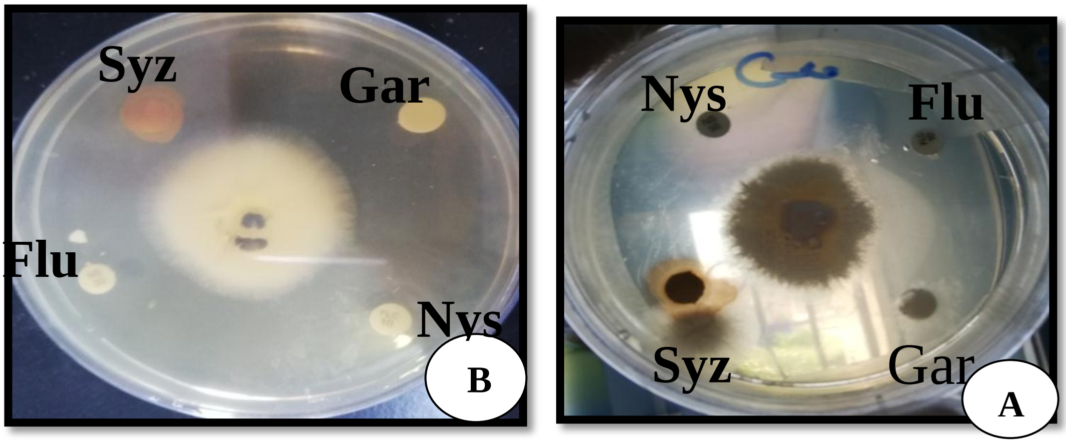
الشكل (4-25) A وB وC: حساسية بعض الخمائر الـ*Candida* spp. اتجاه المضاد الفطري النستاتين والمستخلص النباتي القرنفل والثوم ومقاومته للمضاد الفطري الفلوكونازول بطريقة الأنتشار بالأقراص.

واظهرت نتائج الدراسة الحالية لتأثير المضاد الفطري النستاتين والفلوكونازول فضلاً عن المستخلصات النباتية الثوم والقرنفل أتجاه العزلات الفطرية المعزولة من قناة الأذن الخارجية ، حيث اظهرت الفطريات *A.terreus* و*A.flavus* و*P.*chrysogenum و*Cl.cladosporioide* و*G.candidum* حساسية عالية اتجاه المضادين الفطريين والمستخلصات النباتية الثوم والقرنفل ، أما

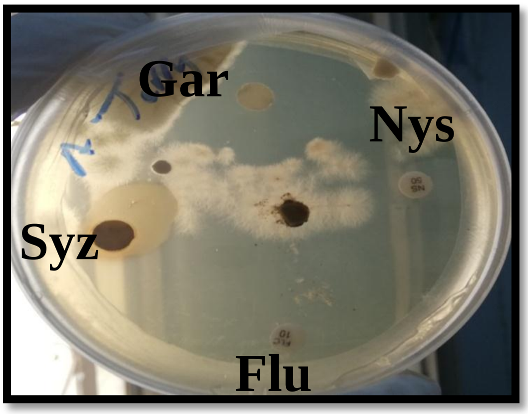
الفطر *A.niger* فأظهر حساسية للمضاد الفطري الفلوكونازول و المستخلص النباتي الثوم والقرنفل ، بينما أظهر مقاومة للمضاد الفطري النستاتين .أما بالنسبة للفطر *A.oryzae,* فقد أظهر حساسية عالية للمضاد الفطري الفلوكونازول و المستخلص النباتي الثوم بينما أظهر مقاومة للمضاد الفطري النستاتين والمستخلص النباتي القرنفل.



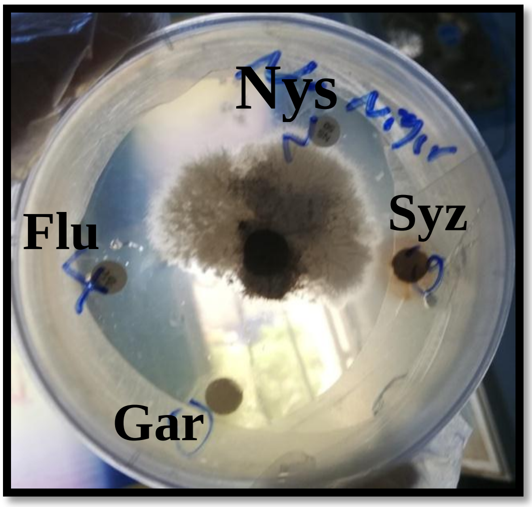
الشكل(4-26) A:حساسية الفطر*A.flavus*، B:حساسية الفطر*P.chrysogenum* المعزول من قناة الأذن الخارجية أتجاه المضاد الفطري الفلوكونازول والنستاتين والمستخلصين النباتين الثوم والقرنفل بطريقة الأنتشار بالأقراص.



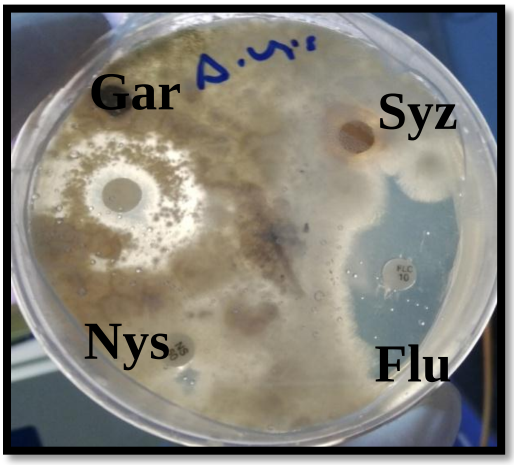
الشكل(4-27) A: حساسية الفطر*G .candidum* ، B:حساسية الفطر*Cl.cladosporoides*:المعزول من قناة الاذن الخارجية أتجاه المضاد الفطري الفلوكونازول والنستاتين والمستخلصين النباتين الثوم والقرنفل و بطريقة الأنتشاربالأقراص



الشكل(4-28) :حساسية الفطر *A.terreus* المعزول من قناة الاذن الخارجية أتجاه المضاد الفطري الفلوكونازول والنستاتين والمستخلصين النباتين الثوم والقرنفل بطريقة الأنتشار بالأقراص



الشكل(4-29) A:حساسية الفطر *A.niger* المعزولة من قناة الاذن الخارجية أتجاه المضاد الفطري الفلوكونازول والمستخلص النباتي الثوم والقرنفل ومقاومة للمضاد الفطري النستاتين وبطريقة الأنتشار بالاقراص.



الشكل (4-30): حساسية الفطر *A.oryzae* المعزولة من قناة الاذن الخارجية أتجاه المضاد الفطري الفلوكونازول والمستخلص النباتي الثوم ومقاومة للمضاد الفطري النستاتين والمستخلص القرنفل وبطريقة الأنتشار بالاقراص

وأظهرت نتائج الدراسة الحالية إن هناك تبايناً في مقاومة العزلات قيد الدراسة والتي مصدرها قناة الأذن الخارجية EAC اتجاه المضادين الفطريين المستعملين (الفلوكونازول والنستاتين) والمستخلصات النباتية ، إذ اظهرت جميع عزلات الخمائر الـ *Candida* sp. حساسية عالية اتجاه المضاد الفطري النستاتين ، أما المضاد الفطري الفلوكونازول فأظهرت جميع العزلات الخمائر *Candida* sp. مقاومة ضده ، يستخدم المضاد الفطري النستاتين بشكل واسع وذلك لمعالجة الاصابات الفطرية إذ ينتمي الى مجموعة البولين polynes ، (Szomek ; Jayachitra, 2018 *et al* ., 2021) ، حيث إن المضاد الفطري النستاتين يتحد مع مكونات Steroles الموجود في غشاء الخلية والذي يسبب تسرب لمحتويات الخلية الفطرية وبالتالي موتها (Torabi *et al* ., 2022) ، اما المضاد الفطري الفلوكونازول الذي ينتمي الى مجموعة الأزول Azoles اذ يعمل على الغشاء الخلوي للفطريات أو يثبط وضيفة الـErgosterol في غشاء الخلية الفطرية (Hao *et al*., 2022).

ونظراً لأن المستخلصات النباتية يمكن ان تمنع نمو الفطريات دون التأثير على المضيف ، فقد تم اجراء العديد من الدراسات لتحديد المركبات النباتية التي تثبط الفطريات المسببة للإمراض التي تؤثر على الاشخاص . ووفقاً لنتائج دراستنا الحالية ، كان المستخلص الكحولي للنبات الثوم هو الاكثر فعالية في تثبيط نمو جميع الفطريات المعزولة من قناة الأذن الخارجية وكذلك أنواع الخمائر المبيضات ، إذ يعد الثوم نباتاً طبياً رائعاً ، وله مجموعة متنوعة من المميزات البيولوجية ، بما في ذلك النشاط المضاد للفطريات . كان مستخلص الثوم هوالعلاج الأكثر فعالية للـ *Candida albicans* وأنواع *Aspergillus* spp. ويعتبر الاليسين allicin هو الجزيء يحتوي على الكبريت ، والمسؤول عن خصائص الثوم المضادة للفطريات (Chudzik *et al* ., 2010). وأما مستخلص القرنفل فقد تم العثور على مادة الاجينول eugenol ، وهي مادة ذات تأثيرات مضادة للفطريات ، وبتركيزات كبيرة في القرنفل *S.aromaticum* (Ranasinghe *et al* ., 2002 ; Mansourian *et al*., 2014)، واثبتت العديد من الدراسات إلى أن فعالية القرنفل تعود إلى وجود المركب الفينولي الأجينول eugenol والذي يثبط عمل Ergosterol الموجود ضمن مكونات غشاء الخلية الفطرية مما يسبب تغير في نفاذية الاغشية ومن ثم موت الخلية الفطرية ، إذ اظهر المركب eugenol نشاطاً مثبطاً ضد المبيضات *Candida albicans* و*Aspergillus* spp. و الفطريات الجلدية (Pinto *et al* ., 2009) .

إن عملية اختبار الحساسية للمضادات الفطرية لها دوراً مهماً في عملية أختبار المضاد الفطري الملائم لعلاج الأصابات الفطرية (Gandhi *et al* ., 2015)، إذ يعد العلاج بالازولات Azoles مناسباً للأصابة الفطرية منذ زمن طويل وذلك بسبب فعاليته واسعة الطيف ، إلا أن شكل زيادة مقاومة

Azoles قلقاً كبيراً ، وذلك لانه يعد اكثر المضادات الفطرية تواجداً في علاج الاصابات الفطرية (Mahboob *et al* ., 2019)، إذ يعود سبب مقاومة الأزولات إلى العلاج لفترات طويلة و زيادة أستخدام المضادات الفطرية (Gandhi *et al*., 2015)، وهذا ما لوحظ في دراستنا الحالية من مقاومة جميع العزلات الخمائر المبيضات *Candida* sp. للمضاد الفطري الفلوكونازول وهذا يتفق مع دراسة (Sonmez and Erbas, 2017).

ذكر Khudhur Mohammed *et al*. (2019) ، من خلال اجراء اختبار حساسية للمبيضات للمضادين الفطرين النستاتين والفلوكونازول ، إذ اظهرت المبيضات المعزولة من قناة الأذن الخارجية للأناث والذكور حساسية عالية اتجاه المضاد الفطري النستاتين وبنسبة 100% ، أما المضاد الفطري الفلوكونازول فكانت الأناث حساسة للمضاد بنسبة 54.5% ومقاومة 45.5% أما الذكور فكانت حساسية المبيضات للمضاد الفطري بنسبة86.7% ونسبة المقاومة للمضاد 13.3%.

وفي دراسة اجراها Ali *et al*.(2018) ، اظهرت النتائج إن 88.2% من *Candida* sp. حساسة للمضاد الفطري النستاتين ، في حين كانت معظم العزلات الفطر *A.niger* حساسة للمضاد الفطري النستاتين وبواقع 51عزلة من مجموع 52 عزلة عند التركيز 100 وحدة دولية /قرص ، أما المضاد الفطري الفلوكونازول فأظهرت جميع عزلات الفطر *A.niger* والتي عددها 52عزلة مقاومة للمضاد الفطري عند تركيز 25 مايكروغرام / قرص وكذلك الحال بالنسبة *A. flavus* كانت معظم العزلات حساسة للمضاد الفطري النستاتين بواقع 31عزلة من مجموع 34 عزلة أما المضاد الفطري الفلوكونازول فأظهرت جميع العزلات مقاومة للمضاد . اما *A.terreus* فأظهرت مقاومة عالية للمضادين الفطرين النستاتين والفلوكونازول وذلك عند دراستهم لالتهاب الأذن الخارجي الفطري لـ122 مصاب.

وشار Gharaghani *et al*. (2020) في دراسته التي اجراها لـ 70عزلة من الفطريات التي عزلت من الاشخاص المصابين بالتهاب الاذن الخارجي بأن 10 عزلات من A.*niger* كانت مقاومة للمضاد الفطري الفلوكونازول .بينما كانت 14 عزلة من *A.flavuas* من مجموع 30 مقاومة للمضاد الفطري الفلوكونازول ، في حين لم تظهر اي مقاومة للفطر *A.terreus* للمضاد الفطري الفلوكونازول . بينما كانت عزلتان من مجموع 3عزلات لخميرة *C.albicans* اظهرت مقاومة للمضاد الفطري الفلوكونازول ، وكما ذكر إن الاستخدام المتكرر والعشوائي للمضادات الفطرية من قبل الاشخاص المصابين وبدون استشارة الطبيب سوف يؤدي الى اكتساب الممرض آليات دفاعية والعوامل ضراوة Virulence factor والتي تساعد الممرض على مقاومة المضاد الفطري المستخدم (Kiakojuri *et al* ., 2021 ; Alexander *et al*., 2013).

وأظهرت ايضاً نتائج الدراسة التي اجريت من قبل Szigeti *et al.* (2012) ، إن جميع السلالات لـ *Aspergillus* spp. والمعزولة من قناة الاذن الخارجية اظهرت حساسية للمضاد الفطري الفلوكونازول وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية . في حين ذكر (Yenisehirli *et al.* 2009 ; Yenisehirli *et al.*, 2015) كل أنواع لـ *Aspergillus* spp. كانت مقاومة للمضاد الفطري الفلوكونازول بينما كانت *C. albicans* المعزولة من الاذن الخارجية حساسة للمضاد الفطري الفلوكونازول .

وأظهر المستخلص النباتي للثوم فعالية تثبيطية ضد الفطريات *A.niger* و A.oryzae (Khan *et al.*, 2019) وهذا ما يتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، ويعود سبب تأثير الثوم المضاد للفطريات الى وجود المركب الأليسين Allicin والذي يمنع نمو الفطريات حيث اظهر المستخلص الكحولي للثوم فعالية تثبيطية لنمو الفطر. *Rhizopus* spp (Kutawa *et al* ., 2018) ومتفق مع دراستنا الحالية .

وأتفقت نتائج الدراسة الحالية مع الدراسة التي أجريت من قبل (Kumar *et al* ., 2012) ، لأنواع المبيضات المعزولة من عدوى مجرى الدم و قد تم أختبار القدرة المضادة للفطريات للنبات القرنفل ضد أنواع من المبيضات ، بما في ذلك *C.albicans* و *C.parapsilosis* و *C.tropicalis* ، اذ وجد لزيت القرنفل أقوى التأثيرات المضادة للفطريات ضد *C.albicans* و *C.tropicalis* وبطريقة انتشار الاقراص.

وفي دراسة قام بها Khodavandi *et al.*(2011) ، بمقارنة فعالية المضاد الفطري الاليسين allicin ، المركب الفعال المستخلص من الثوم و المضاد الفطري الفلوكونازول في تثبيط عزلات مختلفة من *C.albicans* و المكونة للغشاء الحيوي Biofilm حيث لاحظوا تأثير الاليسين على انتاج الاغشية الحيوية في المبيضات مقارنةً بالمضاد الفلوكونازول ، اذ ان خلايا الخميرة المعالجة بالاليسين اظهرت انخفاضاً في نمو الاغشية الحيوية مقارنة بالفلوكونازول .

إن تباين نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسات اخرى من حيث الحساسية Sensitive و المقاومة Resistant يرجع إلى سبب الأفراط في إستخدام المضادات الفطرية والحيوية والممارسات الشخصية والموقع البيئي للعزلات (Aslam, 2016). ويعتبر اختلاف اقطار التثبيط من نوع لاخر لأنواع الفطريات والخمائر المبيضات امراً طبيعياً ، وكذلك التفاوت بين العزلات من حيث الحساسية والمقاومة ، ولان ذلك يعتمد على البيئة.(Mohammed, 2012).

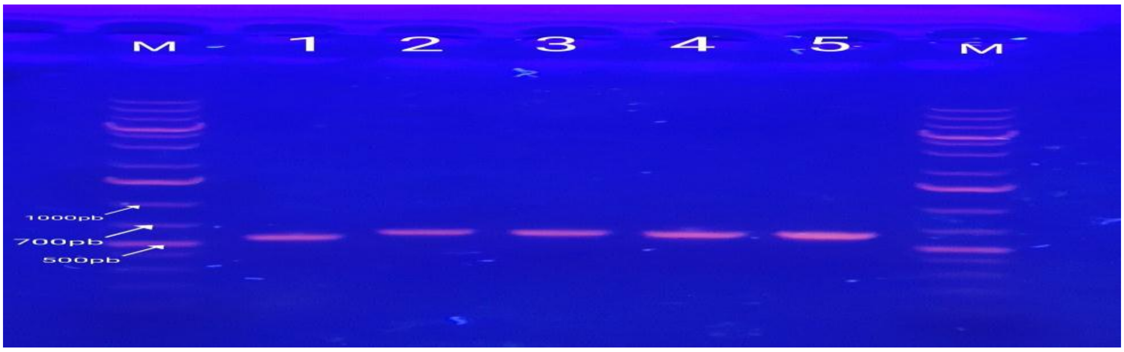
واتضح من خلال نتائج الدراسة الحالية والتي تم الحصول عليها ان فعالية المضاديين الفطريين المستخدمين وكذلك المستخلصين النباتيين الثوم والقرنفل كانت عالية ضد أنواع الفطريات المعزولة من الـ EAC وذلك من خلال ملاحظة منطقة التثبيط لهذه المضادات والمستخلصات النباتية المستخدمة في هذه الدراسة . فقد كان المستخلص النباتي الثوم أعلى تأثيراً تلاه القرنفل ثم المضادين الفطرين النستاتين والفلوكونازول ، أما مقاومة وحساسية الفطريات والخمائر المبيضات المعزولة ، فقد اظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة للمضاد الفطري الفلوكونوزول ، يليه المضاد الفطري النستاتين والمستخلص النباتي القرنفل ، ربما يرجع سبب ذلك الى الاستخدام العشوائي والمتكرر للأدوية من قبل المرضى دون الاخذ استشارة الطبيب المختص وبالتالي يؤدي هذا الى اكتساب الممرض مقاومة ضد العلاج المستخدم (الخزعلي ،2021).

4 -8 : استخدام تقنية الـ PCR لتشخيص الفطريات.

تم خلال الدراسة الجزيئة استخلاص(DNA) الـ 9 نوع من الفطريات و5 نوع من الخمائر المسببة التهاب الاذن الخارجية ، واظهرت النتائج بأستخدام تقنية PCR ان البادئات (ITS4وITS1) قامت بتضخيم الشريط الوراثي ، واظهرت مواقع الحزم المتظخمة بين (500-700pb).

