**وزارة التعليم العالي والبحث العلمي**

**جامعة القادسية**

**كلية التربية**

**قسم علوم الحياة**

# التحري عن الفطريات الإنتهازية المرافقة لطيور الزينة ودراسة بعض عوامل الضراوة فيها

رسالة مقدمة الى مجلس كلية التربية – جامعة القادسية

وهي جزءُ من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة – أحياء مجهرية

**تقدم بها**

**إحسان علي عبد الرضا الزامليِّ**

**بكالوريوس علوم حياة – 1994**

**بإشراف**

الأستاذ الدكتور ماجد كاظم عبود الشبلي

**ربيع الأول 1438 هـ** **كانون الأول 2016**

بسم الله الرحمن الرحيم

( وَمَا مِنْ دَابَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا طَائِرٍ يَطِيرُ بِجَنَاحَيْهِ إِلَّا أُمَمٌ أَمْثَالُكُمْ مَا فَرَّطْنَا فِي الْكِتَابِ مِنْ شَيْءٍ ثُمَّ إِلَى رَبِّهِمْ يُحْشَرُونَ )

**(الأنعام: الآية 38)**

# الإهداء

إلى الذي لا يطيب الليل إلاّ بشكره ولا يطيب النهار الاّ بطاعته ولا تطيب اللحظات إلاّ بذكره الله جلّ جلالُّك ..

إليك يا من بلّغ الرسالة ونصح للأمة .. إلى نبي الرحمة ونور العالمين أبي القاسم محمد صلى الله عليك وعلى آل بيتك أجمعين ..

إلى من علمني العطاء من دون انتظار .. إلى من أحِملُ اسمه بكل افتخار.. رحمك الله واسكنك فسيح جناته، والدي العزيز

إلى ملاكي في الحياة..إلى معنى الحب والحنان ..إلى بسمة الحياة وسر الوجود..إلى من كان دعاؤها سرّ نجاحي ..إلى اغلى البشر.. أمي الحبيبة

إلى كل من وقف بجانبي وساندني .. أهدي إليكم جهدي المتواضع هذا..

**إحسان الزاملي**

# الشكر والتقدير

اللهم لك الحمد لجلال وجهك وعظيم سلطانك والصلاة والسلام على سيدنا محمد (ص) وعلى آله الأطهار، أتوجه بالشكر والامتنان إلى الأستاذ الدكتور ماجد كاظم عبود الشبليّ المشرف على رسالتي لقبوله الإشراف على هذه الرسالة، وعلى ما بذله من جهد متواصل في تقديم الآراء السديدة التي أغنت الرسالة .

ولا يفوتني أن اتقدم بالشكر والامتنان إلى عمادة كلية التربية ممثلة بالأستاذ الدكتور خالد العادلي وإلى رئاسة وكادر قسم علوم الحياة حفظهم الله .

أتقدم بالشكر الى السيد ضياء البناي طالب الدكتوراه في جامعة كربلاء كلية الادارة والاقتصاد لمساندته لي وفضله عليّ ، وفي الختام أشكر كل من وقف معي في إتمام هذه الرسالة ولا سيما عائلتي.

إحسان الزاملي

## إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة نشهد إننا أطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ " التحري عن الفطريات الإنتهازية المرافقة لطيور الزينة ودراسة بعض عوامل الضراوة فيها " المقدمة من قبل طالب الماجستير (إحسان علي عبد الرضا) وناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ ٢٠١٧/١/١٥ ونشهد بأنها جديرة بالقبول بتقدير (إمتياز) لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة .

**رئيس اللجنة**

التوقيع :

الإسم : د. نيران عبيد جاسم

المرتبة العلمية : أستاذ

جامعة القادسية – كلية الصيدلة

**عضو اللجنة**

التوقيع :

الإسم : د. محمد محسن عبد الحسين

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

جامعة الكوفة – كلية العلوم

**عضو اللجنة**

التوقيع :

الإسم : د. إبتسام ثامر جعاز

المرتبة العلمية: مدرس

جامعة القادسية – كلية التربية

**عضواً ومشرفاً**

التوقيع :

الإسم : د. ماجد كاظم عبود

المرتبة العلمية : أستاذ

جامعة القادسية – كلية التربية

**مصادقة عمادة كلية التربية – جامعة القادسية**

التوقيع :

الإسم : د. خالد جواد العادلي

المرتبة العلمية : أستاذ

جامعة القادسية / كلية التربية

التاريخ ٦ / ٢ /٢٠١٧

## الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص الفطريات من طيور الزينة بطريقة العزل المباشر ، إذ شملت الدراسة أربعة أنواع من طيور الزينة، هي الحمام ، طير الحب، الفنجس والكناري. وكانت مصادر العزل هي الريش والعلف والبراز، ،وأخذت العينات من الطيور الموجودة في أقفاص المنازل ومحلات بيع الطيور في محافظة كربلاء، وقد استمرت الدراسة مدة ستة أشهر للفترة من 10/1- 2016/3/1..

أظهرت النتائج ، أن هناك تبايناً في أعداد ونسب الفطريات المعزولة تبعا لجنس الطير ولمصدر العزل ، وقد كان الفطر *Aspergillus sp.* هو الأكثر تواجداً في الطيور، وبنسبة 59.6 % في طير الحب، 46 % في الكناري، 54 % في الفنجس،و 71.6 % في الحمام ، تلاه الفطر *Penicillium sp.* بنسبة بلغت 40.4 % في طير الحب، 51.3 % في الكناري ، 44.2 % في الفنكس ، و 28.4 % في الحمام ، فيما ظهر كلُ من *Alternaria sp.* و *Mucor sp.* بالمرتبة الأخيرة وبنسبة 2.70 % في الكناري و1.80 % في الفنكس على التوالي .

وفيما يخص مصدر العزل فقد كان الريش هو الأكثر تلوثاً بالفطريات إذ سجل نسباً بلغت 58.3 %، و 42.1 %، و 66.66 %، و 83.87 %، لكل من طير الحب والكناري والفنجس والحمام على التوالي .

درست عوامل الضراوة للفطرين *Aspergillus niger* و *Penicillium digitatum* وقد شملت كل من القدرة على انتاج البروتييز واللاييز والفسوسفولايبيز والهيمولايسين وقد تبين قابلية كلا الفطرين على انتاج أنزيم اللاييز على الأوساط الزرعية، وكانت العزلات التي مصدرها الريش هي الاكثر كفاءة في انتاج الانزيم إذ بلغت منطقة التحلل 5 ملم للفطر *A.niger* و 4 ملم للفطر *P.digitatum* .

أما القدرة على انتاج الفوسفولايبيز ايضا استطاع الفطرين المختبرين من انتاج هذا الانزيم على الاوساط الخاصة بهذا الغرض حيث تبين ان العزلات التي مصدرها البراز هي الاكثر كفاءة في انتاج الانزيم إذ بلغت منطقة التحلل 8.6 ملم للفطر *A.niger* و 5 ملم للفطر *P.digitatum* .

أما إنتاج البروتينيز فقد كانت عزلات الفطر *A.niger* والمعزولة من الريش هي الأكثر كفاءة حيث أعطت منطقة تحلل 4.6 ملم فيما كانت العزلات التابعة للفطر *P.digitatum* والمعزولة من العلف هي الأكثر كفاءة أذ بلغت 3 ملم .

أظهرت العزلات الفطرية لكل من *A.niger* و*P.digitatum* والمعزولة من العلف والريش على التوالي قدرة على تحلل الدم إذ بلغت نسبة التحلل 6.3 و 5 ملم على التوالي .

تم اختبار الحساسية الدوائية للفطريات المعزولة من طيور الزينة باستخدام المضادات Amphotericin B و Ketoconazole و Fluconazole بطريقة الأقراص ، وقد لوحظ تفوق واضح للمضاد Ketoconazole ضد عزلات الفطر *A.niger* إذ بلغت منطقة التثبيط 15.6 ملم و 15 ملم و 12.6 ملم للعزلات من الريش والعلف والبراز على التوالي في حين

بلغت منطقة التثبيط للفطر *P.digitatum* 17.6 ملم و 15 ملم و 15.3 ملم للعلف والريش والبراز على التوالي .

وتم اختبار تأثير المطهرات ضد الفطرين *A.niger* و *P.digitatum* المعزولين من طيور الزينة وقد استخدمت ثلاثة مطهرات هي Gentian violet و Povidone-iodine و Dettol وبثلاثة تراكيز هي 1 %، و 5 %، و 10 %، وقد أظهر المطهر Gentian violet كفاءة عالية ضد عزلات الفطرين *A.niger* و *P.digitatum* بتركيز 1% .

الدراسة الحالية سلطت الضوء على الفطريات المرافقة لطيور الزينة وتبيَن إمكانية انتقال هذه الفطريات الى الانسان ، وهو ما يسبب مشاكل صحية له.

# المحتويات


| العنوان | الصفحة |
|---|---|
| الخلاصة | أ |
| قائمة المحتويات | ج- د - ه |
| قائمة الجداول | و |
| قائمة الأشكال | و - ز |
| قائمة المختصرات | ح |
| الفصل الاول / المقدمة | |
| **1-المقدمة** | 2 -1 |
| الفصل الثاني / إستعراض المراجع | |
| 2-استعراض المراجع | 3 |
| 2-1-طيور الزينة | 3 |
| 2-2- بعض الأمراض التي تنقلها طيور الزينة | 5 |
| 2-2-1- Aspergillosis (داء الرشاشيات) | 5 |
| 2-2-2- Pencilliosis | 6 |
| 2-2-3- Histoplasmosis | 7 |
| 2-2-4-Mucormycosis | 9 |
| 2-2-5- Cryptococcosis | 11 |
| 2-2-6- Candidiasis | 12 |
| 2-3- بعض الأجناس الفطرية المسببة للأمراض الفطرية لطيورالزينة | 13 |
| 2-3-1- الجنس *Aspergillus* | 13 |
| 2-3-2- الجنس *Penicillium* | 14 |
| 2-3-3- الجنس *Mucor* | 16 |
| 2-3-4- الجنس *Alternaria* | 17 |
| 2-4- عوامل الضراوة Virulence factors | 18 |
| 2-4-1- القدرة على الالتصاق Ability of adhesion | 20 |
| 2-4-2- انتاج البروتييز Proteases production | 21 |
| 2-4-3- انتاج اللايبيز Lipases production | 23 |
| 2-4-4- انتاج الفوسفولايبيز Phospholipases production | 24 |
| 2-4-5- انتاج انزيمات تحلل الدم Haemolytic enzymes production | 25 |
| 2-4-6- انتاج السموم الفطرية Mycotoxin production | 26 |
| 2-4-6-1- الافلاتوكسين Aflatoxin | 27 |
| 2-5- المضادات الحياتية Antibiotics | 28 |
| 2-5-1- Amphotericin B | 28 |

| | |
|---|---|
| | |
| 29 | Ketoconazole-2-5-2 |
| 30 | Fluconazole -3-5-2 |
| 31 | 2-6- المطهرات Antiseptics |
| 32 | 2-6-1- البوفيدون ايودين Povidone –Iodine (Septidyne) |
| 32 | Gentian violet -2-6-2 |
| 33 | 2-6-3- الديتول Dettol |
| | الفصل الثالث / المواد وطرائق العمل |
| 34 | 3- المواد وطرق العمل materials and methods |
| 34 | 3-1- المواد |
| 34 | 3-1-1- الأجهزة والأدوات |
| 36 | 3-1-2- المواد الكيميائية والبايولوجية |
| 38 | 3-1-3- المضادات الحياتية Antibiotics agents |
| 39 | 3-1-4- المطهرات Antiseptics |
| 39 | 3-1-5- مواد تجربة PCR |
| 39 | 3-1-5-1- عدة استخلاص الـ DNA |
| 40 | 3-1-5-2- خليط التفاعل PCR premix |
| 40 | 3-1-5-3-البادئات Primers |
| 41 | 3-1-5-4- مُعلم الـ DNA DNA ladder |
| 42 | 3-1-5-5- إنزيمات القطع Restriction enzymes |
| 43 | 3-2- طرائق العمل Methods |
| 43 | 3-2-1- جمع العينات Specimens collection |
| 43 | 3-2-2- الأوساط الزرعية Culture media |
| 43 | 3-2-2-1- وسط سابرود دكستروز اكار Sabouraud's – dextrose agar |
| 43 | 3-2-2-2- وسط نقيع المخ والقلب Brain-Heart-Infusion-Agar(BHIA) |
| 44 | 3-2-2-3- وسط أكار الدم Blood Agar(B.A.) |
| 44 | 3-2-2-4- وسط بطاطا دكستروز أكار Potato Dextrose Agar (PDA) |
| 44 | 3-2-2-5- وسط اختبار قدرة الفطريات على تحلل البروتين Protolytic activity test medium |
| 45 | 3-2-2-6- وسط اختبار قدرة الفطريات على تحليل الدهون Lipolytic activity test medium |
| 45 | 3-2-2-7- وسط إختبار القدرة على تحلل الدهون المفسفرة Phospholipase production test medium |
| 45 | 3-2-2-8- وسط إختبار القدرة على تحلل الدم Hemolysis activity test medium |
| 46 | 3-2-3- زراعة العينات Culture of samples |
| 46 | 3-2-4- تنقية العزلات الفطرية Purification of fungal isolates |

| | |
|---|---|
| 3-2-5- التشخيص المختبري للعزلات الفطرية Identification of fungal isolates | 46 |
| 3-2-6- حفظ وادامة العزلات الفطرية Maintance of fungal isolates | 47 |
| 3- 2- 7- طرائق العمل الخاصة بالـ PCR | 47 |
| 3- 2- 7-1 - العينات | 47 |
| 3- 2- 7-2 – استخلاص وتنقية الـ DNA الفطري | 47 |
| أ. إستخلاص الـ DNA | 47 |
| ب. تقدير كمية ونقاوة الـ DNA | 48 |
| 3- 2- 7-3- تحضير البادئات Preparing the primers | 49 |
| 3- 2- 7-4- تضخيم خليط التفاعل أو (تضخيم الجين) | 50 |
| 3- 2- 7- 5- الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز | 51 |
| 3- 2- 7- 6- تجربة الأنزيمات القاطعة لنواتج الـ PCR، (أو restriction fragment length polymorphism أو RFLP) | 52 |
| 3-2-8- اختبارات حساسية الفطريات للمطهرات والمضادات الحياتية | 53 |
| 3-2-8-1- اختبار حساسية الفطريات للمطهرات | 53 |
| 3-2-8-2- اختبار حساسية الفطريات للمضادات الحياتية | 54 |
| 3-2- 9-التحليل الإحصائي Statistical Analysis | 54 |
| الفصل الرابع / النتائج والمناقشة | |
| 4- 1- العزل والتشخيص | 55 |
| 4-1- 1- الأنواع الفطرية المعزولة تبعاً لنوع الطائر | 55 |
| 4-1-2- الأنواع الفطرية المعزولة تبعاً للجزء المعزولة منه | 58 |
| 4-1-3- التشخيص الجزيئي | 61 |
| 4-2- عوامل الضراوة للفطرين *A.niger* و *P.digitatum* | 63 |
| 4-2-1- القدرة على انتاج انزيمات تحلل البروتين | 63 |
| 4-2-2- القدرة على انتاج اللايبيز | 65 |
| 4-2-3- القدرة على انتاج إنزيم تحلل الدهون المفسفرة | 66 |
| 4-2-4- القدرة على انتاج الهيمولايسين | 68 |
| 4 -3- الحساسية الدوائية للفطرين *A.niger* و *P.digitatum* (طريقةالاقراص) | 70 |
| 4-4- حساسية الفطرين *A.niger* و *P.digitatum* للمطهرات | 72 |
| الفصل الخامس / الإستنتاجات والتوصيات | |
| الاستنتاجات والتوصيات | 79 -78 |
| المصادر | 113-80 |
| الخلاصة انكليزي | A-B |

## قائمة الجداول


| التسلسل | العنوان | الصفحة |
|---|---|---|
| 1 | الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة | 34 |
| 2 | المواد الكيمائية والبايولوجية المستخدمة في الدراسة | 35 |
| 3 | الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة | 38 |
| 4 | المضادات الحياتية المستخدمة في الدراسة | 38 |
| 5 | المطهرات المستخدمة في الدراسة | 39 |
| 6 | عدة إستخلاص الـ DNA | 39 |
| 7 | خليط التفاعل (PCR premix ) | 40 |
| 8 | البادئات | 41 |
| 9 | مُعلم الـ DNA ladder DNA | 41 |
| 10 | الإنزيم القاطع Rsa I | 42 |
| 11 | نقاوة وتركيز الـ DNA | 49 |
| 12 | الأحجام والتراكيز الموصى بها في القيام بتفاعل الـ PCR في انابيب الـ PCR | 50 |
| 13 | ظروف تفاعل الـ PCR الموصى بها لإجراء عملية التضخيم | 51 |
| 14 | أعداد ونسب الفطريات المعزولة بحسب اجزاء جسم الطائر | 59 |
| 15 | قدرة الفطرين *A.niger* و *P.digitatum* على انتاج إنزيم البروتينيز | 64 |
| 16 | قدرة الفطرين *A.niger* و *P.digitatum* على انتاج اللاييبز | 66 |
| 17 | القدرة على انتاج الفوسفو لايبيز | 68 |
| 18 | القدرة على انتاج الهيمولايسين | 69 |
| 19 | الحساسية الدوائية للفطرين *A.niger* و *P.digitatum*(طريقة الاقراص) | 71 |
| 20 | حساسية الفطرين*A.niger* و *P.digitatum* للمطهرات بتراكيز مختلفة | 76 |


## قائمة الاشكال


| التسلسل | عنوان الشكل | الصفحة |
|---|---|---|
| 1 | طائر الكناري | 4 |
| 2 | طائر الحب | 4 |
| 3 | طائر الفنجس | 4 |
| 4 | النسبة المئوية للعزلات الفطرية المعزولة من طائر الحب | 56 |
| 5 | النسبة المئوية للعزلات الفطرية المعزولة من طائر الكناري | 56 |
| 6 | النسبة المئوية للعزلات الفطرية المعزولة من طائر الفنجس | 57 |
| 7 | النسبة المئوية للعزلات الفطرية المعزولة من طائر الحمام | 57 |
| 8 | الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز | 62 |
| 9 | الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز لناتج الـ PCR المهضومة بواسطة الانزيم القاطع RsaI (PCR/RFLP) | 62 |

| | | |
|---|---|---|
| 10 | الحساسية الدوائية للفطر *A.niger* والمضادات Amphotericin B و Ketoconazole و Fluconazole | 71 |
| 11 | حساسية الفطر *P.digitatum* للمطهرات Gentian violet و Povidone-iodine و Dettol بتركيز 1 % | 77 |
| 12 | حساسية الفطر *A.niger* للمطهرات Gentian violet و Povidone- iodine و Dettol بتركيز 1 % | 77 |

# المختصرات

| ت | المختصر | المصطلح | الصفحة |
|---|---|---|---|
| 1 | CFT | Complement Fixation Test | 9 |
| 2 | ABLC | Amphotericin B Lipid Complex | 13 |
| 3 | PCZ | Posaconazole | 13 |
| 4 | (5FC) | 5- Fluorocytosine | 14 |
| 5 | Flu | Fluconazole | 14 |
| 6 | OTA | Ochratoxin A | 17 |
| 7 | (PLB)B | Phospholipase B | 25 |
| 8 | (LPL) | Lysophospholipase | 26 |
| 9 | AFB1 | Aflatoxin B1 | 28 |
| 10 | Ket | Ketoconazole | 30 |
| 11 | NDDS | Novel Drug Delivery System | 30 |

# الفصل الأول

## المقدّمة

## 1- المقدّمة

تعد طيور الزينة من الطيور التي حظيت بأهتمام الإنسان، اذ لا يكاد يخلو بيت منها (Saso,2001) فهي مصدر ارتياح للعائلة فضلاً عن كونها تضفي الجمال للمكان الذي تتواجد فيه نظراً لأشكالها الجميلة الجذابة وأصواتها الشجية(Fairy *et al.*,2005) وفي العراق فإن الناس يهتمون بهذه الطيور ويربونها في بيوتهم داخل اقفاص مختلفة الأحجام والأشكال ،وتوجد أسواق خاصة لهذه الطيور يستطيع أي شخص أن يقتني ما يشاء من الطيورفيها، وتعد طيور الحب (Love birds) والحمام (Pigeon) والكناري(Canary) والفنجس (Finches) من أكثر الطيور رواجاً في العراق، إن أغلب طيور الزينة الموجودة في العراق هي مستوردة إذ تستورد من الخارج او يتم إكثارها محلياً لأغراض تجارية بحتة ، وهي ليست أصلية أي أنها جلبت من بيئة تختلف تماما عن البيئة العراقية ، فهي غالباً ذات أصل أوربي أو من شرق آسيا أو من أميركا الجنوبية وأفريقيا ، ومن المعروف فإن مقاومة الطير تكون أقل عند تواجده في بيئة تختلف عن بيئته الاصلية اذ تلعب درجة الحرارة والرطوبة والغطاء النباتي والغذاء ومواسم الأمطار الدور الأكبر في ذلك (Harrison and Greensmith,2010).

عند تربية الطيور في المنزل لابد من الاهتمام بالجانب الصحي ومنع إصابتها بالأمراض المختلفة ،اذ لابد من توفير بيئة مناسبة في الأقفاص وغذاء صحي وتهوية ملائمة، وعكس ذلك فإن الطيور سوف تعاني من أمراض مختلفة قد تكون فايروسية أو بكتيرية أو فطرية (Saso,2001). نظراً لكون الطيور موجودة معنا في المنازل ، وكثيراً ما يحصل تماس مباشر معها أو مع فضلاتها، فإن امكانية انتقال الأمراض من هذه الطيور واردة جدا ( Julia *et al.*,2015).

هنالك الكثير من الفطريات التي تهاجم الطيور منها *Aspergillus spp* و *Penicillium spp* وقد تنتقل هذه الفطريات لتصيب الانسان، إذ ذكر Owin (2000) أن أحد مصادر الأصابة بداء Aspergillosis التحسسي يأتي من طيور الزينة ،أما Julia *et al.*, (2015) فقد ذكر أن الأشخاص الذين يعيشون في منازل تحوي طيور يكونون اكثر عرضة للإصابة بالفطريات الانتهازية .

بناءً على ما تقدم ونظرا لقلة الاهتمام المحلي بهذا الموضوع جاءت هذه الدراسة بهدف :- تسليط الضوء على الفطريات الانتهازية التي ترافق طيور الزينة ، والتحري عن ضراوتها وطرق مكافحتها ، ويمكن إعتماد المحاور الآتية لتحقيق هذا الهدف :-

1.جمـــع عينـــات الـــريش والبـــراز والعلـــف مـــن طيـــور الزينـــة (الحمـــام،طيور الحب،الفنجس،الكناري).

2.عزل وتشخيص الأنواع الفطرية المرافقة لهذه العينات بإعتماد الطرق التقليدية والجزيئية.

3.التحري عن عوامل الضراوة للفطريات المعزولة مثل القدرة على حل الدم،انتاج كلُ من أنزيم البروتييزواللاييز والفوسفولاييز.

4.اختبار الحساسية الدوائية لعدد من المضادات الحيوية تجاه هذه الفطريات المعزولة.

5.اختبار كفاءة بعض المطهرات تجاه الفطريات المعزولة.

# الفصل الثاني

## استعراض المراجع

## 2- استعراض المراجع Literature review

### 2- 1- طيور الزينة Pet Birds

تربية الطيور المنزلية هي من الهوايات والنشاطات الترفيهية للمجتمعات ومعظم هذه الطيور ولا سيما الببغاوات تستورد من خارج البلاد أو تمسك في البراري ، وعندما تجلب هذه الطيور الى المنازل فإنها من المحتمل أن تشكل خطراً عندما يكون الانسان بتماس مباشر مع ريشها ، إذ ان ريش الطيور العائلية أو المنزلية يعرف بأنه حامل لمختلف الميكروبات التي تشمل بضعة أنواع من الفطريات التي تكون ممرضة وقادرة على إصابة البشر والحيوانات في جميع أنحاء العالم (Mbata *et al*.,2005; Deshmukh, 2004)، وأوضحت الدراسات أن الطيور السليمة بالإضافة الى الطيور الميتة التي هلكت بسبب الانهاك والجفاف خلال الهجرة، ممكن ان تحمل معها مختلف الفطريات (الأعفان) التي تلوث الهواء والتربة والماء المحيط ببيئتها ومعظم هذه الطيور تباع بوصفها طيور زينة والتي تكون سريرياً سليمة لكنها تكون مصدراً مهماً لمسببات الأمراض التي تحملها من خلال جسمها ، ويعتبر جسم وريش الطيور من الوسائل المناسبة لإنتقال هذه الأنواع الفطرية إذ تسهم بصورة كبيرة في ظهور مدى واسع من الأمراض الفطرية (Miljković *et al*.,2011)، و بينت الدراسات التي أجريت على غذاء الطيور والتحري عن الفطريات الموجودة فيه فقد ظهرومن خلال دراستين اجراهما Krnjaja *et al.* (2008, 2010) الوجود السائد لفطر *Fusarium* بنسبة 56.09 %و63.40% على التوالي ،يليه الفطر *Aspergillus* بنسبة 54.35 % و73.62 % وتم عزل الفطريات الأخرى ومنها *Rhizopus, Penicillium, Mucor* و*Alternaria* .

تحمل الطيور كثيراً من الكائنات المحبة للكيراتين خلال الريش السليم وبعض هذه الفطريات المحبة للكيراتين معروفة على أنها ممرضة جلدية ، تسبب اصابات جلدية سطحية (Dermatophytoses) للأنسجة المتقرنة (الجلد،الريش ،الشعر ،الأظفر) للإنسان والحيوانات(Deshmukh *et al*.,2008) ، والسلوك الخاص بالطائر عادة يعد من العوامل المهمة في توزيع ونقل الوباء للفطريات الممرضة إذ ان الطيور البرية التي تطير عبر الحدود الدولية ممكن ان تنقل وتنشر العديد من الفطريات الممرضة للطيور المنزلية والتي قد تصيب الإنسان (Efuntoye and Fashanu,2001). ومن اهم طيور الزينة المستخدمة ضمن هذه الدراسة هي الكناري *Serinus canaria* و الحمام المنزلي *Columba livia domestica* و

طير الحب (*Melopsittacus undulatus*) Budgerigar و الفنجس *Taeniopygia guttata* (الأشكال 1 و2 و 3).

**شكل (1) طائر الكناري**

**شكل (2) طائر الحب**

**شكل (3) طائر الفنجس**

## 2-2- بعض الأمراض التي تنقلها طيورالزينة Some diseases transmitted by pet birds

### 2-2-1- Aspergillosis (داء الرشاشيات)

يعد داء الرشاشيات واحداً من الأمراض الفطرية الانتهازية الشائعة للقناة التنفسية في الطيور والتي تسبب معدلاً عالياً من الامراضية والوفيات ، ولذلك يسبب خسائر اقتصادية كبيرة خاصة في الدواجن(Tell, 2005).إذ يصيب انواعاً مختلفة من الطيور الداجنة وعلى مدى واسع (Xavier *et al*.,2007).

إن إستنشاق كونيدات الفطر *Aspergillus fumigatus* يمكن ان يسبب مدى واسعاً من المظاهر السريرية بالاعتماد على الحالة المناعية للمضيف، بالاضافة الى العوامل الفسيولوجية والتشريحية التي يمكن أن تعتمد عليها الاصابة، كما يسبب احتشاء الجهاز التنفسي لمعظم انواع الطيور، وهوما يقود الى بعض المظاهر المرضية التي تتراوح من اصابات حادة إلى مزمنة (Beernaert *et al*.,2010 ;McCormick *et al*., 2010 )، يمكن ان يقسم داء الرشاشيات إلى مرض حاد او مزمن ويمثل المظهر الحاد مشكلة كبيرة ويحدث عند التعرض لكميات كبيرة من الابواغ إذ يتقدم بسرعة ويسبب الموت خلال 48 ساعة ، في بعض الحالات يشمل ضيق التنفس مع تطور سريع للمرض ويسبب الوفاة، الطريق الرئيسي لانتشار الفطريات هو خلال الجهاز التنفسي مع انتشار قليل جدا عن طريق جهاز الدوران، بينما المظهر المزمن يظهر في الطيور البالغة والتي تتعرض لكمية قليلة من الأبواغ والتي تكون منقوصة المناعة بحيث يصبح

الطائر غير قادر على ازالة ابواغ الفطر المستنشقة، والموقع الشائع والاكثر تردداً ضمن الشكل الموضعي المزمن في الطيور هو في منطقة الرغامي بينما الشكل المنتشر عموماً يبدأ في الرئتين والاكياس الهوائية وينتشر الى مناطق إخرى مثل العظام،الكبد،الطحال والكلية (Abundis-Santamaria ,2005).

عند التعرض لأنواع الـ *Aspergillus* فأن كلاً من الطيور والإنسان يمكن أن تتطور فيهما إصابة حادة في الجهاز التنفسي والتي ربما تنتشر إلى أعضاء أخرى (Converse,2008; Charlton *et al*.,2008)، ظهرالفطر *A.flavus* بوصفه ممرضاً سائداً في الإنسان مع إصابات الفطريات الكيراتينية والفطريات المسببة لإلتهاب الجيوب الانفية خاصة في مرضى العوز المناعي (Krishnan *et al*.,2009) . إن عملية الإصابة والتشخيص بالنسبة لداء الرشاشيات في أنواع الطيورتكون معقدة نوعاً ما(Jones and Orosz,2000 ) ولكن تبقى العلامات السريرية والإختبارات الاساسية التي تشمل الزرع واختبارات الدم من الدعائم الرئيسية للتشخيص ،و يتم التشخيص أيضاً بالإختبارات المصلية التي تشمل التحري عن المستضدات والاجسام المضادة ( Cray ,2015 )، فيما يخص التحري عن الاجسام المضادة فإن التطبيق الأول لإختبار (ELISA) للتحري عن الأجسام المضادة في الطيور قد وصف من قبل Redig (Brown and Redig,1994) ، أما الترحيل الكهربائي لبروتينات البلازما فيستخدم في الكشف والتحري عن استجابات المراحل الحادة في أنواع الطيور ( Cray and Tatum,1998).

يعتبر علاج هذا المرض واحداً من أهم التحديات لدى الأطباء المختصين بالطيور (Jenkins,1991)، وفي السنوات الماضية فقد كان المضاد الفطري Voriconazole وهو أحد مشتقات الآزول الذي أُنتج لمعالجة Avian Aspergillosis (Schmidt *et al*.,2007)، الإعطاء الفموي قد تم استبعاده اعتماداً على حقيقة أن نطاق الأمان ضيق أو محدود ، والسمية يمكن أن تستحث عن طريق الإعطاء الجهازي للآزولات وهوما يتطلب الحذر والدقة بموازنة الجرعة المعطاة (Tell *et al*.,2010 ).

## Penicilliosis -2-2-2

إصابة انتهازية ، والمسبب الرئيسي لها هو الفطر*Penicillium marneffei* ، وهو فطر ممرض متوطن قادر على أن يسبب امراضاً فطرية جهازية قاتلة في المرضى المصابين بـHIV ، والمرضى بمراحل متقدمة من الايدز في مناطق جنوب شرق آسيا بحيث يكون معدل الوفيات

عالِ اذا لم يعالج او عندما يتأخر التشخيص والعلاج(Supparatpinyo *et al*.,1993) ومنذ الإصابة الأولى لـ Penicilliosis المنتشر التي سجلت في المريض المصاب بـHIV في تايلند في عام 1988 أصبح هذا المرض الشائع الثالث المعرف لمرضى الأيدز بعد كلاً من Tuberculosis و Cryptococcosis في جنوب تايلند (Supparatpinyo *et al*.,1994) و هناك بضعة أنواع تنتمي لهذا الجنس تكون ممرضة وتسبب Penicilliosis الجهازي في انواع مختلفة من الحيوانات (Aho *et al*.,1990)،و من ضمن الإصابات التي سجلت في الطيور هي إصابة الببغاء بالمرض وكانت الإصابة بفطر *P. chrysogenum* والتي يمكن ان تعتبر إصابة أولية ومن المحتمل انها جاءت عن طريق استنشاق الأبواغ الفطرية أو الهايفات الموجودة في غذاء الطائر اذا لم تخزن بشكل صحيح ، وربما تصبح ملوثة بأنواع مختلفة من الفطريات (Lanteri *et al*.,2011)، و إن الأدلة تشيرإلى تأثير الموسم في اصابات Penicilliosis ،إذ سجلت زيادة في حالات الاصابة خلال الاشهر الممطرة ( Le *et al*.,2011).

الخصائص السريرية للمرض فيها تغايرات كثيرة من حيث الحدة في المريض إذ نلاحظ الحمى والاجهاد وفقدان الوزن والسعال واعتلال العقد اللمفاوية و تضخم الكبد والطحال وبؤر التهابية متميزة ويكون عدد خلايا CD4 عموما أقل من 50 بالمليمتر المكعب الواحد، ومزارع الدم تكون إيجابية بنسبة 88 % من المرضى بينما البؤر الالتهابية تمثل 85 % من المرضى (Wong *et al*.,2001 ; Sirisanthana *et al*.,1998)، ومن المظاهر الأخرى بؤرالتهابية متقرحة مخاطية في الفم (Chiewchanvit *et al*.,1991)، التهاب التامور مع بؤر في الأضلاع والعظام الطويلة والجمجمة والفقرات القطنية والكتف والمنطقة الصدغية (Louthrenoo *et al*.,1994).

يتم التشخيص بعدة طرق منها الفحص المجهري والزرع ،فعند تحضير شرائح لمقاطع نسيجية يظهر الفطرً *P. marneffei* بشكل سبورات داخل خلوية أو خارج خلوية مستديرة او بيضوية في الخزع المأخوذة من البؤر الجلدية ،ونخاع العظم،والعقد اللمفية،والكبد والمسحات الدموية باستخدام صبغات Wright، Wright-Giemsa أو Gomori-Grocott methenamine ونادراً جداً أن تشخص الإصابة مباشرة من القشع،والسائل الجنبي،والسائل الشوكي الدماغي ،والتامور،والبراز،والادرار والسحب من العقد اللمفية(Chan *et al*.,2004)، ، و يستخدم فحص المستضدات البولية وفحص ELISA أيضاً للتحري عن مستضدات *P. marneffei* في الإدرار (Desakorn *et al*.,2002) ، وكذلك التشخيص الجزيئي من خلال

فحص تفاعل السلسلة المتبلمرة PCR يكشف عن الحامض النووي للفطر في عينات الدم أيضا بوصفه طريقة للتشخيص وسجلت حساسية عالية ضمن هذا الفحص ( Vanittanakom *et al*.,2002).

إن العلاج الموصى به هو Amphotericin B بمقدار 3 الى 5 ملغم/كغم وزن الجسم/باليوم حقناً بالوريد لمدة اسبوعين يتبع بـ itraconazole عن طريق الفم 400 ملغم/باليوم لمدة عشرة أسابيع (Sirisanthana *et al*.,1998) و المرضى بحالات المرض المعتدلة يمكن معالجتهم بصورة أولية بـ Itraconazole عن طريق الفم 400 ملغم باليوم لمدة 8 أسابيع ( Supparatpinyo *et al*.,1992) .

**Histoplasmosis -3-2-2**

مرض متوطن والمسبب المرضي له هوالفطر *Histoplasma capsulatum* ، وهو فطر ثنائي الهيئة Dimorphic fungi ، ومن الشائع عزله من الطيور والتربة الغنية بمخلفات الطيور والخفاش والقمامة الرطبة إذ يزدهر فيها نمو هذه الفطريات ،هذا المرض لا يعتبر حيواني المنشأ بصورة حقيقية ،وذلك لأن التربة هي المستودع الأساسي له وليس الطيور ،والإنسان يكتسب الاصابة من خلال استنشاق الأبواغ المحمولة بالهواء و يكون عديم الأعراض في الإنسان، لكن احيانا يمكن ان يلاحظ ايضاً على شكل رئوي حاد شبيه بالانفلونزا ،والشكل المزمن يشبه السل الرئوي ويظهر في الأشخاص فوق 40 سنة من العمر،بينما الشكل المنتشر يظهر في الأشخاص اليافعين، وربما تؤدي في النهاية الى الموت (Dhama *et al*.,2011)، وهناك ضربان تابعة إلى النوع *H. capsulatum* والتي تكون ممرضة للإنسان وهي *H. capsulatum var. capsulatum* و *H. capsulatum var. duboisii* . .

