

بررسی تجربی پاتوژن کاندیدا آلبیکنس و اسپرجیلوس نایجر در گوش سگ

دکتر عیله‌رضا خسروی^۱، دکتر رسول روح‌الامین^۲، دکتر شهرام جمشیدی^۱، دکتر ایرج سهرابی حقدوست^۲، دکتر محمدعلی راد^۳

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۴، شماره ۲، ۱۰ - ۱، (۱۳۷۸)

قارچهای فرصت طلب به صورت بسیار گسترده‌ای در محیط اطراف ما پراکنده‌اند. معهداً تعداد قارچهای بیماریزا برای انسان و حیوانات در حدود ۲۷۰ گونه قارچی می‌باشد. در این میان گونه‌های مختلف اسپرجیلوس جزء شایعترین و بیماریزاترین ساپروفیت‌های فرصت طلب به حساب می‌آیند که موجب اسپرجیلوزیس در انواع حیوانات و انسان می‌شوند (۱۸). کاندیدا آلبیکنس نیز از گونه‌های ساکن در بدن بوده که بطور فرصت طلب موجبات عفونت میزبان را فراهم می‌نمایند. از طرف دیگر مجرای گوش خارجی نیز با توجه به دارا بودن شرایط مناسب از تهاجم این قارچها در امان نبوده و گزارشات بسیار زیادی از عفونتهای موضعی مجرای گوش خارجی توسط این عوامل در انسان و سگ گزارش گردیده است (۱۱). اکثر گونه‌های حیوانی و انسانی در شرایط طبیعی نسبت به عفونت منتشر این قارچها مقاوم می‌باشند و عموماً تنها در شرایطی که منجر به کاهش سطح ایمنی بدن شود، نظیر استفاده از داروهای ایمنوساپرسیو امکان ابتلای به این چهره از بیماری فراهم می‌گردد.

امروزه تعداد بسیار زیادی از بیماریها از جمله نئوپلازی‌ها، اختلالات خونی، بیماریهای ریوی مزمن و پیوند اعضا و غیره با استفاده از داروهای ایمنوساپرسیو تحت درمان قرار گرفته و ایجاد اشکال در انتشار عوامل قارچی فرصت طلب بخصوص کاندیدا و اسپرجیلوس به دنبال پیوند اعضا از مشکلات اساسی در این ارتباط می‌باشند.

در این تحقیق سعی شده با استفاده از مدل تجربی سگ، عوامل قارچی فرصت طلب کاندیدا آلبیکنس و اسپرجیلوس نایجر در مجرای شنوایی گوش خارجی تلقیح و سعی گردید روند علائم بالینی و خصوصیات بیماریزایی این قارچها در گوش این حیوانات مورد بررسی قرار گیرد. به منظور فراهم آوردن زمینه‌های بررسی، کاهش کفایت و توانمندی سیستم دفاعی و تأثیر آنها در میزان مقاومت یا توزیع احتمالی ضایعات در ارگانهای مختلف در گروههایی از سگ تحت مطالعه با استفاده از داروهای ایمنوساپرسیو امکان بررسی لازم در این زمینه نیز فراهم گردیده است.

مواد و روش کار

الف - انتخاب حیوان

به منظور این بررسی تعداد ۱۰ قلاده سگ انتخاب گردید. سگها همه از نظر نژادی مخلوط بودند و سنی بین ۲ تا ۳ سال داشتند. مشخصات دیگر آنها شامل جنس و وزن نیز (جدول ۱) ثبت می‌گردید. بعد از اطمینان از حصول سلامتی کامل در آنها و قبل از انجام هرگونه عملیاتی در سگهای مورد آزمایش ابتدا آنها، به منظور خو گرفتن با شرایط محبوس در داخل قفسها به مدت یک هفته به صورت مجزا نگهداری می‌شدند. درمان کور سگهای مورد آزمایش برای از بین بردن آلودگی احتمالی آنها به سستوها بعد از عادت کردن سگها با شرایط جدید (روز هفتم) با استفاده از داروی پرازیکوانتل (درونسیت) به میزان ۱۰ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و درمان بر ضد نماتودها در روز دهم نگهداری با استفاده از لوامیزول به میزان ۱۰ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن صورت گرفت.

در این بررسی سعی گردید تا با استفاده از مدل تجربی سگ، پاتوژن کاندیدا آلبیکنس و اسپرجیلوس نایجر در گوش سگ مورد مطالعه قرار گرفته و روند تهاجمی احتمالی آنها نیز پس از سرکوب ایمنی مورد مقایسه قرار گیرد. بدین منظور تعداد ۱۰ قلاده سگ انتخاب و آنها را به دو گروه پنج تایی تقسیم و در یک گروه در گوش راست اسپرجیلوس نایجر و در گروه دیگر کاندیدا آلبیکنس تلقیح گردید. علائم بالینی در دو گروه شامل تکان دادن سر، پایین افتادگی لاله گوش و خم نمودن سر به طرف گوش مبتلا و مالیدن و پنجه زدن ناحیه مذکور بود. حیوانات مورد مطالعه در هر دو گروه به دنبال ملامسه گوش از خود علائم درد را بروز می‌دادند. با این حال همگی از نظر وضعیت عمومی در شرایط مناسب به سر می‌بردند و از اشتهاهی خوبی برخوردار بودند. در این بررسی مطالعه مجرای گوش به وسیله اتوسکوپ انجام گرفت که نشان دهنده حضور ترشحات سیاه‌رنگ یا قهوه‌ای تیره و چسبنده و التهاب و قرمزی مجرا در هر دو گروه بود. ولی اتکاء به علائم بالینی مشاهده شده و معاینه مجرای گوش با استفاده از اتوسکوپ هیچ یک به تنهایی قادر به تفریق این دو عامل از یکدیگر نبودند. بیوپسی اخذ شده از یک مورد از سگهای مورد آزمایش از دو گروه نشان دهنده تهاجم کاندیدا به دیواره مجرا و تشکیل میسلیم کاذب بود در حالی که در اسپرجیلوس تمایل به حضور در مجرای شنوایی بیشتر دیده می‌شد. گسترش‌های به عمل آمده به وسیله سوآب گوش از هر دو گروه نشان دهنده حضور قارچهای فعال و زنده بود. تضعیف ایمنی با استفاده از سیکلوفسفامید و دکزامتازون در سه قلاده از هر گروه انجام گرفت. مقایسه تابلوی خونی در این دو گروه از سگها، تضعیف ایمنی را با کاهش معنی‌دار سلولهای لکوسیتی و نوتروفیل تأیید نمود. در سگهای آلوده به کاندیدا پس از ۲۴ ساعت افزایش خفیف درجه حرارت (۳۹/۲ درجه سانتیگراد)، دپرسیون، کاهش فعالیت فیزیکی و بی اشتهاهی را از خود نشان دادند. در حالی که سگهای آلوده به اسپرجیلوس همگی در وضعیت بدنی مناسب قرار داشتند. یک هفته پس از ایجاد تضعیف ایمنی کلیه سگهای مورد آزمایش با استفاده از روش بدون درد معدوم گردیدند و پس از بررسی ماکروسکوپی نمونه‌هایی از اندامهای مختلف جهت مطالعات قارچ‌شناسی و هیستوپاتولوژیک به آزمایشگاههای مربوطه ارسال گردید. از نظر ماکروسکوپی با توجه به تأیید مشاهدات انجام شده توسط اتوسکوپ در گوش تمام سگهای مورد آزمایش و همچنین عوارض ناشی از تزریق سیکلوفسفامید نظیر سیستمیت و تحلیل غدد لنفاوی داخلی و خارجی در گروهی که سیستم ایمنی آنها تضعیف شده بود عارضه خاص دیگری مشاهده نگردید. نتایج حاصل از کشت تنها انتشار کاندیدا آلبیکنس را در سه قلاده سگی که توسط این ارگانسیم آلوده شده و مورد تضعیف سیستم ایمنی قرار گرفته بودند نشان داد. در مورد عفونتهای قارچی اسپرجیلوسی موارد خاصی مشاهده نگردید. در این بررسی به ترتیب کلیه‌ها و ریتین از بیشترین آلودگی برخوردار بودند. گسترش‌های انجام شده از کلیه‌ها و رنگ‌آمیزی توسط روش GMS مخمرهای در حال جوانه زدن به شکل مجتمع همراه با هایف‌هایی بدون دیواره عرضی را در بافت نمودار ساخت.

واژه‌های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، اسپرجیلوس نایجر، اوتیت خارجی، تضعیف ایمنی، سیکلوفسفامید

۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۳) گروه آموزشی پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.



۲. **آسپرژیلوس نایجر**: این سویه قارچی از آب مقطر استریل بر روی پلیت‌های استریل حاوی محیط سابورو گلوکز ۴ درصد آگار پاساژ داده و در ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶ روز نگهداری گردید. جهت اطمینان از عدم پلئومورفیسم در این قارچ آن را در محیط چاپک داکس آگار (Czapeck dox agar) کشت داده و به مدت ۴ روز در ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از آن کلنی‌های قارچی بر روی محیط سابورو گلوکزیرات (سابوروی مایع) کشت داده شده و در ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ هفته نگهداری گردیدند. برای جداسازی کنیدی‌های این قارچ ابتدا با استفاده از فیلتر شماره ۱ واتمن (Whatman filter No.1) پرگنه‌های قارچی از محیط جدا شدند. سپس سه بار با آب مقطر استریل و دو بار با فسفات سالین بافر (Phosphate buffer) (PBS) (saline) شستشو داده شده و با عمل سانتریفیوژ (۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲۰ دقیقه) کنیدی‌ها از رشته‌های قارچی جدا شدند (کنیدی‌ها در سطح قرار می‌گیرند) سپس کنیدی‌های خالص را در آب مقطر استریل حل نموده و یک قطره از آن را در زیر لام هماسیتومتر قرار داده و میزان کنیدی را به 1×10^6 cell/ml رسانده، از این سوسپانسیون تهیه شده جهت تزریق به سگ‌ها استفاده گردید.