شكل (4-31) : ناتج تقنية الـ PCR للأنواع المعزولة خلال الدراسة الحالية على هلام الاكاروز باستخدام البادئات (ITS4و ITS1)

ITS*M :Markar :1:Cl.cladosporioides, 2:Al.alternata , 3:A.terreus , 4:A.niger ,5: P .chrysogenum , 6:Rhizopus oryza ,7:A.flavus , 8:A.oryzae , 9:G. candidum*



شكل (4-32) : ناتج تقنية الـ PCR للأنواع الخمائر المعزولة خلال الدراسة الحالية على هلام الاكاروز باستخدام البادئات (ITS1 و ITS4)

M :Markar 1:C.paraplosis 1, 2: C.paraplosis2, 3: C.paraplosis 3, 4: C.paraplosis4, 5:C.tropicalis

وبينت نتائج تحليل تتابعات القواعد النتروجينية للمادة الوراثية الـDNA للأنواع الفطريات والخميرة المختبرة ومقارنتها مع العزلات الموجودة في بنك الجيناتNCBI تشخيص 9 انواع من الفطريات و 5انواع من الخميرة والتي عزلت من الأذن الخارجية الجدول (4-7).

الجدول (4-7):التشخيص الجزيئي للفطريات الاذن الخارجية المدروسة

Gen Bank sequence Accessio number	Number of references	نسبة التطابق	التشخيص الجزيئي	التشخيص المظهري	رقم العزلة
SUB13580204	OR198483	%100	*Aspergillus flavus*	*Aspergillus flavus*	A1
SUB13580117	OR198074	%100	*A.niger*	*A.niger*	A2
SUB13580226	OR198486	%96	*A.oryzae*	*A.oryzae*	A3
SUB13580086	OR198054	%100	*A.terreus*	*A.terreus*	A4
SUB13580039	OR197710	%100	*Alternaria alternate*	*Alernaria alternate*	A5
SUB13579994	OR197591	%98	*Cladosporium cladosporioides*	*Cladosporium cladosporioides*	A6
SUB13580237	OR198716	%99	*Geotrichium candidum*	*Geotrichium candidum*	A7
SUB13580130	OR198076	%100	*Pencilinum chrysogenum*	*Pencilinum* chrysogenum	A8
SUB13580148	OR198167	%99	*Rhizopus oryza*	*Rhizopus oryza*	A9
SUB13578296	OR199904	%100	*Candida parapsilosis*1	*Candida parapsilosis*1	A10
SUB13578296	OR199905	%98	*C. parapsilosis*2	*C.parapsilosis*2	A11
SUB13578296	(OR199906)	%99	*C. parapsilosis*3	*C.parapsilosis*3	A12
SUB13578296	OR199907	%100	*C. parapsilosis*4	*C. parapsilosis*4	A13
SUB13578458	OR195728	%100	*C.tropicalis*	*C.tropicalis*	A14

أظهرت نتائج التحليل الجزيئي للمادة الوراثية تطابق التشخيص المظهري مع الجزيئي للعزلات المختبرة من الفطريات و الخمائر المدروسة وهي *A.terreus* و*Rhizopus oryza* و *G.candidum* و*A.niger* و*A.flavuss* و*A.oryzae* و *P.chrysogenum* و *Cl.cladosporioides* و*Al.alternata* و*C.tropicalis* و*C.paraplosis* وبنسب تتراوح بين 96-100% مع العزلات الموجودة في البنك الجينات ، كما في الجدول (4-7) ، فكانت نسبة التطابق العزلات *A.flavus* و*C.tropicalis* و*A.niger* و*P .chrysogenum* و *Al.*alternata وA.*terreus* و *C.parapsilosis1,4* فكانت 100% ، وبلغت نسبة التطابق العزلات *G. candidum* و*Rhizopus oryzae* و*C.parapsilosis*3 99% ، في حين إن نسبة تطابق الفطرA.oryzae بلغت 96% ، ونسبة التطابق *Cl.cladosporioides* و*C.parasilosis2* كانت 98% ، حيث وجد أن هناك أختلافاً عند مقارنتها وملاحضتها تحت المجهر الضوئي ، لذا فأن نسبة التطابق بين التشخيص المظهري والجزيئي لم تكن 100% وقد يعزى سبب ذلك إلى أن الفطريات الأذن الخارجية تتأثر بالعوامل البيئية المختلفة ، وقد يؤدي هذا إلى فقدان القابلية على تكوين الكونيدات بعد عملية إعادة الزرع المتعدد (Simmons, 2007).

وهناك العديد من التقنيات الفسيولوجية والبايولوجية التي وفرت معلومات عن التصنيف ، إلا أنه يعد تسلسل القواعد النتروجينية وتنظيم الحامض النووي وهو الاكثر دقة وفرة واحتمالاً لإعطاء تميز واضح وحساس بين مختلف أنواع الكائنات الحية ، وبألإضافة ايضاً إلى معرفة العلاقات التطورية بينهم (Demirel *et al* ., 2013 ; Croft *et al* .,1990) ، إذ أن تصنيف الفطريات وبألاعتماد على الطرق التشخيص الجزيئي ادى إلى ازالة و أبعاد جميع المعوقات و الاخطاء والتي تحصل اثناء التشخيص المظهري ، وذلك لأن التشخيص الجزيئي يعتمد على الصفات الوراثية لكل نوع من أنواع الفطريات ، وبألإعتماد على تسلسل القواعد النتروجينية لشريط DNA ، هذا يعطي الأوجه المقارنة بين الأنواع الفطرية (Weber, 2009)، كما وذكر Demirel *et al* . (2013) إن دراسة أوجه المقارنة لتسلسل النيوكليوتيدات في الجينات يعطي وسيلة لتحليل أو لتفسير العلاقات الوراثية ، ومن ثم رسم الشجرة الوراثية للسلالات ولمجموعة واسعة من الانواع.

وأشار(Lafta , 2019 ; Li *et al*., 2014)، إلى أن الطرق التصنيفة التقليدية والجزيئية لها سلبيات وايجابيات ولكن الطرق التقليدية لها بعض الأيجابيات تفوق الطرق الجزيئية في تقدير الاختلافات بين الفطريات ، لذا يجب ان لا نعتمد فقط على البيانات و التي نحصل عليها من الطرق الجزيئية وبمعزل عن البيانات الاخرى مثل الصفات المظهرية ، ولان ذلك يؤدي بالباحثين الى أعطاء او ظهور بأستنتاج افكار خاطئة من نتائج تحليل الاشجار الوراثية Phylogenetic trees.

النتائج التي حصل عليها بأستخدام البادئات ITS4 و ITS1 قد ضخمت الشريط الوراثي الـDNA حيث تراوحت الحزم المضخمة بين (500-700pb) وهذا الاختلاف الذي شوهد في منطقة ITS بين الفطريات الاذن الخارجية اكد نتائج التشخيص المظهري.

4-9: الشجرة الوراثية للفطريات والخمائر المعزولة من الأذن الخارجية المدروسة

الشجرة النشؤ والتطور: عبارة عن شجرة تظهر العلاقات التطورية لمختلف الأنواع الحيوانية، أو أنواع الكائنات الحية المختلفة ، والتي يعتقد انها تمتلك أصل مشترك تدعم فهم التحولات الرئيسة للتطور، تعد مفتاحاً لاستنتاج أصل الجينات الجديدة وفهم التطور المورفولوجي و أكتشاف التكيف الجزيئي وإعادة بنا التغيرات الديموغرافية في الأنواع المختلفة (Kapli *et al*., 2020).

ويتضح من نتائج الشجرات الوراثية لعزلات الدراسة الحالية بعد إن تم مقارنتها بالعزلات المحفوظة في بنك الجينات إن الشجرة الوراثية للنوع (*A.flavus*(OR198483 شكل(4- 33) انها قريبة من العزلات التالية :(YBY-F123(OP709788 و (KP296143) 013 و AYSWAF (OQ456443) وبعيدة جداً من العزلة (RM376(MT584285.

أما عزلة النوع (*A.niger* (OR198074 فيلاحظ من شجرتها الوراثية شكل (4-34) انها قريبة جداً من العزلات الاتية : جنوب افريقيا (ON988183) والعراق (ON981098) و الصين (OP080740) وبعيدة جداً من العزلة الصين (OQ726219).

ويتضح من الشجرة الوراثية للنوع (*A.oryzae* (OR198486 شكل(4-35) ان هذا النوع قريب جداً من العزلات الاتية : (ON365685) 9030و (OQ940359)1 و yznuB(MW805393) و 3.20(OP584603) و(EF-17(OM095430 و(VJP15(OM946588 وبعيدة جداً من العزلة (YRA3(OQ916424.

ويلاحظ من الشجرة الوراثية للنوع (*A.terreus* (OR198054 الشكل (4-36) إن هذه العزلة قريبة جداً من العزلات التالية : الصين(Chongqing)(OK448259) و الصين(OK465110) و الصين(OL 780836) وبعيدة جداً من العزلة الهند(OQ644519).

ويتضح من الشجرة الوراثية للنوع (*A.alternata* (OR197710 شكل (4-37) إن هذا النوع قريب جدا من العزلات الاتية :(MTTXL(OM319513 و Dryas octopetala (OP697870) و(R-13(OQ159023 و بعيدة جدا من العزلة (S2(MK748143.

يلاحظ من الشجرة الوراثية للـ *Cl.cladosporioides* (OR197591) شكل (4-38) ان هذه العزلة قريبة جداً للعزلات التالية : DHMJ29 (JN986781) و6(KX982237) وXSP-36(ON127865) وبعيدة جداً من العزلة P13 (OP681423).

في حين يلاحظ من الشجرة الوراثية للنوع *G.candidum* (OR198716) شكل(4-39) انها قريبة جداً من العزلات التالية : MEFC101(MK732130) و72-phaff 186(OQ694472)و72-186(MH153571) UCDFST وبعيدة جداً من العزلة GC1(KY009607)

أما عزلة النوع *P.chrysogenum* (OR198076) فيلاحظ من شجرتها الوراثية شكل (4-40) انها قريبة جداً من العزلات التالية :UNASAM-FUN-0012 Per(MT762716) و ايران (ON024398) و الصين(ON127859) وبعيدة جداً من العزلة الصين(OQ726219).

ويتضح من الشجرة الوراثية للنوع*R.oryzae* (OR198167) شكل (4-41) انها قريبة جداً من العزلات الاتية:ايران(MG946217) و اندونسيا(LC514311) و اندونيسيا (lc514313) وبعيدة جداً من العزلة ايران(JQ683247).

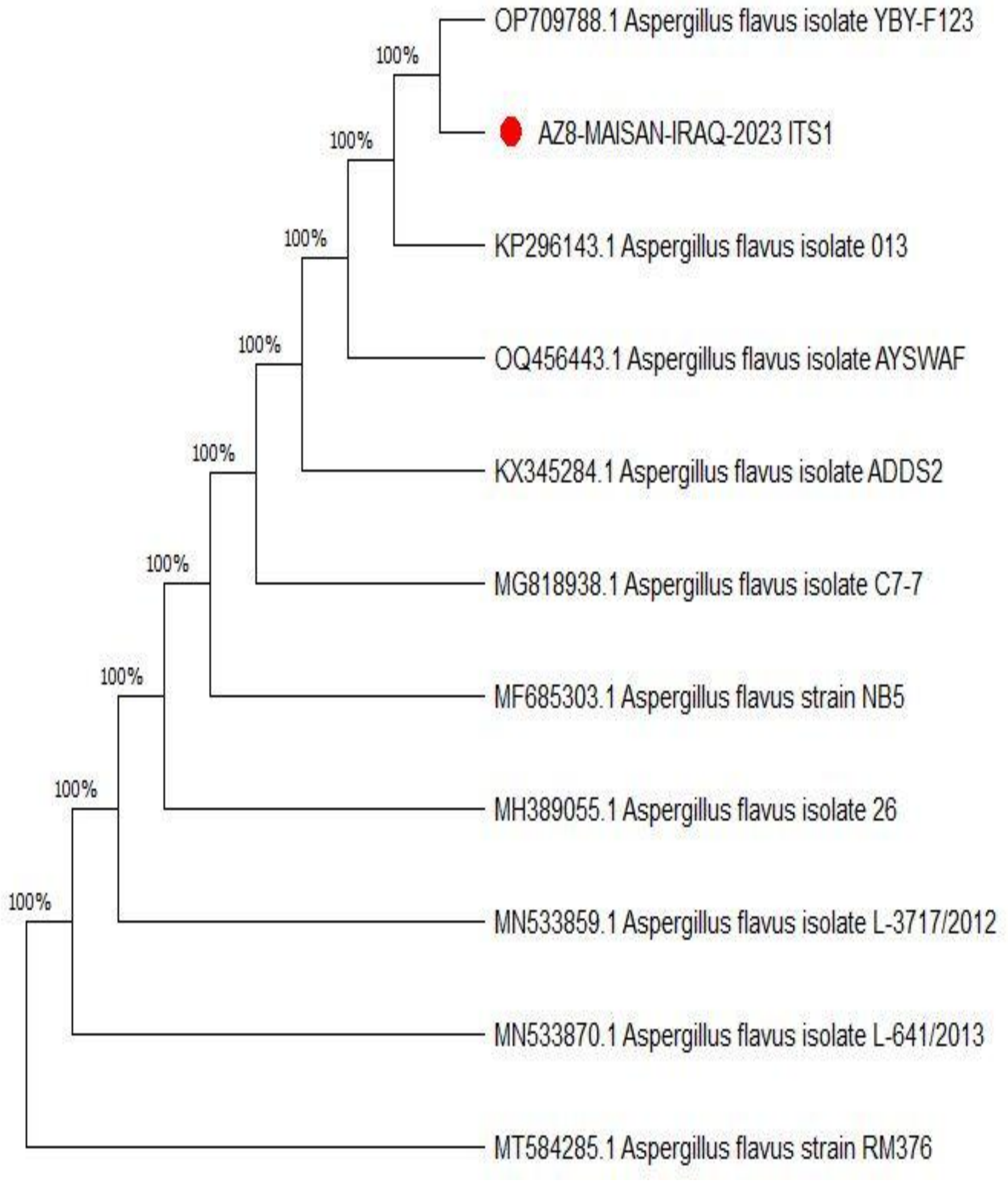
أما عزلة النوع(*C.parapsilosis1*(OR199904 فيلاحظ من شجرتها الوراثية شكل (4-42) انها قريبة من العزلات التالية :H186A(KP674862) وn6b(KP675617) وn94b(KP675678) وCP10(MF462162) و B192A(KP674519) وs6(MZ266571) وSC1(KF953899) و 3(OM523859) و40(OM523859) وبعيدة جداً من العزلة16(OM523853).

ويتضح من الشجرة الوراثية للنوع(*C.parapsilosis* 2 (OR199905 شكل (4-43) انها قريبة من العزلات الاتية : AMC CP002(KU961982) وMD324(JQ697525) و small subunit ribosomal RNA gene(OM523854)17 وبعيدة جدا من العزلة 22-12(OK267872).

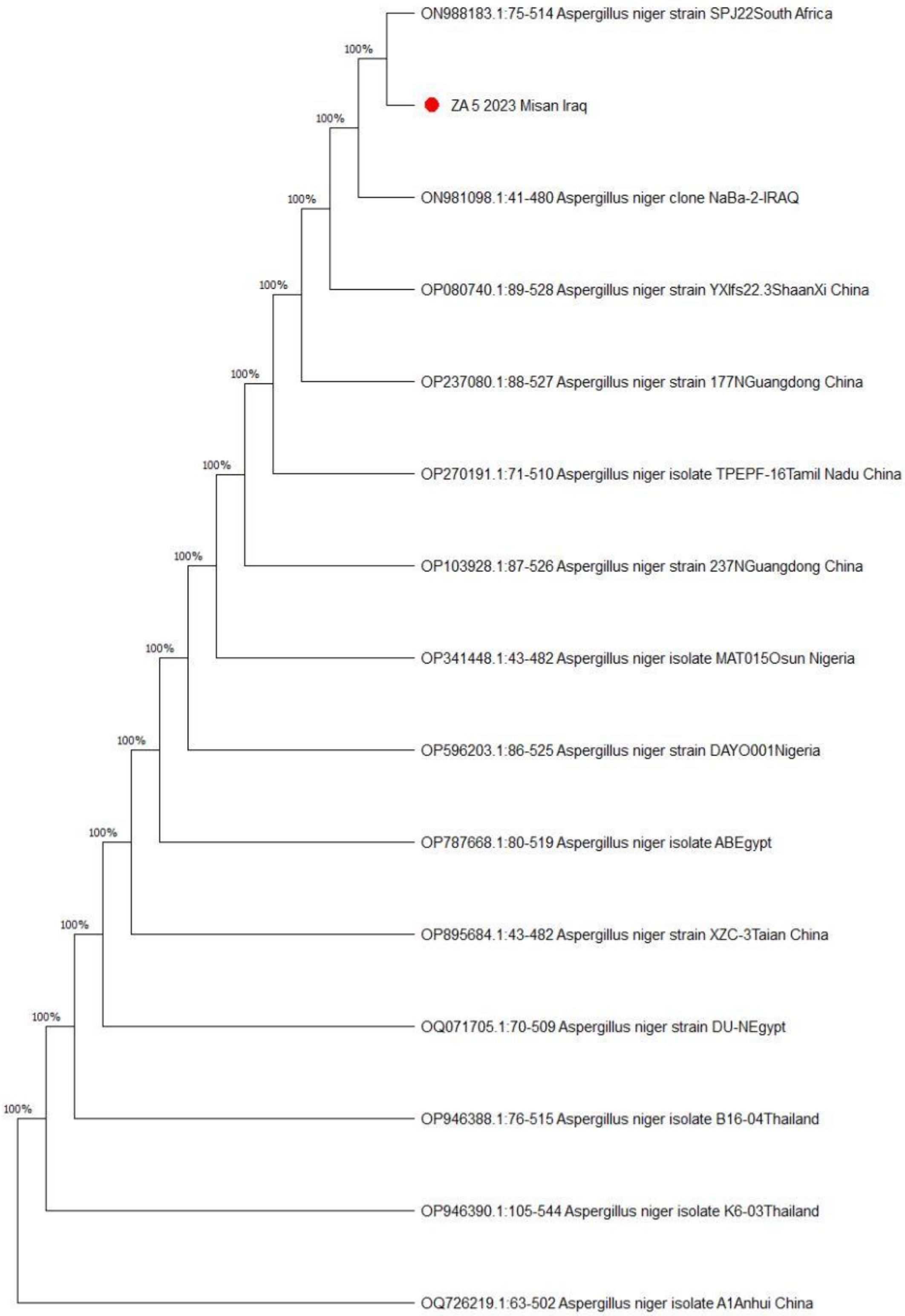
ويلاحظ من الشجرة الوراثية لعزلة للنوع *C.parapsilosis*3 (OR199906) شكل (4-44) انها قريبة جداً من العزلات التالية :Milk8(MN450873) وMilk10(MN450875)و 12DM09713(MN550571) وITP5(MN699481) وCBS60418S(MH545914) و6(MT443897) وبعيدة جداً من العزلة SLD-299(MH748692).

أما العزلة النوع(OR199907) 4 *C.parapsilosis* شكل (4-45) انها قريبة جداً من العزلات التالية :(B81524(MW616798 و(6H9 18Sribosomal RNA gene(KF619555 و(12-22(OK267872 و (15-23(OK267989 و 17small subunit ribosomal RNA gene(OM523854) وبعيدة جداً من العزلة NK S10 small subunit ribosomal RNA gene(KX548360) .

