



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

التوصيف الجزيئي لبعض مسببات الاخماج الجلدية في محافظة

الديوانية وتأثير جزيئات الفضة النانوية في نموها

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم / جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات الحصول على درجة الماجستير علوم / علوم الحياة / الاحياء المجهرية

من

نور جاسم محمد

أشرف

أ.م.د. نيران عبيد جاسم

رقم الصفحة	الموضوع	ت
I-II	الخلاصة	
III-VI	قائمة المحتويات	
VII	قائمة الجداول	
VIII-IX	قائمة الاشكال	
X	قائمة المختصرات	
1-3	الفصل الاول (المقدمة) Introduction	
4-19	الفصل الثاني (استعراض المراجع) Literature Review	
4	الاصابات الفطرية (Type of mycoses)	1.2
٤	الاصابات السطحية (Superficial mycoses)	١,١,٢
4	الاصابات الفطرية الجلدية (Cutaneous mycoses)	٢,١,٢
٤	الاصابات الفطرية تحت الجلد (Subcutaneous mycoses)	3.1.2
٤	الاصابات الفطرية الجهازية (Systemic mycoses)	٤,١,٢
٥	الاصابات الانتهازية (Opportunistic mycoses)	٥,١,٢
5	الفطريات الجلدية (Dermatophytes)	2.2
9	تصنيف الفطريات الجلدية	٣,٢
9	تشخيص الفطريات الجلدية	٤,٢
١٠	الصفات العامة للفطريات الجلدية	٥,٢
١٠	الجنس <i>Microsporum</i>	1.5.2
١١	الجنس <i>Epidermatophytes</i>	٢,٥,٢
11	الجنس <i>Trichophyton</i>	٣,٥,٢
13	الحالات السريرية للفطريات الجلدية	٦,٢
13	سعفة الرأس (Tinea capitis)	١,٦,٢
13	سعفة الجسم (Tinea corporis)	٢,٦,٢
١٤	سعفة القدم (Tinea pedis)	٣,٦,٢
١٥	سعفة الفخذ (Tinea cruris)	4.6.2

15	سعفة الاظافر (Tinea unguium)	5.6.2
15	سعفة اليد (Tinea manum)	6.6.2
16	سعفة الذقن (Tinea barbae)	7.6.2
16	سعفة الوجه (Tinea faieci)	8.6.2
16	وبائية الفطريات الجلدية (Epidemiology of dermatophytes)	7.2
17	تقنية النانو (Nano-Techniques)	٨,٢
18	جسيمات الفضة النانوية (Silver Nanoparticles)	9.2
20-40	الفصل الثالث (المواد وطرائق العمل) Materials & Methods	
20	الاجهزة	1.3
22	المواد الكيميائية والحياتية	2.3
23	العدد المستعملة في أستخلاص DNA	3.3
24	الايوساط والمحاليل المستعملة	4.3
26	جمع العينات السريرية (Collection of the clinical Specimens)	٥,٣
26	الفحص المجهرى المباشر للعينات (Direct microscopic examination of Specimens)	٦,٣
26	زرع العينات (Culturing of specimens)	٧,٣
٢٧	حساسية الاختبارات التشخيصية وخصوصيتها	١,٧,٣
٢٧	تنقية الانواع الفطرية وحفظها	٢,٧,٣
٢٨	تشخيص الانواع الفطرية	٨,٣
٢٨	الخصائص المظهرية	١,٨,٣
٢٨	الخصائص المجهرية	2.8.3
28	اختبار ثقب الشعرة (Hair perforation test)	٣,٨,٣
28	اختبار اليوريز (Urea's test)	٤,٨,٣
29	تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية (Slide culture technique)	5.8.3
29	طريقة التشخيص باستعمال فحص (PCR)	٦,٨,٣
30	استخلاص الحمض النووي من الفطر (DNA extraction)	١,٦,٨,٣
31	فحص الحمض النووي المستخلص (DNA profile)	٢,٦,٨,٣
32	تحضير محلول التفاعل لسلسلة تفاعلات البلمرة PCR	3.6.8.3

33	حالات الدورات الحرارية للفحص (PCR thermocycler conditions)	4.6.8.3
34	تحليل نتائج فحص (PCR)	5.6.8.3
34	طريقة تسلسل الحمض النووي (DNA sequencer method)	7.3
38	دراسة تأثير ايونات الفضة على بعض انواع الفطريات الجلدية	8.3
38	تأثير التراكيز المختلفة لايونات الفضة في تثبيط النمو الشعاعي لفطريات الاختبار	1.8.3
39	تأثير ايونات الفضة في الوزن الجاف للفطريات الاختبارية	٢,٨,٣
39	دراسة تأثير ايونات الفضة النانوية على الصفات المظهرية للفطريات	٩,٣
40	التحليل الاحصائي (Statistical analysis)	١٠,٣
41-70	الفصل الرابع النتائج (Results)	
41	العزل والتشخيص	1.4
42	الحساسية والخصوصية للفحص المجهرى وطريقة الزرع	٢,٤
٤٢	تشخيص الانواع المعزولة	٣,٤
44	الفحوصات التأكيدية للانواع الفطرية المعزولة	4.4
44	التشخيص الجزيئي بأستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	5.4
45	استخلاص الـ (DNA)	١,٥,٤
51	توزيع الاصابات الجلدية بحسب اماكن الاصابة	6.4
51	النسبة المئوية لظهور الانواع المعزولة وترددتها	7.4
52	العلاقة بين الاصابات الجلدية والجنس	8.4
٥٣	العلاقة بين الاصابات الجلدية ومنطقة السكن	٩,٤
٥٤	فاعلية ايونات الفضة على بعض الجوانب الفسلجية للفطريات مختبرياً	١٠,٤
٥٤	تاثير ايونات الفضة النانوية في النمو الشعاعي للفطريات المنتخبة	١,١٠,٤
٦٠	تأثير جزيئات الفضة النانوية في الوزن الجاف للفطريات المختبرة	٢,١٠,٤
٦٧	تاثير جزيئات الفضة النانوية على مورفولوجيا الهايفات الفطرية	٣,١٠,٤
68-69	الفصل الخامس الاستنتاجات والتوصيات	
68	الاستنتاجات	
69	التوصيات	

70-79	المصادر
70-71	المصادر العربية
72-79	المصادر الأجنبية
	الملاحق
	استمارة استبيان المرضى
	قياس تركيز الحامض النووي (DNA) ونقاوته بجهاز Nanodrop
I-II	الخلاصة باللغة الانجليزية

الصفحة	اسم الشكل	ت
٤٣	أنواع جنس <i>Microsporium</i> و <i>Trichophyton</i> المعزولة على وسط SDA	1-4
٤٥	الترحيل الكهربائي Electrophoresis للـ DNA على هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (١٠٠) ولمدة ساعة لعزلات فطر <i>Trichophyton spp.</i> بأستعمال عدة Genomic DNA Mini Kit	2-4
٤٦	الترحيل الكهربائي Electrophoresis للـ DNA على هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (١٠٠) ولمدة ساعة لعزلات فطر <i>Microsporium spp.</i> بأستعمال عدة Genomic DNA Mini Kit	3-4
٤٧	تحليل متعددة اصطفاف تسلسل القواعد الجينية Multiple Sequence alignment analysis بأستعمال برنامج MEGA6 لنتائج تفاعل تسلسل البلمرة PCR لجين ITS1 small subunit rRNA gene في فطر <i>Trichophyton</i>	4-4
٤٨	تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis للفطر <i>Trichophyton</i> بأستعمال برنامج MEGA 6 حيث تم استعمال تحليل الشجرة الوراثية من نوع Un weighted per group method with arithmetic (UP GMA) mean	5-4
٤٩	تحليل متعددة اصطفاف تسلسل القواعد النايتروجينية Multiple Sequence alignment analysis بأستعمال برنامج MEGA 6 لنتائج فحص تسلسل	6-4

	البلمرة PCR لجين ITS1 small subunit rRNA gene في فطر <i>Microsporium</i>	
50	تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis للفطر <i>Microsporium</i> باستعمال برنامج MEGA 6 حيث تم استعمال تحليل الشجرة الوراثية من نوع Un weighted per group method with arithmetic (UP GMA) mean	7-4
59	تأثير جزيئات الفضة النانوية في النمو الشعاعي للفطريات المختبرة	8-4
62	معدل الوزن الجاف للفطر <i>T.rubrum</i> بتركيز مختلفة لايونات الفضة النانوية	9-4
64	معدل الوزن الجاف للفطر <i>T.mentagrophytes</i> بتركيز مختلفة لايونات الفضة	10-4
66	معدل الوزن الجاف للفطر <i>M.canis</i> بتركيز مختلفة لايونات الفضة	11-4
70	بعض التغيرات في الصفات المظهرية للخيوط الفطرية بوجود جزيئات الفضة النانوية	15-4

الصفحة	اسم الجدول	ت
8	توزيع الفطريات الجلدية تبعاً لاماكن تواجدها	1.2
27	حساب حساسية وخصوصية الاختبارات التشخيصية	2.3
30	البيانات التي استعملت في هذه الدراسة	3,3
32	مكونات مزيج تفاعل أنزيم البلمرة PCR وحجمه	4,3
33	الدورات الحرارية لتفاعل انزيم البلمرة PCR	5,3
41	نتائج الفحص المجهرى وطريقة الزرع للعينات	1,4
42	حساسية الفحص المجهرى وخصوصيته وطريقة الزرع	2,4
44	نتائج الاختبارات للفطريات المعزولة	3,4
51	اعداد الاصابات الجلدية ونسبتها بحسب اماكن الاصابة	4,4
52	النسب المئوية لظهور الانواع للفطريات الجلدية وترددتها المعزولة من	5,4

Abbreviations	Key
---------------	-----

	المرضى المصابين بأمراض فطرية جلدية	
٥٣	العلاقة بين اعداد الاصابات الجلدية الفطرية والجنس	٦,٤
٥٤	العلاقة بين الاصابة بالفطريات الجلدية ومنطقة السكن	٧,٤
٥٦	معدل قطر المستعمرة لفطر <i>T.mentagrophytes</i> بوجود تراكيز مختلفة لايونات الفضة النانوية	٨,٤
٥٧	معدل قطر المستعمرات للفطر <i>T.rubrum</i> بوجود تراكيز مختلفة لايونات الفضة النانوية	٩,٤
٥٨	معدل قطر المستعمرات للفطر <i>M.canis</i> بوجود تراكيز مختلفة لايونات الفضة النانوية	١٠,٤
٦٤	تأثير ايونات الفضة النانوية على معدل الوزن الجاف للفطر <i>T.rubrum</i>	١١,٤
63	تأثير ايونات الفضة النانوية على معدل الوزن الجاف للفطر <i>T.mentagrophytes</i>	12.4
65	تأثير ايونات الفضة النانوية على معدل الوزن الجاف للفطر <i>M.canis</i>	13.4

<i>T</i>	<i>Trichophyton</i>	الخلاصة
<i>M</i>	<i>Microsporum</i>	
<i>E</i>	<i>Epidermatophyton</i>	
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid	اجريت
KOH	Potassium hydroxide	
um	Micrometer	ت هذه
ul	Microlitter	
PCR	Polymerase Chain Reaction	الدراسة
SDA	Sabouraud's Dextrose agar	
D.W	Distal Water	للتحري
mg	Milligram	
spp	Species	عن
PH	Power of hydrogen (H^+)	
SPSS	Social Package Statistical System	الفطريات
PIRG	Present Inhibition of Radial Growth	
USA	United State of America	المس

بيرة للأمراض الجلدية في الإنسان حيث تم جمع ١٠٠ عينة من الأشخاص المشكوك بإصابتهم بالفطريات الجلدية من المرضى المراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي من بداية تشرين الأول ٢٠١٣ وحتى نهاية مايس ٢٠١٤ وكانت هذه النماذج مأخوذة من (الجلد و الشعر و الاظافر) حيث خضعت العينات الى الفحص المباشر باستعمال المسحة المرطبة بمحلول KOH 10% وبالوقت نفسه تم زرع العينات على وسط السابرويد للتحري عن الفطريات المسببة للأمراض الجلدية في الإنسان.

اظهر الفحص المباشر نتائج ايجابية في 72 عينة أي بنسبة 72% من مجموع 100 عينة اما بالنسبة لنتائج الزرع المختبري فقد أظهرت ٦٥ عينة نتائج موجبة اي بنسبة ٦٥%.

شخصت ثلاثة أنواع من الفطر *Trichophyton* وهي *T.rubrum* ٢٨ عينة و *T.mentagrophytes* ١٦ عينة و *T.schoenleinii* ٤ عينة ونوع واحد من جنس *Microsporum* وهو *M.canis* ٢٤ عينة. أظهرت نتائج الفحوص ان الاصابة بسعفة الجسم (*Tinea corporis*) هي السائدة أكثر من بقية الاصابات الجلدية وكانت نسبة الاصابة في الاناث أعلى مما هو عليه في الذكور حيث كانت نسبة الاصابة في الاناث 26.39% أما في الذكور فكانت النسبة 13.89% تليها سعفة الرأس (*Tinea capitis*) كانت نسبة اصابة الذكور 19.4% أي أعلى من نسبة اصابة الاناث التي بلغت 13.89% أما سعفة الاظافر

(*Tinea unguium*) فكانت نسبة اصابات الاناث فيها اعلى من الذكور حيث بلغت نسبة اصابة الاناث ١٦,٦٧% بينما في الذكور ٩,٧٢%، وان نسبة الاصابة بالفطريات الجلدية قد اختلف بحسب منطقة السكن حيث كانت اعداد الاصابة في الريف لكل انواع السعفة اعلى من اعداد الاصابة في المدينة اذ بلغ اعداد المصابين بسعفة الجسم (*Tinea corporis*) ١٨ شخصاً وبنسبة ٢٥% اما في المدينة فبلغ عدد المصابين ١١ وبنسبة ١٥,٢٨% اما سعفة الرأس (*Tinea capitis*) فبلغ عدد المصابين بها في الريف ١٦ شخصاً وبنسبة ٢٢,٢٢% وفي المدينة فقد بلغ عدد المصابين بها ٨ اشخاص وبنسبة ١١,١١% اما سعفة الاظافر (*Tinea unguium*) فقد بلغت اعداد الاصابات بها في الريف ١٠ اشخاص وبنسبة ١٣,٨٩% وفي المدينة فقد بلغ عدد المصابين بهذه السعفة ٩ اشخاص وبنسبة ١٢,٥%.

شخصت الفطريات المعزولة اعتماداً على تقنية الـ PCR لغرض التشخيص وتم استكمال العمل باستعمال الشجرة الوراثية لغرض التشخيص الدقيق وتحديد الانواع الفطرية حيث تم ارسال نواتج فحص الـ PCR الى موقع بنك الجينات للتأكد من نوع الفطر من خلال مقارنته مع الفطريات المسجلة في هذا الموقع وباستعمال برنامج MEGA6 حيث تم استعمال تحليل الشجرة الوراثية من نوع UPGMA tree (unweighted pair group method with arithmetic mean) حيث أظهرت نتائج التحليل وجود تقارب واضح في عزلات فطر *Trichophyton spp.* المحلي مع عزلات فطر *Trichophyton rubrum* بالمقارنة مع بقية الانواع الاخرى الظاهرة في تحليل الشجرة الوراثية.

أما بالنسبة لنوع الفطر *Microsporium* فقد تم تشخيصه من خلال تحليل الشجرة الوراثية من نوع up GMA tree وأظهرت نتائج التحليل وجود تقارب واضح في عزلات *Microsporium spp.* المحلي مع عزلات فطر *Microsporium canis* بالمقارنة مع بقية الانواع الاخرى في تحليل الشجرة الوراثية. أظهرت نتائج الدراسة فيما يخص تأثير جزيئات الفضة النانوية المستعملة ضد النمو الفطري للفطريات *T.rubrum* و *T.mentagrophytes* و *M.canis* ان التراكيز المستعملة كانت فعالة في الحد من نمو الفطر *T.mentagrophytes* قياساً مع معاملة المقارنة وكان تركيز ٤ ملغم / لتر أكثر تأثيراً في الحد من النمو الشعاعي للفطر، أما بالنسبة للفطر *T.rubrum* ، كان تركيز ٤ ملغم / لتر أكثر تأثيراً من باقي التراكيز في الحد من نمو الفطر في حين لم يحدث التركيز ١ ملغم / لتر أي فرق يذكر، أما بالنسبة للفطر *M.canis* فقد أثرت التراكيز المذكورة بشكل كبير على نمو المستعمرات الفطرية بالمقارنة مع معاملة المقارنة ويعد هذا الفطر أكثر الفطريات تأثراً بأيونات الفضة النانوية.

١- المقدمة:

يتعرض جلد الإنسان لإصابات متنوعة تنتج عن تعرضه لمختلف أنواع الاحياء المجهرية والناجمة من البيئة التي يوجد فيها الانسان مثل مجموعة الفطريات الجلدية (*Dermatophytes* (Weinstein & Berman 2002) التي تنتمي إلى عائلة المفصليات الجلدية (*Arthrodermataceae*) ويطلق مصطلح

Dermatophytosis على الفطريات التي تغزو الجلد وتتضمن هذه الفطريات ثلاثة أجناس هي *Trichophyton, Microsporium, Epidermatophyton* وتعد هذه الفطريات من أكثر الفطريات المرضية انتشاراً و تنتقل الى الانسان أما عن طريق التلامس مع الحيوانات المصابة أو الحاملة للفطر أو من شخص الى اخر ، اذ ان الجلد أكثر أعضاء الجسم عرضه للبيئة الخارجية لكنه يمتلك وسائل حماية تمنع نمو مسببات المرضية المختلفة هي جفاف الجلد النسبي وانخفاض الاس الهيدروجيني وكذلك وفرة الافرازات الدهنية نخيلان (2011) الا ان هنالك عوامل تجعل الجلد معرض للإصابة بصورة أكبر كالتثبيط المناعي وداء السكري وحروق الجلد والجروح (Richardson & Warnock (2003).

