مسح الفطريات الملوثة لردهات المرضى في مستشفى الديوانية وتقويم كفاءة المطهرات بها

عزل وتشخيص البكتريا المسببة لإصابات العيون في مدينة الديوانية

أ.م.د.ماجد كاظم الشبلي فيصل حسن عيسى الخزعلي زهراء خضير عباس الخفاجي

كلية التربية /علوم الحياة كلية التربية /علوم الحياة كلية التربية /علوم الحياة

الخلاصة:

شملت الدراسة 200 عينة هواء من ردهات المرضى في مستشفى الديوانية التعليمي خلال فترة الدراسة وهي(2011/11/1 الى 2012/4/30)، أظهرت النتائج ان 123 عينة أظهرت نموا فطريا وبنسبة 61.1% من هواء ردهات المرضى ،حيث تم تشخيص 8 أجناس فطرية وهي جنس الـ *Aspergillus* الذي احتل الصدارة بعدد العزلات وهي 44 عزلة توزعت على خمسة أنواع وهي *Aspergillusflavus*19 عزلة (15.4)% و*Aspergillusniger*18 عزلة *Aspergilluscandidus*3%(14.6) عزلات (2.4)% وعزلتان لكل من *Aspergillusfumigatus* و*Aspergillusterreus* (1.6)% جنس *Penicilliumsp*28 عزلة (22.7)% ثم جنس *Mucorsp*26 عزلة (21.1)% ، كما تم تشخيص عزلتان لكل جنس من الأجناس التالية *Alternariaalternata* و*Rhizopussp* و*Candida albicans* و *Cryptococcus neoformans* (1.6)%،اما نتائج حساسية الفطريات تجاه المطهرين الفورمالين والديتول ان نسبة تثبيط هذه المركبات للفطريات كانت متباينة حسب نوع وتركيز المطهر والجنسوالنوع الفطري وكانت هذه المطهرات في تراكيزها الاصلية 10% اكفأ في تثبيط الفطريات مما لو استخدمت في تراكيزها المخفف 5% ،2.5% وان الفورمالين كان اكثر تأثيرا على الفطريات والخمائر من الديتول.

المقدمة

ان للفطريات والخمائر دور فعال واساس في احداث الكثير من الاخماج عند المرضى الراقدين في المستشفيات فضلا عن تسببها لاصابات جهازية مؤثرة في الاشخاص الذين يعانون من ضعف المناعة وخاصة مرضى الحروق والجروح اذا تنتقل بينهم عن طريق المستشفيات [20]، لما لها من قدرة على النمو في درجة حرارة الجسم (37)مْ وتكوين ابواغ فطرية صغيرة الحجم مما يسهل دخولها والتصاقها بالخلايا الطلائية لأنسجة المضيف فضلا عن انتاجها مواد مثل السموم والانزيمات التي تتغلب على ميكانيكيات الدفاع المناعي في جسم المضيف كما ان لها القدرة على تحمل مديات واسعة من المطهرات البيئية [19]،وللهواء دورا مهم في حفظ وانتقال المسببات المرضية داخل بيئة المستشفى ونقلها من مريض الى اخر وهو العامل الرئيسي المهم في تلوث الردهات وصالات العمليات بمايحمله من جراثيم على ذرات الغبار [3] اذ تبين ان المسبباتالمرضية الموجودة في هواء ردهات المرضى هي المسبب الرئيسي لحدوث الاخماج المكتسبة من المستشفيات خصوصا لاشخاص ضعيفي المناعة [17].

ونظرا لخطورة الفطريات المتواجدة في هواءردهات المرضى على صحة المتواجدين فيها ، ارتأينا لدراسة هذا الموضوع الذي تضمن الاهداف التالية :

1-عزل الفطريات المرضية الملوثة لهواء ردهات المرضى في مستشفى الديوانية التعليمي العام

2-معرفة نسب مقاومة الفطريات المعزولة للمطهري الفورمالين والديتول

المواد وطرائق العمل

الاوساط الزرعية

وسط السابرود دكستروز أكار مع الكلورمفنينكول والسايكلوهكسمايد

Sabouraud s Dextrose Agar (SDA)with Chloramphenicol and Cyclohexamaide

حضر هذا الوسط بإذابة 65 غم وسط أكار السابرود الجاهز في1000مل من الماء المقطر عقم الوسط بالموصدة برد إلى درجة 45مْ ثمأضيف إليه 0.5 غم من المضاد الفطري السايكلوهكسمايد و250 ملغم من المضاد البكتيري الكلورامفنينكولوضبط الأس الهيدروجيني عند5.6استخدم لعزلالفطريات [11].