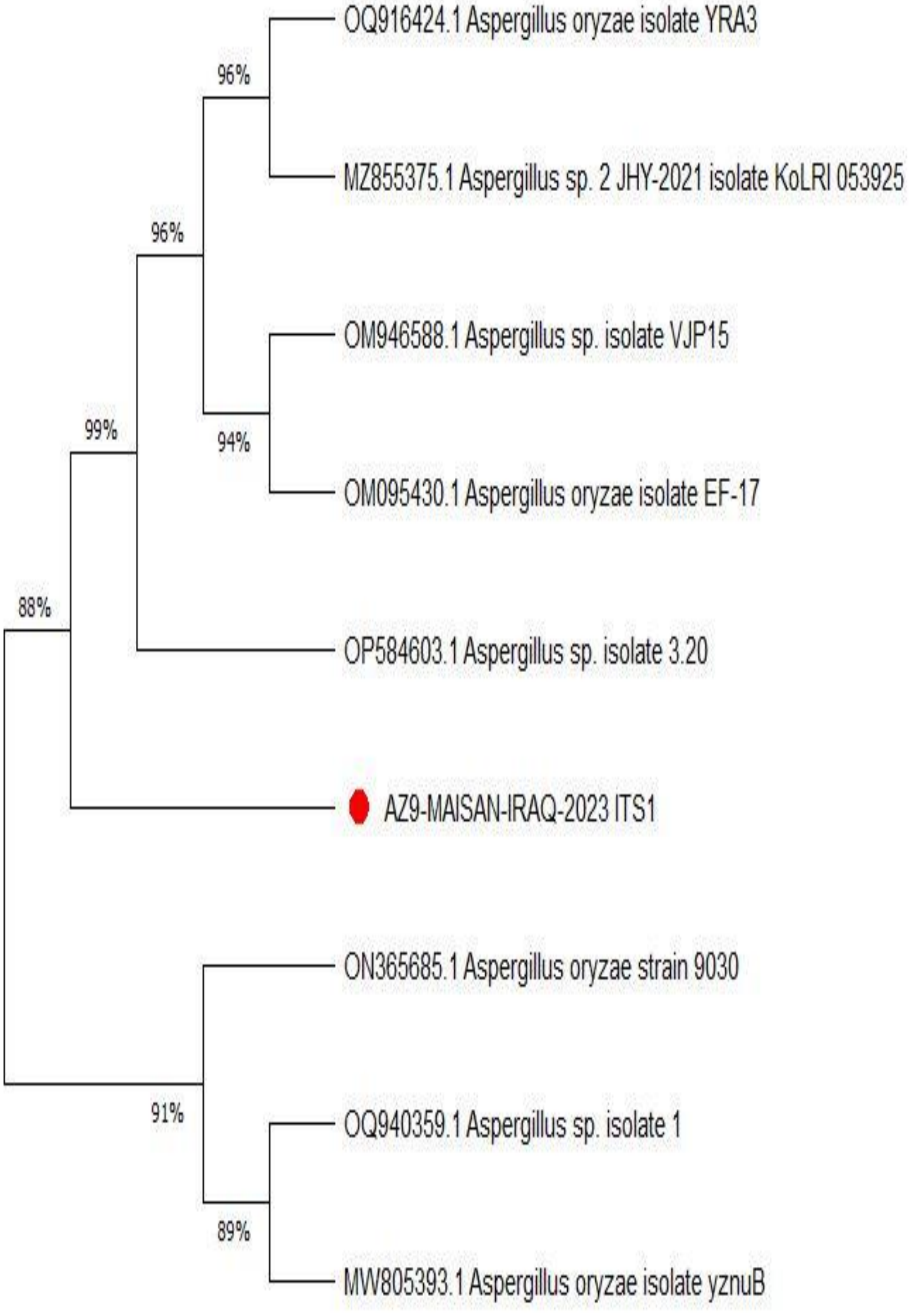
ويتضح من الشجرة الوراثية للنوع(OR195728) *C.tropicalis* شكل (4-46) انها قريبة جداً من العزلات التالية : (FC6865(MH628218 و(NCCPF:420229(MK356076 و(NCCPF:420231(MK356078 و(DMic 113918(MG009522 و DMic 144701(MG241513) و vaginal swab(MK752561) و(Pe1(MK752669 و(L2(MK752673 و(12DM22730(MN559590 وبعيدة جداً من العزلة (IYN77(MT377707.



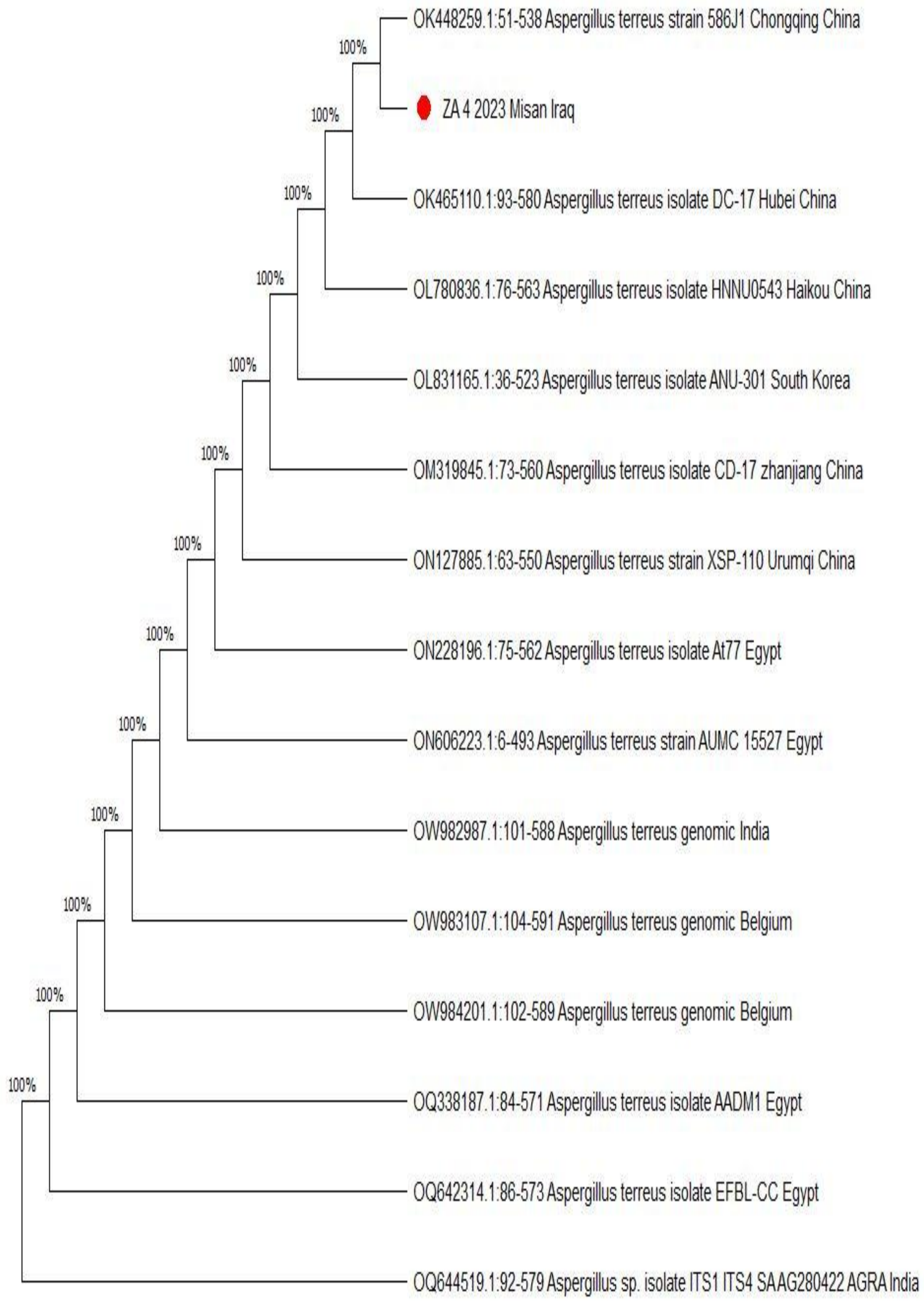
الشكل (4- 33) الشجرة الوراثية للعزلة *Aspergillus flavuas*



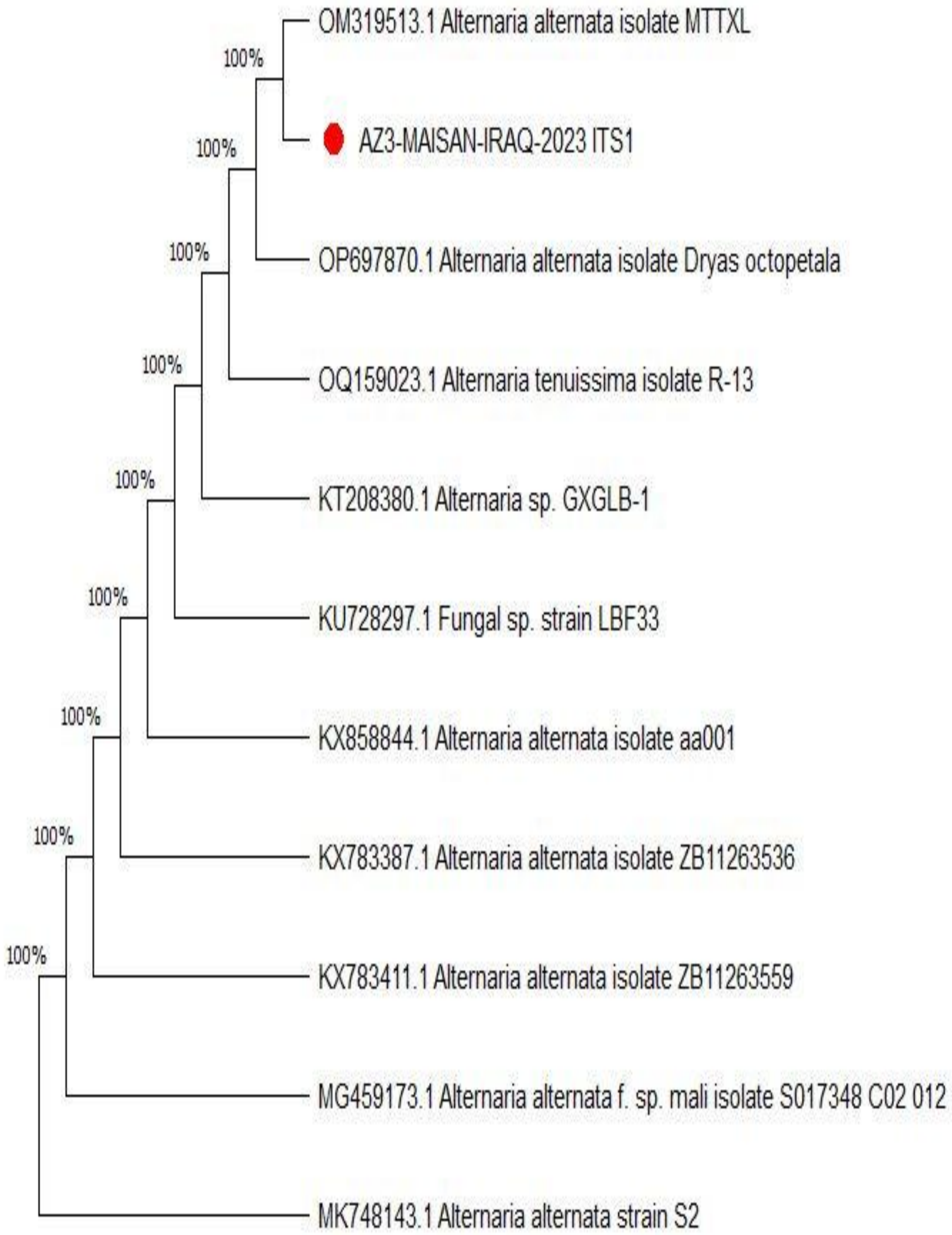
الشكل (4-34) الشجرة الوراثية للعزلة *Aspergillus niger*



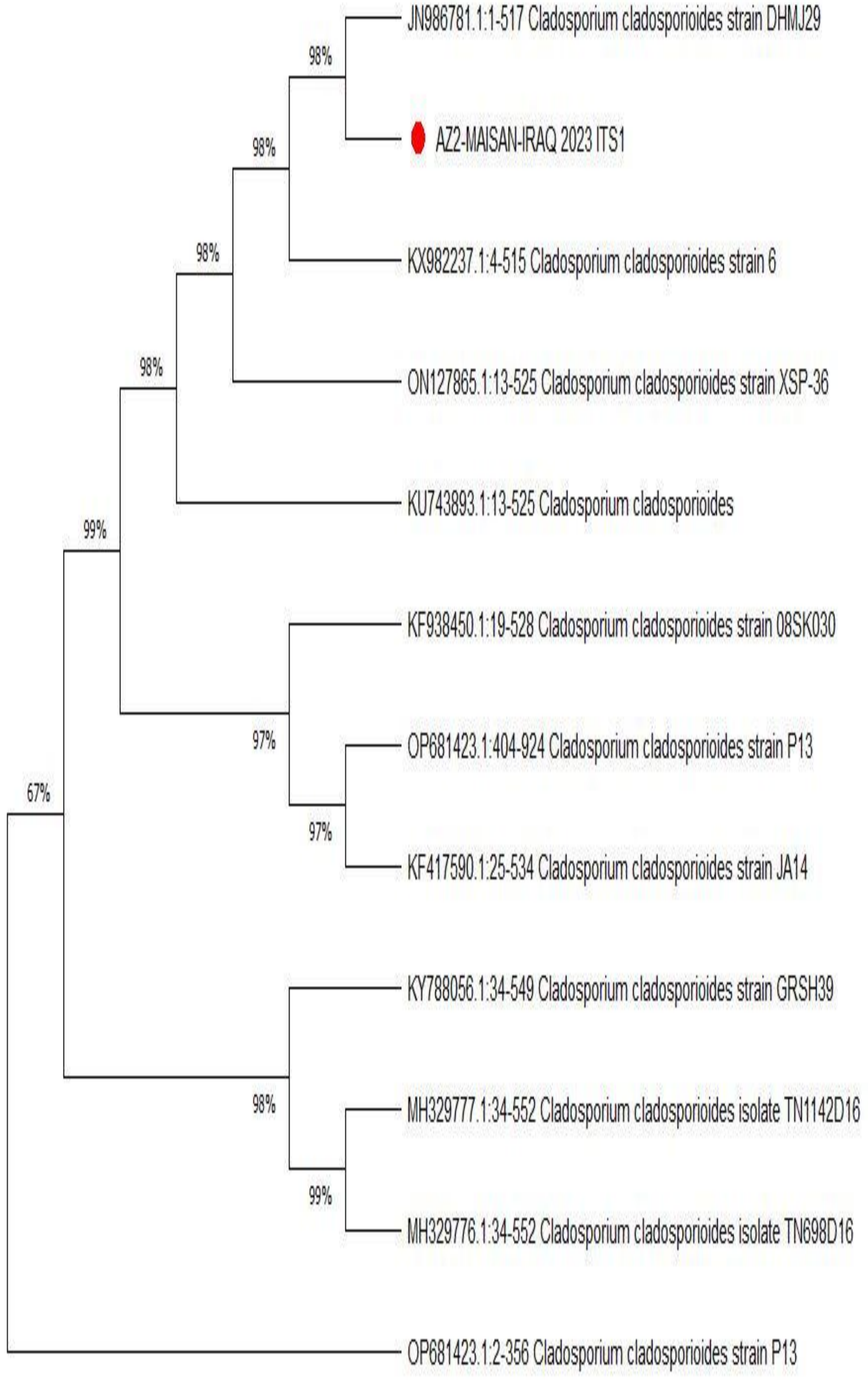
الشكل(4-35) الشجرة الوراثية للعزلة *Aspergillus oryzae*



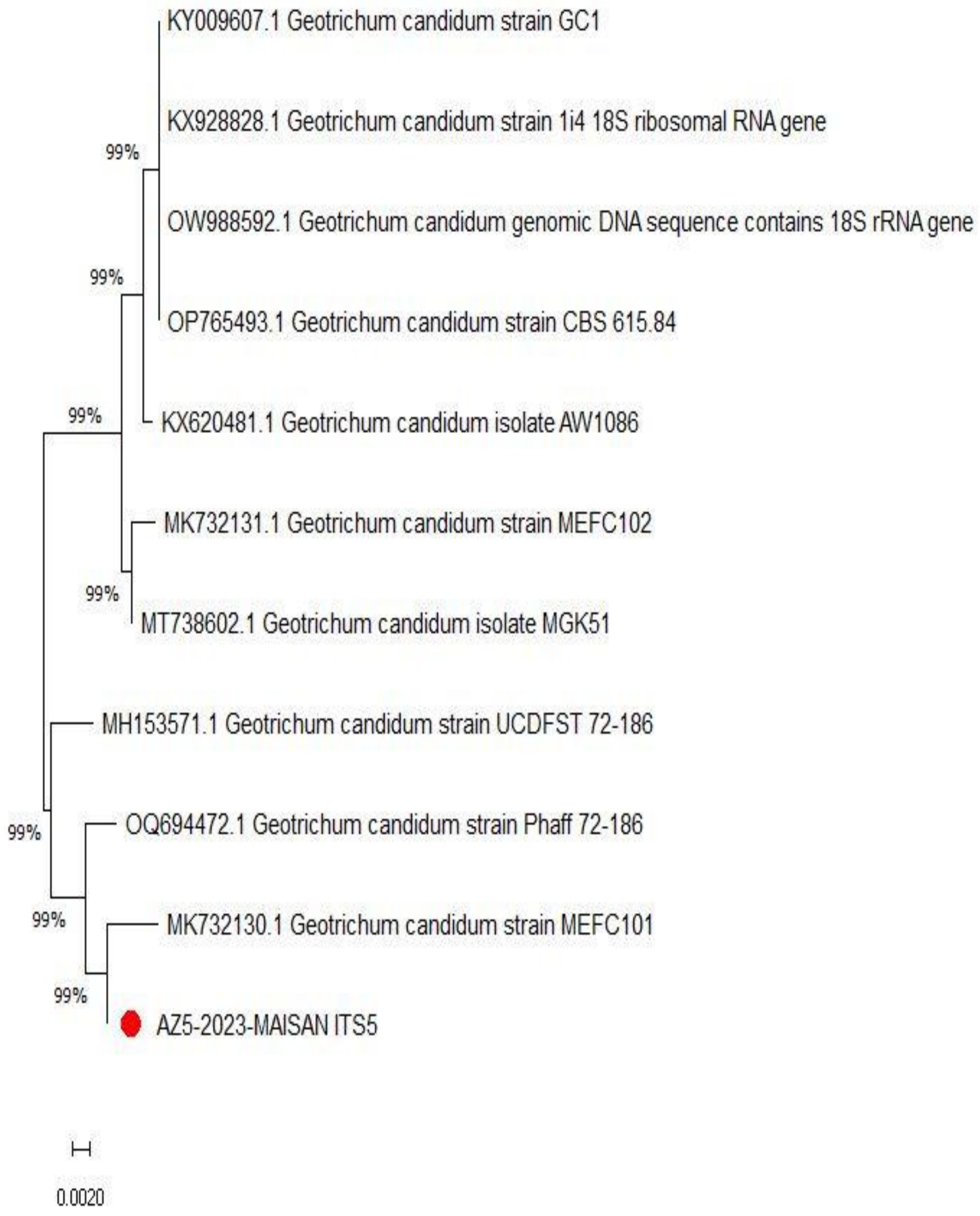
الشكل (4-36) الشجرة الوراثية للعزلة *Aspergillus terreus*