تعد الأخماج الجلدية من الأخماج الشائعة لدى الإنسان منذ زمن طويل، إذ يتعرض ملايين السكان في العالم (Kavanagh (2005, اذ تسبب إصابات جلدية تعرف بالسعفات (Tineas) أو الخمج السعفي Tinea أو داء الفطار الجلدي (Dermatophytosis) في الإنسان والحيوان (Di salvo (2004) وتمتلك مميزات مهمة كونها محبة للكيراتين keratinophilic ومحللة له keratinolytic لكن ليس لها القدرة على اختراق الأنسجة العميقة أسفل الطبقة المتقرنة (Stratum corneum)، حيث ان أغلبها غير قادر على العيش في درجة حرارة مرتفعة مثل درجة حرارة الجسم (Brooks et al. (2001.

ان الأشخاص الأصحاء أو الذين يعانون من تثبيط مناعي يكونون عرضه للإصابة بها، وتتميز أمراض السعفة بأعراض مرضية عامة هي الحكة والاحمرار على الجلد وظهور بقع تتكون من سلسلة من الدوائر موحدة المركز تنتشر على حدود الإصابة، حيث يظهر الخمج السعفي على هيئة بقع ذات مركز واضح محاط بحافات حمراء متفشرة، ويمكن تقسيم الخمج السعفي بحسب منطقة الإصابة الى السعفة الرأسية التي تحدث في بصيلات الشعر وسعفة اللحية التي تظهر في منطقة اللحية في الذكور والسعفة الحلقية او سعفة الجسم التي تكون مواقع تواجدها الجلد الناعم في الوجه (عدا منطقة اللحية) والجذع والأطراف (تتضمن ظاهر اليد والقدم)، وتظهر سعفة الفخذ في منطقة المغبن فضلاً عن سعفة القدم وسعفة راحة اليد وسعفة الإظفر وكذلك السعفة الوجهية التي تحدث في الوجه عدا منطقة اللحية (Springer (2006.

على الرغم من أن نسبة الفطريات الممرضة للإنسان وأهميتها تكون قليلة اذا ما قورنت مع ما تسببها البكتريا والفيروسات لكن أهميتها تتزايد ولاسيما في حالات تعرض المضيف إلى النقص المناعي الذي ينتج عن الأورام الخبيثة وتناول الأدوية الكيماوية المثبطة للمناعة، كذلك فان قدرة الفطريات على إنتاج السموم الفطرية التي تسبب الحساسية وتهاجم الأنسجة بشكل مباشر، كذلك فإن هنالك صعوبات برزت في استعمال المضادات الحياتية ضد الفطريات الجلدية وإن معالجتها أمر فيه صعوبة إذ إنّ أكثر المضادات المستعملة تمتلك فعلاً مثبطاً لنمو الأحياء المجهرية فضلاً عن مفعولها السام للإنسان وكذلك ظهور المقاومة المتعددة للمضادات الحياتية (Richardson & Warnock (2003).

اضافة الى ذلك فان تشخيص الامراض الفطرية الجلدية وخصوصاً التي تنتمي الى مجموعة Dermatophytes من الامور المعقدة والصعبة وذلك بسبب الارباك والتشابه في هذه الفطريات اضافة الى أن أعراضها تتشابه مع بعض الامراض الجلدية الاخرى مثل الاكزيما Eczema والصدفية Psoriasis ونظراً للتطور العلمي الحاصل في مجال التكنولوجيا واستعمال تقنية PCR التي توفر طرائق سريعة ومضمونة في التشخيص ، جاءت هذه الدراسة لتحقيق هدفين أولهما استعمال تقنية PCR وبالاعتماد على الشجرة الوراثية في تشخيص انواع الفطريات الجلدية المسببة للإصابات الجلدية في مدينة الديوانية ، وثانيهما إمكانية استعمال الجزيئات النانوية في علاج الإصابات الجلدية وهي جزيئات الفضة النانوية اذ تناولت الدراسة المحاور التالية:

- ١- إجراء مسح للأخماج الفطرية الجلدية في بعض مناطق محافظة الديوانية من خلال دراسة نسبة الإصابة لبعض أنواع السعفة Tinea , ومدى انتشارها في الفئات العمرية المختلفة.
 - ٢- تشخيص العزلات الفطرية بالاعتماد على الخصائص المظهرية والمجهريّة.
 - ٣- تشخيص بعض العزلات:
 - (أ) باستعمال تقنية PCR . (ب) تشخيص بعض الأنواع بالاعتماد على الشجرة الوراثية.
 - ٤- تقويم تأثير جزيئات الفضة النانوية على نمو بعض أنواع الفطريات الجلدية المعزولة بالاعتماد على المعايير الاتية:
- (قياس تثبيط النمو الشعاعي والوزن الجاف للفطر، ملاحظة التغيرات المظهرية على تركيبية الفطر).

Literature Review

٢- استعراض المراجع

Mycoses

١,٢ الإصابات الفطرية

تسبب الفطريات أنواعاً متعددة من الإصابات التي يطلق عليها مصطلح Mycoses وتقسم الإصابات الفطرية تبعاً لنوع النسيج المصاب على خمسة أنواع ويمكن تمييزها سريريّاً بحسب موقع الإصابة Di Salvo (2004) إلى:

Superficial Mycoses

١,١,٢ الإصابات الفطرية السطحية

هي إصابات تحدث في الطبقة الخارجية من الجلد فقط (الطبقة المتقرنة Stratum corneum) ولا تدخل الى الانسجة الحية ويمكن ان تصيب الشعر، ولا يوجد تفاعل ضد هذه الفطريات من المضيف ومن أمثلة هذه الإصابات، النخالية المبرقشة (Tinea Versicolor) والإصابة العقديّة Piedra . Roberts (1990)

Cutaneous Mycoses

٢,١,٢ الإصابات الفطرية الجلدية

هذه الإصابات تحدث في طبقات الجلد تحت الطبقة المتقرنة Stratum corneum وقد تمتد للخلايا الحية اذ تصيب الانسان والحيوان على السواء، ويحدث تفاعل التهابي بسبب وجود هذه الفطريات يمكن من خلاله تمييز هذا النوع من الإصابات. ويتمثل هذا النوع بالإصابات التي تحدثها الفطريات الجلدية Dermatophytes وأجناس أخرى (Richardson & Elewski (2000).

Subcutaneous Mycoses

٣,١,٢ الإصابات الفطرية تحت الجلد

هي إصابات الأنسجة الحية تشمل الأدمة والأنسجة الموجودة تحت الجلد ولا تصل الى اجهزة الجسم الداخلية (Kobayashi (1990، هذا النوع من الاصابات الفطرية تهاجم الجلد من خلال الجروح التي تتلوث بالتربة المحتوية على مثل هذه الفطريات مسببة عقد في الطبقة تحت الجلدية وتنتشر الى داخل الجسم عن طريق القنوات اللمفاوية مكونة عقداً كثيرة وغالباً هذه الاصابات تكون مزمنة (Michael) Chronic Sporotrichosis, Chromoblastomycosis, ومن أمثلة هذا النوع من الاصابات (2001 Hay & Moore (1998) Mycetoma.

Systemic Mycoses

٤,١,٢ الإصابات الفطرية الجهازية

في الغالب تبدأ هذه الاصابة بالرننتين بعدها تنتشر الى الاعضاء الداخلية في الجسم وهي من أخطر أنواع الاصابات الفطرية وفي أغلب الحالات تكون مميتة ، تسبب هذه الاصابة فطريات ثنائية الشكل (Dimorphic) والمتحملة للحرارة العالية ومن أهم الاجناس التابعة لها (Paracoccidioides) Roberts (1990) (Histoplasma, Coccidioides & Blastomyces).

Opportunistic Mycoses

٥,١,٢ الإصابات الانتهازية

تنتشر هذه الاصابات في المرضى الذين يعانون من نقص مناعي مثل المرضى الذين يكونون تحت المعالجة من مرض أو وجود عوامل مثبطة للمناعة ومن أمثلتها Aspergillosis , Zygomycosis , Cryptococcosis & Candidiosis وهي إصابات شائعة Roberts (1990).

Dermatophytes

2.2 الفطريات الجلدية

هي الفطريات التي تصيب المنطقة المتقرنة من الجلد في الانسان والحيوان (الجلد و الاظافر والشعر) Richardson & Elkewski (2000) وتصيب الطبقة السطحية من الجلد بسبب الفتها للنسيج الكيراتيني Kownchung & Bennett (1992) حيث تقوم بإفراز أنزيم الكيراتينيز Keratenase الذي يقوم بتحليل الكيراتين كما وتفرز هذه الفطريات انزيمات اخرى بالاضافة الى الانزيم المذكور مثل البروتيز والايلاستيز واللايبيز والفوسفولايبيز و الداينيز وانزيم الاميليز الفا (Muhsin & Salih (2001)، وان انزيم البروتيز له أهمية كبيرة في ضراوة هذه الفطريات وشدة امراضيتها Pathogenicity وذلك بسبب نموها على الطبقة المتقرنة من الجلد وذلك لاحتوائها على مصادر النايتروجين والكاربون الاساسية في نموها Tsuboi (1989) Monod et al.(2002).

لقد عرف الإنسان الفطريات الطبية منذ ان اكتشفت المعرفة والتطور الذي أدى الى الإصابة بالفطريات الجلدية حيث ان اسم الفطريات الجلدية Dermatophytes التي تسمى ايضاً باسم (Ring Worm) يعود الى القرن السادس عشر الميلادي حيث تم اكتشاف أصابات جلدية على الجلد وفروة الرأس (Kown-chung & Bennett (1992) ويعود تأريخ الفطريات الجلدية الى ما قبل الميلاد ، في البداية كان يعتقد أنها جزيئات غير مرئية يحملها الهواء بحسب تفسير Varro (2000) Hammett ، مصطلح Tinea يعني الحشرة الصغيرة أو اليرقة حيث ان هذه الكلمة أشتقت من اصل روماني وان الاغريقيين وصفوا المظهر الدائري للأفات Lesions بكلمة Herps وهي تعني القوباء كما نلاحظه في المصطلح الانكليزي Ringworm (الدودة الحلقية) الذي شمل على كلا المعنيين الروماني والاغريقي (David (1986). يعود تأريخ الاصابات الجلدية الى عهد الرومانيين (حوالي ١١٦ سنة قبل الميلاد) وقد تم تسجيل الاصابات الجلدية التقيحية التي حدثت في فروة الرأس من الموسوعة الرومانية Aulus Cornelius celsus (٣٠ سنة ق.م.) التي أطلق عليها celsus في ذلك الوقت Kerion (1974) Ajello واستمر استعمال هذا المصطلح حتى الوقت الحاضر ، وبقي التقدم بطيئاً في هذا المجال حتى ١٨٠٠ (Hammett (2000)، ويعد العالم Robert Remark من الأوائل الذين عملوا في دراسة الفطريات الجلدية حيث وجد عام ١٨٢٧م خيوطاً فطرية من القشور المعزولة من فروة رأس طفل أصيب بالصلع Favus وبين التراكيب المجهرية للفطريات عند دراسة الجلد للمصابين بامراض مثل Tinea Favosa وعرف أيضاً باكتشافه Achorion التي أطلق عليها Achorion schoenleinii وتعرف حالياً Trichophyton schoenleinii وقد اكتشفت بأنها المسببة للصلع (Favus) Kwon-chung and Seeliger (1985); Bennett (1992) وتم التأكد من هذا في السنوات ما بين ١٨٤١-١٨٤٤ من العالم David Gruby خلال عزل الفطر المسبب للمرض على الوسط الزراعي ثم تم تلقيح الجلد بهذا الفطر فوجد أصابة الجلد من خلال التلقيح بالفطر (1998) Ajello and Padhye وفي عام ١٨٤٣ قام الباحث نفسه بتسمية فطر تم عزله من طفل أصيب بسعفة الرأس Microsporum audouinii (1977) Ajello.

وقام العالم Malmstem في عام ١٨٤٥ باطلاق أسم *Trichophyton tonsurans* على عائلة من فطريات الجلد الخيطية التي تم اكتشافها في ذلك الوقت (Emmons et al (1974) واطلق العالم Charles Robin عام ١٨٤٧ اسم الفطر الذي يعرف حالياً *Trichophyton mentagrophytes* وقد قام العالم Sabouraud بدراسة الانسجة المصابة بالفطريات الجلدية عام ١٨٩٠ حيث عالج فروة الرأس باستعمال أشعة أكس (Emmons et al (1974) ثم بدأ العالم Raymond sabouraud عام ١٨٩٢ بدراسة منظمة لاصابات الجلد بالفطريات حيث قدم بحوث عديدة في هذا المجال (Babel et al (1990) وفي عام ١٩١٠ تم تصنيف الفطريات الجلدية الى ثلاثة أجناس هي (*Trichophyton, Microsporum and Eipdermophyton*) وقام العالم ذاته بتطوير الوسط الزراعي لنمو هذه الفطريات وسماه باسمه وقد وضع صفات تصنيفية للتفريق بين الفطريات الجلدية (Ajello (1977).

وفي عام ١٩٣٤ أستحدث العالم Emmons نظاماً تصنيفياً للفطريات الجلدية يعتمد على الطبيعة المرضية لها حيث صنفها الى أجناس ثلاثة *Trichophyton, Microsporum, Eipdermophyton* اعتماداً على شكل سبوراتها وتراكيب أجسامها وأنواع الكونيدات عليها (Emmons et al (1974) وتضم الفطريات الجلدية ٢٤ نوعاً لجنس *Trichophyton* ، ١٦ نوعاً لجنس *Microsporum* ونوعين لجنس *Epidermophyton* (Kwon-chung & Bennet (1992) وبقي تشخيص أمراض الجلد الفطرية صعباً للغاية وذلك بسبب تعدد الأشكال للفطر الواحد والدراسات والمحاولات مستمرة للحصول على نتائج إيجابية في تشخيصها وعلاجها (Hammett (2000).

يمكن تقسيم الفطريات الجلدية اعتماداً على أماكن تواجدها في البيئة والمضيف المفضل لها على ثلاث مجموعات رئيسية هي:

١- الفطريات الجلدية المحبة لجلد الإنسان: **Anthropophilic dermatophytes**

وهي الفطريات التي لها الفة لاصابة جلد الانسان ونادراً ماتصيب الحيوان مثل *E. floccosum* (Gordon,1994; Demang et al.,1992)، وتكون هذه الفطريات متطفلة إجباريا (Obligate Parasite) اذانها لاتستطيع العيش بصورة حرة او تعايشية في البيئة وفطريات هذه المجموعة هي الاكثر شيوعاً في احداث الالاصابات الفطرية الجلدية للإنسان (Hay & Moore,1998).

٢- الفطريات الجلدية المحبة لجلد الحيوان: **Zoophilic dermatophytes**

يكون الحيوان المضيف الطبيعي لها , اذ لها ألفة لإصابة جلد الحيوان ولكنها قد تنتقل إلى الإنسان مسببة له المرض مثل *T.verrucosum , T.mentagrophytes* (Gordon,1994;) (Demang et al.,1992). تصيب هذه الفطريات انواع مختلفة من الحيوانات البرية والمنزلية مثل القطط، الكلاب، والابقار (Emmons et al. (1977) كما انها يمكن ان تصيب الانسان عن طريق التماس المباشر مع الحيوانات المصابة او عن طريق القشور الجلدية والشعر المتساقط منها، تتميز فطريات هذه

المجموعة بأنها متطفلة اجبارياً إذ انها لاتستطيع العيش بصورة حرة او تعايشية في البيئة وغالباً ماتنتشر في المناطق الباردة والمعتدلة اكثر من انتشارها في المناطق الاستوائية (Hay & Moore,1998) ومن اهم الفطريات التابعة لهذه المجموعة هي *M.canis* و *M.persicolor* و *T.verrucosum* و *T.mentagrophytes* و *T.equinum* و *M.gallinae* و Weitzman & Summerbell, 1995).

٣- الفطريات الجلدية الأرضية: Geophilic dermatophytes

هي الفطريات التي تستوطن التربة , وقليلاً جداً ما تصيب الإنسان والحيوان مثل *M.gypseum*) (Gordon, 1994;Demang et al.,1994 .

جدول (٢-١) توزيع الفطريات الجلدية تبعاً لاماكن تواجدها (Sutton et al.,1998).

Anthropophilic species	Zoophilic species	Geophilic species
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Epidermophyton stockdaleae</i>
<i>M.audouinii</i>	<i>M.equinum</i>	<i>M.amazonicum</i>
<i>M.ferrugineum</i>	<i>M.gallinea</i>	<i>M.boullardii</i>
<i>Trichophyton concentricum</i>	<i>M.versicolor</i>	<i>M.gypseum</i>
<i>T.gourvilii</i>	<i>T.equinum</i>	<i>M.cookei</i>
<i>T.kanei</i>	<i>T.mentagrophytes</i>	<i>M.nanum</i>
<i>T.megninii</i>	<i>T.sarkisorii</i>	<i>M.praecox</i>
<i>T.mentagrophytes</i>	<i>T.simii</i>	<i>M.racemosum</i>
<i>T.raubitscheckii</i>	<i>T.verrucosum</i>	<i>M.ripariae</i>
<i>T.rubrum</i>		<i>M.vanbreuseghemii</i>
<i>T.scheonleilii</i>		<i>T.ajelloi</i>
<i>T.soudanense</i>		<i>T.flavescens</i>

<i>T. tonsurans</i>		<i>T. gloriae</i>
<i>T. yaoundei</i>		<i>T. longifusum</i>
<i>T. violaceum</i>		<i>T. phaseoliforme</i>
		<i>T. vanbreusegheii</i>
		<i>T. terrestre</i>

تنتقل الفطريات الجلدية من الحيوان المصاب إلى سليم أو من الحيوان إلى الإنسان أو من انسان إلى اخر أو من التربة إلى الإنسان أو من الحيوان بصورة مباشرة عن طريق التلامس المباشر مع المنطقة المصابة فتحصل العدوى عندما تنتقل بعض القشور الجلدية أو أجزاء من الشعر المصاب إلى الإنسان والحيوان (McGinnis 1985) , أو بصورة غير مباشرة عن طريق الهواء أو أدوات الحلاقة أو الأغطية الملوثة . إذ تبقى الأبواغ حية في الجو لعدة أسابيع وتحفظ بقدرتها على إصابة الإنسان , أو الحيوان (Ellen et al. 1994). عرّف (Hawksworth) مصطلح الفطر الجلدي بأنه فطر متطفل على الأنسجة الكيراتينية (الشعر والجلد والأظافر) للإنسان والحيوانات ويسبب لها الأمراض الفطرية الجلدية , التي تعرف بـ (Tinea أو Ring worm) (Matsumoto & Ajello,1987).

