وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

عزل وتشخيص البكتريا المسببة لالتهاب الأذن الوسطى في مدينة الديوانـــــــــــية

بحث مقدم الى
قسم علوم الحياة كجزء من متطلبات نيل درجة بكالوريوس علوم- في علوم الحياة

من قبل
عدنان خضير عبيس

بأشراف الدكتورة
غيداء جهادي محمد

١٤٣٧هـ ٢٠١٦ م

الخلاصـــة Abstract

جمعـت ٣٦ مسـحة أذن مـن شـعبة الأذن والانـف والحنجـرة (ENT) فـي مستشـفى الديوانيـة التعليمـي لمرضـى يعـانون مـن التهـاب الاذن الوسـطى ، راجعـوا المستشـفى للأشـهر الثلاثـة الاولـى مـن عـام ٢٠١٦ ، وبواقـع (٢١) ذكـر و(١٥) انثـى، وتـم عـزل ٣٢ عزلـة للبكتريـا المسـببة لألتهـاب الاذن الوسـطى بنوعيـة الحـاد والمـزمن ومـن ثـم تـم تحديـد المسـبب الاكثـر شـيوعا ، وكانـت العـزلات البكتريـة تشـكل نسـبة ٨٨,٨% مـن مجمـوع العـزلات الكليـة ، حيـث كـان ١٥ عزلـة لبكتريـا *Pseudomonas aeruginosa* وبنسـبة ٤٦,٨% ، و٨ عزلـة لبكتريـا *Staph.aureus* وبنسـبة ٢٥% ، و٢ عزلـة لبكتريـا *Staph.epidermidis* وبنسـبة ٦,٢% ، و٤ عزلـة لبكتريـا *Proteus spp.* وبنسـبة ١٢,٥% ، و٢ عزلـة لبكتريـا *E.coli* وبنسـبة ٦,٢% ، وعزلـة ١ لبكتريـا *Klebsiella* وبنسـبة ٣,١% .

وهنـاك ٢ عزلـة لـم يظهـر فيهـا اي نمـو بكتيـري ، وبنسـبة ٥,٥% و٢عزلـة وجـد فيهـا نمـو فطـري وبنسبة ٥,٥% من المجموع الكلي للعزلات .

الفصل الاول

المقدمة واستعراض المراجع

١-١ المقدمة :

❖ التهاب الأذن الوسطى Otitis media

يعد التهاب الاذن الوسطى مشكلة صحية تعاني منها مناطق كثيرة بالعالم ، وهو المسبب الرئيسي لفقدان السمع والطرش الكامل وشلل الوجه وخراج الدماغ والتهاب الأذن الداخلية (خليل ،١٩٨٩) و(ياسين ، ١٩٩٠) .

ويصيب الطبقة المخاطية السماحقية او المبطنة لشق الاذن الوسطى middle Ear cleft بشكل كلي اوجزئي ، ويصاحب المرض بطورية الحاد والمزمن تدفق السائل الذي قد يؤدي الى فقدان السمع الدائم (Beswick *et al.*,1999).

ومن المضاعفات الخطيرة هو التهاب جيوب النتوء الحلمي المرافق والتهاب السحايا (الخفاجي ،١٩٩٣) .

ويعرف التهاب الأذن الوسطى بأنه التهاب الاغشية المخاطية المبطنة لتجويف الأذن الوسطى المنتظمة كل او جزء من الاذن الوسطى ابتدأ من قناة اوستاكي الى جيب الغشاء والخلايا الهوائية الغشائية (الجوراني ، ٢٠٠١) .

ويوجد هذا المرض بطورين رئيسيين احدهما الطور الحاد والأخر الطور المزمن ، وقد يصاحب هذين الطورين تدفق السائل القيحي مما يزيد من اهمية وخطورة هذا المرض عند الطفولة (الطرفي ،٢٠٠٢) .

ونظراً لأهمية الموضوع ولغرض الوقوف على واقع الاصابة بمرض التهاب الاذن الوسطى ومسبباته ،حددت اهداف البحث والتي شملت :

- عزل وتصنيف انواع البكتريا المسببة لالتهاب الأذن الوسطى من المرضى المصابين بالتهاب الاذن الوسطى بنوعية الحاد والمزمن .
- تحديد المتسبب الاكثر شيوعاً للمرض .

١-٢- استعراض المراجع .

١-٢-١- تشريح الأذن Anatomy of the Ear

تتألف الاذن من ثلاث أجزاء هي الأذن الخارجـــــية Outer Ear والأذن الوسطى Middle Ear والأذن الداخلية Inner Ear والأذن الخارجية تتألف من الصيوان Pinna وقناة السمع الخارجية External auditory canal وغشاء الطبلة Tampanic membrane الذي يفصل الأذن الخارجية عن الأذن الوسطى .