هناك ثلاثة مظاهر مرضية له ، وهي المرض العديم الأعراض الذي يعتبر المظهر الأكثر شيوعاً في الكلاب والإنسان ، والمرض التنفسي الذي ممكن أن يسبب معظم الأعراض التنفسية ، والثالث المرض المنتشر الذي يؤثر في عدة أعضاء ، ليس فقط الجهاز التنفسي والعقد اللمفاوية التابعة له، بل يشمل الكبد ،والطحال ،والامعاء الدقيقة ونخاع العظم (Murata *et al*. 2007)، والمرض المنتشر يظهر في المرضى المثبطين مناعياً وهوأكثر ظهوراً في المرضى المصابين بـ HIV، و من الممكن أيضاً ان يظهر في المرضى بعد عملية زراعة الأعضاء أو المرضى الذين يتعاطون علاج Corticosteroid (Daher *et al*.,2007; Vail *et al*.,2002).

يتواجد الفطر في البيئة بهيئة الشكل الخيطي ،بينما في المضيف فإنه يتواجد بشكل الخميرة(Nosanchuk and Gacser,2008)، ومن الشائع أن يكون التعرض للاصابة عندما تصبح أبواغ هذا الفطرمحمولة بالهواء ومن ثم تستنشق (Green ,2012).

إن اشكالية تشخيص المرض تكون بسبب أن معدل النتائج الايجابية للزرع يكون منخفضاً والفطر يأخذ وقتاً لبضعة أسابيع لكي ينمو على الاوساط الزرعية ، وله متطلبات خاصة في عملية الزرع على الأوساط ، وقد استخدمت طريقة التحري عن المستضدات لهذا الفطر (Hage and Wheat,2010)،و التشخيص يتطلب الزرع لتمييز الكائن الدقيق المسبب، وفحص الإمراضية النسيجية يكشف التكاثر الزائد في الخلايا البطانية الداخلية الشبكية المحتوية على الاشكال الخميرية،أما صبغات Methenamine silver أو periodic-acid schiffوإختبار حساسية histoplasmin تكون مفيدة للتحري أيضا ، واختبارات التشخيص التقليدية مثل اختبار تثبيت المتمم (CFT)وهو اختبار مناعي يستخدم للتحري عن الأجسام المضادة والمستضدات في مصل المرضى والإنتشار المناعي يستخدم جنباً الى جنب مع الفحوص المناعية السريرية التي تستخدم المستضدات المتميزة ، مثل الفحوص المناعية الانزيمية لتعطي نتائج اكثر تأكيداً.ومؤخراً استخدم PCR تفاعل السلسلة المتبلمرة الذي يستهدف معقد مورث Ribosomal RNA و Real-Time PCR الذي يستهدف M specific protein استخدم لتشخيص *H.capsulatum* (Dhama *et al*.,2011;Highland *et al*.,2011).

وفي معظم الأفراد الكفوئين مناعياً لا يحتاج أي علاج ، وتستخدم المضادات الفطرية لمعالجة الحالات الحادة لإصابة histoplasmosis الحاد ،وكل الحالات للمرض المزمن والمنتشر .المعالجة النموذجية للمرض الحاد تتضمن أولاً إعطاء Amphotericin B ويتبع بـ Itraconazole عن طريق الفم (Wheat *et al*.,2007)، والنظافة الجيدة وممارسة التطهير ضرورية لمنع المرض من الإنتشار عن طريق الطيور ولمنع إنتقالها إلى الإنسان ( Jacob *et al*.,2011).

## Mucormycosis -4-2-2

إصابة انتهازية نادرة تمثل الثالثة من بين الإصابات الفطرية الاجتياحية بعد Candidiasis و Aspergillosis إذ تعتبر من أهم المشاكل الطبية المعقدة في مرضى العوز المناعي (Torres-Narbona *et al*.,2007)، والفطريات المسببة له هي تلك التي تنتمي إلى الرتبة

Mucorales والعائلة Mucoraceae إذ ان *Rhizopus sp., Mucor sp.* هما الفطران الرئيسيان المسببان للمرض بما يقارب 70-80 % من الحالات بينما *Cunninghamella sp., Apophysomyces sp., Saksenaea sp., Rhizomucor sp.,Actinomucor sp. Syncephalastrum sp.* تكون مسؤولة عن 1-5 % من الحالات
(Ribes *et al.*,2000 ; Gomes *et al.*,2011) و هذا المرض كان قد سجل في الطيور البرية والمنزلية ومنها طيور الزينة ، والحبوب الرطبة تكون سبباً بإنتشار المرض في مجاميع الكناري (*Serinus canarius*) مسببةً مشاكل صحية في القناة الهضمية ( Refai *et al.*,2016).

والمظاهر السريرية للمرض متغيرة تعتمد بصورة كبيرة على درجة اعتلال المريض والحالة المناعية ومن الأشكال الشائعة للمرض هي الأنفي المحجري المخي،والرئوي،والجلدي،والمعدي المعوي،والمرض المنتشر، وتكون الحالة الاولى هي السائدة ضمن المرضى بداء السكري والرئوي ضمن المرضى بسرطان الدم ومرضى زرع الأعضاء والخاصية التقليدية لهذا المرض هي الغزوالوعائي الذي يقود الى التخثر أو الجلطة مع تنخر للأنسجة ( Sun and Singh,2011) والفطريات المسببة للمرض تمتلك أنزيماً يدعى ketone reductase الذي يسمح للفطر بالنمو وبصورة سريعة في الوسط الحامضي في البيئة التي فيها فرط سكر الدم ، وعلى أية حال فإن الوسط الحامضي وفرط سكر الدم مثل diabetic ketoacidosis تسمح بالنمو، والحديد عامل آخر يزيد النمو والامراضية خصوصا في المرضى الذين يتناولون deferoxamine إذ ان الفطريات تحتوي على حامل جانبي والذي يزيد من أخذ الحديد وهو ما يحفزعلى غزو النسيج ، ويكون هؤلاء المرضى في خطر كبير للإصابة بالمرض (Long and Koyfman,2015)، افراز البروتييز ربما يساهم في عملية غزو سهلة لأنسجة المضيف ، وزيادة الضرر للمضيف لم يعرف كثيرا عنه بعد باستثناء بعض المظاهر من Mucoromycosis التي تمتلك عدداً كبيراً من الجينات التي تشفر للأنزيمات الحالة اكثر من الممرضات الفطرية الأخرى (Morace and Borghi,2012)،ويكون دفاع المضيف ضد أجناس Mucorales هو من خلال الملتهمات التي تثبط انبات الأبواغ والعدلات التي تستخدم oxidative burst لقتل الخيوط الفطرية ، ولذلك المرضى الذين لديهم امراض تؤثر في وظيفة هذين النوعين من الخلايا سوف يكون في خطر التعرض للإصابة (Ribes *et al.*,2000).

للتشخيص يجب اثبات الإصابة الفطرية الاجتياحية وهذا يتطلب الكشف عن تواجد الفطر في التحليل النسيجي أو زرع العينة النسيجية المأخوذة من موضع المرض

( De Pauw *et al*.,2008)، التقنيات الإشعاعية التقليدية غير حاسمة في تشخيص المرض في الحالة الرئوية وعلى العكس من ذلك فإن استخدام الدقة العالية في التصوير المقطعي computed tomography(CT) والرنين المغناطيسي يمكن ان يكون مفيداً في تشخيص حالة الأنفي المحجري المخي ،الرئوي والمرض المنتشر(Severo *et al*.,2010) ، الفحوصات الجزيئية طورت مؤخرا للتعرف على المرض مباشرة من نماذج الأنسجة إذ تعطى الأولوية للنسيج الطري أكثر من النسيج المغطى بالشمع بسبب أن الفورمالين يحطم DNA ( Dannaoui *et al*.,2010 )، وفي حالة الطيورفإن التشخيص يتطلب فحص الخزعة للنسيج المصاب (Dahlhausen,2006).

لعلاج المرض تستخدم المضادات الفطرية الفعالة ضد أفراد Mucorales ومن هذه المضادات هي (AmB-D) Amphotericin B deoxycholate ومشتقاته الدهنية مثل Liposomal AmphotericinB L-وAmphotericin B Lipid Complex (ABLC) (AmB) Petrikkos,2009)،ويعد (PCZ) Posaconazole وهو مضاد فطري من الازولات الثلاثية والذي يعطى عن طريق الفم أيضاً له فعالية ضد افراد Mucorales (Nagappan and Deresinski ,2007 )ويعتقد بأنه أكثر فعالية من Voriconazole وهو المضاد الفطري الآخر الواسع الطيف ضمن هذه المجموعة واللجوء إلى الدمج باستخدام هذه المضادات يزيد الألفة للموقع المستهدف ويعزز الإختراق الخلوي لها(Chau *et al*.,2006).

## Cryptococcosis -5-2-2

يعد واحداً من أهم الإصابات الفطرية الجهازية الجلدية وسجل في العديد من بلدان العالم (Kulkarni *et al*., 2012) وهذا المرض يسببه الجنس *Cryptococcus* الذي يتكون من 37 نوعا منها النوعان *C. neoformans* and *C. gattii* اللذان يعتبران اكثر امراضية وهما مسؤولان عن معظم الحالات من Cryptococcosis وتظهر مختلف رتب الطيور ترابطاً بيئياً مع *Cryptococcus* والقابلية على نقل الإصابة الى الإنسان إذ ان الخميرة *C. neoformans* وهي المسبب الرئيسي للمرض،و يكون متواجداً بصورة غزيرة في براز الطيور، ومن هنا فإن الطيور مستودع رئيسي للإصابة بهذا المرض Chowdhary *et al*.,2012) (Cafarchia *et al* 2006; Pal, 2014;)،و من الناحية السريرية فإن المرض له مظاهر متعددة ومن اهمها

الإصابة الرئوية إذ تعتبر القناة التنفسية الممر المهم لدخول هذه الخميرة ومظاهرها تتراوح من استعمار الممرات الهوائية العديم الأعراض أو عقيدات رئوية بسيطة تظهر بالفحص الشعاعي للصدر إلى التهاب رئوي يهدد الحياة مع وجود متلازمة ضيق التنفس الحادة ، (Brizendine *et al.*,2011) .

عند إصابة الجهاز العصبي المركزي فإن المظاهر السريرية له لا تعد ولا تحصى من العلامات والأعراض مثل الصداع ،والحمى،واعتلال أعصاب الجمجمة،و نعاس، فقدان الذاكرة وعلامات تهيج السحايا وبالرغم من ان حدة المرض تعتمد مبدئيا على مناعة المضيف فأن أنواع أو سلالات *Cryptococcus* تنتج مظاهر سريرية فريدة من نوعها وعلى سبيل المثال فإنه وفي بعض المناطق من العالم لوحظ ان *C. gattii* يسبب cerebral cryptococcomas أو obstructive hydrocephalus مع كتل رئوية اكثر من *C. neoformans* أو من دونها (Phillips *et al*.,2015;Perfect,2015).

أما إصابة الجلد فأنها ضمن المظاهر السريرية الشائعة لهذا المرض، ويمكن ان تكون هناك انواع مختلفة من البؤر الجلدية في المرضى وهذه تكون غير متميزة عن البؤر التابعة لإصابات أخرى ، ولذلك تكون خزعة الجلد مع الزرع وفحص الامراضية النسيجية ضرورية للتشخيص النهائي (Christianson *et al*.,2003).

يمتلك العقار Tacrolimus فعالية مضادة لـ*Cryptococcus* في درجات الحرارة العالية لكنه يفقد خاصية وصفه مضاداً فطريا في حال انخفضت درجة الحرارة في البيئة وهذا ما يوضح الزيادة المتكررة للبؤر الجلدية في المرضى الذين يتناولون مثبطات calcineurin (Odom *et al*.,2007).

يتم التشخيص بعدة طرق منها الفحص المباشر وهي الطريقة الأفضل والأسرع والأكثر استخداماً بالفحص المجهري المباشر للخمائر المغلفة بواسطة التصبيغ بالحبر الهندي إذ يمكن ان يرى *Cryptococcus* بشكل خلايا خميرية مغلفة كروية مع براعم حجمها يتراوح بين 5-20 مايكرون بالقطرأو من دونها، والزرع هو الطريقة الاخرى بحيث يمكن ان يتم بسهولة من خلال اخذ عينات من البصاق او خزع الجلد وزرعها على الأوساط التقليدية لتظهر المستعمرات بعد 48-72 ساعة بعد حضنها بدرجة حرارة 30-35 م وتظهر بشكل مستعمرات بيضاء الى كريمية وممكن ان تتحول الى برتقالية او بنية بعد الحضن المطول، والطريقة الاخرى هي الطرق الخلوية وفحص الامراضية النسيجية إذ من الممكن تمييز الفطر بواسطة تصبيغ الانسجة

المـأخوذة مـن الرئـة ،والجلـد،ونخاع العظم،والـدماغ وبقيـة الاعضـاء Maziarz and (Perfect,2016).

لمعالجـة المرض تستخدم المضـادات الفطريـة الثلاثـة Amphotericin B ومشتقاته ،-5 Fluorocytosine (5FC) و Fluconazole بصـورة منفـردة او بشكل مجموعـة مترابطـة ويقسم العلاج الـى ثلاثـة مراحل وهـي العلاج الأولـي بالمضـاد الفطـري Amphotericin B وهو كابح للفطريات تتبع بالعلاج التدعيمي لمدة 8 أسابيع ، ويتبع بالفلوكونازول لمدة تستمر من 6-12 شهرا أو حتى استعادة مناعة المضيف (Perfect *et al*., 2010).

## Candidiasis -6-2-2

إصابة فطرية إنتهازية يظهر بصورة عرضية يصيب الطيور، وسجل أيضاً بوصفه إصابةً معوية تصيب العديد من الطيور البرية عند وضعها في الأسر، وهي اصابة منتشرة في الطبيعة وتتفشى عند عدم اتباع القواعد الصحية السليمة (Mugale *et al*.,2015) .

المسـبب المرضـي هـو *Candida albicans* وهـي خميـرة أشـبه بـالفطر ، وهـو ممرض شائع موجود بالبيئة وهو متوطن بصورة طبيعية في غذاء الطيور، ولـوحظ أيضـاً فـي الدجاج والحمام و الطيور الاخرى(Moretti *et al*. 2000 ) ومن الطيور الاكثر عرضـة للاصـابة هو طير الحب *Melopsittacus undulates* يليـه الحمام والطيور الاخـرى (Velasco ,2000 )،وأن ابـتلاع الغـذاء الملـوث وشـرب المـاء الملوث هي من الوسائل الطبيعية لانتقال المرض ، ايضـا البيئـة الملوثـة بفضـلات الانسـان تعتبر مصدراً رئيسياً لتعرض الطيور لجنس *Candida* وتكون الطيور الفتيـة هـي الأكثر عرضـة للإصـابة Kunkle, ; Mugale *et al*.,2015) (2003.

بالرغم من ان انواع *Candida* موجودة بصورة طبيعية ضمن القناة الهضمية للطيور ،فإن النمو الفطري والمرض ممكن أن يظهر في المرضى مع بعض عوامل الخطر التـي يمكــن أن تكــبح جهــاز المناعــة التــي تشــمل ســوء التغذيــة ،نقــص فيتــامين D (Lee *et al*.,2016).

إن الطيور المصابة تظهر نمواً بطيئاً ، وخمولاً ، فقدان الشهية ،والاسهال ،والجفاف وتحدث الوفاة في الطيور ذات الاصابات الحادة، ويمكن ان تلاحظ البؤر في مناطق محدودة للجزء العلوي من القناة الهضمية إذ تتكاثر الفطريات لتشكل خيوط فطرية كاذبة على سطح القناة الهضمية العليا ، وهذا يسبب تضخم مع تكوين غشاء كاذب تظهر بشكل واضح بحيث تشبه الجبن في الحوصلة (Dhama *et al*., 2013).

تشخيص الإصابة يكون من خلال معرفة العلامات السريرية ، ورؤية البؤر وكذلك من خلال الزرع للفطر الممرض ، إن ظهور *Candida* في المزارع او صبغة كرام ليس كافيا بسبب تواجده الطبيعي في الطيور السليمة أيضاً ، ولذلك ملاحظة البؤر في الحوصلة واستخدام الخزعة من الحوصلة والقناة الهضمية العليا تعتبردليلاً مهماً لوجود المرض، كذلك تمييز براعم الخميرة من خلال صبغة كرام التي تجمع من البؤرالمشكوك بها يساهم في تأكيد التشخيص (Velasco ,2000).

لعلاج الإصابة تستخدم المضادات الفطرية مثل النستاتين ، والآزولات (Fluconazole أو Itraconazole ) وAmphotericin B ، و يضاف Nystatin او كبريتات النحاس أيضاً الى غذاء الطيور لمدة من 7-10 ايام كذلك يضاف الكلورين الى ماء الشرب 5 جزء بالمليون إذ يكون فعالاً بشكل كبير (Dhama *et al*.,2013).

## 2-3- بعض الأجناس الفطرية المسببة للأمراض الفطرية لطيورالزينة

### 2-3-1- الجنس *Aspergillus*

يعتبر هذا الفطر من الأعفان التي تتكون من هايفات مقسمة عبارة عن تراكيب انبوبية متفرعة من 2-10 مايكرون، وعندما يبدأ النمو تشكل الهايفات مع بعضها الغزل الفطري والذي يتكون من هايفات سطحية تكون على السطح تدعى بالغزل الفطري الهوائي وهذه التراكيب تنتج الحوامل الكونيدية (Jordan and Pattison ,1997 ) .

ينتمي هذا الجنس الى مملكة الفطريات Fungi kingdom شعبة الفطريات الكيسية Ascomycota صنف Eurotiomycetes رتبة Eurotiales عائلة Trichocomaceae (Geiser *et al*.,2006).

يعتبر النوع *A.fumigatus* هو المسؤول عن إصابة الـ Aspergillosis في كلّ من الدواجن والانسان ويكون مسؤولاً أيضاً عن أكثرمن 95% من حالات الإصابات في الطيور( Olias *et al*.,2010;Hashempour *et al*., 2011)، والأنواع الأخرى من الجنس مثل *A.flavus*،*A.niger* و*A.nidulans* هي الأخرى تسبب نفس الإصابة بالاضافة إلى مسؤوليتها عن التسمم الفطري (aflatoxicosis) في الدواجن (Beernaert *et al*., 2009 )، وإن الاصابة بالـ *Aspergillus* أيضاً وجدت في أنواع إخرى من الطيورمثل الطيور الجارحة، البطاريق والببغاء (Alvarez-Perez *et al*.,2010).

لقد قدر بحوالي 5 مليون شخص يعانون من التعرض للافلاتوكسين الذي ينتجه هذا الجنس على مستوى العالم ، وتكلفة الاجراءات الوقائية هي ضرورية لتخفيض مخاطر الافلاتوكسين الذي يسبب امراض الإنسان أو الحيوان (Khlangwiset and Wu,2010) إذ ان الفطريات تكون مستعمراتها في الحبوب في الحقل خلال الزراعة ، وتستمر خلال عملية الخزن وعندها ربما تنتج السموم (Waliyar *et al*., 2015)، وهذه الفطريات تنتج ايضيات اخرى مثل ochratoxinsو oxalic acid التي تكون خطيرة على الإنسان(Palencia *et al*., 2010) وزيادة تركيز أبواغ أنواع الفطر *Aspergillus* في البيئة تجعل الطيور عرضة للأصابة بمرض Aspergillosis حيث ان البيئة الدافئة ،الرطوبة ، التهوية القليلة وخزن الأغذية ضمن مدى طويل ربما يزيد كمية الابواغ في الهواء، وأن تعرض الطيور لأنواع الاسبرجلس ربما يحدث اختلافات تشريحية ، فسلجية ومناعية للجهاز التنفسي (Tell, ; Khosravi *et al*., 2008 2005).

## 2-3-2- الجنس *Penicillium*

ينتمي الى مملكة الفطريات شعبة الفطريات الكيسية Ascomycota صنف Eurotiomycetes رتبة Eurotiales عائلة Trichocomaceae Houbraken and Samson, 2011 ).

يتكون الغزل الفطري من خيوط شفافة عادة مقسمة متعددة النوى متفرعة بشكل كبير يشبه الشبكة وهناك عدة حوامل كونيدية متفرعة من الغزل الفطري ، وهذه الحوامل تحمل وبصورة فردية ابواغاً كونيدية التي يكون لها دور كبير في انتشار الفطريات، وتكون ألوانها منها الأخضر ،الأزرق .....، أنواع البنسليوم متواجدة في كل مكان من التربة وتفضل المناخات المعتدلة

والبـاردة ، وتتواجـد بصـورة شـائعة أينمـا وجـدت المـواد العضـوية ، والانـواع المترممـة مـن *Penicillium* و*Aspergillus* هـي مـن بـين أهـم الانـواع المعروفـة التـي تنتمـي إلـى رتبـة Eurotiales والتي تعيش بصورة رئيسة على المواد العضوية المتحللة ، إذ تكون من الاسباب الرئيسة لتلوث الغذاء خاصة الانواع التابعة للـ *Penicillium* (Samson *et al*.,2004)،وقدرة هذه الأنواع من جنس البنسليوم بالنمو على البذور والأغذية المخزونة الأخرى تعتمد على ميلها للازدهار في نسبة رطوبة منخفضة وتكوين المستعمرات السريع بواسطة الانتشار الهوائي، وتكون الرطوبة كافية في هذه البذور لكي تنمو هذه الأنواع (Pitt *et al*.,2000 )، وأفراد هـذا الجـنس ذات أهميـة تجاريـة وصـناعية بسـبب اسـتخدامها فـي انتـاج المضـادات الحياتيـة ،ومضـــادات الاورام،ومضـــادات الفطريات،ومضـــادات الحشـــرات،ومركبات مضـــادة للفايروسات،فضـلاً عن الإنزيمـات خـارج خلويـة (Frisvad and Samson,2004) ، وبعض الأنواع تستخدم بشكل واسع في الصناعة مثل منتج البنسلين *P. rubens*،و هنـاك نوعـان من بادئات الاجبان *P. camembertia*nd, *P. roqueforti* ، والعفن المستخدم في تخمر النقانق *p. nalgiovense* (Bernaldez *et al*., 2013).

ويمتاز هذا الفطر بإنتاجه سموم Ochratoxin A (OTA) ،وبوجه الخصوص النوعان *P. verrucosum*و *P. nordicum* المعروفان والمسجلان بأنهما ينتجان هذه السموم، على الرغم من بعض التقارير التي تشير الى الأنواع الاخرى بإمكانية إنتاجه (Frisvad and Samson,2004)، وبالإضافة الى أهميته الاقتصادية فإن الـ *Penicillium* يعطي نموذجاً جيداً لفهم العمليات الوراثية والجينية ضمن التكيف ، بسبب تعدد مواطنه البيئية ،وصغر حجم مورثاته، ،وزمن التكاثر القصير وسهولة التعامل معه في المختبرولذلك فأنه يعتبر المفتاح لفهم التحديات في علم الأحياء التطوري ، والذي يشمل التعريف بالمورثات ذات الصلة بالبيئة اضافة الى فهم الطبيعة واسلوب البناء بالتغيرات الجينية التي تتضمن أصل التجمعات السكانية المتكيفة والتنوع(Gladieux *et al*., 2014) ، فقط بضعة أنواع التي تنتمي الى الجنس *Penicillium* تعتبر ممرضات تسبب مرض penicilliosis الجهازي في مختلف أنواع الحيوانات ومنها الطيور والاصابة هي موضعية او مركزية ومن النادر أن تصبح جهازية ومن بين هذه الأنواع *P. chrysogenum* (Lanteri *et al*.,2011).

## 2-3-3- الجنس *Mucor*

ينتمي هذا الفطر إلى شعبة Zygomycota صنف Zygomycetes رتبة Mucorales عائلة Mucoraceae جنس *Mucor* (White *et al*.,2006)

من الممرضات المتواجدة بشكل واسع في الطبيعة،الغذاء،والتربة والهواء (Nagao *et al*.,2005 ) وتعتبر من الممرضات المهمة للإنسان والحيوان وهو المسؤول عن إصابة الـ Mucormycosis والذي كان يطلق عليه سابقاً Zygomycosis وأفراد هذه الرتبة لوحظ وبشكل كبير ومتزايد بأنها ممرضات انتهازية في مرضى العوز المناعي ، و المثبطين مناعيا (Neto *et al*.,2014; Royer and Puechal ,2014) ولقد عزل Quesada *et al*. (2007) *الفطر Mucor ramosissimus* مصحوباً مع حالة فقدان الريش في الكناري *Serinus canarius* ووجد كميات كبيرة من أبواغ الفطر في الطبقة المتقرنة من البشرة وأيضاً ضمن جريبات الريش وكانت هذه اول حالة تم التعرف عليها لحالة فقدان الريش المترافقة مع هذا الفطر، وليس فقط في الكناري بل في كل الطيور، وافراد رتبة *Mucorales* من بين الأنواع السائدة التي تغزو مختلف المواد ومنها المواد الغذائية إذ انها تمتاز بإنتاج الانزيمات المحللة للدهون فضلاً عن الانزيمات الاخرى (Ghorbel *et al*. 2005) حيث استخدمت هذه الخاصية في عدة بلدان من آسيا وأفريقيا في تخمر المواد الغذائية بالاعتماد على الصويا والمنتجات الزراعية الاخرى الغنية بالدهون و هذه الانواع أيضاً تسبب تلوث الغذاء ولا سيما كعكة الصويا التي تستخدم ضمن الغذاء التقليدي في آسيا (Kim *et al*. 2011).

ويعتبر جنس *Mucor* الأكثر صلة بالحالات السريرية من رتبة Mucorales والأنواع الأكثر تردداً في إصابات الإنسان هي *Mucor circinelloides* , *Mucor indicus* , *Mucor ramosissimus* , *Mucor racemosus* (Alvarez *et al*.,2009) ويعد جنس *Mucor* من بين الأجناس الذي يضم انواعاً أكثر و من المعروف أنها تتحول الى الشكل الاحادي الخلية في البيئات المتحورة وهذه الانواع تشمل *M. rouxii*, *M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M* genevensis, *M. pusilus*,. و *M. racemosus* إذ إن بعض أنواع *Mucor* تظهر فيها الهيئة الثنائية أستجابة لكلّ من مصدر الكاربون الموجود في البيئة ومستوى الأوكسجين في البيئة ويمكن أن تنمو هذه الانواع بأعتبارها خميرةً فقط ، عندما يوجد الهكسوز المتخمر، وبالاضافة إلى ذلك النمو الخميري يكون مفضل في الظروف اللاهوائية بينما تحفز البيئة الغنية بالأوكسجين النمو الخيطي (Ghomade *et al*., 2012 ;Wolff *et al*., 2002)

،والغزل الفطري يكون غير مقسم (مدمج خلوي) أو مقسماً بشكل غير منتظم،الأبواغ الحافظية تنتج في الحوافظ البوغية المتعددة وهذه الحوافظ البوغية متميزة بأنها تتضمن columella مختلفة الاشكال (Hoffmann *et al*.,2013).

إن الأنواع التابعة لجنس *Mucor* تتكاثر بالطريقتين الجنسية واللاجنسية إذ إن السبورات الحافظية اللاجنسية تتشكل في تركيب يدعى الحافظة البوغية في قمة حامل الحافظة البوغية، وهذه الأبواغ تنتشر، وفي الظروف الملائمة تنبت لتنتج غزلاً فطرياً معقداً وتكون معظم أفراد رتبة Mucorales الممرضة هي متغايرة الثالوس وتكاثرها الجنسي يتم عن طريق اثنين من الهايفات الحساسة الواحدة للأخرى وبأنماط تزاوج مختلفة (+ و -) تعاني الانشطار لتكون الابواغ اللاقحية ، والتي فيما بعد تنبت لتكون الحافظة البوغية وتكوين الابواغ اللاقحية يتطلب نمطين متممين للتزاوج ويتطلب وقتاً لكي تنبت الأبواغ اللاقحية (Lee *et al*., 2010).

## 2-3-4- الجنس *Alternaria*

*جنس* كبير ومعقد جداً يحتوي على مئات الأنواع ، ويصعب تقدير العدد بسبب كثرة التسميات ، ومعظم الأنواع هي مترممة بصورة شائعة في التربة والهواء ، وبعضها يكون محللاً للمواد العضوية بينما تكون أنواع أخرى ممرضة للنبات ( Pastor and Guarro, 2008; De Hoog *et al.*, 2000 ) و ينتمي هذا الفطر الى مملكة الفطرياتFungi Kingdom تحت المملكة Eumycotera شعبة الفطريات الناقصةDeuteromycota صنف Hypomycetes رتبة Moniliales عائلة Dematiaceae (Thomma,2003)، ويعتاش على النباتات وهو واحد من الفطريات الناقصة ، و من أهم الفطريات المثيرة للحساسية ويكون الغزل الفطري بني اللون مقسماً يأخذ بالارتفاع إلى حوامل كونيدية بسيطة او منعزلة ربما تنتج ابواغاً قمية وحيدة أو سلسلة من الأبواغ ، وهذه تختلف في الشكل ،والحجم، والنسيج ،واللون،وعدد الخلايا،وسمك جدار الخلية(Vijay and Kurup,2004).

وتمييز انواع *Alternaria* بإعتمادها على المعايير المظهرية فحسب ولاسيما حجم وشكل الكونيدات و وجود أو غياب السلاسل الكونيدية و يعتبر الزرع اساسياً للتشخيص الصحيح لهذه الانواع التي تنمو على الأوساط الزرعية التقليدية على الرغم من ان الانواع السريرية المهمة تفقد بسرعة قابليتها على تكوين الأبواغ(Pastor and Guarro, 2008) ،و أنواع *Alternaria* عادة تكون مترافقة مع الالتهابات الرئوية ، والتي يكون فيها فرط الحساسية ،والربو القصبي،والتهاب الجيوب الأنفية التحسسي وإلتهاب الأنف ( Chowdhary *et al.*,

(2012 ،وتكون السبورات محمولة في الهواء و توجد أيضاً في التربة والماء بالإضافة إلى الأماكن المغلقة، وهي أما أن تكون مفردة أو تشكل سلاسل طويلة ويمكنها ان تنشأ مستعمرات سميكة عادة تكون خضراء،أوسوداء أو رصاصية (Nowicki,2012).

وهناك خاصيتان تتميز بهما أنواع *Alternaria* ، وهي إنتاج الميلانين لاسيما في الأبواغ وإنتاج السموم المتخصصة بالمضيف، وهذا في حالة الأنواع الممرضة(Thomma,2003) ، ضمن الدراسات التي أجريت تبين أن جنس *Alternaria* هو من الأعفان الرئيسة المتواجدة في الحبوب والتي تعتبر غذاءاً رئيساً للطيور ويأتي بعد جنس *Aspergillus* و *Penicillium* من حيث نسبة التواجد حيث ان الفطر السائد هو *Aspergillus* وهذه الفطريات تنتج السموم الفطرية وهوما يتسبب عنه مشاكل صحية كثيرة وتم عزل هذه الاجناس من الحبوب مثل الذرة والرز (Hashem,1996).

## 2-4- عوامل الضراوة Virulence factors

الفطريات قادرة على إحداث المرض وإختراق الأنظمة الدفاعية للمضيف بسبب امتلاكها بضعة عوامل مترافقة مع امراضيتها تدعى عوامل الضراوة و أذى المضيف يمكن ان ينتج من الفعاليات الميكروبية،والاستجابة المناعية للمضيف أو كليهما ، ويحدث المرض عندما يتداخل اذى المضيف مع حالة الاتزان الداخلي إذ ان الأذى الذي يحدث للمضيف هو ناتج من تفاعل الفطر مع المضيف والذي يقود إلى تحطم الانسجة واستعمارها.

وهناك ثلاثة أمور يجب اخذها بنظر الاعتبار هي :

1. الامراض الميكروبية التي تنتج من كيانين،المضيف والممرض.

2. أذى المضيف هو ذو صلة بتداخل المضيف-الممرض.

3. أذى المضيف يمكن ان ينتج من الفعل المباشر للعوامل الميكروبية،أوالاستجابة المناعية،أو كليهما (Casadevall and Pirofski, 2003; Casadevall and Pirofski, 1999; Tomee and Kauffman, 2000)، وعوامل الضراوة يجب ان تساعد الممرض على النمو في درجات الحرارة المرتفعة،وتسهل الالتصاق،والاختراق والانتشار،او تساعده بالمقاومة ضد الدفاعات المناعية الطبيعية ومثالها البلعمة الخلوية،قدرة الفطر على النمو في درجة حرارة 37 م ودرجات الحامضية الفسلجية هو عامل ضراوة للفطريات التي تغزو الأنسجة العميقة،والتحول الى الشكل المتطفل هو ضروري لإمراضية الفطر ثنائي الهيئة وبعض انواع عوامل الضراوة

متطلبة لكل الممرضات مثل القدرة على التعرف والالتصاق بانسجة المضيف،والاستجابة السريعة للتغيرات في البيئة الخارجية وإفراز انزيمات التحلل، وهذه كلها مهمة بالضراوة (Khan *et al*.,2010).

وهناك عوامل ضراوة متعددة للعديد من الفطريات ومنها فطر *Aspergillus* إذ يكون قادراً على انتاج الميلانين وهذا يعزى الى وجود صبغة في جدار الخلية تدعى DHN-melanin التي تتكون بمشاركة منتجات انزيمية لستة جينات ووظيفة الميلانين هي الحماية من الاشعة فوق البنفسجية،الانزيمات المحللة ودرجات الحرارة القصوى ( Rementeria *et al*., 2005; Latgé, 2001)،كما يفرز أيضا العديد من الانزيمات المحللة مثل serine and aspartic protease, metalloproteinase, dipeptydylpeptidases, phospholipases تساهم بالضراوة الفطرية وتسهل عملية استعمار الرئة والانسجة الاخرى و هناك ارتباط وثيق بين فعالية phospholipase وشدة الاصابة ، وهناك انزيمات تحلل اخرى منتجة من *A. fumigatus* وتشمل nucleases و phosphatases (Tomee and Kauffman,2000; Karkowska-Kuleta *et al*.,2009 كذلك (Alp and Arikan, 2008; السموم مثل Aflatoxin وهوالسم الأكثر شهرة المنتج من *A. fumigatus* والذي له خصائص سمية كبدية ومسرطنة ومن المحتمل انه لا ينتج في الانسان خلال الإصابة ، وذلك بسبب أن تعبيره منظم من قبل عدة جينات تحت تأثير معقد من الظروف البيئية، وGliotoxin الذي يثبط البلعمة الخلوية للخلايا البلعمية الكبيرة و ينشط T-cell ويستطيع أن يحفز الموت المبرمج للخلايا البلعمية و يكون مسؤولاً عن إبطاء ضربات اهداب القناة التنفسية وتحطيم الطبقة الطلائية ، ولذلك الخلايا الفطرية لا يمكن ان تزال بكفاءة من الكائن المضيف (Rementeria *et al*., 2005; Hogan *et al*., 1996; Tomee and Kauffman, 2000)، الفطريات الجلدية تفرز العديد من انزيمات الضراوة التي لها تخصصات مختلفة مثل Proteases وLipases وCellulases أيضا تفرزالعديد من الإنزيمات لتحصل على المواد المغذية لتتطور ولتبقى على قيد الحياة والجزيئات الكبيرة الموجودة في انسجة المضيف تستخدم كمصدر للكاربون،والنتروجين،والفسفور،والكبريت للفطريات الجلدية ومن بين الانزيمات ذات التنوع الواسع المفرزة من قبل الفطريات الجلدية انزيمات البروتييز وهي الاكثر دراسة وهي من الأنواع الرئيسة لعوامل الضراوة المنتجة من قبل الفطريات الجلدية التي تستخدم لغزووإستخدام الطبقة القرنية للمضيف (Liu *et al*.,2014; Chinnapun,2015 ; Peres *et al*.,2010).

