



KLİNİK ÇALIŞMA

İÇ ANADOLU BÖLGESİNDE CANDİDALARIN NEDEN OLDUĞU OTOMİKOZLAR VE ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARI

Dr. Zehra Bestepe DURSUN¹ , Dr. Hafize SAV² , Dr. İlhami ÇELİK¹ , Dr. İbrahim ÖZCAN³ 

¹Kayseri Şehir Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Kayseri, Türkiye ²Kayseri Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ve Mikoloji, Kayseri, Türkiye ³Kayseri Şehir Hastanesi, Kulak Burun Boğaz, Kayseri, Türkiye

ÖZET

Giriş: Otomikoz, sıklıkla dış yolunu tutan bir mantar enfeksiyonudur. En sık görülen patojenler Candida spp. ve Aspergillus spp. dir. Bu çalışmanın amacı, hastanemizdeki otomikoz etkeni olan Candida türleri ve bunların antifungal duyarlılık paternlerini belirlemektir.

Metod: Çalışma, Kulak Burun Boğaz ve Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğinde 2018-2019 yılları arasında otomikoz tanısıyla kandida üremesi olan hastaların dış kulak kanalı örneklerinin retrospektif bir analizi olarak tasarlandı. Kulaktan alınan materyalin bir kısmı doğrudan inceleme için slaytlara yerleştirilmiş ve kalan kısmı ise Sabouraud dekstroza agar ekildi. Mayalar, germ tüpü ve klamidospore oluşumu, 45 ° C'de üreme, SDA ortamı üzerinde koloni özellikleri açısından değerlendirildi. Tanımlama için ticari yöntem Phoenix (Becton Dickinson, ABD) de kullanıldı. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), posaconazol, clotrimazol, bifanazol antifungal duyarlılığı için M27-A3 mikrodilüsyon yöntemi uygulandı.

Bulgular: Toplam 27 Candida türü izole edilmiştir. İzole edilen türler; 12 (% 44) C albicans, 7 (% 26) C parapsilosis, 7 (% 26) C glabrata, 1 (% 3.6) C tropicalis olarak tanımlandı. Posaconazol, klotrimazol, bifanazol için minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) geometrik ortalaması (GM) sırasıyla 0,22 µg / mL, 1,98 /g / mL, 0,7 µg / mL idi.

Sonuç: Çalışmada etken olarak en sık C. albicans görüldü. En etkili antifungal ise posaconazol olarak değerlendirildi. Topikal ilaçlar arasında, bifanazolün pıhtırimazolden daha etkili olduğu bulundu.

Anahtar Sözcükler: Otomikoz; Candida spp; antifungal

OTOMYCOSIS OF CANDIDAL ORIGIN IN CENTRAL ANATOLIA AND ANTIFUNGAL SENSITIVITY OF ISOLATED SPECIES

SUMMARY

Introduction: Otomycosis is a fungal infection that frequently involves the external auditory canal. Candida spp., and Aspergillus spp., are the most common fungal pathogens. The aim of this study was to determine the etiologic agents and antifungal susceptibility pattern of Candida otomycosis in our hospital.

Method: The study was designed as a retrospective analysis of the external ear canal specimens of patients with candida growth following otomycosis in Otolaryngology and Infectious Diseases outpatient clinic between 2018-2019. After removal of ear infectious samples, some of them were placed on the slides for direct examination and also a portion of them was plated on the Sabouraud dextrose agar. The yeasts were evaluated according to germ tube, and chlamyospore formation, reproduction at 45°C, colony characteristics on SDA medium. The commercial method Phoenix (Becton Dickinson, USA) was also used for identification. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M27-A3 microdilution method was applied for posaconazole, clotrimazole, bifanazole antifungal susceptibility.

Findings: A total of 27 Candida species were isolated. Isolated species were identified as, 12 (44.4%) C albicans, 7 (26%) C parapsilosis, 7 (26%) C glabrata, 1 (3.6%) C tropicalis. The geometric mean (GM) of the minimum inhibitory concentration (MIC) for posaconazole, clotrimazole, bifanazole was 0,22 µg/mL, 1,98 µg/mL, 0,7 µg/mL, respectively.