٣,٢ تصنيف الفطريات الجلدية:

تصنف الفطريات الجلدية كالآتي (Alexopoulos et al. 1996):

Kingdom: Fungi	مملكة الفطريات
Phylum: Ascomycota	شعبة الفطريات الكيسية
Class: Plectomycetes	صنف الفطريات الكروية
Order: Onygenales	رتبة الأونيكيديات
Family: Arthrodermataceae	عائلة المفصليات الجلدية

وتعود الإصابة بأنواع الفطريات الجلدية إلى الأجناس الثلاثة *Trichophyton* و *Microsporum* و *Epidermophyton* (Matsumoto 1996).

٤-٢ تشخيص الفطريات الجلدية:

هنالك العديد من الطرائق المختبرية المعتمدة لتشخيص مسببات الأمراض الجلدية المتسببة عن الفطريات الجلدية (Kwon Chung & Bennett, 1992), من هذه الطرائق التشخيصية هي الفحص المجهرى المباشر لعينات الجلد و الشعر بواسطة KOH هيدروكسيد البوتاسيوم (Emmons et al. 1977) والزرع (Onsberg 1979) واعتماد متطلبات غذائية معينة لنمو الفطريات مثل احتياج الفطر *T.violaceum* لمركب الثيامين Thiamine للنمو (Kwon Chung & Bennett, 1992), اختبار ثقب الشعرة Hair perforation أو الفحص تحت الأشعة فوق البنفسجية Wood's light (Rippon 1988), وحالياً تستعمل طريقة البلورة المستمرة أو المتسلسلة Polymerase Chain Reaction (P.C.R.) لتشخيص الفطريات في حالة كون المستعمرة الفطرية حديثة النمو أو فاقدة لخصائصها المظهرية التشخيصية أو في حالة الفطريات الميتة (Faggi et al. 2002), الايوبي (2013).

٥-٢ الصفات العامة للفطريات الجلدية:

يمكن تلخيص الصفات المميزة للأجناس الثلاثة كالآتي :

Microsporum

1-5-2 الجنس

مستعمرات هذا الجنس على الاوساط الزرعية تكون ذات غزل فطري قطني ينتج كونيديات كبيرة متعددة الخلايا ذات شكل مغزلي والجدران سميكة ومشوكة من الخارج ويضم هذا الجنس أنواعاً عديدة بإمكانها أن تصيب الجلد والشعر ونادراً ما تصيب الاظافر في الحيوانات ونادراً ما تصيب الانسان نخيلان (٢٠١١). ومن أهم الانواع التابعة لهذا الجنس هي:

M.canis

١- النوع

مستعمرات هذا النوع تكون بيضاء وسرعان ما يظهر لون أصفر مميز لها ليس في الخيوط الفطرية بل تحتها وفي الوسط ، ظهر المستعمرة يكون لونه أصفر ليمونياً يصبح داكناً ومع القدم يصبح أكثر برتقالية. يكون هذا الفطر الكثير من الكونيديات الكبيرة ١٥ x ٨٠ مايكرومتر غير مدببة النهاية وسميكة الجدران وتحتوي (7-12) حاجزاً عرضياً سميكة الجدران ومغطاة بأشواك سميكة ، كثيراً ما تتكون الكونيديات الصغيرة الكمثرية الشكل التي يبلغ قطرها (٣x٤) مايكرومتر وتحمل على الخيوط الفطرية بأعناق قصيرة (Beneke & Roqers, 1980).

M.audouinii

٢- النوع

ان هذا الفطر سبب أوبئة بالاصابات الجلدية للرأس في الاطفال سابقاً وقد عرف باصابته للجلد في المناطق الاخرى من الجسم ونادراً مايصيب البالغين. ان نمو مستعمرات الفطر تكون بطيئة وشكلها سطحي

أو مستوي رمادية دباغية أو بنية فاتحة اللون مع غزل فطري هوائي خفيف زغبى أو حريري مع حافة شعاعية خلال (7-10) أيام. ان ظهر المستعمرة يكون لونه بنياً مصفراً الى مرجاني أو وردي في الاجزاء السميكة والمركز يكون بنياً محمراً (الصبغات تلاحظ جيداً على وسط PDA)، الخيوط الفطرية تكون مقسمة مع تكوين أبواغ كلاميديّة مفردة في نهايات الخيوط الفطرية وكثيراً ما تشاهد خيوط فطرية بشكل المشط أو عرف الديك (Pectinate Hyphae). ان هذا الفطر لا يكون الكثير من الكونيدات على وسط Sabouraud Glucose Agar حيث انه نادراً ما توجد كونيدات كبيرة وتكون غير منتظمة، ويمكن ملاحظة عدد قليل من الكونيدات الصغيرة على جوانب الخيوط الفطرية مشابهة لتلك التي تكونها أنواع الجنس الاخرى (Larone (2002).

Epidermophyton

٢-٥-٢ الجنس

تكون سبورات هذا الفطر كبيرة ذات جدران ملساء ومنتفخة من القمة مؤلفة من (٤-٢) خلية أما المستعمرات فان المظهر الخارجي لها يكون مسحوقياً Powdery ذا لون اصفر مخضر Green-yellow ولا ينتج هذا الفطر أبواغاً صغيرة (Myrvic ; Rippon, 1988 & Weiser, 1988). يحتوي هذا الجنس على نوع واحد فقط هو *E. floccosum* الذي يصيب الجلد و الأظافر ونادراً ما يصيب الشعر، وذكر (Hawks) (worth et al, 1995) ان النوع *E. floccosum* يمكن ان يتسبب بمرض *Tinea cruris* و *Tinea pedis* في الانسان ، ان هذا الفطر يكون متوسطاً في سرعة نموه حيث تنضج المستعمرات خلال ١٠ أيام ويكون هذا الفطر مستعمرات متكتلة وضعيفة في البداية ثم تتطوى وتحدث فيها أخاديد شعاعية ثم تصبح زغبية بعد ذلك ، ويكون ظهر المستعمرة برتقالياً الى بني مع حواف صفراء أحياناً ، والمستعمرات صفراء مخضرة قطنية سهلة التشخيص من خلال تكوينها خيوط فطرية ثنائية التفرع وكونيدات كبيرة من (2-4) خلايا، (7-12×20-40) ميكرومتر سميكة الجدران ملساء ذات شكل يشبه المضرب (Larone (2002).

Trichophyton

3-5-2 الجنس

يمتاز هذا الفطر بقابليته على تكوين سبورات كبيرة تضم (1-12) خلية جدرانها الخارجية ملساء يتميز هذا الجنس بقدرته على تكوين سبورات صغيرة كروية الشكل ، والهايفات تتخذ اشكالاً متعددة منها الحلزونية Spiral أو تتخذ شكل عقد Nodular فضلاً عن الخيوط المغزلية الاعتيادية ، أما المستعمرات النامية على الأوساط الغذائية فتكون بشكل أملس أو تتخذ شكلاً مسحوقياً Powdery وتكون ألوانها بيضاً أو صفراً (Richardson & Elkewski (2000).

يعد هذا الجنس من الفطريات الجلدية المنتشرة عالمياً اذ يضم مجموعة أنواع لها القدرة على إحداث إصابات جلدية مختلفة نخيلان (٢٠١١).

أهم أنواع ألد *Trichophyton* المسبب لمعظم أنواع السعفة:

1- *Trichophyton mentagrophytes*

يصيب الجلد بضمنها الاظافر والشعر وهو المسبب الشائع لمرض قدم الرياضي ، نمو مستعمرات هذا الفطر متوسط السرعة حيث تنضج خلال (10-7) أيام. وأن شكل المستعمرة الخارجي كثير التغيرات حيث يكون السطح مسحوقياً أو زغبياً يظهر طيات شعاعية، لونه أبيض وقد يصبح أصفر أو وردياً. أن الفطر يكون غزلاً فطرياً بسرعة لكن الكونيدات قليلة او معدومة ، ظهر المستعمرة دباغي بني غالباً ويمكن ان يكون عديم اللون أو أصفر أو أحمر، الخيوط الفطرية مقسمة ، الكونيدات الصغيرة في المزارع المسحوقية تكون بشكل دائري قطرها (6-4) ميكرومتر متجمعة على الحوامل الكونيدية المتفرعة. في المزارع الزغبية الكونيدات اصغر وعددها أقل وبشكل قطرات الدمع تتشابه مع كونيدات الفطر *T. rubrum* تتكون احيانا كونيدات كبيرة وتكون بشكل السيكار ذات جدران رقيقة وتحتوي (6-1) خلية يمكن ملاحظة خيوط فطرية لولبية كما يمكن ان تجد في بعض السلالات أجساماً عقدية (2002) Larone. إن الاختبارات العملية لهذا الفطر هو اختبار ثقب الشعرة و انتاج ألد *urease* (2003) *Dismukes et al.*

2- *T. rubrum*

إن المظهر الخارجي للمستعمرة الناتجة عن هذا النوع مختلف , اذ تظهر المستعمرة الانموذجية بلون أبيض تفرز من الخلف صبغة حمراء. أهم صفة تشخيصية رئيسية هي وجود الكونيدات الكبيرة ذات الجدران الملس والكونيدات الصغيرة تترتب على طول الهايفاء وتمتاز بعدم قدرتها على ثقب الشعرة و انتاج أنزيم الـ *urease* (2003) *Dismukes et al.*

3- *T. schoenleinii*

هو فطر عالمي الانتشار بشري العدوى وان الشعر المصاب قلما يحدث وميضاً تحت الاشعة فوق البنفسجية (1977) Blumer ، يتسبب هذا الفطر بمرض القرع (Favus) وهو من الامراض الجلدية التي تتميز بظهور قشور وأصابة الشعرة على طولها وفقدان دائم للشعر نخيلان (2011) يكون نمو الفطر بطيئاً على الاوساط الغذائية الصلبة حيث يتم نضج المستعمرات خلال 15 يوماً وتكون غير منتظمة ومجعدة وجلدية قوية القوام وتكون مرتفعة المركز ، لون المستعمرة يكون أبيض الى دباغي وهي ملس وشمعية أو بيضاء دقيقة ووجود العديد من الاخاديد القطرية. أن ظهر المستعمرة يكون عديم اللون أو برتقالياً أصفر شاحباً الى دباغي العزلات في البداية يمكن ان تكون مستعمرات شبه خميرية ، ان الغزل الفطري يكون مقسماً وغير منتظم والخيوط الفطرية الكبيرة تميل لان تكون ذات عقد أو أشكال صولجانية أو تكوّن أفرع

غير منتظمة. ان الخيوط الفطرية المغمورة تكون تراكيب متفرعة تشبه قرون الوعل، يكون الفطر الكثير من الابواغ الكلاميدية ، الكونيدات الصغيرة تكون قليلة جداً ولا توجد كونيدات كبيرة (Larone 2002) .

٦,٢ الحالات السريرية للفطريات الجلدية:

Tinea capitis

١,٦,٢ سعفة الرأس

يكون أنتشار هذا النوع بين الذكور أكثر من الاناث وغالبا مايصاب الاطفال الذين تتراوح أعمارهم بين (3-7) سنوات أما الاعمار الاخرى فأقل عرضة للإصابة بهذه السعفة ، أما في الاطفال حديثي الولادة فتكون الإصابة قليلة جداً بهذا المرض (Odom, et al.,2000; Kao, 2002). يلاحظ زيادة الإصابة بشكل كبير بسعفة الرأس حيث يمكن عزل أنواع من الفطريات التي تسبب هذا المرض من مختلف الادوات الشخصية مثل (الفرش ،أدوات الحلاقة ،القبعات) وتوجد عوامل تزيد من نسبة الإصابة بهذا المرض ومنها الرطوبة والتواجد في الأماكن المزدحمة وشد الشعر باستمرار واستعمال مستحضرات الشعر المختلفة .Prescott, et al (1996 a)

Tinea corporis

2.6.2 سعفة الجسم

تسمى سعفة الجسم أيضاً بالسعفة الحلقية وذلك لان شكل الإصابة يكون بشكل دوائر متحدة المركز (Hay, et al.(1992) وتكون الإصابة بهيئة بقع حمر دائرية متفشرة مركزها فاتح اللون وتظهر في هذه البقع حدود ناعمة حويصلية يختلف حجمها اختلافاً كبيراً وفي الاحوال كلها لايتجاوز قطرها ٣ أنج (Matsumoto 1996)، ويتضمن هذا النوع كل الاصابات الفطرية الخيطية للجلد ماعدا بعض مناطق الجسم مثل باطن القدم وراحة اليد والمنطقة الاربية Weinstein and Berman, (2002; Rook et al., 2003). ومن أكثر انواع الفطريات التي تسبب هذا النوع من الإصابة هي *M.canis* ، *T.rubrum* ، *T.mentagrophytes* كردي و محمد (٢٠٠٢)، وان ظروف المناخ واستعمال الادوات الشخصية مثل أستعمال المناشف والملابس المستعملة من العوامل الرئيسية لحدوث الإصابة (Matsumoto 1996). ان سعفة الجسم تصيب مختلف الاعمار ولا يوجد فرق في أمكانية حدوث الإصابة بين الذكور والاناث (Chin 2000).

Tinea pedis

٣,٦,٢ سعفة القدم

يمكن عد هذه السعفة من أكثر السعفات الفطرية انتشاراً بالعالم نخيلاً (٢٠١١) وان كل أصابة مزمنة للقدمين بسبب بكتيريا أو فطر تسمى سعفة القدم ، وقد تتجاوز الاصابة حتى تصل راحة اليد او الصفق بين الاصابع (Hay & Moore, 1998) ولكون الرياضيين أكثر عرضه للاصابة بها سميت أيضاً Athlete's Foot (قدم الرياضي) (2003) Hainer. ان من العوامل التي تزيد من انتشار الاصابة بهذه السعفة هي الجروح والتشققات في القدم مما يزيد من فرصة دخول الفطر واحداث الاصابة وكذلك فان الاشخاص الذين يعانون من زيادة الوزن هم الاكثر عرضة للاصابة بهذه السعفة (2000) Rinaldi وهناك عادات شخصية تزيد من فرصة الاصابة مثل ارتداء الملابس الثقيلة واستعمال الحمامات العامة (Hay & Moore, 1998)، ويكون الاشخاص المتعاطين للادوية والكيميائيات أكثر عرضة للاصابة لان هذه العلاجات تسبب تثبيطاً مناعياً مما يسهل في انتقال الفطريات وحدث الاصابة ومن أكثر الفطريات المسببة لهذا النوع من الاصابة *E.floccosum* ، *T.rubrum* ، *T.mentagrophytes* (Irene and Richard,1995;) (Joseph, 2004) وفي الغالب يرافق الاصابة تقشر بين الاصابع قد ينتشر الى أخص القدم وان تشقق القدم يجعلها عرضة لدخول الجراثيم واحداث اصابات التهابية ثانوية (2002) Martin.

Tinea cruris

٤,٦,٢ سعفة الفخذ

يستعمل اسم اخر لها Jock Itch (حكة الفارس) (Prescott, et al.(1996) وتصيب هذه السعفة منطقة أصل الفخذ وتكون الاصابة بشكل بقع حمر مع حافات ذات قشور ومرتفعة قليلاً (Bergfled, et al. (1993). وتكون نسبة الاصابة بالذكور أعلى من الاناث نخيلاً (٢٠١١). حيث تكون الاصابة في الذكور الى الجهة الداخلية العليا للفخذ ويمكن ان تصل الى الابطين وقد تنزل الى القدم فتحدث اصابة بين الاصابع أو تصل الى الاظافر وغالباً ما تكون الاصابة في جهة واحدة ثم تنتقل الى الجهة الاخرى (Springer (2006).

Tinea unguium

٥,٦,٢ سعفة الاظافر

تبدأ الاصابة بهذا النوع بمهاجمة الكيراتين الطري في الاظفر ثم تنتشر حتى تصل لكيراتين الاظفر بأكمله حتى يتحول الى أظفر مشوه وتكون الاصابة عند الحافة البعيدة للاظفر حيث تحول الاصابة الاظفر الى شكل متقصف ذي لون أصفر لامع ثم يتحول الى لون باهت يتزامن مع هذا تتخن وزيادة في سمك الاظفر (1993) Williams، وان هذا النوع من الاصابات يسمى بـ Onychomycosis ، وأن أصل هذا المصطلح لاتيني مكون من مقطعين الاول هو Onycho ويعني أظفر والثاني هو mycosis ويعني أصابة فطرية (2000) Joseph, et al. ان تزايد الاصابة يستمر لعدة أسابيع وقد تأخذ شهور طويلة (Rodgers & Bassler, 2001) تتزامن معها تراكم الاوساخ تحت الاظافر المصابة.

Tinea manum

أن الإصابة بهذا النوع يحدث في يد واحدة أو في كلتا اليدين وقد تصيب أصابع اليد بأكملها أو جزء منها وقد تصيب مابين الاصابع وتظهر الإصابة أيضاً تحت منطقة الساعة اليدوية وهناك أنواع عديدة من الفطريات الجلدية التي تسبب هذا النوع من الاصابات وأكثرها انتشاراً *T.rubrum* (Robert, 1983; Irene & Richard, 1995; Wilkinson and Ebling,1998). تظهر الإصابة بشكل أحمرار وتبدأ راحة اليد بالجفاف والتقشر (كردي و محمد ٢٠٠٠)، ويعد الاستعمال المستمر لمساحيق التنظيف وملامستها للأيدي عاملاً مساعداً في حدوث الإصابة.