خاصية الشكل الثنائي تمثل قدرة الفطريات الممرضة على تغيير شكلها خلال دورة حياتها وهي واسعة الانتشار وعلى اية حال فإن بضعة فطريات نسبياً تعتبر ثنائية الشكل والتي تدل على قدرتها على التغيير بين مظهرين الخميري والخيطي ، وهذه الممرضات يمكن أن تقسم الى حرارية(تغيير المظهر يحفز بالحرارة) وفطريات ثنائية الشكل غير حرارية ويعتبر التغيير المظهري بين الخيوط الفطرية والشكل الخميري ضرورياً للإمراضية والضراوة ، ودورة حياة الفطريات ثنائية الشكل في التربة (22-25)م ،الفطريات الثنائية الشكل الحرارية تنمو بوصفها غزلاً فطرياً والتي تنتج كونيدات معدية (مثال الابواغ) ويتبع مرحلة التربة الرذاذ الكونيدي وقطع الهايفات عملية الاستنشاق من قبل رئات اللبائن المضيفة(37)م لتتحول الى الشكل الخميري لتسبب ذات الرئة وبالرغم من ان الحرارة هي المحفز الرئيس ، فأن هناك عوامل اخرى مثل $CO_2$، cysteine, estradiol تؤثر في عملية التحويل والنمو في درجة حرارة 37 م (Gauthier and Klein,2008; Gauthier ,2015)، وجود او عدم وجود الاوكسجين يعتبر من المحفزات التي تؤثر في تغيير الشكل المظهري للفطريات الثنائية الشكل غير الحرارية فمثلا انواع الجنس *Mucor* تنمو بإعتبارها خمائر تحت الظروف اللاهوائية وبشكل خيوط عند توفر الأوكسجين(مثال النسيج) (Lee *et al*.,2013 )، والكونيدات الصغيرة الحجم للفطريات الثنائية الشكل الحرارية يمكن ان تعبر دفاعات الرئة التركيبية مثل الخلايا الطلائية المهدبة وتدخل القناة التنفسية السفلى وفي الحال وهي في الرئة تتحد مع الخلايا المناعية بواسطة مستقبلات اللكتين والمانوزويتم بلعمتها لتنبت وتتضاعف داخل الخلايا بوصفها خميرةً متبرعمة وتشكيل المستنسخات ربما يسهل التكيف السريع للكونيدات التي تنبت بوصفها خميرة داخل المضيف ، وكونيدات *Histoplasma capsulatum* تكون غنية بالمستنسخات التي تشارك في اجهاد المقاومة،وتضاعف DNA،الاشارات الخلوية وتنظيم الاستنساخ ( Inglis *et al*.,2013)، تساهم الهايفات في الامراضية إذ ان نمو الهايفات بالاضافة الى تكوين الكونيدات يسمح بالبقاء على قيد الحياة في البيئة والانتقال الى مضائف جديدة والتنوع الوراثي عن طريق التزاوج ، فمثلا قابلية *Coccidioides posadasii* على اصابة مضائف سليمة والبقاء على قيد الحياة في التربة يساهم وبمعدل كبير في الانتشار الجغرافي (Sharpton *et al*.,2009).

### 2-4-1- القدرة على الالتصاق Ability of adhesion

قابلية الالتصاق للفطريات بخلايا وانسجة المضيف تعتبر من الخطوات الضرورية في احداث الإصابة ، وتعتبر الفطريات متطفلة داخل و خارج خلوية وظاهرة التطفل هذه تعتمد على الجزيئات السطحية المتكاملة إذ ان دخول الفطر الممرض الى خلايا المضيف

يبدأ بالتصاق الفطر بسطح الخلية الذي يولد اشارة لإدخال مكوناته السايتوبلازمية بالاضافة الى ان الفطر الممرض يستخدم مختلف جزيئاته السطحية للاتحاد مع المكونات الخارج خلوية للمضيف ، لكي يحدث الإصابة بشكل فعال ( Mendes-Giannini *et al.*,2005).

إن للفطر *A. fumigatus* القابلية على الالتصاق بانسجة المضيف ، وكذلك الاتحاد مع مختلف بروتينات المضيف التي تشمل laminin, fibrinogen, immunoglobulin , fibronectin ... الخ من خلال مختلف المستقبلات التي تتصل مع جدار الخلية الفطرية ، وكونيدات هذا الفطر مغطاة بطبقة من البروتينات نافرة للماء تدعى rodlet layer مبنية من البروتينات وهي مسؤولة عن الاتحاد مع الالبومين والكولاجين (Latgé, 2001).

إنّ الخطوة الأولى للإصابة بالفطريات الجلدية هي الالتصاق ونقل الامراض الجلدية وربما يكون الإنتقال بالاتصال المباشر بالإنسان أوالحيوان أو بصورة غير مباشرة من خلال الملابس الملوثة وتلتصق الفطريات الجلدية مع الانسجة المتقرنة لتصل الى البشرة وتولد كونيدات مفصلية وبعدها تكون هايفات التي تدخل الطبقة المتقرنة، وفي الوقت الحاضر المعرفة قليلة عن كيفية التصاق الفطريات الجلدية ، ولكن اقترح ان المانوز والكالاكتوز الموجودين في سطح الجلد هي كاربوهيدرات مخصصة للالتصاق ومعرفة من قبل *Trichophyton rubrum* و*T. mentagrophytes* و الفطريات الجلدية أيضاً تفرز أنزيمات Proteases ضرورية لعملية الالتصاق (Chinnapun,2015 ) .

## 2-4-2- انتاج البروتييز Proteases production

وهي انزيمات محللة للبروتينات، و تصنف بصورة رئيسة على أساس pH الأمثل لها الى أنزيمات حامضية ومتعادلة وقاعدية ، وممكن ان تعزل الى مجموعتين رئيستين إعتماداً على قدرتها على شطر الاواصر البيتيدية N- او C- (ببتايديز خارجية)او الاواصر البيتيدية الداخلية(ببتايديز داخلية) بينما الامينو ببتايديز تشطر الارتباط البيتيدي النهائي N- والكاربوكسي ببتايديز يشطر الاصرة البيتيدية النهائية C- (Anand,2016) وإن هذه الأنزيمات المتحصل عليها من الفطريات يمكن لها ان تلعب دوراً غذائياً عاماً أو أدواراً متخصصة في الأيض الغذائي هذا من جهة ، ومن جهة اخرى يمكن ان تكون امراضية او عوامل ضراوة (Haq *et al.*,2006) إذ

تساهم بالضراوة الميكروبية من خلال تحطيمها لأنسجة المضيف وهضم البروتينات المناعية المهمة مثل الأجسام المضادة والمتممات (Jansen *et al*.,1995).

أ- البروتييزات الداخلية المفرزة من الفطريات الممرضة هي:

1- aspartic proteases وهو مشابه للببسين (عائلةA1) أو ينتمي الى العائلة A4 التي تحتوي فقط انزيمات فطرية مفرزة، وPeptidases العائلة A1 تثبط كليا بواسطة pepstatin بينما انزيمات العائلة A4 غير حساسة لهذا المثبط ، والوزن الجزيئي له 40 كيلودالتون وفعاليته المثلى عند PH من 3-4 على الرغم من ان البروتييزات يكون لها pH الأمثل 5 وتبقى فعالة عند PH المتعادل (Schoen *et al*., 2002) .

2- Metallo proteases هي الانزيمات المفرزة من الفطريات الممرضة تنتمي الى عائلتين مختلفتين deuterolysins (M35) وfungalysins (M36) وهذه الانزيمات هي سلسلة ببتيدية وزنها الجزيئي 20 كيلو دالتون وهي فعالة عند pH من 6 - 9 (Tatsumi *et al*., 1991; Rhodes *et al*., 1990)

3- serine proteases تفرز من الفطريات الممرضة التي تنتمي الى تحت العائلة subtilisin (S8A) وتثبط كليا بواسطة PMSF(Monod *et al*., 1991) ووزنها الجزيئي حوالي 28-30 كيلو دالتون وفعاليتها المثلى عند pH 8-9 .

ب - البروتييزات الخارجية المفرزة من الفطريات الممرضة هي :

aminopeptidases, carboxypeptidases و dipeptidyl-peptidases وقد عزلت من مزارع مختلفة من الفطر *Aspergillus* (Doumas *et al*., 1998).

أما بالنسبة لعلاقة هذه الانزيمات المختلفة بالضراوة فهناك دراسات كثيرة وفيما يخص فطر *A. fumigatus* فقد أجريت دراسات مختلفة باستخدام موديلات من الفئران وخنازير غينيا (Reichard *et al*., 1997) واستخدمت سلالات برية واخرى طافرة بعد استهداف الجينات إذ تبين من كل التجارب أنه لا وجود لاختلافات بالامراضية بين السلالات البرية والسلالات الطافرة، وكذلك المنحنى الاحصائي للوفيات ليس فيه اختلافات وكذلك فإن دراسات الإمراضية النسيجية للرئات المصابة أظهرت تشابهاً لامتداد الغزل الفطري في كل من السلالات البرية والطافرة ،وإن غزو انسجة الرئة من قبل السلالة البرية والطافرة قد ظهر خلال النسيج الطلائي القصبي بعد التطور الزائد من قبل الفطر داخل القصبات والقصيبات ، وحينما تقاطعت الهايفات

مع مادتي الكولاجين والايلاستين لم تظهر فعالية تحلل بروتيني من قبل الفطر ( Jaton-Ogay *et al*., 1994 ) وفي هذه الحالة قد تكون هذه الاستنتاجات مدهشة والتناقض بين موديلات الحيوانات المستخدمة وإصابات الانسان ، و من الممكن أيضاً أن توجد أنواع أخرى من Proteases تستحث خلال عوامل المضيف المتخصصة ، وعلى اية حال هناك مجموعة من الحجج التي تبين غياب دور Proteases المفرزة من الفطر *A. fumigatus* في الامراضية وهي فقدان elastolysis الذي يحلل جدران الأوعية في Aspergillosis الاجتياحي في الإنسان ، وقد أثبت ذلك من الأنسجة المأخوذة من تشريح الجثة (Denning *et al*., 1992) والامر الاخر هو أن ضراوة الفطر تضعف بفعل الأجسام المضادة إذ انها تثبط ALP (Frosco *et al*., 1994 )، أما بالنسبة للفطريات الجلدية فالبروتييزات المفرزة منها عموما هي keratinases التي تستهدف الأنسجة الكيراتينية وهذه الأنسجة هي البشرة والأظافر والشعر وهي ليست متكونة فقط من الكيراتين بل من شبكة من البروتينات المتقاطعة مثل involucrin,loricrin وبروتينات صغيرة غنية بالبرولين تشكل غلاف الخلايا القرنية(Steinert and Marekow, 1997)، وللان ليس هناك دراسة للمقارنة بين البروتييزات المفرزة من الفطريات الجلدية التي يمكن أن توضح الخصوصية النسبية لهذه الفطريات التي تسبب انواعاً مختلفة من dermatophytosis والدراسات السابقة أوضحت أن البروتييزات المفرزة من الفطريات الجلدية هي مشابهة للمفرزة من انواع الفطر *Aspergillus spp* ،لكن مع اختلاف خصوصية المادة الاساس وعوائل الجينات المنظمة ( Brouta *et al*., 2002).

## 2-4-3- انتاج اللاييز Lipases production

هي انزيمات قادرة على تكوين سلسلة طويلة من الأحماض الدهنية المبلمرة وكما في البروتييزات فإنها تعتبر أيضا مهمة في الضراوة كما في الفطر *Metarhizium. anisopliae* ، ومن بين الأنزيمات الكثيرة التي تفرزها الفطريات فأن اللاييزات تعتبر من أهم الأنزيمات المفرزة والتي تعتبر عوامل ضراوة لهذه الفطريات الممرضة ; Stehr *et al*. 2003 (Perinotto *et al*., 2014) ، والأنزيمات المحللة للدهون لمعظم الكائنات الدقيقة كانت قد درست منذ أمد بعيد على أنها تلعب ادواراً مهمة في عمليات الإصابة وأن تكوينها ينظم خلال هذه العمليات وكما وصف بأن الفعالية المحللة للدهون تزيد التفاعلات النافرة للماء من خلال تحرير الأحماض الدهنية التي تفضل الالتصاق بالمضيف ( Schofield *et al*. 2005; Go¨ttlich *et al*.,1995) ، والكشف المبكر عن الفعالية المحللة للدهون ربما يعود الى وجود هذه

الأنزيمات على سطح الكونيدات التابعة للفطر *Metarhizium anisopliae* كما لوحظت في الفطريات الممرضة للنبات التي تلعب دوراً مهماً في نجاح الإصابة كانت قد اقترحت من قبل Berto *et al*.,(1999) وقد استخدمت استراتيجية المعالجة بـebelactone وهو مثبط لإفراز اللايبيز بصورة رئيسية ضد الفطريات الممرضة للنباتات تستخدم الفعالية المحللة للدهون وتعتبر من ضمن الفعاليات المهمة لها (Voigt *et al*. 2005)، وهناك القليل من المعرفة حول ان تكون اللايبيزات كعوامل ضراوة للممرض إذ ان هناك بعض التقارير حول فعالية الانزيمات المحللة للدهون بوصفها عوامل ضراوة في البكتريا والفطريات وهناك بعض التحقيقات أيضاً حول اللايبيزات الفطرية بوصفها عوامل ضراوة محتملة ضمن ممرضات النبات ، حيث تلعب دوراً مهماً في تحلل طبقة شمع الكيوتكل بالاضافة الى مختلف أنواع الدهون المتواجدة في الخلايا النباتية، وأغلبها يتألف من الدهون الفوسفاتية والدهون السكرية جنباً الى جنب مع البروتينات هي المكونات الرئيسية لاغشية الخلايا النباتية والدهون والزيوت موجودة في كل الخلايا النباتية إذ تكون خزيناً للطاقة وهذه المكونات تكون هدفاً للفعالية الانزيمية المحللة للدهون مثل اللايبيز والفوسفولايبيز، والتي تحلل الأحماض الدهنية من جزيئة الدهن (Nam Long,2008; Gácser *et al.*, 2007) ، لكن في دراسات اخرى أثبت ان الفعالية المحللة للدهون لها علاقة وثيقة بالضراوة للفطريات الممرضة إذ إن مساهمة اللايبيزات قد شخصت كثيراً في انواع الكانديدا إذ تمتلك *C. albicans* مالا يقل عن 10 جينات تشفر للايبيزات ، وإن هذا التعبير الجيني يؤثر وبشكل كبير في عملية الاصابة واللايبيزات في *C. parapsilosis* تكون مسؤولة عن تدمير انسجة البشرة والانسجة الطلائية (Hube *et al*.,2000 ; Gacser *et al*.,2007 )، وكذلك اثبت ان لها دوراً مهماً في ضراوة الفطريات الممرضة المحبة للدهون والمرافقة للجلد مثل انواع *Malassezia* spp. إذ إن المورث المشفر للايبيزات في *M. furfur*, *M. pachydermatis*, و *M. globosa* شخص أيضا فيها إذ ان محاولات معرفة التتابع الجيني كشفت عن مالايقل عن 14 مورثاً مشفراً للايبيز في *M. globosa* (DeAngelis *et al*.,2007)

## 2-4-4- انتاج الفوسفولايبيز Phospholipases production

فعالية Phospholipases عالية جداً خلال غزو الأنسجة بسبب أن هذه الأنزيمات مسؤولة عن تحليل واحدة أو أكثر من روابط الاستر في glycerophospholipids التي يبنى منها الغشاء البلازمي وقد عزلت خلايا *C. albicans* من الدم وهي تنتج كميات كبيرة من الفوسفولايبيز الخارج خلوي وفعاليته أكثر من السلالات المتعايشة(Ibrahim *et al.*, 1995)،

هناك أربعة أنواع من الفوسفولايبيزات المفرزة وهي A, B, C , D وهي متخصصة باتجاه آصرة الأستر في glycerophospholipids ومن أهم هذه الفوسفولايبيزات في الضراوة الفطرية هو الفوسفولايبيز B (PLB) الذي له فعاليتان hydrolase و Lysophospholipase-transacylase (Ghannoum, 2000; Yang, 2003) ولذلك PLB يمكنه ان يحرر الأحماض الدهنية من الفوسفات الدهنية وبقايا الأحماض الدهنية من Lysophospholipid وبعدها ينقل الاحماض الدهنية الحرة الى Lysophospholipid وينتج الفوسفات الدهنية (Theiss *et al.*, 2006).

ويفرزالفطر *A. fumigatus* عدة انزيمات ومن بينها الفوسفولايبيزات التي تساهم في ضراوة الفطر من خلال تسهيلها لاستعمار الفطر في الرئتين والأنسجة الأخرى إذ إن هناك ارتباطاً وثيقاً بين فعالية الفوسفولايبيزات وحدة الاصابة (Alp and Arikan, 2008) كما انه وفي بعض مراحل الاصابة من قبل *C. neoformans* فإنه ينتج انزيمات محللة ومن ضمنها Phospholipases التي تلعب دوراً في التغذية وأذى لأنسجة المضيف والفوسفولايبيز الخارج خلوي لهذا الفطر يظهر بشكل الفوسفولايبيز B (PLB)، Lysophospholipase (LPL) و Lysophospholipase-transacylase (LPTA) وبفعل هذه الأنزيمات يمكن أن ينتج عنه عدم استقرار وتدمير الاغشية وسطح الرئة ،وتحلل الخلايا وتحرير المراسلات الثانوية للدهون (Chen *et al.*, 2000 ;Cox *et al.*, 2001) ومن المحتمل ان PLB تلعب دوراً مهماً في النمو داخل الخلايا ،والبقاء والتضاعف لهذا الفطر ضمن الخلايا البلعمية (Santangelo *et al.*, 2004،) يضاف إلى ذلك ان الفوسفولايبيزات لا تلعب دوراً فقط في التحول السريع للغشاء الفطري البلازمي بل انها تحافظ على جدار الخلية وسلامته ولذلك يبقى الفطر على قيد الحياة خاصة خلال التغاير في درجات الحرارة (Siafakas *et al.*, 2007) وقد أثبتت دراسات سابقة أن *C. neoformans* قادر على أن يفرزحويصلات تحتوي العديد من الانزيمات تشمل laccase واليوريز والفوسفولايبيز B ، وخلال الاصابة بمرض Cryptococcosis المنتشر تم الكشف عن مستويات من منتجات الفطر في السوائل الجسمية للمرضى وهو ما يقترح ان هذه الحويصلات ربما تمثل طريقاً عاماً وكفوءاً لإيصال الأيضيات الثانوية المرتبطة بالامراضية الى البيئة خارج خلوية بواسطة الفطر *C. neoformans* (Rodrigues *et al.*,2008).

## 2-4-5- انتاج انزيمات تحلل الدم Haemolytic enzymes production

تعرف هذه الإنزيمات على أنها سموم خارجية والتي تكون قادرة على حل خلايا الدم الحمراء بالإضافة الى الخلايا ذات الأنوية والمعرفة الحالية تقترح ان الهيمولايسين تتفاعل وبروابط خاصة مع سطوح مختلف الخلايا الهدف وقد اثبت وجودها بعدة دراسات في الفطريات (Gonzalez *et al*.,2008; Nayak *et al*.,2012).

ظهرت قابلية الكائنات الممرضة بالحصول على عنصر الحديد بأعتبارها محوراً مهماً في بقائها على قيد الحياة و قابليتها على احداث الاصابة أيضا ضمن اللبائن المضيفة وبما انه لا يوجد حديد بصورة حرة فإن معظم الممرضات تحصل عليه بشكل غير مباشر من المركبات الأخرى مثل الهيموكلوبين ، ولفعل ذلك يجب ان يكون الممرض مجهزاً بآلية تمكنه من تحطيم شوارد الحديد ويستخلص منها عنصر الحديد والانزيمات المستخدمة في هذه العملية ، تصنف على أنها هيمولايسين (Sachin *et al*.,2012)،و الحديد المتطلب للنمو الفطري ضروري للعمليات الايضية و يعمل أيضاً محفزاً لمختلف العمليات الكيمائية الحياتية ( Calera *et al*.,2009) وتعبير البروتينات الحالة للدم مع القدرة على تحلل خلايا الدم الحمراء اقترح أيضا أستراتيجية بقائية للفطريات خلال الإصابات الإنتهازية، وعلى سبيل المثال في الـ *Candida* إذ ان افراز الهيمولايسين بالاضافة الى أن امتصاص الحديد يسهل غزو الهايفات خلال Candidiasis المنتشر(Odds,1998) وأن الهيمولايسين تمتلك تأثيرات سمية سايتوبلازمية على أغشية خلايا الدم الحمراء والخلايا الالتهامية ،بالاضافة الى أنها تشكل ثقوباً ولها تأثير تحللي على الخلايا الحقيقية النواة الاخرى والتراكيب الخلوية ( Schaufuss and Steller,2003).

وهناك عدة أنواع فطرية قادرة على تحلل الدم تشمل الفطريات الخيطية،الممرضات الفطرية المتوطنة مثل *H. capsulatum* و *Blastomyces dermatidis* بالإضافة إلى الممرضات الانتهازية ومنها *C. albicans* و *C. neoformans* (Nayak *et al*.,2013).

يستطيع الفطر *A. fumigatus* الحصول على الحديد بطريقتين مختلفتين الاولى بواسطة اختزال تمثيل الحديد ، والثانية بواسطة امتصاص الحديد عن طريق حامل اليود وميكانيكية الاختزال لتمثيل الحديد تمثل اختزال الحديديك الى الحديدوز، والامتصاص اللاحق للحديدوز بواسطة معقد FtrA/FetC ، وتعطيل FtrA ذي الألفة العالية للحديد لا ينتج عنه تقليل للضراوة في موديل الفئران المصابة ، وهذا يؤكد أن ضراوة الفطر *Aspergillus* لا تعتمد على تقليل تمثيل الحديد ، وعلى العكس من ذلك ان تعطيل مورث sidA الذي يحفز الخطوة الأولى من

التكوين الحياتي لكل حاملات اليود المعروفة وجد انه وبصورة مطلقة ضرورياً للضراوة (Schrettl *et al*.,2004; Hissen *et al*.,2005).

## 2-4-6- انتاج السموم الفطرية Mycotoxin production

إن السموم الفطرية هي أيض ثانوي ذو وزن جزيئي واطىء تنتج طبيعياً من الفطريات مثل الفطر *A. flavus* والتكوين الحياتي للسموم الفطرية يعود إلى بعض العوامل الداخلية مثل الصفات الوراثية الكامنة في الفطريات أو الى العوامل التي تخص نمو المحاصيل ، حصادها وخزنها ، مثل الأوكسجين(عادة الفطريات تحتاج ما لايقل عن 1-2% من الأوكسجين) والرطوبة (تنمو الفطريات في 13-18 % رطوبة) والحرارة (تنمو في 20-30 م) والاضرار الفيزيائية بفعل الحشرات وعوامل الاجهاد الاخرى( Simona and Mihaela, 2008; Richard, 2007) وأنواع الأعفان التي تنتج السموم الفطرية شائعة جداً مثل *Aspergillus*, *Fusarium* و*Penicillium* ويمكن أن تنمو بمدى واسع على المواد الاساسية وبمدى واسع من الظروف البيئية إذ إنها تظهر في كل المنتجات الزراعية حول العالم( Bosco and Mollea, 2012).

### 2-4-6-1- الافلاتوكسين Aflatoxin

وهي من أشهر السموم الفطرية التي يمكن أن تسبب تأثيرات حادة تدعى aflatoxicoses عندما تستهلك بكميات من المليغرام وهذه التأثيرات لها عدة أعراض منها النزيف،والاسهال،وامراض الكبد، تغيرات في الأيض الغذائي ، وأحيانا الموت Binder ) (2007,. هناك أربعة أنواع رئيسة من الأفلاتوكسين هيB1, B2, G1 , G2 وضعت حسب توهجها تحت الاشعة فوق البنفسجية (أزرق أو أخضر) والحركة الكروموتوكرافية النسبية خلال طبقة الكروموتوكرافي الرقيقة (Eshetu *et al*.,2016) ، وهي أيضيات ثانوية سمية مع قدرة مسرطنة ومن الفطريات المنتجة لها *A. flavus* و*A. parasiticus* وهذه الفطريات تغزو الأعلاف تحت الظروف المناسبة وتنتج الافلاتوكسين (Thieu *et al*.2008 ) والسلالات المنتجة لسموم الافلاتوكسين من الفطر *A. flavus* تعتبر من السموم الفطرية المؤذية التي توجد بصورة دائمة في التربة بالاضافة الى الحبوب،والمكسرات،ومنتجات الالبان ،والشاي،والتوابل، والكاكاو بالإضافة إلى غذاء الحيوانات والاسماك(Waliyar, 2008).

إن المناطق الأكثر تأثراً بالافلاتوكسين هي المناطق ذات المناخ الاستوائي وشبه الاستوائي إذ ان مستويات الرطوبة والحرارة تلعب دوراً ايجابياً بنمو الفطريات و ان استهلاك الافلاتوكسين AFB1 يسبب افراز الافلاتوكسين M1 الى الحليب ، وهو يعتبر من الايضيات الثانوية من AFB1 الرئيسة ينتج بصورة رئيسية في الكبد ويمتلك قابلية مسرطنة وفي بعض الحالات وجدت تراكيز عالية أكثر من المسموح بها وهوما يجعل الحليب غير صالح للاستهلاك2003 (Kourousekos *et al*., 2012; Abdulrazzaq *et al*.)).

وفيما يخص الجهاز التناسلي ،والميكانيكية التي يتأثر بها من جراء AFB1 تبقى غير واضحة إذ ان تأثيرات السموم لم تدرس بصورة وافية علاوة على ذلك ،الخطر الكبير من سمية AFB1 على الجنين والمشيمة نتيجة إفراز هذه السموم وأيضيات AFB1 مع القدرة المسرطنة كانت قد درست في النساء (Shuaib *et al*. 2010 ;Partanen *et al*. 2010)، أشار Storvik *et al*. (2011) الى ان التعرض المزمن الى AFB1 ربما يسبب تعطيل الغدد الصماء ضمن الوحدة الجنينية المشيمية في الإنسان بسبب تأثيره في تعبير الانزيمات P450s) (CYPsإذ يصنف AFB1 على أنه المسبب لإختلال الغدد الصماء.

## 2-5- المضادات الحياتية Antibiotics

تندرج المضادات الحياتية تحت هذه الأقسام الثلاثة :

منتجات طبيعية تنتج من الكائنات الدقيقة،ومنتجات نصف تركيبية مشتقة من المنتجات الطبيعية،منتجات كيميائية منتجة اعتماداً على تركيب المنتجات الطبيعية ويمكن أن تعرف أيضاً على أنها مواد تنتج من الكائنات المجهرية والتي تعمل على تثبيط نمو كائنات مجهرية اخرى(الجشاعة،2001) وفي الوقت الحالي تعرف بأنها المادة المنتجة من قبل الكائنات المجهرية كليا او جزئيا بالتخليق الكيميائي، تثبط وبتراكيز قليلة نمو الكائنات المجهرية الاخرى (Nikodinovic *et al*. 2003 ;Hodgson and Kizior,2003) , وهناك عدد محدود من المضادات الفطرية واغلبها لها اعراض جانبية إذ يصعب الحصول على علاج معين لنوع محدد من الفطريات ويعزى السبب في ذلك الى أن الفطريات هي من ضمن الكائنات الحقيقية النواة وتركيبها وأيضها مشابه لمضائفها ومن هنا فإنها على قدر تحطيمها للفطريات الممرضة للانسان تكون ايضا لها القدرة على تحطيم انسجة المضيف (Jawetz *et al*.,1998; Wetter,2004) ،

وميكانيكية عملها معقدة وبايجاز فإن جزيئات المضادات الحياتية تعمل على مختلف الاهداف الخلوية مثل تضاعف DNA،وتكوين RNA ،وتكوين جدار الخلية،وتكوين البروتين بواسطة التفاعلات الجسمية التي تتضمن التغيرات التركيبية والجزيئية والكيميائية الحياتية (de Lima Procópio *et al*. 2012) وفيما يلي ندرج بعض أنواع المضادات الحياتية التي تم استخدامها ضمن البحث

## Amphotericin B -1-5-2

يعد من مضادات البولينات المهمة الذي اكتشف من قبل العالم Gold وذلك في عام 1955 والكائن المنتج له هو *Streptococcus nodosus* ويستخدم بشكل واسع لمكافحة الأمراض الفطرية التي تهدد حياة مرضى العوز المناعي ، وأمراض تعفن الدم وهو واسع الاستخدام لمعالجة الإصابات الفطرية الجهازية ولتجنب التلوث الفطري في عملية زراعة الانسجة (Mathieson *et al*., 2011; Rang *et al*.,2003; Terrell and Hughes,1992; Chattopadhyay and Jafurulla,2011)؛ يعمل بوصفه كابحاً للفطريات وفي الجرعات العالية يعمل بإعتباره قاتلاً للفطريات ولايفضل اعطاؤه عن طريق الفم وفائدته تكون مصحوبة بعدد كبير من التأثيرات المعاكسة ، تشمل الحمى،والقشعريرة،والغثيان،والتقيؤ،والصداع والفشل الكلوي المصحوب بفقر الدم ،ونقص بوتاسيوم ومغنيسيوم الدم عندما يعطى بواسطة الحقن (Plumb ,2008; Naik *et al*.,2005)،و يعطى هذا المضاد الفطري عن طريق الحقن بالوريد مع أملاح Sodium Deoxycholate المذابة في محلول Dextrose Solution وذلك لكي يتم تقليل سمية المضاد لخلايا الكلية(Bodey,1993).

إن ميكانيكية عمله تتضمن اتحاد المضاد مع الستيرولات (الاركيستيرولات )لغشاء الخلية الفطرية إذ ان بعض من جزيئات المضاد تخزن معا بشكل حلقة مشكلة قناة الى الداخل من غشاء الخلية ضمن الستيرولات وخلال هذه القناة تتسرب المكونات السايتوبلازمية وهوما يؤدي الى موت الخلية (Plumb ,2008). أما بالنسبة للمقاومة ففي الاختبارات التي أجريت داخل المختبر كانت فعالية المضاد جيدة جدا لعزلات من *Aspergillus* من الطيور البرية والمنزلية(Beernaert *et al*.,2009) بينما أشار(Silvanose *et al*.,(2006، ان هناك زيادة بالمقاومة لهذا المضاد اذا ما قورن مع Itraconazole أو Voriconazole إذ تنخفض هذه المقاومة خلال العلاج بهذه المضادات الفطرية و لقد وجد انه في حالة اتحاد Amphotericin B مع الازولات الثلاثية مثل Itraconazole يكون مؤذياً وغير فعال ، أما في حالة اتحاده مع

Voriconazole يكون مفيدا حتى وان كان بكميات قليلة لكن هذا لا ينطبق في كل الدراسات التجريبية ( Ostrosky-Zeichner,2008) وعلى الرغم من الفطريات الخيطية طورت مقاومة لـ Amphotericin B او أمتلكت مقاومة موروثة من خلال حالات سجلت،الا ان ترددها لم يوصف بعد (Sutton *et al*.,1999).

## Ketoconazole -2-5-2

الكيتوكونازول هو من مشتقات الايميدازول صنع وطور من قبل Janssen Pharmaceutica وآلية العمل تتضمن منع تكوين الاركيستيرول وهو المكون الرئيس للأغشية البلازمية الفطرية من خلال تثبيط fungal cytochrome P450-dependent enzyme lanosterol 14-a-demethylase وهوما ينتج عنه نفاد الاركيستيرول ويصاحب ذلك تراكم 14-a-methylated إذ يتداخل مع وظيفة الأركيستيرول في الاغشية الفطرية من خلال تغييره سيولة الغشاء وفعالية بعض الانزيمات المرتبطة مع الغشاء، والتأثير النهائي يكون في تثبيط النمو الفطري والتضاعف إضافة إلى بعض التأثيرات الثانوية الاخرى مثل تثبيط التحول الوراثي للخمائر إلى الشكل الهايفي ، ويقلل الالتصاق الفطري والتأثير السمي المباشر على الدهنيات الفوسفاتية للغشاء وقد ظهر ان امتصاص Ketoconazole المعطى عن طريق الفم متغاير نسبياً بين الأفراد و يتأثر أيضاً بدرجة الحامضية المعدية،و عدم توفر صيغ الحقن بالوريد،وكمية العقار الذي تخترق الحاجز الدموي الدماغي تكون ضئيلة ، وهذا المضاد له فعالية كابحة للنمو الفطري، وقد اثبت انه اقل فعالية في الافراد القليلي المناعة (Maertens ,2004 )، التأثيرات الجانبية الشائعة التي تترافق مع استخدام Ketoconazole تشمل حروقاً معتدلة ،ورد فعل تحسسي حاد،وبثوراً وتهيجاً وألماً أو احمراراً (Patel *et al*.,2009).

إن الـ Ketoconazole قليل الذوبان جداً ($0.017\ mg\ mL^{-1}$ at25ºC) أو غير ذائب في pH المتعادل وقليل الذوبان في المحاليل الحامضية ( Yang *et al*.,2008;Wagh and Patel, 2010 ) ، و تراكيزه المائية الواطئة تحدد وبشكل حاد تواجده الاحيائي وفعاليته الدوائية ، وذلك بسبب أنه ينبذ من القناة الهضمية قبل ذوبانه بالكامل ، مما يخفض امتصاصه إلى مجرى الدم (Bikiaris *et al*.,2011) .

وللتغلب على الاثار الجانبية في النظام التقليدي لاعطاء العقار فإن نظام التوزيع الجديد للعقار (NDDS) بدأ يلعب دوراً مهماً في هذا الجانب فقد استخدمت Nanoemulsions بصورة واسعة باعتبارها حاملاً للعقار في المعالجة الموضعية للأمراض خاصة الأمراض الجلدية إذ انها

تكون قادرة على الاندماج مع انواع مختلفة من العقاقير سواءً كانت محبة او نافرة للماء لتحسن من عملية تراكم العقار في الموضع المطلوب ولتخفض الاثار الجانبية أيضاNanoemulsions يمكن ان تؤدي او تسيطر ببراعة على تحرير العقار المحاصر، وهذا النظام يسمح بتراكم العقار في الجلد مع تغلغل او تدفق قليل اذا ما قورن مع العقاقير الموضعية التقليدية ، ولقد اصبح من الواضح ان Nanoemulsions متناسبة تماماً مع المادة الهلامية وتستخدم لحمل العقاقير لتوزيعها موضعيا (Patel *et al*.,2009) ، الإصابات الفطرية للجلد واحدة من المشاكل الجلدية الشائعة ومن بين الصيغ الموضعية للعلاج هناك مدى واسع للاختيار من الجرعة بالشكل الصلب الى شبه الصلب ، وللجرعة السائلة هناك صيغة المادة الهلامية الشفافة مقبولة بشكل واسع في كلا الحالتين الدوائية والتجميلية (Sunil *et al*.,2015 ).

## Fluconazole -3-5-2

مضاد فطري واسع الطيف من الآزولات الثلاثية وقد برز باعتباره بديلاً مناسباً للـ AmphotericinB لمعالجة مختلف الاصابات الفطرية السطحية والجهازية (Goa and Barredell ,1995) وهو يشابه المضادات التابعة لهذا الصنف ، إذ اثبتت فعاليته في المختبر وفي الوسط الحيوي ضد *Cryptococcus neoformans* ومعظم انواع Candida ، و ظهرت فعاليته التثبيطية أيضاً ضد *Blastomyces dermatitidis*، *Coccidioides immitis*, و*Histoplasma capsulatum* واثبت فعالية محدودة فقط ضد *Aspergillus flavus* , *A. fumigatus* (Olin ,1997).

و ميكانيكية العمل يثبط نزع مثيل C-14a للانوستيرول في الفطريات بواسطة الاتحاد مع واحد من انزيمات السايتوكروم P450 التي تؤدي الى تراكم C-14a مثيل ستيرول ويخفض تراكيز الاركيستيرول ، إذ ان الستيرول ضروري للغشاء البلازمي الفطري الطبيعي (Warnock ,2010) وبواسطة ايقاف انتاج الاركوستيرول فهو يغير تركيب الاغشية الدهنية الفطرية وهذا ما ينتج عنه تغيرات في الوظائف الخلوية وعدم القدرة على التكاثر، وقد وجد أن Fluconazole هوأقل سمية من AmphotericinB في عدة دراسات Kontoyiannis *et al*., 2001 ;Kramer *et al*.,1997) وبعد التحليل اثبتت الاحصائيات التأثير المميز للـ Fluconnazole على معدل الوفيات مع انخفاض 24% من معدل وفيات الرضع الذين اعطوا Fluconnazole بالمقارنة مع المواصفات القياسية (Kaufman and Manzoni ,2010).