Conclusion: C albicans was the predominant aetiological agent. On the basis of the values, the most effective antifungal was posaconazole. Among the topical drugs, bifanazole was found to be more effective than clotrimazole.

Keywords: Otomycosis; Candida spp; antifungal

GİRİŞ

Otomikoz, dış kulak yolunda maya ve küf mantar türlerinin neden olduğu kaşıntılı süpüratif inflamasyonla karakterize akut ya da kronik yüzeysel enfeksiyondur. Sıklıkla sıcak ve

nemli iklimlerde, kronik hastalığı olan ya da antibiyotik kullanım öyküsü olan hastalarda karşılaşılmaktadır. Genellikle termofilik özelliği olan Aspergillus ve Candida türleri otomikoz ile ilişkilendirilmektedir^{1,2}. Hastalar kulakta dolgunluk, dış kulağın kızarıklığı, kaşıntı, ağrı, ödem, iltihap ve şişlik ile kliniğe başvurmaktadır. Karşılaşılan bu semptomlar birçok kulak enfeksiyonunda görüldüğü için bu bulgular otomikoz için patognomik değildir. Klinisyenler tarafından Aspergillus türlerinin neden olduğu otomikozlarda otomikroskopik muayenesinde spesifik görüntüler (Resim 1) görülmesine

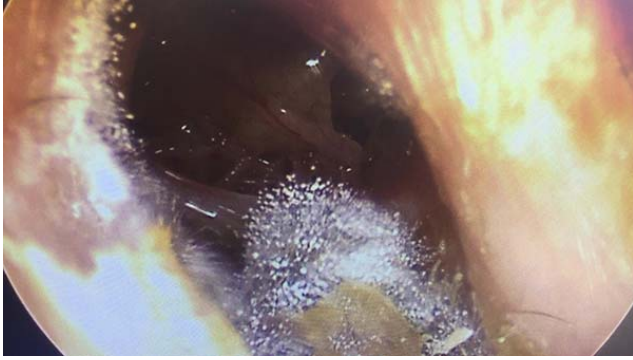
İletişim kurulacak yazar: Dr. Zehra BESTEPE DURSUN, Kayseri Şehir Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Kayseri, Türkiye, E-mail: dr.zehrabestepe@hotmail.com

Gönderilme tarihi: 09 Mayıs 2019, revizyonun gönderildiği tarih: 14 Haziran 2019, yayın için kabul edilme tarihi: 27 Haziran 2019

Kaynak gösterimi: Bestepe Dursun Z, Sav H, Çelik İ, Özcan İ. İç Anadolu Bölgesinde Candidaların Neden Olduğu Otomikozlar ve Antifungal Duyarlılıkları. KBB-Forum 2019;18(2):144-149



rağmen Candida türlerinin sebep olduğu otomikozlarda spesifik görüntü yoktur³. Bu nedenle otomikoz düşünülen hastalardan alınan klinik örnekler etkenin tanımlanması için mikolojik açıdan da değerlendirilmelidir.



Şekil 1: Aspergillusun neden olduğu otomikoz

Otomikozların standart tedavisi lokal temizlik ve toplikal antifungallerdir. İmmünespresif hastalarda sistemik antifungal tedavi uygulanmalıdır. Lokal tedavide steroid, antiseptik, asidik solüsyonlar ve yıkayıcı solüsyonlar kullanılmaktadır. Lokal antifungallardan clotrimazole, cilt, vulvovajinal ve orofaringeal mantar enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan, güvenli ve iyi tolere edilen bir ilaçtır⁴. Bifanazole imidazol grubu olup otomikoz tedavisinde kullanılmaktadır fakat henüz ototoksite özelliği test edilmemiştir⁵. Posakonazol sistemik kullanılan, Candida ve Aspergillus türlerine karşı iyi etkinliği olan geniş spektrumlu antifungal ilaçtır⁶.

Bu çalışmada otomikoz etkeni olan Candida türlerinin tanımlanması ve bu türlerin bazı toplikal ve sistemik antifungallere karşı in vitro duyarlılığı standart mikrodilüsyon yöntemiyle test edilerek bu antifungallerin etkinliğinin bildirilmesi amaçlandı.