وسط اليوريا Urea agar Medium

حضر بإذابة 2.4 غم من وسط أكار اليوريا الأساس (Urea Agar Base) المجهز من شركة Oxoid في 95 سم^3 من الماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني عند 6.8 ، وعقم الوسط بالموصدة في الظروف الاعتيادية تم تبريده ثم أضيف إليه 5 سم^3 من محلول اليوريا المعقم بالترشيح وبتركيز 40% ، ثم وزع في أنابيب بمقدار 5 ملليلتر وبشكل مائل استخدم الوسط للتحري عن إنتاج إنزيم اليوريز [2] .

جمع العينات

جمعت200 عينة هواء من ردهات المرضى في مستشفى الديوانية التعليمي خلال فترة الدراسة (2011/11/1 الى 2012/4/30)،وذلك بتعريض أطباق حاوية على وسط Sabourud Dextrose Agar الى الهواء لمدة 10 دقائق مع التحريك المستمر لزيادة تعريضهاللهواء وبعدها وضعت جميع الاطباق في اكياس نايلون معقمة ونقلت الى مختبر الاحياء المجهرية في المستشفى لغرض تنميتها وتشخيصها[5].

الفحوصات التشخيصية الخاصة بالفطريات

اولا -الصفات المظهرية : اعتمدت الصفات المظهرية للمستعمرات بالنسبة للأعفان (molds) وتشمل شكل المستعمرة ولونها وحجمها وقوامها والصبغات التي تنتجها[11]

ثانيا - الصفات المجهرية: تضمنت شكل الخيط الفطري ولونه والكونيدات وتم ذلك بنقل جزء صغير من المستعمرة الفطرية باستعمال ابرة معقمة الى قطرة من صبغة اللاكتوفينول على شريحة زجاجية نظيفة اذ سخنت الشريحة بعد وضع غطاء الشريحة بإمرارها قليلا على لهب مصباح بنزن بعدها تركت الشريحة لمدة 30 دقيقة ثم فحصت تحت المجهر على القوة 100x و 40x لملاحظة الصفات المجهرية للعزل الفطري والتراكيب التكاثرية التي ينتجها الفطر[11] ،وشخصت بالاعتماد على المصدر[6]. أما الخمائر فقد شخصت باستخدام الاختبارات التالية :

A-النمو في درجة حرارة 37Growth in 37 c

اجري الاختبار بتنمية الخمائر على الوسط الزرعي (سابرود دكستروز أكار) في درجة حرارة 37م لمدة اسبوع ويعد الاختبار موجبا عند ظهور نمو للخمائر [7].

B-اختبار تكوين الانبوبة الجرثومية Germ tube test

اجري هذا الاختبار وفقا لما ورد في (Colle*et al*.,1996) وهو اختبار للتفريق بين الانواع التابعة لجنس المبيضات *Candidasp* وذلك بتلقيح (5مل) من مصل الدم الموجود في انبوبة زجاجية بلقاح من مستعمرات هذا الجنس وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة (2- 3) ساعة نقلت قطرة من الانبوبة الزجاجية المزروعة الى شريحة زجاجية ثم وضع غطاء الشريحة عليها وتم الفحص المجهري لملاحظة الانبوب الجرثومي ، في حالة تكون الانبوبة الجرثومية Germ tube فهذا مؤشرعلى ان الفحص موجب وهذا الفحص مميز للنوع *C.albicans*اذ نلحظبروز الانبوب الجرثومي من احدى جوانب الخلية .