الأذن الوسطى هي الغرفة الهوائية Air Champer التي تتكون من عظام صغيرة هي المطرقة Mallens والركاب Ancus والسندان Stapes ، وترتبط الاذن الوسطى بالخيشوم Nasoeharynx من خلال قناة اوستاكي Eustachiantube ، وتعد الاذن الداخلية عضو السمع والتوازن (Barbara and Homeier,2005) .

تبطن الأذن الوسطى بطبقة من الخلايا الطلائية العمودية الكاذبة والمهدبة والتي تحتوي على الخلايا الكاسية والغدد الفارزة للمادة المخاطية (Pool,1995).

وقد ادى اتصال الاذن الوسطى بالجزء العلوي للجهاز التنفسي الى تلوثها بالمسببات المرضية لهذا الجهاز مثل البكتريا والفيروسات وغيرها .

وان انفتاح هذه الاذن على المحيط الخارجي عن طريق غشاء الطبلة ادى ايضاً إلى تعرضها للعديد من المسببات المرضية الانتهازية التي تسبب اصابة الاذن الوسطى (Rayner,1998).

١-٢-٢- التهاب الاذن الوسطى Otitis Media

تعد الاصابة بالتهاب الاذن الوسطى بكل انواعة من المشاكل الصحية الشائعة بين المرضى المراجعين للعيادات الطبية (Luos,1995)

وتلعب الثقافة الصحية للمجتمع والبيئة دوراً مهماً في انتشار المسببات المرضية وحصول حالة الالتهاب ، اذ ان تنظيف القناة السمعية بصورة غير صحيحة وعدم اتباع شروط النظافة الصحية والسباحة في المياه الملوثة كلها تؤدي الى حصول الاصابة وانتشار المسببات المرضية (Nicolatill,2000).

وأشارت العديد من الدراسات الى حصول حالة التهاب الأذن الوسطى بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام يكون مصدرها التجويف الانفي البلعومي هو السائد .

أمـا مصـدر البكتريـا السـالبة لصـيغة كـرام المعويـة فـلا يكـون التجويـف الانفـي البلعـومي وانمـا تلوث القناة السمعية بهذه البكتريا قد يكون هو المسبب في حدوث حالة الاصابة .

إن حـدوث التغيـرات فـي ضـغط المجـرى الهـوائي تسـبب دفـع المسـببات المرضـية القادمـة مـن السائل الانفي والحنجرة نحو الأعلى عن طريق قناة اوستاكي (Faden.1997) .

اسـتدل (Lee,1999) ان معظـم الاطفـال الـذين يعـانون مـن حـالات التهـاب الاذن الوسـطى هـم ممـن يعـانون مـن حـالات التهابـات سـابقة فـي الجهـاز التنفسـي وان البكتريـا التـي تشـترك فـي حـدوث هذه الالتهابات توجد بشكل نبيت طبيعي Normal flora في الجهاز التنفسي .

ويصنف هذا المرض الى عدة اصناف هي :

- **التهاب الأذن الوسطى القيحي Suppurative Otitis media** والذي يشمل :
  - التهاب الأذن الوسطى القيحي الحاد .Acute Suppurative otits media
  - التهـاب الأذن الوسـطى المـزمن . Chronic Suppurative otits media (التميمي ،٢٠٠٤) و(الصقر ،٢٠٠٠).
- **التهـاب الأذن الوسـطى غيـر القيحـي الحـاد Non suppurative otits media والذي يشمل :**
  - _ التهاب الأذن الوسطى غير القيحي الحاد Acute non suppurative otits media.
  - _ التهاب الأذن الوسطى غير القيحي المزمن Chonic non suppurative Otits media (الطرفي،٢٠٠٢) و(الرماحي ،٢٠٠٦).
- **التهاب الأذن الوسطى النوعي Specific otitis media** ويشمل :
  - _ التهاب الأذن الوسطى التدرني Tuber sulous otitis media
  - _ التهاب الأذن الوسطى السفلي Syphilitic otitis media (الشيوخ،٢٠٠٢) و(الطرفي ،٢٠٠٢)
- **التهاب الأذن الوسطى الالتصاقي. Adhesive** (Pool,1995).

أما السبب الرئيسي لألتهاب الأذن الوسطى الحاد فقد وجد ان بكتريا *Haemophilus inflnenza* غير النمطية (Rayner,1998) و (Lous,1995) وكذلك *Streptococcus pneumonae* و*Moraxella catarrhils* وبنسبة اقل من *Staphylococcas* و *Streptococcus* (Nicolatill,2000) .

كما ذكر Heikinen أن ٣٠% من حالات التهاب الأذن الوسطى الحاد لا يكون سببها بكتري وانما فايروسي مثل *coronavirus* و respiratory syncytial virus (Heikinen,1998).

أما التهاب الأذن الوسطى المزمن فقد بين بعض الباحثين ان مدى واسع من البكتريا الهوائية واللاهوائية تظهر كمسببات لالتهاب الأذن الوسطى القيحي المزمن والبكتريا الهوائية *Pseudomonas aeruginosa* و *Kbsiella*و*E.coli* و*Staphylococcus aureus* .اما البكتريا اللاهوائية فتشمل *bacteroides melaninogenjens*و *bacteroides Fragilis* .