HASTALAR VE YÖNTEM

Çalışma 2018-2019 tarihleri arasında Kulak-Burun Boğaz ve Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğinde otomikoz tanısıyla takip edilen Candida üremesi olan hastaların dış kulak yolu sürüntü örneklerinin türlerinin ve antifungal

duyarlılıklarının retrospektif olarak incelenmesi olarak dizayn edildi. Kulak yolundan alınan sürüntü örnekleri fungal inceleme açısından iki ayrı Sabouraud dekstroz agara (SDA) (Oxoid, İngiltere) ekilerek birisi 25 °C diğeri ise 37°C'de 1-3 hafta bekletildi. Üremeler inkübasyon süresi boyunca günlük olarak kontrol edildi. Üreyen maya türleri için besiyerindeki koloni şekli ve 45 °C'de üremesi değerlendirildi. Germ tüp ve klamidiaspor oluşumlarına bakıldı. Türlerin tanımlanmasında ayrıca ticari yöntem olarak Phoenix(Becton Dickinson, ABD) kullanılmıştır. Tür düzeyinde tanımlanan kökenler antifungal duyarlılık testi yapıldı. Posakonazol (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), klotrimazol(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), bifanazol (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) antifungal duyarlılığı için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)", M27-A3 mikrodilüsyon yöntemi uygulandı⁷. Çalışılan MİK değerleri (CLSI)", S4 mikrodilüsyon yöntem ile değerlendirildi⁸.

Antifungal Duyarlılık;

Çalışılan MİK değerleri (CLSI)", S4 mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirildi⁸. Mayaların duyarlılığını değerlendirmek için L-glutaminli, bikarbonatsız, RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA) kullanılarak referans mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Bu besiyeri %2 dekstroz ilave edilip 0.165 M morfolin-propan-sülfonik asit (MOPS; Sigma) ile pH'ı 7 olarak ayarlandıktan sonra broth mikrodilüsyon (BMD) testinde kullanılmıştır. Bu yöntem doğrultusunda önce posakonazol, klotrimazol, bifanazol toz etken maddesi BMD testinde kullanılacak son konsantrasyonunun 10 katı olacak şekilde çözülüp stok solüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra %2 dekstroz ilave edilip MOPS ile tamponlanmış L-glutaminli, bikarbonatsız, RPMI 1640 ile dilüe edilip steril, U tabanlı, 96 kuyucuklu mikroplaklara her kuyucukta 100 µl besiyeri ilaç çözeltisi olacak şekilde iki kat azalan seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Otomatik ölçüm cihazı ile % 0.85 sodyum klorür içerisinde 0.5 McFarland süspansiyonları hazırlanan suşlar CLSI M27-A3 standartlarına uygun olarak dilüe edilip sadece sondan bir önceki kuyucuk boş bırakılacak şekilde tüm kuyucuklara 100'er µl dağıtılmıştır. Sondan bir önceki kuyucuk sterilite kontrol



kuyucuğu ve en sondaki kuyucuk üreme kontrol kuyucuğu olarak ayrılmıştır. Böylece son posakonazol konsantrasyonunun 16µg/mL-0.03 µg/mL bifanazol konsantrasyonu 16 µg/mL -0,03 µg/mL, Klotrimazol 8 µg/mL -0,03 µg/mL aralığında olması sağlanmıştır. Plaklar 24 saatlik inkübasyondan sonra ön değerlendirmeye alınmış ve üreme olmaması durumunda 48 saatlik inkübasyonun ardından üç farklı araştırmacı tarafından çıplak gözle değerlendirilmiştir. Üreme kontrol kuyucuğuna göre %50 ve daha az üreme olan en küçük ilaç konsantrasyonuna sahip kuyucuk MİK değeri olarak kaydedilmiştir. Araştırmacılar tarafından ortak MİK değeri belirlenemeyen suşlar yeniden çalışılmıştır. Antifungallerin geometrik

ortalamaları çalışılan antifungallerin potensini değerlendirmek amacıyla hesaplanmıştır.

BULGULAR

Çalışmada otomikoz düşünülen 467 hastanın kulak kültürü değerlendirildi. Toplamda 27 hastada Candida izole edildi En sık izole edilen tür *C. albicans* türü olup bu türü *C. parapsilosis* izlemiştir (Tablo-1). Antifungal ajanlardan Posakonazol, klotrimazol, bifanazolun etkinlik MİK geometrik ortalamaları sırasıyla 0,22 µg/mL, 1.98 µg/mL, 0.7 µg/mL olarak bulundu. Herbir antifungalın her bir türe karşı MİK değerleri Tablo-2 de verildi.