د - تقسیم‌بندی سگ‌های مورد آزمایش

به منظور این بررسی سگ‌ها به دو گروه پنج‌تایی تقسیم و یک گروه جهت بررسی آسپرژیلوس نایجر و گروه دیگر به منظور تلقیح کاندیدا البیکنس در نظر گرفته شدند. در تمام موارد گوش راست جهت تلقیح و گوش چپ نیز به عنوان شاهد انتخاب گردید. در ابتدا پس از معاینه مجدد توسط اتوسکوپ و حصول اطمینان از عدم وجود هرگونه عارضه غیر طبیعی، مجرای شنوایی توسط کورت خراش داده شد و سپس به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده در مجرای گوش وارد گردید و مقداری نیز در دیواره‌های آن تلقیح شد. به منظور جلوگیری از خروج مایعات تلقیح شده گوش‌ها به مدت چند ساعت توسط بانداژ و مصرف بسته می‌شدند، همچنین با تزریق داخل عضلانی پنی‌سیلین قطره 6.3.3 گوشی جنتامایسین سعی شد تا از بروز عفونت‌های باکتریایی ثانویه جلوگیری شود.

پس از تلقیح هر یک از سگ‌های مورد آزمایش به شکل منظم و مداوم، محل تلقیح و همچنین سایر اعضا و شرایط عمومی آنها از جمله نحوه رفتار دام، وضعیت اشتها و مصرف آب، دفع مدفوع و غیره بررسی و ثبت می‌گردید. همچنین با استفاده از اپلیکاتور، گسترشی از گوش آنها تهیه و جهت بررسی ارگانیزم‌های داخل مجرای گوش به آزمایشگاه قارچ‌شناسی ارسال می‌شد. پس از گذشت یک ماه، جهت بررسی بیشتر تغییرات حاصل از بکار بردن عوامل قارچی مذکور، توسط کوچکترین شماره پانچ اسکولاپ، نمونه بیوپسی از داخل مجرای آلوده یکی از سگ‌های مورد آزمایش از هر گروه تهیه و در داخل فرمالین به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال و مورد بررسی قرار گرفت.

جهت تضعیف ایمنی و بررسی اثرات حاصل از این گونه داروها تعداد سه قلاده از سگ‌های هر گروه و در مجموع ۶ قلاده سگ انتخاب و میزان 14 mg/kg سیکلوفسفامید به (Cyclophosphamide) و 0.5 mg/Case دگزامتازون (Dexamethasone) داخل ورید رادیال هر یک از سگ‌ها تزریق گردید. لازم به ذکر است که قبل از مصرف این داروها و بعد از آن از سگ‌های انتخابی خونگیری شد و وضعیت سلول‌های خونی آنها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با توجه به افزایش حساسیت در سگ‌ها سعی شد با تزریق پنی‌سیلین و جنتامایسین از بروز عفونت ثانویه باکتریایی جلوگیری بعمل آید. در این دوره تمام علائم بالینی بررسی شد و نتایج حاصل از آن بطور کامل ثبت گردید.

با توجه به سن و شرایط نگهداری جهت جلوگیری از هرگونه آلودگی به عفونت‌های میکروبی و ویروسی تمام سگ‌های مورد آزمایش بر علیه بیماری‌های عفونی از قبیل دیستمبر، هپاتیت عفونی سگ‌ها، پارواویروس و لپتوسپیروز واکسینه شدند.

سگ‌ها در طول دوره آزمایش در قفس‌های مجزا و محبوس کننده نگهداری می‌شدند و با یکدیگر در تماس نبودند. مشخصات هر سگ شامل، سن، جنس، رنگ، وزن، تاریخ دریافت داروهای ضد انگلی و تاریخ واکسیناسیون در روی قفس سگ‌های مورد آزمایش بطور انفرادی نصب گردید و در دفترچه ثبت روزانه نیز عملیات انجام شده بطور مرتب یادداشت می‌گردید. در طول دوره آزمایش سگ‌ها عمدتاً با گوشت درجه دوم تغذیه می‌شدند. مدفوع داخل قفس‌ها روزانه با رعایت کامل اصول بهداشتی جمع‌آوری می‌گردید و فضای داخل قفس و اطراف آن با مواد ضدعفونی کننده بخوبی شستشو می‌شد. لازم به ذکر است گوش تمام سگ‌های مورد آزمایش توسط اتوسکوپ مورد معاینه قرار گرفته و پس از اطمینان از سلامت آنها، توسط پنبه و الکل تمام ترشحات خارج می‌گردید.

ب - انتخاب استرین‌های قارچی

در این بررسی از دو گونه قارچی فرصت‌طلب استاندارد کاندیدا البیکنس (Candida Albicans) (C.A,123) و آسپرژیلوس نایجر (Aspergillus niger) (A.N.12) استفاده گردید. سویه (C.A,123) کاندیدا البیکنس از یک خانم مبتلا به واژنیت کاندیدیایی مزمن در ۱۴ ماه قبل از آزمایش جدا گردیده بود و بیماری‌زایی آن (به صورت سیستمیک و تهاجمی) با استفاده از خرگوش به اثبات رسیده بود. این سویه به صورت لیوفیلیزه در کلکسیون بخش قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری می‌شود. سویه (A.N, 12) آسپرژیلوس نایجر از یک کشاورز مبتلا به اتومایکوز در دو سال پیش از آزمایش جدا گردیده بود و در مقایسه با سویه استاندارد ارسالی از مرکز قارچ‌شناسی لندن از حدت بالاتری برخوردار بود. این قارچ در آب مقطر استریل نگهداری می‌گردد.

ج - روش کشت

۱. **کاندیدا البیکنس**: ابتدا این مخمر از حالت لیوفیلیزه خارج گردید. جهت انجام این کار میزان ۳ میلی لیتر آبگوشت برین هارت (Brain heart) را با پودر مخمري مخلوط نموده و آن را به مدت دو ساعت در حرارت آزمایشگاه نگهداری نموده تا آب از دست رفته جبران گردد، سپس با روش کشت خطی، مخمرها، در پنج پلیت استریل حاوی محیط سابورو گلوکز ۴ درصد آگار همراه با کلرامفنیکل پاساژ داده شدند و در ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. پس از چهار روز کلنی‌های حاوی مخمر به میزان کافی رشد نمودند و سطح محیط را پر کردند. در این حالت از مخمرها بر روی محیط کورن میل آگار + توئین ۸۰ (Commeal agar + Tween 80) پاساژ داده شد تا مرفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن مجدداً مورد نظر قرارگیرد. پس از اطمینان از مرفولوژی طبیعی آن، مخمرها را بر روی پلیت‌های محتوی محیط مالت اکستراکت آگار (Malt extract agar) در ۳۰ درجه سانتیگراد کشت داده و به مدت ۷ روز نگهداری شدند. سپس در شرایط استریل کلنی حاوی مخمر را با اسکالپل از سطح محیط کشت برداشت نموده و در شیشه‌های حاوی آب مقطر استریل حل نموده تا سوسپانسیون یکنواختی حاصل گردد. در مرحله بعد یک قطره از سوسپانسیون را در زیر لام هماسیتومتر قرار داده و مخمرها شمارش گردیدند. با تغییر غلظت مخمرها، میزان آن را به 1×10^4 cell/ml رسانده و از آن در تزریق به سگ‌ها استفاده شد.



در هیچ‌یک از موارد علائم تب و بی‌اشتهایی مشاهده نشد. جهت پرهیز از هرگونه دستکاری در گوش به مدت یک هفته هیچ معاینه‌ای به وسیله اتوسکوپ صورت نگرفت و تنها به ثبت علائم رفتاری در سگهای مورد آزمایش اکتفا شد. در هفته دوم، بررسی توسط اتوسکوپ نشان‌دهنده حضور ترشحات سیاه رنگ یا قهوه‌ای تیره در داخل مجرای گوش در هر دو گروه سگهای آلوده به اسپرجیلوس و کاندیدا بود که میزان آنها متفاوت بود، در مواردی فضای داخل گوش از این ترشحات انباشته و در تعدادی به میزان کمتری دیده می‌شد. قوام ترشحات در بیشتر موارد سفت و چسبنده بود. دیواره مجرا نیز در طی این بررسی قرمز رنگ و تغییرات التهابی را نشان می‌داد. در معاینه قسمت انتهایی تر، پرده صماخ سالم و هیچ‌گونه علائمی حاکی از نکروز در آن دیده نمی‌شد. در تمام موارد بررسی با سوآب‌های اخذ شده از گوش نشان‌دهنده حضور قارچهای زنده و فعال در داخل مجرای گوش و در عین حال عدم وجود آلودگی باکتریایی بود.

از نظر علائم بالینی سگهای مورد آزمایش کماکان همانند هفته اول، گوش مبتلایان را خم کرده و گه‌گاه به آن پنجه زده و سر خود را تکان می‌دادند. با این حال تمام آنها از اشتهای مناسبی برخوردار بوده و در شرایط عمومی خوبی به سر می‌بردند.

نتایج حاصل از تابلوی خونی مورد بررسی قبل و بعد از تلقیح عوامل قارچی در جداول و نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. مقایسه آماری مقادیر حاکی از بدست آمده با روش فاکتورها Pare T Test عدم وجود اختلاف آماری مابین این قبل و بعد از تلقیح است.