وتوصل Mills الممرضات المعزولة من اشخاص مصابين بالالتهاب الأذن الوسطى القيحي والتي شملت *Haemophilus influenza* و*H.paralnfluenza* و*Streptococcus pyogens* و*Staph.aureus* (الخفاجي ،١٩٩٣).

١-٢ -٣ الأعراض .

اعراض هذا المرض كثيرة وعادة تأتي فجأة سنذكر اهم الاعراض عند ملاحظتها ،والتي يجب مراجعة الطبيب لاستبعاد الاصابة بهذا المرض وهي التالي :

- ألم في الأذن ، بالنسبة للأطفال الصغار الذين لا يستطيعون وصف هذا الالم قد يستدل بهذا العرض اذ ان الطفل يضغط او يشد او يحك اذنة واحيانا يبكي اثناء الرضاعة ويرفض الأكل لأنها تغير من ضغط الأذن مما يزيد من حدة الألم .
- ارتفاع في درجة الحرارة .
- سريع الانفعال وعصبي .
- اضطراب في النوم وفقدان الشهية وقد يصاحبه تقيؤ .

- ضعف السمع .
- في المراحل المتأخرة من هذا المرض قد نلاحظ خروج افرازات صفراء من الأذن (الشيوخ ،٢٠٠٢).

١-٢-٤ المسببات .

١-٢-٤ – أ- المسببات البكتيرية .

توجد عدة مسببات بكترية منها *Staph. aureus*، *Staph. epidermidis* ، *Proteus spp* ، *Pseudomonas aeruginosa* و *E. Coli* . (Brook *et al.*,1998))

١-٢-٤-ب- المسببات الفطرية .

من المسببات الفطرية خميرة *Candida albicans* وفطر *Aspergilus*(الصقر،٢٠٠٠).

١-٢-٤-ج- المسببات الفيروسية .

من المسببات الفيروسية *Rhinoviruses*، *Enteroviruses & Adenoviruses* .(Heikinen,1998)

١-٢-٥ التشخيص .

بعد اخذ التاريخ المرضي يبدأ الطبيب او الممرضة بأخذ حرارة المريض ومن ثم يفحص أذن المريض باستخدام منظار الأذن لمشاهدة طبلة الأذن باستخدام هذه الاداة يحدد الطبيب اذا كانت علامات التهاب الأذن الوسطى الحاد ظاهرة مثل انتفاخ او احمرار طبلة الاذن بسبب ضغط السوائل على طبلة الأذن ، وقد يكتشف وجود ثقب بالطبلة وقيح في القناة الخارجية فيأخذ منة مسحة طبية لزراعتها لمعرفة نوع البكتريا المسببة للالتهاب (الشيوخ ،٢٠٠٢).

وبعد الفحص قد يطلب الطبيب عمل تخطيط للطبلة للتأكد من وجود السوائل بالأذن الوسطى او ان كان هناك انسداد في قناة اوستاكي وايضاً قد يطلب تخطيط للسمع الذي يظهر في اغلب الحالات صمم توصيلي (Battiki,2004).

١-٢-٦ العلاج

يعتمد علاج الأذن الوسطى في الغالب على المضادات الحيوية لأن معظم هذه الالتهابات سببها بكتري .(ياسين ،١٩٩٠).

إن استخدام المضادات بشكل متزايد قد ادى الى وجود سلالات بكتيرية مقاومة لها ، وهناك دراسات اثبتت ان المضادات الحيوية تجفف من الأعراض بشكل اسرع، وايضاً تمنع من حدوث المضاعفات الخطيرة ، فضلاً عن ذلك فأن القرار الاخير يرجع للطبيب في وصف المضادات .(ياسين ،١٩٩٠).

وفي الغالب يتم اختيار الاموكسيسلين وعند عدم توفره او عند وجود بكتريا مقاومة يتم اختيارالأوكمنتين او مضاد من السيفالوسبوريين بالجيل الثاني او الثالث .

وعند وجود حساسية ضد البنسلين فيتم اختيار مضاد حيوي ما اروليدي مثل الارثرو مايسين .

ويجب التأكد من تناول المضاد كل يوم في موعدة وعدم تركة عند الشعور بتحسن حالة المريض، اي اكمال المدة المحددة للعلاج من قبل الطبيب (ياسين ،١٩٩٠).