C- تحلل اليوريا Hydrolysis of Urea

اجري هذا الاختبار بتلقيح انابيب الاختبار الحاوية على وسط اليوريا بالخمائر المراد تشخيصها باستعمال الناقل Loop أو ابرة التلقيح Needle وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 27- 30مْ ولمدة يومين الى خمسة أيام وعدت النتيجة موجبة بتغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي وسالبة عندما يبقى لون الوسط اصفر . يستخدم هذا الاختبار لتشخيص خميرة *Cryptococcus spp*[14] .

ثالثا : حفظ وادامة العزلات الفطرية Maintance of fungal isolates

للحفاظ على العزلات الفطرية لحين استعمالها زرعت في قنان خاصة سعة 20 مل ملئت بوسط السابرود ديكستروز أكار بصورة مائلة ووضعت في الثلاجة بدرجة 4 مْ ولمدة شهرين بعدها يتم اعادة زرعها على وسط السابرود ديكستروز أكار في طبق زجاجي وتعاد العملية مرة اخرى (Colle*et al*.,1996).

فحص حساسية الفطريات المعزولة تجاه مطهري الفورمالين والديتول :

- تحضير اللقاح الفطري

تم تحضير اللقاح الفطري بالاعتماد على ما أورده McGinnis[13]وذلك بنقل جزء من المستعمرات النامية على وسط (SDA) بعد تنشيطها وذلك باستخدام ابرة معقمة ووضعها في انبوبة محكمة الغلق (vial) حاوية على 5 مل من المحلول الفسلجي (Normal saline) ورج المحلول جيدا ثم حسبت اعداد الخلايا الفطرية (الابواغ) باستخدام جهاز عد الخلايا Hemocytometer للحصول على تركيز 10^{10} بوغ /مل .

- تحضير تراكيز مطهري الفورمالين والديتول :

استخدم مطهري الفورمالين والديتول بتركيزهما الاصلي وهو 10 % ومن هذه التراكيز تم تحضير تركيزيين هما 5%و2.5 % عقمت المطهرات بالترشيح باستخدام اوراق الترشيح الدقيقة 0.45Millipore filter paper مايكرون .

اختبار حساسية الفطريات للمطهرات:-

اخذ 0.2 مل من اللقاح الفطري ونشر على سطح وسط (SDA) المحضر سابقا في إطباق بتري باستخدام ناشر بشكل حرف (L-Spreader)[4] تركت الأطباق بعد تلقيحها لمدة 30 دقيقة ، عملت حفر 5ملم في الوسط الملقح بواسطة ثاقب الفلين [12] ، أضيف o.1 مل من تراكيز المطهرين المحضرةسابقا الى كل حفرة بواسطة ماصة دقيقة (Micro pipette)وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 28- 30 مْ لمدة تتراوح بين يومين الى ثلاثة أيام ، قيس قطر منطقة التثبيط النمو (Inhibition zone)بوحدات المليمتر[15] .

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص

أظهرتالنتائج ان 123 عينة أظهرت نموا فطريا وبنسبة 61.1% من هواء ردهات المرضى،حيث تم تشخيص8أجناس فطرية وهي جنس الـ *Aspergillus* الذي احتل الصدارة بعدد العزلات وهي 44 عزلة توزعت على خمسة أنواع وهي *Aspergillusflavus*19عزلة (15.4)% و*Aspergillusniger*18 عزلة (14.6)%و*Aspergilluscandidus*3 عزلات (2.4)% وعزلتان لكل من *Aspergillusfumigatus* و*Aspergillusterreus* (1.6)% جنس *Penicilliumsp*28 عزلة (22.7)% ثم جنس *Mucorsp*26 عزلة (21.1)% ، كما تم تشخيص عزلتان لكل جنس من الأجناس التالية *Alternariaalternata*و*Rhizopussp* و*Candida albicans* و*Cryptococcus neoformans* (1.6)%جدول1

جدول (1)الفطريات المرضية الملوثة لهواء شعبة الطوارئ في مستشفى الديوانية التعليمي العام