پس از گذشت ۸ روز، تمام سگهای مورد آزمایش به وسیله تزریق داخل وریدی فنوباریتال سدیم با دوز استاندارد پیشنهاد شده معدوم و پس از کالبدگشایی تمام اعضا مورد بررسی ماکروسکوپی قرار گرفت و نمونه‌هایی از آنها جهت آزمایشات پاتولوژی و قارچ‌شناسی تهیه گردید. نمونه‌های پاتولوژی در داخل فرمالین ۱۰ درصد و نمونه‌های قارچ‌شناسی نیز هرچه سریعتر و در داخل پلیت‌های استریل جمع‌آوری و به آزمایشگاه ارسال شد. جهت کشت از اندامهای مختلف (کلیه، طحال، ریه، کبد، عضلات، مغز، پوست، چشم و غدد لنفاوی) سگهایی که کالبدگشایی شدند، ابتدا مقداری از هر اندام را در دستگاه ورتکس ریخته و با آب مقطر مخلوط نموده و میزان یک گرم از این سوسپانسیون برای کشت مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور مطالعات پاتولوژی پس از ثابت شدن نمونه‌ها و برش آنها، اندامهای مورد نظر مراحل مختلف تهیه لام را سپری نمودن و تحت دو روش مورد بررسی هماتوکسیلین اتوزین و G.M.S قرار گرفتند.

نتایج

در طی این بررسی دو تا سه روز پس از تلقیح عوامل قارچی، برخی از سگها، گوش مبتلایان را پایین گرفته و گاهی حتی سر خود را نیز به سمت ناحیه تلقیح خم می‌نمودند. همچنین در مواردی در نتیجه تحریک و تورم به گوش خود پنجه زدن و یا آن را تکان می‌دادند به نحوی که حتی در تعدادی از سگها خراشهایی در ناحیه پوست اطراف دیده می‌شد.

ملاسه ناحیه مبتلا با عکس‌العمل درد در تمام موارد همراه بود ولی

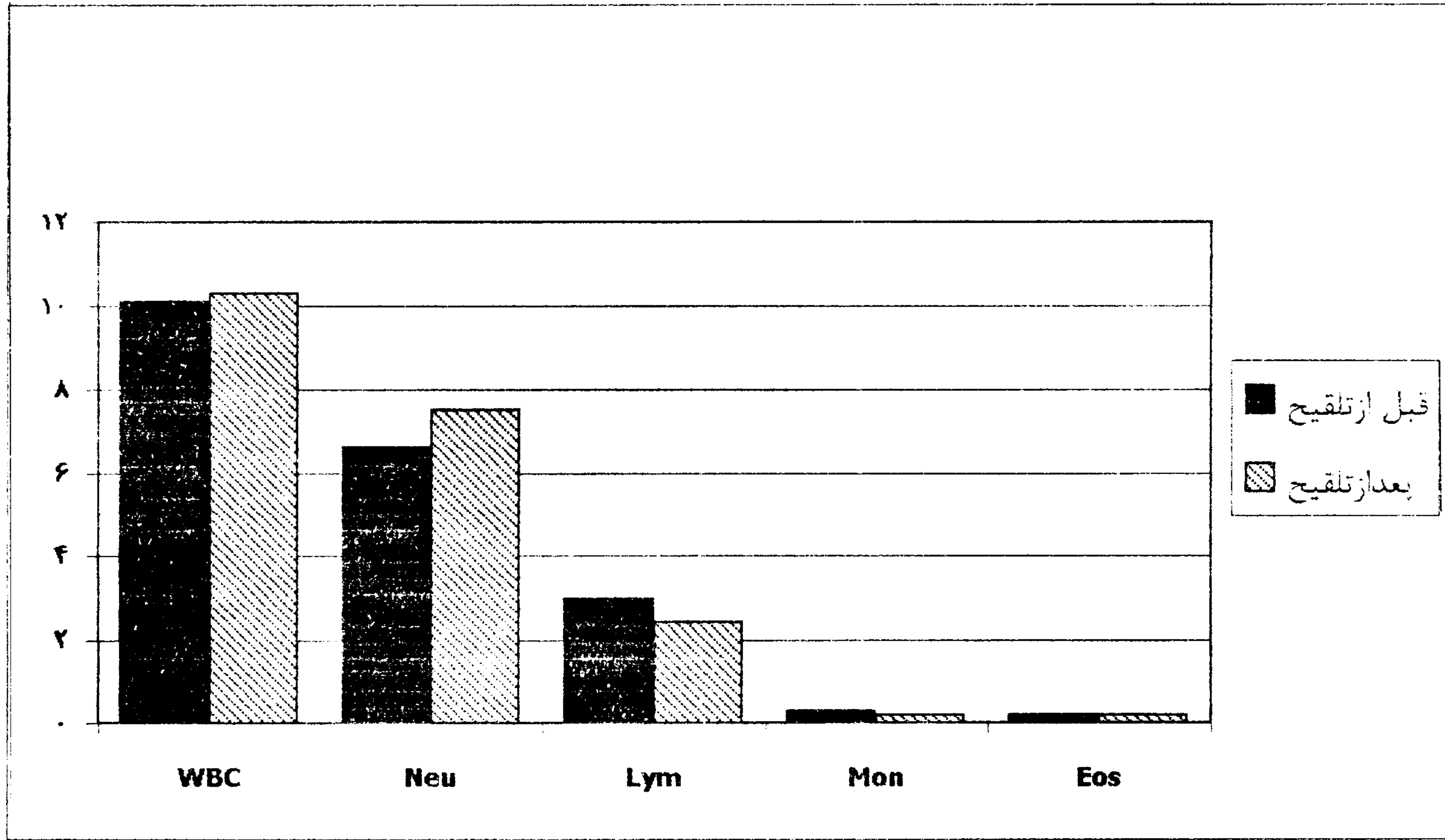
جدول ۱- تابلوی خونی حیوانات مورد بررسی قبل و بعد از تلقیح کاندیدا آلبیکنس

فاکتورهای خونی														شماره حیوان
اوتوزینوفیل (%)		منوسیت (%)		لنفوسیت (%)		نوتروفیل (%)		Hb (gr/dl)		PCV (%)		WBC/ μ l		
قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	
۱	۱	۱	۱	۱۸	۳۵	۸۰	۶۳	۱۷/۵	۱۷	۵۲	۵۱	۹۴۵۰	۱۰۲۰۰	۳
۲	۱	۲	۲	۲۲	۲۲	۷۴	۷۵	۱۵/۵	۱۶/۵	۴۶	۵۱	۸۰۰۰	۹۵۰۰	۴
۱	۲	۱	۴	۲۲	۲۶	۶۶	۶۸	۱۷	۱۷/۵	۵۱	۵۳	۱۲۴۰۰	۱۱۰۰۰	۶
۱	۲	۲	۵	۲۱	۲۳	۷۷	۵۰	۱۶/۵	۱۸	۴۹	۵۴	۱۱۲۵۰	۹۰۰۰	۹
۳	۲	۲	۳	۳۴	۲۵	۶۱	۷۰	۱۶	۱۶/۵	۴۸	۵۰	۱۱۰۵۰	۱۰۵۰۰	۱۰

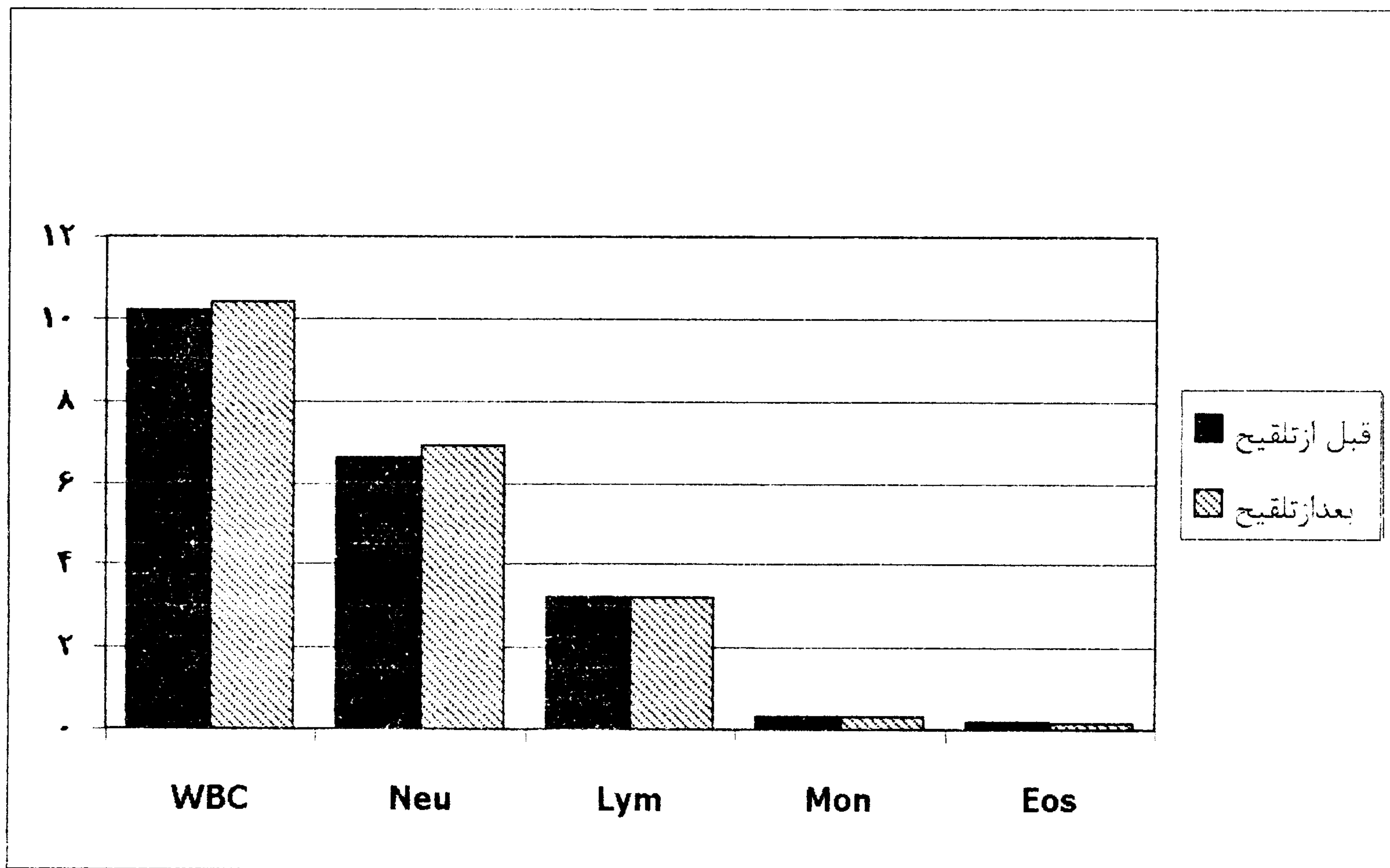
جدول ۲- تابلوی خونی حیوانات مورد بررسی قبل و بعد از تلقیح اسپرجیلوس نایجر