أما بالنسبة للتأثيرات المعاكسة للمضاد فهناك عدد من التأثيرات المعاكسة المترافقة مع الفلوكونازول وهي الأكثر تردداً ومنها الغثيان،والصداع،والطفح الجلدي،والتقيؤ،وألم البطن،والاسهال،وهناك حالات تظهر بنسبة أقل من 1% وتشمل : نوبات مرضية،تساقط الشعر،ونقص الكريات البيضاء،وقلة الصفيحات الدموية،وارتفاع مستويات زوال الكوليسترول والكليسيريدات الثلاثية ونقص بوتاسيوم الدم (Olin ,1997) و أرتبط الفلوكونازول أيضاً في بعض الحالات بالسمية الكبدية الحادة ، التي قد تتسبب بموت المريض وثبت انه ليس لهذا ارتباط بالجنس،والعمر ،والجرعة ومدة المعالجة(Kramer *et al*.,1997) إن عدة دراسات سجلت زيادة في معدلات المقاومة لـ fluconazole في عزلات *C. albicans* ولذلك فإن Voriconazoleوposaconazole التي هي انواع جديدة من الازولات الثلاثية تمتلك طيفاً واسعاً من الفعالية ضد الخمائر والاعفان وتشمل انواع الكانديدا المقاومة لـ Fluconazole Sabatelli *et al*.,2006 . (;Antoniadou *et al*.,2003)

## 2-6- المطهرات Antiseptics

السيطرة على الكائنات الحية الدقيقة يدل على تقليص أعدادها وهي أيضا تمنع انتقال الأمراض والإصابات ، وكذلك تمنع التلوث بواسطة نمو الكائنات غير المرغوب فيها وتدعى هذه العملية بالتطهير، إذ تدل على تحطيم الممرضات في الحالة الخضرية (غير مكونة للسبورات الداخلية) ، والمادة الكيميائية المستخدمة تسمى المطهر، وفي دراسات اخرى ظهر أن المطهرات سامة ليس فقط للكائن الممرض ، بل تكون كذلك بالنسبة لخلايا المضيف ولهذا فانها يمكن ان تستخدم فقط لتعطيل فعالية الكائنات الدقيقة في البيئة أو استخدام محدود على سطح الجلد ، لكنه لا يمكن اعطاؤها جهازياً (Okore *et al*.,2014) ، ومن المطهرات التي تم استخدامها هي :

### 2-6-1- البوفيدون ايودين Povidone –Iodine (Septidyne)

يعد أحد المركبات الحاملة لليود (Idophores) وهو ذو تأثير سريع وقاتل للبكتريا ،والفطريات والفايروسات ومن مميزاته يكون عديم الفعالية في الدم والمواد العضوية وله استخدامات أخرى في حالات الجروح بوصفه معقماً وكذلك فهو معقم للجلد بعد العمليات الجراحية ، و يمكن استخدامه في تنظيف وتعقيم تقيحات الجلد والحروق والضرر الناتج عن الصدمات (;Southwoodand ;Clair and Domb,2001; Goldenheim,1993;

Abou and Alwan,1998 Baxter,1996 ) ولقد أوضح Birnbach *et al*.,(1998) بأنه في حالة استخدام محلول pvp-I بشكل مضاعف في الحالات الاعتيادية ، ربما يكون ملوثاً هذا بالاضافة الى أن قناني الزجاج المفتوحة مسبقا ولأوقات طويلة تكون أقل تأثيراً منPVP- I غير المستعمل واستنتج أيضاً(Lammer *et al*.,1990) بأن الجروح المزمنة والمتلوثة بشكل كثيف في حالة تنقيعها في محلول pvp-I وبتركيز 1 % لمدة 10 دقائق لا يقلل اعداد البكتيريا ، إذ اثبت مؤخراً أن عملية تنقيع البكتريا بهذا المطهر عملية غير مرغوب فيها في تنظيف الجروح والمحاليل المائية لهذا المطهر تكون غير مريحة لتطبيقها عبر الجلد لتطهير الجروح بسبب ان فترة بقائها على الجلد تكون قليلة ومن المحتمل أن تصبغ الأقمشة (Benjamin *et al*.,2011) وهناك عدد من العوامل التي تؤثر في فعالية التعقيم منها مدة التلامس مع الكائنات الحية، ودرجة الحرارة وطبيعة ونوع الكائن الحي المجهري و مستوى التلوث بالميكروبات ،وتراكيز المعقم،وpH وعسرة المياه التي تستخدم في تخفيفات المعقم أيضاً ومن أهم صفات هذا المطهر هو انه يؤثر وبمدى واسع في الجراثيم وبتراكيز قليلة كما انه لا يحدث تهيجاً ولا حرقة عند استخدامه للأنسجة السليمة وإنه يذوب في الماء ومتوفر وقليل الكلفة (Russell and McDonnell,2000;Rutala and Weberr,1999 .(;Al-wazzan,1990

## Gentian violet -2-6-2

هي صبغة triphenyl-methane تستخدم بوصفها مضاداً ميكروبياً ومضاداً فطرياً لمعالجة الإصابات ، ولها تاريخ طويل بالاستخدامات الطبية تحت مسمى Gentian Violet وتشبه المالاكايت الأخضر، بأنها عالية السمية ، وقد ظهر بأنها تعزز نمو الأورام .(Diamante *et al*.,2009; Safarik and Safarikova,2002)

وهو مضاد فطري ومضاد للطفيليات لمعالجة الأسماك ، وكذلك فإنه مطهر موضعي ،وهوايضا مركب مضاد فطري ومضاد بكتيري استخدم لمعالجة إصابات الجلد والعين في الماشية ، وعلى أية حال وبسبب خواصه باعتباره مضاداً فطرياً وبكتيرياً ولكونه مشابهاً للمالاكايت الأخضر فأنه من المحتمل أن يستخدم ضمن تربية الاحياء المائية لتخفف من الاصابات الفطرية والبكتيرية في بعض البلدان(Khoshkho and Matin, 2013) .

وكان سابقاً يستخدم في غذاء الدواجن ليمنع نمو الفطريات فيه ، وحالياً حظر استخدامه في غذاء الحيوانات المنتجة في الولايات المتحدة الأمريكية (FDA, 1991; Davis *et al*.2009)

وبسبب فعاليته بالتجفيف وفعاليته ضد الفطريات أصبح ذا شعبية بالاستخدام ، خاصة من قبل أطباء الأطفال وخلال الاعتناء بالقدم فإن أطباء الأطفال يقومون بإضافة المحلول للفراغات النسيجية عندما تظهر العلامات الأولى للأنحلال أو الإصابة الفطرية بحيث أن هذا المحلول يقوم بتجفيف الإصابة ويمنع تداخلها مع أخرى مع تقديم النصيحة للمريض بتجفيف المنطقة ما بين الأصابع بعد الاستحمام (Farid *et al*.,2008; Pupp *et al*.,2002). Gentian violet (محلول 1%) موافق عليه للاستخدام ضمن أدوية الإنسان وللاستخدام الموضعي (HealthCanada, 2013).

## 2-6-3- الديتول Dettol

الصيغة الجزيئة C8H9CIO تكون 4.8 % منه ، أما النسبة الباقية فهي عبارة عن زيت الصنوبر والكحول الايزوبروبيلي وزيت صابون الخروع والكرميل والماء والديتول موجود في الأسواق بصورة سائل وبصورة صابون واستعماله يتصف بالأمان إذ يستخدم معقماً يقوم بقتل البكتريا ، وكذلك يحمي الجسم من الجراثيم التي تسبب الأمراض والعدوى و له أيضاً فعالية كبيرة في ابادة الجراثيم لما يحويه من مكونات مضادة للجراثيم حيث يكون فعال ضد بعض انواع البكتيريا (الموجبة والسالبة) والخمائر والأعفان ،على الرغم من أن أكثرها تقاومه بشدة (McDonell and Russell,1999)، وهو واحد من المركبات الفينولية التي ربما تحطم الغشاء البلازمي وتمسخ البروتينات **(**Michalowicz and Duda, 2007**)** .

إن تناول الديتول يمكن أن يسبب اضطراباً في عمل الجهاز العصبي المركزي يتراوح بين الخمول إلى الغيبوبة،وتهيج أو تآكل القناة الهضمية،والالتهاب الرئوي،ومتلازمة ضيق التنفس في البالغينARDS بالإضافة الى إيقاف التزويد الرئوي القلبي (Chan *et al*.,1993; Chan *et al*.,1995) وقد وجد Redal,(1999) أن مطهر الديتول بتركيز 10 % اكثر كفاءة في التثبيط مما لو استخدم بتراكيز مخففة اخرى.

# الفصل الثالث

## المواد وطرق العمل

# 3- المواد وطرق العمل materials and methods

## 3-1- المواد

### 3-1-1- الأجهزة والأدوات Apparatuses and Instruments

ادناه بعض الأجهزة المستخدمة أثناء إجراء البحث موضحة في جدول (1)

**جدول (1) الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة**

| اسم الجهاز | الشركة المصنعة والمنشأ |
|---|---|
| Centrifuge | EBA 20 Hettich /Germany |
| Water bath | Elektro.mag /turkey |
| Autoclave | Triup international corp/ Italy |
| Distillator | Barloworld scientific ltd /UK |
| Incubator | Memmert/Germany |
| Electric oven | Memmert/Germany |
| Compound light microscope | CYANScope..Belgium |
| Sensetive balance | SARTORIUS AG/GERMANY |
| Refrigerator | CONCORD/Lebanon |
| Hood | K&K Scientific supplier/Korea |
| Microscopic digital camera | Scopephoto/Italy |
| PH meter | Matini /USA |
| Hot plate | Hana/Romania |
| Micropipettes | Slamed /Germany |
| Millipore filter | Difco /England |

| | |
|---|---|
| Bio rad/Italy | Vortex |
| Express/England | Vacum pump |
| Bio Basic – Canada | PCR pipette tips |
| Bio Basic – Canada | Yellow loading tips |
| Bio Basic – Canada | Blue loading tips |
| HTL – Poland | Micropipettes |
| Bio Basic – Canada | Cold RACK Box |
| Broche – Malaysia | Nitrile powder free gloves |
| Bio Basic – Canada | PCR thin wall tubes (0.2 ml) |
| Labnet – USA | Cool microcentrifuge |
| Sony – China | Deep freezer (-20°C) |
| Jeiotech – Korea | Fume hood |
| JUNYI – China | Gel image viewer |
| Optima – Japan | Horizontal compact electrophoresis |
| Biodrop – UK | Nanodrop (part # 80-3006-50) |
| ae™ – China | PCR Thermocycler (gradient) |
| Jeiotech – Korea | PCR Workstation |

### 3-1-2- المواد الكيميائية والبايولوجية Chemical and biological materials

إستخدمت مجموعة من المواد الكيميائية في إجراء التجارب المختبرية أثناء الدراسة وهي موضحة في جدول (2) .

**جدول (2) المواد الكيمائية والبايولوجية المستخدمة في الدراسة**

| اسم المادة | الشركة المصنعة والمنشأ |
|---|---|
| Gelatin | Ajax |
| Peoton | Ajax |
| Nacl | Ajax |
| Cacl2.2H2O | Ajax |
| Tween 80 | BDH/England |
| Agar-Agar | BDH |
| Ethanol | BDH |
| Methylene blue | BDH |
| Egg yolk | BDH |
| Normal saline | BDH |
| Methanol | BDH |
| Eosin | BDH |
| Chloroform | BDH |
| Butanol | BDH |
| Acetone | BDH |
| Glycerol | BDH |
| Lactophenol blue stain | BDH |

| | |
|---|---|
| BDH | Hematoxylin stain |
| BDH | Sodium bicarbonate |
| BDH | Heparin |
| Bio Basic – Canada | Agarose |
| Bio Basic – Canada | Boric acid ($H_3BO_3$) |
| Bio Basic – Canada | Bromophenol blue ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) |
| Alkem Lab. – India | Deionized disttle water |
| Sharlo – Spain | Disodium EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) |
| Geneaid – Taiwan | DNA gel loading dye |
| Merck – Germany | (Isopropanol) C3H8O |
| Merck – Germany | Glacial acetic acid ($CH_3COOH$) |
| Promega – USA | Ethidium bromide, [EtBr] ($C_{21}H_{20}N_3Br$) |
| Bio Basic – Canada | Sodium dodecyl sulfate (SDS) |
| Merck – Germany | Sodium hydroxide (NaOH) |
| Bio Basic – Canada | $C_2H_3NaO_2$ (Sodium acetate) |
| Bio Basic – Canada | Tris (hydroxyethyl) aminomethane [tris base] (C4H11NO3) |
| Geneaid | xylene cyanol FF |

| | |
|---|---|
| Glycerol | Geneaid |

**جدول (3) الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة**

| اسم الوسط | الشركة المصنعة والمنشأ |
|---|---|
| Sabouraud's Dextrose Agar | Hi-media ( India) |
| Blood Agar base | Hi-media ( India) |
| Brain Heart Infusion | Hi-media ( India) |
| Potata Dextrose Agar | Oxoid (England) |
| Neutrient agar | Ajax/Australia |
| Protolytic activity test medium | حُضر مختبريا |
| Lypolytic activity test medium | حُضر مختبريا |
| Phospholypolytic activity test medium | حُضر مختبريا |
| Haemolytic activity test medium | حُضر مختبريا |

### 3-1-3- المضادات الحياتية Antibiotics agents

**جدول (4) المضادات الحياتية المستخدمة في الدراسة**

| اسم المضاد | الرمز | الشركة المصنعة والمنشأ | استخدامه |
|---|---|---|---|
| Amphotericin B | Amp.B | HIMEDIA.India | مضاد فطري |
| Fluconazole | Flu. | HIMEDIA.India | مضاد فطري |
| Ketoconazole | Ket. | HIMEDIA.India | مضاد فطري |
| Chloromphenicol | Chloromph. | BDH | مضاد بكتيري |

## 4-1-3 - المطهرات Antiseptics

**جدول (5) المطهرات المستخدمة في الدراسة**

| الاسم | التراكيز | | | بلد المنشأ |
|---|---|---|---|---|
| Povidone-Iodine | %١ | %٥ | %١٠ | سوريا |
| Chloroxylenol | %١ | %٥ | %١٠ | سامراء-العراق |
| Gentian violet | %١ | %٥ | %١٠ | سامراء - العراق |

## 3-1-5- مواد تجربة PCR

### 3-1-5-1- عدة استخلاص الـ DNA

استخدمت عدة استخلاص خاصة للفطريات بالإعتماد على طريقة Cenis عام (1992)، مع بعض التحويرات والتي تتألف من المواد الآتية (جدول 6) :

**جدول (6) عدة إستخلاص الـ DNA**

| المكونات | | التركيز | الخزن |
|---|---|---|---|
| Sodium dodecyl sulphate (SDS) | | 10% (w/v) | R.T. |
| Disodium EDTA | | 0.5 M | 4˚C |
| NaCl | | 1 M | R.T. |
| Tris HCl pH 8.5 | دارىء استخلاص | 0.2 M | R.T. |
| NaCl | | 0.25 M | |
| EDTA | | 0.025 M | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 0.5% | SDS | DNA |
| 4ºC | 3 M | Sodium acetate, pH 5.2 | |
| 4ºC | 10 mM | Tris HCl pH 8.0 | |
| | 1 mM | Disodium EDTA | |

### 3-1-5-2- خليط التفاعل PCR premix

استخدم خليط التفاعل المجهز من شركة Bioneer والذي يضم 96 أنبوبة حجم 1مل والذي يتألف من المواد الآتية (جدول 7) :

**جدول (7) خليط التفاعل (PCR premix )**

| | | |
|---|---|---|
| - 20ºC | 10 mM | Tris-HCl (pH 9.0) |
| | 30 mM | KCl |
| | 1.5 mM | $MgCl_2$ |
| | 250 µM | dGTP |
| | 250 µM | dATP |
| | 250 µM | dTTP |
| | 250 µM | dCTP |
| | 1 U/ml | Taq DNA Polymerase |
| | | Stabilizer and tracking dye |
| | 20µl reaction | حجم التفاعل |

### 3-1-5-3-البادئات Primers

استخدم زوج البادئات المصنع من شركة Bioneer والذي يتكون من تسلسل قواعد نايتروجينية مذكورة في جدول (8):

**جدول (8) البادئات**

| إسم البادىء | درجة الحرارة | تسلسل القواعد |
|---|---|---|
| ITS grimens | 52 ºC | FP: 5′- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′ |
| | 52 ºC | RP: 5′- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′ |

علماً بأن الطول المتوقع لتلك البوادئ المنتخبة هو 546 bp
( Alsudani and Al-Shibli, 2015).

### 3-1-5-4- مُعلم الـ DNA ladder DNA

**جدول (9) مُعلم الـ DNA ladder DNA**

| المكونات | التركيز | الخزن |
|---|---|---|
| 13 حزمة من DNA مزدوج الشريط من 50 الى 1000 زوج قاعدي | 135 ng/µl | -20 ºC |
| Tris-HCl (pH 8.0) | 10 mM | |
| EDTA | 10 mM | |
| Ficoll | 2.5% | |
| Bromophenol blue | 0.005% | |
| Xylene cyanol | 0.005% | |

### 3-1-5-5- إنزيمات القطع Restriction enzymes

إستخدم الانزيم RsaI المجهز من شركة Bioneer والذي استخدم في تجربة RFLP-PCR جدول (10) :

**جدول (10) الإنزيم القاطع Rsa I**

| | المكونات | التركيز | الخزن |
|---|---|---|---|
| | *Rsa* I, restriction enzyme | | |
| 1 | *Rsa* I | 1000 unit<br>(20 unit / µl) | |
| 2 | 10X AccuCut™green Buffer | | |
| | Tris-Cl, pH 7.6 | 100 mM | |
| | $MgCl_2$ | 100 mM | |
| | DTT | 10 mM | |
| 3 | Tris-Cl, pH 7.6 | 10 mM | |
| | KCl | 50 mM | |
| | EDTA | 0.1 mM | |
| | DTT | 1 mM | |
| | Acetylated BSA | 200 µg/ml | |
| | Glycerol | 50% | |
| 4 | إنزيم RNase A | 50 mg/ml | |

## 2-3- طرائق العمل Methods

### 3-2-1- جمع العينات Specimens collection

تم جمع العينات من المنازل ومحلات بيع طيور الزينة في مدينة كربلاء المقدسة بواقع مرة واحدة بالأسبوع للفترة من 10/1- 2016/3/1، والطيور التي تركز العمل عليها هي : طيور الحب والكناري والحمام والفنجس و شملت عملية الجمع أخذ اجزاء من ريش هذه الطيور ووضعه في أكياس معقمة ومغلقة معدة لهذا الغرض ثم أخذ عينات أخرى من براز هذه الحيوانات ووضعها أيضاً في أكياس مخصصة لها ، و أخذ عينات أخرى من علف الحيوانات ووضعها في أكياس معقمة مغلقة، وكانت عملية الجمع تتم صباحا وكانت العينات تجمع بصورة متساوية لكل طير ايضا وإن الطيورالتي جمعت منها العينات كانت تبدو سليمة ، وتم تعليم هذه العينات حسب الاماكن التي جمعت منها سواء كانت من المنازل أو محال البيع ، وتم التركيز على جلب هذه العينات في نفس اليوم إلى المختبروبالسرعة الممكنة ليتسنى لنا البداية بعملية زرعها (الظاهر ، 2015).

### 3-2-2- الأوساط الزرعية Culture media

استخدمت عدة أوساط غذائية في تنمية وعزل وتشخيص وحفظ مزارع الفطريات ، و هي كما يأتي :

**A- أوساط زرعية جاهزة** : أُعتمد على تعليمات الشركة المصنعة عند تحضيرها وشملت ما يأتي :

### 3-2-2-1- وسط سابرود دكستروز اكار Sabouraud's – dextrose agar

أستخدم في عزل وتشخيص وتنقية الفطريات ، حُضّر هذا الوسط بأضافة المكونات أدناه وبعدها عُقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م:-

| | | |
|---|---|---|
| *سابرود-دكستروز-أكار | Sabouraud's Dextrose Agar | 65غم |
| *ماء مقطر | Distilled water | 1000مل |
| *مضاد الكلورامفينيكول | Chloramphenicol | 0.05غم |

### 3-2-2-2- وسط نقيع المخ والقلب Brain-Heart-Infusion-Agar(BHIA)

أُستخدم لعزل الفطريات و يزيد من حيوية العزلات أيضاً قبل استخدامها في التجارب،وحضربأضافة المكونات أدناه وبعدها عُقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م:-

| | | |
|---|---|---|
| *نقيع المخ والقلب | Brain heart agar | 37غم |
| *أكار | Agar | 20غم |
| *ماء مقطر | Distilled water | 1000مل |

**3-2-2-3- وسط أكار الدم Blood Agar(B.A.)**

أُستخدم في عزل الفطريات واختبار قدرتها على تحليل الدم،وحُضر بأضافة المكونات أدناه وبعدها عُقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م :-

| | | |
|---|---|---|
| *أكار الدم | Blood Agar base | 40غم |
| *دم بشري ،أضيف اليه بعد التعقيم والتبريد الى 45 م | Human blood | 50مل |
| * ماء مقطر | Distilled water | 950مل |

**3-2-2-4- وسط بطاطا دكستروز أكار Potato Dextrose Agar (PDA)**

أُستخدم هذا الوسط في عزل وتشخيص الفطريات و في إدامة حيويتها أيضاً قبل اجراء التجارب عليها، وحُضربأضافة المكونات أدناه وبعدها عُقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م :-

| | | |
|---|---|---|
| *أكار دكستروز البطاطا | Potato Dextrose Agar | 39غم |
| *ماء مقطر | Distilled water | 1000مل |
| * مضاد الكلورامفينيكول | Chloramphenicol | 0.05غم |

**B- أوساط زرعية مُحضرة مختبرياً** : وشملت ما يأي :

**3-2-2-5- وسط اختبار قدرة الفطريات على تحلل البروتين Protolytic activity test medium**

حضر وسط خاص لبيان قدرة الفطريات على تحليل البروتين بالاعتماد على Hankin and Anagnostakis (1975) وكالآتي:

حضر 8% من محلول الجيلاتين ، وذلك باذابته في الماء ،و حُضر أيضاً وبنفس الوقت 100 مل من وسط الاكار المغذي ،بعدها عُقم الوسطان كلّ منها على حدة ومن ثم أضيف الوسط الاول إلى الوسط الثاني وبمقدار 5مل /100 مل ، وتمت عملية مزجهما بشكل جيد ، بعدها تم تلقيح المزيج بـ 0.2 مل من عالق الفطريات ، ثم تمت عملية المزج بشكل جيد ثم صب المزيج في اطباق بتري معقمة وتركت مدة من الزمن لتتصلب ثم حضنت بدرجة حرارة 25 م .

وكانت المتابعة للأطباق بشكل يومي لمدة أسبوعين إذ ان ظهور منطقة رائقة حول المستعمرات تعني أن النتيجة إيجابية.

**3-2-2-6- وسط اختبار قدرة الفطريات على تحليل الدهون Lipolytic activity test medium**

حضر هذا الوسط بالاعتماد على Sierra (1957) لبيان القدرة على تحليل الدهون وكما يأتي :

حضر عن طريق مزج كلّ من 10 غم ببتون مع كلوريد الصوديوم 5 غم مع ثنائي كلوريد الكالسيوم المائي 0.1 غم مع الاكار 20 غم مضافاً اليها 1000 مل ماء مقطر وتمت عملية المزج بشكل جيد ، ثم وضع المزيج في المؤصدة ، و وضعت أيضاً مادة توين 80 بتركيز 1 مل بمعزل عن المزيج وتمت عملية التعقيم وبعد عملية التعقيم أضيف 1 مل لكل 100 مل من الوسط وبعد ذلك لقح الوسط وصب وحضن بنفس الطريق السابقة. إن ظهور منطقة رائقة حول المستعمرات يدل على ان النتيجة ايجابية.

**3-2-2-7- وسط إختبار القدرة على تحلل الدهون المفسفرة Phospholipase production test medium**

تم استعمال طريقة Price *et al.*,(1982) إذ حضر الوسط كما يأتي:

مزج 20 غم من الاكار المغذي مع 1 مولاري من محلول كلوريد الصوديوم مع 0.005 غم من محلول كلوريد الكالسيوم مع 8% من مسحوق مح البيض المعقم واضيف للمزيج 1000 مل من الماء المقطر، ومن ثم عقمت ولقحت وحضنت بنفس الطريقة السابقة. ان ظهور منطقة ترسيب حول المستعمرات يعني ان النتيجة إيجابية أيضاً.

**3-2-2-8- وسط إختبار القدرة على تحلل الدم Hemolysis activity test medium**

استخدمت طريقة Senior and Hughes,(1987) للتحري عن الفطريات التي تنتج العامل المحلل للدم وحضر الوسط كما يأتي :

* نبذ 5 مل من الدم المسحوب آنياً باستخدام أنابيب نبذ بلاستيكية مزودة بمانع التخثر للتخلص من البلازما والحصول على راسب خلايا الدم الحمراء.

* غسلت الخلايا مرتين متتاليتين بالمحلول الملحي الفسيولوجي المعقم إلى أن تم ترسيب الخلايا بالنبذ المركزي بعد كل غسل.

*اضيفت نسبة 5 % من الراسب إلى وسط اكار الدم الأساس المعقم بعد تبريده الى درجة حرارة (45-50)م وبعدها تم توزيعه في اطباق معقمة وحضن بدرجة حرارة 25 م لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم وجود أية عملية تلوث.

*زرعت العزلات بطريقة التخطيط على الأوساط التي تم تحضيرها ، وحضنت الأطباق في درجة حرارة 25 م ولمدة 24 ساعة لملاحظة قابلية العزلات على تحليل الدم من خلال تكوين هالة شفافة حول المستعمرات النامية.

### 3-2-3- زراعة العينات Culture of samples

زرعت العينات وكما ورد في الشبلي (2006) على الأوساط الزراعية المعدة لهذا الغرض بواقع ثلاث مكررات لكل عينة ، وعلّمت الأطباق بمعلومات تخص جنس الطائر والجزء الذي تمت زراعته ، كأن يكون ريشاً او برازاً او علف الحيوانات ، لكي تفيدنا هذه المعلومات لاحقاً بتشخيص نوع الفطر المعزول من هذه العينات، والأوساط الغذائية التي استخدمت هي S.D.A و P.D.A ، وبعدها تم وضع الأطباق في الحاضنة وبدرجة حرارة 25م ولمدة 4 ايام ومتابعتها لحين ظهور النموات فيها ، ليتم بعدها البدء بعملية التنقية والتشخيص.

### 3-2-4- تنقية العزلات الفطرية Purification of fungal isolates

تمت عملية التنقية للأنواع الفطرية ، وذلك من خلال نقل بعض أجزاء المستعمرات النامية بواسطة الناقل الجرثومي المعقم (sterilized loop) إلى أطباق فيها وسط سابرود دكستروز اكار معقمة حضرت لهذا الغرض ، وبعد ذلك تم حضنها في درجة حرارة 30 م لمدة 7 أيام لغرض الحصول على مستعمرات نقية وبعد ملاحظة النمو تمت عملية الحفظ بدرجة 4 م ومع

تكرار هذه العملية يتم تجديد المستعمرات التابعة للأنواع الفطرية المختلفة من وقت إلى آخر حسب الحاجة (Kwon-Chung and Bennett,1992) .

**3-2-5- التشخيص المختبري للعزلات الفطرية Identification of fungal isolates**

اعتمد التشخيص على الصفات المظهرية للمستعمرات ، وتشمل شكل المستعمرة ولونها وحجمها وقوامها والصبغات التي تنتجه ، أما بالنسبة للصفات المجهرية فقد تضمنت شكل الخيط الفطري ولونه والكونيدات ، وتم ذلك بنقل جزء صغير من المستعمرة الفطرية باستعمال ناقل معقم على شريحة زجاجية وباستخدام صبغة المثيل الأزرق ثم فحصت تحت المجهر لملاحظة الصفات المجهرية للغزل الفطري (Kwon-Chung&Bennett,1992;De Hooge *et al*.,2000;Watanabe,2002).

**3-2-6- حفظ وادامة العزلات الفطرية Maintance of fungal isolates**

للحفاظ على العزلات الفطرية لحين استعمالها زرعت في قناني زجاجية محكمة الغلق سعة 20 مل ، وملئت بوسط السابرود دكستروز اكار وبصورة مائلة ، ووضعت في الثلاجة بدرجة 4 م ، ولمدة شهرين وبعدها تمت اعادة زراعتها على وسط السابرود دكستروز اكار في طبق زجاجي وأعيدت العملية مرة اخرى حسب الحاجة (Colle *et al*.,1996).

**3- 2- 7- طرائق العمل الخاصة بالـ PCR**

**3- 2- 7-1 - العينات**

العينات هي عبارة عن 12 عزلة من فطر *A.niger* من طيور الزينة المستخدمة ضمن هذا البحث وهي الكناري ،و الحمام ، وطير الحب والفنجس وتمت بعدها عملية التنقية لتصبح جاهزة للاستخدام وشخصت بالطرق التقليدية والمستعمرات بعمر 7 أيام نميت على وسط PDA.

**3- 2- 7-2 – استخلاص وتنقية الـ DNA الفطري**

**أ. إستخلاص الـ DNA**

تم استخلاص الـ DNA من الفطر *A. niger* بالاعتماد على طريقة Cenis عام (1992)، مع بعض التحويرات، كما هو مذكور أدناه:

- قمنا بزرع العزلات على وسط الـ PDA الموضوع داخل أنابيب ( Eppendorf tube)، سعة 1.5 مل بـ 500 µl من وسط potato dextrose وتركها لتنمو لمدة 72 ساعة عند درجة حرارة 25 درجة مئوية.

- بعد نمو الغزل الفطري رُسبت الخيوط الفطرية بالنبذ المركزي لمدة 5 دقيقة بسرعة 13000 دورة في الدقيقة في جهاز النبذ المركزي.

- تم غسل الخيوط الفطرية بواسطة اضافة 500µl من دارئ الـ TE وتم ترسيب الخيوط من جديد.

- بعد إزالة دارئ الـ TE، تم اضافة 300 µl دارئ الاستخلاص. وبعد ذلك تم تكسير الخيوط الفطرية باستعمال عصا زجاجية ملائمة، بحيث تدخل في الانبوب تماماً. ويتم ضرب الخيوط الفطرية بحذر لعدة دقائق يدوياً.

- تم إضافة 150µl من محلول اسيتات الصوديوم (3M)، ذي الأس الهيدروجيني 5.2، ثم تم وضع الأنابيب بدرجة حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر لمدة 10 دقائق تقريباً.

- تم نبذ الأنابيب نبذاً مركزياً في جهاز نبذ مركزي للأنابيب الصغيرة (microcenterfuge)، وتم نقل الرائق إلى أنبوب آخر. وبعد ذلك، تم اضافة حجم مساو من مادة isopropanol المطلق، وبعد خمس دقائق من الحضن في درجة حرارة الغرفة، تم ترسيب الـ DNA بالنبذ المركزي.

- بعد غسل الـ DNA الراسب باستعمال 70% ايثانول، تم تجفيف الراسب لبضع دقائق في 50µl من دارئ الـ TE المحتوي على انزيم هضم الـ RNA (أي RNase A)، وتم حضنه لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.

**ب. تقدير كمية ونقاوة الـ DNA**

تم معرفة كمية ونوعية الـ DNA بواسطة جهاز Nanodrop (شركة Biodrop البريطانية).

- تمت وضع 2µl فقط من دارئ الـ TE في فتحة العينات للجهاز. ثم تم تصفير الجهاز باستعمال هذا المحلول.

- تم اضافة 2µl من الـ DNA المعزول من كل عينة فطرية في فتحة العينات المذكورة في أعلاه في هذا الجهاز. وتم استحصال النتائج بوحدات مايكروغرام لكل مل (µg/ml).
- تم قياس الامتصاصية بطول موجي 260 نانوميتر.
- تم قياس نقاوة عينات الـ DNA بشكل أوتوماتيكي بحساب نسبة 260/280.

**جدول(11) نقاوة وتركيز الـ DNA**

| رقم العينة | النقاوة | التركيز(µg/ml) |
|---|---|---|
| 1 | 1.8 | 505.5 |
| 2 | 1.7 | 284.9 |
| 3 | 1.4 | 16.2 |
| 4 | 1.3 | 33.9 |
| 5 | 1.4 | 26.9 |
| 6 | 1.8 | 208.1 |
| 7 | 1.5 | 24.5 |
| 8 | 1.6 | 45.1 |
| 9 | 1.8 | 158.8 |
| 10 | 1.6 | 198.8 |
| 11 | 1.4 | 38.8 |
| 12 | 1.7 | 227.1 |

### 3- 2- 7-3- تحضير البادئات Preparing the primers

ان البادئات المستخدمة في هذه الدراسة جهزت من قبل شركة Bioneer بهيئة محلول وحضرت طبقاً لما ورد في التعليمات المرفقة من قبل الشركة المصنعة وذلك بإضافة البادئ الى حجم مناسب ومحدد على العلبة الخاصة لكل بادئ من مادة Tris-EDTA وذلك لكي نحصل على 100 بيكامول / مايكرو لتر من Stock solution ،بعدها يتم اخذ التخفيف المطلوب بالاعتماد على المعادلة C1V1=C2V2 اذ نحضر تركيز بادئ مساوي ل10 بيكامول / مايكرو لتر.

### 3- 2- 7-4- تضخيم خليط التفاعل أو (تضخيم الجين)

تم القيام بتجربة التضخيم باستعمال جهاز الدوار الحراري التقليدي ( conventional PCR thermocycler، شركة $AE^{TM}$ الصينية)، كما في الآتي:

- الـ DNA القالب (template DNA): تم إضافة 100- 200 نانو غرام من الـ DNA الفطري المعزول الى أنابيب خليط الـ PCR المحضر مسبقا الجاهزة لإجراء تجارب الـ PCR.
- تم إضافة 1µl فقط من كل من البادئ الأمامي والخلفي إلى الخليط أعلاه.
- أضيف 17µl من الماء المقطر إلى خليط الـ PCR الجاهز كي يكون الحجم الكلي 20µl جدول (12) .

**جدول( 12)الأحجام والتراكيز الموصى بها في القيام بتفاعل الـ PCR في انابيب الـ PCR.**

| المكونات | الحجم | التركيز |
|---|---|---|
| PCR SuperMix | Lyophilized | 1X |
| forward primer | 1 µl | ~10 pmole |
| reverse primer | 1 µl | ~10 pmole |
| template DNA | 1 – 2 µl | ~ 50 ng |
| الحجم النهائي | 20µl | |

- تم حل وخلط المكونات الزرقاء لأنابيب الـ PCR بواسطة خلطها يدوياً ونبذها لعدة ثوان.
- تم وضع الخليط في جهاز المدور الحراري المبرمج سلفاً لاجراء التجارب المرغوب فيها للمنطقة الجينية قيد الدراسة (جدول 3- 2).
- تم تشغيل جهاز المدور الحراري لإجراء تجربة الـ PCR.

**جدول (13): ظروف تفاعل الـ PCR الموصى بها لإجراء عملية التضخيم. تم اختبار هذه الظروف في جهاز الدوار الحراري.**

| الخطوة | الحرارة | الوقت | عدد الدورات |
|---|---|---|---|
| Initial denaturation | 95°C | 4 minutes | 1 cycle |
| Denaturation | 95°C | 45 sec. | 30 cycles |
| Annealing | 52°C | 45 sec. | |
| Extension | 72°C | 45 sec. | |
| Final extension | 72°C | 5 minutes | 1 cycle |
| Holding | 4°C | Indefinite | 1 cycle |

رُحلت النتائج في هلام الأكاروز وصورت لاحقاً بإستعمال وحدة تصوير الهلام (Photodocumentation unit).

**3- 2- 7- 5- الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز**

تم الاعتماد على البروتوكول الموصوف من قبل Robinson and Lafleche (2000) في إجراء هذه التجارب.

أ. تهيئة الجهاز: تم وضع أمشاط العينات (samples' combs) في درج الهلام (gel tray) في مكانها المهيأ لها مسبقاً بعناية. ويكون ارتفاع هذه الامشاط في سطح

درج الهلام هو 1 mm مع ملاحظة كون موقع الامشاط هو قرب القطب السالب، أو الكاثود.

ب. تحضير الهلام: ان تركيز الاكاروز المستخدم في تجارب الـ PCR هو 2%. تم وضع 2 غرام من مسحوق هلام الأكروز في 100 مل من دارئ الـ TBE (1x). وبعذ ذلك، وضع المحلول على مصدر ناري لحين وصوله إلى الغليان. وبعد برهة، أي عند وصول درجة حرارة الهلام إلى مايقارب الـ 60 درجة مئوية، أضيف له 2.5µl، بتركيز 100mg/ml من محلول صبغة بروميد الاثيديوم الجاهزة (شركة Bio basic الكندية، رقم الكاتالوك D0197 ). وبعد ذلك، تم صب الهلام قبل أن يتصلب في درج الهلام مع مراعاة ازالة أي فقاعة هوائية محتملة. ثم يترك الهلام كي يتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة تقريباً. وبعد التصلب، يتم رفع الأمشاط من درج الهلام بلطف.