Tinea barbae

تسمى أيضاً بحكة الحلاق Barber Itch وكانت الإصابة سابقاً بهذا المرض شائعة حيث لم تكن قد صنعت الشفرات التي تستعمل لمرة واحدة حيث انتشرت عن طريق استعمال الشفرات غير المعقمة لأكثر من مرة ونشر الإصابة بين الأشخاص (Mastumoto 1996)، وتظهر هذه الإصابة في منطقة اللحية والعنق في الذكور البالغين وتصاب أيضاً النساء اللاتي لديهن شعر كثيف في هذه المنطقة (Hainer 2003). تكون الإصابة بشكل تقرحات مع وجود تقشرات واضحة وتكسر الشعر أو فقدانه نهائياً وقد تكون بشكل نقط حمر ذات حدود واضحة وقد لاتظهر أعراض واضحة ولكن الحكة الخفيفة هي الصفة المميزة لهذه الإصابة (Rinaldi 2000).

Tinea faieci

تظهر الإصابة بشكل حبوب أو بقع حمر اللون صغيرات ترافقها بقع كبيرة مقوسة الحافات (Hay et al., 1992) وتنتشر الاصابات بين النساء والاطفال لانعدام الشعر في منطقة الحنك والشفة العليا (Sutton et al., 1998)، ومن أكثر المسببات المرضية لهذا النوع من الإصابة هما الفطران *T.mentagrophytes* و *T.rubrum* (Robert & Mackanzi, 1986).

Epidemiology of Dermatophytes

كشفت الدراسات التي أجريت في مناطق متعددة من العالم للتحري عن الاصابات التي تسببها الفطريات الجلدية أن هناك اختلافاً كبيراً في الاشكال السريرية للإصابات وأنواع الفطريات الجلدية المسببة لها من منطقة الى أخرى في البلد نفسه ومن بلد الى اخر نخيلا (٢٠١١) من أهم الأسباب التي تساعد على

زيادة انتشار الإصابة بالفطريات الجلدية هي الرطوبة و درجات الحرارة و العمر وموقع الإصابة بالجسم والمنطقة الجغرافية وأمراض جلدية أخرى مثل مرض عدم انتظام تكوين الكيراتين الذي يعمل على زيادة نسبة الإصابة بالفطريات الجلدية ، (Bronson *et al.* (1983). تعد الفطريات من اكثر الاحياء المجهرية التي تتكيف للعيش في ظروف بيئية مختلفة وهذا يقود الى زيادة نسبة الإصابة بها (Shimmura (1995) وتكون الإصابة بالسعفة *Tinea* أكثر الامراض انتشاراً على مستوى العالم كما ان العديد من الدراسات في مختلف انحاء العالم أشارت لذلك والتي حدد بها أكثر الانواع انتشاراً وان الشخص الطبيعي لا يسلم من الإصابة بأحد انواع الفطريات الجلدية خلال حياته وقد وجد ان نسبة كبيرة من الاشخاص الاصحاء يتعرضون للإصابة (Weinstein & Berman (2002).

قد ظهر بأن هنالك اختلافات كبيرة بالتوزيع الجغرافي لانواع الفطريات الجلدية حيث ان بعضها يكون شائع الانتشار في العالم مثل الفطر *T.rubrum* الذي تم عزله من مختلف الدول بينما هنالك فطريات يتحدد تواجدها في مناطق معينة مثل الفطر *T.soudanense* و *T.gourvilii* حيث توجد هذه الفطريات بصورة رئيسة في الاشخاص الذين يقطنون في وسط أفريقيا والاشخاص الذين يتعاملون معهم (Liu *et al.*(2002). وفي مدينة تكريت فقد أجريت دراسة للتحري عن انتشار الامراض الجلدية في المدينة وتضمنت الدراسة عينة مكونة من ٢٩٧٠ من الطلبة ومن مناطق سكنية مختلفة أظهرت ٦٢٥ عينة نتيجة إيجابية وتم تأكيدها بالفحوصات وأشارت هذه الدراسة الى ان هنالك علاقة بين اصابة الفرد والتاريخ المرضي للعائلة عبد الكريم (٢٠٠٧) وقد أجريت دراسة في باكستان ووجد ان متوسط معدل السعفات 40 % وفي الهند في منطقة البحر الكاربيي كانت الإصابة ٧٢%، أما في تونس فقد اجريت دراسة على مدينة صغيرة ووجد ان معدل الإصابة بالفطريات الجلدية ٨٤% ، ويلاحظ من هذه الدراسات انتشار الفطريات الجلدية بشكل كبير جاسم (٢٠١١).

Nano Techniques

٨,٢ تقنية الصغائر

تعد تقنية الصغائر ذات تطبيقات واسعة المجال وتدخل في كثير من المجالات الصناعية والطبية والزراعية وغيرها حيث تعد هذه التقنية ضرباً من الازدهار والتقدم في المجال الطبي حيث يمكن من خلالها توصيل الدواء الى خلايا محددة كما يمكن تقليص استهلاك الدواء اضافة الى الاعراض الجانبية بشكل واضح من خلال ايداع العامل النشط في المنطقة المصابة فقط وبدون اي جرعات اعلى مما هو مطلوب. ان هذا الاسلوب يقلل من التكلفة والمعاناة البشرية ويمكن ان نتعرف على احد هذه الامثلة من خلال استعمال مكاثير او بوليمرات الكتلة المشتركة والتي تكون مركب (micelles) المستعمل في تغليف الدواء حيث تستعمل في المحافظة على جزيئات الدواء الصغيرة لمساعدتها في الانتقال الى الجهة المقصودة بالاضافة الى ذلك هنالك رؤية أخرى مبنية على الانظمة الاليكتروميكانيكية الصغيرة حيث هنالك بحوث في مجال النظم الكهروميكانيكية النانوية والتي تعد الجيل الاصغر من النظم الكهروميكانيكية الصغرى وذلك

لغرض الاطلاق النشط للدوية وتتضمن بعض التطبيقات المهمة في علاج السرطان باستعمال جزيئات الحديد النانوية أو دروع الذهب ويقوم الدواء المستهدف بتقليل عملية استهلاك الدواء ونفقات العلاج مما يسفر عن تحقيق فائدة اجتماعية شاملة من خلال تقليص التكلفة كما ان تقانة الصغائر فتحت فرصاً جديدة في نظام توصيل الدواء القابلة للزرع والتي يفضل استعمالها مع الادوية المحقونة نتيجة ان الاخيرة دائماً ما ترافقها أعراض من الدرجة الاولى (حيث يرتفع تركيز الدم بسرعة ولكنه ينخفض بشكل ضعيف بمرور الزمن) وقد يسبب الارتفاع السريع صعوبات مع السمية وكفاءة الدواء قد تتلاشى نتيجة انخفاض تركيز الدواء عن المعدل المطلوب له كما ان تقانة الصغائر ساعدت في مجال هندسة الانسجة من إعادة انتاج النسيج التالف واصلاحه وقد استفادت هذه التقانة من عملية انتشار الخلايا المحفز صناعياً من خلال استعمال عوامل النمو والسقالات القائمة على المواد النانوية المناسبة (Yovita)

Siswanto & Cheng-King Lee, J. Mater. Chem. (2010). قد تحل تقانة هندسة الانسجة محل أساليب العلاج التقليدية المستعملة في الوقت الحاضر ومنها زراعة الاعضاء والاطراف الصناعية وأحياناً لا تتوفر للمرضى الذين يعانون من فشل تام في وظيفة الاعضاء خلايا طبيعية كافية لعمليات التوسع والزراعة في نسيج خارج الخلية ، وفي هذه الحالة تصبح هنالك حاجة الى الخلايا الجذعية ذات القوة التناسلية المتعددة وهنالك مصادر محتملة لتلك الخلايا تتمثل في الخلايا الجذعية المستحثة ذات القوة التناسلية العالية والتمثلة في خلايا عادية من جسد المريض والتي يتم برمجةها لتصبح ذات قدرة تناسلية متعددة بالإضافة الى ذلك توفر مزايا تجنب الرفض (لفظ جسد المريض لها) والمضاعفات المهددة لحياة المريض من جراء استعمال العلاجات المثبطة للمناعة (Qin, Yimin (2005).

٩,٢ جسيمات الفضة النانوية

Silver Nano particles

هي جسيمات متناهية الصغر للفضة بمعنى انها جسيمات الفضة التي يتراوح حجمها ما بين (1-100) نانومتر ، وغالباً ما وصفت بأنها "فضة " وبعضها يتكون من نسبة مئوية كبيرة من أكسيد الفضة نظراً للنسبة السطحية الكبيرة التي يمتلكها مقارنة مع ذرات الفضة السائبة. وفي العقود الماضية استعملت جسيمات الفضة في البصريات والالكترونيات وغيرها من المجالات وذلك بسبب حجمها الفريد وهذا ما تعتمد عليه البصريات وخواصها الكهربائية والمغناطيسية، في الوقت الحاضر معظم التطبيقات الخاصة بجسيمات الفضة النانوية تمركزت في العوامل المضادة للفطريات والمضادة للبكتريا وفي مجال التكنولوجيا الحيوية والهندسة البيولوجية ، معالجة المياه والمنتجات الاستهلاكية القائمة على الفضة. هنالك محاولة

لدمج جسيمات الفضة النانوية في مجموعة واسعة من الاجهزة الطبية على سبيل المثال (اسمنت العظم و أدوات الجراحة و الاقنعة الجراحية الواقية و ضمادات الجروح) (Samsung's Silver Nano washer) (2005). ومن خلال الدراسات التي أظهرت التأثير الواضح لجزيئات الفضة النانوية على مختلف أنواع الاحياء المجهرية ومنها الفطر *Candida spp.* و *T.rubrum* و *T.mentagrophytes* (Fatemah) (2011)، وكذلك تأثيرها على بكتيريا *Eschrichia coli* و بكتيريا *E faecalis* (Kvitek L et) (2008). وتأثيرها المثبط للفيروسات شجعت الباحثين للقيام بتجارب أخرى على أنواع مختلفة من الاحياء المجهرية واستعمالها تطبيقياً في مختلف المجالات الصحية حيث تم استعمال تقنية النانو في الحج للقضاء على المايكروبات حيث تم استخدام هذه المادة (الفضة) المصنعة بتقنية النانو والمقاومة للفطريات والبكتيريا كتجربة استطلاعية وبحثية للتأكد من فعالية هذه المادة ، حيث تم تطبيق هذه التجربة في المسجد النبوي الشريف بالتعاون مع أمانة المدينة المنورة. حيث تم استعمال تقنية النانو في صناعة مادة مضادة للبكتيريا والفطريات والفيروسات وقد تم رشها على السجاد والاقمشة وعلى الجدران مع الدهان ، وان المادة ليست باهظة الثمن قياساً بالفائدة الكبيرة حيث تمنع نسبة انتقال الميكروبات بين الحشود البشرية البار (٢٠٠٨) ، ومن الناحية العلمية والتاريخية فان استعمال الفضة قديم حيث استعملت الحضارة الرومانية الفضة بشكلها المعدني المعروف لتنقية المياه كما استعملها أوائل المهاجرين الامريكيين في حفظ اللبن طازجاً لمدد طويلة وذلك بوضع قطعة نقدية من الفضة في أناء اللبن ليبقى محافظاً على قوامه فترة طويلة كما استخدمت الفضة على مدى مائة عام الماضية على شكل محلول كيميائي يحتوي على مركبات الفضة بحجم المايكرومتر كعلاجاً يؤخذ داخلياً للعديد من الامراض على مدى المائة عام الماضية نظراً لخاصية الفضة القاتلة للفطريات والبكتيريا (Morley KS et al.(2004) الا ان هذه الطريقة كانت تؤدي الى نوع من السمية بالجسم من بين أعراضها تغير لون الجلد للازرق ، أما النقلة الكبرى في استعمال الفضة في التطبيقات الصحية جاءت مع ثورة تقنية النانو حيث تم تصنيع الفضة حالياً بحجم متناهي الصغر والمعروف اصطلاحاً بجزيئات الفضة النانوية ومقياس النانو كما أصبح معروفاً لدى الكثيرين جزء من مليار جزء من المتر ، كما تعد تقنية النانو حقاً بمثابة فتح طبي جديد حيث تستطيع الفضة المصنعة عند هذا الحجم البالغ الصغر أن تقضي على أكثر من ٦٣٠ نوعاً من البكتيريا وذلك من خلال تحطيم جدران الخلية البكتيرية وعلى العديد من الفطريات والفيروسات وان المادة أصبحت تستعمل في تعقيم أدوات الجراحة كما تساعد على التئام الجروح بشكل سريع ، وان هنالك دراسة علمية نشرت في مجلة تقنية النانو الامريكية عام ٢٠٠٥ أجراها باحثون من جامعتي تكساس و مكسيكو الامريكيتين تؤكد بأن جزيئات الفضة النانوية عند مقياس (1-10) نانومتر قادرة على القضاء على أحد أخطر الفيروسات على صحة الانسان الا وهو فيروس الايدز (HIV-1) ، وطبقاً لما جاء بالبحث المشار اليه فان (النانو سيلفر) قد قضى على ١٠٠% من فيروسات الايدز خلال ٣ ساعات فقط من بدأ التجربة عند درجة حرارة (٣٧ م) أي درجة حرارة جسم

الانسان وأن جزيئات الفضة النانوية ربما يصبح العلاج البديل لآوبئة خطيرة جداً قد تهدد سكان العالم كله مثل أنفلونزا الطيور مشيراً الى ان مثل تلك الفتوحات العلمية لم تأخذ ما تستحقه من التغطية الاعلامية لان ذلك قد يتعارض مع مكاسب شركات تصنيع الادوية العالمية الكبرى، كما دخلت تطبيقات النانو سيلفر حياة الناس دون ضجة فمثلاً اليوم هناك ثلاجات منزلية وغسالات ملابس تستخدم هذه التقنية في أطالة عمر الطعام في الثلاجات وتعقيم الملابس وإزالة الروائح الكريهة منها ، كما تستعمل هذه التقنية في تنقية مياه الشرب وغيرها من المياه كالمياه الغازية والمياه التي تدخل في الاستعمالات الصناعية على ان لا تزيد نسبتها عن ١٠٠ جزء من مليار جزء من الماء بحسب الانظمة المتبعة في أمريكا، كما قد تستعمل جزيئات الفضة النانوية في صناعة المنسوجات مثل (أغطية المخدات و السرر و الجوارب) والكثير من الاستعمالات المنزلية وفي المرافق الصناعية والعامه حبيب (٢٠٠٨).

Materials &

3. المواد وطرائق العمل :

methods

أجريت هذه الدراسة في مختبرات قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة القادسية وكلية الطب البيطري في جامعة القادسية ومختبرات مستشفى الديوانية التعليمي التابعة لمديرية صحة الديوانية.

١,٣ الأجهزة:

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة (المنشأ)
١	موصدة Autoclave	Gallen Kaamp(England)
٢	مجهر ضوئي مركب Compound light microscope	Olympus (Japan)
٣	جهاز تقطير Distiller	Fisons(Japan)
٤	ثلاجة Refrigerator	Concord (Lebanon)
٥	ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance	Gallen Kaamp(England)
٦	حمام مائي Water bath	Memmert (Germany)
٧	أنبوبة اختبار Test tubes	Superestar(India)
٨	محاقن Disposable Syringes	Superestar(India)

Superstar(India)	Slides and cover شرائح زجاجية وغطاء الشريحة slides	٩
Shndon,scientific Co.LTD/ England	Gel electrophoresis جهاز ترحيل كهربائي	١٠
CYAN China	Vortex مازج	١١
Bioneer/ korea	PCR Thermocycler جهاز الدوران الحراري	١٢
Bioneer/ korea	Exispin vortex centrifuge جهاز الطرد المركزي المازج	١٣
San.Gabriel,USA	Ultra violel باعث الاشعة فوق البنفسجية	١٤
Sony (Japan)	Digital camera كاميرا رقمية	١٥
Eppendorf/ Germany	Cooling Centrifuge جهاز نبد مركزي مبرد	١٦
Himedi (India)	Standard wire loop (1m) الناقل الزرع القياسي	١٧
Sailbran (chian)	Petry Dish اطباق بتري	١٨
CYAN/ China	Micropipette 0.5-10 مايكروليتر 10-100 ماصة مايكروليتر 100-1000 مايكروليتر	١٩
Gallenkamp (England)	Incubator حاضنة	20
Bioneer/ korea	Hood هود	٢١
Janetzki	Cork borer (5 mm) ثاقب فليني	22
Thermo/ USA	Nanodrop spectrophotometer	٢٣

٢,٣ المواد الكيميائية والحياتية:

المنشأ والشركة المصنعة	المادة	ت
NanoShel (United States)	Silver NanoPowder (80 nm) (Ag) NanoPowder	١
BDH (England)	Agar-Agar	٢
BDH (England)	Glucose	٣
BDH (England)	Ethyl alcohol	٤
Difco (England)	Dextrose	٥
BDH (England)	Cycloheximide	٦
BDH (England)	Chloramphenicol	٧
Difco (England)	Glycerole	٨
Difco (England)	Ammonium hydroxide	٩
Difco (England)	Yeast extract	١٠
BDH (England)	Formalin	١١
BDH (England)	Phenol	١٢
BDH (England)	Lactic acid	١٣
Difco (England)	Cotton blue	١٤

Biobasic (Canada)	Agarose	١٥
Biobasic (Canada)	Ethidium bromide	١٦
Biobasic (Canada)	TBE buffer	١٧
Biobasic (Canada)	Absolute ethanol	١٨
Biobasic (Canada)	Isopropanol	١٩
Bioneer (Korea)	Free nuclease water	٢٠
Biobasic (Canada)	Loading dye	٢١
Bioneer (Korea)	Ladder 100bp	٢٢

٣,٣ العُدَدُ المُستعمَلَةُ فِي اسْتِخْلَاصِ الـ DNA

الشركة وبلد المنشأ	مكوناته	اسم العدة	ت
Biobasic Canada	EZ-10 Column 50	عدة استخلاص الحمض النووي الفطري EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit	١
	2.0 ml Collection Tube 50		
	Universal Digestion Buffer 12 ml		
	Universal Buffer PF 6 ml		
	Universal Buffer BD 12 ml		
	Universal PW Solution (concentrate) 18 ml		
	Universal Wash Solution (concentrate) 7.5 ml		
	TE Buffer 10 ml		
	Proteinase K (10mg/ml) 1.2 ml		

Bioneer (Korea)	Top DNA polymerase	Accupower® عدة فحص PCR PerMIX	٢
	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		
	Tris-HCl (pH 9.0), KCl, MgCl ₂		
	Stabilizer and tracking dye		

٤,٣ الاوساط والمحالييل المستعملة:

أ- الاوساط

١- وسط اكار السابرويد ديكستروز Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

استعمال وسط اكار السابرويد - دكستروز Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) حيث حضر على وفق ما ورد في Emmons وجماعته (1977) وذلك بإذابة (٦٥ غم) من مسحوق SDA في لتر واحد من الماء المقطر ثم يتم تعقيم المزيج بواسطة جهاز التعقيم (المؤصدة) بدرجة حرارة ١٢١°م وضغط واحد بار ولمدة ١٥ دقيقة و بعد ذلك يتم إضافة المضاد البكتيري كلورامفينيكول ٢٥٠ ملغم و0.05 غم من المضاد السايكلوهكساميد وذلك لمنع نمو الفطريات الرمية ثم رج الوسط جيدا وضبط الرقم الهيدروجيني عند (6.5) وبعدها وزع في اطباق بتري معقمة واستعمل لعزل وتشخيص الفطريات.