Tablo 1: Candida türlerinin oranı

Kandida Türü	N (%)
<i>C. albicans</i>	12/27(% 44)
<i>C. parapsilosis</i>	7/27(%26)
<i>C. glabrata</i>	7/27(%26)
<i>C. tropicalis</i>	1/27(%4)

Tablo 2: Candida türlerinin Antifungal Duyarlılıkları

Candida Türleri n (%)	Antifungal Ajanlar ve MIC değerleri																			
	Posakonazole				Bifazonazole				Clotrimazole											
	0.03	0.06	0.25	0.5	1	2	0.06	0.125	1	2	4	8	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4
<i>C. albicans</i> 12(%44)	8	2	-	1	-	1	-	1	6	5	-	-	-	5	1	1	1	1	3	-
<i>C. glabrata</i> 7(%26)	3	-	1	-	2	1	-	1	2	2	2	-	-	-	1	2	3	-	1	-
<i>C. parapsilosis</i> 7(%26)	3	4	-	-	-	-	1	-	1	1	3	1	1	-	-	3	2	-	-	1
<i>C. tropicalis</i> 1(%4)	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-



TARTIŞMA

Otomikoz nemli ve ılıman bölgelerde görülmesine rağmen hastanemizin bulunduğu lokasyon karasal iklime sahiptir. Literatürde otomikozla alakalı çalışmalar bulunmakla birlikte Candidaların tür düzeyinde ayrımı ve antifungal duyarlılığına dair az sayıda çalışma olması bizim çalışmamızı önemli kılmaktadır. Yapılan çalışmalarda otomikoz etkeni Candida türleri ülkelere göre hatta ülkelerin bölgelerine göre bile farklılık gösterebilmektedir Ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında Candida'ların tür düzeyinde ayrımına dair veriler kısıtlı olarak görülmüştür. Ayrıca Candida türlerinin antifungal duyarlılığın ait veriler bulunmamaktadır. Değerli ve arkadaşlarının bölgemize göre daha ılıman etkiye sahip Manisa ilinde otomikoz etkeni olarak en sık *C tropicalis* türü olarak bildirmişlerdir⁹. Erzurum ilinde yapılan çalışmada en sık otomikoz etkeni Candida olarak izole edilmiş fakat tür belirtmemişlerdir¹⁰. Ordu ilinde yapılan bir çalışmada ise non albicans türleri otomikoz etkeni olarak bildirilmiştir¹¹.

Yurt dışında yapılan bazı çalışmalarda bizim sonuçlarla benzer olarak, otomikoz etkenleri arasında maya mantarı türünün ise *C.albicans* olduğu ifade edilmektedir¹²⁻¹⁸. Afrika'da yapılan bir çalışmada ise Candida guilliermondii ve Candida parapsilosis olduğu tespit edilmiştir¹⁹. İran'ın güney batısında yapılan iki farklı çalışmada izole edilen türlerin farklılığı tespit edilmiştir. Sakı ve ark en sık izole edilen türün *C albicans* türü olarak bildirilirken, Sabz ve ark en sık izole edilen türün *C parapsilosis* olarak bildirmişlerdir^{20,21}. Brezilyada yapılan iki farklı çalışmada ise izole edilen en sık türün *C albicans* olduğu bildirilmiştir^{18,22}. Bizim çalışmamızda ise en sık *C albicans* türü izole edilmiştir.