فاکتورهای خونی														شماره حیوان
اوتوزینوفیل (%)		منوسیت (%)		لنفوسیت (%)		نوتروفیل (%)		Hb (gr/dl)		PCV (%)		WBC/ μ l		
قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	
۲	۱	۱	۲	۳۰	۳۵	۶۷	۶۲	۱۸	۱۷/۵	۵۴	۵۳	۸۸۵۰	۱۰۰۰۰	۱
۱	۱	۳	۱	۳۱	۴۱	۶۵	۵۷	۱۵	۱۹	۴۵	۵۷	۱۳۰۰۰	۱۳۵۰۰	۲
۲	۱	۱	۱	۲۲	۲۳	۷۵	۷۴	۱۶/۵	۱۶/۵	۴۹	۵۱	۱۱۷۰۰	۹۵۰۰	۵
۲	۲	۱	۴	۳۳	۲۶	۶۴	۶۸	۱۷/۵	۱۷/۵	۵۹	۵۵	۸۲۵۰	۹۰۰۰	۷
۲	۲	۵	۴	۴۲	۲۲	۵۰	۷۲	۱۶/۵	۲۰	۵۰	۶۰	۸۹۰۰	۱۰۳۰۰	۸





نمودار ۱ - میانگین تابلوی خونی حیوانات مورد بررسی قبل و بعد از تلقیح کانیدیدا البیکنس (× ۱۰۰۰)



نمودار ۲ - میانگین تابلوی خونی سگهای مورد آزمایش قبل و بعد از تلقیح اسپرچیلوس نایجر (× ۱۰۰۰)

کماکان شفافیت صدفی شکل و رنگ خود را حفظ نموده و فاقد هرگونه جراحی بود. در سگهای مورد آزمایش شماره ۲ و ۸ که مورد تلقیح اسپرچیلوس نایجر قرار گرفته بودند، پرگنه‌های سفید بر روی ترشحات سیاه رنگ داخل مجرا دیده می‌شد (جدول ۳).

در هفته سوم و چهارم نیز بررسی مجرای شنوایی سگهای مورد آزمایش متعلق به دو گروه نشان دهنده حضور ترشحات تیره و چسبنده همراه با التهاب مجرا بود. هیچ‌گونه اثری از عفونتهای ثانوی باکتریایی یا تنگی و استنوز مجرای گوش در نتیجه هیپرپلازی قابل توجه در اپیدرم و درم دیده نشد. پرده صماخ نیز

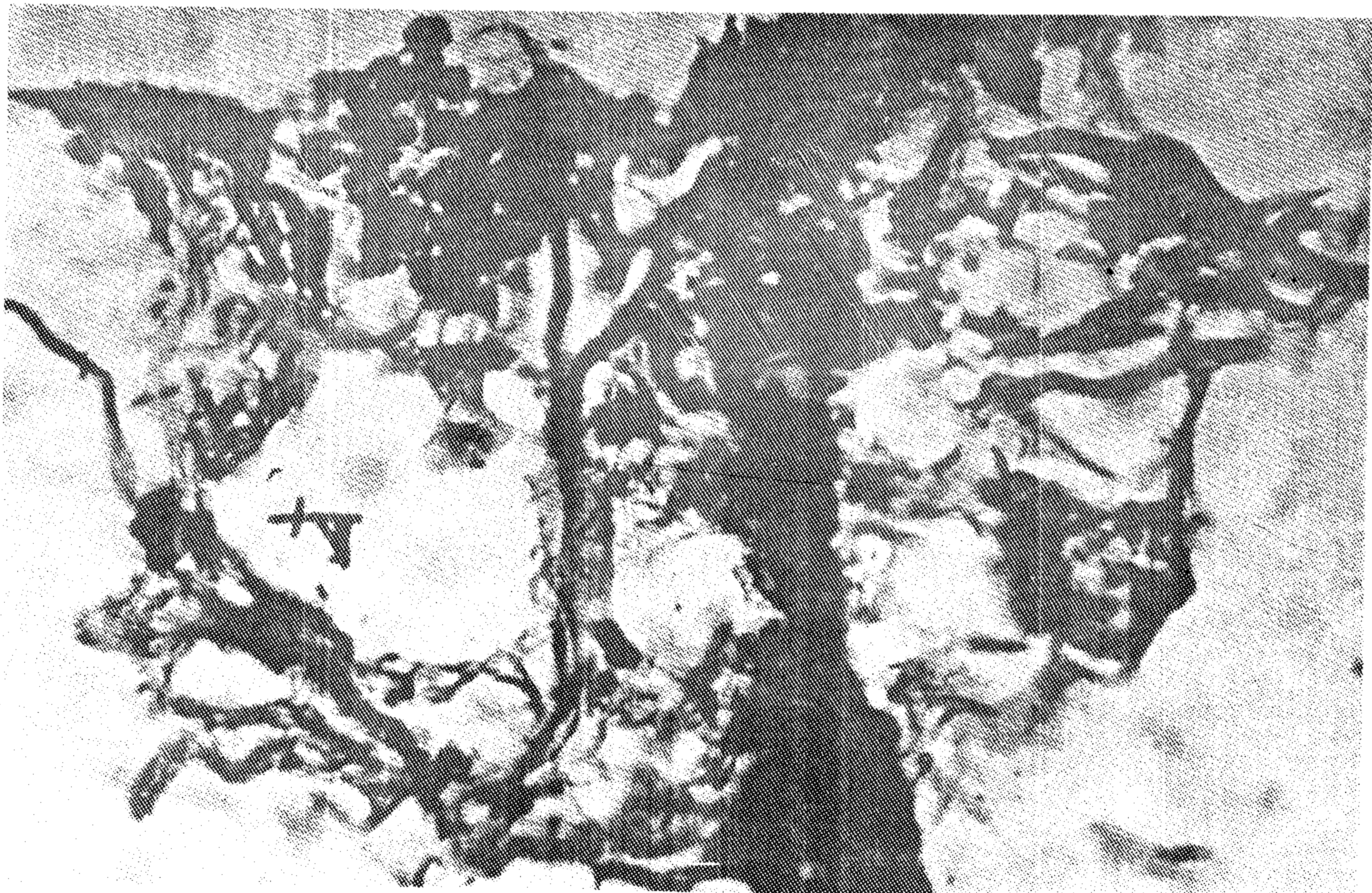


جدول ۳- علایم بالینی ثبت شده در سگهای مورد آزمایش در طی هفته‌های مختلف

هفته اول	باین افتادگی لاله گوش مبتلا و خم نمودن سر به طرف این ناحیه - مالیدن و پنجه زدن گوش مبتلا- تکان دادن سر در نتیجه درد یا تورم ناحیه - تمام حیوانات از نظر وضعیت عمومی در شرایط مناسب به سر برده و از اشتهاى خوبى برخوردار مى‌باشند. عکس‌العمل درد در ملامسه گوش مبتلا دیده می‌شود. وجود خراش در پوست نواحی اطراف گوش‌ها.
هفته دوم	حضور ترشحات سیاه رنگ یا قهوه‌ای تیره و چسبنده (شبه قیر) و التهاب دیواره مجرا - حضور قارچهای زنده و فعال در گسترش بعمل آمده از سواب‌های مجرای گوش - تداوم علایمی بالینی
هفته سوم و چهارم	ترشحات تیره و چسبنده و التهاب مجرا کماکان دیده می‌شود - حضور پرگنه‌های سفید بر روی ترشحات تیره مجرای دو مورد از سگهای آلوده به آسپرگیلوس - عدم وجود هیپرپلازی، استئوز و تنگی مجرا - برده صماخ سالم و تمامیت خود را حفظ کرده است - بیوپسی اخذ شده از یک مورد از حیوانات دو گروه نشان دهنده تهاجم کاندیدا به دیواره مجرا و تشکیل میسلیم کاذب می‌باشد - وضعیت عمومی تمام حیوانات مناسب و تابلوی خونی اخذ شده از آنها فاقد هرگونه عارضه غیر طبیعی بود.