ت	الفطريات المعزولة	العينات التي اظهرت نمو	النسبة المئوية
1	*Alternaria alternata*	2	1.6
2	*Aspergilluscandidus*	3	2.4
3	*Aspergillusflavus*	19	15.4
4	*Aspergillusfumigatus*	2	1.6
5	*Aspergillusniger*	18	14.6
6	*Aspergillusterreus*	2	1.6
7	*Candida albicans*	2	1.6
8	*Cryptococcus neoformans*	2	1.6
9	*Fusarium sp.*	17	13.8
10	*Mucor sp.*	26	21.1
11	*Penicillium sp.*	28	22.7
12	*Rizopus sp.*	2	1.6
العدد الكلي		123	% 99.6

تقترب نتائج دراستنا هذه نسبياً مع ما توصل إليه RamadanوYehia[16] الذي أشار الى إن أعلى نسبة للتلوث كانت (53%) في هواء ردهات المرضى الراقدين في مستشفيات الموصل،وقد يكون مصدر التلوث في هذه الردهات من النقل الهوائي (air borne) أيضا حيث غالبا ما يدخل الهواء الى هذه الردهات دون وجود مرشحاتهوائية أو وسائل لطرد الهواء الى الخارج ومن المعروف إن الهواءيحمل أنواعاً جرثومية مختلفة كما أكدت ذلك العديد من الدراسات [18;22].

ومن الجدول 1 نلاحظ ان الجنس*sp. Aspergillus* قد شكل اعلى نسبة للظهور وقد يعود سبب هذا الانتشار الواسع له الى امتلاك انواعه لقابلية انزيمية عالية تمكنها من استغلال مختلف مصادر المواداد الغذائية وتحملها لمختلف الظروف البيئية [10] .ان ظهور التلوث الفطري في هواء ردهات المرضى امر يستدعي الانتباه من قبل الجهات المعنية اذ ان وجود هذه الممرضات مع المرضى الذين يعانون من نقص في الدفاعات المناعية قد يؤدي الى امور اصعب من الحالة التي راجع لاجلها المريض وقد تؤدي هذه المضاعفات الى الوفاة [8].

حساسية الفطريات للمطهرات:-

أظهرت نتائج اختبار حساسية العزلات الفطرية تجاه مطهري الفورمالين والديتول ان مطهر الفورمالين أبدى فعالية تثبيطية أعلى مما أبداه مطهر الديتول .إذاأبدىالأولبتركيزه الأصلي10% فعالية تثبيطية عالية حيت تراوحت نسب المقاومة له بين (47.3-10.7)% ماعدا *Alternariaalternata* و*Aspergilluscandidus* و*Aspergillusflavus* و*Aspergillusterreus* و*Candida albicans* و*Cryptococcus neoformans* و*Rhizopussp* فقد كانت حساسة بنسبة 100%، ولكن زادت نسبة المقاومة عند تخفيف التركيز الأصلي الى النصف أي 5% إذأصبحت نسبة المقاومة تتراوح

بين (100-21.4)% ماعدا *Aspergilluscandidus* كان حساس بنسبة 100% وتزداد المقاومة الى أكثر من ذلك عند تركيز 2.5 % لنفس المطهر لتصبح النسب متراوحة بين (100-71.4)%. أما بالنسبة لمطهر الديتول فنلاحظ من الجدول 2ان هذا المطهر كان اقل تأثيرا على الفطريات من مطهر الفورمالين وبالتراكيز الثلاث المستخدمة إذ نلاحظ ان هذا المطهر بتركيزه الأصلي تراوحت نسب المقاومة له بين (100-50)% ماعدا *Aspergillusterreus* كان حساس له بنسبة 100%وعلى نفس الحال نلاحظ ارتفاع المقاومة لهذا المطهر في تركيز (5)%(2.5)% إذ تراوحت نسب المقاومة في التركيز5%بين (66.6-100)% وفي التركيز 2.5%تراوحت النسب بين (100-72.2)%جدول 2.