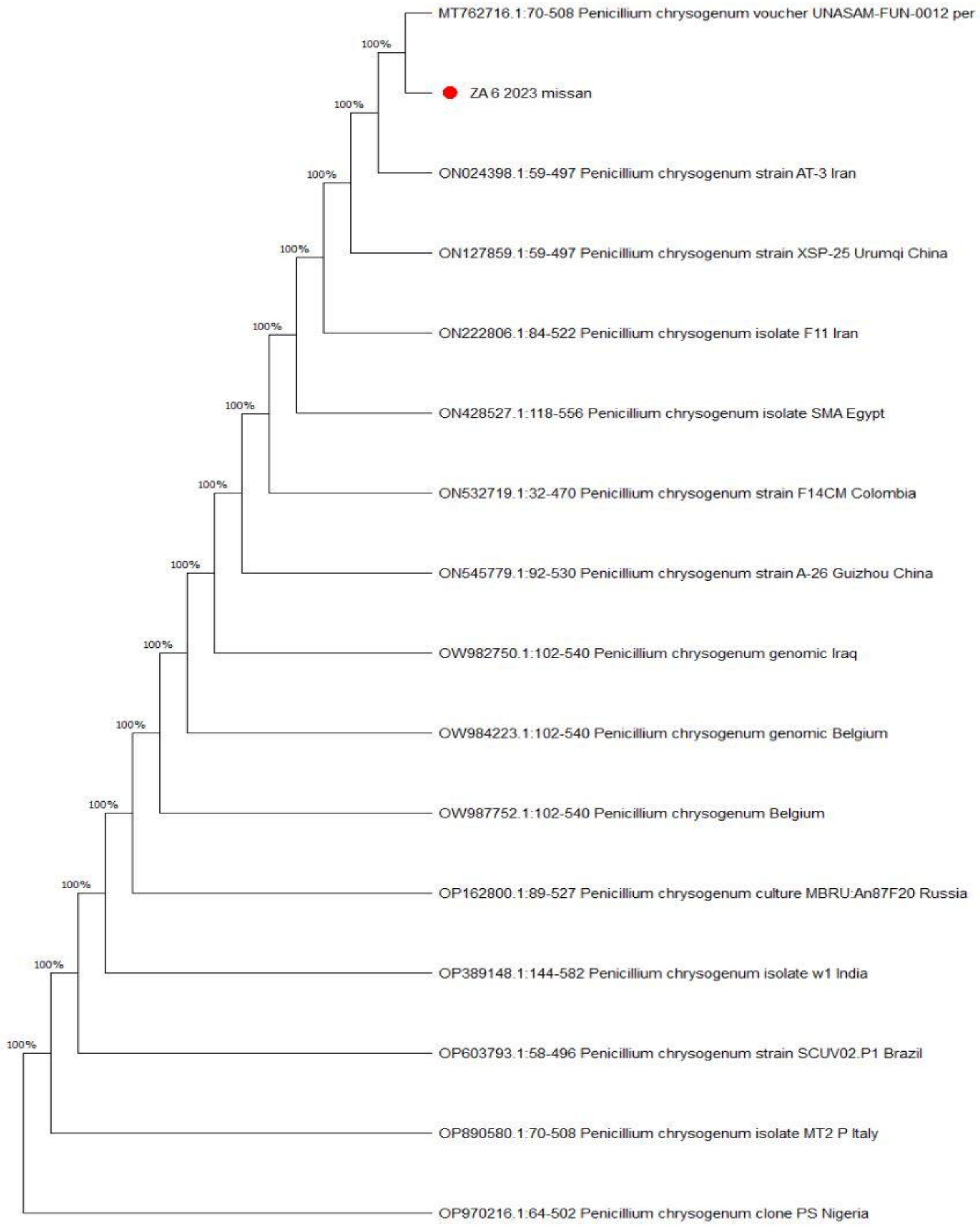
الشكل (4-37)الشجرة الوراثية للعزلة *Alternaria alternata*



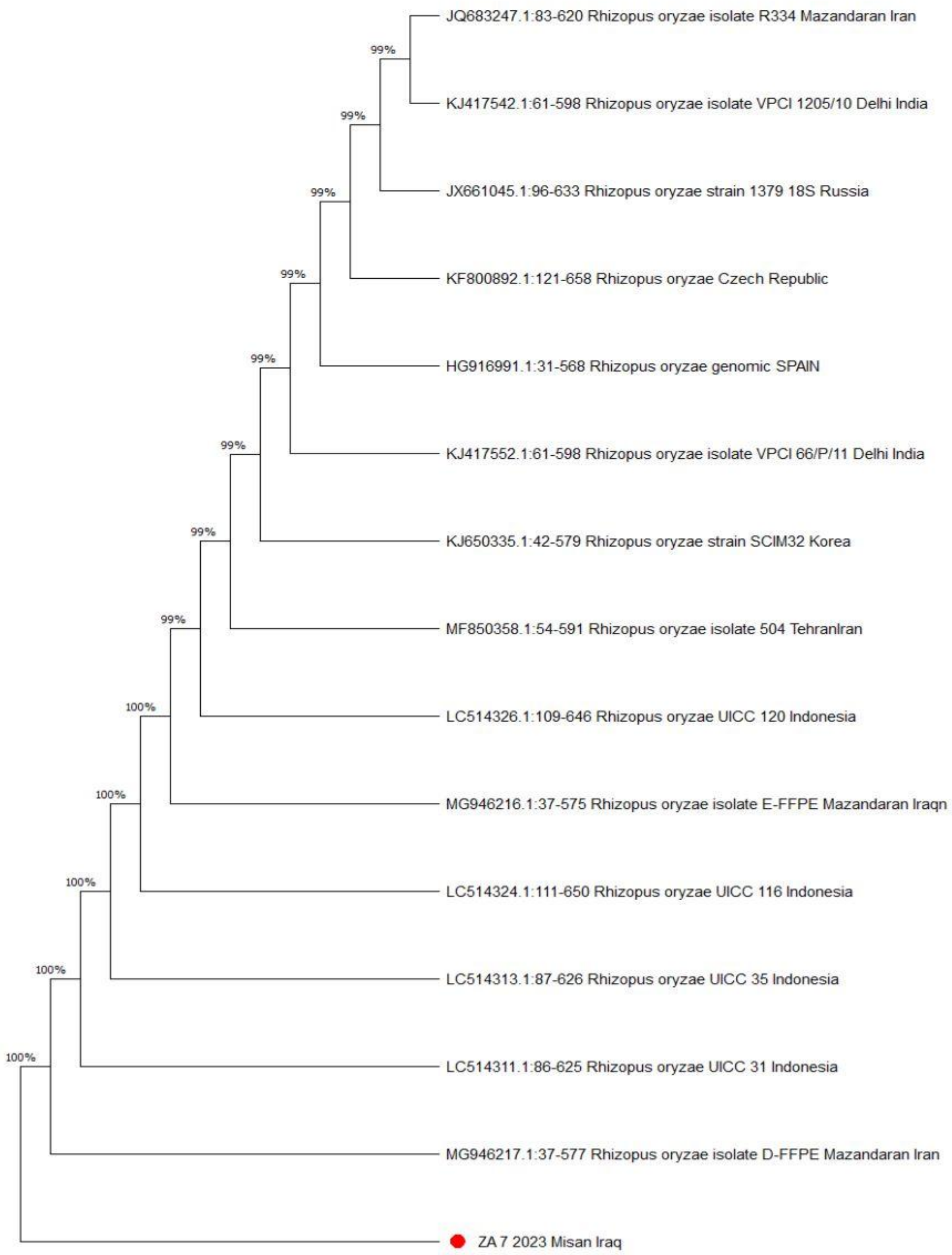
الشكل (4-38)الشجرة الوراثية للعزلة *Cladosporium cladosporioides*



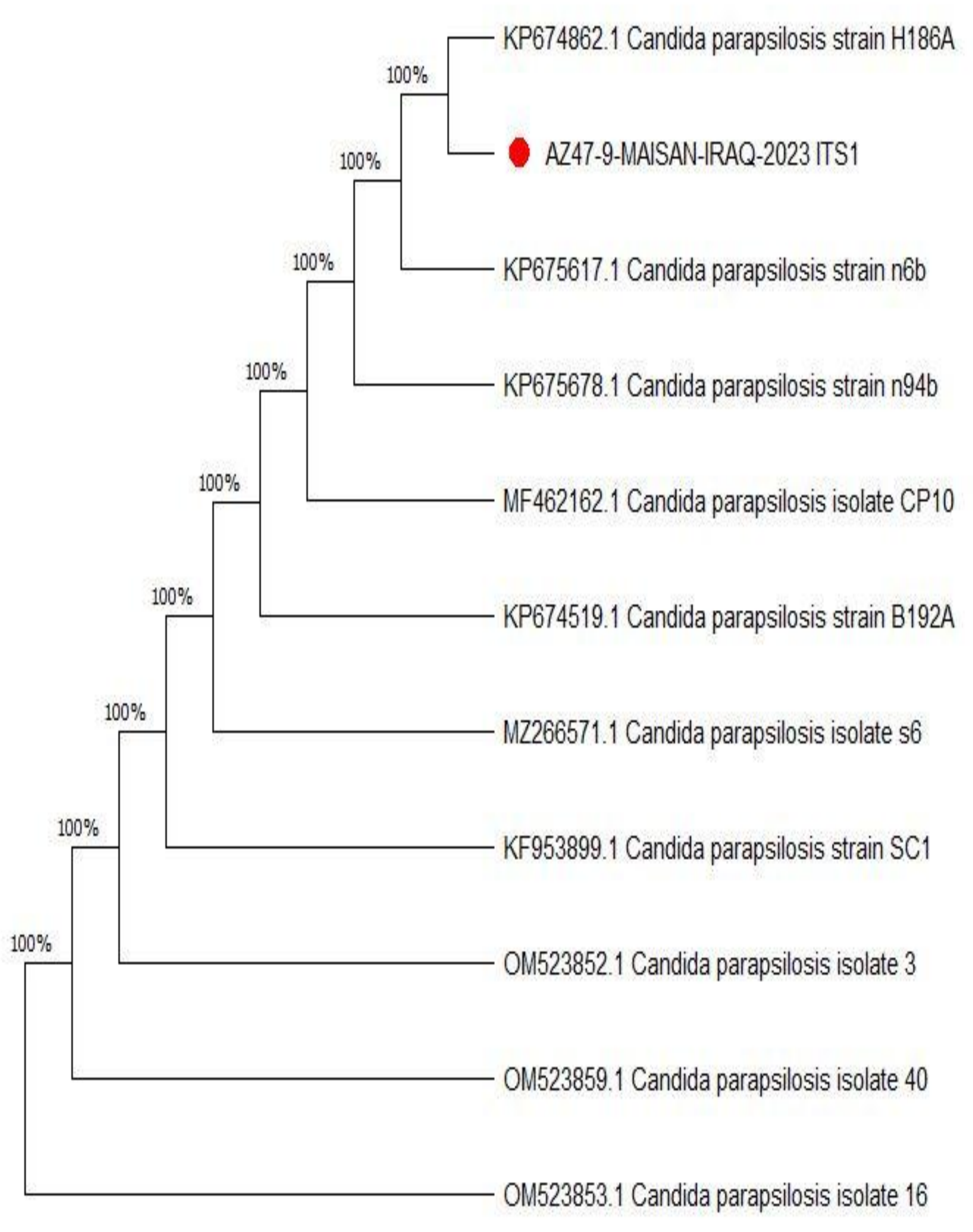
الشكل (4-39) الشجرة الوراثية للعزلة ***Geotrichium candidum***



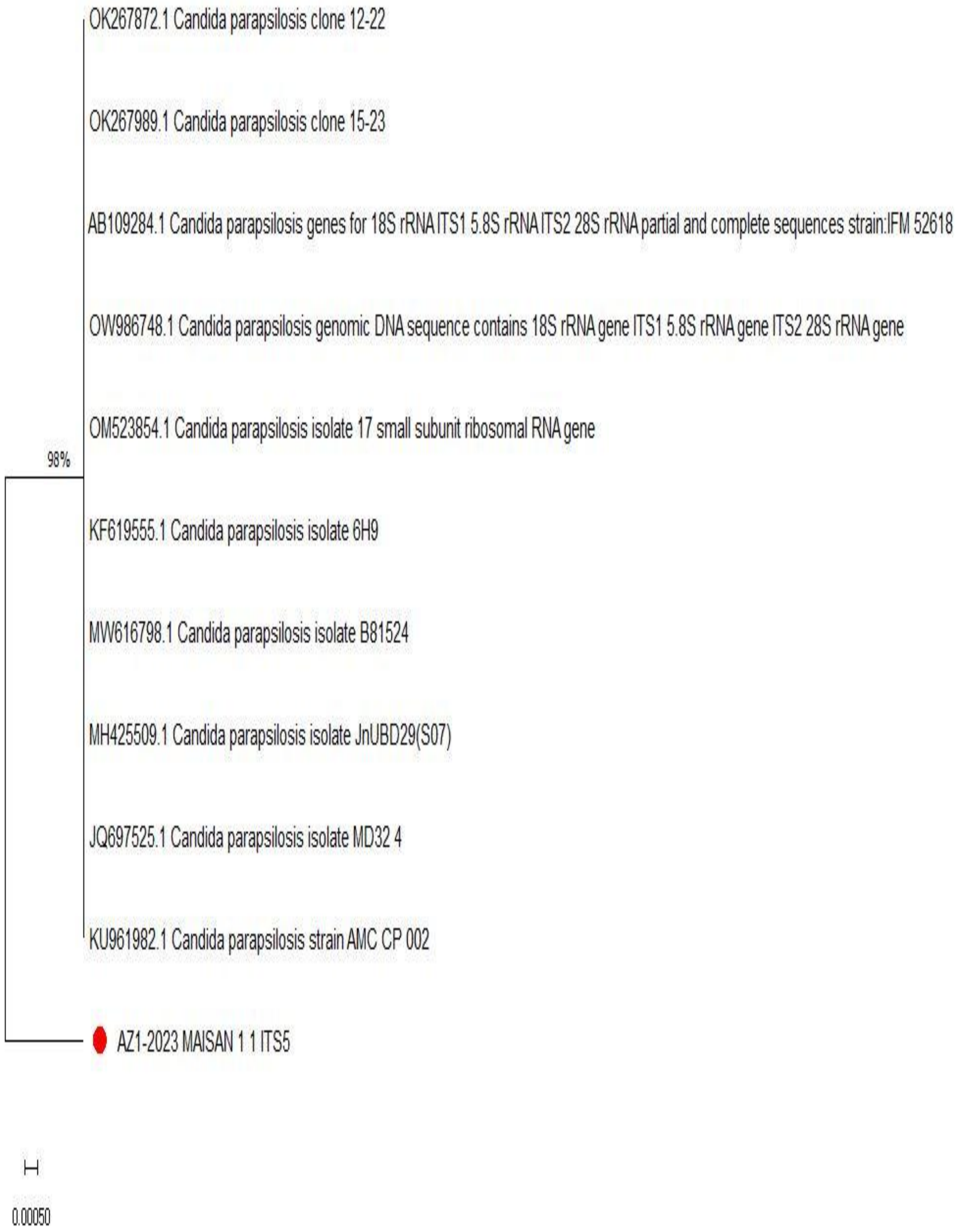
الشكل (4-40)الشجرة الوراثية للعزلة *Pencillium Chrysogenum*



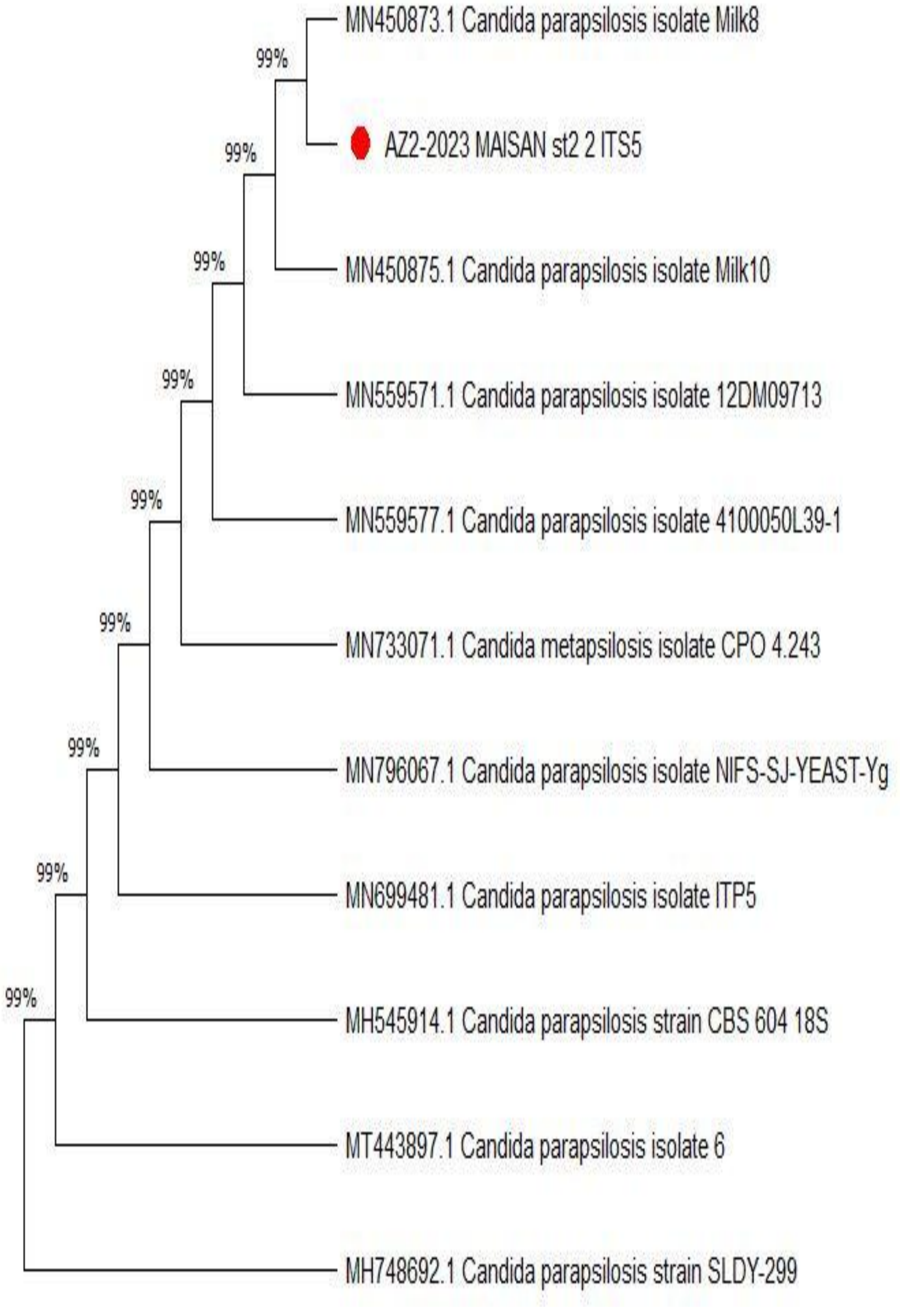
الشكل (4-41)الشجرة الوراثية للعزلة *Rhizopus oryzae*