ت. تحميل العينات (Loading samples): يتم إضافة 5µl من كل ناتج من نواتج الـ PCR إلى حفر الهلام. ويوضع الواسم القياسي DNA ladder marker على يسار عينات الـ PCR المراد ترحيلها.

ث. يتم وضع الهلام في جهاز الترحيل الكهربائي بحيث يجب أن تكون الحفر قرب الكاثود. ثم يتم إضافة دارئ 1x TBE إلى وحدة الترحيل الكهربائي بحيث يكون ارتفاع الدارئ 5 mm تقريباً فوق الهلام.

ج. ظروف الترحيل الكهربائي: يتم تسليط 10 فولت لكل 1 سنتميتر من الهلام، ويستمر الترحيل الكهربائي الى أن تصل صبغة العينات المرحّلة إلى 50% من حجم الهلام في جهاز الترحيل الكهربائي (شركة Mupid اليابانية، موديل Mupid-One, a submarine type electrophoresis system ).

ح. بعد انتهاء الترحيل الكهربائي يتم تصوير النتائج باستخدام الاشعة فوق البنفسجية لجهاز UV translluminator والمجهز بوحدة تصوير مناسبة ملحقة به.

**3- 2- 7- 6- تجربة الأنزيمات القاطعة لنواتج الـ PCR، (أو restriction fragment length polymorphism أو RFLP)**

تم اجراء هذا البروتوكول وفقاً لـ Spadaro *et al* (2012) و (Alsudani and Al-Shibli, 2015). تضمن البروتوكول تحضير مزيج الـ PCR-RFLP باستخدام الانزيم القاطع *Rsa*I وكما في أدناه :

| مزيج الـ RFLP-PCR | الحجم |
|---|---|
| PCR Product | 5 µl |
| 1X dilution buffer | 2 µl |
| *Rsa* I restriction enzyme (10 units) | 0.5 µl |
| Free nuclease water | 12.5 µl |
| الحجم النهائي | 20 µl |

بعد خلط كل المكونات في أعلاه في الأنبوب، وضع هذا المزيج في حمام مائي، وتم حضنه بدجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة ساعتين ومن ثم تم تحميل 10µl من العينات في هلام الأكاروز (2%) في كل حفرة وتم إعادة البروتوكول نفسه للترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز المذكور في أعلاه.

## 3-2-8- اختبارات حساسية الفطريات للمطهرات والمضادات الحياتية

- **اللقاح الفطري**

حضر اللقاح الفطري بالاعتماد على Mc Ginnis (1980) وذلك بنقل جزء من المستعمرات النامية على وسط (SDA) بعد تنشيطها ، وذلك باستخدام ابرة معقمة ووضعها في انبوبة محكمة الغلق تحتوي على 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.

### 3-2-8-1- اختبار حساسية الفطريات للمطهرات

- **تحضـير تراكيـز المطهـرات Preparation of disinfectants concentration**

اتبعت طريقة المعموري (2010) في تحضير التخافيف المختلفة من المطهرات إذ اعتبر المحلول التجاري محلولاً خزيناً Stock solution ، وحضرت منه باقي التراكيز عن طريق عمل تخافيف عشرية بإضافة الماء المقطر المعقم ، بحسب مقتضيات الدراسة ، إذ تم الحصول على ثلاثة تراكيز هي 1% ، 5 % ، 10 % وقد اعتبر التركيز 0 % معاملة مقارنة.

- **طريقة العمل**

أخذ حوالي 0.2 مل من اللقاح الفطري ، ونشر على الطبق الذي يحتوي على وسط سابرود دكستروز اكار حضر مسبقا لهذا الغرض، وعملية النشر تمت باستخدام (L-spreader) وتركت الأطباق بعد عملية التلقيح لمدة 30 دقيقة،بعدها عملت حفر 5 ملم في الوسط الملقح بواسطة ثاقب الفلين ، اضيف 0.1 مل من كل تركيز من المطهرات الى هذه الحفر بواسطة ماصة دقيقة(Micro pipette) وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 28- 30 م مدة تراوحت بين يومين إلى ثلاثة أيام،بعدها تم قياس منطقة التثبيط(Inhibition zone) بوحدات المليمتر ( Prize *et al*., 1990)

## 3-2-8-2- اختبار حساسية الفطريات للمضادات الحياتية

استخدمت طريقة الانتشار بالأقراص (Disc diffusion) Casals,(1979) إذ أخذ حوالي 0.2 مل من العالق الفطري ، لكل نوع فطري ، وتم تلقيحها ونشرها على سطح وسط SDA المحضر مسبقاً في أطباق بتري وبإستخدام الناشر الجرثومي (L-spreader)،وتركت الأطباق مدة من الزمن تقدر بساعة واحدة ، وبوضع مستوٍ ثم وضعت الأقراص على سطح الوسط الغذائي باستخدام ملقط معقم (قرص واحد لكل عقار) وبواقع مكررين لكل حالة . حضنت الأطباق في درجة حرارة 28-30 م ولمدة 2-3 أيام ، وبعدها سجلت النتائج بقياس منطقة تثبيط النمو(Inhibition zone) حول كل قرص باستخدام مسطرة إذ إن مناطق التثبيط تمثل المناطق الخالية من النمو الجرثومي، وبالاعتماد على اقطار مناطق التثبيط القياسية الموصوفة من قبل Himedia Laboratories Limited,(1993) .

## 3-2- 9- التحليل الإحصائي Statistical Analysis

أخضعت جميع نتائج الدراسة للتحليل الإحصائي لمعرفة الاختلافات المعنوية ، وقد تم استخدام كل من اختبار مربع كاي Chi-square test، تحليل التباين الثنائي Two way Anova و تحليل التباين المتعدد Multiple way Anova لهذا الغرض، وقد حددت الاختلافات المعنوية عند مستوى احتمالية 5 % (Schiefer,1980).

# الفصل الرابع

## النتائج والمناقشة

**4- 1- العزل والتشخيص**

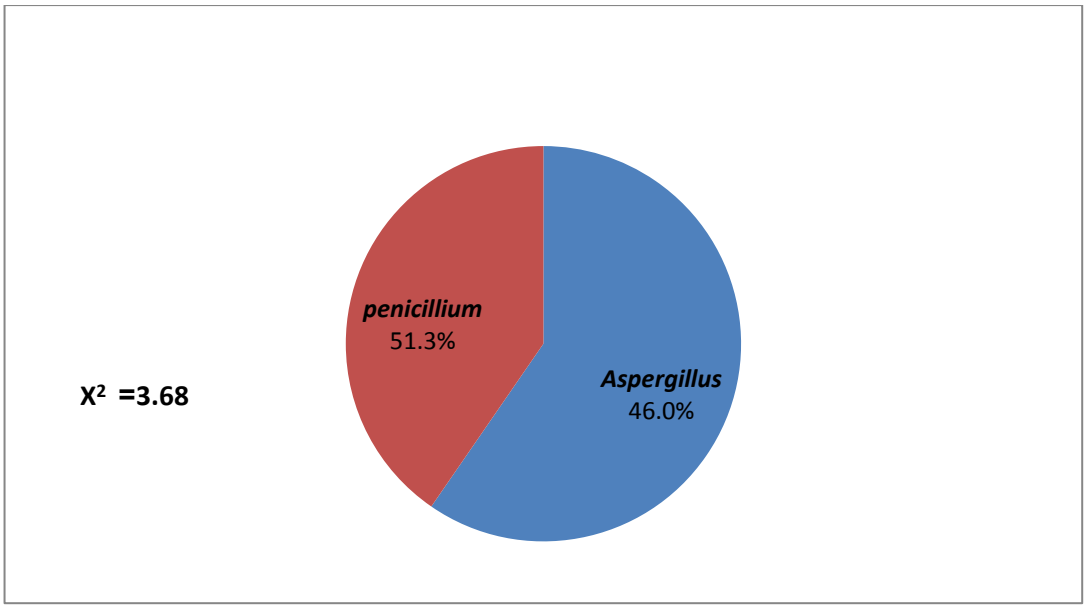
**4-1- 1- الأنواع الفطرية المعزولة تبعاً لنوع الطائر**

أظهرت النتائج تبايناً في النسب المئوية وأعداد الأنواع الفطرية المعزولة من أنواع الطيور الأربعة المختارة للدراسة وهي الحمام ،الكناري،طير الحب والفنجس ،وتم الأعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية لتشخيص هذه الأنواع وكانت كالآتي : *A.niger* ، *P.digitatum* ، *Alternaria alternata* ، *Mucor sp.*، تم حساب نسبة الظهور تم من خلال عدد مرات ظهور الفطر مقسوماً على عدد الفطريات الكلي ،فقد ظهر الفطر *A.niger* في الحمام 50 مرة (71.6%) تلاه طير الحب إذ ظهر 37 مرة (59.6 %)، و ظهر 35 مرة (46%) في طائر الكناري وأخيراً ظهر الفطر 33 مرة (54%) في طائر الفنكس ، يليه الفطر *P. digitatum* و بنسبة ظهور 39 مرة (51.3%) في طائر الكناري، 27 مرة ( 44.2%) في طائر الفنجس، 25 مرة (40.3%) في طير الحب ، و 20 مرة في الحمام (28.4%)،وجاء الفطر *alternata Alternaria* في المرتبة الثالثة إذ ظهر مرتين وبنسبة (2.70%) في طائر الكناري فقط ولم يسجل ظهوره في الطيور الثلاثة الاخرى، أما الفطر *Mucor sp.* فقد ظهر بأقل نسبة بالمقارنة مع الفطريات الاخرى إذ ظهر مرة واحدة فقط (1.80%) في طائر الفنكس فقط و لم يسجل ظهوره في الطيور الاخرى (شكل 4،5،6،7).

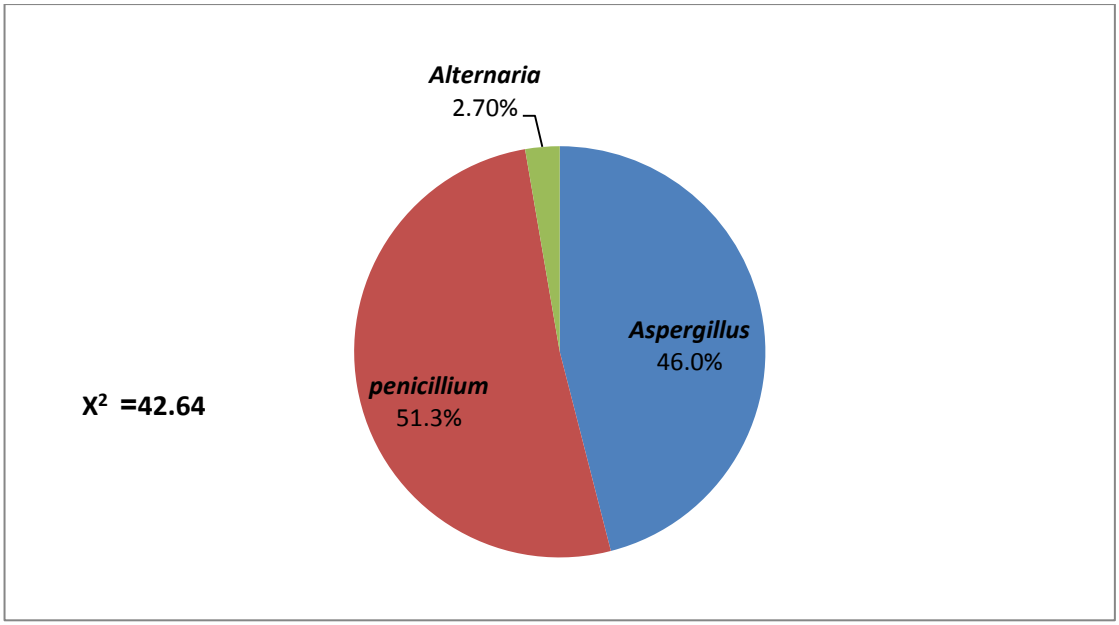
إن الفطريات التي تنتمي للجنس *Aspergillus* تعتبر من أهم الفطريات التي تصيب الطيور ويعتبر الجنس*A.fumigatus* هو المسؤول عن إصابة Aspergillosis في كلّ من الطيور والإنسان ،وسجلت الأنواع الأخرى التابعة لهذا الجنس مثل *A. flavus, A. niger* و *A. nidulans* أيضاً كمسببات لهذا المرض فضلاً عن التسمم الفطري ( Beernaert *et al.*, 2010).

يكون نمو هذا الجنس على مختلف أنواع المواد ايضاً انتاجه للأبواغ والتي تلوث البيئة والهواء لبيوت الطيور ويمكن أن تستنشق هذه الأبواغ من قبل الطيور مسببة المرض ، ولا سيما الطيور القليلة المناعة أو الطيور التي تستنشق كميات كبيرة من هذه الابواغ ( Hashempour *et al*., 2011; Beernaert *et al*., 2010) . و أظهرت الدراسات الفطرية التي اجريت على عينات من أعلاف الطيور الداجنة وجود انواع من *Aspergillus* المختلفة إذ بلغ عدد مرات ظهور هذا الفطر 136 مرة (52.71%) بينما الأجناس الأخرى المتمثلة بـ *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp. و*Rhizopus* spp.. كان عدد

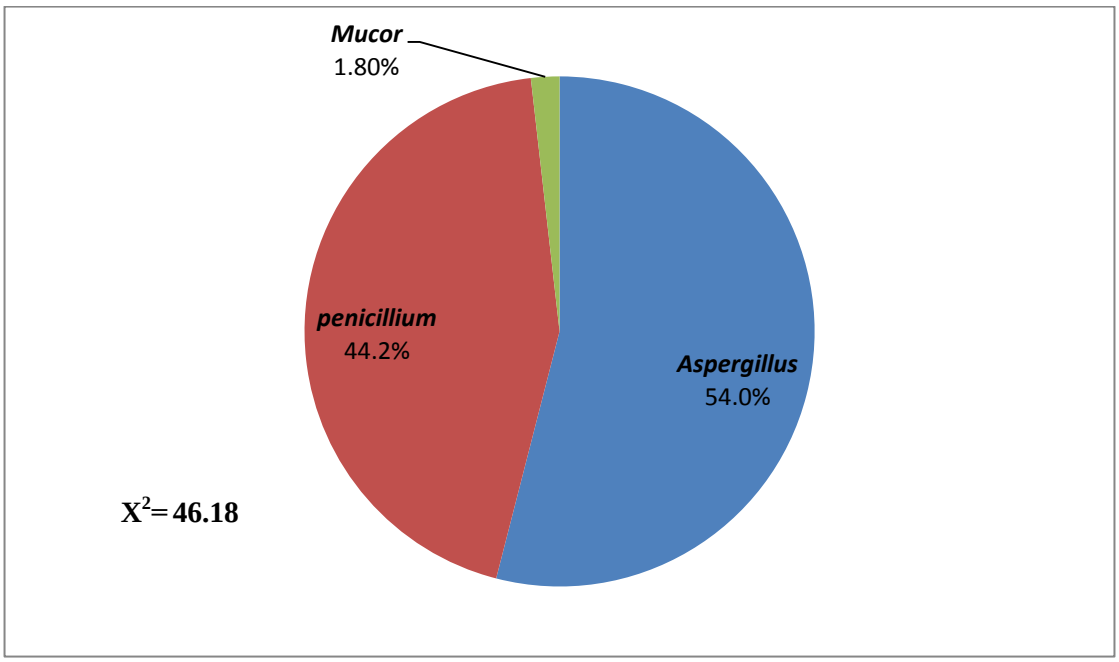
مرات ظهورها 122 (47.29%) (Aliyu *et al*.,2016) ، وفي دراسة أجريت على طيور الدجاج الأيراني ، إذ حصل فيها على 190 عزلة شملت 10 أجناس فطرية منها *Aspergillus* (54.2%) ، تلاه الجنس *Mucor* (8.4%) ، ثم الجنس *Penicillium* (5.3%) وأخيراً الجنس*Alternaria* بنفس النسبة (5.3%) (Mehdi *et al*.,2014، وفي دراسة أجريت على الطيور في اسبانيا تم عزل بعض الأجناس الفطرية وكان عدد مرات ظهور الفطر *Aspergillus* هو 21 مرة (48.84%)، تلاه الفطر *Penicillium* 13 مرة (30.23%) ، ثم الفطر *Alternaria* 4 مرات (9.3%) وأخيراً الفطر *Mucor* بمرتين فقط (4.65%) (Garcia *et al*,2007).



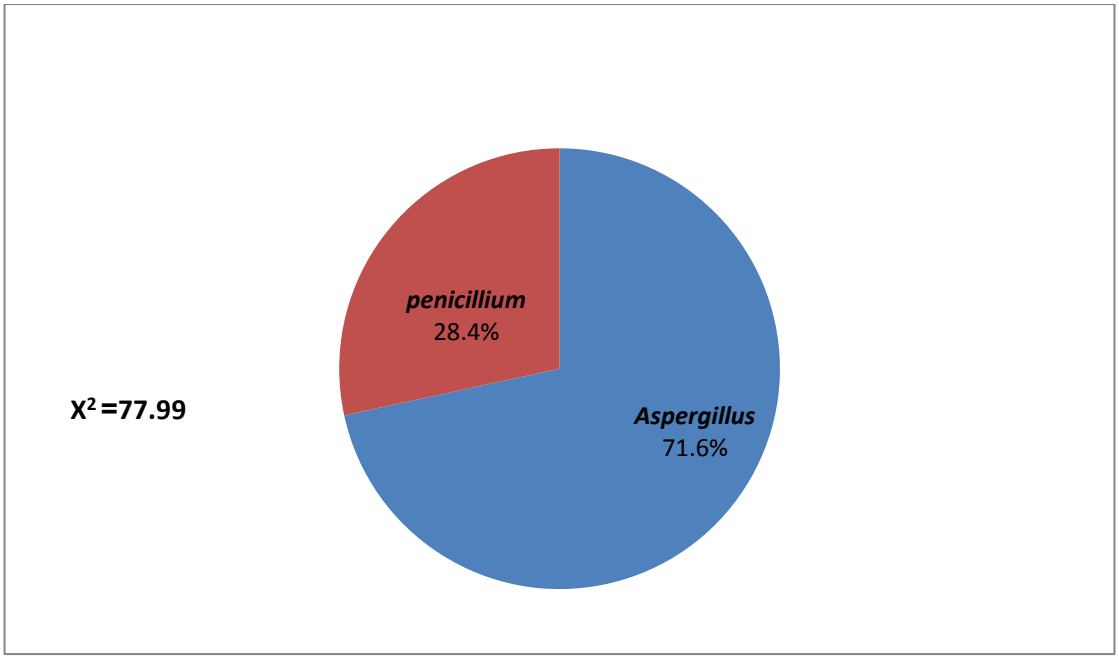

**شكل (4) النسبة المئوية للعزلات الفطرية المعزولة من طائر الحب**




شكل (5) النسبة المئوية للعزلات الفطرية المعزولة من طائر الكناري




شكل (6) النسبة المئوية للعزلات الفطرية المعزولة من طائر الفنجس




**شكل (7) النسبة المئوية للعزلات الفطرية المعزولة من طائر الحمام**

### 4-1-2- الأنواع الفطرية المعزولة تبعاً للجزء المعزولة منه :

يبين الجدول (14) الأعداد والنسب المئوية للفطريات المعزولة بحسب أجزاء جسم الطائر إذ تباينت الأعداد والنسب بحسب جنس الطير وكانت كالاتي :

فيما يخص الريش فإنه قد تفوق من حيث نسب وأعداد الفطريات المتواجدة فيه، فقد ظهر الفطر *A. niger* في ريش الحمام 26 مرة (83.87%) في حين ظهر في ريش الفنكس 14 مرة (66.66%) ، أما في ريش طائر الحب 10 مرات (58.83%) ، وأخيراً ظهر في ريش الكناري 8 مرات (42.1%)، أما في العلف فقد ظهر نفس الفطر في علف الكناري 18 مرة (54.54%) وفي علف الحمام 15 مرة (71.42%)، أما في علف طائر الحب فقد ظهر 15 مرة (60%) وأخيراً في علف الفنكس 11 مرة (40.74%)، أما بالنسبة للبراز فقد ظهر الفطر *A. niger* بأعلى نسبة ظهور في براز الحمام 19 مرة (67.85%)، تلاه براز طائر الحب 12 مرة (60%) ، براز الكناري 9 مرات (37.5%) واخيراً في براز الفنكس 8 مرات

(61.53%)،وجاء الفطر*Penicillium digitatum* بعدد مرات الظهور ففي الريش قد ظهر الفطر بأعلى عدد في ريش الكناري 10 مرات (52.63%) ، ثم في ريش طير الحب7 مرات ( 41.17%)، وفي ريش الفنكس 7 مرات ( 33.34%)، وأخيراً في ريش الحمام 5 مرات (16.13%). أما فيما يخص العلف فقد ظهر الفطر في علف الفنكس 15 مرة (55.55%) وفي علف الكناري ظهر أيضاً 15 مرة (45.46%) ، وفي علف طير الحب 10 مرات (40%)، وأخيراً في علف الحمام 6 مرات (28.57%)،أما بالنسبة للبراز فقد سجل الفطر ظهوراً أعلى في براز الكناري 14 مرة (58.3%)، تلاه في براز الحمام 9 مرات (32.14%) ، في براز طائر الحب 8 مرات (40%) ، وأخيراً في براز الفنجس 5 مرات ( 38.46%)، أما فيما يخص الفطر*Alternaria alternata* فقد ظهر فقط في ريش الكناري وبرازه ولمرة واحدة (5.26%)، (4.16%)على التوالي ، ولم يظهر في الطيور الاخرى، الفطر*Mucor sp* وأتى أخيراً بظهوره مرة واحدة فقط في علف الفنكس (3.70%) ولم يسجل حضوره في الطيور الاخرى.

ان للطيور دوراً رئيساً في تلوث البيئة وانتشار العديد من الممرضات من خلال برازها إذ إن سلوك هذه الطيور يكون بأتجاه انها تكون جماعات عند بحثها عن الغذاء والمأوى، وهذا يساهم في انتقال الممرضات إلى الانسان، من جهة أخرى تكون الطيور حاملة لمختلف الممرضات ولكنها تبدو سليمة ، وهذا مما يزيد من فرص انتقال هذه الممرضات الى الانسان والفطريات الموجود في براز الطيور يمكن أن تكون خطراً على الإنسان والحيوان ،والنسبة العالية لظهور الجنس *Aspergillus* تعزى إلى أنه من الفطريات الأكثر انتشاراً في الطبيعة وفي مختلف البيئات إذ يكون محمولاً في الهواء وفي التربة والغذاء والنباتات والماء وعلى سطوح المواد المتحللة، كل هذه الأسباب جعلت نسبة ظهوره أكبر (Mendes *et al*.,2014 ).

هناك دراسات أجريت للتحري عن الفطريات في براز بعض الطيور، وقد تبين وجود 8 أجناس فطرية من ضمنها *Alternaria* (0.4%)، *Aspergillus* (7.6%)، *Mucor* (22.3%) والجنس *Penicillium* (0.8%) (Nwadiaro *et al* .,2015)، وفي دراسة اخرى أجريت لمعرفة مدى تلوث غذاء الطيور بالفطريات تبين أن السيادة كانت لجنس *Aspergillus* ،تلاه الجنس *Alternaria*، ثم الجنس *Fusarium*، ثم الجنس *Penicillium* ( Saleemi *et al*.,2010)، وفي دراسة ثالثة أجريت لفحص البراز من أقفاص الطيور وجدت النسب الاتية *Aspergillus* (8%)،*penicillium* (6%)،*Mucor* (4%) ( Mendes *et al*.,2014 )، و في دراسة رابعة تم عزل الأجناس *Aspergillus* و *Penicillium* من ريش الطيور وكانت

نسبة ظهور الفطر *Aspergillus* أكثر من الفطر *Penicillium* (Arenas-Castro *et al*., 2016).

**جدول (14) أعداد ونسب الفطريات المعزولة بحسب اجزاء جسم الطائر**

| الطيور | اجزاء الجسم | الفطر | العدد | النسبة المئوية |
|---|---|---|---|---|
| طير الحب | الريش | *A.niger* | 10 | %58.83 |
| | | *P.digitatum* | 7 | %41.17 |
| | العلف | *A.niger* | 15 | %60 |
| | | *P.digitatum* | 10 | %40 |
| | البراز | *A.niger* | 12 | %60 |
| | | *P.digitatum* | 8 | %40 |
| الكناري | الريش | *A.niger* | 8 | %42.1 |
| | | *Alternaria alternata* | 1 | %5.26 |
| | | *P.digitatum* | 10 | %52.63 |
| | العلف | *A.niger* | 18 | %54.54 |
| | | *P.digitatum* | 15 | %45.46 |
| | البراز | *A.niger* | 9 | %37.5 |
| | | *Alternaria alternata* | 1 | %4.16 |
| | | *P.digitatum* | 14 | %58.4 |
| | الريش | *A.niger* | 14 | %66.66 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| %33.34 | 7 | *P.digitatum* | | الفنجس |
| %40.74 | 11 | *A.niger* | العلف | |
| %3.70 | 1 | *Mucor sp.* | | |
| %55.55 | 15 | *P.digitatum* | | |
| %61.53 | 8 | *A.niger* | البراز | |
| %38.47 | 5 | *P.digitatum* | | |
| %83.87 | 26 | *A.niger* | الريش | الحمام |
| %16.13 | 5 | *P.digitatum* | | |
| %71.34 | 15 | *A.niger* | العلف | |
| %28.57 | 6 | *P.digitatum* | | |
| %67.86 | 19 | *A.niger* | البراز | |
| %32.14 | 9 | *P.digitatum* | | |

**$X^2 = 286.44$**

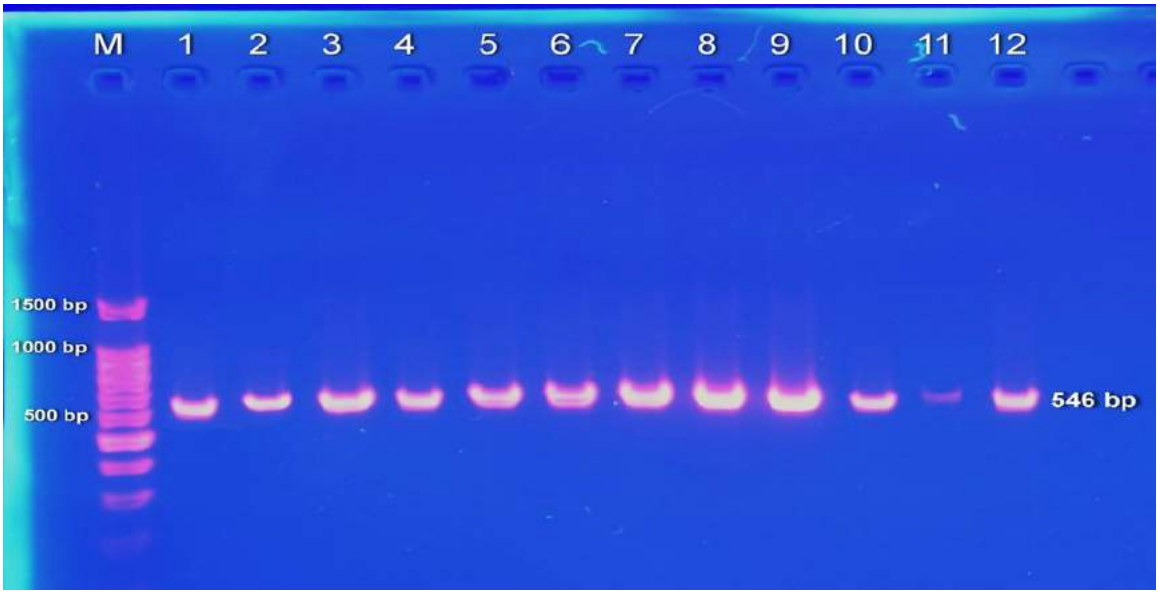
### 4-1-3- التشخيص الجزيئي

نظراً لكون الفطر *A.niger* هو الأكثر تكراراً من بين الأنواع المعزولة في الدراسة لذلك تم الأعتماد على تقنية الـ PCR في تشخيصه إذ اختبرت 12 عزلة منه بالأعتماد على بادئات متخصصة للتشخيص وقد أظهرت النتائج وجود حزمة ذات طول 546 bp بعد ترحيلها على هلام الأكاروز (شكل 8) وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره Alsudani and Al-Shibli, (2015).

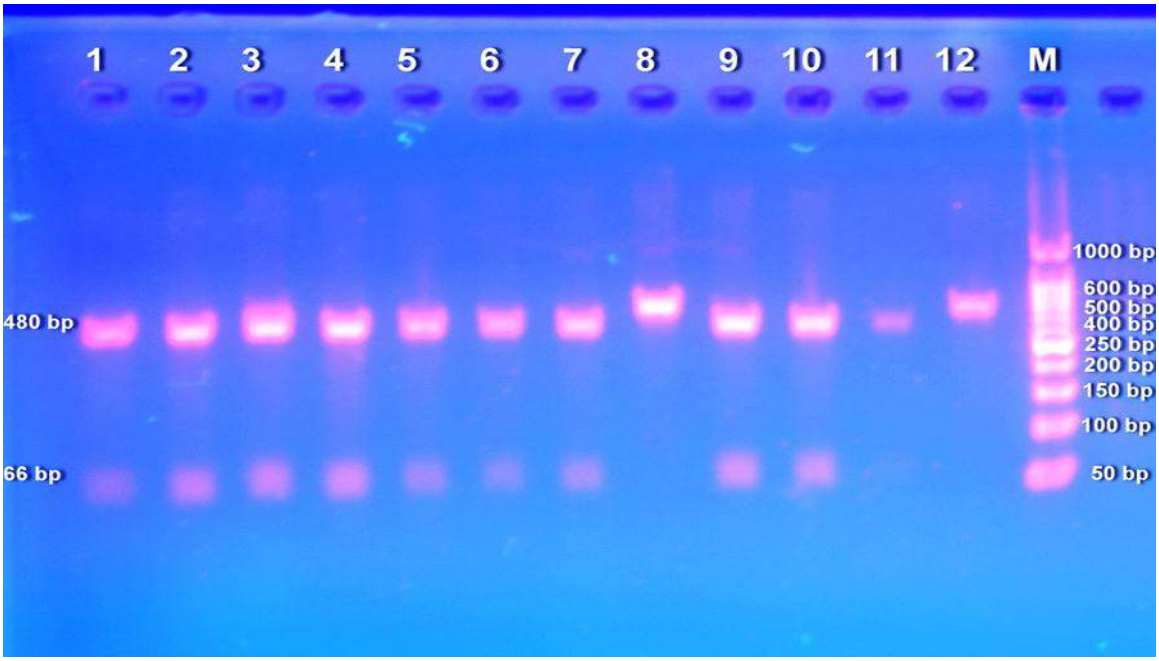
لغرض معرفة التغايرات الوراثية الناتجة من الطفرات النقطية وغيرها فقد تم الإعتماد على طريقة الـ RFLP-PCR وبإستخدام القاطع RsaI إذ ظهر إن هنالك عينتين فقط لم تهضم

باستخدام هذا الانزيم وهما العينة رقم 12 والعينة رقم 8(شكل 9)، وهذا يعود الى حدوث تغير في التسلسل الهدف (recognition sequences) والذي يعمل عليه الانزيم القاطع RsaI. ويعود هذا التغيير الى وجود تغاير نيوكليوتيدي مفرد ( single nucleotide polymorphism) أو SNP لموقع واحد في هذا الموقع قيد الدراسة. وهذه الـ SNP قد لاتكون واحدة فقط وانما قد تكون أكثر من واحدة. لذا، لابد من استخدام تقنية معرفة التسلسل (sequencing) للعينيتين رقم 8 ورقم 12 وذلك لغرض تقصي طبيعة التغاير الوراثي الحادث في هذا الموقع الجيني.

ان التغاير الوراثي الحادث لتلك العينيتين قد يعود الى وجود عوامل بيئية مسببة لذلك أو قد تعود الى وجود تغاير تصنيفي لتلك العينتين أو العزلتين. لذا، فان الفيصل في معرفة طبيعة هذا اتغاير هو اجراء تجارب الـ sequencing وهذا قد يعطي اجابة شافية لعدم قطع تلك العينيتين بالأنزيم القاطع، أما بقية العينات العشر، فقد أبدت نمطاً متوقعاً في انقطاعها الانزيمي، وهذا يتفق مع عدد من البحوث الأخرى المنشورة في هذا المضمار، والتي قد توصلت الى نتائج مشابهة، كما في (Alsudani and Al-Shibli, 2015, Spadaro, *et al*., 2012).



**شكل (8): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز(2%) لناتج الـ PCR (546 زوج قاعدي) للفطر *A. niger* بأستخدام صبغة بروميد الأثيديوم بحيث M : واسم الدنا DNA marker ، 1 الى 12 عزلات الفطر المدروسة بظروف ترحيل 100 فولت / 30 دقيقة.**




**شكل (9): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز(2%) لناتج الـ PCR (546 زوج قاعدي) المهضومة بواسطة الانزيم القاطع RsaI (PCR/RFLP) للفطر *A. niger*.**

**بحيث M : الواسم الحجمي ladder marker ، 1 إلى 12 عزلات الفطر المدروسة**

**بظروف ترحيل الكهربائي 100 فولت / لمدة 30 دقيقة .**

## 4-2- عوامل الضراوة للفطرين *A.niger* و *P.digitatum*

### 4-2-1- القدرة على انتاج انزيمات تحلل البروتين

يبين الجدول (15) قدرة العزلات الفطرية على انتاج البروتينيز إذ تم عزل هذه الفطريات من مصادر متعددة وهي ريش وعلف وبراز الطيور المختارة للدراسة وقد تبين ان الجنس *A.niger* له قابلية أكبر من جنس *P.digitatum* على انتاج البروتينيز في مختلف العزلات ومن مختلف مصادر العزل إذ تقاس هذه الفعالية من خلال قياس منطقة التحلل التي انتجها الفطر ففي الريش انتج الفطر *A.niger* منطقة تحلل مقدارها ( 4.6ملم)، وفي البراز كانت منطقة التحلل بمقدار (3.6ملم) وفي العلف انتج منطقة تحلل (3.3ملم)،

أما بالنسبة للجنس *P.digitatum* في العلف فقد كانت منطقة التحلل (3ملم) بينما في الريش كانت بمقدار (2.6ملم) وفي البراز كانت (2ملم) .

تنتج الفطريات الخيطية ضمن مدى واسع مختلف أنواع الأنزيمات المحللة للبروتين وتنمو هذه الفطريات في مختلف الظروف البيئية،من pH وحرارة مستخدمة مختلف المواد الاساس بوصفها مغذيات ، وهناك دراسات أظهرت أن مصادر الكاربون المختلفة لها تأثيرات متباينة على انتاج الانزيمات الخارج خلوية وتأثير مصادر النتروجين مثل الجيلاتين ،الببتون،الاسبارتيك اسيد،والكازائين سجل أيضاً بوصفه محفزاً لتراكم البروتييز في الأوساط الزرعية لفطر *A. terreus* Ikram *et al*.,2006; Nehra *et al*.,2002; Ashour *et al*.,1996).

إن هذه الاختلافات بين الجنسين من حيث انتاج هذا الانزيم ربما تعزى الى التركيب الوراثي لكلّ منهما كما بينه Oyeleke *et al*.,(2010)، أو ربما تعزى إلى قابلية المواد الأساس على التغيير الكيميائي لها أو ربما تكون مكونات الاوساط لها تأثير على انتاج هذه الانزيمات ، وأن درجة الحرارة لها تأثير على فعالية هذا الانزيم ، فقد وجد أن الفعالية المثلى لهذا الانزيم عند درجة حرارة 40 م ، بينما تلاحظ الفعالية الواطئة لهذا الانزيم عندما تتعرض جزيئة الانزيم البروتينية للمسخ الحراري، وهذا الاستنتاج يتعارض مع ما توصل اليه Oyeleke *et al*.,(2010) الذي أثبت أن الفعالية المثلى للانزيم تكون عند درجة 30 م وذلك عند فحصه لعزلات *A.flavus* و *A.fumigatus*، و وجد ان الـ pH له تأثير في فعالية هذه الانزيمات إذ إن pH الأمثل للانتاج كان 4 – 6 .