Çalışmamızda aynı zamanda izole edilen türler mikolojik olarak tanımlandıktan sonra posakonazol, klotrimazol, bifanazol antifungallerine karşı antifungal duyarlılığı tespit edildi. MİK değerlerinin geometrik ortalamasına göre en potent ilaç sistemik olarak kullanılan posakonazol olarak belirlendi. Posakonazol,

kemik dokusuna ve merkezi sinir sisteminin iyi nüfuz ederek, fungal mastoidit ve otojenik serebral mikoz hastalarının tedavisinde sistemik kullanılan triazolollerdir²³. Bu konuda yapılan çok fazla çalışma bulunmamakla birlikte otomikoz etkeni siyah *Aspergillus* türleri ile yapılan bir çalışmada bu türlere karşı düşük MİK değeri gösterdiği saptanmıştır²⁴. Farklı bir çalışmada MALDI-TOF-MS((Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight mass spectrometry) sistemiyle tanımlanan ve otomikoz etkeni olan küf ve maya mantarlarının tümüne karşı posokonazolun düşük MİK değerleri gösterdiği saptanmıştır²⁵. Bizim çalışmamızda Candida izolatlarına karşı posokonazol antifungal duyarlılığı çalışıldı ve ilacın MİK değeri 0,03-2 µg/mL değerinde bulundu. Herhangi bir direnç paternine rastlanmadı.

Bifanazol imidazol grubu olup ve fungistatik topikal kullanılan bir ajandır. Dermatofitlere, mayalara, küflere karşı etkilidir. Bifonazolün, dermatofit ve Candida spp suşuna karşı, clotrimazolden daha fazla fungisidal aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir²⁶. Topikal klotrimazol, hem *Aspergillus* spp hem de Candida spp 'nin etken olduğu otomikoz tedavisinde tercih edilen antifungal ajanlardır^{27,28}. Bununla birlikte yan etki açısından irdelediğimizde bifanazolun ototoksik özelliği henüz test edilmemişken klotrimazolün ise ototoksik özelliği bulunmamaktadır^{23,29}. Bizim çalışmamızda otomikoz etkeni Candida türlerine en etkili topikal antifungal ajan bifanazol olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak hastanemizde otomikoz etkeni izole edilen ve tanımlanan en sık etyolojik ajan *C albicans* türü olmuştur. Otomikoz vakalarının bölgemizde sıklığına dair yeterli sayıda çalışma bulunmamakla birlikte komorbid hastalıklara sahip olan hastalarda tedavi zorluklarına yol açabileceği düşünülmektedir. Otomikozun tedavisiyle alakalı çalışmaların olması tedavi protokollerinde yol göstermesi açısından önemlidir. Çalışmamızda posakonazolun en potent sistemik antifungal ilaç olduğu görülürken bu ilacın lokal kullanımının olmaması bir kısıtlılık olarak düşünülmüştür. Çalışmada lokal ajanlar değerlendirildiğinde en