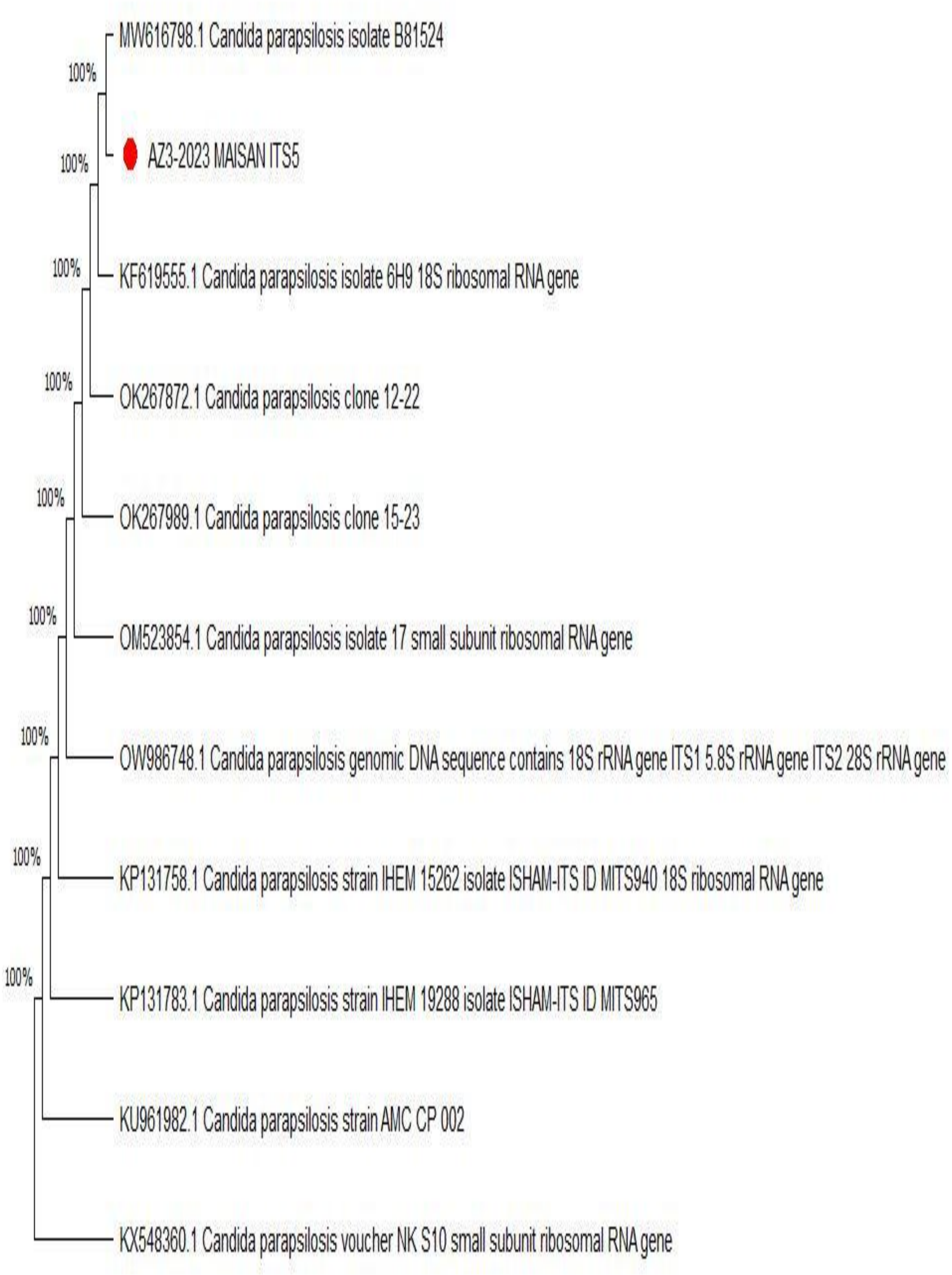
الشكل (4-42) الشجرة الوراثية للعزلة *C.parapsilosis1*



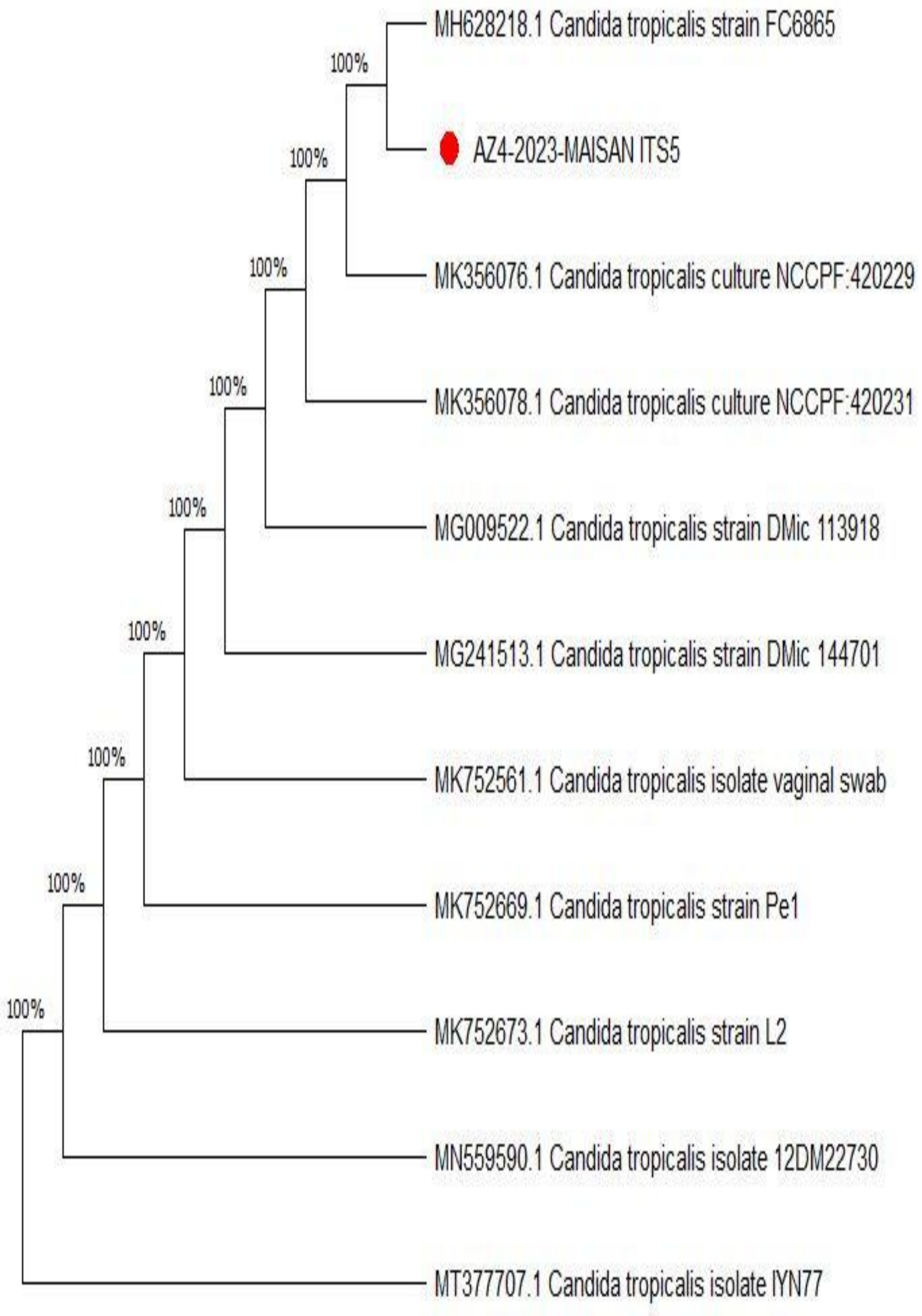
الشكل (4-43)الشجرة الوراثية للعزلة2 *C.parapsilosis*



الشكل (4-44) الشجرة الوراثية للعزلة3 *C.parapsilosis*



الشكل (4-45) الشجرة الوراثية للعزلة 4 *C.parapsilosis*



الشكل (4-46) الشجرة الوراثية للعزلة *C.tropicalis*

الإستنتاجات والتوصيات

Conclusions

and

Rrcommendations

الإستنتاجات Conclusions

من نتائج دراستنا الحالية يمكن ان نستنتج مايلي:

1- ظهرت الدراسة الحالية انتشار عدوى التهاب الاذن الفطري Otomycosis في محافظة ميسان.

2- وجد ان انواع الجنسين .*Aspergillus* spp و .*Candida* sp اكثر الأنواع المسببة لالتهاب الأذن الخارجي الفطري Otomycosis وإن النوع *A.niger* هو الاكثر ظهوراً وانتشاراً.

3- اظهرت الدراسة إن نسبة أصابة الأناث بـالفطريات الأذن الخارجية Otomycosis هي أعلى مما هي علية في الذكور ، والفئة العمرية بين (21-30) سنة هي الاكثر تعرضاً للأصابة مقارنةً مع الفئات الاخرى.بينما أقل نسبة أصابة سجلت في الفئة العمرية (11-20)سنة.

4- اظهرت الدراسات إن جميع العزلات الفطرية المختبرة والمعزولة من قناة الأذن الخارجية تمتلك القدرة على انتاج بعض الانزيمات وبنسب متفاوتة.

5- لم تظهر أي عزلة من الفطريات المرضية والخمائر المبيضات مقاومة للمستخلص الكحولي لنبات الثوم.

6- لوحظ من الدراسة الحالية إن أستخدام الطرق الجزيئية بواسطة تقنية الـ PCR وعمل التتابعات Sequence ومقارنة النتائج مع العزلات المسجلة في بنك الجينات NCBI أعطت نتائج ايجابية في التشخيص لبعض هذه الفطريات .

التوصيات Recommendations

1- اجراء دراسات اخرى مكملة عن التهابات الاذن الخارجية وتشمل التحري عن الكائنات الدقيقة الأخرى كالبكتريا نظراً لظهور نسبة معينة من الاشخاص يعانون من أصابات الاذن الخارجية لم تكن الفطريات سبب لها .

2- دراسة العلاقة بين الامراض التي تسبب ضعف المناعة كالامراض السكري والإصابة االفطرية .

3- اجراء دراسات اخرى تهتم بعوامل الضراوة ومنها المواد الايضية التي تفرزها هذه الفطريات ودورها في حدوث الامراضية.

4- اجراء العديد من الندوات والدورات لبيان اهمية هذه الاصابة وطرق الوقاية منها مثل الاهتمام بنظافة الاذن وعدم التعرض للرطوبة.

المصادر

References

المصادر العربية:

الجبوري ،إيناس عبد الله إبراهيم (2022). عزل وتشخيص المبيضات المرافقة لالتهاب المجاري البولية لدى النساء المصابات بالسكري .رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.

الخزعلي ، أفراح طالب عبد الله (2021). تقيم فعالية مستخلص ازهار البابونج Matricaria chamomilla على بعض انواع الفطريات المرضية المعزولة من اصابات سريرية مختلفة . رسالة ماجستير ، كلية التربية ،جامعة البصرة .

الخفاجي ، زهراء خضُير عباس(2017). توصيف بعض عوامل الضراوة والتعبير الجيني لانزيم Aspartly proteinase Secreted في المبيضات البيضاء المعزولة من داء المبيضات الفموي المعزولة من مرضى السرطان أطروحة .دكتوراه، كلية التربية /جامعة القادسية.

السامرائي، بثينة عبد الخالق عقيل (2009). تاثير مستخلصات نبات الدفلة على نمو بعض الفطريات المعزولة من مرضى مدينة سامراء.رسالة ماجستير ،جامعة تكريت .جمهورية العراق.عزل الفطريات الجلدية من الإنسان ودراسة تاثير المستخلصات النباتية والمضادات الفطرية عليها.

الظويهري، زهير حميد عبود (2007). تاثير مستخلصات بعض النباتات الطبية في معالجة بعض الاخماج البكترية والفطرية الجلدية السطحية، أطروحة دكتوراه، كلية العلوم ،الجامعة المستنصرية.

عبد الله ،زينب خلف (2015). دراسة تصنيفية وحياتية للفطريات الناقصة الملونة في محافظة البصرة .أطروحة دكتوراة، كلية التربية جامعة البصرة.

العمري ،عائشة وميض؛ الراوي ،اميرة محمود محمد رؤوف،وعد محمد(2017). التحري عن تكوين الأغشية الحيوية في بعض الجراثيم المرضية بأستخدام طريقتي الأنبوب واكار أحمر الكونغو.مجلة علوم الرافدين.24 (6)،55-65.

محمد، أريج لؤي (2020). عزل وتشخيص فطريات الاذن الخارجية لعدد من المصابين من مدينة سامراء وتحديد لبعض الجينات الضراوة . رسالة ماجستير ،كلية التربية ،جامعة سامراء.

مصطفى،محمد عبد المنعم (2007). المعالجة بالاعشاب الطبية.مجلة الاعجاز العلمي.العدد (24).

المصادر الأجنبية:

Aala, F., Yusuf, U. K., & Nulit, R. (2013). Electron microscopy studies of the effects of garlic extract against Trichophyton rubrum. *Sains Malaysiana*, *42*(11), 1585-1590.

Aala, F., Yusuf, U. K., Nulit, R., & Rezaie, S. (2014). Inhibitory effect of allicin and garlic extracts on growth of cultured hyphae. *Iranian journal of basic medical sciences*, *17*(3), 150.

Aala, F., Yusuf, U.K., Khodavandi, A. & Jamal, F. 2010. In vitro antifungal activity of allicin alone and in combination with two mediations against six dermatophytic fungi. *African Journal of Microbiology Research* 4(5): 380-385.

Abad, M. J., Ansuategui, M., & Bermejo, P. (2007). Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*, *7*(11), 6-145.

Abbas, J., Bodey, G. P., Hanna, H. A., Mardani, M., Girgawy, E., Abi-Said, D., ... & Raad, I. (2000). Candida krusei fungemia: an escalating serious infection in immunocompromised patients. *Archives of internal medicine*, *160*(17), 2659-2664.

Abdelazeem, M., Gamea, A., Mubarak, H., & Elzawawy, N. (2015). Epidemiology, causative agents, and risk factors affecting human otomycosis infections. *Turkish journal of medical sciences*, *45*(4), 820-826.

Abdel-Raheem, A., and Shearer, C.A. (2002). Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. *Fungal Diversity*, 11: pp.1-19.

Aboul-Nasr, M. B., & Obied-Allah, M. R. A. (2013). Biological and chemical detection of fumonisins produced on agar medium by Fusarium verticillioides isolates collected from corn in Sohag, Egypt. *Microbiology*, *159*(Pt_8), 1720-1724.

Aboul-Nasr, M. B., Zohri, A. N. A., & Amer, E. M. (2013). Enzymatic and toxigenic ability of opportunistic fungi contaminating intensive care

units and operation rooms at Assiut University Hospitals, Egypt. *SpringerPlus*, *2*(1), 1-6.

Aboutalebian, S., Ahmadikia, K., Fakhim, H., Chabavizadeh, J., Okhovat, A., Nikaeen, M., & Mirhendi, H. (2021). Direct detection and identification of the most common bacteria and fungi causing otitis externa by a stepwise multiplex PCR. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *11*, 644060.

Aboutalebian, S., Mahmoudi, S., Mirhendi, H., Okhovat, A., Abtahi, H., & Chabavizadeh, J. (2019). Molecular epidemiology of otomycosis in Isfahan revealed a large diversity in causative agents. *Journal of medical microbiology*, *68*(6), 918-923.

Agarwal, P., & Devi, L. S. (2017). Otomycosis in a rural community attending a tertiary care hospital: assessment of risk factors and identification of fungal and bacterial agents. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, *11*(6), DC14.

Ahmed, S., Babiker, F. A. M., Abuzeid, N., & Ahmed, M. H. (2021). Eumycetoma of the Ear in a 13-Year-Old Boy: A Rare Presentation in ENT Clinic in a Tropical Country. *Ear, Nose & Throat Journal*, *100*(10_suppl), 1122S-1124S.

Ahuja, S., Bansal, A., Pandey, A., Madan, M., & Gupta, D. K. (2017). A clinico-mycological study of otomycosis from a tertiary care hospital in western Uttar Pradesh. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, *6*(45), 3493-3498.

Aktas, E., Yigit, N., & Ayyildiz, A. (2002). Esterase activity in various Candida species. *Journal of international medical research*, *30*(3), 322-324.

Al Mosaid, A., Sullivan, D., Salkin, I. F., Shanley, D., & Coleman, D. C. (2001). Differentiation of Candida dubliniensis from Candida albicans

on Staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar. *Journal of clinical microbiology*, *39*(1), 323-327.

Al-Abbasi, A. M., & Al Sadoon, B. A. (2011). OTOMYCOSIS IN BASRAH-IRAQ. *Journal of the Arab Board of Health Specializations Vol*, *12*(2).

Alexander, B. D., Johnson, M. D., Pfeiffer, C. D., Jiménez-Ortigosa, C., Catania, J., Booker, R., ... & Pfaller, M. A. (2013). Increasing echinocandin resistance in Candida glabrata: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clinical infectious diseases*, *56*(12), 1724-1732.

Ali, K., Hamed, M. A., Hassan, H., Esmail, A., & Sheneef, A. (2018). Identification of fungal pathogens in otomycosis and their drug sensitivity: our experience. *International archives of otorhinolaryngology*, *22*(04), 400-403.

Al-Laaeiby, A., Ali, S., & Al-Saadoon, A. H. (2019). Candida species: the silent enemy. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, *20*(4), 260-267.

Allam, A. A. E., Tantawy, A. E. E., Mohamed, K. A. E., Morad, E. A., & El Shafei, M. A. E. (2020). otitis externa in a tertiary care hospital in zagazig, Egypt: isolated pathogens and their antibiotic sensitivity patterns. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, *21*(1), 60-65.

Almeida, R. S., Wilson, D., & Hube, B. (2009). *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS yeast research*, *9*(7), 1000-1012.

AL-Rubayae, I. M. et al., (2013) (Ph.D thesis). Isolation and Identification of *Candida* species Associated with Urinary Tract Infections. University of Basra/ collage of Science/ Department of Biology.

References المصادر

Alshaikh, N. A., & Perveen, K. (2021). Susceptibility of Fluconazole-Resistant *Candida albicans* to Thyme Essential Oil. *Microorganisms*, *9* (12), 2454.

Al-Sharrad, N., Al-Kataan, M. A., & Al-Rejaboo, M. A. (2021). Isolation and Identification of Fungal Isolates caused Otomycosis from some Hospitals and Clinics in Mosul with Determination of Their Virulence Factors. *Al-Qadisiyah Journal of Pure Science*, *26*(4), 210-220.

Aneja, K. R., Sharma, C., & Joshi, R. (2010). Fungal infection of the ear: a common problem in the north eastern part of Haryana. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, *74*(6), 604-607.

Angiolella, L., Vavala, E., Ragno, R., Colone, M.,& Stringaro, A. (2010) *ISTISAN Congressi 10/C8*, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.

Antoniadou, A. (2009). Outbreaks of zygomycosis in hospitals. *Clinical Microbiology and Infection*, *15*, 55-59.

Anwar, K., & Gohar, M. S. (2014). Otomycosis; clinical features, predisposing factors and treatment implications. *Pakistan journal of medical sciences*, *30*(3), 564.

Aremu, S. K., Adewoye, K. R., & Ibrahim, T. (2020). A prospective analysis of otomycosis in a tertiary care hospital. *International Journal of Tropical Diseases*, *3*(1).

Argaw-Denboba, A., Abejew, A. A., & Mekonnen, A. G. (2016). Antibiotic-resistant bacteria are major threats of otitis media in Wollo Area, Northeastern Ethiopia: a ten-year retrospective analysis. *International journal of microbiology*, *2016*.