ان انتاج البروتييزات الخارج خلوية من المحتمل ان يكون محدداً للأمراضية ومنها alkaline protease, metalloprotease و aspartic protease المفرزة من عزلات الفطر *Aspergillus* ، والدليل على ذلك أن العزلات الطافرة من هذا الفطر التي تفتقد واحداً او أكثر من هذه الأنزيمات يكون تأثيرها قليلاً على معدل الوفيات في الإنسان والحيوان (Birch *et al*.,2004).

و لقد لوحظ في بعض الدراسات فعالية التحلل البروتيني بواسطة الانزيمات المفرزة من الفطريات الخيطية في الفطر *Aspergillus* (20.35 U )، والفطر *Penicillium* (18.65 U) ، والفطر *Fusarium* (18.34 U ) على التوالي إذ إن انواع الفطر *Aspergillus* تفرز أنزيمات التحلل البروتيني اكثر من الفطريات الاخرى (Rodarte *et al*.,2011)، وفي

الدراسات التي أجريت لبيان انتاج الفطريات للبروتينيز أثبت ان الفطر *A.niger* قد انتج الانزيم بنسبة( 49 %) بينما انتجه الفطر *Penicillium frequestans* بنسبة (44%)،

وفي دراسة أخرى أجريت على بعض العزلات الفطرية لأجناس مختلفة لقحت على وسط يحتوي على( 1%) من casein وكانت النتائج كالاتي :كانت اعلى نسبة انتاج من الانزيم هي للفطر *Fusarium solani* (98 U/ml) تلاه الفطر *Aspergillus ochraceous* (95 U/ml)، تلاه الفطر *Penicillium oxalicum* (91 U/ml) ثم الفطر *A.niger*(87U/ml) (Muthukrishnan and Mukilarasi ,2016).

**جدول (15) قدرة الفطرين *A.niger* و *P.digitatum* على انتاج إنزيم البروتينيز**

| مصدر العزلة | الفطر | منطقة التثبيط بالمليمتر ± الخطا القياسي |
|---|---|---|
| الريش | *A.niger* | 4.6±0.14 |
| | *P.digitatum* | 2.6±0.22 |
| العلف | *A.niger* | 3.3±0.08 |
| | *P.digitatum* | 3±0.28 |
| البراز | *A.niger* | 3.6±0.18 |
| | *P.digitatum* | 2±0.32 |

قيمة اقل فرق معنوي LSD= 1.48

## 4-2-2- القدرة على انتاج اللاييز

يبين الجدول (16) قدرة الفطريات على انتاج اللاييز إذ ظهر أن الفطر *A.niger* هو الاكثر فعالية في تحلل الدهون إذ إن الفطر المعزول من الريش كان الأعلى مقداراً بالتحلل إذ بلغت منطقة التحلل (5 ملم)، تلاه نفس الجنس المعزول من العلف ، إذ كانت منطقة التحلل بمقدار (4.3 ملم) ثم الفطر المعزول من البراز بمنطقة تحلل بلغت (3.6 ملم). أما بالنسبة للفطر *P.digitatum* فقد جاء بعد الفطر *A.niger* من حيث فعاليته المحللة للدهون فكان الفطر

المعزول من الريش هو الاعلى بمنطقة تحلل (4 ملم) تلاه الفطر المعزول من البراز (3.6 ملم) ثم الفطر المعزول من العلف (3ملم).

تختلف الفطريات من حيث الفعالية المحللة للدهون وهذه الاختلافات تعزى إلى سعة الاستيعاب لها لانتاج اللايبيزوالتي ترتبط بمعدل تحليل الكليسيريدات الثلاثية لتنتج الأحماض الدهنية الحرة والكليسرول وهذا السبب مدعوم من قبل Negedu *et al*., (2010); Bhattacharya and Raha, (2004); Bankole and Joda, (2004) الذين أثبتوا أن قدرة الفطر بالتواجد على المواد العضوية تعتمد على قدرة الفطر نفسه بانتاج الانزيمات الضرورية، واستيعاب انتاج الانزيمات الخارج خلوية في المادة الاساس، بالإضافة إلى ذلك أن الفعالية المحللة للدهون للفطريات ربما تكون نتيجة للأفراد التي تظهر الخصوصية والأولوية باستخدام الأحماض الدهنية كمصدر للكاربون ، والحقيقة أن الفطر *Aspergillus tamarii* يمتلك أعلى وزن جاف من الغزل الفطري على وسط النمو وربما يعزى إلى معدل تحليله السريع واستهلاك نواتج التحلل الدهني وهي الأحماض الدهنية الحرة والكليسرول (Negedu *et al*.,2012)، يستخدم زيت الزيتون أيضاً محفزاً للفطريات من أجل ان تنتج الانزيمات إذ اعطى نتائج جيدة في معظم الدراسات (Teng and Xu, 2008; Wang *et al*., 2008; Ertugrul *etal*., 2007) ، و وجد ان انزيمات اللايبيزات المنتجة من سلالات الفطر *Aspergillus* هي اكثر فعالية بين pH 4-7 وعند درجة حرارة بين 40-50 م (Savitha *et al*.,2007).

وفي دراسة أجريت لبيان قدرة الفطريات على انتاج اللايبيز وتبين منها ان كل الفطريات المعزولة قادرة على انتاج هذا الانزيم لكن بدرجات متفاوتة ، إذ ظهر أن الفطر *A. niger* في قمة الترتيب من حيث الانتاج تلاه الفطر *p. camemberti* (Saleem,2008)،و في دراسة أخرى تم اجراؤها للتعرف على قابلية الفطريات على تحليل الدهون ظهر أن الفطر *Penicillium* هو الاكثر فعالية في عملية التحلل الدهني إذ كان مقدار منطقة التحلل هو (2.81U) تلاه الفطر *Aspergillus* وبمقدار (2.03 U) (Colla *et al*.,2010)، وفي دراسة أخرى تبين ان الفطر *Aspergillus* له فعالية أكبر في انتاج اللايبيز أكثر من الفطر *Penicillium* إذ وجد ومن خلال بعض الفحوص التي أجريت على بعض الأجناس الفطرية التي تنتج اللايبيز ان الأعلى أنتاجاً هو الفطر *A. niger* ، تلاه الفطر *A. terreus, A. fumigatus* و *Fusarium moniliforme* ، والأقل انتاجاً كان الفطر *Penicillium chrysogenum* و *Alternaria alternata* (Moubasher *et al*.,2016).

**جدول (16) قدرة الفطرين *A.niger* و *P.digitatum* على انتاج اللاييز**

| مصدر العزلة | الفطر | منطقة التثبيط بالمليميتر ± الخطا القياسي |
|---|---|---|
| الريش | *A.niger* | 5±0.64 |
| | *P.digitatum* | 4±0.18 |
| العلف | *A.niger* | 4.3±0.24 |
| | *P.digitatum* | 3±0.12 |
| البراز | *A.niger* | 3.6±0.15 |
| | *P.digitatum* | 3.6±0.26 |

**قيمة اقل فرق معنوي LSD= 1.86**

**4-2-3- القدرة على انتاج إنزيم تحلل الدهون المفسفرة**

فعالية انتاج انزيمات تحلل الدهون المفسفرة تتم بقياس منطقة الترسيب Precipitation zone وحسب المعادلة الآتية :

$$\textbf{Pz( precipitation zone)} = \frac{\text{قطر المستعمرة}}{\text{قطر منطقة النرسيب}}$$

**Pz= 1.00 negative**

**$0.64 \leq pz \leq 1$ positive**

**$pz \leq 0.64$ strong positive**

وتبين النتائج في جدول (17) قدرة الفطريات على انتاج الفوسفولايبيز إذ تباينت العزلات الفطرية في فعاليتها على انتاج هذه الانزيمات وكانت كالآتي :

كانت فعالية الفطر *A.niger* أكبر إذ إن الفطر المعزول من البراز أظهر أكثر فعالية من حيث انتاج هذا الانزيم بمنطقة تحلل( 8.6 ملم) ، تلاه نفس الفطر والمعزول من الريش بمنطقة تحلل قدرها (6.6 ملم) ثم نفس الفطر والمعزول من العلف بمنطقة تحلل مقدارها (5 ملم).

وأظهر الفطر الاخر وهو *P.digitatum* فعالية تحلل لكن أقل من الفطر *A.niger* إذ سجل الفطر المعزول من البراز أعلى نسبة وهي (5 ملم) ، تلاه نفس الفطر والمعزول من الريش بمنطقة تحلل مقدارها( 3.6 ملم) ، ثم الفطر المعزول من العلف بمنطقة تحلل (2 ملم).

ظهر من خلال التحليل الوراثي لمورثات *A. fumigatus* انها تحتوي على عامل مفرز واحد من PLA، وأثنين من PLB's، وثلاثة من PLC's و اثبتت فعالية افراز PLB, PLA , و PLC الخارج خلوية أيضاً ( Robson, 2009).

إن الفوسفولايبيز الخارج خلوي عامل مهم بالامراضية للفطر *A. fumigatus* بسبب أن الإصابة خلال الرئة والحجم الصغير لكونيدات الفطر، وهذا يعني ان اتصالها مباشر بالسطوح الطلائية للحويصلات ، والتي تتكون من 90% من الفوسفات الدهنية، ولذلك يكون الإنبات والنمو في بيئة غنية وبصورة كبيرة بالدهنيات الفوسفاتية (Veldhuizen *et al*., 1998 )، و يساهم بوصفه عامل ضراوة إذ يحلل خلايا المضيف ويغير خواصها المميزة ، و من الممكن ان يساهم بالالتصاق ومن ثم الاختراق الى داخل انسجة المضيف (Ibrahim *et al*,1995)،و لقد وجد Cole *et al*.,(1990) ان انزيم الفوسفولايبيز له تأثيرحاد على القناة الهضمية ومن هنا تنخفض كفاءتها في هضم وامتصاص المواد الغذائية والفيتامينات الضرورية للجسم.

لقد اظهرت احدى الدراسات تفوق جنس *Aspergillus* في إفراز الفوسفولايبيز إذ كان من اكثر الأجناس تكراراً إذ أبدت كل أنواعه فعالية انتاج هذا الانزيم وبنسبة (38.4 %) للنوع *A.flavus* و (28.2%) للنوع *A.niger* و (7.6%) للنوع *A.terreus* (محمود وحميد،2015).

**جدول (17) القدرة على انتاج الفوسفو لايبيز**

| مصدر العزلة | الفطر | منطقة الترسيب بالمليميتر ± الخطا القياسي |
|---|---|---|
| الريش | *A.niger* | 6.6±0.48 |
| | *P.digitatum* | 3.6±0.22 |
| العلف | *A.niger* | 5±0.5 |
| | *P.digitatum* | 2±0.14 |
| البراز | *A.niger* | 8.6±0.42 |
| | *P.digitatum* | 5±0.5 |

قيمة اقل فرق معنوي LSD= 2.04

## 4-2-4- القدرة على انتاج الهيمولايسين

يبين الجدول (18) قدرة الفطريات على انتاج الهيمولايسين وكانت النتائج كالآتي:

كانت فعالية الفطر *A.niger* أكثر من الفطر *P.digitatum* بحيث أن أعلى فعالية كانت من قبل الفطر المعزول من العلف بمقدار (6.3 ملم) ،تلاه الفطر المعزول من الريش (5.6 ملم) ثم الفطر المعزول من البراز بمقدار (5.3 ملم ).

أما بالنسبة للفطر *Penicillium* فكانت اعلى فعالية هي من قبل الفطر المعزول من الريش بمقدار (5 ملم ) ،ثم الفطر المعزول من البراز بمقدار (4.6 ملم )، ثم الفطر المعزول من العلف بمقدار (4 ملم ). تمتلك الكائنات المجهرية الممرضة عاملاً محللاً للدم يدعى انزيم الهيمولايسين (Hemolysin) ، ودوره مهم في حدوث الاصابة إذ ان خلايا الدم الحمراء المتحللة ستوفر المادة الغذائية و يعمل الهيمولايسين أيضاً على تحلل خلايا الدم البيضاء خصوصا العدلات ذات الدور الفعال في مقاومة الإصابة ،وكذلك الخلايا البلعمية الكبيرة، لذلك تصبح عملية البلعمة غير كفوءة وهناك بعض العوامل يجب أخذها بنظر الاعتبار عند دراسة الفعالية التحليلية للاحياء المجهرية ، مثل درجة حرارة الحضن ومدته ،كذلك وجود بعض المواد

مثل المصل والكوليسترول اللذين يعملان على تثبيط عملية التحلل إذ يجب فصل البلازما وعمل راسب لخلايا الدم الحمراء لكي يتم الكشف عن الهيمولايسين (الشبلي،2006)، وهناك اختلافات واضحة بين الفطريات في قابليتها على انتاج الهيمولايسين إذ اقترحت بعض الدراسات ان المكونات الخلوية،وضعف النضوحية،ومحتوى الصوديوم،و نسبة البروتينات الى الدهون في الاغشية،والحجم الكلي للخلية والمساحة السطحية يمكن أن تساهم في زيادة قابلية خلايا الدم الحمراء للحيوانات على التحلل(Greenhill *et al*.,2010)،و لقد اثبت من خلال فحص فعالية تحلل الدم التي أجريت على الفطر *Penicillium citrinum* بأنه محلل للدم في المختبر وكذلك لوحظت اختلافات في فعالية التحلل باستخدام كريات دم حمراء لكل من الفئران والبشر، ففي خلايا دم الانسان وجد ان الفطر والفوسفولايبيز C ذو فعالية عالية مما نتج عنه ( 80-100%) تحلل دموي خلال 30 دقيقة، بينما كان التحلل بنسبة (50 -80%) في خلايا دم الفئران(Atagazli *et al*.,2010)، وفي إحدى الدراسات التي أجريت لمعرفة قدرة الفطريات على تحلل الدم ظهر ان الفطر *Penicillium* هو الأول بنسبة كبيرة بلغت (84%) من العزلات التي كانت محللة دلالة على فعالية هذا الجنس في تحلل الدم ، تلاه الفطر *Aspergillus* إذ بلغت نسبة العزلات المحللة للدم هي (72%)(Greenhill *et al*.,2010)

**جدول (18) القدرة على انتاج الهيمولايسين**

| مصدر العزلة | الفطر | منطقة التحلل بالمليميتر |
|---|---|---|
| الريش | *A.niger* | 5.6±0.68 |
| | *P.digitatum* | 5±0.5 |
| العلف | *A.niger* | 6.3±0.42 |
| | *P.digitatum* | 4±0.16 |
| البراز | *A.niger* | 5.3±0.44 |
| | *P.digitatum* | 4.6±0.28 |

**قيمة اقل فرق معنوي LSD= 1.23**

**4 -3- الحساسية الدوائية للفطرين *A.niger* و *P.digitatum* (طريقةالاقراص)**

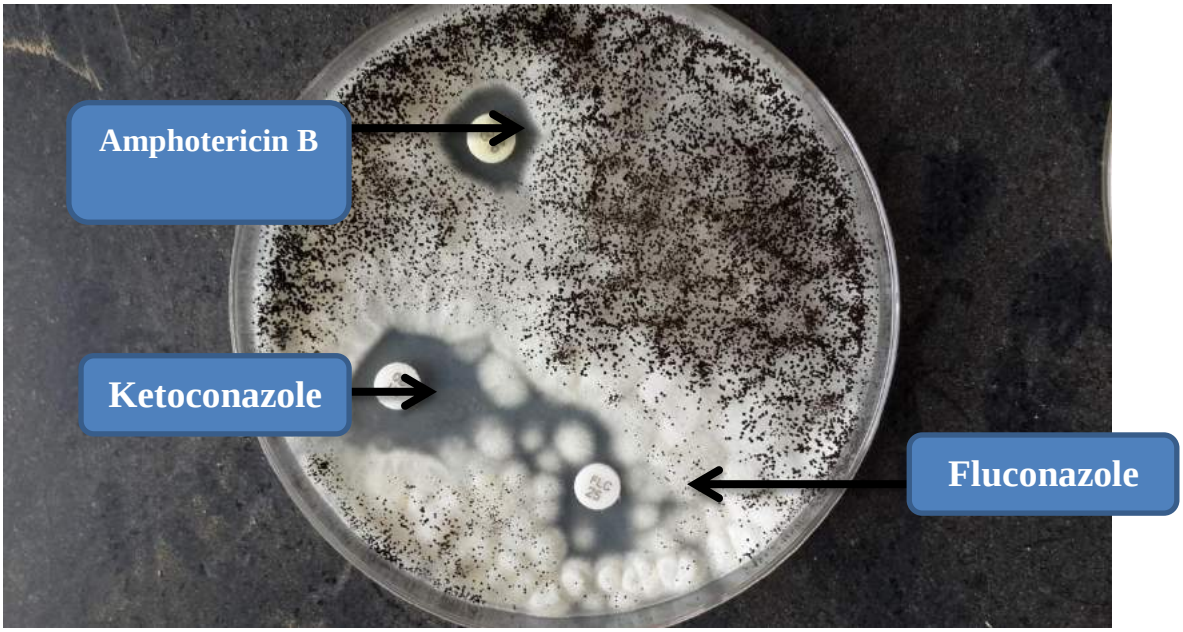
لقد ظهر من خلال الدراسة أن المضاد الحياتي Ketoconazole هو الأكثر فاعلية ضد العزلات الفطرية إذ سجل نسب تثبيط عالية ضد الفطريات وكانت نسبة تثبيطه لعزلات *Aspergillus* المعزولة من العلف هي (15.6 ملم) والمعزولة من الريش هي (15 ملم) والمعزولة من البراز هي (12.6 ملم )،وأظهر نفس المضاد الحياتي فاعلية متباينة أيضاً ضد عزلات *Penicillium* فسجل نسبة تثبيط (17.6 ملم) ضد العزلات من العلف تلتها العزلات من الريش بنسبة (15 ملم) ، ثم العزلات من البراز بنسبة (15.3 ملم) (جدول 19).

كما أظهرالمضاد الفطري Amphotericin B تبايناً بالفعالية ، لكنه إجمالاً أقل مقارنتاً بالأول ، وفيما يخص عزلات *Aspergillus* فقد سجل نسبة تثبيط للعزلات من البراز بمقدار (4 ملم) تلتها العزلات من العلف بمقدار (3.6 ملم) ثم العزلات من الريش بمقدار (2.3 ملم)، أما فيما يخص نفس المضاد ضد عزلات الفطر *Penicillium* فقد أظهرت تبايناً بالفعالية فكانت نسبة التثبيط للعزلات من الريش (4.6 ملم) تلتها العزلات من العلف بنسبة (4.3 ملم)، ثم العزلات من البراز بنسبة (3.6 ملم) (جدول 19).

أما المضاد الفطري Fluconazole فقد كان أقل المضادات السابقة تأثيراً ضد العزلات الفطرية فقد كانت نسبة التثبيط لعزلات *A.niger* من الريش (1.6 ملم) وكذلك من البراز (1.6 ملم) ثم العزلات من العلف بنسبة تثبيط (1.3 ملم) .

أظهرت الدراسات أن المضاد الحياتي Amphotericin B له فعالية عالية قاتلة ضد الفطريات وأن له فعالية كبيرة في منع التحول المظهري الوراثي بينما يكون المضاد الحياتي Fluconazole اقل فعالية مثبطة لهذا النوع من التحول، Amphotericin B و وجد أنه يمزق الغشاء او جدار الخلية ويثبط نمو الهايفات في التراكيز الواطئة ( Hawser and Islam,1999)، ومن ضمن الدراسات التي أجريت لبيان حساسية الفطريات للمضادات الحياتية تبين أن المضاد الحياتي Ketoconazole هو الأكثر فعالية ضد الفطريات إذ كانت منطقة التثبيط Inhibition zone بمقدار (21-27ملم) ، تلاه المضاد الحياتي Fluconazole بمنطقة تثبيط (15-18ملم)، وأخيراً جاء المضاد الحياتي Amphotericin B بمقدار (10-14ملم) ( Moges *et al*.,2016) ، وفي اختبار اجري على عزلات من *Candida* أيضاً وجد أن الحساسية تجاه بعض الأنواع من المضادات الحياتية مختلفة من مضاد الى آخر فكانت الحساسية( 100%) تجاه المضاد الحياتي Amphotericin B ، تلاه المضاد الحياتي Ketoconazole

بنسبة ( 41.7%)، ثم المضاد Fluconazole بنسبة (0%) اي ان جميع العزلات كانت مقاومة لهذا المضاد،بينما كانت كل العزلات حساسة للمضاد Amphotericin B (Prasanna *et al.*,2016).




**شكل (10) الحساسية الدوائية للفطر *A.niger* والمضادات Amphotericin B و Ketoconazole و Fluconazole**

**جدول (19) الحساسية الدوائية للفطرين *A.niger* و *P.digitatum*(طريقة الاقراص)**

| أماكن العزل | الفطريات | المضادات الحياتية | منطقة التثبيط بالمليمتر |
|---|---|---|---|
| الريش | *A.niger* | Amphotericin B | 2.3±0.22 |
| | | Ketoconazole | 15±1.98 |
| | | Fluconazole | 1.6±0.11 |
| | *P.digitatum* | Amphotericin B | 4.6±0.32 |
| | | Ketoconazole | 16±2.14 |
| | | Fluconazole | 3±0.98 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 3.6±0.54 | Amphotericin B | *A.niger* | العلف |
| 15.6±2.16 | Ketoconazole | | |
| 1.3±0.02 | Fluconazole | | |
| 4.3±0.04 | Amphotericin B | *P.digitatum* | |
| 17.6±3.12 | Ketoconazole | | |
| 2.3±0.18 | Fluconazole | | |
| 4±0.86 | Amphotericin B | *A.niger* | البراز |
| 12.6±1.64 | Ketoconazole | | |
| 1.6±0.14 | Fluconazole | | |
| 3.6±0.64 | Amphotericin B | *P.digitatum* | |
| 15.3±1.88 | Ketoconazole | | |
| 1.6±0.12 | Fluconazole | | |

قيمة اقل فرق معنوي LSD= 6.85

**4-4- حساسية الفطرين *A.niger* و *P.digitatum* للمطهرات**

أظهرت الفطريات حساسية متباينة تجاه أنواع المطهرات الثلاثة المستخدمة ، بحيث أن هناك اختلافاً ما بين العزلات من حيث منطقة العزل، وكذلك اختلاف واضح في تأثير انواع المطهرات الثلاثة على العزلات الفطرية ، فمثلا كان المطهر Gentian violet فعالاً في تركيز 1% في حين ان المطهرين الاخرين كان تأثيرهما معدوما ضمن هذا التركيز بحيث ان المقاومة من قبل العزلات الفطرية كانت 100%،بينما نلاحظ انخفاضاً في فعالية المطهر Gentian violet في

تركيز (5% و10 %) بينما لاحظنا زيادة فعالية المطهرين الآخرين وهما Povidone-iodine و Dettol ضد العزلات الفطرية ضمن هذين التركيزين (جدول 20).

وقد سجل Gentian violet فعالية متفاوتة ضد عزلات *A.niger* ضمن تركيز (1%) إذ كانت منطقة التثبيط في حالة العزلات الفطرية من العلف بمقدار (11 ملم) ، وتلاه الفطر المعزول من كل من الريش والبراز بمنطقة تثبيط مقدارها (10 ملم ) لكل منهما، بينما سجل نفس المطهر ضمن تركيز(5 ملم ) فعالية متفاوتة أيضاً إذ كانت منطقة التثبيط للفطريات المعزولة من العلف هي (5 ملم )، تلاه الفطر المعزول من الريش بمنطقة تثبيط (3 ملم)، ثم الفطر المعزول من البراز (1 ملم )،وفي حالة تركيز (10 ملم ) كانت الفعالية أيضاً متباينة حيث كانت منطقة التثبيط للفطر المعزول من الريش هي ( 4 ملم ) وتلاه الفطر المعزول من البراز ( 3 ملم )، ثم الفطر المعزول من العلف بمنطقة تثبيط قدرها (2 ملم ).

أما فيما يخص فعالية Gentian violet ضد عزلات *P.digitatum* أيضاً فكانت متفاوتة ففي تركيز (1%) للمطهر كانت منطقة التثبيط (16ملم) للفطر المعزول من البراز (الشكل 11، 12) ، وتلاه الفطر المعزول من الريش (10ملم)، ثم الفطر المعزول من العلف (7ملم)،أما ضمن تركيز ( 5%) فكانت منطقة التثبيط (5ملم) للفطر المعزول من العلف ، وتلاه الفطر المعزول من الريش (4ملم) ثم الفطر المعزول من البراز (2ملم)، وضمن تركيز (10%) كانت الفعالية ايضا متفاوتة فكانت منطقة التثبيط (5ملم)للفطر المعزول من الريش ،وتلاه الفطر المعزول من البراز (4ملم) ،ثم الفطر المعزول من العلف (2ملم) (جدول 20).

والمطهر الآخرهو Povidone-Iodine فقد تباينت فعاليته أيضاً ضد العزلات الفطرية وضمن التراكيز الثلاثة ، وفعالية المطهر ضد عزلات الفطر *Aspergillus* كانت متفاوتة وحسب منطقة العزل ففي تركيز(1%) وكانت الفعالية معدومة تماماً ولم نلاحظ وجود اي مناطق تثبيط،أما ضمن تركيز (5%) فكانت الفعالية متفاوتة حيث كانت منطقة التثبيط (5ملم) للفطر المعزول من العلف تلاه الفطر المعزول من الريش والبراز بنفس منطقة التثبيط (2ملم)،وبالنسبة للتركيز الثالث (10%) كانت منطقة التثبيط للفطر المعزول من الريش والعلف (6ملم)،و تلاهما الفطر المعزول من البراز (4ملم)(جدول 20).

وإن فعالية المطهر Povidone-Iodine ضد عزلات الفطر *P.digitatum* كانت متباينة أيضاً ففي تركيز (1%) كانت الفعالية معدومة تماماً ، اما بالنسبة للتركيز (5%) فتباينت الفعالية فكانت منطقة التثبيط (8ملم) للفطر المعزول من العلف،و تلاه الفطر المعزول من الريش (5ملم)

ثم الفطر المعزول من البراز (4ملم)، وفيما يخص التركيز الثالث (10%) تفاوتت الفعالية أيضاً إذ كانت منطقة التثبيط (6ملم)للفطر المعزول من العلف ،تلاه الفطر المعزول من الريش بمنطقة تثبيط مقدارها (5ملم)، ثم الفطر المعزول من البراز (4ملم).

وكانت فعالية المطهر Dettol ضد عزلات*A. niger* متفاوتة أيضاً، ففي تركيز (1%) كانت الفعالية معدومة تماما ولم تظهر اي مناطق تثبيط ، أما في تركيز (5%) ظهرت فعالية المطهر ضد الفطر إذ كانت منطقة التثبيط (6 ملم) للفطر المعزول من الريش ، تلاه الفطر المعزول من البراز (5ملم) ، ثم الفطر المعزول من العلف (2ملم)،وفيما يخص التركيز الاخر (10%) فكانت منطقة التثبيط (8ملم) للفطر المعزول من الريش، تلاه الفطر المعزول من البراز (7ملم) ثم الفطر المعزول من العلف (6ملم).

أما فعالية نفس المطهر ضد عزلات *P.digitatum* فكانت مباينة كذلك فلم تظهر اي فعالية للمطهر في تركيز (1%)، أما فيما يخص تركيز (5%) فكانت منطقة التثبيط (6ملم) للفطر المعزول من البراز، تلاه الفطر المعزول من العلف (4ملم) ،ثم الفطر المعزول من الريش (1ملم) ،وفي تركيز (10%) كانت الفعالية مختلف إذ كانت منطقة التثبيط (7ملم) للفطر المعزول من الريش ، وتلاه الفطر المعزول من العلف والبراز بنفس القيمة (5ملم).

Gentian violet هي صبغة triphenylmethane فعالة ضد المكورات الموجبة لصبغة كرام بالإضافة إلى العديد من الخمائر الممرضة مثل مختلف أنواع الـ Candida ، وهي تستخدم بشكل محاليل مائية ضمن تركيز (1-10 %) ومنظمة الصحة العالمية اوصت باستخدامها مطهراً فعالاً وآمناً للتطهير الموضعي بتركيز( 0.5- 1%)،و هي أيضاً صبغة ذائبة في الماء وتبقى نسبيا لمدة طويلة على الجلد ،وعدة اليات توضح فعالية Gentian violet بوصفها مضاداً فطرياً تشمل اختراق الخلية والاتحاد مع الـ DNA وهوما يقود الى تهتك غشاء المايتوكوندريا وبالتالي تحلل الخلية (Docampo and Moreno,1990).

إن المطهر Povidone-Iodine عند استخدامه بتراكيزه الاصلية تكون فعاليته أكبر على الفطريات، وتنخفض هذه الفعالية عند استخدام تراكيز أقل، ويكون سبب تواجد الفطريات في المستشفيات هو التخفيف العشوائي للمطهرات من دون اتباع التعليمات الصحيحة، وكذلك استخدام المياه العادية للتخفيف، إذ من الممكن ان تكون محتوية على الجراثيم وان اختلاف تأثير المطهر Povidone-Iodine و Dettol على الفطريات يعود الى استخدام الديتول بشكل عشوائي وهوما أدى الى نشوء مقاومة له من قبل الفطريات (Jawetz *et al*., 1998; Jake,

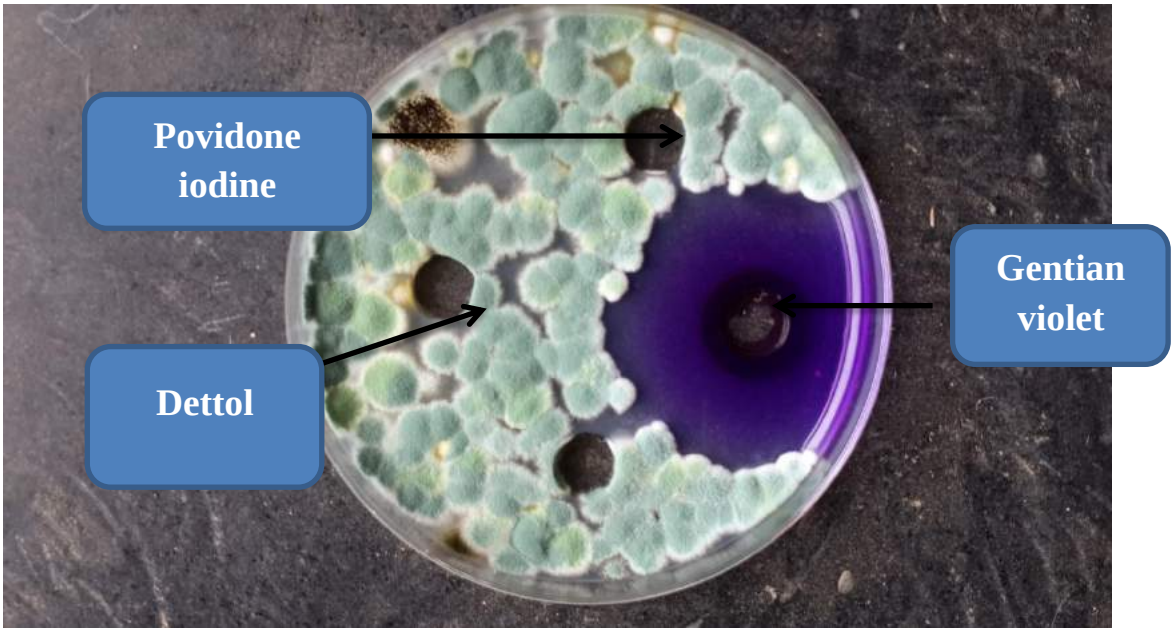
(2003 ، ويحـافظ المطهـر Povidone-Iodine علـى فعاليتـه التثبيطيـة إلـى حـد التخفيـف (2.5%)، وهذا يلاحظ من خلال أن عملية التعقيم تعتمد على نوع الكائن ومستوى التلوث وكذلك الجراثيم نفسها واستجابتها للمطهر إذ أن الخلايا الخضرية لبعض الفطريات تكون اقل مقاومة من الابواغ وبهذا يقوم المطهر بتحطيم هذه الخلايا بسهولة ،و عمر المزرعة إذ ان المزرعة القديمة وان كانت ذات فعالية ايضية واطئة لكن تكون ذات جدران سميكة (Handel *et al*.,2003).

و يكون مطهر الديتول أيضاً اكفأ ضمن تركيز (10%)مما لو كان بتراكيزه المخففة بحسب ما توصل اليه الكناني (2005) ويقوم هذا المطهر بتحطيم غشاء الخلية وبروتيناته، وبذلك يمنع تكـون ATP(Adenosine Triphosphate) (Rotter,1999) ، وأثبتـت الدراسـات ان Gentian violet هـي اكثـر فعاليـة مـن Povidone-Iodine فـي عـلاج Candidiasis عنـد تركيز اقل من( 1%) وهذه الفعالية للتطهير الموضعي يجب ان تستخدم الحد الأدنى للتركيز القاتل للفطريات ضمن 5 دقائق، ولا يجب أن تستخدم قيمة التركيز الأدنى المثبط للفطريات أو التركيز الأدنى القاتل للفطريات ضمن 24 ساعة لمنع الاصابات الفموية بصورة شاملة( Kondo *et al*.,2012) ، وضمن دراسة أجريت لبيان التلوث الفطري في إحدى المستشفيات واستخدام مطهرين هما Povidone-Iodine او ما يسمى السبتادين والديتول إذ تمت المقارنة فيما بينهما وتبين ان المطهر الاول Povidone-Iodine أكثر فعالية من الديتول ضمن التراكيزالمستخدمة (2.5% ،5%، 10 %) (حمود،2005).

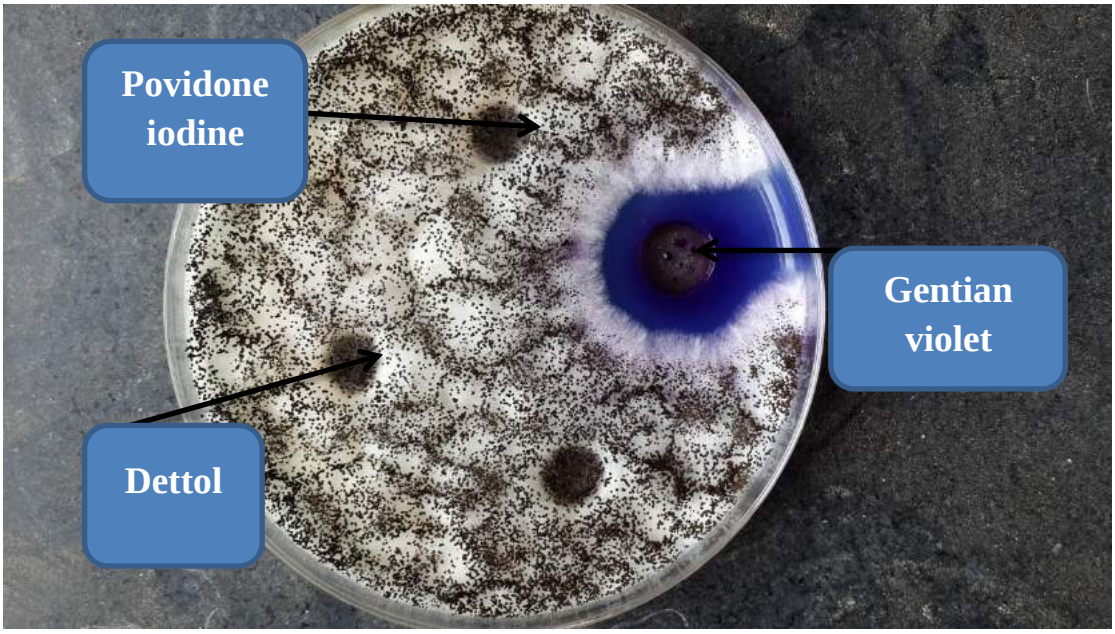
**جدول (20) حساسية الفطرين*A.niger* و *P.digitatum* للمطهرات بتراكيز مختلفة**

| مكان العزل | الفطر | Gentian violet | | | Povidone-iodine | | | Dettol | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | %1 | %5 | %10 | %1 | %5 | %10 | %1 | %5 | %10 |
| لريش | *A.niger* | 10.2±1.2 | 3±0.8 | 4.3±0.12 | 0±0 | 2.1±0.08 | 6.4±1.42 | 0±0 | 6.1±1.28 | 8±2.4 |
| | *P.digitatum* | 10.2±1.2 | 4.2±0.44 | 5.2±0.56 | 0±0 | 5.2±0.56 | 5.2±0.56 | 0±0 | 1±1.2 | 7.2±1.36 |
| لعلف | *A.niger* | 11.4±0.98 | 5.2±0.56 | 2.4±0.12 | 0±0 | 5.2±0.56 | 6.4±1.42 | 0±0 | 2.1±0.12 | 6.4±1.42 |
| | *P.digitatum* | 7.6±0.65 | 5.2±0.56 | 2.4±0.12 | 0±0 | 8±2.24 | 4.2±0.12 | 0±0 | 4.2±0.44 | 5.5±0.5 |
| لبراز | *A.niger* | 10.2±1.2 | 1±0.02 | 3±0.8 | 0±0 | 2.1±0.12 | 4.8±0.98 | 0±0 | 5.2±0.56 | 7.2±1.36 |
| | *P.digitatum* | 16±2.02 | 2±0.08 | 4.2±0.44 | 0±0 | 4.8±0.98 | 4.3±0.12 | 0±0 | 6±1.2 | 5.8±1.5 |

3.96 =LSD




**شكل (11) حساسية الفطر *P.digitatum* للمطهرات Gentian violet و Povidone- iodine و Dettol بتركيز 1 %**




**شكل (12) حساسية الفطر *A.niger* للمطهرات Gentian violet وPovidone- iodine و Dettol بتركيز 1 %**

# الفصل الخامس

## الاستنتاجات والتوصيات

## الاستنتاجات

من دراستنا هذه يمكن ان نلخص عدداً من الاستنتاجات وهي كما يأتي :

- هناك مجموعة من الفطريات المترممة ترافق الطيور وتتواجد على ريشها وغذائها وفي برازها، وكان أكثرها تواجدا النوعين *Aspergillus* و *Penicillium* .