٢ - وسط السابرويد السائل Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

حضر بأذابة (٢٠) غم من الدكستروز مع (١٠) غم من البيبتون في (١٠٠) مللتر من الماء المقطر بحسب طريقة (Laron, 1995).

Rice Grain Medium

٣ - وسط الرز

استعمل هذا الوسط للتمييز بين الفطرين *M. canis*, *M. audouinii* إذ يتمكن *M. canis* من النمو على هذا الوسط، أما الفطر الاخر فلا يستطيع النمو على هذا الوسط (Rippon, 1988)، حيث تم تحضير هذا الوسط بمزج (٨) غم من الرز و (٢٥) مل ماء مقطر ثم عقم بالموصدة ثم وزعت بأطباق بتري معقمة.

Urea Agar

٤ - وسط أكار اليوريا

استعمل هذا الوسط في اختبار قابلية الفطريات الجلدية المعزولة على إنتاج الانزيم المحلل لليوريا Urease، (Collee *et al.*, 1996) وتم تحضيره بحسب تعليمات الشركة المجهزة بأذابة 4.6 غم من مسحوق اكار اليوريا في (١٩٠) مل من الماء المقطر ثم عقم بالموصدة وترك ليبرد قليلاً ثم أضيف اليه محلول اليوريا (40%) ورج جيداً ثم تم توزيعه في أنابيب اختبار معقمة.

Brain Heart Infusion(BHI)

٥- وسط نقيع القلب والدماغ

حضر هذا الوسط بإذابة (٣٧) غم منه مع (٢٠) غم من الاكار واضيف اليه (١) لتر من الماء المقطر واستعمل هذا الوسط لتنشيط الفطريات.

ب - المحاليل:

Lactophenol – cotton blue stain

١ - صبغة اللاكتوفينول

وتتكون من:

- ازرق القطن ٠,٠٥ غم
- حامض اللاكتيك ٢٠ مل
- كليسيرون ٤٠ مل
- فينول ٢٠ مل
- ماء مقطر ٢٠ مل

Potassium hydroxide solution - محلول هيدروكسيد البوتاسيوم

ويتكون من:

- هيدروكسيد البوتاسيوم ١٠ غم
- كليسيرون ١٠ مل
- ماء مقطر ٨٠ مل

يضاف الكليسيرون الى ١٠% هيدروكسيد البوتاسيوم لمنع تبلور هذا المحلول وكذلك لمنع جفاف العينة (Emmons *et al.*,1977).

5.3 جمع العينات السريرية

Specimens collection

تم جمع (١٠٠) عينة سريرية لأعمار مختلفة ولكلا الجنسين من المرضى المصابين بالفطريات الجلدية الذين راجعوا استشارية الأمراض الجلدية والزهرية في مستشفى الديوانية التعليمي للمدة من تشرين الأول ٢٠١٣/ إلى نيسان / ٢٠١٤ , وأعطت ٧٢ عينة نتائج إيجابية بالفحص المجهرى المباشر وأعطت ٦٥ عينة نتائج ايجابية بالزرع المختبري وتضمنت هذه العينات ٢٩ أنموذج قشور جلدية و ٢٤ أنموذج شعر و ١٩ أنموذج أظافر, حيث تمت معاملة منطقة الإصابة بكحول ايثيلي تركيزه ٧٠% ثم أخذت قشور صغيرة من حافة التقرحات باستعمال شفرة جراحة معقمة , وتم الحصول على عينات الشعر باستعمال ملقط معقم (Kwon – Chung & Bennett , 1992) ثم نقلت إلى مختبر الفطريات / قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة القادسية.

6.3 الفحص المجهرى المباشر للعينات Direct Microscopic examination for samples

فحصت عينات الشعر والجلد بحسب (Koneman *et al.* (1978) وكما يلي:

(١) تم وضع كمية قليلة من العينة (جلد, شعر) باستعمال إبرة التلقيح في قطرة من هيدروكسيد البوتاسيوم تركيز ١٠% على شريحة زجاجية نظيفة , وعادةً ما يتم هرس عينة الجلد , واستعمل تركيز ٣٠% من هيدروكسيد البوتاسيوم لعينات الاظافر باستعمال إبرة معقمة ثم وضع غطاء الشريحة الزجاجية فوق العينة .

(2) سخنت الشريحة الزجاجية المحضرة بهدوء وذلك بتحريكها قليلاً على لهب مصباح بنزن .

(3) تركت العينة لمدة ٣٠ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة بعد ذلك ضغطت العينة بواسطة قاعدة الإبرة لفرشها على الشريحة .

(٤) فحصت العينة مجهرياً على القوى (40X) و (100X) لملاحظة الغزل الفطري والتراكيب الفطرية الأخرى .

Culturing of Specimens

7.3 زرع العينات

تم زرع العينات على وسط سابرويد - دكستروز أكار الحاوي على كلورامفينيكول ٢٥٠ ملغم / مل لمنع نمو البكتريا، ثم تم إضافة السايكلوهكسامايد بتركيز 0.05 ملغم/لتر لمنع نمو الفطريات الملوثة. ثم صب الوسط الغذائي السابرويد المعقم وحركت الأطباق حركة رحوية او دائرية وتركت لمدة ٢٠ دقيقة قبل زراعة الأطباق باللقاح الفطري , حضنت الأطباق بدرجة حرارة (٣٠±٢)°م لمدة ٢١ يوماً.

١,٧,٣ حساب حساسية وخصوصية الاختبارات التشخيصية:

تم حساب حساسية Sensitivity وخصوصية Specificity للاختبارات التشخيصية بحسب ماجاء ب (Thrusfield, 1986) وفقاً لما يأتي :

جدول (2-3) حساب حساسية وخصوصية الاختبارات التشخيصية

المجموع	الزرع الفطري		الفحص المجهري
	Negative	Positive	
a+b	B	a	Positive
c+d	D	c	Negative
a+c+b+d	b+d	a+c	المجموع

$$Sensitivity = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$Specificity = \frac{d}{d + b} \times 100$$

حيث أن: a : True positive, c : False negative, b : False positive, d : True negative

٢,٧,٣ تنقية الأنواع الفطرية وحفظها:

تمت تنقية الفطريات المعزولة بوضع كمية قليلة من المستعمرة على وسط سابرويد دكستروز أكار وبأطباق معقمه , وعلى درجة حرارة 30 م° . ثم حفظت الأنواع المعزولة لمدة حضن (٣٠-١٤) يوماً , وبدرجة حرارة 4 م° وجددت هذه الأنواع الفطرية كل ١٥ يوماً (, Kwon – Chung & Bennett 1992).

٨,٣ تشخيص الأنواع الفطرية:

١,٨,٣ الخصائص المظهرية

وتشمل شكل المستعمرة ولونها وقوامها والصبغة التي تنتجها من الجهة الخلفية للطبق (Koneman *et al.*, 1978; Kwon-Chung & Bennett, 1992).

٢,٨,٣ الخصائص المجهرية

وتشمل وجود الأبواغ الكونيدية الكبيرة والصغيرة وشكلها وعدد الخلايا. ويتم ذلك بنقل جزء صغير من المستعمرة الفطرية باستعمال إبرة معقمة إلى قطرة من صبغة اللاكتوفينول على شريحة زجاجية نظيفة إذ سخنت الشريحة بعد وضع غطاء الشريحة بإمرارها قليلاً على لهب مصباح بنزن بعدها تركت الشريحة لمدة نصف ساعة ثم فحصت تحت المجهر على قوة (40X) لملاحظة الصفات المجهرية للغزل الفطري والتراكيب التكاثرية التي ينتجها الفطر (Kwon-Chung & Bennett , 1992).

Hair perforation test

٣,٨,٣ اختبار ثقب الشعرة

تم اخذ عينة من شعر سليم لطفل رضيع , قطع الشعر بأطوال 15 - 20 ملم ووضع في طبق زجاجي وعقم بالمؤصدة بدرجة 121 م° وتحت ضغط واحد جوولمدة 15 دقيقة . أضيف إلى الطبق بعد تبريده

25 مل من الماء المقطر الذي يحتوي من 2-3 قطرات من خلاصة الخميرة 10 % Yeast extract المعقمة بالترشيح , ثم لقع الشعر بجزء من مستعمرة الفطر المعزولة بعمر 10-14 يوماً , وحضنت الأطباق بدرجة (26±1)°م لمدة أربعة أسابيع . وللتأكد فيما إذا كان الفطر قد هاجم الشعرة أم لا , فحصت الشعرة خلال هذه المدة بأخذ جزء من الشعرة ووضعها في قطرة من Lacto phenol blue وملاحظة وجود الثقوب تحت المجهر (Clayton & Midgley ,1989 ; Padhye *et al* . ,1980).

Urea's test

٤,٨,٣ اختبار اليوريز

تم العمل بهذا الاختبار طبقاً لما جاء به (Dehoog & guarro, 1995) الذي يتضمن استعمال أنبوتي اختبار حاوية على وسط اليوريا الذي يلحق من المستعمرات باستعمال لوب معقم وتحضن بدرجة حرارة ٢٧°C لمدة (٢-٣ أسابيع) ، التغيرات في لون الوسط يعني تحلل اليوريا.

Slide culture technique

٥,٨,٣ تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية

لدراسة الصفات المجهرية للأنواع المعزولة بغية الحصول على تشخيص أكثر دقة طبقاً لما أورده الباحث (Benson, 2002) وكما يأتي:

(١) عقم طبق بتري حاوٍ على ورق ترشيح مبلله وقضيب زجاجي بشكل حرف V ووضع عليه شريحة زجاجية.

(٢) قطع وسط الاكار على شكل مكعبات صغيرة وبأبعاد لا تزيد عن (١×١)سم ونقل مكعبان ووضعها على سطح الشريحة الزجاجية .

(٣) لقحت الزاويتان المتقابلتان للوسط الزرع على سطح الشريحة بنوع الفطر المراد تشخيصه وتم ترطيب سطح ورقة الترشيح بـ (٣ مل) ماء مقطروغطي بغطاء الشريحة المعقم . ووضع غطاء طبق بتري وحضن عند (٣٠ م°) ولمدة اسبوعين.

(٤) تم رفع غطاء الشريحة بالملقط ووضع على شريحة زجاجية اخرى تحتوي على قطرة من صبغة اللاكتوفينول.

(٥) لوحظ شكل الابوغ الكونيدية الكبيرة وترتيبها وابعادها وبقية التراكيب التي يمكن ان تستعمل بعملية التشخيص.

٣,٨,٦ طريقة التشخيص باستعمال فحص PCR:

تم اجراء فحص PCR وذلك لتحري عن فطر *Trichophyton spp* و *Microsporum spp* وذلك باستعمال البادئات الخاصة بجين ال- 18S rRNA gene الخاصة بتشخيص الفطر حيث تم استعمال نوعين من بادئات نوعية, الاول (18S rRNA gene ITS region) الخاص بتشخيص فطر *Trichophyton* والثاني (18S rRNA gene ITS region) الخاص بتشخيص فطر *Microsporum* حيث تم تصميم البادئات في هذا الدراسة من موقع بنك الجينات NCBI Genbank وباستعمال برنامج Primer3plus لتصميم البادئات والخاصة في فحص ال- PCR ، و جهزت البادئات من شركة Bioneer الكورية:

الجدول (٣-٣): البادئات المستعملة مع تسلسلها النيوكليوتيدي

حجم ناتج التضخيم	البادئ	تسلسل القواعد النايروجينية (٥ → ٣)
397bp	F	CTGAGCGTTTAGCAA GCACA
	R	CCTACCTGATCCGAG GTCAA
411bp	F	AAGGATCATTAACGC GCAAG
	R	GTGCGTTCAAAGATT CGATG

R: Reverse primer البادئ العكسي

F: Forward primer البادئ الأمامي

وتضمن الفحص الخطوات التالية :

Fungus DNA extraction

١,٦,٨,٣ استخلاص الحمض النووي من الفطر

تم اجراء استخلاص الحمض النووي من عينات مستعمرات الفطر وذلك باستعمال عدة الـ (EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit) المجهزة من شركة Bioneer الكورية, وتم اجراء الاستخلاص بحسب تعليمات الشركة كآلاتي:

- ١- نقل حوالي ٢٠٠ ملغم من مستعمرات النمو الفطري الى حاوية خزفية معقمة وباستعمال النايتروجين السائل تم سحق المستعمرات الفطرية ثم نقلت الى انابيب معقمة سعة 1.5 مل.
- ٢- بعد ذلك تم اضافة 180 مايكروليتر من محلول Universal Digestion Buffer و 20 مايكروليتر من انزيم Proteinase K الى كل عينة و تم مزجت جيدا بواسطة جهاز المازج ثم حضنت العينات بدرجة حرارة 56°C لمدة ٣٠ دقيقة وباستعمال حمام مائي.
- ٣- تم اضافة 100 مايكروليتر من محلول Universal Buffer PF ومزج بواسطة المازج وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 20°C- لمدة ٣٠ دقيقة.
- ٤- وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000rpm لمدة ٥ دقائق. من ثم نقل السائل الطافي الى انبوبة سعة 1.5 مل جديدة.
- ٥- تم اضافة 100 مايكروليتر محلول Universal Buffer BD ومزجت جيدا بواسطة المازج.
- ٦- بعد ذلك تم اضافة الكحول الايثيلي المطلق 96% Absolute Ethanol الى العينات كلها ومزجت جيدا بواسطة المازج.
- ٧- تم نقل المزيج الى انابيب خاصة تحتوي على فلتر لاستخلاص الحمض النووي المجهزه مع العده EZ-10 column موضوعة داخل انابيب جامعة سعة 2 مل ومن ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة ثم تم التخلص من الراسب.
- ٨- بعد ذلك تم اضافة 500 مايكروليتر من محلول Universal PW Solution ومن ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة ومن ثم تم التخلص من الراسب.
- ٩- بعد ذلك تم اضافة 500 مايكروليتر من محلول Universal Wash Solution ومن ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة ومن ثم تم التخلص من الراسب.
- ١٠- وضعت الـ EZ-10 column الحاوية على الحمض النووي في انابيب معقمة سعة 1.5 مل ومن ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقتين لتجفيف الـ EZ-10 column membrane من الكحول ومن ثم تم التخلص من الراسب.

١١- أخيراً تمت إضافة 50 مايكروليتر من محلول الـ TE Buffer لإذابة الحمض النووي داخل الـ EZ-10 filter column ومن ثم حضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة وبعدها وضعت الانابيب كلها في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة لجمع الحمض النووي وبعدها نقل الى الحفظ بدرجة حرارة (-20) تحت الصفر في الثلاجة لحين الاستعمال في فحص الـ PCR.

٢,٦,٨,٣ فحص الحمض النووي المستخلص:

تم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص من العينات وذلك من خلال استعمال جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) الخاص بالكشف وقياس تركيز الاحماض النووية (DNA and RNA) حيث يتم الكشف الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي DNA (ng/μl) وقياس نقاوة الحمض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين (260-280 nm) وتم استعمال الجهاز على النحو التالي:

- ١- بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع DNA .
- ٢- تم تصفير ركيذة المقياس مرتين باستعمال ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع ١ مايكروليتر من (ddH₂O) باستخدام ماصة معقمة على سطح ركيذة المقياس وأجراء التصفير وبعدها تنظف الركيذة لقياس العينات.
- ٣- ضغط على زر ok لبدء عملية قياس تركيز الـ DNA وذلك باستعمال ١ ميكروليتر من كل عينة من الـ DNA المستخلص ومن ثم نظفت ركيذة مقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.
- ٤- وكذلك تم تحديد نقاوة عينات الـ DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260/280 nm) حيث ان الحمض النووي DNA المستخلص يعد نقياً عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

3.6.8.3 تحضير محلول التفاعل لسلسلة تفاعلات البلمرة PCR:

تم تحضير مزيج تفاعل PCR 50 مايكروليتر باستعمال عدة الـ PCR PerMIX Accupower® من الشركة الـ Bioneer الكورية وبحسب تعليمات الشركة كما في الجدول (٣-٤) الاتي:

جدول (٣-٤) حجوم مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

PCR master mix	Volume
DNA template	5مايكروليتر

Forward primer	2مايكروليتر
Reverse primer	2مايكروليتر
Free nucleas water	41مايكروليتر
Total	50مايكروليتر

بعد ذلك تم وضع مكونات مزيج تفاعل PCR التي ذكرت في الجدول اعلاه الى أنابيب حجم 0.2ml خاصة بعدة فحص الـ PCR (Accupower ® PCR Premix) والحاوي على بقية مكونات تفاعل الـ PCR ومن ثم نقلت الأنابيب كلها الى جهاز الطرد المركزي المازج (Exispin) vortex centrifuge بسرعة 3000rpm لمدة ثلاثة دقائق ثم وضعت في جهاز PCR Thermocycler.

PCR Thermocycler conditions ظروف الدورات الحرارية لفحص PCR ٤,٦,٨,٣

تم اجراء فحص تفاعل سلسلة البلمره باستعمال جهاز PCR Thermocycler وكما ميبين في الجدول التالي:

جدول (3-5) ظروف الدورات الحرارية لفحص PCR

(١) الفطر *Trichophyton*

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95C	5min
Denaturation	30	95C	5sec.