جدول (2) النسب المئوية للمقاومة العزلات الفطرية قي الدراسة لمطهري الفورمالين والديتول

ت	الفطريات المعزولة	عدد العزلات	مطهر الفورمالين						الديتول					
			%10		%5		%2.5		%10		%5		%2.5	
			R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%
1	*Alternaria alternata*	2	0	0	1	50	2	100	2	100	2	100	2	100
2	*Aspergilluscandidus*	3	0	0	0	0	3	100	2	66.6	2	66.6	3	100
3	*Aspergillusflavus*	19	9	47.3	9	47.3	14	73.6	14	73.6	14	73.6	18	94.7
4	*Aspergillusfumigatus*	2	0	0	1	50	2	100	2	100	2	100	2	100
5	*Aspergillusniger*	18	8	44.4	11	55.5	15	83.3	9	50	13	72.2	13	72.2
6	*Aspergillusterreus*	2	0	0	1	50	2	100	0	0	0	0	2	100
7	*Candida albicans*	2	0	0	1	50	2	100	2	100	2	100	2	100
8	*Cryptococcus neoformans*	2	0	0	1	100	2	100	2	100	2	100	2	100
9	*Fusarium sp.*	17	5	29.4	10	58.8	17	100	17	100	17	100	17	100
10	*Mucor sp.*	26	3	11.5	6	32	26	100	26	100	26	100	26	100
11	*Penicillium sp.*	28	3	10.7	6	21.4	20	71.4	28	100	28	100	28	100
12	*Rhizopus sp.*	2	0	0	2	100	2	100	2	100	2	100	2	100
	العدد الكلي	123	28	22.7	42	34.1	83	67.4	82	66.6	11	89.4	117	95.1

R =مقاومة العزلات الفطرية للمطهر

تتفق نتائجنا مع نتائج دراسة الكناني [1] فيما يخص مطهر الفورمالين حيث أشارت الى ان استخدام الفورمالين بتركيز الأصلي هو أكفأ في التثبيط وقد يعود السبب الى استعماله القليل في المستشفيات لكونه مهيجا للأنسجة وذو رائحة قوية وغالي الثمن [21].

كما نلحظ من نتائج الدراسة أيضا انه كلما خفف المطهر أو المعقم كلما قل تأثيره على الفطريات وقد يكون هذا السبب الرئيس لتواجد الفطريات والجراثيم الأخرى فيالردهات الأخرى التي تستخدم في تنظيفها المطهرات والمعقمات المخففة دون أتباع أي قواعد صحيحة للتخفيف بل يستخدم ماء الحنفية الذي يكون حاويا على الجراثيم التي بدورها تبطل مفعول هذه المعقمات ،إذ أشارKelff وجماعته [9] ان استخدام الماء في تخفيف المعقمات والمطهرات وأتباع العشوائية في التخفيف يؤدي الى تلوث تلك المواد وإبطال دورها في القضاء على التلوث الميكروبي.

المصادر

1. الكناني ،هيام قائد محمد.(2005). عزل وتشخيص الاعفان والخمائر الملوثة للمستشفيات في مدينة الديوانية . رسالة ماجستير، كلية التربية ابن الهيثم - جامعة بغداد.
2. Atlas,R.M.(2004). Handbook of Microbiological Media. 3eded.CRC Press LLC. USA.
3. Benenson ,A. S.(1995).Control of communicable Disease in Man.12thed.Newyork , American public health association.
4. Casals,J.B.(1979).Tablet Sensitivity testing of pathogenic fungi. Journal of clini.Patholo.32:719.