الفصل الثاني

المواد وطرق

٢- المواد وطرق العمل MATERIALS AND METHODS

٢-١-المواد

٢-١-١- الاجهزة Instruments

أستخدمت الأجهزة والمعدات المختبرية الآتية :-

جدول (٢-١) الأجهزة والمعدات المستخدمة

ت	أسم الجهاز	الشركة المصنعة	المنشأ
1	حاضنة Incubator	Gallenkamp	انكليزي England
2	Oven	Elektro,mag4420	تركي
3	Hood	Shinsueng	كوري

4	ميزان حساس Sensitive balance	Gallenkamp	انكليزي England
5	مصباح بنزن	Gallenkamp	انكليزي England
6	Autoclave	Gallenkamp	انكليزي England
7	Water bath	Gallenkamp	انكليزي England
8	Centtrifuge	Kokusan H-19F	ياباني
9	Microscope	Olympus	ياباني
10	ثلاجة لحفظ العينات	Beko	_____
١١	الناقل الزرعي القياسي Standard wire loop	John Bolten	England
١٢	شرائح زجاجية وغطاء الشريحة Slides and cover slides	Superestar	India
١٣	أطباق بلاستيكية Disposable Petri dishes	Al-Hani	USA

٢-١-٢- المواد الكيميائية CHEMICAL MATERIALS

جدول (٢-٢) المواد الكيميائية والصبغات

ت	المادة الكيميائية	الشركة المصنعة	المنشأ
1	a-naphthol	BDH	England
2	KoH,5HPO4,KH5PO4,NaCI	BDH	England
3	H5O5	BDH	England
4	كحول اميلي Amyl Alohol	BDH	England
5	يوريا Urea	BDH	England
6	مانيتول Mannitol	BDH	England

7	بروموثايمول الأزرق Bromo thymol blue	BDH	England
8	كلوكوز Glucose	BDH	England
9	احمر المثيل Methyl red	BDH	England
10	NaOH	BDH	England
١١	صبغة البنفسج البلوري Crstalfiolet	BDH	England
١٢	صبغة السفرانين Safranine dye	BDH	**England**

٢-١-٣- الأوساط الزرعية Culture media

جدول (٢-٣) الأوساط الزرعية

ت	الوسط الزرعي	الشركة المصنعة	المنشأ
1	الاكار المغذي Nutrient agar	Oxoid	England
2	اكار المكونكي MacConky agar	Oxoid	England
3	الاكار اليوريا Urea agar	Difco	U.S.A
4	الاكار المانيتول المملح Mannitol salt agar	Oxoid	England

5	الاكار الدم الاساس Blood base agar	Difco	U.S.A
6	MR-VP Medium	Difco	U.S.A

❖ الاوساط الزرعية Culture Media

حضرت الاوساط الزرعية وفق تعليمات الشركة المصنعة والمصدر العلمي (Maccfaddin,2000) وعقمت بالموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة ١٢١مْ وضغط ١٥ باوند/انج لمدة ١٥ دقيقة بعدها تركت لتبرد بدرجة حرارة ٥٠-٤٥ م واستخدمت هذه الاوساط لتنمية البكتريا وتشخيصها وتمثلت هذه الأوساط بالتالي:

١- الوسط المغذي الصلب Nutrient agar .

استخدم الوسط لغرض العزل الاولي ودراسة الخواص الزرعية المظهرية للبكتريا المعزولة .

٢- Simmons citrate agar .

استخدم الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون .

٣- MacConky agar .

استخدم الوسط لعزل البكتريا السالبة لصبغة الكرام وللكشف عن قابلية البكتريا على تخمير سكر اللاكتوز .

٤- Blood agar medium .

حضر الوسط بإضافة ٥% من دم الانسان الى الوسط الاساس Blood agar base المعقم بـ Autoclave والمبرد الى ٥٠م ، فضلاً عن ذلك استخدم الوسط لعزل البكتريا وللتحري عن قابليتها على تحلل الدم ولمعرفة نوع التحلل .

٥- Urea agar medium .

حضر الوسط بإضافة ١٠ مليلتر من محلول اليوريا المحضر بتركيز ٤٠% والمعقم بالترشيح الى ١٠٠مليلتر من الوسط الاساسي Urea agar medium والمعقم

Autoclave والمبرد الى ٥٠م وبعد مجانسة الوسط وزع في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة وترك ليتصلب بشكل مائل ، واستخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم اليوريز Urease .

٦- **MR.VP.Medium** .

حضر الوسط بإذابة ٥غرام ببتون و٥ غرام K2HPO4 في لتر ماء مقطر وذوبة المكونات بواسطة الحمام المائي وعدل PH الى ٧،٦ وعقمت بـ Autoclave برد الوسط الى ٥مْ ثم اضيف اليه ٥٠ مليلتر من محلول ١٠% كلوكوز والذي عقم بالترشيح ووزع الوسط في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة ، واستخدم هذا الوسط للكشف عن التحلل الكامل او الجزئي للسكريات الحامض او الاستيل مثيل كاربون .

٧- **Pepton water Medium** .

حضر بإذابة ٥ غرام كلوريد الصوديوم و١٠ غرام من الببتون في لتر من الماء المقطر وضبط PH الى ٧،٤ ثم وزع على انابيب اختبار بمقدار ٥ مليلتر لكل انبوبة .

٨- **Mannitil Motility Medium** .