نتایج حاصل از بیوپسی نشان دهنده تهاجم ارگانیسیم‌های کاندیدایی میسلیم کاذب در دیواره مجرای گوش بود. ارگانیسیم‌های کاندیدایی در این حالت به شکل دسته‌هایی به دور هم قابل مشاهده بوده که در کنار آنها رشته‌های میله‌ای شکل حاصل از میسلیم کاذب دیده می‌شد. لازم به ذکر است که در سگهای آلوده به آسپرگیلوس با وجود حضور قارچهای زنده و فعال در گسترش اخذ شده به وسیله بیوپسی‌های مجرای گوش

هیچ‌گونه ارگانیسیمی در نمونه بیوپسی مشاهده نگردید. در این دوره تمام سگها از نظر شرایط عمومی در وضعیت مناسبی به سر برده و تابلوی خونی اخذ شده از آنها هیچ‌گونه علایم غیر طبیعی را نشان نمی‌داد. نتایج بدست آمده از بررسی تابلوی خونی سه قلاده سگی که از هر گروه به آنها سیکلوفسفامید و دکزامتازون تزریق شده بود (سرکوب سیستم ایمنی) در جدول ۴ ارائه گردیده است.



تصویر ۱- بیوپسی اخذ شده از مجرای گوش سگ آلوده به کاندیدا پس از گذشت یک ماه از تلقیح ارگانیسیم‌های کاندیدایی و رشته میسلیم کاذب حاصل از آن را نشان می‌دهد.



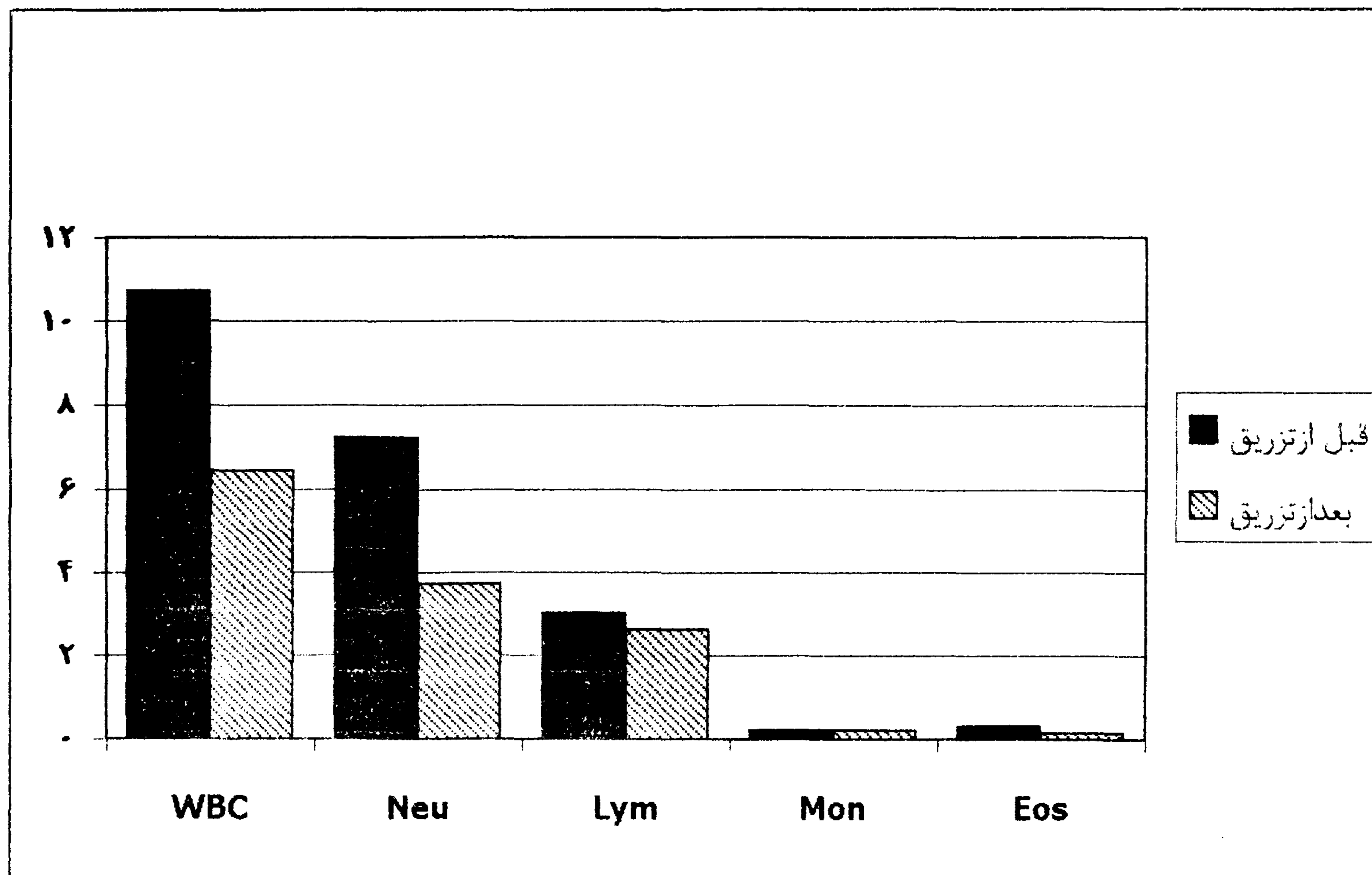
جدول ۴- تابلوی خونی سگهای مورد بررسی قبل و بعد از تزریق سیکلوفسفامید و دگزامتازون

فاکتورهای خونی														شماره حیوان
اوتوزینوفیل (%)		مونوسیت (%)		لنفوسیت (%)		نوتروفیل (%)		Hb (gr/dl)		PCV (%)		WBC/ μ l		
قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	قبل از تلقیح	بعد از تلقیح	
*	۲	*	۱	*	۳۰	*	۶۷	*	۱۸	*	۵۴	*	۸۸۵۰	۱
*	۱	*	۳	*	۳۱	*	۶۵	*	۱۵	*	۴۵	*	۱۲۰۰۰	۲
*	۱	*	۱	*	۱۸	*	۸۰	*	۱۷/۵	*	۵۲	*	۹۴۵۰	۳
*	۲	*	۲	*	۲۲	*	۷۴	*	۱۵/۵	*	۴۶	*	۸۰۰۰	۴
۱	۲	۲	۱	۴۳	۲۲	۵۴	۷۵	۱۷	۱۶/۵	۵۱	۴۹	۵۵۰۰	۱۱۷۰۰	۵
۱	۱	۳	۱	۲۵	۲۲	۷۷	۶۶	۱۹/۵	۱۷	۵۸	۵۱	۶۰۰۰	۱۲۴۰۰	۶
۱	۲	۲	۱	۴۱	۲۳	۵۶	۶۴	۲۰	۱۹/۵	۶۰	۵۹	۷۱۵۰	۸۲۵۰	۷
۱	۲	۲	۵	۵۵	۴۲	۴۲	۵۰	۱۷/۵	۱۶/۵	۵۲	۵۰	۷۲۵۰	۸۹۰۰	۸
۱	۱	۲	۲	۲۰	۲۱	۷۷	۷۷	۱۷/۵	۱۶/۵	۵۳	۴۹	۶۰۰۰	۱۱۳۵۰	۹
۱	۳	۳	۲	۵۶	۳۴	۴۰	۶۱	۱۷	۱۶	۵۱	۴۸	۶۵۰۰	۱۱۰۵۰	۱۰

* سگهای شاهد در مطالعه مقایسه‌ای تزریق سیکلوفسفامید و دگزامتازون

قبل از تزریق دارو ۷۱۸۷ با خطای انحراف معیار $\pm ۸۷۵/۲۶۳$ و بعد از تزریق معادل ۳۶۴۳ با خطای انحراف معیار $\pm ۳۶۲/۲۹۶$ می‌باشد. لازم به ذکر است مقادیر PCV، Hb هر چند دچار افزایش شده و در مقابل از میزان لنفوسیت، مونوسیت و اوتوزینوفیل کاسته شده، ولی فاقد اختلاف آماری معنی دار بود (نمودار ۳).

استفاده از آزمون آماری Pare - T - test نشان دهنده اختلاف معنی دار در مقدار لکوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها بود به شکلی که میانگین تعداد لکوسیت‌ها قبل از تزریق دارو ۱۰۶۲۵ عدد در میلی لیتر، با خطای انحراف معیار $\pm ۶۶۲/۴۱۴$ و میانگین بعد از تزریق معادل ۶۴۰۰ با خطای انحراف معیار $\pm ۲۸۴/۳۱۳$ بود و در مورد نوتروفیل‌ها میانگین



نمودار ۳- فرمول خونی قبل و بعد از تضعیف ایمنی با سیکلوفسفامید و دگزامتازون (x ۱۰۰۰)



تأیید شد. مجرای دارای ترشحات تیره و چسبنده بود و اثری از هیپرپلازی و تنگی مجرا مشاهده نشد. چهار قلابه سگهایی که دچار تضعیف سیستم ایمنی شده بودند علائم سیستمیت را در مثانه خود نشان می‌دادند که از عوارض تزریق سیکلوفسفامید به شمار می‌آید. همچنین در سگهایی که سیستم ایمنی آنها تضعیف شده بود، معاینه غدد لنفاوی داخلی و خارجی حاکی از تحلیل رفتن آنها بود که خود اثر حاصل از تزریق ترکیبات تضعیف سیستم ایمنی را تأیید می‌کرد. مقایسه دو گروه سگهای آلوده به کاندیدا و آلوده به اسپرجیلوس و همچنین سگهای تحت تزریق سیکلوفسفامید و بدون تزریق در هر گروه نشان داد که کاهش تعداد سلولهای سیستم ایمنی فقط بعد از تزریق این دارو به وجود آمد در حالی که انتشار عفونت تنها در گروهی با سیستم ایمنی تضعیف شده رخ داد که آلوده به کاندیدا آلبیکنس بودند (جدول ۵).