5. Collee , J; Gerald , G. ; Fraser , F. ; Andrew , G. ; Marmion , M ; Barrie , P. ; Simmon , S.andAnthong , N.(1996) . "Practical Medical Microbiology ".14th.ed Churchill Livingstone .Newyork.,pp.131-150
6. De Hooge, Guarro, g.s.j. ; Gene, j. and figueras, m.j. (2000).Atlas of clinical fungi, 2nd .vol. l.centraabureeauvoorschimmelculturees. Utrecht, the Netherlands.
7. Ellis, D.H.(1994).Clinical mycology. human opportunistic mycoses. Gillingham.Printters Pty. Ltd,Australia. P: 166.
8. Jawetz, C.;Melnick, J.L. &Adelberg, E.A.(1998). Review of Medical Microbiology. 21st ed.Appleton and Lange.USA.
9. Kelff,S.R.;Plebeq ,J.G.andMallie,M.(2002).Nosocomial Fungus Infection .J.Med .Vet.Mycol.33:404-409.Klepser,pharm ,D.and Michael ,E.(2004).Future candidates in the search for New Anti Fungal Agent Current Secince ,Inc.1-7.
10. Kim,D.G.Hoog,S.C.kim ,H.J.,Chi,J.G.,Han,m,h.,Choic, (1993).Cerebral aspergilosis in immunologically compeletentpatinents .Surg.Neurol .4:326-331.
11. Kwon-Chung, K.J. and Bennett, J.E.(1992).Medical Mycology. Williams and Wilkins Company,pp. 105-161.
12. Mahmood, M.J.;Jawad, A.Y.;Hussain, A.M.;Al-Omari,M.&Al-Naib, A.(1989).Invitro Antimicrobial activity of Salsolarosmarinas and AdiantumCapillusVeneris.Int.J.Crnde Drugs.Res.27:14-16.
13. McGinnis, M.R.(1980).Laboratory handbook of medical mycology. Academic press,New York, U.S.A.66P.
14. Padhye, A.&Ajello, L.(1977).The taxonomic status of Hedgehog fungus trichophytonerinacei. Sabouraudia., 15:130-141.
15. Prize,C.;Pauli,M.&Bazerque,P.(1990).Anantibiotic assay by the agar-well diffusion Method.J.Actabiologiae.15:113-115.
16. Ramadan ,N.A.andYehia ,M.M.(1995). Occurrence of fungi in the atmosphere of mousul hospitals .Basrah Journal science ,13(1) : 67-72.
17. Rath, J.D.(2000).Nosocomial infection in surgical wards,Arch.Intern.Med.,35:120-125.
18. Vincent ,J.L.;Bihari,D.J.;suter,Bruining ,H.A.;White,J.;Nicollas-International Advisory committee :the role of the air in Nosocomial infection Strylenes ,M.J.(1995).Traking the epidemiology of infection and antibiotics resistance in hospital :Time to deploy molecular typing ,J.Med .Microbial .45:1035-1036.
19. Virella ,G.(1997).Microbiology and infiction diseases .3rd edition William &Wilkins Company .USA
20. Wallace ,K.R.(2000).Bacterial nosocomical infections in some generals hospitals infections control . Hosp.Epidermiol.(20)5:210-215.
21. Wenzel,R.P.(1997).Disinfection,sterilization and waste disposal in :prevention and control of nosocomicak infection .3rd ed.Bultimore: Williams and Wilkns,PP:539-593.
22. Werstey,M.A.;ward,K.A. andPraker,L.(1998)The role of air-borne and baths in wards contamination ,AM.Control.J..13(21):15-18.

Survey of indoor fungi of sick patients Al-Diwania hospital and evaluated efficiency of sterile materials

A .P.D. Majedkadem AL-ShablyFaisal Hassan IssaAL-KhazaCollege of Education/ Biology College of Education/ Biology

ZahraakedeerAbaass AL-kafaji

College of Education/ Biology

Abstract

The study included 200 samples of air corridors of hospital patients in the education of Diwaniyah during the study period, namely, (11/01/2011 to 04/30/2012). The results showed that 123 samples showed growth of fungal and by 61.1% of the air corridors of patients, where they were diagnosed 8 races innate is the genus *Aspergillus*, who took the lead a number isolates are 44 isolation were distributed among five types of the *Aspergillus flavus* 19 isolates (15.4)% and *Aspergillus niger* 18 isolates (14.6)% *Aspergillus candidus* 3 isolates (2.4)% and 2 isolates each of *Aspergillusfumigatus* and *Aspergillusterreus* (1.6)% sex *Penicillium sp* 28 isolates (22.7)% and genus *Mucor* sp 26 isolates (21.1)%, and was diagnosed 2 isolates each race of races following Alternariaalternata and *Rhizopus* sp and *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* (1.6)%, either the results of the sensitivity of fungi to cleansers formalin and Dettol that the percentage of inhibition of these compounds for the fungus differentiated by the type and concentration of disinfectant, sex and type innate this was the disinfectants in the concentrations original 10% in the most efficient inhibition of fungi than if used in diluted concentrations of 5% and 2.5% formalin was more effective on fungi and yeasts of Dettol.