ASHOPA, V., VERMA, U., NAREDA, P., GUPTA, E., & PRAKASH, P. (2020). Assessment of Risk Factors and Microbial Profile of Otomycosis in Patients Attending Tertiary Level Hospital of Western Rajasthan, India. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, *14*(2).

Aslam ,M.D.I;Roy , S.P., (2013) . Antifungal potentiality of Syzicum aromaticum against the fungi Penicilium notatum and Aspergillus niger . *Indian Journal of fundamental and applied life Science* ISSN Vol 3(1) : 33 – 35.

Aslam, A. (2016). *Prevalence, Antifungal Susceptibility and Biofilm Characterization of Candida Species Isolated from Tertiary Care Hospitals, Rawalpindi, Pakistan* (Doctoral dissertation, Quaid-i-Azam University Islamabad).

Atiencia-Carrera, M. B., Cabezas-Mera, F. S., Tejera, E., & Machado, A. (2022). Prevalence of biofilms in Candida spp. bloodstream infections: A meta-analysis. *PLoS One*, *17*(2), e0263522.

Ávila-Uribe, M. M., García-Zárate, S. N., Sepúlveda-Barrera, A. S., & Godínez-Rodríguez, M. A. (2016). Plantas medicinales en dos poblados del municipio de San Martín de las Pirámides, Estado de México. *Polibotánica*, (42), 215-245.

Ayyanar, M., & Ignacimuthu, S. (2009). Herbal medicines for wound healing among tribal people in Southern India: Ethnobotanical and Scientific evidences. *International journal of Applied research in Natural products*, *2*(3), 29-42.

Balajee, S. A., Kano, R., Baddley, J. W., Moser, S. A., Marr, K. A., Alexander, B. D., ... & Chiller, T. (2009). Molecular identification of Aspergillus species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *Journal of clinical microbiology*, *47*(10), 3138-3141.

Balouchi, M., Berjis, N., & Okhovat, A. R. (2006). The frequency of fungul infections of externa ear. *Isfahan Med J*, 24(82), 72-5.

Bandana, K., Jashandeep, K., & Jagdeep, K. (2018). Phospholipases in bacterial virulence and pathogenesis. *Adv Biotechnol Microbiol*, *10*(5),1-8.

References المصادر

Barati, B., Okhovvat, S. A. R., Goljanian, A., & Omrani, M. (2011). Otomycosis in central Iran: a clinical and mycological study. *Iranian red crescent medical journal*, *13*(12), 873.

Barnes, P., Vieira, R., Harwood, J., & Chauhan, M. (2017). Self-taken vaginal swabs versus clinician-taken for detection of candida and bacterial vaginosis: a case-control study in primary care. *British Journal of General Practice*, *67*(665), e824-e829.

Baron, E. J., Peterson, L. R., & Finegold, S. M. (1994). Bailey & Scott's diagnostic microbiology, Mosby-Year Book. *Inc., St. Louis*.

Bassetti, M., Peghin, M., & Timsit, J. F. (2016). The current treatment landscape: candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71*(suppl_2), ii13-ii22.

Batiha, G. E. S., Alkazmi, L. M., Wasef, L. G., Beshbishy, A. M., Nadwa, E. H., & Rashwan, E. K. (2020). Syzygium aromaticum L.(Myrtaceae): traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. *Biomolecules*, *10*(2).

Beardsley, J., Halliday, C. L., Chen, S. C., & Sorrell, T. C. (2018). Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. *Future microbiology*, *13*(10), 1175-1191.

Beighton, D., Ludford, R., Clark, D. T., Brailsford, S. R., Pankhurst, C. L., Tinsley, G. F., ... & Khalifa, N. (1995). Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. *Journal of clinical microbiology*, *33*(11), 3025-3027.

Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2012). The genus cladosporium. *Studies in mycology*, *72*, 1-401.

Berkow, E. L., & Lockhart, S. R. (2017). Fluconazole resistance in Candida species: a current perspective. *Infection and drug resistance*, 237-245.

Bhatti, H. N., Mustafa, G., & Asgher, M. (2007). Production of glucoamylase by Fusarium moniliforme under solid-state fermentation. *JOURNAL-CHEMICAL SOCIETY OF PAKISTAN*, *29*(2), 161.

Bhavan, P. S., Rajkumar, R., Radhakrishnan, S., Seenivasan, C., & Kannan, S. (2010). Culture and Identification of Candida albicans from Vaginal Ulcer and Separation of Enolase on SDS-PAGE. *International Journal of Biology*, *2*(1), 84.

Birch, M., Denning, D. W., & Robson, G. D. (2004). Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental Aspergillus fumigatus isolates. *Medical mycology*, *42*(1), 81-86.

Bırınci, A., & Bılgın, K. (2014). Investigation of acid proteinase and phospholipase activity as virulence factors in clinical Aspergillus spp. isolates. *Mikrobiyoloji Bulteni*, *48*(3), 491-494.

Bojanović, M., Ignjatović, A., Stalević, M., Arsić-Arsenijević, V., Ranđelović, M., Gerginić, V., ... & Otašević, S. (2022). Clinical Presentations, Cluster Analysis and Laboratory-Based Investigation of Aspergillus Otomycosis—A Single Center Experience. *Journal of Fungi*, *8*(3), 315.

Borst, A., & Fluit, A. C. (2003). High levels of hydrolytic enzymes secreted by Candida albicans isolates involved in respiratory infections. *Journal of medical microbiology*, *52*(11), 971-974.

Bretagne, S., & Costa, J. M. (2006). Towards a nucleic acid-based diagnosis in clinical parasitology and mycology. *Clinica Chimica Acta*, *363*(1-2), 221-228.

Bugni, T. S., & Ireland, C. M. (2004). Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural product reports*, *21*(1), 143-163.

Bussmann, R. W., & Sharon, D. (2015). Plantas medicinales de los Andes y la Amazonia. La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú. In *Plantas medicinales de los Andes y la Amazonia. La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú* (pp. 292-292).

Canela, H. M. S., Cardoso, B., Vitali, L. H., Coelho, H. C., Martinez, R., & Ferreira, M. E. D. S. (2018). Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of Candida spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses*, *61*(1), 11-21.

Caudle, K. E. (2010). *Transcriptional regulation of azole antifungal resistance and tolerance in Candida glabrata*. The University of Tennessee Health Science Center.

Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). Candida biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in medicine*, *5*, 28.

Chander, J. (2017). *Textbook of medical mycology*. JP Medical Ltd.

Chang, A., Neofytos, D., & Horn, D. (2008). *Candidemia in the 21st century*

Chappe, M., Vrignaud, S., de Gentile, L., Legrand, G., Lagarce, F., & Le Govic, Y. (2018). Successful treatment of a recurrent Aspergillus niger otomycosis with local application of voriconazole. *Journal de mycologie medicale*, *28*(2), 396-398.

Cheesbrough, M. (2005). *District laboratory practice in tropical countries, part 2*. Cambridge university press.

Chudzik, B., Malm, A., Rajtar, B., Kolodziej, S., & Polz-Dacewicz, M. A. (2010). The fresh extracts of Allium species as potential in vitro agents against planktonic and adherent cells of Candida spp. *Ann Univ Mariae Curie-Sklodowska, DDD Pharm*, *23*(1), 73-78.

Claudia, S., & Dario, L. (2013). Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed research international*, 2013.

Collee, J. G., Miles, R. S., & Watt, B. (1996). Tests for identification of bacteria. *Mackie and McCartney practical medical microbiology*, *14*, 131-49.

Contesini, F. J., Lopes, D. B., Macedo, G. A., da Graça Nascimento, M., & de Oliveira Carvalho, P. (2010). Aspergillus sp. lipase: potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *67*(3-4), 163-171.

Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (Syzygium aromaticum): a precious spice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, *4*(2), 90-96.

Croft, J. H., Bhattacherjee, V., & Chapman, K. E. (1990). RFLP analysis of nuclear and mitochondrial DNA and its use in Aspergillus systematics. *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*, 309-320.

D'hooge, E., Becker, P., Stubbe, D., Normand, A. C., Piarroux, R., & Hendrickx, M. (2019). Black aspergilli: A remaining challenge in fungal taxonomy?. *Medical mycology*, *57*(6), 773-780.

Da Silva, B. C. M., Auler, M. E., Ruiz, L. D. S., Gandra, R. F., Dos Santos, J. I., Paula, C. R., ... & Gambale, W. (2005). Trichophyton rubrum isolated from AIDS and human immunodeficiency virus-infected patients in São Paulo, Brazil: antifungal susceptibility and extracellular enzyme production. *Chemotherapy*, *51*(1), 21-26.

Dal Pizzol, M., Freitas, E. C., Locatelli, C., Guareze, F., Reginatto, P., Machado, G., ... & Marinho, D. (2021). Antifungal efficacy and safety of cycloheximide as a supplement in optisol-GS. *Drug Design, Development and Therapy*, 2091-2098.

Darah, I., Nisha, M., & Lim, S. H. (2013). Enhancement of polygalacturonase production from Enterobacter aerogenes NBO2 by submerged fermentation. *Advanced Studies in Biology*, *5*(5), 173-189.

De Greef, D., Barton, E. M., Sandberg, E. N., Croley, C. R., Pumarol, J., Wong, T. L., ... & Bishayee, A. (2021, August). Anticancer potential of garlic and its bioactive constituents: A systematic and comprehensive review. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 73, pp. 219-264). Academic Press.

de Hoog, G. S., & Smith, M. T. (2011). Geotrichum Link: Fries (1832). In *The Yeasts* (pp. 1279-1286). Elsevier.

De Vries, G. A. (1952). Contribution to the knowledge of the genus Cladosporium Link ex Fr. *Contribution to the knowledge of the genus Cladosporium Link ex Fr*.

Deepa, K., Jeevitha, T., & Michael, A. (2015). In vitro evaluation of virulence factors of Candida species isolated from oral cavity. *Journal of Microbiology and antimicrobials*, *7*(3), 28-32.

Demirel, R., Sariozlu, N. Y., & İlhan, S. (2013). Polymerase chain reaction (PCR) identification of terverticillate Penicillium species isolated from agricultural soils in eskişehir province. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *56*, 980-984.

Desai, K. J., Malek, S. S., Italia, I. K., Jha, S., Pandya, V., & Shah, H. (2012). Fungal spectrum in otomycosis at tertiary care hospital.

Deshmukh, J., Surpam, R., Band, A., Jalgaon, K. D., & India, M. (2014). Mycological study of Aspergillus infections in otomycosis in eastern part of Maharashtra. *Int J Health Sci Res*, *4*(10), 77-82.

Dundar, R., & İynen, İ. (2019). Single dose topical application of clotrimazole for the treatment of otomycosis: is this enough?. *Journal of Audiology & Otology*, *23*(1), 15.

Dupont B, Richardson M, Verweij PE, Meis FGM. Invasive aspergillosis. Med Mycol 2000; 38(1):215–24.

Egunsola, O., Adefurin, A., Fakis, A., Jacqz-Aigrain, E., Choonara, I., & Sammons, H. (2013). Safety of fluconazole in paediatrics: a systematic review. *European journal of clinical pharmacology*, *69*, 1211-1221.

El-Diasty, E. M., Ahmed, M. A., Okasha, N. A. G. W. A., Mansour, S. F., El-Dek, S. I., El-Khalek, H. M. A., & Youssif, M. H. (2013). Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against dermatophytic lesions of cattle. *Romanian Journal of Biophysics*, *23*(3), 191-202.

Ellis, D. H. (1994). *Clinical mycology: The human opportunistic mycoses*. Pfizer Incorporated.

Ellis, D. H., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R., & Bartley, R. (2007). *Descriptions of medical fungi* (Vol. 2). Adelaide: University of Adelaide.

Emmons, C. W., Binford, C. H., & Utz, J. P. (1970). *Medical mycology*. Lea Fibiger, 185-199 .

Espinel-Ingroff, A., & Cantón, E. (2007). Antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrobial susceptibility testing protocols. Taylor & Francis Group LLC*, 173-208.

Faggi, E., Pini, G., Campisi, E., Bertellini, C., Difonzo, E., & Mancianti, F. (2001). Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *Journal of clinical microbiology*, *39*(9), 3382-3385.

Fasunla, J., Ibekwe, T., & Onakoya, P. (2008). Otomycosis in western Nigeria. *Mycoses*, *51*(1), 67-70.

Fatahinia, M., Poormohamadi, F., & Mahmoudabadi, A. Z. (2015). Comparative study of esterase and hemolytic activities in clinically important Candida species, isolated from oral cavity of diabetic and non-diabetic individuals. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *8*(3).

Febriyanti R, & Aldi BR. 2012. Pengaruh antifungi atsiri daun cengkeh (Syzygium aromaticum (L.) Merr. Perry). Parapemikir*: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 1(2).

Frisvad, J. C., Møller, L. L., Larsen, T. O., Kumar, R., & Arnau, J. (2018). Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, and Trichoderma reesei. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*, 9481-9515.

Gales, A. C., Pfaller, M. A., Houston, A. K., Joly, S., Sullivan, D. J., Coleman, D. C., & Soll, D. R. (1999). Identification of Candida dubliniensis based on temperature and utilization of xylose and α-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC systems. *Journal of clinical microbiology*, *37*(12), 3804-3808.

Gallegos-Zurita, M. (2016, October). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 77, No. 4, pp. 327-332). UNMSM. Facultad de Medicina.

Gandhi, T. N., Patel, M. G., & Jain, M. R. (2015). Antifungal susceptibility of Candida against six antifungal drugs by disk diffusion method isolated from vulvovaginal candidiasis. *International Journal of Current Research and Review*, *7*(11), 20.

Gandhi, V. V., Sree, P. N., & Kalyani, M. (2016). A Study on Etiological Agents with Special Reference to Fungal Isolates causing Chronic Suppurative Otitis Media in a Tertiary Care Hospital. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, *5*(11), 508-14.

Ganesan, K., Harigopal, S., Neal, T., & Yoxall, C. W. (2009). Prophylactic oral nystatin for preterm babies under 33 weeks' gestation decreases fungal colonisation and invasive fungaemia. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, *94*(4), F275-F278.

Garba, I., Umar, A. I., Abdulrahman, A. B., Tijjani, M. B., Aliyu, M. S., Zango, U. U., & Muhammad, A. (2013). Phytochemical and

antibacterial properties of garlic extracts. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, *6*(2), 45-48.

García-Agudo, L., Aznar-Marín, P., Galán-Sánchez, F., García-Martos, P., Marín-Casanova, P., & Rodríguez-Iglesias, M. (2011). Otomycosis due to filamentous fungi. *Mycopathologia*, *172*, 307-310.

Gharaghani, M., Halvaeezadeh, M., Jalaee, G. A., Taghipour, S., Kiasat, N., & Mahmoudabadi, A. Z. (2020). Antifungal susceptibility profiles of otomycosis etiological agents in Ahvaz, Iran. *Current medical mycology*, *6*(2), 18.

Gharaghani, M., Shabanzadeh, M., Jafarian, H., & Zarei Mahmoudabadi, A. (2022). ABC typing and extracellular enzyme production of Candida albicans isolated from Candida vulvovaginitis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *36*(1), e24117.

Gilbert, G. S., & Parker, I. M. (2023). How to be a fungus. *The Evolutionary Ecology of Plant Disease*, 27.

Gnat, S., Łagowski, D., Nowakiewicz, A., & Dyląg, M. (2021). A global view on fungal infections in humans and animals: opportunistic infections and microsporidioses. *Journal of Applied Microbiology*, *131*(5), 2095-2113.

Gokale, S. K., Suligavi, S. S., Baragundi, M., Anushka, D., & Manjula, R. (2013). Otomycosis: A clinico mycological study. *Int J Med Health Sci*, *2*(2), 218-223.

Golshiri, A., Mokhtaree, M. R., Bahramabadi, R., Shabani, Z., Sayadi, A. R., & Abbasi, A. (2017). Prevalence of microbial agents and pattern of antimicrobial resistance in patients with acute otitis externa in Rafsanjan in 2011. *Community Health Journal*, *7*(4), 10-17.

Gonçalves, B., Ferreira, C., Alves, C. T., Henriques, M., Azeredo, J., & Silva, S. (2016). Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology,

microbiology and risk factors. *Critical reviews in microbiology*, *42*(6), 905-927.

González Gravina, H., González de Morán, E., Zambrano, O., Lozano Chourio, M., Rodríguez de Valero, S., Robertis, S., & Mesa, L. (2007). Oral Candidiasis in children and adolescents with cancer: Identification of Candida spp. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, *12*(6), 419-423.

Gu, X., Cheng, X., Zhang, J., & She, W. (2022). Identification of the fungal community in otomycosis by internal transcribed spacer sequencing. *Frontiers in microbiology*, *13*, 820423.

Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of C andida species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*, 5-10.

Gupta, S., & Mahajan, B. (2015). Prevalance and Demographical Profile of Patients Presenting with Otomycosis. *JK Science*, *17*(3).

Gupta, S., Singh, R., Kosaraju, K., Bairy, I., & Ramaswamy, B. (2012). A study of antibacterial and antifungal properties of human cerumen. *Indian Journal of Otology*, *18*(4), 189-192.

Hagiwara, S., Tamura, T., Satoh, K., Kamewada, H., Nakano, M., Shinden, S., ... & Makimura, K. (2019). The molecular identification and antifungal susceptibilities of Aspergillus species causing otomycosis in Tochigi, Japan. *Mycopathologia*, *184*, 13-21.

Hajjeh, R. A., Sofair, A. N., Harrison, L. H., Lyon, G. M., Arthington-Skaggs, B. A., Mirza, S. A., ... & Warnock, D. W. (2004). Incidence of bloodstream infections due to Candida species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *Journal of clinical microbiology*, *42*(4), 1519-1527.

Hameed, A. R., Ali, S. M., & Ahmed, L. T. (2018). Biological study of Candida species and virulence factor. *Int J Adv Res Eng Technol*, *1*(4), 8-17.

Hankin, L., & Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, *67*(3), 597-607.

Hao, W., Wang, Y., Xi, Y., Yang, Z., Zhang, H., & Ge, X. (2022). Activity of chlorhexidine acetate in combination with fluconazole against suspensions and biofilms of Candida auris. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *28*(1), 29-34.

Harborne, J. B. (1984). Methods of plant analysis. In *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis* (pp. 1-36). Dordrecht: Springer Netherlands

Harley ,J.P., & Prescott , L.M. (1996) . Laboratory exercises in microbiology .3 rd ed. WCB /McGraw-Hill.

Hashim, S. M. M. (2007). *Isolation and Identification of Mycelial Fungi Associated with Human Ear Infections* (Doctoral dissertation, University of Khartoum).

Havlickova, B., Czaika, V. A., & Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, *51*, 2-15.

Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological research*, *105*(12), 1422-1432.

Hawksworth, D. L. (2012). Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate?. *Biodiversity and Conservation*, *21*, 2425-2433.

Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., & Denning, D. W. (2007). Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, *153*(6), 1677-1692.

Hernández-Carreón, O., Hernández-Howell, C., Hernández-Hernández, G., Herrera-Basurto, M. S., González-Gómez, B. E., Gutiérrez-Escobedo, G., ... & Castaño, I. (2021). Highly specific and rapid molecular detection of Candida glabrata in clinical samples. *Brazilian Journal of Microbiology*, *52*(4), 1733-1744.

Hibbett, D.S.,Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon,P. F., Eriksson, O.E., …&Zhang,N. (2007). Ahigher-level phylogentic classification of the fungi. *Mycological research ,111*(5), 509-547.

