الكشف عن قابلية بعض الفطريات الانتهازية المسببة لالتهابات الإذن الوسطى على إنتاج الأفلاتوكسين

أ.دعدنان حمد عبيد الحمداني كلية الطب / جامعة القادسية
أ.د عبد الرضا طه سرحان كلية مدينة العلم الجامعة / بغداد
م. محمد محسن عبد الحسين كلية العلوم /جامعة الكوفة

المستخلص:

اختبرت ٢٢١ عينة تعود إلى ١١ نوعا" ضمن ثلاثة أجناس من الفطريات الانتهازية هي *Aspergillus* و *Penicillium* و *Alternaria* معزولة من المرضى المراجعين إلى استشارية الإذن والأنف والحنجرة، في مستشفى الديوانية التعليمي في محافظة الديوانية، والذين يعانون من التهابات الأذن الوسطى المتقيح المزمن، وذلك لغرض الكشف عن قابليتها على أنتاج سموم الافلاتوكسين مختبريا" باستخدام بخار الأمونيا (٢٥ %) في ثلاثة أوساط زرعية هي: وسط السابروويد دكستروز- أكار (SDA) والبطاطا دكستروز- أكار (PDA) والزابيكس أكار (CZA) وتحت ثلاث درجات حرارية ٢٥ و ٣٠ و ٣٥ مْ . أظهرت النتائج، أن القسم الأكبر من هذه الفطريات وخاصة جنس *Aspergillus* تمتلك قدرة عالية لإنتاج سموم الافلاتوكسين عند درجة حرارة ٣٥ مْ في وسط الزابيكس ، مما يدل على خطورة هذه الفطريات في كونها منتجة لمواد سمية مسرطنة ومطفرة في الأنسجة التي تصيبها، مما يستدعي الانتباه إلى عوامل ضراوة تلك الفطريات المتمثلة بسموم الافلاتوكسين خصوصا" في الأشخاص الضعاف مناعيا".

Detection of Aflatoxins Production by Some Opportunistic Fungi which Cause Chronic Suppurative Otitis Media(CSOM)

Abstract :

This research was conducted to detect the ability of 221 clinical specimens which belong to 11 species in three genera of opportunistic fungi *Aspergillus, Penicillium* and *Alternaria* isolated from patients of Chronic Suppurative Otitis Media (CSOM), in the consultant of (E.N.T.) at Al-Diwaniya Teaching Hospital, Al-Diwaniya province, to produce aflatoxins. It was found that 11 species of the opportunistic fungi were able to produce the aflatoxins when grown on different media (SDA, PDA & CZA) under various temperature degrees (25, 30 & 35 °C). Also, it was found that genus *Aspergillus* was the best one for the production of aflatoxins on CZA and under 35 °C. This result means that these fungi may behave as carcinogenic and mutagenic agents in the infected tissues, and use aflatoxins as virulent factors, especially in immune-deficient persons.

المقـــدمـــة:

لقد ظهرت خلال السنوات الأخيرة، زيادة ملحوظة في حالات الإصابة بالفطريات المرضية، وخصوصا"الانتهازية منها مما دفع الباحثين إلى بذل جهود مضاعفة للحيلولة دون انتشار مثل هذا النوع من الإصابات التي غالبا" ما أدت إلى الموت في الكثير من الحالات المسجلة عالميا" (Aisner & Murillo, 1989)، وتعد الإصابة بالتهابات الأذن الوسطى (Otitis media) موضوعا مهما لكثير من الباحثين في مختلف دول العالم (Ellis, 1994 ; Koker, 1997) إذ ذكرت دراساتهم، بأن هناك أنواعاً مختلفة من الفطريات الخيطية والخمائر الانتهازية، تساهم في أحداث أضرار بليغة للإنسان، ومنها إصابة الإنسان بالتهابات الأذن الوسطى المتقيح المزمن Chronic Suppurative Otitis Media ، إذ لوحظ أن العديد من هذه الفطريات لها القدرة على إنتاج مواد سمية ذات قابلية على تحطيم الأنسجة المختلفة في الإنسان والحيوان، وخصوصا" الكبد والكلية (Riley *et al.*, 1993) وتعد هذه السموم من الأيضات الثانوية secondary metabolites التي لها تأثير مطفر ومسرطن (Williams, 2004) . ومن أهم هذه السموم هي سموم الافلاتوكسين التي ينتجها أكثر من نوع تعود للجنس *Aspergillus* أهمها هي الأنواع *A. flavus* و *A. parasiticus* فضلا" عن إنتاجها من قبل أجناس أخرى مثل *Penicillium* و *Alternaria* (Berry, 1988) . وتحتل هذه السموم الموقع الأهم بين السموم الفطرية في ضوء طبيعتها الفعالة في توليد أمراض مختلفة للإنسان والدواجن والماشية (Klein *et al.*, 1989) ، إذ تشير الأبحاث بأنها مسئولة عن سرطان الكبد في الإنسان والحيوانات فضلا عن كونها كابحة للمناعة (Deiner&Davis, 1969 ; Moss, 1989). يوجد على الأقل ١٣ نوعا" مختلفا" من سموم الافلاتوكسين التي تنتجها الفطريات ، ويعد الافلاتوكسين BI (C17H12O6) وB2 (C17H14O6) التي ينتجهما كل من الفطر *A. flavus* والفطر *A. parasiticus* أكثرها سمية ، أما الافلاتوكسين G1 (C17H14O7) و G2 (C17H14O7) فينتجهما الفطر *A. parasiticus* . توجد تقنيات مختلفة للكشف عن سموم الافلاتوكسين بشكل نوعي، منها الوميض أو التألق fluorescence باستخدام الأشعة فوق البنفسجية أو تكوين صبغات صفراء في الوسط الزرعي أو تغير اللون بعد تعريض المستعمرات الفطرية لبخار هيدروكسيد الامونيوم أو بشكل كمي باستخدام تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC أو تقنية الادمصاص المناعي immune adsorption (Abbas, 2004). ونظرا لما للفطريات الانتهازية من علاقة في إحداث أضرار وإصابات بليغة للإنسان، وخاصة التهابات الإذن الوسطى المتقيح المزمن ولكون البعض منها منتجة لسموم الافلاتوكسين مما يزيد

من خطورتها على العائل ، فان الهدف من هذا البحث هو اختبار قابلية بعض الفطريات المسببة لالتهابات الإذن الوسطى المتقيح المزمن في إنتاج سموم الافلاتوكسين مختبريا" .

المواد وطرائق العمل:

جمع العينات:

جمعت العينات في استشارية (الإذن و الأنف والحنجرة) / مستشفى الديوانية التعليمي في محافظة الديوانية ، اختبرت ٢٢١ عينة تعود لمرضى بأعمار مختلفة لكلا الجنسين مصابين بالتهاب الإذن الوسطى المتقيح المزمن (CSOM) والتي شخصت سريريا" من قبل الطبيب الاخصائي ، إذ أخذت مسحات الإذن من المرضى المصابين باستخدام مسحة إذن معقمة sterile ear swab وبواقع ثلاث مكررات لكل عينة ، ثم نقلت العينات إلى المختبر لإجراء الفحوصات المطلوبة.

الفحص المباشر :

لغرض إجراء الفحص المباشر للعينات استخدمت صبغة اللاكتوفينول ازرق – القطن Lacto - phenol cotton blue وصبغة Gram's Iodine لهذا الغرض ، اذ حضرت الشريحة الزجاجية للفحص المباشر كما ياتي :

1. وضعت كمية قليلة من هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH 10%) على شريحة زجاجية نظيفة، ثم اخذت مسحة الاذن ومسح بها على الشريحة.
2. سخنت الشريحة الزجاجية بهدوء وذلك بامرارها خلال اللهب مرتين او ثلاث مرات، او وضعها على المسخنة الحرارية (Hot Plate) لمدة 30-60 ثانية، مع تجنب التسخين لحد الغليان، لانه يؤدي الى تبلور هيدروكسيد البوتاسيوم .
3. وضعت قطرة من صبغة Gram's Iodine أو صبغة اللاكتوفينول ازرق – القطن ثم وضع غطاء الشريحة الزجاجية فوق المسحة .
4. فحصت الشريحة الزجاجية تحت المجهر، حيث يؤشر الفحص على انه موجب او سالب اعتمادا على وجود او انعدام خيوط فطرية او كونيدات.