- كان طائر الكناري هو الأكثر تلوثاً بالفطريات ،في حين كان طائر الفنجس هو الأقل تلوثاً بالفطريات.

- فيما يخص مصدر العزل فإن العلف كان هو الأكثر غزارة بالفطريات ،وتلاه الريش، ثم البراز.

- ان الفطرين *Aspergillus* و *Penicillium* يمتلكان ضراوة عالية وهوما يدل على إمكانية مهاجمتهما للإنسان فهما قادران على انتاج الانزيمات المحللة للبروتين والدهون وكذلك هما قادران على انتاج الانزيم الحال للدم.

- إن أفضل المضادات المستخدمة في الدراسة هو مضاد Ketoconazole ويتلوه المضاد Amphotericin B ، ثم المضاد Fluconazole ، من حيث القدرة على تثبيط الفطرين *Aspergillus* و *Penicillium* المعزولين في هذه الدراسة.

- أعطى المطهر Gentian violet أفضل النتائج في تثبيط الفطرين *Aspergillus* و *Penicillium* بتركيز (1%).

- ظهر من خلال استخدام تقنية PCR و RFLP-PCR إمكانية الكشف عن التغايرات الوراثية التي تطرأ على الجينات وبالتالي يمكن الكشف عن عوامل الضراوة المختلفة للفطريات والتي تؤدي الى الأمراضية .

## التوصيات

من خلال دراستنا هذه يمكن أن نوصي بما يأتي :-

- يجب اقتناء الطائر من جهة موثوقة ومن مصادر لها خبرة في تربية طيور الزينة واكثارها ويجب فحص الطيور المستوردة قبل ادخالها للبلد.
- اقتناء الطائر الذي يمتاز بصحة جيدة (على الاقل ظاهريا) ، وتجنب الطيور المريضة وعدم خلطها مع الطيور السليمة كما يجب توفير بيئة صحية للطائر، اذ يجب أن يكون قفصه ذا تهوية جيدة ، ودرجة حرارة مناسبة.
- يجب أن يكون غذاء الطائر سليماً وصحياً و من الضروري أن تكون الطيور في البيوت وفي محلات بيع الطيور خاضعة للرقابة البيطرية من حيث اللقاحات والعلاجات.
- إجراء دراسات أخرى عن طيور زينة اخرى وفطريات أخرى كالخمائر مثلاً ، لغرض توسيع قاعدة البيانات الخاصة بطيور الزينة.
- استخدام المضاد الفطري Ketoconazole في معالجة الإصابات الفطرية، لكونه أعطى أفضل النتائج ضد الفطرين *Aspergillus* و *Penicillium* .
- استخدام المطهر Gentian violet في تنظيف أماكن الطيور والأدوات المستخدمة في تربية الطيور .

# المصادر

**المصادر العربية**


**الجشاعة**،فضل احمد سعيد.(2001).**دراسة علاقة مقاومة عزلات بكتريا *Pesudomonas aeruginosa* للمضادات الحيوية مع انتاجها للبايوسين**.رسالة ماجستير.كلية العلوم –الجامعة المستنصرية.

**الظاهر**،**رسل عصام علي .**(2015). **التشخيص الجزيئي للخمائر والأعفان المرافقة لمخلفات الطيور و تقييم كفاءة بعض المستخلصات النباتية ضد خميرة *Cryptococcus* .**رسالة ماجستير.كلية علوم بنات-جامعة بابل.

**الشبلي**،ماجد كاظم عبود.(2006). **تأثير العزلات السريرية لخميرة المبيضات *Candida spp.* دراسة بايولوجية ونسيجية مرضية في محافظة الديوانية**.اطروحة دكتوراه.كلية التربية-جامعة القادسية.

**الكناني** ، هيام قائد محمد (2005)، **عزل وتشخيص الاعفان والخمائر الملوثة للمستشفيات في مدينه الديوانية** ، رسالة ماجستير مجلس كلية التربية جامعة بغداد .

**المعموري** ، ايناس عباس خير الله . (2010) . **تقييم كفاءة بعض العوامل المضادة للفطريات والخمائر الانتهازية المعزولة من بعض مستشفيات محافظة بابل** . رسالة ماجستير . كلية العلوم – جامعة بابل .

**حمود**،بهيجة عبيس.(2005).**التلوث الفطري الانتهازي لردهات الجراحة في مستشفى الديوانية التعليمي ودراسة تأثير مطهري الديتول والسبتادين عليها**.مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري. 4 (2)ص 99- 100 .

**محمود** ،وفاق أحمد و سميره كاظم حميد .(2015)**. دراسة قابلية أنواع الفطر أسبرجلس *A.niger* ، *A.flavus* و *A.terreus* على انتاج انزيم الفوسفولايبيز مظهريا**. مجلة جامعة الكوفة للعلوم الصرفة . 2 (7)219-224.

**Abdulrazzaq, Y.M**.; Osman, N.; Yousif, Z.M., and Al-Falahi, S. (2003). **Aflatoxin M1 in breast-milk of U.A.E. women**. Annals of Tropical Paediatrics, 23, 173–179.

**Abou, Y.Z.** and Alwan, A.S.(1998). **Guide to Chemotherpy and Chemoprophylaxis in Bacterial infection**. 2nd ed.WHO Regional Publication Eastern Mediterranean,Series 4.Printed in Alexandria,Egypt by Bara Graphics.

**Abundis-Santamaria, E**. (2005). **Aspergillosis in birds of prey**, 2003. Available at: http//www.aspergillus.man.ac.uk. Accessed 23 March 2005.

**Aho, R**.; Westerling, B., Ajello, L., Padhye, A. A. and Samson, R. A.( 1990). **Avian penicilliosis caused by *Penicillium griseofulvum* in a captive toucanet**. Med. Mycol. 28: 349–354.

**Al varez, E**.; Sutton, DA. and Cano J.( 2009). **Spectrum of zygomycete species identified from clinically significant specimens in the United States**. J Clin Microbiol; **47** : 1650 – 1656.

**Alagarsamy, S**.; Christian, L., and Ashok, P. (2006). **Microbiology and Industrial Biotechnology of Food Grade Protease**: A Perspective.

**Aliyu, RM**. ; Abubakar, MB. ; Yakubu, Y. ; Kasarawa , AB.; Lawal, N., Bello, MB. , and Fardami AY.(2016). **Prevalence of potential toxigenic *Aspergillus* species isolated from poultry feeds in Sokoto metropolis** . Sokoto J of Vete. Sci.14(1):39-44.

**Alp, S**., and Arikan, S. (2008). **Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species**. J Basic Microbiol 48: 331–337.

**Alsudani**, AA. and Al-Shibli, MK. ( 2015). **Determine the genotype of the local fungal isolation *Aspergillus niger* 5 producers of**

**citric acid**. International J. of Advanced Research 3 (7): 1058-1067.

**Alvarez-Perez, S**.;Mateos, A.; Domingues, L.; Martinez-Nevado, E.; Blanco, J.L. and Garcia, M.E. (2010).**Polyclonal *Aspergillus fumigatus* infection in captive penguins**.Veterinary Microbiology (144),444-9.

**Al-Wazzan, S.A.A**.(1990).**Evaluation of some Aspects of Aseptic Techniques in Operating Department and Its Relation with post –operative wound infection M.Sc**.(Thesis).,College of Nursing University of Baghdad.

**Anand,K.(2016). Fungal Protease Production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* Using Rice Bran as the Substrate.** Academia Journal of Agricultural Research 4(6): 333-338.

**Antoniadou, A**.; Torres, HA.; Lewis, RE.; Thornby, J.; Bodey, GP.; Tarrand, JP.( 2003). **Candidemia in a tertiary care cancer center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy**. *Medicine (Baltimore).* 82(5):309–21

**Arenas-Castro, H**.; Muñoz-Gomez, SA.;Uribe-Acosta, M.; Castaño-Castaño, L., and Lizarazo-Medina PX. (2016). **Richness, cellulolytic activity and fungicide susceptibility of fungi from a bird biological collection**. Acta biol. Colomb. 21(1):167-173.

**Ashour, S.A**.; EL Shore, H.M.; Metwally, M. and Habib, S.A. (1996). **Fungal fermentation of Whey incorporated with certain supplements for the production of protease**. Microbios., 86: 59-69.

**Atagazli ,Latifeh**.; Greenhill, A. R. ; Melrose ,W.; Pue, A . Warner ,G and Jeffrey, M.(2010). **Is *Penicillium citrinum* Implicated in sago hemolytic disease?**. The Southeast Asian j. of tropical medicine and public health. Vol 41 No. 3.pp:643.

**Bankole, SA**., and Joda, AO.(2004). **Effect of lemon grass (*Cynbopogun citratus* Stapf.) Powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melon seeds (C*olosynthis citrulus* L.)** .African J. of Biot.3: 52-59.

**Beernaert ,L. A**.; Pasmans ,F.; Van Waeyenberghe, L.; Haesebrouck, F. , and Martel, A.( 2010). **"*Aspergillus* infections in birds**: a review," Avian Pathology, vol. 39, no. 5, pp. 325–331.

**Beernaert, L.A**.; Pasmans, F.; Baert, K.; Van Waeyenberghe, L.; Chiers, K.; Haesebrouck, F. and Martel, A. ( 2009). **Designing a treatment protocol with voriconazole to eliminate *Aspergillus fumigatus* from experimentally inoculated pigeons**. Vet. Microbiol., 139, 393–397.

**Beernaert,LA**.;Pasmans,F.;VanWaeyenbergheL.(2009). **Avian *Aspergillus fumigatus* strains resistant to both itraco-nazole and voriconazole**.Antimicrob Agents Chemother 53(5):2199-2201.

**Benjamin, RJ**.; Dy. B.; Warren, R.; Lischka, M., and Eder AF. (2011). **Skin disinfection with a single-step 2% chlorhexidine swab is more effective than a two-step povidone-iodine method in preventing bacterial contamination of apheresis platelets**. 51: 531-538.

**Berto, P**.; Comme´ nil, P.; Belingheri, L., and Dehorter, B.( 1999). **Occurrence ofa lipase in spores of Alternaria brassicicola with a crucial role in infection of cauliflower leaves**. FEMS Microbiology Letters 180: 183–189.

**Bhattacharya, K**., and Raha , S.( 2004).**Deteriorative changes of maize, groundnut and soyabean seeds by fungi in storage**. Mycopathologia,; 155: 135-141.

**Bikiaris, D.N**. (2011). **Solid dispersions, Part I: recent evolutions and future opportunities in manufacturing methods for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs**. Expert Opin. Drug Deliv.; 8: 1501-1519.

**Binder, EM**. (2007). **Managing the risk of mycotoxins in modern feed production**. Anim Feed Sci Technol 133: 149- 166.

**Birch ,M**.; Dennings, D. W. and Robson, G. D. (2004). **Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates**. Medical Mycology, 42, 81-86.

**Birnbach,D.J**.;Stein,D.J.;Murry,O.,Thys,D.M and Sordillo,E.M.(1998).**Anesthesiology**.,(88):668-72.

**Bodey, G.P**.(1993).**Candidiasis Pathogenesis,Diagnosis and treatment**. 2nd ed.Raven Press.USA-Bohme.

**Bosco, F**., and Mollea, C. (2012). **Mycotoxins in Food, In: Food Industrial Processes-Methods and Equipment**. pp. 169-200.

**Brizendine, K**.; Baddley, J. and Pappas P. (2011). **Pulmonary cryptococcosis**. Semin Respir Crit Care Med.32(6):727–34.

**Brouta, F**.; Descamps, F.; Monod, M.; Vermout, S.; Losson, B., and Mignon, B. (2002). **Secreted metalloprotease gene Family of Microsporum canis**. Infect. Immun. 70, 5676 - 5683.

**Brown, PA**. and Redig, PT.( 1994). ***Aspergillus* ELISA: a tool for detection and management**. Proc Annu Conf Assoc Avian Vet. 295-297.

**Burton, M**. and Burton, R. (2002). **International Wildlife Encyclopedia**: Brown bear - Cheetah. Marshall Cavendish Corporation, New York.

**C**

**Cafarchia, C**. *et al.* (2006). **Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts**. Med. Mycol. 44, 485–92.

**Calera, JA**. ; Haas, H . ; Latge, JP. and Steinbach, WJ. (2009). **eds *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis** . Washington, DC: ASM Press ; : 107 – 129 .

**Casadevall, A**. and Pirofski, L.( 1999). **Host–pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity**. Infect. Immun. 67, 3703–3713.

**Casadevall, A**. and Pirofski, L.( 2003). **The damage–response framework of microbial pathogenesis**. Nature Microbiol. Rev. 1, 17–24.

**Casals,J.B**.(1979).**Tablet Sensitivity testing of pathogenic fungi**.J. of clini.Patholo.32:719

**Cenis**, JL. (1992). **Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification**. Nucleic Acids Research 20 (9): 2380.

**Chan, TY**.; Lau, MS., and Critchley, JA.( 1993). **Serious complications associated with Dettol poisoning**. Q J Med.86:735-8.

**Chan, TY**.; Sung, JJ., and Critchley, JA.( 1995). **Chemical gastro-oesophagitis, upper gastrointestinal haemorrhage and gastroscopic findings following Dettol poisoning**. Hum Exp Toxicol.14:18-9..

**Chan, YH**.; Wong, KM. and Lee ,KC..( 2004). **Pneumonia and mesenteric lymphadenopathy caused by disseminated *penicillium marneffei* infection in a cadaveric renal transplant recipient**. Transpl Infect Dis.6(1):28-32.

**Charlton, R**.; Chin, RP.; Barnes, HJ; Saif, YM.; Fadly, AM.; Glisson, JR.; Mcdougald, LR.; Nolan, LK.; and Swayne, DE.;. ( 2008). **Aspergillosis. Diseases of Poultry**. 12 ed. Oxford: Blackwell,: 989-1001.

**Chattopadhyay, A**., and Jafurulla, M.( 2011). **A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis**. Biochem. Biophys. Res. Commun. 416 (1–2), 7–12.

**Chau, AS**.; Chen, G.; McNicholas, PM. and Mann, PA.( 2006) .**Molecular basis for enhanced activity of posaconazole**

**against *Absidia corymbifera* and *Rhizopus oryzae***. AntimicrobAgents Chemother.50:3917–9.

**Chen, SC**.; Wright, LC.; Golding, JC., and Sorrell, TC. (2000). **Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans***. Biochem J 347: 431–439.

**Chiewchanvit, S**.; Mahanupab, P.; Hirunsri, P. and Vanittanakom, N. (1991).**Cutaneous manifestations of disseminated *penicillium marneffei* mycosis in five HIV-infected patients**. Mycoses.34(5-6):245-9.

**Chinnapun ,D**.(2015). **Virulence Factors Involved in Pathogenicity of Dermatophytes**. Walailak J Sci & Tech; 12(7): 573-580.

**Chowdhary, A**.; Agarwal ,K.; Randhawa, HS.; Kathuria, S.; Gaur, SN.; Najafzadeh, MJ.; Roy, P.; Arora, N.; Khanna, G., and Meis, JF. (2012). **A rare case of allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Alternaria alternata***. Med Mycol 50: 890–896.

**Chowdhary, A**.; Rhandhawa, H. S.; Prakash, A. and Meis, J. F. (2012).**Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India**: an update. Crit. Rev. Microbiol. 38, 1–16.

**Christianson, J**.; Engber, W. and Andes ,D.( 2003). **Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts**. Med Mycol.41(3):177–88.

**Clair,M**. and Domb,A.(2001). **inactivation of the human Immunodeficiency virus**. Med.Surg.183(3):195-200.

**Cole, G. T**.; Lynn , K. T., and Seshan, K. R. ( 1990). **An animal model for pharyngeal, esophageal and gastric candidosis**. Mycoses 33**:**7–19.

**Colla, Luciane. Maria**.; Andreiza, Lazzarotto. Primaza.; Silvia, Benedettia.; Raquel, Aparecida. Lossa.; Marieli, de Limaa.;Christian, Oliveira. Reinehra.; Telma, Elita. Bertolina., and Jorge, Alberto and Vieira Costab.(2010). **Selection of Lipase-Producing Microorganisms through Submerged Fermentation**. Z. Naturforsch. 65 c, 483 – 488.

**Collee, J.G**.; Fraser, A.G.; Marmion , B.P.and Simmons, A.(1996). **Practical medical microbiology 4th ed** ., Churchill Living stone., PP: 695-717.

**Converse, KA**.; Thomas, NJ.; Hunter, B. and Atkinson, C. ( 2008). **Aspergillosis. Infectious Diseases of Wild Birds**. Ames: Blackwell: 360-374.

**Cox, GM**.; McDade, HC.; Chen, SC.; Tucker, SC.; Gottfredsson, M.; Wright, LC.; Sorrell, TC.; Leidich, SD.; Casadevall, A.; Ghannoum, MA., and Perfect, JR. (2001). **Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans***. Mol Microbiol 39: 166–175.

**Cray, C**. and Tatum, LM.( 1998). **Applications of protein electrophoresis in avian diagnsotics**. J Avian Med Surg.12:4-10.

**Cray, C**.( 2015). **Diagnostic testing for Aspergillosis in avian species**. Federation of European Companion Animal Veterinary Associations.Barcelona,Spain.

**D**

**Daher, EF**.; Silva, GB, Jr. and Barros, FA. ( 2007). **Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis in HIV patients from Brazil**. Trop Med Int Health: 12: 1108–1115.

**Dahlhausen, R.D**.(2006).**Implications of Mycoses Clinical Disorders**. In: Clinical Avian Medicine,Harrison, G.J. and T.L. Lightfoot(Eds).Spix Publishing, Inc.,Palm Beach, FL.,PP:691-704.

**Dannaoui, E.**; Schwarz, P. and Slany, M..( 2010). **Molecular detection and identification of zygomycetes species from paraffin-embedded tissues in a murine model of disseminated zygomycosis**: a collaborative European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG) evaluation. J Clin Microbiol. 48:2043-2046.

**Davis, J.L.**; Smith, G.W.; Baynes, R.E.; Tell, L.A.; Webb, A.I. and Riviere, J.E. (2009). **Update on drugs prohibited from extralabel use in food Animals**. J. of the American Veterinary Medical Association, 235: 528–534.

**De Hoog** ,GS.; Guarro, J.; Gené, J., and Figueras, MJ. (2000). **Atlas of clinical fungi**, 2nd ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

**de Lima Procópio, R. E. and I. R. da Silva**. (2012). **"Antibiotics produced by *Streptomyces*."** The Brazilian J. of Infect. Dis. 16(5): 466-471.

**De Pauw, B**.; Walsh, TJ. and Donnelly, JP.( 2008). **Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group**. Clin Infect Dis.;46:1813-1821.

**DeAngelis, YM**.; Saunders, CW.; Johnstone, KR.; Reeder, NL.; Coleman, CG.; Kaczvinsky, JR.jr.;Gale, C.; Walter, R.; Mekel, M. and Lacey, MP. (2007).**Isolation and expression of a *Malassezia globosa* lipase gene,LIPI**. J Invest Dermatol.127:2138-46.

**Del Hoyo, J**.; Elliot A., and Sargatal , J.( 1997) .**Handbook of the birds of the world**. Vol. 4. Sandgrouse to Cuckoos. Lynx Ediciones, Barcelona. (España). 679p.

**Denning, D. W**.; Ward, P. N.; Fenelon, L. E.; and Benbow, E. W. (1992). **Lack of vessel wall elastolysis in humaninvasive aspergillosis**. Infect. Immun. 60, 5153 -5156.

**Desakorn, V**.; Simpson, AJ. and Wuthiekanun, V.( 2002). **Development and evaluation of rapid urinary antigen detection tests for diagnosis of *penicilliosis marneffei***. J Clin Microbiol;40(9):3179-83.

**Deshmukh, SK**.( 2004). **Keratinophilic fungi on feathers of pigeon in Maharashtra, India**. Mycoses; 47: 213–5.

**Deshmukh, SK**; Mandeel, QA. And Verekar, SA.( 2008). **Keratinophilic fungi from selected soils of Bahrain.** Mycopathologia; 165: 143–7.

**Dhama, K**.;Anjaneya ,A. ; Hansa and Singh S.D.(2011).**Fungal diseases of poultry**.Poult.Fortune,12:30-35.

**Dhama,K**.;Chakraborty,S.;Verma,A.K.;Tiwari,R.;Barathidasan,R.;Kumar,A., and Singh S.D.(2013).**Fungal/Mycotic Diseases of Poultry-diagnosis,Treatment and Control**:A Review.Pakistan J. of Biological Sciences 16(23):1626-1640.

**Diamante, K**.; Bergfeld, W.F.; Belsito, D.V.; Klaassen, C.D.; Marks, J.G.; Shank ,R.C.; Slaga ,T.J.; Snyder, P.W., and Andersen, F.A. ( 2009). **Final report on the safety assessment ofbasic violet 1, basic violet 3 and basic violet 4**, Int. J. Toxicol. 28 .193–204.

**Docampo, R**., and Moreno SN.( 1990). **The metabolism and mode of action of gentian violet**. Drug Metab Rev;22:161–78.

**Doumas, A**.; Van den Broek, P.; Affolter, M.; and Monod, M. (1998).**Characterization of the prolyl dipeptidyl peptidase gene (dppIV) from the koji mold *Aspergillus oryzae***. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4809 - 4815.

**E**

**Efuntoye, MO.,** and Fashanu, SO.( 2001). **Occurrence of keratinophilic fungi and dermatophytes on domestic birds in Nigeria.** Mycopathologia; 153: 87–99.

**Ertugrul S**., D◌nmez G., and Takaç, S. (2007). **Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olivemill waste water and improving its enzyme activity**. J. Hazard. Mater. 149, 720 – 724.

**Eshetu , E**.; Adugna, H., and Gebretensay, A.(2016). **An Overview on Major Mycotoxin in Animal: Its Public Health Implication, Economic Impact and Control Strategies**. J. of Health, Medicine and Nursing. Vol.25.PP: 64-73.

**F**

**Farid, K.**; Farid, M., and Andrews, C.( 2008). **Total contact casting as a part of an adaptive care approach: a case study**. Ostomy Wound Manage.54:50-65.

**Fairy,T.S**.;Monro,H.L. and Freidy.F.F. (2005).**Our domestic pet,how to encage the domestic pet**.Maclory publishing institute.Canada

**FDA**. (1991). Code of Federal Regulations, Title 21, part 500.30– **Gentian violet for use in animal feed.**

**Frisvad, J.C**.; Samson, R.A. (2004). **Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium***. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. Stud. Mycol., 49, 1–173.

**Frosco, M. T**.; Chase, T.; and MacMillan, J. D. (1994). **The effect of elastase-specific monoclonal and polyclonal antibodieson the virulence of *Aspergillus fumigatus* in immunocompromised mice**. Mycopathologia 125, 65 - 76.

**G**

**Gácser , A**.; Schater, W.; Nosanchuk, JS.; Salomon, S., and Nosanchuk, JD.(2007).**Virulence of *Candida parapsilosis,Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis***

**in reconstituted human tissue models** .Fungal Genet Biol .44:1336-41.

**Gácser, A.**; Stehr, F.; Kröger, C.; Kredics, L.; Schäfer, W., and Nosanchuk, J.D. (2007). **Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans***. Infect. Immun. 75(10), p. 4710-4718.

**Garcia, M.E.**; Lanzarot, P.; Rodas, V.L.; Costas, E., and Blanco J.L.(2007). **Fungal flora in the trachea of birds from a wildlife rehabilitation centre in Spain**. Veterinarni Medicina, 52, (10): 464–470.

**Gauthier, GM**. (2015). **Dimorphism in Fungal Pathogens of Mammals, Plants, and Insects**. PLoS Pathog. 11(2):PP 1-7.

**Gauthier, GM**., and Klein, BS. (2008). **Insights into fungal morphogenesis and immune evasion**. Microbe 3: 416–423.

**Geiser, DM**.; Gueidan, C. and Miadlikowska, J.( 2006). **Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chaetothyriomycetidae**. Mycologia. 98: 1053_1064.

**Ghannoum, MA**. (2000). **Potential role of phospholipases invirulence and fungal pathogenesis**. Clin Microbiol Rev 13: 122–143.

**Ghomade, V**.; Pathan, E.; and Deshpande, M. V. (2012). **Yeast-hypha dimorphism in Zygomycetous fungi**. In: J. Ruiz-Heerrera Ed. Dimorphic Fungi: Their Importance as Models for Diffentiation and Fungal Pathogenesis. Bentham Books, Mexico.

**Ghorbel, S**.; Souissi, N.; Triki-Ellouz, Y.; Dufosse, L.; Guerard, F., and Nasri, M.( 2005). **Preparation and testing of Sardiella protein hydrolysates as nitrogen sourcefor extracellular lipase production by Rhizopus oryzae**. World J. of Microbiology and Biote. 21: 33–38.

**Gladieux, P**.; Ropars, J.; Badouin, H.; Branca, A.; Aguileta, G.; Vienne, D.M.; Rodriguez de la Vega, R.C.; Branco, S., and Giraud, T. (2014). **Fungal evolutionary genomics provides**

**insight into the mechanisms of adaptive divergence in eukaryotes**. Mol. Ecol. *23*, 753–773.

**Go¨ ttlich, E**.; de Hong, GS.; Yoshida, S.; Takeo, K, Nishimura, K., and Miyaji M. (1995). **Cell-surface hydrophobicity and lipolysis asessential factors in human *tinea nigra***. Mycoses 38: 489–494.

**Goa, KL**., and Barradell, LB.( 1995). **Fluconazole: An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in major superficial and systemic mycoses in immunocompromised patients**. Drugs;50:658-90. Erratum published in Drugs 1996;51:505.

**Goldenheim, P.D**.(1993).**An appraisal of povidone-iodine and wound harling postgard**.Med.J.,69(3):97-105.

**Gomes, MZ**.; Lewis, RE. and Kontoyiannis, DP.( 2011). **Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-rhizopus, -mucor, and -lichtheimia species**. Clin Microbiol Rev. 24: 411–445.

**Gonzalez, MR**. ; Bischofberger, M. ; Pernot, L. ; van der Goot, FG. , and Freche, B .( 2008). **Bacterial pore-forming toxins: the whole story?** Cell Mol Life Sci . 65 : 493 – 507 .

**Green, C**.(2012).**Fungal and algal diseases ,Infectious Diseases of the Dog and Cat.**fourth ed.Elsevier Saunders,St.Louis Messouri, P.614-621.

**Greenhill ,Andrew. R**.; Barry, J. Blaney.; Warren, A. Shipton.; Aisak ,Pue. ;Mary, T. Fletcher.,and Jeffrey, M. Warner.(2010). **Haemolytic Fungi Isolated from Sago Starch in Papua New Guinea**. Mycopathologia 169:107–115.

**Hage, CA**. and Wheat, LJ.( 2010). **Diagnosis of pulmonary histoplasmosis using antigen detection in the bronchoalveolar lavage**. Expert Rev Respir Med. 4:427–9.

**Handel,S.M**.; Sugar,M.H., and Quindos,G.(2003).**Multicenter study on noscomical candidiasis in republic of American**. Rev.Amri.Microbial.31:114-9.

**Hankin, L**. and Anagnostakis, S.L.(1975).**The use of solid media for detection of enzyme production by fungi**. J.Mycologia.67:597-607.

**Haq, I.U**.; Mukhtar, H., and Umber, H. ( 2006). **Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions**. J. Agri. Soc. Sci., 2(1), 23–25.

**Harrison,H**. and Greensmith,A.(2010).**Birds of the world**.puplisher ,DK.Adult isBn.

**Hashem, A. R**.( 1996). **Seed-borne fungi in domestic bird feed in Saudi Arabia**. Mycoscience 37: 223-226.

**Hashempour, A**.; Zali, M.H.S.; Delshad, R.; Karamad, V.R.; Farzayi, V. and Kalbkhani, M.( 2011). **A study on the existence of *Aspergillus* in birds in the farms around Urmia-Iran**. J. Stored Products Postharvest. Res., 2, 235–236.

**Hawser , I**., and Khalid S.(1999). **Comparisons of the effects , of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans***. J. of Antimicrobial Chemotherapy . 43, 411–413.

**Health Canada**. **(**2013). **Health Canada Drug Product Database**. Available at: http://webprod5.hcsc. gc.ca/dpd-bdpp/index-eng.jsp Accessed 2014-05-09.

**Highland, M.A**.; Chaturvedi, S; Perez, M.; Steinberg, H. and Wallace, R.(2011).**Histologic and molecular identification of disseminated *Histoplasma capsulatum* in a captive brown bear(Ursus arctos)**.J.Vet.Diagnostic Investigation,23:764-769.

**Himedia Laboratories Limited**. (1993).**Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test** 4th ed .Vol.10.

**Hissen, AH**.; Wan, AN.; Warwas, ML.; Pinto, LJ., and Moore, MM.( 2005). **The *Aspergillus fumigatus* siderophore biosynthetic gene sidA, encoding L-ornithine N-oxygenase, is required for virulence**. Infect Immun. 73:5493–503.

**Hodgson, B.P.** and Kizior,R.J.(2003).**Staunders nursing drug handbook**.Elsevier science.USA

**Hoffmann, K**.; Pawlowska, J.; Walther, G.; Wrzosek, M.; de Hoog, GS. and Benny, GL.( 2013). **The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies**. Persoonia. 30:57–76.

**Hogan, LH**.; Klein, BS., and Levitz, SM. (1996). **Virulence factors of medically important fungi**. Clin Microbiol Rev **9**: 469–488.

**Houbraken, J**. and Samson, R. A. (2011). **Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families**. Studies in Mycology, 70, 1–51.

**Hube , b**.; Stehr, F.; Bossenz, M.; Mazur , A.; Kretschmar, M., and Schafer, W. (2000). **Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning,characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members**.Arch Microbial .174:362-74.

**I**

**Ibrahim, AS**.; Mirbod, F.; Filler, SG.; Banno, Y.; Cole, GT.; Kitajima,Y.; Edwards, JE Jr.; Nozawa, Y., and Ghannoum, MA .(1995). **Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans***. Infect Immun 63: 1993–1998.

**Ikram-Ul-Haq.;** Hamid, Mukhtar. and Hina Umber.( 2006). Production of protease by *pencillium chrysogenum* through

optimization of environmental conditions. J. of Agric. and Social Sciences, 1813-2235/02-1- 23- 25.

**Inglis, DO**.; Voorhies, M.; Hocking Murray, DR., and Sil, A. (2013). **Comparative transcriptomic of infectious spores from the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* reveals a core set of transcripts that specify infectious and pathogenic states**. Eukaryot Cell 12: 828–852.

**J**

**Jacob, J**.;Pescatore, T. and Cantor, A.(2011).**Avian diseases transmissible to humans**.Cooperative Extension Service,University of Kentucky,College of Agriculture,Lexington,PP:1-6.

**Jake,D.M**. (2003).**In vitro susceptibility of some fungus to antibiotics and disinfectants** .chemotherapy, 40: 239-244.

**Jansen, H.-J**.; Grenier ,D., and Van der Hoeven, J. S.( 1995). **Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens***. Oral Microbiol. Immunol. 10**:**138–145.

**Jaton-Ogay, K**.; Paris, S.; Huerre, M.; Quadroni, M.; Falchetto, R.; Togni, G.; Latge¬, J. P., and Monod, M. (1994). **Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus***. Mol. Microbiol. 14, 917 - 928.

**Jawetz, C**. ;Melnick, J.L. and Adelberg, E.A.(1998). **Review of medical microbiology** .21 st ed .Appleton and Lange.USA.

**Jenkins, JR**.( 1991). **Aspergillosis. In: Proceedings of the annual conference of the Association of Avian Veterinarians**. pp. 328–330.

**Jones, MR**., and Orosz, SE.( 2000). **The diagnosis of aspergillosis in birds**. Sem Avian Exot Pet Med. 9:52-58.

**Jordan, FT**. and Pattison, M.( 1997). **Poultry diseases**. 4th ed. London: Saunders.

**Julia**. R. Ko hler; Casadevall,Artouro and Perfect, John.,(2015). **The Spectrum of Fungi That Infects Humans**. Cold Spring Harbor Laboratory Press.PP:1-22.

**K**

**Karkowska-Kuleta, Justyna**.; Maria Rapala-Kozik and Andrzej, Kozik.( 2009). **Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans, Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus.*** Vol. 56 No. 2/2009, 211–224.

**Kaufman, DA**. and Manzoni P.( 2010). **Strategies to prevent invasive candidal infection in extremely preterm infants**. Clin Perinatol.37:611–28.

**Khan,M. S. A**.; Ahmad, I.; Aqil, F.; Owais, M.; Shahid, M., and , Musarrat, J.( 2010). **Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans***.Combating Fungal Infections . Chapter 2.PP:21-45.

**Khlangwiset, P**., and Wu,F.(2010).**Costs and efficacy of public health interventions to reduce aflatoxin-induced human disease**.Food additives and contaminants. Part A, Chemistry, analysis,control,exposure & risk assessment 27,pp:998-1014.

**Khoshkho, Zh**., and Matin, R.H.**(** 2013). **Efficacy of medication therapy to control of Saprolegniasis on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs**. Global Veterinaria, 10(1): 80–83.

**Khosravi, A.R**., Shokri, H., Ziglari, T., Naeini, A.R., Mousavi, Z. and

Hashemi, H. (2008). **Outbreak of severe disseminated aspergillosis in**

**a flock of ostrich (Struthio camelus)**. Mycoses, 51, 557_559.

**Kim, JY**.; Yeo, SH.; Baek, SY., and Choi, HS. (2011). **Molecular and morphological identification of fungal species isolated from bealmijang meju**. J. of Mic. and Biote. 21: 1270–1279.

**Kondo, Shigemi**. ; Yoko, T. ; Toshihiko, Y. ; Shigeki , M. ; Toyoko, O. ; Akimichi, O. and Takashi, M.(2012). **Comparison of Antifungal Activities of Gentian Violet and Povidone-Iodine Against Clinical Isolates of CandidaSpecies and Other Yeasts: A Framework to EstablishTopical Disinfectant Activities**. Mycopathologia 173:21–25.

**Kontoyiannis, DP**.; Bodey, GP., and Mantzores, CS. (2001).**Fluconazole vs. amphotericin B for the management of candidaemia in adults**: a meta-analysis. Mycoses.; 44:125-35.

**Kourousekos, G.D**.; Theodosiadou, E.; Belibasaki, S.; Deligiannis, K.; Koukoulas, Th.; Zoulfos, K., and Lymberopoulos A.G. (2012). **Effects of aflatoxin B1 administration on Greek indigenous goats' milk**. International Dairy Journal, 24, 123–129.

**Kramer, KM**.; Skaar, DJ., and Ackerman, BH.( 1997). **The fluconazole era: Management of hematogenously disseminated candidiasis in the nonneutropenic patient**. Pharmacotherapy;17:538-48.

**Krishnan, S**.; Manavathu, EK., and Chandrasekar, PH.( 2009). ***Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus Aspergillus species of significance**. Mycoses. 52, 206-222.

**Krnjaja, V.;** Stojanovic LJ.; Cmilianic R.; Trenkovski S. and Tomasevic D. (2008). **The presence of potentially toxigenic fungi in poultry feed**. Biotehnology in Animal Husbandry, 24, 5-6, 87-93.