حضر بإذابة ٥ غرام من سكر المانيتول و٤ غرام اكار في لتر من وسط المرق المغذي بعدها اضيف اليه بضع قطرات من كاشف البروموثايمول الازرق وضبط PH الى ٧ ثم وزع على انابيب اختبار بمقدار ٥ مل لكل انبوب ليكون جاهز للتعقيم .

٢-١-٤- الكواشف المستخدمة REAGENTS

حضرت الكواشف التالية حسب ما ذكر في (Macfaddin,2000)

١- Kovacs Reagents

أذيب ٥ غرام من مادة benzyde amino methyl في ٧٥ مل من كحول اثيلي ثم اضيف اليه ٢٥مل من حامض HCL المركز وحفظ في قنينة معتمة وفي الثلاجة لحين الاستعمال ،استخدم للكشف على قابلية البكتريا على انتاج الاندول.

٢- Bromothymol blue reagent

حضـر باذابـة ١غـرام مـن بروموثـايمول الازرق فـي ٢٥مـل مـن NaoH اضـيف الـى ٤،٧٥ مـل من الماء المقطر ، حفظ في قنينة معتمة لحين الاستعمال .

٣- Methyl red reagent

حضـر بأذابـة ٠،١ غـم مـن المثيـل الاحمـر فـي ٣٠٠ مـل مـن الكحـول الاميلـي ٩٥% ثـم اكمـل الحجم الى ٥٠٠ مل بالماء المقطر ، حفظ في قنينة معتمة في الثلاجة.

٤- Vogas – Prokauer reagent

تتضمن تحضير محلولين :

A-كاشف اومير O Meara reagent

حضـر بأذابـة ٤٠غـرام مـن KoH مـن ٩٠ مـل مـن مـاء مقطـر ثـم اكمـل الحجـم الـى ٧٠٠ مـل بالماء المقطر المعقم .

B-كاشف باريت Barrit reagent

حضـر بأذابـة ٥ غـم مـن مـادة **a-** naphthol فـي كحـول اثيلـي ٩٩% ثـم اكمـل الحجـم بـالكحول الـى ٧٠٠ مـل ، حفـظ المحلـولان فـي قنـاني معتمـة فـي الثلاجـة لحـين الاسـتعمال ، ويستخدم في الكشف عن قابلية البكتريا على التحلل الجزئي للسكريات.

٥- **كاشف الكتليز Catalase reagent**

حضر بتركيز ٣٠% من بيروكسيد الهيدروجين H2O2 في قنينة معقمة .

٦- **كاشف التجلط** Coaglase reagent

حضـر باضـافة ٠,٥ مـن بلازمـا الـدم فـي انبوبـة بلاسـتيكية تحتـوي علـى مـادة EDAT وحفـظ في الثلاجة .

٧- **كاشف الاوكسيديز Oxidase**

حضـر باذابـة ١غـم مـن Tetramethyl paraphenyene dimine dihyro chloride في ١٠٠مل من الماء المقطر .

٢-١-٥- تحضير المحاليل :

تم تحضير المحاليل بحسب ما ذكر (Jawetz,1998)

❖ محاليل صبغة كرام :

١- محلـول الكرسـتال البنفسـجي : تـم اذابـة ٠,٥ غـم مـن الصـبغة فـي ١٠٠مـل مـن المـاء المقطر .

٢- محلـول اليـود :تـم اضـافة ١غـم مـن مسـحوق اليـود و٩غـم مـن يوديـد البوتاسـيوم فـي جفنـة وتـم اذابنـة فـي ٥مـل مـن المـاء المقطـر واكمـل الحجـم الـى ١٠٠مـل وحفـظ فـي قنينـة معتمـة .

٣- القاصر Decolorizer : تم استعمال الكحول بتركيز ٩٥% .

٤- محلـول السـفرانين : تمـت اذابـة ٠,٥ غـم مـن الصـبغة فـي ١٠مـل مـن الكحـول ثـم اكمـل الحجم الى ١٠٠مل من الماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة .

٢-١-٦- التعقيم Sterilization

١- التعقـيم الرطـب Auto claving : تـم تعقـيم الاوسـاط الغذائيـة كافـة والمحاليـل بالمؤصـدة عند درجة ١٢١مْ ولمدة (١٠-١٥) دقيقة .

٢- التعقـيم الجـاف Dry sterilization : اسـتخدم الفـرن الكهربـائي لتعقـيم الزجاجـات عنـد درجة ١٨٠مْ لمدة ساعتين .

٢-٢- طرق العمل

١- جمع العينات Collection of Samples

جمعـت ٣٦ مسـحة اذن مـن المرضـى الـذين راجعـو مستشـفى الديوانيـة التعليمـي ، شـعبة الأذن والأنـف والحنجـرة (ENT) والـذين كـانوا يعـانون مـن التهـاب الاذن الوسـطى بنوعيـة الحـاد والمـزمن ،حيث اخذت العينات حسب طريقة(Indndhanan & ashrafal ,1996) . وكما يلي :

تـم إزالـة القـيح مـن الأذن الخارجيـة وتنظيفهـا باسـتخدام جهـاز مسـح الخـراج (suker) أو اسـتخدام الكحـول الأثيـل بتركيـز ٧٠% مـع مسـح الأذن وتنظيفهـا تمـرر المسـحة القطنيـة (swab)مـن قنـاة السـمع الخارجيـة الحاويـة علـى القـيح المتبقـي وتـدور قلـيلا لتكـون بتجـانس مـع القـيح وتنقـل المسـحة مباشرة إلى المختبر لإكمال خطوات الزرع البكتيري .