زرع العينات وتشخيصها:

زرعت مسحات الإذن على سطوح أطباق زجاجية معقمة حاوية على وسط السابروید دكستروز أكار(SDA) Sabouraud`s Dextrose Agar ، المضاف إليها المضاد الحيوي الكلورامفنيكول (٢٥ ملغرام / لتر) لمنع نمو البكتريا ، باستخدام طريقة التخطيط Streaking method ، وحضنت الأطباق المزروعة عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٥ ـ ١٤ يوم ، فحصت الإطباق يوميا

خلال الأسبوع الاول ومرتـــين خلال الأسبوع الثاني ، وبعد اكتمال نمو المزارع الفطريـــــــة عزلت وشخصت الأنواع المختلفة على ضوء الصفات الزرعية والمظهرية والمجهرية بالاعتماد على المصادر المتخصصة
De-Hoog & Guarro,1995 ;Elmer &Glemn,1985 ; Raper & Funnel, 1977

الكشف عن سموم الأفلاتوكسين:

اختبرت الفطريات المعزولة للكشف عن قابليتها على إنتاج سموم الافلاتوكسين مختبرياً، إذ استخدمت ثلاثة أنواع من الأوساط الغذائية المستخدمة بشكل واسع في تنمية الفطريات هي: السابروبد دكستروز أكار (SDA) ، بطاطا دكستروز أكار(Potato Dextrose Agar(PDA والزابيكس أكار Czapek's agar (CZA) وعند ثلاث درجات حرارية ٢٥ و ٣٠ و ٣٥ مْ، لمعرفة تأثير نوع الوسط الغذائي ودرجة الحرارة في قابلية الأنواع الفطرية المعزولة على إنتاج سموم الافلاتوكسين. حضرت الأطباق الزجاجية المعقمة والحاوية على الأوساط الزراعية ونقل إليها جزء من المستعمرات الفطرية بواسطة الناقل ، حضنت الإطباق عند درجة حرارة ٢٥ مْ ولمدة ٤ ـ٧ أيام ثم أخرجت الأطباق من الحاضنة بعد انتهاء مدة الحضن وقلبت رأسا" على عقب ثم أضيف في منتصف غطاء الطبقة كمية O.2 مل من محلول الامونيا (٢٥ %) ، ثم أعيدت الأطباق مرة أخرى إلى الحاضنة وتركت لمدة ٢-٧ ايام وخلال هذه المدة تراقب المستعمرات الفطرية لملاحظة تغير قواعدها، فإذا تغير لون قاعدة المستعمرة إلى اللون الأحمر الوردي أو الأصفر البرتقالي وبدرجة لونية متباينة، فان ذلك يدل على أن الفطر له قابلية على أنتاج سموم الافلاتوكسين (Saito& Machida, 1999).

النتائج والمناقشة :

تم عزل وتشخيص (١١) نوعا" من الفطريات الانتهازية تعود لثلاثة أجناس مختلفة هي *Aspergillus* و *Penicillium* و *Alternaria* ، تسعة منها تعود للجنس الأول والاثنين الأخرى تعود للجنسين الثاني والثالث (جدول ١) إذ كان النوع *A. flavus* أكثرها تكرارا" حيث سجل في (٣٣عزلة) من مجموع العزلات ٢٢١ عزلة أي بنسبة ٩٣. ١٤ % ، يليه النوع *A. fumigatus* (٣١عزلة) وبنسبة ١٤,٠٣% ، ثم النوع *A. parasiticus* (٣٠ عزلة) وبنسبة ٥٧ .١٣ % . أظهرت النتائج أن قسما" كبيرا" من الفطريات المعزولة والمختبرة لها قدرة عالية في أنتاج سموم الافلاتوكسين، إذ بمجرد ملامسة سطح المستعمرة الفطرية لبخار الامونيا فان تغير لون قاعدتها إلى اللون الأحمر الوردي أو الأصفر البرتقالي فذلك