نتایج حاصل از کشت قارچی در جدول ۶ نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود تنها کشت بافتهای مربوط به کبد، طحال، کلیه، ریه، عضلات، مغز و سایر اعضا در سگهای شماره ۶، ۹، ۱۰ که تحت تلقیح کاندیدا قرار گرفته و سیستم ایمنی آنها نیز تضعیف شده بود مثبت می‌باشد. به عبارت دیگر در سگهای آلوده به کاندیدا که تحت تجویز داروهای تضعیف سیستم ایمنی قرار نگرفته بودند و همچنین کلیه حیواناتی که مورد تلقیح اسپرجیلوس نایجر قرار گرفته بودند نتایج کشت منفی بود و ارگانسیم در آنها انتشار نیافته بود. در این نتایج بیشترین میزان آلودگی در کلیه و پس از آن در ریه مشاهده می‌شود. در هیچ موردی کاندیدا از مغز جدا نگردید.

تمام سگهایی که به آنها سیکلوفسفامید و دگزامتازون تزریق شده بود دچار استفراغ شدند که از عوارض جانبی سیکلوفسفامید به شمار می‌آید و در نتیجه تحریک مراکز استفراغ صورت می‌گیرد. بدین منظور الکترولیت خوراکی به میزان کافی در اختیار این حیوانات قرار داده شد تا از عوارض دهیدراتاسیون و بروز مسمومیت دارویی جلوگیری شود. پس از ۲۴ ساعت سگهای شماره ۹ و ۶ دچار افزایش خفیف حرارت شده (۳۹/۲-۳۷/۷ درجه سانتیگراد) که با وضعیت خمودی و کم شدن میزان فعالیت فیزیکی در آنها و کاهش اشتها همراه بود. چهل و هشت ساعت بعد از تزریق سگ شماره ۱۰ نیز همین علائم را نشان داد. لازم به یادآوری است که همه سگهایی که تحت تلقیح کاندیدا قرار گرفته بودند چنین علائمی را نشان می‌دادند و در هیچ یک از سه قلابه سگ تحت تلقیح با اسپرجیلوس این علائم دیده نشد و کماکان به فعالیت طبیعی خود ادامه می‌دادند. در هر چهار سگی که سیستم ایمنی آنها وضع طبیعی خود را حفظ کرده بود تغییر علائم بالینی نه در سگهای آلوده به کاندیدا و نه در سگهای آلوده به اسپرجیلوس دیده نشد.

پس از ۷۲ ساعت و در مجموع ۴ روز پس از تزریق سیکلوفسفامید و دگزامتازون، سگهای مورد آزمایش بتدریج علائم بهبودی خود را نشان دادند که حاکی از کاهش اثرات سیکلوفسفامید و شروع مقاومت بیماران بود. لذا پس از سپری شدن یک هفته از تضعیف سیستم ایمنی، جهت بررسی نتایج حاصل تمام سگها با روش بدون درد معدوم و مورد کالبدگشایی قرار گرفتند. در کالبدگشایی پس از باز کردن کامل مجرای شنوایی معاینه تمام قسمت‌های آن انجام گرفت. در این حالت علائم موجود در معاینه اتوسکوپی

جدول ۵- وضعیت تابلوی خونی قبل از کالبدگشایی و میزان انتشار آلودگی قارچی در بدن

نوع آلودگی	تزریق سیکلوفسفامید	تعداد	m WBC	mPCV	mHb	mNeu	mlym	mMon	mEos	موارد انتشار عفونت
کاندیدا	+	۳	۶۱۶۷	۵۴	۱۸	۶۵	۳۴	۳	۱	۳
آلبیکنس	-	۲	۱۱۶۰۰	۴۹	۱۶/۵	۷۷	۲۰	۲	۱	-
اسپرجیلوس	+	۳	۶۶۳۳	۵۴/۳	۱۸/۲	۵۱	۴۵	۲	۲	-
نایجر	-	۲	۸۰۵۰	۴۹/۵	۱۶/۵	۶۷	۲۰	۳	۱	-

جدول ۶- تعداد ارگانسیم‌های جدا شده از کشت اعضای مختلف

شماره حیوان	اعضای مختلف	طحال	کلیه	ریه	کبد	عضله	مغز	سایر اعضا
۱	-	-	-	-	-	-	-	-
۲	-	-	-	-	-	-	-	-
۳	-	-	-	-	-	-	-	-
۴	-	-	-	-	-	-	-	-
۵	-	-	-	-	-	-	-	-
۶	۶۱	۱۷۲	۹۵	۷۳	۵	-	کمتر از ۵	
۷	-	-	-	-	-	-	-	
۸	-	-	-	-	-	-	-	
۹	۳۹	۷۹	۵۱	۴۵	۵	-	کمتر از ۵	
۱۰	۳۲	۷۵	۳۸	۲۱	۵	-	کمتر از ۵	



قارچی را به خود اختصاص می‌دهد. اکثر مطالعات حاکی از آن است که کاندیدا البیکنس ۶۰ درصد گونه‌های کاندیدایی جدا شده از مناطق عفونت را شامل می‌گردد (۳).

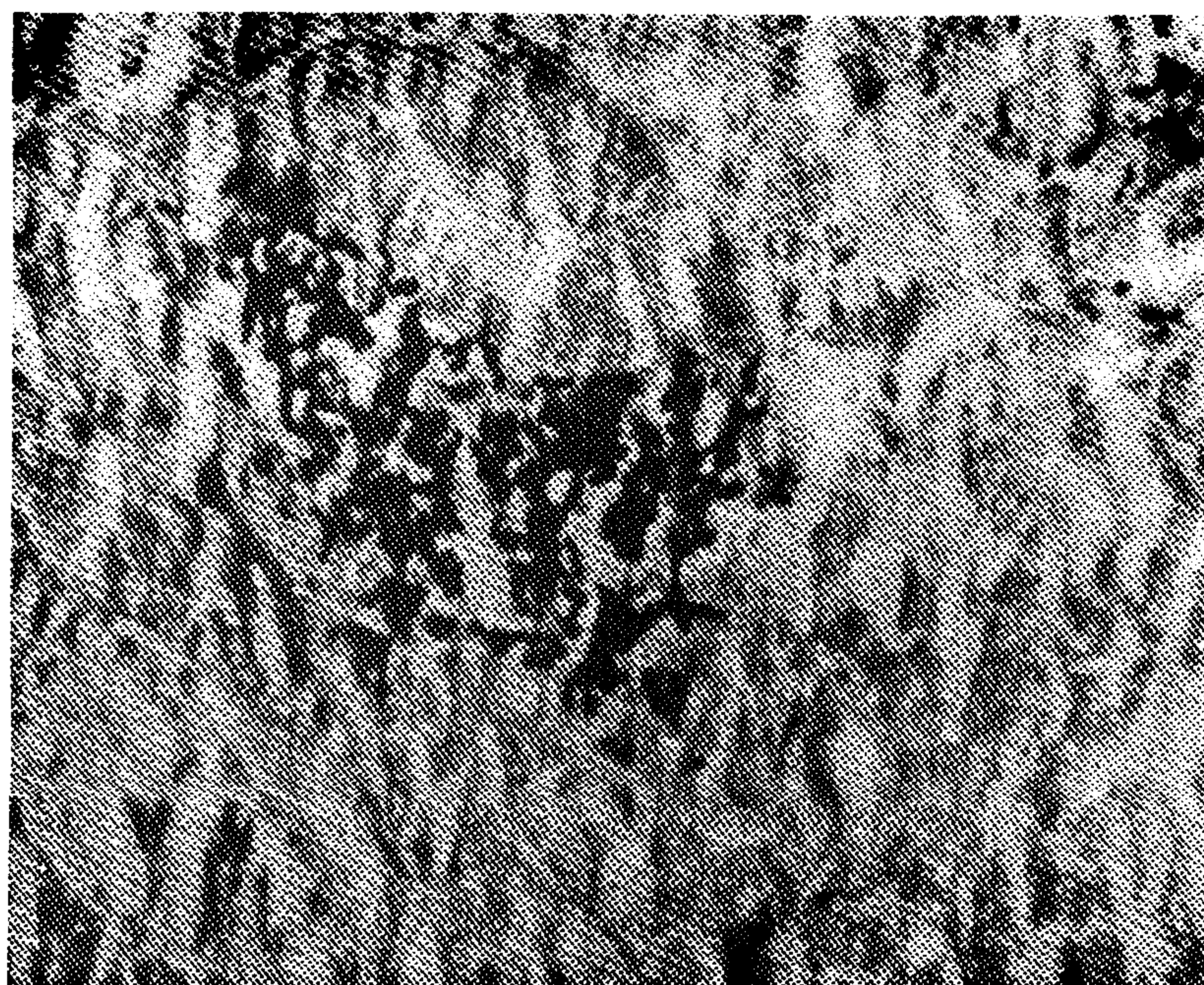
در انسان، کارگرانی که تماس با آب دارند و خانمهای خانه‌دار در معرض تهاجم کاندیدا البیکنس در ناخنها و بافت‌های اطرافشان می‌باشند. خانمها در دوران بارداری و یا در هنگام مصرف داروهای پیشگیری از حاملگی در معرض ابتلا به کاندیدوز واژن هستند و کشت واژن یکی از آزمایشهای شایع قارچ‌شناسی در آزمایشگاهها می‌باشد. همچنین در بیماران مبتلا به ویروس عامل بیماری AIDS از عوامل مهم عفونت ثانویه کاندیدا البیکنس می‌باشد، اصولاً کاندیدا البیکنس در دسته عوامل فرصت‌طلب قرار گرفته و در صورت فراهم شدن حداقل شرایط لازم به منظور عفونت موجب ابتلا می‌زبان خواهد شد (۱۹ و ۱۱). Wilson در سال ۱۹۶۲ بیان داشته کاندیدا البیکنس کلینیسین ماهری بوده و قادر است موارد غیر طبیعی را سریعتر از کلینیسین‌هایی که این کار را توسط آزمایشات شیمیایی انجام می‌دهند کشف نماید (۱۱).