Hof, H. (2006). A new, broad-spectrum azole antifungal : posaconazole– mechanisms of action and resistance, spectrum of activity. *Mycoses*, *49*, 2-6.

Hornik, C. D., Bondi, D. S., Greene, N. M., Cober, M. P., & John, B. (2021). Review of fluconazole treatment and prophylaxis for invasive candidiasis in neonates. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, 26(2), 115-122.

Huang, Y. S., Wang, F. D., Chen, Y. C., Huang, Y. T., Hsieh, M. H., Hii, M., ... & Liu, W. L. (2021). High rates of misidentification of uncommon Candida species causing bloodstream infections using conventional phenotypic methods. *Journal of the Formosan Medical Association*, *120*(5), 1179-1187.

Hussain, M., Zouhar, M., & Ryšánek, P. (2017). Effects of nematophagous fungi on viability of eggs and juveniles of Meloidogyne incognita. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 27(1).

Ismail, M. T., Al-Kafri, A., & Ismail, M. (2017). Otomycosis in Damascus, Syria: Etiology and clinical features. *Current medical mycology*, *3*(3), 27.

Iyalla, C. (2017). A review of the virulence factors of pathogenic fungi. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, *18*(1), 53-58.

Jabra-Rizk, M. A., Brenner, T. M., Romagnoli, M., Baqui, A. A. M. A., Merz, W. G., Falkler Jr, W. A., & Meiller, T. F. (2001). Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida. *Journal of clinical microbiology*, *39*(5), 2015-2016.

Jafarian, H., Gharaghani, M., Seyedian, S. S., & Mahmoudabadi, A. Z. (2021). Genotyping, antifungal susceptibility, enzymatic activity, and phenotypic variation in Candida albicans from esophageal candidiasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *35*(7), e23826.

Janakiram, B., & Ramesh, B. (2017). Methods of determination of biofilm formation by Candida albicans. *Res J Microbiol*, *12*, 90-96.

Jayachitra, J. (2018). Isolation, characterisation and antifungal sensitivity pattern of fungi causing otomycosis in patients reporting in a tertiary care hospital (*Doctoral dissertation, Kilpauk Medical College, Chennai*).

Jayachitra, J. (2018). *Isolation, characterisation and antifungal sensitivity pattern of fungi causing otomycosis in patients reporting in a tertiary care hospital* (Doctoral dissertation, Kilpauk Medical College, Chennai).

Jia, X., Liang, Q., Chi, F., & Cao, W. (2012). Otomycosis in Shanghai: aetiology, clinical features and therapy. *Mycoses*, *55*(5), 404-409.

Jung, P., Mischo, C. E., Gunaratnam, G., Spengler, C., Becker, S. L., Hube, B., ... & Bischoff, M. (2020). Candida albicans adhesion to central venous catheters: Impact of blood plasma-driven germ tube formation and pathogen-derived adhesins. *Virulence*, *11*(1), 1453-1465.

Jyothi, S. R., Shah, W. A., Mohan, M., Mannur, S., Nazir, F., Mohta, V., & Nithavare, R. (2014). Otomycosis-mycological spectrum aetio-pathological factors and management. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, *3*(18), 4850-4859.

Kapli, P., Yang, Z., & Telford, M. J. (2020). Phylogenetic tree building in the genomic age. *Nature Reviews Genetics*, *21*(7), 428-444.

Kaup, S., Sankarankutty, J., Balasubrahmanya, H. V., Kulkarni, S., & Nirmala, M. (2016). Speciation of Candida using HiCrome candida differential agar. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, *5*(7), 267-74.

Kaur, R., Mittal, N., Kakkar, M., Aggarwal, A. K., & Mathur, M. D. (2000). Otomycosis: a clinicomycologic study. *Ear, nose & throat journal*, *79*(8), 606-609 .

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., & Zinkernagel, R. M. (2007). Mikrobiologia lekarska. PZWL, Warszawa.

Kazemi, A., Majidinia, M., Jaafari, A., Mousavi, S. A. A., Mahmoudabadi, A. Z., & Alikhah, H. (2015). Etiologic agents of otomycosis in the North-Western area of Iran. *Jundishapur journal of microbiology*, *8*(9).

Keissler.,K. (1912). Zur Kenntnis Pilzflora Krains. Beihefte zum Bbot botanischen Centralblatt 29: 433.

Khan, A. M., & Bhadauria, S. (2019). Molecular characterization of keratin degrading fungi isolated from semi-arid soil by PCR using ITS4 and ITS5 primers. *Journal of King Saud University-Science*, *31*(4), 1418-1423.

Khan, S. T., Akhtar, U., Iqbal, S., Khan, M. A., & Siddique, S. (2019). Antifungal activity of garlic (Allium sativum) against Aspergillus niger and Aspergillus oryzaea. *Lahore Garrison University Journal of Life Sciences*, *3*(4), 187-195.

Khodavandi, A., Harmal, N. S., Alizadeh, F., Scully, O. J., Sidik, S. M., Othman, F., ... & Chong, P. P. (2011). Comparison between allicin and fluconazole in Candida albicans biofilm inhibition and in suppression of HWP1 gene expression. *Phytomedicine*, *19*(1), 56-63.

Khudhur Mohammed, T., & KMWMA, J. (2019). Isolation and identification of Candida albicans in different clinical samples. *Al-Nisour J Med Sci*, *1*(1).

Kiakojuri, K., Armaki, M. T., Rajabnia, R., Pournajaf, A., Karami, M., Khademian, A., & Omran, S. M. (2019). Outer ear infections in Iran: a review. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, *7*(7), 1233.

Kiakojuri, K., Mahdavi Omran, S., Roodgari, S., Taghizadeh Armaki, M., Hedayati, M. T., Shokohi, T., ... & Abastabar, M. (2021). Molecular identification and antifungal susceptibility of yeasts and molds isolated from patients with otomycosis. *Mycopathologia, 186*, 245-257.

Kiakojuri, K., Omran, S. M., Jalili, B., Hajiahmadi, M., Bagheri, M., Shahandashti, E. F., & Rajabnia, R. (2016). Bacterial otitis externa in patients attending an ENT clinic in Babol, North of Iran. *Jundishapur journal of microbiology*, *9*(2).

Kiakojuri, K., Rajabnia, R., Jalili, B., Khafri, S., & Omran, S. M. (2015). Otomycosis in adolescent patients referred to the therapeutic centers in Babol City, Iran. *Jundishapur journal of microbiology*, *8*(5).

Kiakojuri, K., Roushan, M. R. H., & Sepidgar, S. A. A. (2007). Suction clearance and 2% topical miconazole versus the same combination with acidic drops in the treatment of otomycosis. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, *38*(4), 749.

Kim, J. W., Kim, Y. S., & Kyung, K. H. (2004). Inhibitory activity of essential oils of garlic and onion against bacteria and yeasts. *Journal of food protection*, *67*(3), 499-504.

Köhler, J. R., Hube, B., Puccia, R., Casadevall, A., & Perfect, J. R. (2017). Fungi that infect humans. *Microbiology spectrum*, *5*(3), 5-3.

Krakowska-Sieprawska, A., Kiełbasa, A., Rafińska, K., Ligor, M., & Buszewski, B. (2022). Modern Methods of Pre-Treatment of Plant material for the extraction of bioactive compounds. *Molecules*, *27*(3), 730.

Krcmery, V., & Barnes, A. J. (2002). Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of hospital infection*, *50*(4), 243-260.

Krebs, C. J. (1972). *Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance/por Charles J. Krebs* (No. Libro 574.5 K74.).

Kumar, A. (2005). Fungal spectrum in otomycosis patients. *JK science*, *7*(3), 152-155.

Kumar, A., Thakur, S., Thakur, V. C., Kumar, A., Patil, S., & Vohra, M. P. (2012). Antifungal activity of some natural essential oils against Candida species isolated from blood stream infection. *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University*, *1*(1), 61-66.

Kurnatowski, P., Wójcik, A., Blaszkowska, J., & Góralska, K. (2016). The hydrolytic enzymes produced by fungi strains isolated from the sand and soil of recreational areas. *Annals of parasitology*, *62*(3).

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In *The yeasts* (pp. 87-110). Elsevier.

Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier,2011

Kutawa, A. B., Danladi, M. D., & Haruna, A. (2018). Regular article antifungal activity of garlic (Allium sativum) extract on some selected fungi. *J. Med. Herbs Ethnomed*, *4*, 12-14.

Lafta , A.A. (2019). Taxonomical and Molecular Study of the Nematode -Trapping fungi and their antagonistic relationship with the

Trichoderma harzianum and *Pseudomonas fluorescens*. Master thesis, University of Misan, Iraq. P72.

Larone, D. H. (1993). Medically important fungi: a guide to identification, 2nd ed., p. 193–211. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

LARONE, D. H. (1994). Medically important fungi. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *36,* 432-432.

Larone, D. H., & Larone, D. H. (1987). *Medically important fungi: a guide to identification* (Vol. 196, p. 203). New York: Elsevier.

Lemar, K. M., Turner, M. P., & Lloyd, D. (2002). Garlic (Allium sativum) as an anti-Candida agent: a comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts. *Journal of Applied Microbiology*, *93*(3), 398-405.

Lestrade, P. P. A., Meis, J. F., Melchers, W. J. G., & Verweij, P. E. (2019). Triazole resistance in Aspergillus fumigatus: recent insights and challenges for patient management. *Clinical Microbiology and Infection*, *25*(7), 799-806.

Li, J., Hyde, K. D., & Zhang, K. Q. (2014). Methodology for studying nematophagous fungi. *Nematode-Trapping Fungi*, 13-40.

Linares, C. E. B., Loreto, É. S. D., Silveira, C. P., Pozzatti, P., Scheid, L. A., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2007). Enzymatic and hemolytic activities of Candida dubliniensis strains. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *49*, 203-206.

Luo, G., Samaranayake, L. P., & Yau, J. Y. (2001). Candida species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(8), 2971-2974.

Lyon, J. P., Moreira, L. M., Cardoso, M. A. G., Saade, J., & Resende, M. A. (2008). Antifungal suscepitibility profile of Candida spp. oral

isolates obtained from denture wearers. *Brazilian Journal of Microbiology*, *39*, 668-672.

MAA, S. (1984). A revision of the genus Rhizopus. I. The Rhizopus stolonifer-group and Rhizopus oryzae. *Stud Mycol*, *25*, 1-19.

Mahboob, N., Iqbal, H., Ahmed, M., Magnet, M. M. H., & Mamun, K. Z.(2019). Disk diffusion Method in Enriched Mueller Hinton agar for determining susceptibility of Candida isolates from various clinicalspecimens. *Journal of Dhaka Medical College*, 28(1).

Mahdavi Omran, S., Jalili, B., Rajabnia, R., & Kiakojuri, K. (2015). clinical and demographical findings of otitis externa in adult patients who referred to Roohani Hospital, Babol, Iran. *Int J Curr Microbiol App Sci*, *4*(5), 133-9.

Malcok, H. K., Aktas, E., Ayyildiz, A., Yigit, N., & Yazgi, H. (2009). Hemolytic activities of the Candida species in liquid medium. *The Eurasian Journal of Medicine*, *41*(2), 95.

Mansourian, A., Boojarpour, N., Ashnagar, S., Beitollahi, J. M., & Shamshiri, A. R. (2014). The comparative study of antifungal activity of Syzygium aromaticum, Punica granatum and nystatin on Candida albicans; an in vitro study. *Journal de mycologie medicale*, *24*(4), e163-e168.

Marak, M. B., & Dhanashree, B. (2018). Antifungal susceptibility and biofilm production of Candida spp. isolated from clinical samples. *Int J Microbiol*, *2018*(7495218), 7495218.

Martinez, M., Lopez-Ribot, J. L., Kirkpatrick, W. R., Bachmann, S. P., Perea, S., Ruesga, M. T., & Patterson, T. F. (2002). Heterogeneous mechanisms of azole resistance in Candida albicans clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *49*(3), 515-524.

Martins, N., Ferreira, I. C., Barros, L., Silva, S., & Henriques, M. (2014). Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. *Mycopathologia*, *177*, 223-24 .

Mba, I. E., & Nweze, E. I. (2020). Mechanism of Candida pathogenesis: revisiting the vital drivers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *39*, 1797-1819.

McGinnis, M. R. (1980). Susceptibility testing and bioassay procedure. *Laboratory handbook of medical mycology. Academic Press, Inc., New York, NY*, 431.

Meenakshi, M., Akshath, S. U., & Shoba, S. (2020). Incidence of Otomycosis and its causative factors. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 23, 2323-102.

Merad, Y., Derrar, H., Ouldsaid, K., & Benallel, K. (2021). Netherton syndrome associated to Candida parapsilosis otomycosis. *BMJ Case Reports CP*, *14*(7), e243260.

Mercado, A., & Vessuri, H. (2015). El conocimiento científico y tecnológico en la estrategia de aprovechamiento de los recursos naturales para el desarrollo integral de UNASUR. *OLOGIA INDUSTRIALIZACION*, 69.

Milan, E. P., & Zaror, L. (2004). Laboratory diagnosis of some types of fungi: Medical Mycology.

Milne, L.J.R (1996). *Fungi In: Practical Microbiology by Collee,J.G.,Marmion B.P.; Frasser, A.G. and simmons, A., 14 th ed.*, Longmen Singapore Pubihers Ltd, pp:695-717.

Mirhendi, H., Makimura, K., Khoramizadeh, M., & Yamaguchi, H. (2006). A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, *47*(3), 225-229.

Mofatteh, M. R., Yazdi, Z. N., Yousefi, M., & Namaei, M. H. (2018). Comparison of the recovery rate of otomycosis using betadine and

clotrimazole topical treatment. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, *84*404-409.

Mohammadali S. C. C; Nwadiuto E; Adnan, M; Jatin M. V; and Hadi, S. W. A. (2017). Advances in *Candida* detection platforms for clinical and point-of-care applications. *Critical reviews in biotechnology*, *37*(4), 441-458.

Mohammed, A., Hamoody, A. H., Raheem, O., & Al-Obaidy, O. (2020). Isolation and identification of fungi caused otomycosis in Samarra city and inhibitory of some virulence gene. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, *23*, 1-10.

Mohammed, N. A. (2012). *Detection of Candida spp. and other pathogens responsible for vulvovaginitis in women with contraceptive methods* (Doctoral dissertation, MSc thesis. College of Science, University of Baghdad, Iraq).

Mohammed, S; Alhussaini, I, Noha, F; and El- Tahtawi, A. M.(2013). Phenotypic and molecular characterization of Candida species in urine samples from renal failure patients Sci J Clin Med.; 2 (1): 14–25.

Monod, M., & Borg-von Zepelin, M. (2002). Secreted proteinases and other virulence mechanisms of Candida albicans. *Fungal Allergy and Pathogenicity*, *81*, 114-128.

Montagna, M. T., Lovero, G., Coretti, C., Martinelli, D., De Giglio, O., Iatta, R., ... & Caggiano, G. (2015). Susceptibility to echinocandins of Candida spp. strains isolated in Italy assessed by European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *BMC microbiology*, *15*, 1-6.

Moris, D. V., Melhem, M. S. C., Martins, M. A., & Mendes, R. P. (2008). Oral Candida spp. colonization in human immunodeficiency virus-

infected individuals. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, *14*, 224-257.

Moris, D. V., Melhem, M. S. C., Martins, M. A., & Mendes, R. P. (2008). Oral Candida spp. colonization in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, *14*, 224-257.

Mothershed, E. A., & Whitney, A. M. (2006). Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta*, *363*(1-2), 206-220.

Moya-Salazar, J., & Rojas, R. (2018). Comparative study for identification of Candida albicans with germ tube test in human serum and plasma. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *3*(3), 1-4.

Muazu, S. A., Channya, F. K., Chimbekujwo, I. B., Basiri, B., Zakari, B. G., Tukur, K. U., ... & Samuel, K. B. (2018). Antifungal activity of garlic (Allium sativum) essential oil and wood ash against post-harvest fruit rot of banana (Musa acuminata L.) in Yola, Adamawa State, Nigeria. *International Journal of Plant & Soil Science*, *24*(6), 1-10.

Mulet Bayona, J. V., Salvador García, C., Tormo Palop, N., Valentín Martín, A., González Padrón, C., Colomina Rodríguez, J., ... & Gimeno Cardona, C. (2022). Novel chromogenic medium CHROMagarTM Candida Plus for detection of Candida auris and other Candida species from surveillance and environmental samples: A multicenter study. *Journal of Fungi*, *8*(3), 281.

Nadeem, S. G., Hakim, S. T., & Kazmi, S. U. (2010). Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of Candida species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *Libyan Journal of Medicine*, *5*(1).

Naglik, J. R., Moyes, D. L., Wächtler, B., & Hube, B. (2011). Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and infection*, *13*(12-13), 963-976.

Naglik, J. R., Rodgers, C. A., Shirlaw, P. J., Dobbie, J. L., Fernandes-Naglik, L. L., Greenspan, D., ... & Challacombe, S. J. (2003). Differential expression of Candida albicans secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *The Journal of infectious diseases*, *188*(3), 469-479.

Nandyal, C. B., & Choudhari, A. S. (2015). Evaluation of therapeutic efficiency of topical clotrimazole and topical miconazole in the treatment of otomycosis-a prospective study. *National Journal of Medical Research*, *5*(02), 145-149.

Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, *94*(6), 2101-2137.

Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., & Goździcka-Józefiak, A. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia microbiologica*, *59*, 181-196.

Nazeer, H. A., Khaja, S. M., & Rao, S. S. P. (2015). Mycology of otomycosis in a tertiary care teaching hospital. *Journal of research in medical and dental science*, *3*(1), 27-30.

Nipa, K. K., Kamal, A. M., Hossain, M. J., & Imtiaj, A. (2020). Present Scenarios of Otomycosis in Rajshahi City of Bangladesh. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*, *8*(5), 137-142.

Nouraei, H., Jahromi, M. G., Jahromi, L. R., Zomorodian, K., & Pakshir, K. (2021). Potential pathogenicity of Candida species isolated from oral cavity of patients with diabetes mellitus. *BioMed Research International*, *2021*, 1-6 .

Nowrozi, H., Arabi, F. D., Mehraban, H. G., Tavakoli, A., & Ghooshchi, G. (2014). Mycological and clinical study of otomycosis in Tehran, Iran. *Bull Environ Pharmacol Life Sci*, *3*(2), 29-31.

Olds, R. J. (1975). *A colour atlas of microbiology*. Wolfe Medical Books..

Osazuwa, F., Osazuwa, E., Osime, C., Igharo, E. A., Imade, P. E., Lofor, P., ... & Dirisu, J. (2011). Etiologic agents of otitis media in Benin city, Nigeria. *North American journal of medical sciences*, *3*(2), 95.

Ozcan, K. M., Ozcan, M., Karaarslan, A., & Karaarslan, F. (2003). Otomycosis in Turkey: predisposing factors, aetiology and therapy. *The Journal of Laryngology & Otology*, *117*(1), 39-42.

Pai, S. T., & Platt, M. W. (1995). Antifungal effects of Allium sativum (garlic) extract against the Aspergillus species involved in otomycosis. *Letters in applied microbiology*, *20*(1), 14-18.

Panariello, B. H. D., Klein, M. I., Pavarina, A. C., & Duarte, S. (2017). Inactivation of genes TEC1 and EFG1 in Candida albicans influences extracellular matrix composition and biofilm morphology. *Journal of Oral Microbiology*, *9*(1), 1385372.

Panchal, P., Pethani, J., Patel, D., Rathod, S., & Shah, P. (2013). Analysis of various fungal agents in clinically suspected cases of otomycosis. *Indian J Basic Appl Med Res*, *2*(08), 12-19.