دليل على قابلية الفطر في إنتاج مثل هذه السموم (جدول ٢) ومن اجل معرفة مدى التأثير الناتج من اختلاف مكونات الوسط والاختلاف في درجات الحرارة على إنتاج سموم الافلاتوكسين من قبل الفطريات المختبرة، لوحظ تغير قواعد المستعمرات الفطرية بدرجات متباينة بين اللون الوردي والأصفر والبرتقالي وحسب كمية لافلاتوكسين المنتج ، إذ أظهرت النتائج أن اغلب الأنواع أعطت كشفا" موجبا" باستثناء الفطر *Penicillium* عند إنمائه على وسط CZA ، والفطر *A. echinulatus* عند تنميته على الوسط SDA ، وكذلك الفطريات *A. niger* و *A. candidus* و عند تنميتها عاى الوسط PDA *Alt. alternata* . وأظهرت النتائج أيضا" أن الوسط CZA هو الأفضل في إنتاج كمية سموم الافلاتوكسين من قبل الفطرين *A. flavus* و *A. fumigatus* ، يليه الوسط SDA ثم الوسط PDA ، إذ لوحظ ظهور اللون الأحمر الوردي القاتم في قاعدة المستعمرات. وقد يعزى سبب ذلك إلى طبيعة المواد التي يتكون منها هذا الوسط الحاوي على ثمانية مصادر أساسية تساعد في إنتاج سموم الافلاتوكسين، وهذا يتفق مع ما أشار اليه (Saito&Machida, 1999). أما فيما يخص تأثير درجة الحرارة على أنتاج سموم الافلاتوكسين، فقد ظهر أن درجة الحرارة ٣٥ مْ هي الأفضل لإنتاج سموم الافلاتوكسين وتغيرلون المستعمرات إلى اللون الأحمر القاتم وهذا التغير الشديد في اللون راجع إلى زيادة تكوين السموم من قبل العزلات الفطرية ، وهذا يتفق مع ذكره (Diener&Daviss, 1999) ، أما العزلات التي أعطت كشفا" سالبا" للافلاتوكسين فقد يكون سبب ذلك راجعا" إلى تأثير التباين في درجة الحرارة والتباين في مكونات الوسط الغذائي، أو لعدم قدرتها على إنتاج مثل هذه المواد، أو أنها تنتج بكميات ضئيلة يصعب الكشف عنها إلا باستخدام تقنيات أكثر حساسية من هذه التقنية التي تعد طريقة سريعة للكشف عن تكوين للسموم الفطرية (Abass, 2004) .

الاستنتاجات والتوصيات:

نستنتج من نتائج هذا البحث خطورة تلك الفطريات الانتهازية، لاسيما أنها عزلت من مرضى التهابات الإذن الوسطى المتقيح المزمن ، وبما أن سموم الافلاتوكسين هي مواد مسرطنة ومطفرة لذا نتوقع أن تحدث أضرار صحية على أنسجة الجسم وخصوصا" الجهاز التنفسي والهضمي ، وما تسببه من ضعف في النمو وزيادة في وزن كل من الكبد والكلى والطحال، وزيادة نسبة الدهون في دم المصاب ، فضلا" عن تأثيرها على جهاز المناعة كونها كابحة للمناعة بسبب انخفاض بروتينات المصل مثل الالبومين والكلوبيولين (Bakshi *et al.*, 1997)، وهذا ما أكدته الدراسات التجريبية على الحيوانات المختبرية (الجبوري ،

1994) بالإضافة إلى ذلك فأن الافلاتوكسين يحث على حدوث السرطان في الأعضاء الأخرى كالدماغ ، تبعا" لنوع الافلاتوكسين (Bl و Gl) وطريقة أخذ الافلاتوكسين (Bhatnagar *et al.*, 1992).

ونوصي بإجراء دراسات أعمق على تلك الفطريات وأثارها الصحية عندما تكون احد مسببات التهابات الإذن الوسطى لغرض الحد من انتشار تلك الفطريات باستخدام الوسائل الفعالة في التشخيص والمعالجة قبل أن تصبح تلك المسببات المرضية مزمنة.

جدول (١) المجموع الكلي والنسبة المئوية للأنواع الفطرية المعزولة من المرضى المصابين التهابات الإذن الوسطى المتقيح المزمن .

الأنواع الفطرية المعزولة	مجموع العزلات للنوع الواحد	النسبة المئوية %
Aspergillus flavus	٣٣	١٤,٩٣
A. niger	٢٧	١٢,٢٢
A. terreus	١٣	٥,٨٨
A. japonicus	١١	٤,٩٨
A. fumigatus	٣١	١٤,٠٣
A. echinulatus	٨	٣,٦٢
A. candidus	١٥	٦,٧٩
Parasiticus A.	٢٤	١٠,٨٦
A. glaucus	٢٢	٩,٩٥
***Penicillium* sp.**	٣٠	١٣,٥٧
Alternaria alternata	٧	٣,١٧
عدد العزلات الكلي	٢٢١	١٠٠,٠٠

جدول (٢): الكشف عن النشاط السمي (الافلاتوكسين) لبعض الفطريات المعزولة من المرضى المصابين بالتهابات الإذن الوسطى المتقيح المزمن CSOM