٢-- زراعة العينات .

لقحت الأوساط الغذائية Blood agar واكار الماكونكي MaCconkey agar بمسحات العينات بطريقة التخطيط Streaking ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة (١٨-٢٤) ساعة .

٣- تشخيص العزلات البكترية Identification of bacterial isolates

تم تشخيص العزلات من خلال مايأتي :-

٣-أ- الخصائص المظهرية للمستعمرات .

لوحظت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية كأشكالها ولونها،سطح المستعمرات ، وجود روائح مميزة لها ، قوامها ، شفافيتها ، نمط التحلل الدموي على اكار الدم ، تخمر اللاكتوز على وسط الماكونكي(MacFaddin ,2000).

٣-ب- الفحص المجهري

فحصت العزلات البكترية مجهرياً وذلك بأخذ مسحة من المستعمرات النامية على الاوساط الزرعية وتثبيتها وتصبيغها بصبغة كرام لملاحظة اشكال وترتيب الخلايا البكترية وتفاعلها مع الصبغة (MacFaddin ,2000).

٣-ج- الاختبارات الكيميو حيوية Biochemical.

أجريت اختبارات انزيم الكايتليز Catalase ، الأوكسيديز Oxidase ، انزيم urease، الفوكس بروسكاور، احمر المثيل Methyl red ، الأندول Indol ، استهلاك السترات citrate utilizetion ،إنتاج غاز كبريت الهيدروجين H2S ، اختزال النترات Nitrite reduction ،الجيلاتينيز Gelatinase بالنسبة للبكتريا السالبة لصبغة كرام (MacFaddin ,2000).

وأجريت اختبارات التحلل الدموي Hemolysis والكاتليز catalase والاوكسديز oxidase ، اختزال النترات nitrite reduction ، الحركة Motility، coagulase ، وتخمر الكلوكوز CLucose والمانيتول Manuiol بالنسبة للبكتريا الموجبة لصبغة كرام(MacFaddin (,2000 .

٣-د التشخيص باستخدام نظام API 20 E .

تم إجراء اختبارات اكمو حيوية اخرى باستخدام API 20 E لتأكيد تشخيص البكتريا السالبة لصبغة كرام وحسب تعليمات الشركة المصنعة .

النتائج والمناقشة Results &Discussion

تم عزل ٣٢ عزلة لأنواع البكتريا المسببة لألتهاب الأذن الوسطى وبنوعيه الحاد والمزمن من المرضى المراجعين لشعبة الأنف والاذن والحنجرة (ENT) في مستشفى الديوانية التعليمي ، نقيت وشخصت العزلات البكتيرية وذلك بتحديد الصفات المظهرية للمستعمرات النامية والصبغات المحضرة للشرائح المحضرة منها .

حيث شملت البكتيريا المعزولة نوعين من البكتيريا الموجبة لصبغة كرام وهي :

Staphylococcus epidermidis و *Staphylococcus aureus* ، والجدول رقم (١) يبين الاختبارات الكميوحيوية المستخدمة لتشخيصها .

أما الجدول رقم (٢) يبين الاختبارات الكميوحيوية التي استعملت لتشخيص أنواع البكتيريا السالبة لصبغة كرام والتي شملت *psedomanos aeroginosa* ، *E.Coli ،Proteus spp.*، *Klebsiella* .

جدول(3-1):الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية للعزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام

الأختبار / نوع البكتريا	Hemolysis	Catalase	Oxidase	Nitrate reduction	Motility	Coagulase	Glucose	Mannitol
S.aureus	+	+	-	+	-	+	+	+
S.epidermidis	-	-	-	-	-	-	+	-

جدول(3-2): الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية للعزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام

الأختبار	*P.aeruginosa*	*Proteus spp.*	*E.coli*	*klebsiella*
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	-	-	-
Indol	-	-	+	-
V.P.	-	-	-	+
Simmon Citrate	-	+	+	+
M.R.	+	-	-	-
Motility	-	+	+	-
Urease	+	+	-	+
H2S	-	+	-	-

جدول (٣-٣) النسبة المئوية لأنواع البكتريا المسببة لألتهاب الأذن الوسطى والمعزولة من العينات.