بر اساس تحقیقات انجام گرفته متداولترین عوامل اتومایکوزیس را اسپرجیلوس نایجر و کاندیدا البیکنس تشکیل داده‌اند (۳). بررسی Pavlenko در ناحیه کوزباس روسیه نیز حاکی از افزایش وقوع اسپرجیلوس نایجر (۷۵/۲ درصد) و کاندیدا البیکنس (۶/۷ درصد) در وقوع اتومایکوزیس می‌باشد (۱۴). در شمال عراق نیز طی بررسی ۲۱۹ مورد انسانی اوتیت خارجی در طی ۱۵ ماه ۱۷۹ مورد حاصل از عفونت قارچی بوده است در این بررسی نیز گونه‌های اسپرجیلوس بیشترین قارچ جدا شده بوده است (۹۲/۱ درصد) (۲۰). در نیجریه Gugnani از ۳۱ مورد قطعی اتومایکوزیس ۱۳ مورد را اسپرجیلوس نایجر و ۶ مورد را اسپرجیلوس فلاووس و ۶ مورد را کاندیدا البیکنس و ۴ مورد را کاندیدا پاراپزیلوزیس گزارش کرده است (۹). گزارش Martin از اسپانیا در بین سالهای ۱۹۸۴ تا ۱۹۸۸ حاکی از آن است که اسپرجیلوس نایجر اکثریت موارد اتومایکوزیس ۷۳/۳ درصد را شامل شده است (۱۰). گزارشات دیگری از این موارد در انسان موجود است (۱، ۲، ۴، ۵، ۷، ۱۲، ۱۳ و ۱۵).

در سگ با وجود مطالعات اپیدمیولوژیک اندک در مورد اوتیت‌های قارچی، نقش این عوامل در بروز اوتیت کاملاً به اثبات رسیده است (۱۶ و ۲۱). در مطالعه انجام شد در فرانسه بر روی ۱۵۳ نمونه از گوش سگهای مبتلا به اوتیت ۹۷ مورد (۶۳ درصد) در نتیجه مخمرها و ۷۲ مورد (۴۷ درصد) در نتیجه قارچها بوده است که ۲۵ درصد آن را اسپرجیلوس و ۶/۵ درصد آن را کاندیدا تشکیل داده است. در این مقاله نگارنده اشاره می‌نماید که از میان قارچها بخصوص اسپرجیلوس قبل از این بررسی به عنوان بیماریزا و مسئول ایجاد اوتیت در نظر گرفته نمی‌شدند. در میان مخمرها نیز کاندیدا البیکنس با آنکه درصد کمی را به خود اختصاص داده، موجب اوتیت شدید بخصوص پس از درمان آنتی‌بیوتیکی یا کورتیکواستروئیدی می‌شود (۱). با توجه به گزارشات ذکر شده و اهمیت موضوع، مطالعه حاضر انجام گرفت. بررسیهای مختلف حاکی از عدم تأثیر جنس در فراهم آوردن استعداد به بیماری است (۶ و ۱۷).

Oliveri از ایتالیا معتقد است که خارش از علایم اولیه اوتیت قارچی بوده که بلافاصله به درد تبدیل می‌شود (۱۲)، توام شدن عفونتهای باکتریایی همراه با اتومایکوزیس علایم مذکور را تشدید می‌نماید. Gomez از فرانسه نیز به حضور ترشحات سیاه رنگ و چسبنده در عفونتهای کاندیدایی اشاره می‌کند (۸). در مطالعه ما در تمام موارد درد متوسط تا شدید مشاهده شد و ترشحات گوش نیز در همه سگها به صورت تیره و خمیری دیده می‌شد. در معاینه اتوسکوپي مجرای گوش در تمام سگها ملتهب بوده و ترشحات تیره و خمیری چسبنده و پرخونی دیده می‌شد. بنابراین نه تنها علایم بالینی بلکه معاینه اتوسکوپي نیز

در مطالعه میکروسکوپي کاهش سلولهای لنفاوی در اعضایی همچون طحال، غدد لنفاوی مختلف و لوزه‌ها در گروه تحت سرکوب ایمنی دیده شد. همچنین واکنشهای دژنراتیو در اعضای مختلف حیوانات آلوده به کاندیدا که دچار ضعف سیستم ایمنی بودند در مقاطع هیستوپاتولوژیک به چشم می‌خورد ولی به منظور تشخیص قطعی در نمونه کلیه‌ای که بیشترین آلودگی کاندیدایی را در کشت قارچی نشان داد اقدام به تهیه گسترشهای سریال و رنگ‌آمیزی آنها به روش GMS شد که در این حالت مخمرهای در حال جوانه زدن به شکل مجتمع همراه با هایف‌هایی بدون دیواره عرضی در بافت کلیه مشاهده شد (تصویر ۲).



تصویر ۲ - تهاجم ارگان‌های کاندیدایی به بافت کلیه

بحث

مروری بر مقالات بطور کامل نشانگر این حقیقت است که ابتلای گوش در میان سگهای تمام کشورهای دنیا بسیار گسترده می‌باشد و معمولاً بیماریهای گوش در سگ و در سایر حیوانات هنگامی مورد تشخیص قرار می‌گیرد که عارضه بسیار پیشرفته باشد (۱۷ و ۶).

در ادینبورو از هر هشت سگی که به بیمارستان دامهای کوچک مراجعه می‌کنند، یک مورد از نظر بالینی به اوتیت مبتلا بوده و هیچ دلیلی حاکی از وقوع کمتر بیماری بطور معنی‌دار در سایر نقاط دنیا در دسترس نمی‌باشد (۱۸). حاصل تحقیقات تعدادی از محققین حاکی از آن است که ۶ تا ۹ درصد اوتیت‌های خارجی در نتیجه عوامل قارچی بوجود می‌آیند (۱۸). استفاده طولانی مدت از ترکیبات دارویی مختلف همچون آنتی‌بیوتیکهای وسیع‌الطیف و کورتیکواستروئیدهای موضعی افزایش رشد قارچها را به دنبال خواهد داشت (۱۷).

کاندیداها ذاتاً بیماریزا نیستند بلکه ناتوانی و تغییراتی در سیستم دفاعی بدن و پاره‌ای از عوامل دیگر زمینه را برای تهاجم مخمرها به بافت میزبان فراهم می‌سازند. نکته قابل توجه در مورد این قارچها گذشته از قدرت بیماریزایی تعداد محدودی از آنها که باعث آزارهای سطحی، پوستی و یا مخاطی در انسان و حیوان می‌شوند توزیع فراوان آنها در محیط درونی بدن و یا در محیط خارج از بدن انسان است که باعث جدا شدن مکرر آنها از محیطهای کشت افتراقی در هنگام کشت نمونه‌های کلینیکی می‌شود (۱۱).

کاندیدا البیکنس از مخمرهای بیماریزا می‌باشد که درصد بالایی از عفونت



آلوده به کاندیدا از نظر علایم بالینی از مبتلایان به اسپرجیلوس نایجر قابل تفریق بودند. این حیوانات علایم تب، دپرسیون، ضعف و بی‌اشتهایی را نشان می‌دادند. این علایم حکایت از سپتی سمی داشته با این حال مختص به سپتی سمی کاندیدایی نبوده و جهت تشخیص قطعی نیاز به کشت و بررسی پاتولوژیک بود.

نتایج حاصل از کشت قارچی نشان داد که کاندیدا البیکنس در شرایط تضعیف سیستم ایمنی قادر به انتشار و تهاجم به اعضای مختلف می‌باشد. پیش از این منشاء سپتی سمی کاندیدایی از دستگاه تنفس و ادراری و بخصوص دستگاه گوارش به دنبال کاهش دفاع سلولی و یا حذف بی‌هوازی‌های روده‌ای تلقی می‌شد؛ ولی در این بررسی برای اولین بار نشان داده شد که انتشار ارگانسیم به دنبال تضعیف سیستم ایمنی حاصل از کورتیکوستروئیدها و سیکلوفسفامید از گوش نیز امکانپذیر است و این راه نیز می‌بایست در بررسی عفونت منتشر مدنظر قرار گیرد. نتایج حاصل از بررسی پاتولوژیک در این مطالعه نیز با نشان دادن رشته‌های میسلومی در بافت، تهاجم ارگانسیم‌های کاندیدایی در اعضای مختلف را قطعی می‌سازد.

در مجموع نتایج حاضر از این بررسی بر روی مدل تجربی سگ گویای آن می‌باشد که در عفونتهای قارچی مجرای شنوایی در نتیجه عوامل فرصت‌طلب همانند کاندیدا البیکنس گرچه اغلب مورد توجه قرار نگرفته و به عنوان رشد ساپروفیتی بدون ضرر تلقی می‌گردد، با این حال این عفونت قارچی ممکن است در صورت فراهم شدن شرایط مساعد همچون تضعیف سیستم ایمنی در سگ شکل منتشر به خود بگیرد. این که چطور ارگانسیم از عروق این ناحیه منتشر شده و اعضای پارانشیماتوز را مورد تهاجم قرار می‌دهد هنوز مشخص نمی‌باشد. در مورد عفونتهای قارچی حاصل از اسپرجیلوس نایجر این موارد مشاهده نگردید که ممکن است به دلایل مختلف از جمله اندازه کوچکتر مخمرهای کاندیدایی و انتشار سهل‌تر آنها از عروق و یا قدرت پاتوژنیسیته کمتر آنها باشد که در مقایسه با کاندیدا البیکنس تظاهرات بالینی و همانولوژیک کمتری نشان داده است. قطعاً این بررسی قدم اول در یک مسیر طولانی به شمار آمده و تجارب بسیار دیگری می‌بایست بر روی عوامل فرصت‌طلب دیگر و همچنین نحوه انتشار این عوامل از مجرای گوش خارجی صورت پذیرد.