باستخدام أوساط زراعية صلبة ودرجات حرارة متباينة

الأنواع الفطرية المعزولة	وسط PDA			وسط SDA			وسط CZA		
	درجة الحرارة المئوية			درجة الحرارة المئوية			درجة الحرارة المئوية		
	٢٥	٣٠	٣٥	٢٥	٣٠	٣٥	٢٥	٣٠	٣٥
Aspergillus flavus	+	+	++	++	++	++	++	++	+++
A. niger	-	-	-	*	*	*	+	+	+
A. terreus.	+	+	++	**	++	++	+	+	++
A. japonicus	*	*	*	+	+	++	+	+	+
fumigatus . A	++	++	+++	++	++	+++	++	++	+++
A. echinulatus	+	+	++	-	-	-	+	+	+
A. candidus	-	-	-	-	*	**	-	*	**
parasiticus A.	+	+	+++	+	+	+	+	+	++
A. glaucus	*	*	*	+	+	+	+	+	+
sp. *Penicillium*	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Alternaria alternata	-	-	-	-	-	*	+	+	+

+ احمر وردي فاتح { قابلية الفطر على إنتاج سموم الافلاتوكسين قليلة}

*** اصفر برتقالي فاتح { قابلية الفطر على إنتاج سموم الافلاتوكسين قليلة}**

++ احمر وردي معتدل { قابلية الفطر على أنتاج سموم الافلاتوكسين معتدلة}

**** اصفر برتقالي معتدل{قابلية الفطر على أنتاج سموم الافلاتوكسين معتدلة}**

+++ احمر وردي غامق { قابلية الفطر على إنتاج سموم الافلاتوكسين عالية}

***** اصفر برتقالي غامق { قابلية الفطر على إنتاج سموم الافلاتوكسين عالية}**

- يدل على عدم قابلية الفطر في إنتاج سموم الافلاتوكسين

المصـــــادر:

١.الجبوري، كركز محمد ثلج (١٩٩٤). التأثير المتبادل بين الافلاتوكسينات وبعض المركبات الغذائية في ذكور الجرذان النامية. رسالة ماجستير ، كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل.

2.Abbass, H. K. (2004).Comparison of cultural and analytical methods for determination of aflatoxin production by *Aspergillus* isolates. Can. J. Microbiol. 50:193-199.

3.Aisner, J. and Murillo, J. (1989). Invasive aspergillosis in acute leukemia. J. Ann. Intern. Med. 8 : 12 – 15.

4. Bakshi, C. S., Sikar, A., Johri, T. S. and Malik, E. (1997). Effect of aflatoxins on total serum proteins : albumin and globulin in broilers , India . J. Co. Micro .Immu . Infec. Dis. 18(2):166-176.

5. Berry, C.L. (1988).The pathology of mycotoxins .
J.Pathol . 7(1):151-156.

6. Bhatnagar, D., Lillehoj, E. B. and Arar, D. K. (1992). Hand Book of Applied Mycology. Mycotoxins: In Ecological System Vol .
5. Marcel- Dekker , lnc. New York. pp. 213-214.

7. De – Hoog, G. S. and Guarro, J. (1995) . Atlas of Clinical Fungi. Univirsitat Rovirai Virgili, Reus. Spain. Pp. 228.

8. Diener, U. I. and Davis, N. D.(1999) .Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in :Aflatoxins ed. by Gold Balt , L.A. Academic Press , New York .pp. 13-54.

9. Ellis, D. H. (1994).Clinical Mycology : The human opportunistic Mycosis. Pfizer, New York. Pp. 211.

10.Elmer, W. K. and Glemn, D. R. (1985) . Laboratory identification molds in Practical Laboratory Mycology. 3rd. ed. Williams &Wilkins, Baltimore. Pp. 211.

11.Klein, A. S., Satio, J. and Reind, C. (1989) . Aflatoxin poisoning : treatment and the role of liver transplantation .Amri. J. Med. 3(2): 25 - 29.

12. Koker, B. J. (1997) .Chronic Suppurative Otitis Media. British J. Clinic Practice .12(2):31-35.

13. Moss, M. Q. (1989) Mycotoxins of *Aspergillus* and other filamentous fungi . J. Applied Bact. Sympo. Suppl .15(2):130-133.

14. Raper, K. B. and Funnel, D. I. (1977) . The Genus *Aspergillus*. Robert, E. Ktieger Publ. Co. New York. Pp.686.

15. Riley, R .T. Saimon , S. and Serink, J. I. (1993) .Fungal toxins in foods recent concerns .Ann. Rev. Nuter .12:30-32 .

16. Saito, M. and Machida, S. (1999) .A rapid identification method for Aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor Myco. Sci. 40:205-208.

17. Willliams, H. A., Depra, J R. and Sulzberger, J.A. (1991) . Lack of seasonal variability for recurrent otitis media in very young children. J. Family Pratic. 33 : 489 – 493.