نوع البكتيريا	عدد العزلات	النسبة المئوية
Pseudomonas aeruginosa	١٥	%46.8
Staphylococcus aureus	8	%25
Staphylococcus epidermidis	2	%6.2
Proteus spp	4	%12.5
E.coli	2	%6.2
Klebsiella	1	%3.1

يتبين من الجدول (٣-٣) سيادة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* إذ عزلت بنسبة (٤٦,٨%) ، تليها بكتريا *staph.aureus* إذ عزلت بنسبة (٢٥%) تليها بكتريا *Proteus spp* إذ عزلت بنسبة (١٢,٥%) ثم تليها بكتريا *staph.epidermidis* إذ عزلت بنسبة (٦,٢%) ثم بكتريا *E.coli* إذ عزلت بنسبة(٦,٢%) ثم بكتريا *Klebseilla* وبنسبة (٣,١%).

أن نتائج الدراسة الحالية كانت متفقة مع دراسة (خليل،١٩٨٩) ، فقد وجدت الدراسة التي اجراها في مدينة الموصل ، إن هذه البكتريا أظهرت سيادة بالإصابة نفسها . كذلك توصل باحثون آخرون إلى نفس هذه النتائج مثل (ياسين ، ١٩٩٠) و(الخفاجي،١٩٩٣) و(الجوراني٢٠٠١) و(الطرفي،٢٠٠٢) و(الرماحي،٢٠٠٦).

أما المكورات العنقودية الذهبية *Staph.aureus* فقد كانت السبب الثاني لألتهاب الأذن الوسطى كما موضح في الجدول (٣-٣) وهذا يتفق مع دراسة (الصكر،٢٠٠٠) و(التميمي،٢٠٠٤) اللذان وجدا إن المكورات العنقودية كانت السبب الثاني في التهاب الأذن الوسطى .

أما بالنسبة لبكتريا *proteus.spp* فقد ظهرت بالترتيب الثالث كمسبب لألتهاب الاذن الوسطى ، وهذا ما يتفق مع دراسة (التميمي، ٢٠٠٤).

أما بالنسبة لبكتريا *staph epidermidis* فقد كانت النسبة قليلة (٦,٢%) ، وهذا ما يتفق مع دراسة (الرماحي ،٢٠٠٦) .

أما بالنسبة لأفراد العائلة المعوية المتمثلة بـ *E.coli*، اظهرت نسبة قليلة بانخفاضها الى نسبة (٦,٢%) بينما ظهرت *Klebsiella* بنسبة(٣,١%) .

ويمكن تعليل أسباب سيادة يكتريا *Pseudomonas areuginosa* كمسبب رئيسي لالتهاب الأذن الوسطى إلى ما يلي :

- تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* أكثر الغازيات الثانوية عندما تقل مقاومة الأذن الوسطى (الطرفي ،٢٠٠٢).
- تقاوم العديد من المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال مقارنة بأنواع البكتريا الاخرى (الطرفي ،٢٠٠٢) .
- تفرز نوعين من الانزيمات Alkaline, protease, Elastase ، بينما يفرز المضيف أنزيم Serine protease كاستجابة للألتهابات وجميع هذه الإنزيمات المفرزة من البكتريا و المضيف تشترك في تحطيم وثقب غشاء الطبلة مما يساعد البكتريا على غزو الأذن الوسطى وإحداث الإصابة (Avidano,1998).

بينما يعود تكرار وجود بكتريا *Staph.aureus* كمسبب لالتهاب الأذن الوسطى لأسباب عدة منها أنها تمتلك مقاومة نامية للمضادات الحياتية وإنتاجها لإنزيم البيتالاكتميز (Blueston,1995) .

أمـا بكتريـا *Staph.epidermidis* فتعـد متعايشـة علـى جلـد غشـاء الطبلـة والأذن الوسـطى وتصـبح انتهازيـة وتسـبب الإصـابة عنـد انخفـاض مقاومـة الأذن الوسـطى نتيجـة دخـول الجـراثيم الأخرى و نتيجة استخدام المضادات الحياتية .

إن مصـدر التهـاب الأذن الوسـطى بالبكتريـا المعويـة السـالبة لصـبغة كـرام يمكـن ان تكـون عـن طريـق التلـوث البـرازي للمجـرى السـمعي أو الجهـل بآليـة تنظيـف الأذن الخارجيـة واسـتخدام الطـرق غيـر الصـحيحة ممـا يسـاعد فـي نقـل الممرضـات كـذلك السـباحة فـي الانهـار والمسـتنقعات تعـد مـن طرائـق الاصـابة بـأفراد العائلـة المعويـة لأنهـا عرضـة للتلـوث بفضـلات الانسـان والحيـوان (Levinson,1993)

وهنـاك (٢) عينـة لـم تظهـر اي نمـو بكتـري علـى الـرغم مـن وجـود اعـراض المـرض ، ويعـزى ذلك الى احتمالية ان تكون الاصابة فايروسيه ، كما ان هناك (٢) عينة ظهر فيها نمو فطري .

❖ : المصادر

المصادر العربية

١- خليـل ، هيـثم محمـد (١٩٨٩) . أنـواع الجـراثيم المسـببة لألتهـاب الأذن الوسـطى فـي الاعمـار المختلفة في الموصل وحواليها . رسالة ماجستير ، كلية الطب ، جامعة الموصل .