Annealing		58C	30sec
Extension		72C	40sec
Final extension	1	72C	7min
Hold	-	4C	Forever

(٢) الفطر *Microsporium*

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95C	5min
Denaturation	30	95C	5sec.
Annealing		55C	30sec
Extension		72C	60sec
Final extension	1	72C	7min
Hold	-	4C	Forever

5.6.8.3 تحليل نتائج فحص الـ PCR:

تم اجراء الترحيل الكهربائي Agrose gel electrophorsis باستعمال هلام الاكروز بنسبة ١,٥% وبحسب طريقة (Sambrook *et al.*,1989) وذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمره PCR product analysis كما يأتي:

- ١- تمت اذابة ١ غم من هلام الاكروز Agarose gel في ١٠٠ مل من محلول الـ TBE buffer الدارئ بتركيز 1X وباستخدام جهاز Microwave لمدة ٥ دقيقة.
- ٢- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة ٥٠م° وبعدها تم إضافة ٣ ميكروليتر من صبغة الحمض النووي المشعة Ethidium bromide ومزجت جيدا مع الهلام.

٣- صب هلام الاكروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb لتحديد اماكن عينات PCR, وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة ١٥ دقيقة ومن ثم ازيل المشط من الهلام بعناية ونقل الى حوض الترحيل الكهربائي.

٤- تمت عملية تحميل العينات ناتج الفحص PCR product ووضعت في حفر الهلام.

٥- تم استعمال سلم القياس 100 DNA ladder لقياس ناتج PCR product ووضع في الحفرة الاولى.

٦- بعد اكتمال عملية التحميل تم غمر هلام الاكروز باستعمال محلول TBE Buffer الدائري بتركيز 1X وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستعمال تيار ١٠٠ فولت و ٨٠ امبير لمدة ساعة واحدة.

٧- بعد انتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج PCR باستعمال مصدر الاشعة فوق البنفسجية U.V light source لتحديد الناتج مع وحدة القياس.

٧,٣ طريقة تسلسل الحمض النووي DNA sequencer method

تم اجراء طريقة تسلسل الحمض النووي لتحديد نوع فطر *Trichophyton* و *Microsporium* المشخص بطريقة الصفات المظهرية وطريقة فحص الـ PCR وذلك من خلال اجراء تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis لجين ITS1 small subunit rRNA gene, حيث في البداية تم اجراء تفاعل الـ PCR البالغ طوله (411bp PCR product) لفطر *Microsporium* (397bp PCR product) لفطر *Trichophyton*.

بعد ذلك تم ارسال ناتج تفاعل PCR الى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية وذلك لإجراء تسلسل الحمض النووي باستعمال جهاز AB DNA sequencing system . حيث كان تسلسل القواعد النانيتروجينية باستعمال هذا الجهاز للفطر *Trichophyton* والفطر *Microsporium* الاتي:

(1) T1 forward primer sequence

```
CTGAGCGTTTAGCAAGCACAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
CTCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTC
AAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCCCCTCCCTTCGGGGGC
```

GGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTGG
GCGAATGGGCAGCCAAACCAGCGCCCTCAGGACCGGCCGCCCTGGCCC
CAATCTTTAT

(2) T2 forward primer sequence

CTGAGCGTTTAGCAAGCACAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
CTCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTC
AAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCCCCTCCCTTCGGGGGC
GGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTAG
GCGAATGGGCAGCCAATTCAG

(3) T3 forward primer sequence

CTGAGCGTTTAGCAAGCACAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
CTCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCA
AGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCCCCTCCCTTCGGGGGCG
GGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTAGG
CGAATGGGCAGCCAATTCAG

(4) T4 forward primer sequence

CTGAGCGTTTAGCAAGCACAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
CTCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTC
AAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCCCCTCCCTTCGGGGGC
GGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTAG
GCGAATGGGCAGCCAATTCAG

(5) T5 forward primer sequence

CTGAGCGTTT TAGCAAGCACAATCAGTTAAA ACTTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
CTCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTC
AAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCCCCTCCCTTCGGGGGC
GGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTAG
GCGAATGGGCAGCCAATTCAG

(6) M1 forward primer sequence

AAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT
CCGTCTCCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGT
GCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCGGTTGCCTCGGC
GGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTTCGGGGGGGACGCCTGA
GGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAG
GATTACTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGAACATAACCGTCTGAGCGA
GCAACGCAAATCAGTTAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC

(7) M2 forward primer sequence

AAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT
CCGTCTCCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGT
GCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCGGTTGCCTCGGC
GGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTTCGGGGGGGACGCCTGA
GGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAG
GATTACTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGAACATAACCGTCTGAGCGA
GCAACGCAAATCAGTTAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGG

CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC

(8) M3 forward primer sequence

AAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT
CCGTCTCCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGT
GCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCGGTTGCCTCGGC
GGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTTCGGGGGGGACGCCTGA
GGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAG
GATTACTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGAACATACCGTCTGAGCGA
GCAACGCAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC

(9) M4 forward primer sequence

AAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT
CCGTCTCCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGG
TCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCGGTTGCCTCGGCG
GGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTTCGGGGGGGACGCCTGAG
GGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGA
TACTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGAACATACCGTCTGAGCGAGCA
ACGCAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC

(10) M5 forward primer sequence

AAGGATCATTAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCCGAAGCTCTT
CCGTCTCCCCCCCCGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGT
GCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCTACTGACCCGGTTGCCTCGGC

GGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTTCGGGGGGGACGCCTGA
GGGGGACTCTTGTTCCTAGGCCACGCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAG
GATTACTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGAACATACCGTCTGAGCGA
GCAACGCAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC

٨,٣ دراسة تأثير ايونات الفضة النانوية على بعض انواع الفطريات الجلدية:

تم اختيار الانواع وهي *T.rubrum* و *T.mentagrophytes* و *Microsporum canis* لاجراء هذا الاختبار على اعتبارها الانواع الاكثر تردداً.

١,٨,٣ تأثير تراكيز مختلفة لايونات الفضة النانوية في النمو الشعاعي للفطريات المختبرة

لاختبار الفعالية التثبيطية لايونات الفضة النانوية في النمو الشعاعي للفطريات اتبعت تقنية الغذاء المسموم (Poisoned food technique) التي أوردتها (Hmawndi, 2006) حيث تم اختبار أربع تراكيز وهي (0,1,2,4) ملغم / لتر ولكل المعاملات والتي تم التوصل اليها بالاعتماد على الاختبارات الاولية. حضر الوسط الزرعي SDA في أربع دوارق سعة (١ لتر) بواقع (٦٥ غم) وسط زرعي لكل لتر عقت في جهاز المؤصدة وبعد التعقيم تركت لتبرد في حمام مائي بدرجة (45) م° حتى لايتكون ماء التكاثر أثناء صبها في الاطباق ثم اضيفت ايونات الفضة النانوية للدوارق وبالتراكيز المذكورة أعلاه وقبل تصلب الوسط صببت محتويات الدوارق في أطباق بتري بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز ، أما معاملة المقارنة فقد تضمنت أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي المعقم SDA من غير أي إضافة ولقحت الاطباق بقرص (٥) ملم مأخوذة من حافة المستعمرة لكل فطر من الفطريات المختبرة وبعمر أسبوعين وطبقت هذه الخطوات على الفطريات المختبرة وحضنت الاطباق بدرجة حرارة (٣٠±٢) م° وبعد وصول نمو مستعمرات الفطر في معاملة المقارنة الى حافة الطبق يحسب مقدار التثبيط للنمو الشعاعي القطري (Percent Inhibition of Radial Growth (PIRG) بأخذ معدل قطرين متعامدين للمستعمرات النامية والحصول على النتيجة باستعمال المعادلة على وفق ماجاء به (Jinantana and Sariah, 1997).

$$PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} * 100$$

R1: أعلى نمو للمستعمرة في معاملة المقارنة.

R2: أعلى نمو للمستعمرة في الاطباق الحاوية على أيونات الفضة النانوية.

٢,٨,٣ تأثير ايونات الفضة النانوية في الوزن الجاف للفطريات المختبرة:

لاختبار تأثير ايونات الفضة النانوية بالوزن الجاف للفطريات المختبرة استعملت دوارق مخروطية سعة كل منها (٢٥٠ مل) وضعت في كل منها (٥٠ مل) من الوسط الغذائي السائل SDA اذ تم تحضير التراكيز وهي (0,1,2,4) ملغم / لتر من ايونات الفضة النانوية ووضعت في الوسط الغذائي السائل المعقم أما معاملة المقارنة فقد تضمنت الوسط الغذائي السائل المعقم من غير اية اضافة ثم لقت كل الدوارق بقرص قطره (٥ ملم) من مستعمرة الفطريات المختبرة وبواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز وحضنت الدوارق بدرجة حرارة (٣٠±2) م° ولمدة (2-4) أسبوع بعدها تم ترشيح الغزل الفطري لكل فطر على ورق الترشيح معقمة ومعلومة الوزن ثم جففت بالفرن بدرجة حرارة (٦٠) م° ولمدة ٢٤ ساعة بعد ذلك تم قياس الوزن الجاف لكل فطر (Pinto et al.,2001).

٩,٣ دراسة تأثير ايونات الفضة النانوية على الصفات المظهرية للفطريات:

لمعرفة تأثير ايونات الفضة النانوية على الصفات المظهرية للفطريات المختبرة أتبعنا طريقة (Benson, 2002) وهي تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية Slide culture technique حيث قطع وسط الاكار الحاوي على ايونات الفضة النانوية بتركيز (٤ ملغم/لتر) بشكل مكعبات صغيرة لزيادة عن (١×١) سم ونقل مكعبين ووضعنا على سطح الشريحة الزجاجية واتبعنا خطوات التقنية نفسها وبعد (2-4) أسبوع فحصت الشريحة الزجاجية تحت المجهر ثم تم تحديد نوع التأثير من خلال وجود او عدم وجود تشوهات في الخيط الفطري وكذلك نوع هذه التشوهات.

Statistical Analysis

10.3 التحليل الاحصائي

بهدف معرفة الفروق المعنوية بين معدلات المعايير المدروسة فقد تم تحليل قسم من نتائج هذه الدراسة احصائياً باستعمال مربع كاي (Qi-square) باستعمال البرنامج الاحصائي الشامل (SPSS) الاصدار (Version-20) عند مستوى احتمال (P≤0.05) في حين حلت بقية نتائج التجارب باستعمال تحليل التباين (ANOVA) One Way Analysis Variance ضمن برنامج التحليل الاحصائي ذاته وتم اختبار الفروقات بين متوسطات المجاميع باستعمال قيمة اقل فرق معنوي (LSD) Least Significant Difference عند مستوى احتمال (P≤0.05) لتحديد معنوية الاختلافات (محمود، ٢٠١٣).

Results & Discussion

4- النتائج والمناقشة:

١,٤ الغزل والتشخيص:

أظهرت النتائج وجود فطريات جلدية في 72 عينة اي بنسبة 72% من المجموع الكلي للعينات في حين كان عدد الحالات السالبة 28 اي بنسبة 28%، أما بالنسبة لنتائج الزرع المختبري فقد أظهرت 65 عينة بنسبة 65 % نتيجة موجبة على وسط السابروييد في حين كان عدد الحالات السالبة 35 عينة بنسبة 35% كما مبين في الجدول (1-4)، حيث تشير نتائج هذا الجدول إلى ان الفحص المجهرى المباشر ذو حساسية عالية في تشخيص الاصابات الجلدية مقارنة مع عملية الزرع على الاوساط الزرعية وهذه النتائج تتفق مع النتائج التي توصل إليها النعيمي (2007) حيث كانت حساسية الفحص المباشر بنسبة 70% من العينات المدروسة ، وهذا ما أكده Ajello and Padhye (1998) حيث أشار الى ان الفحص المباشر بمثابة كشف عن وجود أو عدم وجود الفطريات. ويعود ظهور النتائج السالبة سواء كان بالفحص المجهرى المباشر أو الزرع المختبري لأسباب عديدة أهمها التشخيص السريري غير الدقيق حيث تكون الاصابة ليست فطرية وانما هي أعراض لأمراض الحساسية كذلك فان انخفاض نتائج الزرع مقارنة بالفحص المجهرى المباشر قد يعود الى ان بعض المصابين يلجئون الى استعمال علاجات بدون استشارة الطبيب مما يؤدي الى التأثير في نشاط الفطريات المتسببة بالإصابة وعدم نموها عند الزرع (Collee et al. (1996 او قد يكون بسبب وجود خطأ بطريقة خزن العينات لحين الزرع Fathi and Al-Samarai (2000).

جدول (1-4) نتائج الفحص المجهرى وطريقة الزرع للعينات:

نوع الفحص	عينات موجبة	نسبتها المئوية	عينات سالبة	نسبتها المئوية
الفحص المجهرى المباشر (KOH)	72	72%	28	28%
نتائج الزرع الفطري	65	65%	35	35%

2.4 الحساسية والخصوصية للفحص المجهرى وطريقة الزرع:

يبين الجدول (2-4) حساسية وخصوصية الفحص المجهرى وبنسبة 100 % مقارنة مع طريقة الزرع الفطري حيث كان أقل حساسية وبنسبة 90.2 % ، أما الخصوصية فقد بلغت 100 %.

جدول (٢-4) حساسية الفحص المجهرى وخصوصيته وطريقة الزرع:

نوع الفحص	الحساسية	الخصوصية
الفحص المجهرى المباشر	%100	%١٠٠
الزرع الفطري	%90.2	%100

٣,٤ تشخيص الأنواع المعزولة:

أوضحت نتائج الدراسة تشخيص ثلاثة أنواع تابعة لجنس *Trichophyton* من العينات المشمولة بالدراسة وهي *T.mentagrophytes* و *T.rubrum* و *T.schoenlenii* ونوع واحد من جنس *Microsporium* وهو الفطر *M.canis* وكما مبين في الشكل (1-4).



مستعمرة الفطر *T.rubrum* على وسط SDA بعد مدة حضان أسبوعين ودرجة حرارة 30 ± 2



مستعمرة الفطر *T.mentagrophytes* على وسط SDA بعد مدة حضان أسبوعين ودرجة حرارة 30 ± 2



مستعمرة الفطر *M. canis* على وسط SDA
بعد مدة حضن أسبوعين ودرجة حرارة 30 ± 2



مستعمرة الفطر *T. schoenlenii* على وسط SDA
بعد مدة حضن أسبوعين ودرجة حرارة 30 ± 2

شكل (1-4) أنواع جنس *Trichophyton* و *Microsporum* المعزولة على وسط SDA

4.4 الفحوصات المخبرية التأكيدية للأنواع الفطرية المعزولة:

تشير النتائج الموضحة في الجدول (3-4) الى قدرة الفطر *T. mentagrophytes* على اختراق الشعرة على عكس الفطرين *M. canis* و *T. rubrum*. فقد اظهروا نتائج سالبة لهذا الاختبار. أما في اختبار اليوريا الذي يبين قابلية الفطريات على إنتاج انزيم اليوريز من خلال ملاحظة التغيرات اللونية على الوسط. يبين الجدول أيجابية الفطر *T. mentagrophytes* لهذا الاختبار في حين لم تلاحظ أي تغيرات لونية على الوسط بوجود الفطرين *T. rubrum* و *M. canis*، أما بالنسبة لاختبار النمو على وسط الرز، فقد أوضحت نتائج الاختبار قابلية الفطر *M. canis* في النمو على وسط الرز وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (Abid-Ali (2010 حيث أشار الى ايجابية نتائج اختباري اليوريا وثقب الشعرة للفطر *T. mentagrophytes* وقابلية الفطر *M. canis* في النمو على وسط الرز وهذا ما أكدته أيضاً عبد علي (٢٠١٠) وتتفق هذه النتائج أيضاً مع الخفاجي (٢٠٠١).