Park, H. G., Managbanag, J. R., Stamenova, E. K., & Jong, S. C. (2004). Comparative analysis of common indoor Cladosporium species based on molecular data and conidial characters. *Mycotaxon*.

Pawar, P. R., Pawar, V. A., & Aute, R. A. (2014). Role of extracellular hydrolytic enzymes in Candida albicans virulence. *INTERNATIONAL JOURNAL OF INNOVATIVE PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH*, *2*(7), 1521-1532.

Pereira, R., dos Santos Fontenelle, R. O., De Brito, E. H. S., & De Morais, S. M. (2021). Biofilm of Candida albicans: formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, *131*(1), 11-22.

Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet infectious diseases*, *17*(12), e383-e392.

Peyclit, L., Yousfi, H., Rolain, J. M., & Bittar, F. (2021). Drug repurposing in medical mycology: Identification of compounds as potential antifungals to overcome the emergence of multidrug-resistant fungi. *Pharmaceuticals*, *14*(5), 488.

Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from Syzygium aromaticum on Candida, Aspergillus and dermatophyte species. *Journal of medical microbiology*, *58*(11), 1454-1462.

Pontes, Z. B. V. D. S., Silva, A. D. F., Lima, E. D. O., Guerra, M. D. H., Oliveira, N. M. C., Carvalho, M. D. F. F. P., & Guerra, F. S. Q. (2009). Otomycosis: a retrospective study. *Brazilian Journal of otorhinolaryngology*, *75*, 367-370.

Prasad, S. C., Kotigadde, S., Shekhar, M., Thada, N. D., Prabhu, P., D'Souza, T., & Prasad, K. C. (2014). Primary otomycosis in the Indian subcontinent: predisposing factors, microbiology, and classification. *International journal of microbiology*, *2014*.

Prescott, M., Harley, P., & Klein, A. (2001). Microbiology 2nd ed. Printed in the united state of America by WMC Brown Communication.

Prianto H, *et al*. 2013. Isolasi dan karakteristik dari minyak bunga cengkeh (syzgium aromaticum) Kering hasil distilasi uap. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya : *Kimia Student Journal*. 1(2) : 269-274.

Price, M. F., Wilkinson, I. D., & Gentry, L. O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in Candida albicans. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, *20*(1), 7-14.

Putignani, L., D'Arezzo, S., Paglia, M. G., & Visca, P. (2010). DNA-based detection of human pathogenic fungi: dermatophytes, opportunists, and causative agents of deep mycoses. *Molecular identification of Fungi*, 357-415.

Raju, E. V. N., & Divakar, G. (2013). Production of pectinase by using Bacillus circulans isolated from dump yards of vegetable wastes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *4*(7), 2615.

Raksha, G,S., & Urhekar, A. D. (2017). Virulence factors detection in Aspergillus isolates from clinical and environmental samples. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, *11*(7), DC13.

Ranasinghe, L., Jayawardena, B., & Abeywickrama, K. (2002). Fungicidal activity of essential oils of Cinnamomum zeylanicum (L.) and Syzygium aromaticum (L.) Merr et LM Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Letters in Applied Microbiology*, *35*(3), 208-211.

Raper, K. B., & Fennell, D. I. (1965). The genus Aspergillus. *The genus Aspergillus*.

Raut, S. H., & Varaiya, A. (2009). Differentiation of Candida dubliniensis on chrom agar and Pal's agar. *Indian journal of medical microbiology*, *27*(1), 55-58.

Ray, R., Pal, S., Ghosh, M., Samaddar, D., & Banerjee, M. (2015). Prevalence of fungal infection in chronic otitis media-A study at a tertiary care hospital in Eastern India. *Int J Curr Microbiol App Sci*, *4*(3), 684-90.

Rewak-Soroczynska, J., Sobierajska, P., Targonska, S., Piecuch, A., Grosman, L., Rachuna, J., ... & Wiglusz, R. J. (2021). New approach to antifungal activity of fluconazole incorporated into the porous 6-Anhydro-α-L-Galacto-β-D-Galactan structures modified with nanohydroxyapatite for chronic-wound treatments—in vitro evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(6), 3112.

Richard, P; and Harald , S (2014). Nosocomial bloodstream infections due to Candida spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *International journal of antimicrobial agents*, *43*(1), 78-81.

Romsaithong, S., Tomanakan, K., Tangsawad, W., & Thanaviratananich, S. (2016). Effectiveness of 3 per cent boric acid in 70 per cent alcohol versus 1 per cent clotrimazole solution in otomycosis patients: a randomised, controlled trial. *The Journal of Laryngology & Otology*, *130*(9), 811-815.

Rooney, P. J., & Klein, B. S. (2002). Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cellular Microbiology*, *4*(3), 127-137.

Rossoni, R. D., Barbosa, J. O., Vilela, S. F. G., Jorge, A. O. C., & Junqueira, J. C. (2013). Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans Candida* species. *Brazilian oral research*, *27*, 484-489.

Ruiz Reyes, S. G., Venegas Casanova, E. A., Valdiviezo Campos, J. E., Ocaña Ventura, J. P., & Tadeo Horna, M. D. L. A. V. (2018). Características farmacognósticas y cuantificación espectrofotométrica de antocianinas totales del fruto de Prunus serotina subsp. capuli (Cav.) McVaugh (Rosaceae)" capulí". *Arnaldoa*, *25*(3), 961-980.

Saki, N., Rafiei, A., Nikakhlagh, S., Amirrajab, N., & Saki, S. (2013). Prevalence of otomycosis in Khouzestan Province, south-west Iran. *The Journal of Laryngology & Otology*, *127*(1), 25-27.

Salvo, D. (2009). Microbiology and Immunology. chapter3. *Mycology, The University of South Carolina, USA.*

Salyers, A. A., Whitt, D. D., & Whitt, D. D. (1994). *Bacterial pathogenesis: a molecular approach* (Vol. 1). Washington, DC: ASM press.

Samaranayake, L. P., Raeside, J. M., & MacFarlane, T. W. (1984). Factors affecting the phospholipase activity of Candida species in vitro. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, *22*(3), 201-207.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Sander, R. (2001). Otitis externa: a practical guide to treatment and prevention. *American family physician*, *63*(5), 927-937.

Sangaré, I., Amona, F. M., Ouedraogo, R. W. L., Zida, A., & Ouedraogo, M. S. (2021). Otomycosis in Africa: epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of Medical Mycology*, *31*(2), 101115.

Sangavi, A. B., Peerapur, B., & Gummadi, N. (2018). Clinicomycological study of otomycosis in Raichur, Karnataka: a hospital based study. *Int J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, *4*(1), 233-36.

Satish, H. S., Viswanatha, B., & Manjuladevi, M. (2013). A clinical study of otomycosis. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, *5*(2), 57-62.

Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C., & Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans. *Mycoses*, *48*(6), 365-377.

Schipper, M. A., & Stalpers, J. A. (1984). A revision of the genus Rhizopus.

Schoofs, A., Odds, F. C., Colebunders, R., Ieven, M., & Goossens, H. (1997). Use of specialised isolation media for recognition and identification of Candida dubliniensis isolates from HIV-infected

patients. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, *16*, 296-300.

Seman, B. G., Moore, J. L., Scherer, A. K., Blair, B. A., Manandhar, S., Jones, J. M., & Wheeler, R. T. (2018). Yeast and filaments have specialized, independent activities in a zebrafish model of Candida albicans infection. *Infection and immunity*, *86*(10), 10-1128.

Sherry, L., Ramage, G., Kean, R., Borman, A., Johnson, E. M., Richardson, M. D., & Rautemaa-Richardson, R. (2017). Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant Candida auris. *Emerging infectious diseases*, *23*(2), 328 .

Shin, J. H., Nolte, F. S., & Morrison, C. J. (1997). Rapid identification of Candida species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(6), 1454-1459.

Shirvani, F., & Fattahi, M. (2021). Molecular identification of Candida species isolated from candiduria and its risk factors in neonates and children. *Current Medical Mycology*, *7*(3), 9.

Simmons, E. G. (2007). Alternaria an identification manual, fully illustrated and with catalogue raisonné 1796-2007. *(No Title)*.

Slifkin, M. (2000). Tween 80 opacity test responses of various Candida species. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(12), 4626-4628.

Soll, D. (2014). The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of Candida albicans. *Journal of oral microbiology*, *6*(1), 22993.

Sonmez, M., & Erbas, G. (2017). Isolation and identification of Candida spp. from mastitis cattle milk and determination of antifungal susceptibilities. *International Journal of Veterinary Science*, *6*(2), 104-107.

Spampinato, C., & Leonardi, D. (2013). Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed research international*, *2013*.

Srivastava, V., Singla, R. K., & Dubey, A. K. (2018). Emerging virulence, drug resistance and future anti-fungal drugs for Candida pathogens. *Current topics in medicinal chemistry*, *18*(9), 759-778.

Staniszewska, M. (2020). Virulence factors in Candida species. *Current Protein and Peptide Science*, *21*(3), 313-323.

Stehr, F., Kretschmar, M., Kröger, C., Hube, B., & Schäfer, W. (2003). Microbial lipases as virulence factors. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, *22*(5-6), 347-355.

Subramanya, S. H., Sharan, N. K., Baral, B. P., Hamal, D., Nayak, N., Prakash, P. Y., ... & Gokhale, S. (2017). Diversity, in-vitro virulence traits and antifungal susceptibility pattern of gastrointestinal yeast flora of healthy poultry, Gallus gallus domesticus. *BMC microbiology*, *17*, 1-14.

Sullivan, D. J., Westerneng, T. J., Haynes, K. A., Bennett, D. S. E. E., & Coleman, D. C. (1995). Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*, *141*(7), 1507-1521.

Szigeti, G., Kocsubé, S., Dóczi, I., Bereczki, L., Vágvölgyi, C., & Varga, J. (2012). Molecular identification and antifungal susceptibilities of black Aspergillus isolates from otomycosis cases in Hungary. *Mycopathologia*, *174*, 143-147.

Szomek, M., Reinholdt, P., Petersen, D., Caci, A., Kongsted, J., & Wüstner, D. (2021). Direct observation of nystatin binding to the plasma membrane of living cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1863*(2), 183528.

Tamo, S. B. (2020). Candida Infections: Clinical Features, Diagnosis and Treatment. *Infect. Dis. Clin. Microbiol*, *2*, 91-103.

Tang, S. S., Prodhan, Z. H., Biswas, S. K., Le, C. F., & Sekaran, S. D. (2018). Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. *Phytochemistry*, *154*, 94-105.

Tasić-Otašević, S., Golubović, M., Đenić, S., Ignjatović, A., Stalević, M., Momčilović, S., ... & Arsić-Arsenijević, V. (2020). Species distribution patterns and epidemiological characteristics of otomycosis in Southeastern Serbia. *Journal de mycologie medicale*, *30*(3), 101011.

Thomas, B.P.H.J. (2003). Candida spp: from saprophyte to specific parasiteMolecular plant pathology, 4:225-236.

Torabi, I., Sharififar, F., Izadi, A., & Mousavi, S. A. A. (2022). Inhibitory effects of different fractions separated from standardized extract of Myrtus communis L. against nystatin-susceptible and nystatin-resistant Candida albicans isolated from HIV positive patients. *Heliyon*, *8*(3).

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2010). Microbiology an introduction 10th edition.

Tóth, R., Nosek, J., Mora-Montes, H. M., Gabaldon, T., Bliss, J. M., Nosanchuk, J. D., ... & Gácser, A. (2019). Candida parapsilosis: from genes to the bedside. *Clinical microbiology reviews*, *32*(2), 10-1128.

Towaha, J. (2012). Manfaat eugenol cengkeh dalam berbagai industri di Indonesia. *Perspektif*, *11*(2), 79-90.

Vaidya, K., Madhup, S. K., Shrestha, B. L., Gautam, A., & Tuladha, N. R. (2015). Bacteriological and mycological profile of chronic suppurative otitis media among patients visiting Dhulikhel Hospital. *Annals of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *1*(1), 37-41.

Vila, T., Sultan, A. S., Montelongo-Jauregui, D., & Jabra-Rizk, M. A. (2020). Oral candidiasis: a disease of opportunity. *Journal of Fungi*, *6*(1), 15.

Viswanatha, B., Sumatha, D., & Vijayashree, M. S. (2012). Otomycosis in immunocompetent and immunocompromised patients: comparative study and literature review. *Ear, Nose & Throat Journal*, *91*(3), 114-121.

Wan, L., Luo, G., Lu, H., Xuan, D., Cao, H., & Zhang, J. (2015). Changes in the hemolytic activity of Candida species by common electrolytes. *BMC microbiology*, *15*, 1-7.

Wang, Y., & Liu, H. (2021). Liquid and vapor-phase antifungal activities of natural borneol against Candida albicans and its germ tube formation. *bioRxiv*, 2021-03.

Warriso, K., Lilly-Tariah, D., Benedict, O., & Oparaodu, U. A. (2022). Antifungal Susceptibility Pattern in Otomycosis among Patients Attending a Tertiary Healthcare Institution in Port Harcourt, Nigeria. *Asian Journal of Medicine and Health*, 1-7.

Watanabe, T. (1986). Fungus isolates from Japanese black and red pine seeds with some taxonomical notes. *Bull For & For Prod Res Inst*, *336*, 1-18.

Weber, R. W. (2009). Recent developments in the molecular taxonomy of fungi In Physiology and Genetics. Springer, Berlin, Heidelberg. 15: pp.1-5.

Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*. Cambridge university press.

Weile, J., & Knabbe, C. (2009). Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *394*, 731-742.

Wellinghausen, N., Wirths, B., Franz, A. R., Karolyi, L., Marre, R., & Reischl, U. (2004). Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *48*(4), 229-241.

White, D. (2021). Healthy uses for garlic. *Nursing Clinics*, *56*(1), 153-156.

White, P. L., Barton, R., Guiver, M., Linton, C. J., Wilson, S., Smith, M., ... & United Kingdom Fungal Polymerase Chain Reaction Consensus Group. (2006). A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *The Journal of Molecular Diagnostics*, *8*(3), 376-384.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, *18*(1), 315-322.

Wiederhold, N. P. (2017). Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infection and drug resistance*, 249-259.

Wiegand, S., Berner, R., Schneider, A., Lundershausen, E., & Dietz, A. (2019). Otitis externa: investigation and evidence-based treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*, *116*(13), 224.

Wisplinghoff, H., Ebbers, J., Geurtz, L., Stefanik, D., Major, Y., Edmond, M. B., ... & Seifert, H. (2014). Nosocomial bloodstream infections due to Candida spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *International journal of antimicrobial agents*, *43*(1), 78-81.

Yakasiri, H. P., & Siddabathuni, A. (2020). Utility of non-serum liquid media against conventional human serum in germ tube production

test.International Journal of Medical Microbiology and Tropical Diseases 2020;*6(1)*:54-575.

Yang, Y., Lin, L., Li, Y., Jiang, Z., Li, C., Liu, M., ... & Lin, X. (2021). Etiology, microbiological isolates, and antibiotic susceptibilities in culture-proven pediatric endophthalmitis: a 9-year review. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, *259*, 197-204.

Yassin, M. T., Mostafa, A. A. F., & Al-Askar, A. A. (2020). In vitro anticandidal potency of Syzygium aromaticum (clove) extracts against vaginal candidiasis. *BMC complementary medicine and therapies*, 20(1), 1-9.

Yenisehirli, G., Bulut, N., Yenisehirli, A., & Bulut, Y. (2015). In vitro susceptibilities of Candida albicans isolates to antifungal agents in Tokat, Turkey. *Jundishapur journal of microbiology*, *8*(9).

Yenişehirli, G., Bulut, Y., Güven, M., & Günday, E. (2009). In vitro activities of fluconazole, itraconazole and voriconazole against otomycotic fungal pathogens. *The Journal of Laryngology & Otology*, *123*(9), 978-981.

Yike, I. (2011). Fungal proteases and their pathophysiological effects. *Mycopathologia*, *171*(5), 299-323.

Zafar, A., Jabeen, K., & Farooqi, J. (2017). Practical guide and atlas for the diagnosis of fungal infections.

Zuza-Alves, D. L., Silva-Rocha, W. P., & Chaves, G. M. (2017). An update on Candida tropicalis based on basic and clinical approaches. *Frontiers in microbiology*, *8,* 1927.

الملحق رقم (1) : استمارة العينات

رقم العينة ( ) التأريخ / / 202

الجنس : عمر المصاب :

عنوان السكن: المدة الزمنية للمرض:

الأعراض

الامراض المزمنة :

العقاقير المأخوذة:

العقاقير الخاصة بمرض التهابات الاذن :

امراض اخرى:

Abstract

Otomycosis, which is also known as fungal otitis externa, is one of the common fungal infections that infect the external auditory canal of the ear. Therefore, this study was conducted for the first time in Maysan Governorate, 115 clinical samples were collected from patients attending the nasal consultation department ear and nose and throat in Al-Sadr General Teaching Hospital and some private clinics during November 2022 to April 2023. The samples were taken using sterile cotton swabs and under the direct supervision of the specialist doctor and for all ages and for both male and female.

The study was conducted in the fungi laboratory/ College of Science / University of Maysan for examining and cultivating. The study aimed to isolate and identify the fungi (filamentous and yeasts) from patients with fungal otitis externa, the samples were collected randomly from different ages (0-80 years), Samples were cultured onto sabouraud dextrose agar (SDA) and Potato Dextrose Agar (PDA). A total of 115 samples, 109 samples were a positive (94.8%). About 112 isolates were isolated and identify, 72 isolates belong to filamentous fungi and 40 isolates belong to *Candida* spp. *Aspergillus* spp. showed a highest number of isolates reached to 57 isolates, with a rate of (50.9%), *A. niger* appeared high isolates number (41 isolates, with a rate of 36.6%), compared with rest species, followed by C. .*parapsilosis* (15 isolates, with percentage 13.39%). ***A.*** *oryzae* and *Alternaria alternata* showed the lowest number of isolates and frequency (one isolate and 0.89 % for each, respectively).

The results of the study showed that the percentage of infected females is higher than males, moreover, the age group (30-21 years) was more susceptible to infection with external ear fungi (33.02%), while the age group (11-20 years) appeared the less percentage of infection (2.8%).

The current study showed different enzymatic activities among tested fungi for all tested enzymes (phospholipase, hemolysin and esterase). All tested fungi appeared ability to produce phospholipase (100%), 6 fungal isolates produced hemolysin (66.7%), and 8 isolates producing esterase (88.9%).

Abstract

The Alcoholic garlic extract showed higher inhibitory activity against all yeasts and filamentous fungi, followed by cloves and the antifungals nystatin and fluconazole.

Molecular study of some isolated species were made using the PCR technique for identify these fungi. 14 species of fungi that were identified phenotypically were selected for detection of sequences of their nitrogenous bases and compared with the species kept in the GenBank. The results of the molecular study apeared that there was a correspondence ranging from 100% to 96% between our isolates and the GenBank isolates. Phylogenetic trees was made for species to determine the percentage of its similarity and closeness to the GenBank species using the MEGA program.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Misan
College Of Science

Isolation and Identification of Opportunistic Fungi from Patients with Otitis Externa in Maysan Governorate

A Thesis
Submitted to the council of College of Sciences/ University of Misan
In partial/ Fulfillment of the Requirements For the Degree
Master of Science in Biology
By

Azhar lilo sayyid

B.Sc. Biology

2014

Supervised by

Prof. Dr. Ali A. Kasim

2023 A.D **1445 A.H**