کمکی به تفریق اوتیت کاندیدایی از اوتیت اسپرجیلوسی نمی‌کند. با وجود آنکه در دو مورد از نمونه‌های تلقیح شده با اسپرجیلوس نایجر پرگنه‌های سفید بر روی ترشحات سیاه رنگ داخل مجرای گوش دیده شد ولی این یافته، نیز به طور قطع در تفریق این دو گونه قارچ کمی نکرده زیرا موارد اسپرجیلوسی بدون پرگنه سفید نیز در بین نمونه‌ها وجود داشته است و همواره تشخیص تفریقی این دو گونه باید بر اساس تهیه گسترش و کشت استوار باشد. ارزیابی اثرات پاتولوژیک اسپرجیلوس نایجر و کاندیدا البیکنس در گوش نشان دهنده قدرت تهاجمی کاندیدا البیکنس با حضور سلولهای مخمری را داخل بافت و ایجاد رشته‌های میسلوم بود، در صورتی که در نمونه بیوپسی اسپرجیلوس نایجر اثری از هیچ‌گونه عارضه غیرطبیعی دیده نمی‌شد (تصویر ۱). لازم به ذکر است که قبل از اخذ بیوپسی به وسیله سوآب گسترشی از مجرای گوش هر دو حیوان تهیه و حضور کاندیدا البیکنس و اسپرجیلوس نایجر در مجرای گوش تأیید گشت. بدین ترتیب مشخص گردید که کاندیدا البیکنس نسبت به اسپرجیلوس نایجر از قدرت تهاجمی بیشتری برخوردار بوده و قادر است در صورت فراهم شدن شرایط مساعد بافتهای زیر اپیتلیوم را نیز مورد تاخت و تاز قرار داده و در این بافت‌ها به رشد خود ادامه دهد، در هیچ‌یک از مطالعات خارجی مقایسه‌ای بین کاندیدا البیکنس و اسپرجیلوس نایجر از نظر قدرت تهاجمی و امکان رشد در بافتهای زیر اپیتلیوم انجام نشده و در این مطالعه اولین گزارش از این نوع می‌باشد.

همان‌طور که اشاره شد امروزه عوامل قارچی فرصت‌طلب همچون کاندیدا و اسپرجیلوس در مبتلایان به نقص سیستم ایمنی، مصرف کنندگان داروهای مهارکننده سیستم ایمنی، کورتیکوستروئیدها، آنتی بیوتیک‌ها، نئوپلازی‌ها، برخورد با اشعه، پیوند اعضا و همچنین جراحیهای مختلف و به‌کارگیری کاتترهای داخل رگی و همودیالیز و غیره مشکل آفرین بوده و در این بیماران منجر به ایجاد فرم منتشر می‌شوند. لذا تصمیم گرفته شد در سگهای مورد آزمایش به طور مصنوعی با استفاده از دگزامتازون و سیکلوفسفامید اقدام به تضعیف سیستم ایمنی نموده و اثر اوتیت‌های قارچی ایجاد شده را در این شرایط مورد سنجش و ارزیابی قرار داد.

پس از گذشت ۴۸ ساعت از ایجاد تصنعی تضعیف سیستم ایمنی حیوانات

References

1. Bigler, B. and Merchant, S.R. Otitis externa, Adv. in Vet. Dermatol. Vol.1, Proceedings of the first world congress of veterinary dermatology, Dijon, France 27 - 30 September. (1989).
2. Deniau, M. Clinical and mycological aspects of otomycosis - in C.H.U., of Lome. bulletin - de -la - Societe Francaise - de Mycologie, 16(2), 341-344. (1987).
3. Emmuns et al. Medical mycology. Publisher Lea & Febiger, PP: 341 - 348, (1993).
4. Erkan, M., Treatment of otomycosis with acetic and boric acid. Revistalberoamericana de Micologia. 10(4), 33-35. (1993).
5. Erkan, M., Otmycosis in Kayseri (Turkey). Revistalbero americana de Micologia. 8(4), 92-84, (1991)
6. Fraser, G., Grepow, W.W., Mackenzie, C.P., Spreull, J.S.A., and Withers. A.R., Caine ear disease, J., Small Anim. Pract. Vol. 10, PP 725-754, (1970).
7. Carcia Martos, P.D., delgado, D., Marin, P., and Mira, J., Analysis of 40 cases of otomycosis. Enferm, Infec, Microbiol, Clin. Nov. 11(9), 487-9.
8. Cillies, H. C., A textbook of clinical pharmacology second edition. Publisher: Edward Arnold PP: 782-787, (1986).
9. qugnani, H.C., Okafor, B.C., Nzelibe, F. and Nijoku, O., Etiological agents of otomycosis in nigeria. Mycoses. May, 32(5), 244-249, (1986).
10. Martin, A.M., canut, S., Pescador, C., and Comez, J.L., Otomycosis presentation of 15 cases Enferm, Infec, Microbiol. Clin. May, 7(5), 248-251, (1989).
11. Odds Candida and Candidosis. A review and Bibliography, (1988).
12. Oliveri, S., Capello, G., Napolitano, M.G., Triolo, C., and Grillo, C., Otmycosis, Etiology and analysis of predisposing factors. Boll. 1st Sieroter, Milan, 63(6), 537-542, (1984).



- 13 . Paulose, K.O., Al Khalifa, S., Shenoy, P., and Sharman, R.K., Mycotic infection of the ear (Otomycosis): A., Prospective study. *J., Larynol, Otol. Jan*, 103(1), 60 -35, (1989).
- 14 . Pavlenko, S.A., Otomycosis in the Kuznetsk region and organization of medica sevices for this group of population. *vestn.Otorinolaryngol. Jul. Aug. (4)*, 70-4.
- 15 . Placio, A., et al (1993): Long term follow up of otomycosis and its treatment with bifonazole *J., of medical and Vet. Mycology*, 31(6), 433-477, (1993).
- 16 . Sinha, B.K., studies on experimental otomycosis in dogs. *Indian, Journal exprimental Biology*, 11(4), 339-370, (1973).
- 17 . Krahwinkel D.J. External ear canal in: *Textbook of small animal surgery*, PP: 1560-1567, (1993).
- 18 . Smith, M.G.B., *Opportunistic mycoses in human and other animals*. Publisher: C.B.A., company, (1989).
- 19 . *The Merck. Veterinary Mannual, Sixth edition*. Publisher: Merck copany. Inc, (1986).
- 20 . Yehia, M.M., Alhabib, H.M., and Shehab, N.M., Otomycosis, A., common problem in north Iraq, *J., Irayngol. Otol. May*: 104(5), 387-389, (1990).
- 21 . Zanabria, O., Identification of bacteria and fungi in supprative external otitis in dogs. *Revista, Ecuatorina de Higine, Medician, Tropical*, 38(38), 53-69, (1988).

Experimental study of Candida albicans and Aspergillus niger's pathogenesis in canine ear

**Khosravi A. R.¹, Rouholamine R.², Jamshidi Sh.²,
Sohrabi - Haghdoust I.³, Rad M.²**

¹*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine , Tehran University, Tehran - Iran.* ² *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine , Tehran University, Tehran - Iran.* ³ *Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine , Tehran University, Tehran - Iran.*

This study was done by using 10 clinically healthy adult dogs divided to two groups of five each. In the first group candida albicans and in the second group, Aspergillus niger were inocluded in their right ear

canals respectively. Clinical signs in both groups included pain of affected ear during palpation, head shaking, lowering the affected ear, turning head toward the affected ear, rubbing and scratching the affected area. But overall outlook were satisfactory and they had good appetite too. Otosopic examination of the external canal showed sticky black and dark brown secretions (Tar), inflammation and reddeness of ear canal wall. Neither otoscopic examination nor clinical signs could differentiate the changes occurred by these two organisms but the biopsy which was taken from one cases of each group showed only candida's invasion to external canal wall and formation of pseudomycellium, whereas in aspergillus group the fungus has remained and localized in canal itself. The smears prepared from each group showed the presence of actived alive fungus too. Immunosuppression was accomplished by using cyclophosphamide and dexamethasone in 3 dogs of each group. The animal's blood cell count comparison confirmed immunosuppression by significant decrease of leukocyte and neutrophil cells. Depression, decreasing physical activity, lack of appetite and increasing in temperature were noted in candida affected dogs but comparatively all the dogs of aspergillus affected one were in a good condition. One week after immunosuppression all dogs were euthanized for macroscopic studies and sample collection for fungal and histopathological examinations. The macroscopic examination confirmed the changes observed by otoscope in all dogs ear and changes resulting by injection of cyclophosphamide such as cystitis and atrophy of external and internal lymph nodes in immunosuppressed animals. The results obtained from fungal culture showed that the candida albicans invaded to other organs in all the three dogs that were inocluded by this organisms. In these animals kidney and lung had the highest contamination rate respectively. Smears obtained from serial tissue samples taken from kidney of these animals which were stained with G.M.S. method showed the changes of budding yeast with hyphae without septal wall in this tissue.

Key words: Candida albicans, Aspergillus niger, Otitis externa, Immunosuppression, Cyclophosphamide