جدول (3-4) نتائج الفحوصات المخبرية التأكيدية للأنواع الفطرية المعزولة:

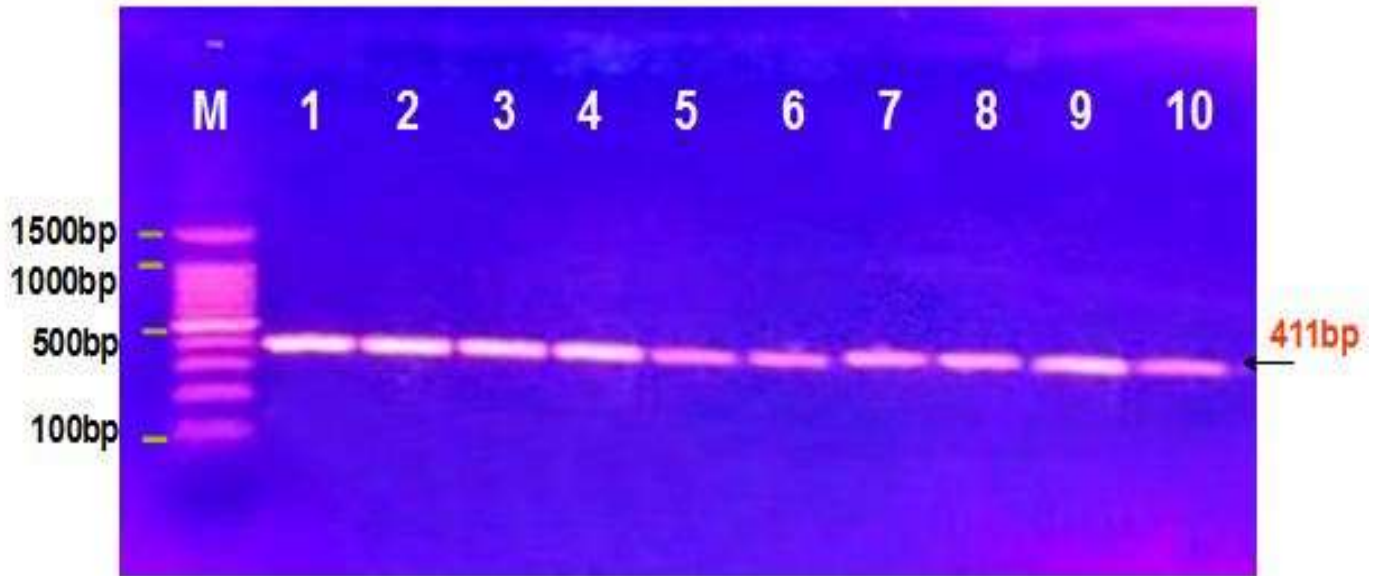
الفطريات المعزولة	اختبار اليوريا	اختبار ثقب الشعرة	اختبار النمو على وسط الرز
<i>T. rubrum</i>	-	-	-
<i>T. mentagrophytes</i>	+	+	-
<i>M. canis</i>	-	-	+

5.4 التشخيص الجزيئي باستعمال تفاعل السلسلة المتبلر Diagnosis by PCR

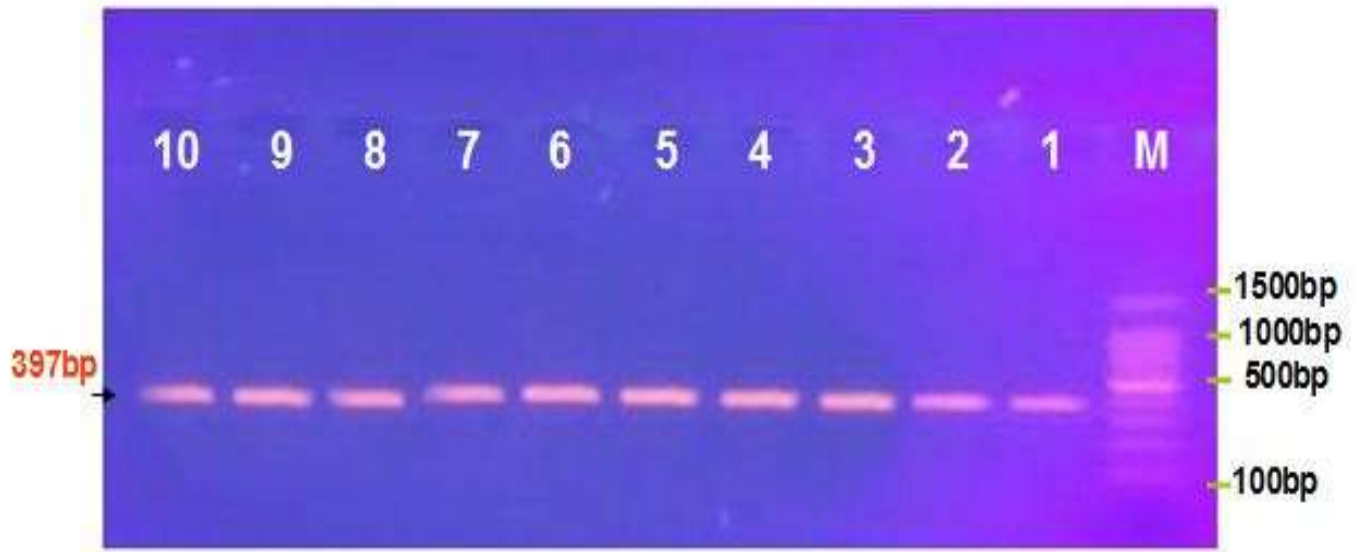
بعد ان تم تشخيص الأنواع الفطرية المعزولة بوساطة الطرائق التقليدية والقائمة على تحديد المعايير المظهرية باستعمال المفاتيح التصنيفية كما مبين سابقا وللتأكد من صحة تشخيصها تم استعمال نوعين من البادئات, الاول (18S rRNA gene ITS region) الخاص بتشخيص فطر *Trichophyton* والثاني (18S rRNA gene ITS region) الخاص بتشخيص فطر *Microsporium* حيث تم تصميم البادئات في هذا الدراسة من موقع بنك الجينات NCBI Genbank وباستعمال برنامج Primer3plus لتصميم البادئات والخاصة في فحص الـ PCR وتم تجهيز البادئات من شركة Bioneer الكورية. استعملت تقنية الـ (PCR) في الدراسة الحالية لتشخيص مايقارب ٢٠ عزلة عائدة لاجناس الفطريات الجلدية الاكثر تردداً بنسبة أصابتها اعتماداً على بواىء (Primers) للجينات المشفرة لاحد أنزيمات التفاعلات الحيوية المهمة التي تجري داخل الخلية الفطرية نظراً لكون الطرائق التقليدية المعتمدة لتشخيص الأعفان ومنها الانواع التابعة لجنس *Trichophyton spp.* و *Microsporium spp.* والقائمة على تحديد المعايير المظهرية ، لم تعد كافية بسبب تداخل هذه المعايير مع غيرها من الأنواع التي تصنف ضمن الانواع الاخرى التابعة لجنس *Trichophyton spp.* و *Microsporium spp.* فضلاً عن التباين الوراثي فيما بينها فمزارع الاحياء المجهرية حتى وان كانت تعود الى مجموعة معينة فانها تختلف في خصائص نموها وصفاتها المظهرية ولا يعني الاختلاف بالضرورة اختلافاً في البناء الوراثي لاسيما بين المزارع والعزلات التي تعود الى الجنس والنوع ذاته بل قد يكون نتيجة استجابة المزارع والعزلات للظروف البيئية محي الدين وجيجان (٢٠١٣)، ومن هنا شرع الباحثون الاعتماد على الطرائق الجزيئية باستعمال تقنية الـ (PCR) والتي أطلق عليها الطريقة القياسية الذهبية وذلك لانها تتميز بالدقة والخصوصية العالية بالتشخيص إبراهيم (٢٠١٣).

١,٥,٤ استخلاص الـ DNA

اظهرت نتائج استخلاص الحمض النووي لعزلات الفطريات باستعمال العده الخاصة لهذا الغرض وترحيله كهربائيا في هلام الاكاروز والكشف عنه باستعمال صبغة الاثيديم برومايد وفحصه تحت الاشعة فوق البنفسجية (U.V.transiluminator) احتواء جميع العزلات على حزمة واحدة ومفردة الحامض النووي DNA المستخلص باخذ الموقع نفسه على صفيحة اسناد الاكاروز كما مبين بالأشكال (2-4) و (3-4) وتم قياس كمية ونقاوة الـ DNA المستخلص باستعمال جهاز (Nanodrop).



الشكل (2-4) الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) للـ DNA على هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة لعزلات فطر *Trichophyton* spp. (1-10) عذلة باستعمال عده (Genomic DNA Mini Kit) حيث ان M: DNA Ladder (100-1500 bp) ، base pair: زوج قاعدي.



الشكل (3-4) الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) للـ DNA على هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة لعزلات فطر *Microsporium spp.* (1-10) عزلة باستعمال عدة (Genomic DNA Mini Kit) حيث ان M: DNA Ladder (100-1500 bp) ، base pair:bp زوج قاعدي.

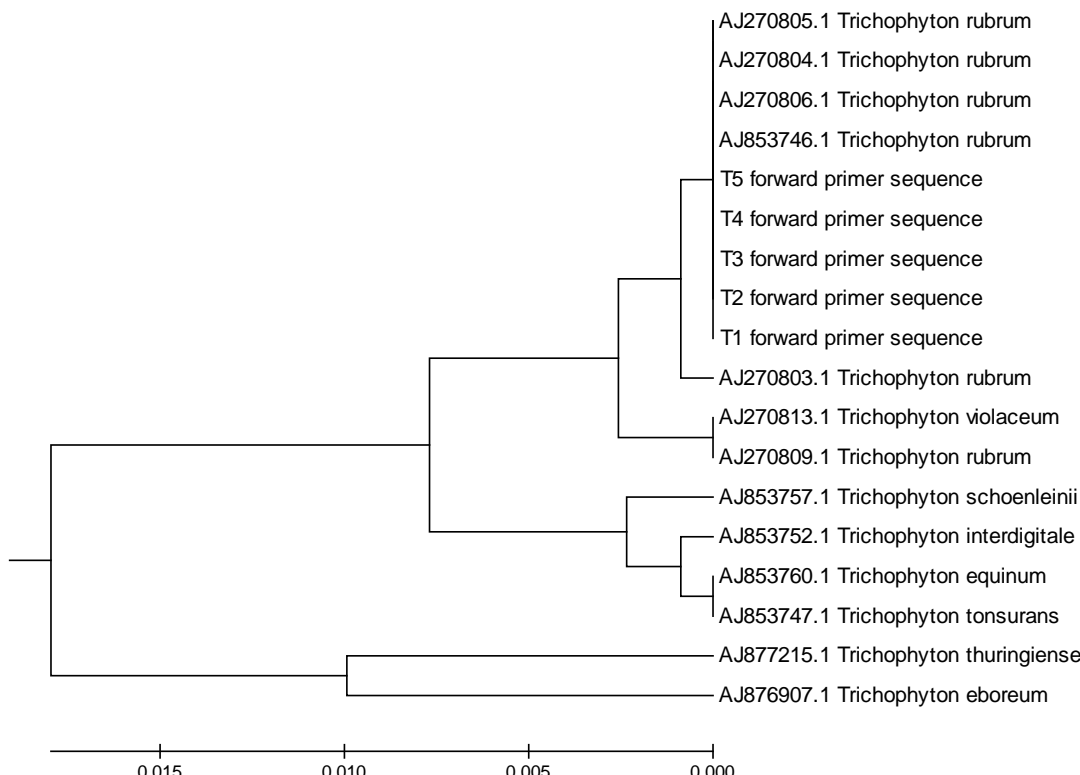
بعد أستكمال فحص الـ PCR ، تم ارسال نواتج الفحص الى موقع بنك الجينات للتأكد من نوع الفطر من خلال مقارنته مع الفطريات المسجلة في هذا الموقع كما في الاشكال (4-4) و (6-4) و باستعمال برنامج MEGA6 حيث تم استعمال تحليل الشجرة الوراثية من نوع (UPGMA tree Unweighted Pair) حيث أظهرت نتائج التحليل وجود تقارب واضح في عزلات فطر *Local Trichophyton spp.* المحلي مع عزلات فطر *Trichophyton rubrum* بالمقارنة مع بقية الأنواع الأخرى الظاهرة في تحليل لشجرة الوراثية. أما بالنسبة لنوع الفطر *spp. Microsporium* فقد تم تشخيصه من خلال تحليل الشجرة الوراثية من نوع UPGMA tree (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) حيث أظهرت نتائج التحليل وجود تقارب واضح في عزلات فطر *Local Microsporium spp.* المحلي مع عزلات فطر *Microsporium canis* بالمقارنة مع بقية الأنواع الأخرى الظاهرة في تحليل لشجرة الوراثية. تستعمل الشجرة الوراثية في معرفة ارتباط كل الأنواع الخاصة بجنس معين مع النوع المراد تحديده بالإضافة إلى الخصائص والصفات المظهرية كطريقة للحصول على التشخيص الدقيق بالإضافة الى التشخيص الروتيني.

في بعض الحالات يكون التشخيص المظهري والمجهري صعباً او غير مؤكد بسبب التنوع الكبير او تعدد الاشكال للنوع نفسه ، تحديد النمط الجيني مفيد في تصنيف الفطريات ويعزز وبدقة وسرعة التشخيص

Faggi *et al.*, 2001, 2002; Graser *et al.*, 2006; Jousson *et al.*, 2004; Liu *et al.* (2000; Ninet *et al.*, 2003).

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	** **
1. T5 forward primer sequence	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
2. T4 forward primer sequence	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
3. T3 forward primer sequence	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
4. T2 forward primer sequence	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
5. T1 forward primer sequence	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
6. AJ877215.1 <i>Trichophyton thuringiense</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
7. AJ876907.1 <i>Trichophyton eboreum</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
8. AJ853760.1 <i>Trichophyton equinum</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
9. AJ853757.1 <i>Trichophyton schoenleinii</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
10. AJ853752.1 <i>Trichophyton interdigitale</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
11. AJ853747.1 <i>Trichophyton tonsurans</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
12. AJ853746.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
13. AJ270813.1 <i>Trichophyton violaceum</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
14. AJ270809.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
15. AJ270806.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
16. AJ270805.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
17. AJ270804.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T
18. AJ270803.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	A T G T G A A T T G C A G A A T T C C G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C T C T G G C A T T

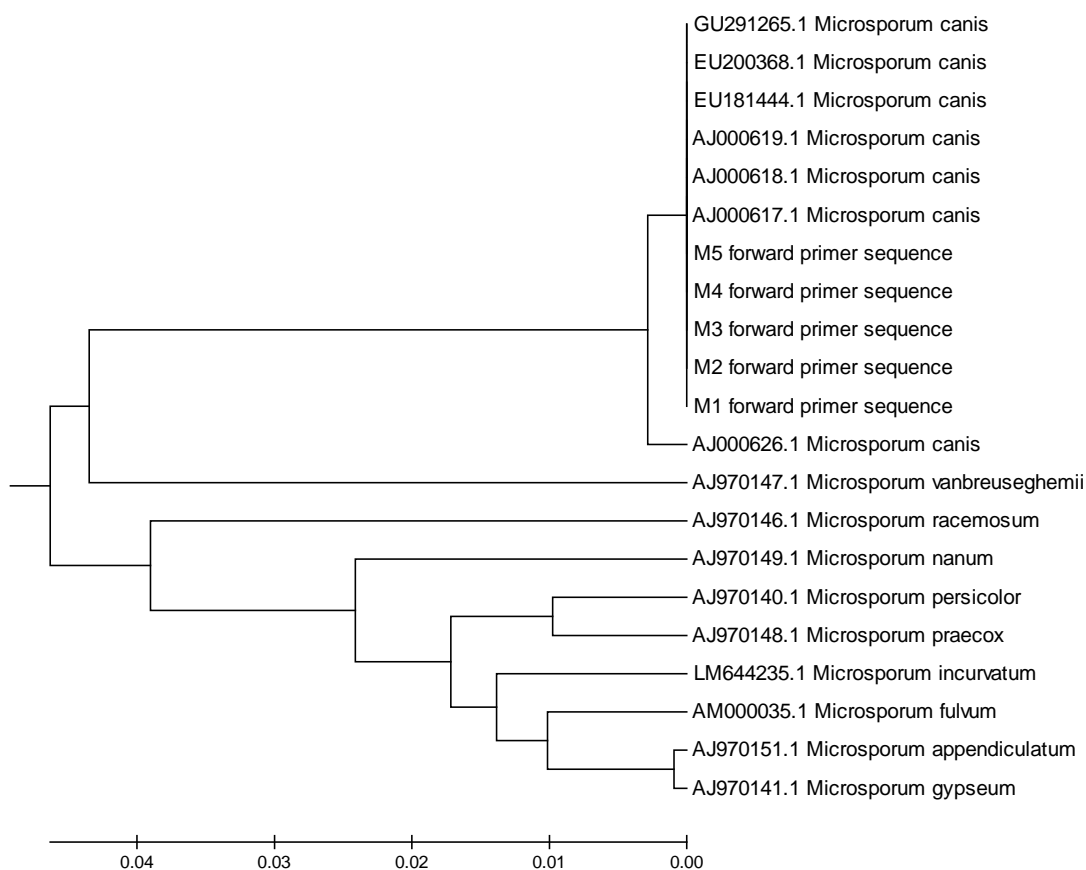
الشكل (4-4): تحليل متعددة اصطفاف تسلسل القواعد الجينية (Multiple sequence alignment analysis) باستخدام برنامج (MEGA6) لنتائج فحص تفاعل تسلسل البلمرة PCR لجين ITS1 small subunit rRNA في فطر *Trichophyton*, حيث يلاحظ التشابه الواضح لاصطفاف تسلسل القواعد لجين (ITS1 gene) في عزلات فطر *Trichophyton spp.* المحلي مع عزلات فطر *Trichophyton rubrum* المسجلة في موقع بنك الجينات NCBI-Genbank الظاهرة في الصورة.



الشكل(4-5): تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis باستعمال برنامج (MEGA 6) حيث تم استعمال تحليل الشجرة الوراثية من نوع (UPGMA tree) (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) حيث أظهرت نتائج التحليل وجود تقارب واضح بنسبة ٩٣% في عزلات فطر spp. Local Trichophyton المحلي مع عزلات فطر *Trichophyton rubrum* بالمقارنة مع بقية الأنواع الأخرى الظاهرة في تحليل لشجرة الوراثية.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	
1. M1 forward primer sequence	A T T A C G A A A C A C A C T G A A A C A T A C G T C T G A C G A G G A G C A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
2. M2 forward primer sequence	G G A T T A T G G A A A A C A C A T T G A G A A C A A C C G T C T G A G C G G G A C A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
3. M3 forward primer sequence	G G A T T A T G G A A A A C A C A T T G A G A A C A A C C G T C T G A G C G G G A C A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
4. M4 forward primer sequence	G G A T T A T G G A A A A C A C A T T G A G A A C A A C C G T C T G A G C G G G A C A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
5. M5 forward primer sequence	G G A T T A T G G A A A A C A C A T T G A G A A C A A C C G T C T G A G C G G G A C A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
6. AJ970151.1 <i>Microsporium appendiculatum</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G A G G A G C A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
7. AJ970147.1 <i>Microsporium vanbreuseghemii</i>	G G A C C G A A C A A A A A T T C T T G C A C A G C T T C C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
8. AJ970140.1 <i>Microsporium persicolor</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
9. AJ970148.1 <i>Microsporium praecox</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
10. AJ970141.1 <i>Microsporium gypseum</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
11. LM644235.1 <i>Microsporium incurvatum</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
12. AM000035.1 <i>Microsporium fulvum</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
13. AJ970149.1 <i>Microsporium nanum</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
14. AJ000626.1 <i>Microsporium canis</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
15. AJ970146.1 <i>Microsporium racemosum</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
16. AJ000617.1 <i>Microsporium canis</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
17. AJ000618.1 <i>Microsporium canis</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
18. AJ000619.1 <i>Microsporium canis</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
19. EU181444.1 <i>Microsporium canis</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
20. GU291265.1 <i>Microsporium canis</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A
21. EU200368.1 <i>Microsporium canis</i>	G G A T T A T G G A A A A C C C A T T G A G A A C A T A C G T C T G A G C G G G A A A A A T C A G T T A A A A C T T T C A A C A A

الشكل(4-6): يمثل تحليل متعددة اصطفاف تسلسل القواعد الجينية (Multiple sequence alignment analysis) باستخدام برنامج (MEGA6) لنتائج فحص تفاعل تسلسل البلمرة PCR لجين ITS1 small subunit rRNA gene في فطر *Microsporium*, حيث يلاحظ التشابه الواضح لاصطفاف تسلسل القواعد لجين (ITS1 gene) في عزلات فطر *Local Microsporium spp.* المحلي مع عزلات فطر *canis Microsporium* المسجلة في موقع بنك الجينات NCBI-Genbank الظاهرة في الصورة.