potentin bifanazol olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte otomikozun klinik özelliklerinin iyi değerlendirilmesi tedavi başlanmadan önce etkenin belirlenmesi için örnek alınması önemlidir. Alınan kulak örneğinin mantar üremesi için SDA besiyerine ekilmesi ve üreyen mantar etkeninin türünün belirlenerek antifungal duyarlılığının çalışılması hastanın tedavi protokolünü oluşturmada yol gösterici olmaktadır. Çalışmanın kısıtlılığı invitro olarak dizayn edilmesiydi, gelecek zamanda klinik verilerin de değerlendirilerek daha geniş çaplı ve çok merkezli çalışmalar yapılmasına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gharaghani M, Seifi Z, Zarei Mahmoudabadi A. Otomycosis in Iran: a review. *Mycopathologia*. 2015 Jun;179(5-6):415-24.
2. Fayemiwo SA, Ogunleye VO, Adeosun AA, Bakare RA. Prevalence of otomycosis in Ibadan: a review of laboratory reports. *Afr J Med Med Sci*. 2010 Dec;39 Suppl:219-22.
3. Anwar K, Gohar MS. Otomycosis; clinical features, predisposing factors and treatment implications. *Pak J Med Sci*. 2014 May;30(3):564-7.
4. Crowley P.D., and Gallagher H.C.: Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J Appl Microbiol* 2014; 117: pp. 611-617.
5. Vennewald I, Klemm E. Otomycosis: Diagnosis and treatment. *Clin Dermatol*. 2010 Mar 4;28(2):202-11.
6. Groll AH, Walsh TJ. Posaconazole: clinical pharmacology and potential for management of fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2005 Aug;3(4):467-87.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, third ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008 CLSI document M27-A3.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 4th Informational Supplement, CLSI M27-S4 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
9. Değerli K, Ecemiş T, Günhan K, Başkesen T, Kal E. Agents of otomycosis in Manisa region, Turkey, 1995-2011. *Mikrobiyol Bul*. 2012 ;46(1):79-84.
10. Malçok HK, Uyanık MH, Aktaş O, Ayyıldız A. Dış kulak yolu kültür sonuçlarının değerlendirilmesi, *EAJM* 2006;38(3):85-8.
11. Çetinkol Y, Korkmaz M, Korkmaz H, Yıldırım A. Otomycosis and Causative Organisms in Ordu City, *ANKEM Derg* 2015;29(1):31-35.
12. Aneja KR, Sharma C, Joshi R. Fungal infection of the ear: a common problem in the north eastern part of Haryana, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010;74(6):604-7.
13. Araiza J, Canseco P, Bonifaz A. Otomycosis: clinical and mycological study of 97 cases, *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 2006;127(4):251-4.
14. Fasunla J, Ibekwe T, Onakoya P. Otomycosis in western Nigeria, *Mycoses* 2008;51(1):67-70.
15. García-Agudo L, Aznar-Marín P, Galán-Sánchez F et al. Otomycosis due to filamentous fungi, *Mycopathologia* 2011;172(4):307-10.
16. Kumar A. Fungal spectrum in otomycosis patients, *JK Science* 2005;7(3):152-5.
17. Ninkovic G, Dullo V, Saunders NC. Microbiology of otitis externa in the secondary care in United Kingdom and antimicrobial sensitivity, *Auris Nasus Larynx* 2008;35(4):480-4.
18. Pontes ZB, Silva AD, Lima Ede O et al. Otomycosis: a retrospective study, *Braz J Otorhinolaryngol* 2009;75(3):367-70.
19. Adoubryn KD, N'Gattia VK, Kouadio-Yapo GC, Nigué L, Zika DK, Ouhon J. Epidemiology of otomycoses at the university hospital of Yopougon (Abidjan-Ivory Coast), *J Mycol Med* 2014;24(2):e9-15. doi: 10.1016/j.mycmed.2013.07.057
20. Saki N, Rafiei A, Nikakhlagh S, Amirrajab N, Saki S. Prevalence of otomycosis in Khouzestan Province, southwest Iran. *J Laryngol Otol*. 2013 ;127(1):25-7.
21. Sabz G, Gharaghani M, Mirhendi H, Ahmadi B, Gatee MA, Sisakht MT, Hemati A, Mohammadi R, Taghavi J, Nouripour-Sisakht S. Clinical and microbial epidemiology of otomycosis in the city of Yasuj, southwest Iran, revealing *Aspergillus tubingensis* as the dominant causative agent. *J Med Microbiol*. 2019 Feb 25. doi: 10.1099/jmm.0.000948.
22. Zaror L, Fischman O, Suzuki FA, Felipe RG. Otomycosis in São Paulo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991 May-Jun;33(3):169-73.
23. Vennewald I, Klemm E. Otomycosis: Diagnosis and treatment. *Clin Dermatol*. 2010 Mar 4;28(2):202-11.
24. Badali H, Fakhim H, Zarei F, Nabili M, Vaezi A, Poorzad N, Dolatabadi S, Mirhendi H. In Vitro Activities of Five Antifungal Drugs Against Opportunistic Agents of *Aspergillus Nigri* Complex. *Mycopathologia*. 2016 Apr;181(3-4):235-40.
25. Rath S, Das SR, Padhy RN. Bayesian analysis of two methods MALDI-TOF-MS system and culture test in otomycosis infection. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2019 Jan 4;5(1):6-13.
26. Lackner TE, Clissold SP. Bifonazole. A review of its antimicrobial activity and therapeutic use in superficial mycoses. *Drugs*. 1989 Aug;38(2):204-25.
27. Anwar K, Gohar MS. Otomycosis; clinical features, predisposing factors and treatment impl. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2013 Jan-Jun;25(1-2):78-80.
28. Khan F, Muhammad R, Khan MR, Rehman F, Iqbal J, Khan M, Ullah G. Efficacy of topical clotrimazole in treatment of otomycosis. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2013 Jan-Jun;25(1-2):78-80.



29. Tom LW. Ototoxicity of common topical antimycotic preparations. *Laryngoscope*. 2000 Apr;110(4):509-16