٢- ياسـين ، حسـن هاشـم (١٩٩٠) . التهـاب الاذن الوسـطى دراسـة وبائيـة واحيائيـة ، رسـالة ماجستير ، كلية الطب ، جامعة البصرة .

٣- الخفـاجي ، فـراس حميـد (١٩٩٣) . دراسـة سـريرية واحيائيـة لالتهـاب الاذن الوسـطى القيحـي المزمن ،رسالة ماجستير كلية الطب ، جامعة بغداد .

٤- الجـوراني ، ماجـدة غـازي (٢٠٠١) . دراسـة بعـض الجوانـب المناعيـة والبكتريولوجيـة للمصـابين بالتهـاب الأذن الوسـطى فـي مدينـة البصـرة ، رسـالة ماجسـتير كليـة العلـوم ، الجامعـة المستنصرية .

٥- الطرفـي ، بلقـيس عبـد علـي (٢٠٠٢) . عـزل وتشـخيص البكتريـا والفطريـات المسـببة لالتهـاب الاذن ، رسالة ماجستير كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

٦- التميمي ، بشرى جبار حمود (٢٠٠٤) . دراسة بكتريولوجية عن بكتريا *Moraxella catarrhhis* المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب الأذن الوسطى القيحي المزمن في محافظة بابل ، رسالة ماجستير كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .
٧- الصقر ، رباب قاسم (٢٠٠٠) . دراسة عن بعض البكتريا الهوائية المقاومة للمضادات الحيوية المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب الاذن الوسطى ، رسالة ماجستير كلية العلوم ، جامعة بغداد .
٨- الرماحي ، سيوف خومان (٢٠٠٦) . دراسة بكتيرية ومناعية عن مرضى قيح الاذن الوسطى في الديوانية ، أطروحة دكتوراة كلية التربية ، جامعة القادسية .
٩- الشيوخ ، رنا مجاهد عبد الله (٢٠٠٢) . عزل وتشخيص بعض انواع البكتريا المسببة لالتهاب الاذن الوسطى ، رسالة ماجستير كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

المصادر الأجنبية

١- Avidano,M.A.; Cotter,C.S.; Ctriger, S.P. and Schults,G.S.(1998). Analysis of protease activity in human otitis media. Otolayngoal. Head- Neck. Surg.719(40:346-351).
2-Battik, M.N. and Ammar, S.I.(2004).Otitis terna infection in Jordan. Clinical and microbiological features. Saudi, med.j.25(19):199-203.
٣- Brook,I.(1998). Microbiogy of common infection in the upper respiratory tract .prim .care 25(3);633-648.
٤- Faden; H.; Duffy, L. ;Wasielewski, R.; Wolf, J.; Krystofik, D. and Tung,Y.(1997).Relationship between nasopharyngeal coloization and the development of Otitis media in children. Pediatric . Infect. Dis.J175:1440-1445.
٥- Heikinen,T.; Ghafar,F.; OkOrodudu, A.O.; Chonmaitrree, T. (1998). Serum anterluin- 6 in bacterial and no bacterial , acut otitis media pediatrics.102(2ptl) : 296-299 .
٦- Indudharan,R. and Ashraful, J.H.(1996). UeO pre-reucesweb in bacteriology of chronic cupportife otitis media. J. of laryngology and otology .110(10):950-951.

٧- Lee. K.J.F.(1999). Pediatric otolaryngology. In. Essential otolaryngology Head neck surgery .7th ed.1/9-18/9.

٨- Levinson,(1993) .Medical Microbiology and Immunology .3th ed. Alange media. 97 (3) : 396-402.

٩- Lous, J.(1995). Secretory otitis media in school children in screening for secretory otitis media advisable European J. of Gene Prac.1.87.97.

١٠- MacFaddin, J. F.(2000). Biochemical tests for the identification of medical bacteria 3rd ed., The Williams and Williams and Wilkins -Baltimor, U.S.A.Stellwagen, E. and Stellwagen, N.C. (2002). The free solution mobility of DNA in Tris-acetate-EDTA buffers of different concentrations, with and without added NaCl. *Electrophoresis*, 23(12): 1935-41.

١١- Nicolatill,M.B.Ch.B; Brad, M.B.; Nilesxit; Vasan, M. B.CH. B; Malcolm, F.R.A.C.S .(2000). Cerebellopotine angel lymphoma presenting an chronic Mastoiditis J. Laryngology, and otology .

١٢- Poole, M.D.(1995) .Otitis media complication andtreatment failures: Implications of pneumococcal resistant peediator. Infact Dis.J.14(4): 23.6.

١٣- Rayner,M.G.; Zhang,y, Gorry, M.C.; Chen,Y. and Ehrlich,F.D.(1998). Evidence of bacterial metabolic activity in culture negative otitis media with effusion: Clin. Invest. J.Jama.279:296.9.