**Krnjaja, V**.; Stojanovic LJ.; Trenkovski S.; Bijelic Z. and Tomasevic D. (2010).**The frequency of pathogenic fungi genera in poultry feed**. J. of Food, Agric. and Environment, 8, 3-4, 589-591.

**Kulkarni, A**.; Sinha, M., and Andhu,U.( 2012). **Primary cutaneous Cryptococcosis due to *Cryptococcus laurentii* in a renal transplant**, Saudi J. of Kidney Dis. Transplantation ,23: 102-105.

**Kunkle,RA**. (2003). **Fungal infections**. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson,JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE (eds) Diseases of poultry, 11th edn. Iowa State Press, Ames, p 901.

**Kwon-Chung, K.J**. and Bennett, J.E. (1992). **Medical Mycology**. Williams and Wilkins Company,pp.105-161.

## L

**Lammer,R.L**.;Fourre.M.,;Callaham,M.L.&Bonne.,T.(1990).**Effect of povidone-iodine &saline soaking on Bacterial count in Acute,Traumatiecontamination wounds**.Ann.Emerg.Med.,19:709-714.

**Lanteri ,Giovanni**.; Alessandra, Sfacteria.; Daniele, Macrı.`; Stefano, Reale., and Fabio, Marino.( 2011). **Penicilliosis in an African grey Parrot (*Psittacus erithacus*)**. J. of Zoo and Wildlife Medicine. 42(2): 309–312..

**Latgé, JP**. (2001) .**The pathobiology of *Aspergillus fumigatus***. Trends Microbiol 9: 382–389.

**Le, T**.,; Wolbers, M. and Chi, NH.( 2011). **Epidemiology, seasonality, and predictors of outcome of AIDS-associated *Penicillium marneffei* infection in Ho Chi Minh City**, Viet Nam. Clin Infect Dis. Apr 1;52(7):945-952.

**Lee, SC**.; Li ,A.; Calo, S., and Heitman, J. (2013). **Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of *Mucor circinelloides***. PLoS Pathog 9:(9).

**Lee, SC**.; Ni, M.; Li, W.; Shertz, C.; and Heitman, J.( 2010). **The evolution of sex: A perspective from the fungal kingdom**. Microbiol Mol Biol Rev 74: 298–340.

**Lee,E.** ; Kim, A.; Lee, E.; Park, S., and Jeong, K.(2016). **Septic shock associated with complex infection by crop *Candida* and bacteria in two blue-fronted amazon parrots**: a case report . Veterinarni Medicina, 61, (5): 288–294.

**Liu, T**.; Xu, X.; Leng, W.; Xue, Y.; Dong, J. and Jin ,Q.( 2014). **Analysis of gene expression changes in *Trichophyton rubrum* after skin interaction**. J. Med. Microbiol.; 63, 642-8.

**Long Brit, MD**. and Koyfman Alex, MD.( 2015). **Mucormycosis: what emergency physicians need to know?**, American J. of Emergency Medicine.

**Louthrenoo, W**.; Thamprasert, K. and Sirisanthana, T.( 1994). **Osteoarticular penicilliosis marneffei**. A report of eight cases and review of the literature. Br J Rheumatol;33(12):1145-50.

**M**

**Maertens , J. A**.( 2004). **History of the development of azole derivatives**. Clin Microbiol Infect. 10 (Suppl. 1): 1–10.

**Mathieson, W**.; Kirkland, S.; Leonard, R., and Thomas, G.A.( 2011). **Antimicrobials and in vitro systems: antibiotics and antimycotics alter the proteome of MCF-7 cells in culture**. J. Cell Biochem. 112 (8), 2170–2178.

**Maziarz, K Eileen**. and Perfect, R John. (2016). **Cryptococcosis**. Infect Dis Clin N Am .30 179–206.

**Mbata, TI**; Ike, NP., and Ahonkhai, I.( 2005). **Isolation of keratinophilic fungi and other dermatophytes from feathers of Nigerian turkey**. Sudanese J Dermatol; 3: 119–24.

**McCormick, A**.; Loeffler, J. and Ebel, F. (2010). ***Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen**. Cellular Microbiology, 12: 1535-1543.

**McDonell,G**. and Russell,A.(1999).**Antiseptic and disinfectants Activity,Action and Resistance**,clin.Microbial.Rev.,12:147-170.

**Mehdi, T**.; Hassan, G. C.; Ali, R. K.; Ahmed, E., and Asad, B. (2014). **Fungal flora of the combs and wattles of Iranian native chickens**. Iranian J. of Mic., 6 (1): 46-50.

**Mendes, J.F**.; Albano, A.P.N.; Coimbra, M.A.A.; Ferreira, G.F.; Goncalves, C.L.; Nascente, P.S. and Mello, J.R.B.(2014). **Fungi isolated from the excreta of wild birds in screening centers in Pelotas, RS, Brazil**. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 56(6): 525-8.

**Mendes-Giannini , M.J.S**.; Soares, C. P.; Monteiro da Silva, J. L., and Andreotti, P.F.(2005). **Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches.** FEMS Immunology and Medical Microbiology 45 . 383–394.

**Michalowicz, J**. and Duda, W.( 2007) . **Phenols transformations in the environment and living organisms** : Current Topics in Biophysics,: 30(A): 24-36.

**Miljković, Z.**; Pavlovski, D.; Jovičić, O.; Radanović, B. and Kureljušić B.( 2011). **Fungi on feathers of common clinically healthy birds in Belgrade**. Biotechnology in Animal Husbandry 27 (1), p 45-54 .

**Moges, Birhan**.; Adane, Bitew., and Aster, Shewaamare.(2016). **Spectrum and the *In Vitro* Antifungal SusceptibilityPattern of Yeast Isolates in Ethiopian HIV Patients withOropharyngeal Candidiasis**. International J. of Mic.pp 3.

**Monod, M**.; Togni, G.; Rahalison L.; and Frenk, E. (1991). **Isolation and characterisation of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*.** J. Med. Microbiol. 35, 23 - 28.

**Morace, G**. and Borghi, E.( 2012). **Invasive mold infections: virulence and pathogenesis of mucorales**. Int J Microbiol. 2012: 349278.

**Moretti AD**, Piergili FL, Boncio P, Pasquali ED and Rossi. (2000). **Isolation of *Candida rugosa* from turkeys**. J Vet Med B 47:433–439.

**Moubasher ,Abdel-Aal. H**.; Mady, A. Ismail.; Nemmat ,A. Hussein.,and Hassan, A. Gouda.(2016). **Enzyme producing capabilities of some extremophilicfungal strains isolated from different habitats of Wadi El-Natrun, Egypt. Part 1: Protease, lipase and phosphatase**. European Journal of Biological Research; 6 (2): 92-102.

**Mugale ,M**. ; Bhat, A. A. ; Gavhane, D. S. and Bhat ,S. A.(2015). **Outbreaks of thrush in pigeons in Punjab State of India**. Comp Clin Pathol . 24:635–638.

**Murata, Y**.; Sano, A.; Ueda, Y.; Inomata, T.; Takayama, A.; Poonwan, N.; Nanthawan, M.; Mikami, Y.; Miyaji, M.; Nishimura, K. and Kamei, K. (2007). **Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan**. Med Mycol 45:233–247.

**Muthukrishnan, S**., and Mukilarasi, K.(2016). **Industrial Important Protease Screening and Optimization from Micro-Fungal Isoltaes of Ayyanar Falls Forest Samples, Rajapalalyam**. World Applied Sciences Journal 34 (3): 343-347.

**N**

**Nagao, K**.; Ota, T.; Tanikawa, A.; Takae, Y.; Mori, T. and Udagawa, S. (2005).**Genetic identification and detection of human pathogenic Rhizopus species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internaltranscribed spacer region of rRNA gene**. J Dermatol Sci. 39(1):23–31.

**Nagappan, V**. and Deresinski, S.( 2007). **Reviews of anti-infective agents: posaconazole: abroad-spectrum triazole antifungal agent**. Clin Infect Dis.45:1610–7.

**Naik, S**.; Chougule, M.; Padhi, B.K., and Misra, A.( 2005). **Development of novel lyophilized mixed micelle Amphotericin B formulation for treatment of systemic fungal infection**, Curr Drug Deliv. 2 .PP: 177–184

**Nam Long, Nguyen**.( 2008). **Importance of secreted lipases for virulence of the phytopathogenic fungus *Fusarium graminearum* Dissertation**. A thesis submitted to the Departments für Biologie, Universität Hamburg for the degree of doctor rerum naturalium. Hamburg .

**Nayak, AP**.; Green, BJ.; Friend, S., and Beezhold, DH .( 2012). **Development of monoclonal antibodies to recombinant terrelysin and characterization of expression in *Aspergillus terreus*** . J Med Microbiol . 61 : 489 – 499 .

**Nayak, AP.;** Green, BJ. and Beezhold, DH.( 2013). **Fungal hemolysins.** Med Mycol;51:1—16.

**Negedu, A**.; Ameh, JB.; Umoh, VJ., and Atawodi, SE.(2012). **Lipolytic activity of some fungal species on castor oil**.African Journal of Food,Agriculture,Nutrition and Development.V12 No 6.

**Negedu, A**.; Dapiya, SH.; Wartu, JR., and Migap ,HH.( 2010). **Biodeterioration of Soya bean oil by mesophilic moulds. Biological and Environmental sciences J. for the Tropics**, 7 (3): 113 – 118.

**Nehra, K.S**.; S., Chaudhary, K., and Singh R. (2002). **Production of alkaline protease by *Aspergillus* under submerged and solid state fermentation**. Ind. J. Microbiol., 42: 43-47.

**Neto, FM**.; Camargo, PC.; Costa, AN.; Teixeira, RH.; Carraro, RM. and Afonso, JJ. (2014).**Fungal infection by Mucorales order in lung transplantation: 4 case reports**. Transplant Proc. 46(6):1849–51.

**Nikodinovic, J**. Barrow, K. D. (2003). **"High frequency transformation of the Amphotericin-producing bacterium *Streptomyces nodosus*."** J. of micro. methods 55(1): 273-277.

**Nosanchuk, J**. and Gacser, A. (2008). ***Histoplasma capsulatum*** **at the host-pathogeninter- face, Microb**.Infect.10973–977.

**Nowicki, Marcin**; *et al*. (2012), "***Alternaria*** **black bpot of crucifers: Symptoms, importance of disease, and perspectives of resistance breeding**", Vegetable Crops Research Bulletin(Vegetable Crops Research Bulletin,Versita, Warsaw, Poland) 76.

**O**

**Odds, FC** .( 1998). ***Candida and candidosis*** : a review and bibliography . Oxford, UK: Bailliere Tindall .

**Odom, A**.; Muir, S. and Lim, E.( 2007) .**Calcineurin is required for virulence of *Crytptococcus neoformans***. EMBO J.16:2576–89.

**Okore , Chioma. C**.; Mbanefo, Ogechukwu. N.; Onyekwere, Bright .C.; Onyewenjo, Simon. C.; Ozurumba, Agaptus. U., and Abba-Father Chinyere A.M.(2014). **Antimicrobial Efficacy of Selected Disinfectants**, American J. of Bio. and Life Sci. Vol. 2, No. 2, 2014, pp. 53-57.

**Olias, P**.; Hauck, R.; Windhaus, H.; Grinten, E.; Gruber, AD. and Hafez, HM.( 2010). **Articular aspergillosis of hip joints in turkeys**. Avian Dis . 54: 1098-1101.

**Olin, B.R**.( 1997). **Drug Facts and Comparisons**. St. Louis, Facts and Comparisons, Inc.;:359-359f.

**Ostrosky-Zeichner, L**. (2008).**Combination antifungal therapy: a critical review of the evidence**. Clin Microbiol Infect. 14 Suppl 4:65–70.

**Oyeleke, S.B**.;Egwim, E.C., and Auta, S.H.(2010). **Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production**.J.Microbial.Antimicrob.,2:83-87.

**P**

**Pal, M**. (2014). ***Cryptococcus gattii*: An emerging global mycotic pathogen of humans and animals**. J. of Mycopath. Research , 52: 1-7.

**Palencia, ER**.; Hinton, DM., and Bacon, C W. (2010). **The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production**. Toxins 20:399-416.

**Partanen, H.A**.; El-Nezami, H.S.; Leppanen, J.M.; Myllynen, P.K.; Woodhouse, H.J., and Vahakangas, K.H. (2010). **Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta**. Toxicological Sciences, 113, 216–225.

**Pastor, FJ**., and Guarro, J. (2008). ***Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features**. Clin Microbiol Infect 14: 734–746.

**Patel, RP**.; Patel, HH., and Baria, AH.( 2009). **Formulation and evaluation of carbopol gel containing liposomes of ketoconazole**, Int. J. Drug Delivery Technology; 1(2):42-45.

**Peres, NTA**.; Maranhão ,FCA.; Rossi, A., and Martinez-Rossi, NM.( 2010 ).**Dermatophytes: Host-pathogen interaction and antifungal resistance**. *An.* Bras. Dermatol.; 85, 657-67.

**Perfect, J.R**.; Dismukes, W.E.; Pappas, P.G.; Singh, N.; Harrison, T.E.; Lortholary, O.; Dromer, F.; Sobel, J.D.; Sorrell, T.C.; Goldman, D.L.; Nuygen, M.H.; Hammil, R.D.; Larsen, R.A.; Powderly, W.G. and **Perfect, JR**.( 2015) .***Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii***. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders. p. 2934–48.

**Perfect, J.R**.; Dismukes, W.E.; Pappas, P.G.; Singh, N.; Harrison, T.E.; Lortholary, O.; Dromer, F.; Sobel, J.D.; Sorrell, T.C.; Goldman, D.L.; Nuygen, M.H.; Hammil, R.D.; Larsen, R.A.; Powderly, W.G. and Graybill, J.R.( 2010). **Clinical practice guidelines forthe management of cryptococcal disease**: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 50, 291–322.

**Perinotto, W.M.S**.; Gôlo, P.S.; Coutinho-Rodrigues, C.J.B.; Sá, F.A.; Santi, L.; Beys-da-Silva, W.O.; Junges, A.; Vainstein, M.H.; Schrank, A.; Salles, C.M.C. and Bittencourt, V.R.E.P. (2014). **Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of Metarhizium anisopliae in *Rhipicephalus microplus*.** VeterinaryParasitology, 203, 189-196.

**Petrikkos, GL**.( 2009). **Lipid formulations of amphotericin B as first-line treatment of zygomycosis**. Clin Microbiol Infect;15(Suppl. 5):87–92.

**Phillips, P**.; Galanis, E. and MacDougall, L.( 2015). **Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia**. Clin Infect Dis;60(9):1368–76

**Pitt, JI**.; Basílico, JC.; Abarca, ML.; López, C.; Basílico; Abarca and López. (2000). **"Mycotoxins and toxigenic fungi"**. Medical Mycology38 (Suppl 1): 41–46.

**Plumb,DC**.(2008).**AmphotericinB**:in PlumbDC(ed) :Plumb'sVeterinary DrugHandbook.(ed6).Oxford,UK,Blackwell Publishing Professional,pp71-77.

**Prasanna, S**.; Partha, Roy.; Raghu, Sriram.; Naveen, Grover.; Priyanka, Pandit., and Mayuri ,A .Kulkarni.(2016**). Comparison of E-test and Colorimetric Micro Broth Dilution Method for Antifungal Susceptibility Testing of Candida Isolates**. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci (2016) *5*(5): 194-204.

**Price, M.F**. ; Wilkinson, I.D. and Gentry, L.O.(1982).**Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans* sabouraudia**. 22:201-207.

**Prize, C**. ; Pauli, M. and Bazerque, P.(1990). **An antibiotic assay by the agar –well diffusion Method** .J.Actabiologiae.15:113-115.

**Pupp, GR**.; Savage, DT., and Hillmann, MB.( 2002). **What are the best modalities forCharcot's foot?PodiatryToday**;15:30-6.

## Q

**Quesada, Ó**. ; Rodríguez, F.; Herráez, P.; Seara, D.; and Espinosa de los Monteros, A. (2007). ***Mucor ramosissimus*** **associated with feather loss in canaries (*Serinus canarius*)**. Avian Diseases: June 2007, Vol. 51, No. 2, pp. 643-645.

## R

**Rang, H.P**.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. and Moore, P.K.(2003).**Pharmacology**.5th ed.Churchil Livingstone,Edinburgh.

**Redal,K.M**.(1999). **Secular trends in the epidemiology of Nosocomical fungal infections in the United States**.J. of Disease.16:197-210.

**Refai, M**. K.; Amir, Elbatrawi, G.; Osman and Atef Hassan. (2016). **Monograph on Avian Mycoses and Mycotoxicoses**.p: 198.

**Rementeria, A**.; Lopez-Molina, N.; Ludwig, A.; Vivanco, A. B.; Bikandi, J.; Ponton, J. and Garaizar, J. (2005). **Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence**. Rev Iberoam Micol, 22**,** 1-23.

**Rhodes, J**. C.; Amlung, T. W.; and Miller, M. S. (1990). **Isolation and characterization of an elastinolytic proteinase from *Aspergillus flavus***. Infect. Immun. 58, 2529 -2534.

**Ribes, JA**.; Vanover-Sams, CL. and Baker, DJ.( 2000). **Zygomycetes in human disease**. Clin Microbiol Rev; 13: 236–301.

**Richard, J.L**. (2007). **Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview**. Inter. J. of Food Microbiology**.**119: 3-10.

**Reichard, U**., Monod, M., Odds, F., R and chel, R.: (1997). **Virulence of an aspergillopepsin-deficient mutant of**

***Aspergillus fumigatus*** **and evidence for another aspartic proteinase linked to the fungal cell wall**. J. Med. Vet. Mycol. 35, 189 - 195.

**Robinson**, D. H. and Lafleche, G.L.( 2000). **Nucleic acid electrophoresis in agarose gels**. Chapter five, Essential Molecular Biology. Volume One, second edition. Edited by.T.A.Brown.

**Robson, G. D**. (Ed.) .(2009). **Phospholipases of *Aspergillus fumigatus***. In: Latgé JP, Steinbach WJ, eds. *Aspergilus fumigatus* and *Aspergillosis.* , Washington: ASM Press. Robson, G. D., Huang, J., Wortman, J. and Archer, D. B. (2005) Apreliminary analysis of the process of protein secretion and the diversity of putative secreted hydrolases encoded in *Aspergillus fumigatus*: insights from the genome. Med Mycol, 43**,** S41-S47.

**Rodarte, M. P**.; Disney, R. D.; Danielle, M .V., and Rosane,F. S.(2011). **Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.)**. Acta Scientiarum. Agronomy. Maringá, v. 33, n. 3, p. 457-464.

**Rodrigues, M.L**.; Nakayasu, E.S.; Oliveira, D.L.; Nimrichter, L.; Nosanchuk, J.D.; Almeida, I.C. and Casadevall, A. (2008) .**Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence**. *Eukaryotic Cell*, 7, 58-67.

**Rotter,M**.(1999).**Hand washing and hand disinfection in:Mayhall, C.G. Hospital Epidemiology and Infection Control**. 2nd ed.Lippincott Wilkins,Philadelphia.

**Royer, M**., and Puechal, X. (2014). **Mucormycosis in systemic autoimmune diseases**. Joint Bone Spine.;81(4):303–7.

**Russell, A.D**. and Mc Donnell, G.(2000).**Concentration :amajor factor in studying biocidal action**.J.Hosp.Infect.,44:1-3.

**Rutala,W.A**. and Weber, D.J.(1999).**Infection control:the role of disinfection and sterilization**.J.Hosp.Infect.43:43-55.

**Rasmussen, H. B**. (2012). **Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting**. In Gel Electrophoresis - Principles and Basics, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.).

**S**

**Sabatelli, F**.; Patel, R.; Mann, PA.; Mendrick, CA.; Norris, CC. and Hare, R.( 2006). **In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts**. Antimicrob Agents Che¬mother. 50(6):2009–15.

**Sachin, CD**.; Ruchi, K., and Santos, S.( 2012). **In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of Candida species isolated from clinical specimens**. Int J Med Biomed Res; 1:153—7.

**Safarik, I**., and Safarikova,M.( 2002). **Detection of low concentrations of malachite greenand crystal violet in water**, Water Res. 36 . 196–200.

**Saleem, Abdel-Rahman**.(2008). **Effect of Some Food Preservatives on the Lipolytic Activity of Beef Luncheon Fungi** . Mycobiology 36(3) : 167-172.

**Saleemi , M**. K.; Khan M. Z.;Khan, A. and Javed, I.(2010). **Mycoflora of poultry feeds and mycotoxins producing potential of *Aspergillus* species**. Pak. J. Bot., 42(1): 427-434.

**Samson, RA**.; Seifert, KA.; Kuijpers, AF.; Houbraken, JA., and Frisvad, JC. (2004). **"Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Pencillium* using partial beta-tubulin sequences"** (PDF). Studies in Mycology 49: 175–200.

**Santangelo, R**.; Zoellner, H.; Sorrell, T.; Wilson, C.; Donald, C.; Djordjevic, J.; Shounan, Y., and Wright, L .(2004). **Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model**. Infect Immun 72: 2229–2239.

**Saso**,M.A.(2001).**The wide world domestic birds.breading,curing and feeding**.Mark Wilson publishing com.Washington.

**Savitha, J**.; Srividya, S.; Jagat, R.; Payal, P.; Priyanki, S. and Rashmi, GW.,.( 2007). **Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase**. Afr J Biotechnol.; 6(5): 564-568.

**Schaufuss, P**., and Steller, U.( 2003). **Haemolytic activities of Trichophyton species**. Med Mycol.41:511—6.

**Schiefer,W.C**.(1980).**Statistics for the biological sciences**,2nd ed.Addison.Wesley publcomp,California,London.

**Schmidt, V**.; Demiraj, F.; Di, SA.; Bailey, T.; Ungemach, FR., and Krautwald-Junghanns, ME.( 2007). **Plasma concentrations of voriconazole in falcons**. Vet Rec. 161:265–8.

**Schoen, C**.; Reichard, U.; Monod, M.; Kratzin, H. D., and Ruchel, R. (2002). **Molecular cloning of an extracellularaspartic proteinase from Rhizopus microsporus and evidence for its expression during infection**. Med. Mycol. 40, 61 - 71.

**Schofield, DA**.; Westwater, C.; Warner, T., and Balish, E. (2005). **A differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection**. FEMS Microbiology Letters 244: 359–365.

**Schrettl, M**.; Bignell, E.; Kragl, C.; Joechl, C.; Rogers, T. and Arst, Jr HN. (2004).**Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence**. J Exp Med.;200:1213–9.

**Senior, B.W**. and Hughes, C. (1987).**Production and properties of hemolysin from clinical isolates of protease**. J.Med. 24:17-25.

**Severo, CB**.; Guazzelli, LS. and Severo, LC.( 2010). Chapter 7: **zygomycosis**. J Bras Pneumol.;36:134-141.

**Sharpton, TJ**.; Stajich, JE.; Rounsley, SD.; Gardner, MJ. and Wortman, JR. (2009). **Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens Coccidioides and their relatives**. Genome Res 19: 1722–1731.

**Shuaib, F.M**.; Ehiri, J.; Abdullahi, A.; Williams, J.H. and Jolly, P.E. (2010). **Reproductive health effects of aflatoxins: a review of the literature**. Reproductive Toxicology, 9, 262–270.

**Siafakas, AR**.; Sorrell, TC.; Wright, LC.; Wilson, C.; Larsen, M.; Boadle, R.; Williamson, PR., and Djordjevic, JT. (2007). **Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity**. J Biol Chem 282: 37508–37514.

**Sierra, G**.(1957). **A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observation on the influence of the concentration of tween cell and fatty substrate**.Antoni Van Leewenhock.Ned. J.Hyg. 23:15-22.

**Silvanose, CD**.; Bailey, TA., and Di Somma, A.( 2006). **Susceptibility of fungi isolated from the respiratory tract of falcons to amphotericin B, itraconazole and voriconazole**. Vet Rec 159:282-284.

**Simona, O**. and Mihaela, S. (2008). **Mycotoxins: A Review of Toxicology, Analytical Methods and Health Risks**. Food technology.12:1.

**Sirisanthana, T**.; Supparatpinyo, K.; Perriens, J. and Nelson, KE. (1998).**Amphotericin B and itraconazole for treatment of disseminated *penicillium marneffei* infection in human**

**immunodeficiency virus-infected patients**. Clin Infect Dis.26(5):1107-10.

**Southwood , L.L**. and Baxter,G.M.(1996).**Instrument sterilization. Skin preparation and wound management**. Veterinary Clinics of North America:Equine Practice,(12):173-194.

**Spadaro**, **D**.; Patharajan, S.; Lore, A.; Garibaldi, A. and Gullino, M.( 2012). Ochratoxigenic Black Species of Aspergilli in Grape Fruits of Northern Italy Identified by an Improved PCR-RFLP Procedure. Journal of toxins, 4: 42-54.

**Stehr, F**.; Kretschmar, M.; Kroger, C.; Hube, B., and Schafer, W.( 2003). **Microbial lipases as virulence factors. J. of Molecular Catalysis B**: Enzymatic 22: 347–355.

**Steinert, P. M**., and Marekow, L. N. (1997). **Direct evidence thatinvolucrin is a major earlyisodipeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope**. J. Biol. Chem. 272, 2021 - 2030.

**Storvik, M**.; Huuskonen, P.; Kyllonen, T.; Lehtonen, S.; El-Nezami, H.; Auriola, S., and Pasanen, M. (2011**). Aflatoxin B1 – a potential endocrine disruptor – up-regulates CYP19A1 in JEG-3 cells**. Toxicology Letters, 202, 161–167.

**Sun, HY**., and Singh, N.( 2011). **Mucormycosis: its contemporary face and management strategies**. Lancet Infect Dis. 11:301-311.

**Sunil, Y.**; Ajay, B.; and Mahesh, K. K.( 2015). **Review On Topical Liposomal Gel Of Ketoconazole**. International J. of Institutional Pharmacy and Life Sciences. 5(1): 40-50.

**Supparatpinyo, K**.; Chiewchanvit, S. and Hirunsri, P. ( 1992). **An efficacy study of itraconazole in the treatment of *Penicillium marneffei* infection**. J. of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet. Dec.75(12):688-691.

**Supparatpinyo, K**.; Khamwan, C.; Baosoung, V.; Nelson, KE. and Sirisanthana, T.( 1994). **Disseminated *penicillium marneffei* infection in southeast asia**. Lancet.344(8915):110-3.

**Supparatpinyo, K**.; Nelson, KE. and Merz, WG.( 1993). **Response to antifungal therapy by human immunodeficiency virus-infected patients with disseminated *penicillium marneffei* infections and in vitro susceptibilities of isolates from clinical specimens**. Antimicrob Agents Chemother.37(11):2407-11.

**Sutton, DA**.; Sanche, SE.; Revankar, SG.; Fothergill, AW., and Rinaldi, MG.( 1999). **In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to head comparison to voriconazole**. J Clin Microbiol.;37:2343–2345.

T

**Tatsumi, H**.; Murakami, S.; Tsuji, R. F.; Ishida, Y.; Murakami, K.;Masaki, A.; Kawabe, H.; Arimura, H.; Nakano, E., and Motai, H. (1991). **Cloning and expression in yeast of a cDNA clone encoding *Aspergillus oryzae* neutral protease II, a unique metalloprotease**. Mol. Gen. Genet. 228, 97 - 103.

**Tell, LA**. (2005). **Aspergillosis in mammals and birds**: impact on Veterinary medicine. Medical Mycology, 43 Suppl 1: S71-73.

**Tell, LA**.; Clemons, KV.; Kline, Y.; Woods, L.; Kass, PH.; Martinez, M. and Stevens, DA.( 2010). **Efficacy of voriconazole in Japanese quail (Coturnix japonica) experimentally infected with *Aspergillus fumigatus***. Med Mycol. 48:234–44.

**Teng, Y**. and Xu, Y. (2008). **Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. Bioresour**. Technol. 99, 3900 – 3907.

**Terrell, G.L**. and Hughes, C.E.(1992).**Antifungal agents used for deep –seated mycotic infection**.Mayo clin proc.67:69-91.

**Theiss, S**.; Ishdorj, G.; Brenot, A.; Kretschmar, M.; Lan, CY.; Nichterlein, T.; Hacker, J.; Nigam, S.; Agabian, N., and Köhler,GA. (2006). **Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence**. Int J Med Microbiol 296: 405–420.

**Thieu, N.Q**.; Ogle, B., and Pettersson, H. (2008). **Screening of aflatoxins and zearalenone in feedstuffs and complete feeds for pigs in southern Vietnam**. Tropical Animal Health and Production, 40, 77–83.

**Thomma, BART P. H. J**. (2003). ***Alternaria spp.*: from general saprophyte to specific parasite**. Molecular Plant Pathology 4 ( 4 ) , 225–236.

**Tomee, JFCH**., and Kauffman, HF. (2000). **Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus***. Clin Exp Allergy 30:476–484.

**Torres-Narbona, M**.; Guinea, J.; Munoz, P. and Bouza E.( 2007) .**Zygomycetes and zygomycosis in the new era of antifungal therapies**. Rev Esp Quimioter.20:375–86.

**V**

**Vail, GM**.; Young, RS.; Wheat, LJ.; Filo, RS.; Cornetta, K. and Goldman, M.( 2002). **Incidence of histoplasmosis folowing allogenic bonemarrow transplant or solid organ transplant in a hyperendemicarea**. Transpl Infect Dis: 4: 148–151.

**Vanittanakom, N**.; Vanittanakom, P. and Hay, RJ.( 2002). **Rapid identification of penicillium marneffei by PCR-based detection of specific sequences on the rRNA gene**. J Clin Microbiol.40(5):1739-42.

**Velasco,M**. C.(2000). **Candidiasis and Cryptococcosis in Birds**. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, Vol 9, No 2 (April): pp 75-81.

**Veldhuizen, R**.; Nag, K.; Orgeig, S., and Possmayer, F. (1998). **The role of lipids in pulmonary surfactant**. BBA-Mol Basis Dis, 1408**,** 90-108.

**Vijay, HM**., and Kurup, VP. (2004). **Fungal allergens**. Clin Allergy Immunol;18:223-49.

**Voigt, CA**.; Scha¨ fer ,W., and Salomon, S.( 2005). **A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals**. The Plant Journal 42: 364–375.

**W**

**Wagh, MP**., and Patel, JS.(2010).**Biopharmaceutical classification system scientific basis for biowaiver extension**, Int. J. Pharm. Pharma. 12-19.

**Waliyar, F**.; Osiru, M.; Ntare, BR.; Kumar, VKK.; Sudini, H.; Traore, A.,and Diarra, B. (2015). **Post-harvest management of aflatoxin contamination in groundnut**. World Mycotoxin J. 8(2):245-252.

**Waliyar**. (2008). **Institutionalizing Mycotoxin Testing in Africa**. Chapter 31. Pp: 367-375.

**Wang, D**.; Xu, Y., and Shan T. (2008). **Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media**. Biochem. Eng. J. 41, 30 – 37.

**Warnock, DA**.( 2010). **Antifungal agents.** In: Finch, RG.; Greenwood, D.; Norrby, SR.; Whitley, RJ., editors. Antibiotic and Chemotherapy. London: Elsevier Saunders;, pp. 366–94.

**Watanabe, T**.(2002).**Pictorial atlas of soil and seed fungi,Morphologies of culture of fungi and key to species**.second edition.C.R.C.P.Press.

**Wetter, T.J**.(2004).**Advances in yeast and mold monodrug and combination drug antifungal suscesptibility testing**.Microbiology .Ph.D.Thesis.Montana state University.

**Wheat, L. J**.; Freifeld, A. G. and Kleiman, M. B.( 2007). **Infectious Diseases Society of America. "Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: update by the Infectious Diseases Society of America"**. Clinical Infectious Diseases 45 (7): 807–25.

**White M. M**.; James, T. Y.; O'Donnell,K.; Cafaro,M.J.; Tanabe,Y. and Sugiyama,J.(2006). **Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data**. Mycologia, 98(6), 2006, pp. 872–884.

**Wolff ,AM**.; Appel, KF.; Petersen, JB.; Poulsen, U. and Arnau, J. (2002). **Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (syn. racemosus)**. FEMS Yeast Res 2: 203–213.

**Wong, SS**.; Wong, KH.; Hui, WT.; et al.( 2001). **Differences in clinical and laboratory diagnostic characteristics of *penicillium marneffei* in human immunodeficiency virus (HIV)- and non-HIV-infected patients**. J Clin Microbiol.39(12):4535-40.

**X**

**Xavier, MO**.; Soares, MP.; Meinerz, ARM.; Nobre, MO.; Oso´rio LG.; Silva Filho, RP., and Meireles, MCA.( 2007). **Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive magellanic penguins**. Braz J Microbiol. 38:480–4.

**Y**

**Yang, W**.; Wiederhold, N.P., and Williams, R.O.( 2008). **Drug delivery strategies for improved azole antifungal action**. Expert Opin. Drug Deliv. 5: 1199-1216.

## Summary

The current study included isolate and diagnose of fungi from pet birds by direct isolation , and it included four types of pet birds were pigeons , love bird , finches and Canary, The study examined samples of feathers, feed and feces taken from four types of isolated pet birds that were kept in cages in people's homes and pet shops in the city of Karbala, The study lasted for a period of six months from the 1st March - 1st October 2016.

The results showed a variation in the number and percentage of isolated fungi depending on the sex of the bird and the source of the isolation. *Aspergillus sp.* is the most common amongst all types of pet birds*:* 59.6% in love birds, 46% in Canaries, 54% in finches and 71.6% in pigeons, followed by *Penicillium sp. :* 40.4% in love birds, 51.3 %in canaries, 44.2% in finches and 28.4% in pigeons. Whereas results shows *Alternaria* sp. and *Mucor sp. the* least common in an average of 2.70% in canaries and 1.80% in finches respectively.

As far as sources of tested samples is concerned, samples taken from feathers were the most infected with fungi, as an average of 58.3%, 42.1%, 66.66% and 83.87%, for love birds, canaries, finches and pigeons respectively.

virulence factors was studied for two fungi *A.niger* and *P.digitatum* have included all of the ability to produce protease and Lipases and Phospholipases and Haemolysin and this study proved the ability of two fungi to produce lipases on culture media and was isolates originating feathers are the most efficient in the production of this enzyme so that inhibition zone reaching 5 mm of the fungus *A.niger* and 4 mm of *P.digitatum*.

As for the capability to produce Phospholipases enzyme, the two lab fungi produced this enzyme on specific media and it was observed that the samples taken from birds feces are the most efficient in the production of the enzyme. The inhibition zone were 8.6 mm for *A.niger* and 5 mm for *P.digitatum*.

on the other hand, the production proteases was observed mainly in samples of feathers were the *A.niger* recorded the highest inhibition zone 4.6 mm, whereas samples taken from birds feed shows the presence of *P.digitatum* which is the most efficient in producing of enzyme 3 mm.

Fungal isolates of *A.niger* and *P.digitatum* which were isolated from feed and feathers respectively the ability of haemolysis about 6.3 and 5 mm respectively.

Drug sensitivity of fungi isolated from pet birds was tested by using antibiotics Amphotericin B, Ketoconazole and Fluconazole. It was clearly observed that Ketoconazole that used against isolates *A.niger* is the most effective antibiotic, as inhibition zone reached 15.6 mm, 15 mm and 12.6 mm in samples taken from feathers, feed and feces respectively while inhibition zone of *P.digitatum* recorded 17.6 mm, 15 mm and 15.3 mm for samples from feed and feathers and feces, respectively.

Disinfectants effect against the two fungi, *A.niger* and *P.digitatum* isolated from pet birds were also tested by using Three disinfectants: Gentian violet ,Povidone-iodine and Dettol in three concentration levels: 1%, 5%, 10% , The results showed that Gentian violet antiseptic was highly efficient against the isolates of two fungi: *A.niger* and *P.digitatum* in concentration level of 1%.

The current study shed light on fungal infections associated with pet birds and the possibility of transmitting these infections to humans, which will certainly cause various health problems.

**Ministry of higher education**

**and scientific research**

**Al Qadissiya university**

**College of education**

**Biology department**

# Investigation of opportunistic fungi associated with pet birds and study of it's virulence factors

**A Thesis submitted**

To the Council of the College of Education - Qadissiya University

In partial fulfillment of requirements a master's degree in Microbiology science requirements – fungi

Presented by

Ihsan Ali Abdul Redha AL-Zamili

B.sc. OF Biology 1994

Supervised by

Prof. Dr. Majid Kadhim Abboud AL- Shibli

September 2016