الشكل (4-7): تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis باستخدام برنامج (MEGA 6) حيث تم استعمال تحليل الشجرة الوراثية من نوع (Unweighted Pair Group Method (UPGMA tree) with Arithmetic Mean) حيث أظهرت نتائج التحليل وجود تقارب واضح بنسبة ٩١% في عزلات فطر *Local Microsporum spp.* المحلي مع عزلات فطر *Microsporum canis* بالمقارنة مع بقية الأنواع الأخرى الظاهرة في تحليل لشجرة الوراثية.

٦,٤ توزيع الاصابات الجلدية بحسب أماكن الإصابة:

توضح النتائج المبينة في جدول (4-4) ان أعلى نسبة اصابة بالفطريات الجلدية كانت للسعفة الحلقية *Tinea corporis* إذ بلغ عدد المرضى المصابين بها ٢٩ مصاباً وبنسبة ٤٠,٢٨% ثم تليها بالمرتبة الثانية سعفة الرأس *Tinea capitis* حيث بلغت ٢٤ مصاباً وبنسبة ٣٣,٣٣% وجاءت سعفة الاظافر *Tinea unguium* بالمرتبة الثالثة وكان عدد المصابين ١٩ مصاباً وبنسبة ٢٦,٣٩% ، اتفقت هذه الدراسة مع ما توصلت اليه جاسم (٢٠١١) التي أوضحت ان نسبة الاصابة بالسعفة الحلقية *Tinea corporis* والبالغة 42.35% أعلى من نسبة الاصابة بسعفة الرأس *Tinea capitis* التي بلغت ٢٠% واحتلت سفة الاظافر *Tinea unguium* المرتبة الثالثة بنسبة 17.6% وتتفق مع الخزعلي (٢٠٠٥) التي بينت ان نسبة الاصابة بالسعفة الحلقية *Tinea corporis* تأتي بالمرتبة الاولى بنسبة الاصابة والبالغة 44.6% ولا تتفق مع الحمداني واخرون (٢٠١٠) الذي بين أن منطقة الاظافر أكثر مناطق الجسم أصابة بنسبة 64.21% .

جدول (4-4) أعداد الاصابات الجلدية ونسبتها بحسب أماكن الإصابة:

النسبة المئوية %	عدد المرضى	الإصابة الفطرية
٤٠,٢٨ %	٢٩	السعفة الحلقية <i>Tinea corporis</i>

السعفة الرأسية <i>Tinea capitis</i>	٢٤	٣٣,٣٣%
سعفة الاظافر <i>Tinea unguium</i>	١٩	٢٦,٣٩%
Total	٧٢	

٧,٤ النسبة المئوية لظهور الأنواع المعزولة وترددتها:

يوضح الجدول (٤-٥) وجود فروق عالية المعنوية لنسب العزل المئوية التابعة لجنس *Trichophyton* و *Microsporum* المعزولة وأعدادها ($P \leq 0.05$ ، $X^2 = 26$) ، إذ يتضح من نسب العزل المئوية سيادة الفطر *T.rubrum* بواقع ٢٨ عزلة مشكلة نسبة تكرار ٢٨% من المجموع الكلي للعزلات وشكل الفطر *M.canis* المرتبة الثانية بواقع 24 عزلة وبنسبة تكرار 24%، في حين بلغت نسبة تكرار الفطر *T.mentagrophytes* نسبة ١٦% وبواقع ١٦ عزلة، وظهر الفطر *T.schoenlleni* بواقع ٤ عزلة وبنسبة تكرار ٤% وفي الدراسة أيضاً سجلت أجناس أخرى تابعة لأنواع مختلفة من الفطريات غير الجلدية بواقع ٢٨ عزلة وبنسبة تكرار ٢٨%، وهذه النتائج تتفق مع ماجاء به الحمداني وآخرون (٢٠١٠) والذي بين ان الجنس *Trichophyton* يحتل المرتبة الاولى بالظهور يليه الجنس *Microsporum* وكان الفطر *T.rubrum* أكثر أنواع الفطريات تردداً بنسبة 14.72% وتتفق مع محمد (٢٠٠٨) الذي أوضح ان الفطر *T.rubrum* أكثر الانواع تردداً بنسبة 54.3% ولا تتفق مع نتائج دراسة النعيمي (٢٠٠٧) التي بينت سيادة الفطر *T.mentagrophytes* بنسبة 37.5% ولا تتفق مع جاسم (٢٠١١) التي أشارت الى أن أكثر الفطريات المعزولة هو الفطر *T.mentagrophytes* بنسبة 33.3% يليه الفطر *T.rubrum* بنسبة 24% ولا تتفق مع ما توصل اليه (Abid-Ali (2010) الذي أشار الى ان الفطر *T.mentagrophytes* يأتي بالمرتبة الاولى بين الفطريات المعزولة بنسبة 26.31% يليه الفطر *T.verrucosm* بنسبة 22.22%، يعود السبب في نسب اختلاف نسب الانواع الى اختلاف حجم العينة المدروسة وكذلك اختلاف الموقع الجغرافي.

جدول (4-5) النسبة المئوية لأنواع الفطريات الجلدية المعزولة من المرضى المصابين بأمراض فطرية جلدية وترددتها

النسبة المئوية للتكرار	عدد العينات	النوع الفطري
2٨%	٢٨	<i>T.rubrum</i>
2٤%	٢٤	<i>M.canis</i>

% 1٦	١٦	<i>T.mentagrophytes</i>
%4	4	<i>T.schoenllenii</i>
%٢٨	٢٨	أنواع أخرى
%100	100	مجموع العينات الكلي
26		X^2 المحسوبة

٨,٤ العلاقة بين الإصابات الجلدية الفطرية والجنس:

توضح النتائج المبينة في جدول (4-7) نوع الإصابة ونسبتها وعلاقة ذلك بالجنس إذ شكلت *Tinea corporis* أكثر إصابة في الإناث بنسبة ٢٦,٣٩% وفي الذكور نسبة ١٣,٨٩% و *Tinea capitis* أكثر إصابة في الذكور بنسبة ١٩,٤% وفي الإناث نسبة ١٣,٨٩% و *Tinea unguium* أكثر إصابة في الإناث بنسبة ١٦,٦٧% وفي الذكور نسبة ٩,٧٢% وهذه النتيجة تتفق مع دراسة الحمداني اخرون (٢٠٠١)، حيث اوضح ان الاناث اكثر اصابة من الذكور اذ بلغت نسبة اصابات الاناث ٦٤,٢١% ونسبة الاصابة في الذكور ٣٥,٧٩% وفي الاردن أيضاً كانت نسبة اصابة الاناث أعلى من نسبة اصابة الذكور (Chouela 1997) وخاصة في عمر المدرسة. أما في مدينة كرمان الايرانية عام ٢٠٠٣ فقد كانت نسبة أصابة الاناث ٩٥,٥% والذكور ٤,٥% (Kamiabi and Nakhaei 2005) ، وفي دراسة أخرى وجد ان الاناث أكثر بثلاث مرات من اصابات الذكور (Esterada 2000) ، أما في تركيا فقد بينت الدراسات ان الاناث اكثر تأثراً من الذكور (Wegner et al,1994., Inanir, 2002., Hong, 1995).

جدول (4-6) العلاقة بين أعداد الاصابات الجلدية الفطرية والجنس:

النسبة المئوية	عدد الذكور	النسبة المئوية	عدد الإناث	العدد الكلي للمرضى	الإصابة الفطرية
%١٣,٨٩	١٠	%٢٦,٣٩	١٩	٢٩	Tinea corporis
%١٩,٤	١٤	%١٣,٨٩	١٠	٢٤	Tinea capitis
%٩,٧٢	٧	%١٦,٦٧	١٢	١٩	Tinea unguium
	٣١		٤١	٧٢	Total

$$P = ٠,١٧٧ ، مربع كاي = ٣,٤٥٣$$

٩,٤ العلاقة بين الاصابات الجلدية ومنطقة السكن:

بينت النتائج في الجدول (4-7) أن نسبة الإصابة بالاخماج الفطرية الجلدية قد اختلفت بحسب منطقة السكن (الريف , المدينة) , حيث كانت الاصابة بسعفة الجسم *Tinea corporis* بالمرتبة الاولى في أعداد الاصابات اذ بلغ عدد المصابين ١٨ شخصاً في الريف وبنسبة 25 % ، أما في المدينة فقد بلغ عدد المصابين بهذه السعفة ١١ وبنسبة 15.28% ، أما سعفة الرأس *Tinea capitis* فبلغ عدد المصابين بها في الريف ١٦ شخصاً وبنسبة 22.22% ، وفي المدينة فقد بلغ عدد المصابين بهذه السعفة ٨ أشخاص وبنسبة 11.11% ، أما سعفة الاظافر *Tinea unguium* فبلغت أعداد الاصابات بها في الريف ١٠ اشخاص وبنسبة 13.89% ، وفي المدينة فقد بلغ عدد المصابين بهذه السعفة ٩ أشخاص وبنسبة 12.5% ، وهذه النتائج لا تتفق مع دراسة النعيمي (٢٠٠٧) والتي بينت ان مناطق الريف أكثر اصابة بالفطريات الجلدية بنسبة ٦٨% أما نسبة الاصابة في المدينة كانت ٣٢% ولا تتفق هذه النتائج مع ماجاءت به القيسي (٢٠٠٦) التي أوضحت أن أغلب الاصابات الفطرية الجلدية تكون في الاشخاص الذين يسكنون المناطق الريفية وذلك بسبب الحالة الصحية المتردية الناتجة عن عدم الاهتمام والتوعية الصحية وتتفق هذه النتيجة مع دراسة الطائي (٢٠٠١) وكذلك تتفق مع ماجاء به Wessels (1996) والذين ذكروا بأن انخفاض الرعاية الصحية والمستوى الاقتصادي يساعدان في حدوث الاصابة بالفطريات الجلدية على حد سواء بين الريف والمدينة وتتفق هذه الدراسة أيضاً مع ماجاء به Bassaly *et al.* (1993) الذي لم يجد فرقاً بأعداد الاصابات بين الريف والمدينة.

جدول (4-7) العلاقة بين الإصابة بالفطريات الجلدية ومنطقة السكن:

الريف		المدينة		العدد الكلي للمرضى	الإصابة الفطرية
النسبة المئوية	عدد المرضى	النسبة المئوية	عدد المرضى		
25%	١٨	15.28%	11	٢٩	Tinea corporis
22.22%	١٦	11.11%	٨	٢٤	Tinea capitis
13.89%	١٠	12.5%	٩	١٩	Tinea unguium
61.11%	٤٤	38.89%	٢٨	٧٢	Total

مربع كاي = ٠,٨٩٨ ، P = ٠,٦٣٨

٤,١٠٠ فاعلية ايونات الفضة النانوية على بعض الجوانب الفسلجية للفطريات مختبرياً:

٤,١٠٠ تأثير ايونات الفضة النانوية في النمو الشعاعي للفطريات المنتخبة:

بين التحليل الاحصائي لنتائج التأثير التثبيطي لايونات الفضة النانوية على معدل أقطار مستعمرات الفطريات المدروسة والتراكيز المستعملة ان هنالك فروقاً معنوية ($P \leq 0.05$) في معدل قطر المستعمرات

بمعدلات متباينة بحسب التراكيز المستعملة ونوع الفطر، حيث ان معدلات اقطار المستعمرات الفطرية كانت تتناسب تناسباً عكسياً مع تركيز المعاملة اذ تقل معدلات اقطار نمو الفطريات كلما ازداد تركيز ايونات الفضة النانوية على عكس النسبة المؤية للتثبيط التي كانت تزداد بزيادة التركيز.

في الجدول (4-9) ان جميع التراكيز المستعملة كانت فعالة في الحد من نشاط الفطر *T.mentagrophytes* قياساً بمعاملة المقارنة وقد تباينت التراكيز في قدرتها على تثبيط النمو الشعاعي للفطر وقد كان أكثر تركيز مؤثر في الحد من النمو الشعاعي لهذا الفطر هو تركيز ٤ ملغم/لتر مقارنة بمعاملة السيطرة حيث كان قطر المستعمرة يبلغ ٩ سم.

أما بالنسبة للفطر *T.rubrum* فقد أدت تراكيز (2,4) ملغم/لتر الى خفض معنوي بمعدلات اقطار المستعمرات قياساً بمعاملة المقارنة كما مبين في الجدول (4-10) ، حيث كان معدل قطر المستعمرات 7.5 ± 0.11 للمقارنة وعند معاملته بتركيز ٢ ملغم/لتر أصبح معدل قطر المستعمرات 0.11 ± 0.05 وبتركيز ٤ ملغم/لتر أصبح معدل قطر المستعمرات 4.5 ± 0.28 في حين لم يحدث التركيز 1 ملغم/لتر أي فرق معنوي يذكر وقد بلغ متوسط التأثير التثبيطي للمعاملة بايونات الفضة النانوية لجميع التراكيز هو 66.67%. أما بالنسبة للفطر *M.canis* فيوضح الجدول (4-11) أكثر الفطريات حساسية لايونات الفضة النانوية عند تركيز ٤ ملغم / لتر حيث بلغ معدل قطر المستعمرات 3 ± 0.05 سم بوجود ايونات الفضة النانوية في حين كان معدل قطر المستعمرات 8.5 ± 0 في معاملة المقارنة وقد أدت جميع التراكيز المستعملة الى خفض معنوي في معدلات اقطار المستعمرات قياساً بمعاملة المقارنة. وهذه النتيجة تتفق مع ماجاء به (Kim Kj et al.(2008 حيث استعمل جزيئات الفضة النانوية في تثبيط الفطر *T.mentagrophytes* و (*Candida species*) بمجموعة تراكيز من (٧-١) مايكروغرام/ مل وأثبتت هذه التراكيز فعاليتها في تثبيط هذا الفطر وهذا يتفق مع دراستنا الحالية ، وأشار (Ales panac (2009 الى ان التركيز المثبط الادنى للفطر *Candida albicans* I,II و *Candida tropicalis* هو (0.21, 0.42, 0.84 ملغم / لتر) على التوالي ، وأشارت (Fatemah (2011 التي استعملت جزيئات الفضة النانوية على الفطر *T.rubrum* بتركيز (2.5 مايكروغرام / مل) وأضافه (٢٠ مايكروغرام / مل) من المضاد (Flocunazol) ولوحظ تأثير المركبين معاً وأيضاً تم إضافة (2.5 مايكروغرام / مل) من جزيئات الفضة النانوية مع (0.4 مايكروغرام / مل) من المضاد (Geriseofulvin) لوحظ ان تأثير هذه المضادات (Flocunazol و Geriseofulvin) يزداد بوجود جزيئات الفضة النانوية. ان اختلاف التراكيز في أحداث التأثير على نمو الفطريات يعتمد على نوع الفطر وشكل أيونات الفضة النانوية المستعملة وحجمها Pal S(2007) وأن جزيئات الفضة النانوية تمتلك مساحة سطح كبيرة قياساً بمعدل الحجم مما يسهل عملية ارتباط هذه الجزيئات مع خلايا الاحياء الدقيقة (Morones et al.(2005).

جدول (٤-8) معدل قطر المستعمرة لفطر *T.mentagrophytes* بوجود تراكيز مختلفة لايونات الفضة النانوية

متوسط تأثير المعاملة (نسبة التثبيط)	معدل قطر المستعمرات بوجود المعاملة (سم) ± الخطأ القياسي			معدل قطر السيطرة (سم)	نوع المعاملة
	٤ ملغم	٢ ملغم	١ ملغم		
64.8%	4.5±0.9 ^c	6±0.89 ^b	7±1 ^b	9±0 ^a	ايونات الفضة النانوية
0.004					LSD _{0.05}

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ لقياسي.
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية.
- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروق مهمة احصائياً بين التراكيز في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروق مهمة احصائياً بين المعاملات تحت مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD.

جدول (٩-٤) معدل قطر المستعمرات للفطر *T.rubrum* بوجود تراكيز مختلفة لايونات الفضة النانوية:

متوسط تأثير المعاملة (نسبة التثبيط)	معدل قطر المستعمرات بوجود المعاملة (سم) ± الخطأ القياسي			معدل قطر السيطرة (سم)	نوع المعاملة
	٤ ملغم	٢ ملغم	١ ملغم		
66.67%	4.5±0.28 ^c	5±0.11 ^c	6.5±0.17 ^b	7.5±0 ^a	ايونات الفضة النانوية
<0.001					LSD_{0.05}

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ لقياسي.
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية.
- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروق مهمة احصائياً بين التراكيز في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروق مهمة احصائياً بين المعاملات تحت مستوى احتمالية (p≤0.05) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD.

جدول (٤-١٠) معدل قطر المستعمرات للفطر *M.canis* بوجود تراكيز مختلفة لأيونات الفضة النانوية:

متوسط تأثير المعاملة (نسبة التثبيط)	معدل قطر المستعمرات بوجود المعاملة (سم) \pm الخطأ القياسي			معدل قطر السيطرة (سم)	نوع المعاملة
	٤ ملغم	٢ ملغم	١ ملغم		
58.8%	3 \pm 0.05 ^d	5 \pm 0.23 ^c	7 \pm 0.17 ^b	8.5 \pm 0 ^a	ايونات الفضة النانوية
<0.001					LSD _{0.05}

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات \pm الخطأ لقياسي.
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية.
- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروق مهمة احصائياً بين التراكيز في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروق مهمة احصائياً بين المعاملات تحت مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD.

4 ملغم / لتر	2 ملغم / لتر	1 ملغم / لتر	0 ملغم / لتر	التركيز نوع الفطر
				<i>T. rubrum</i>
				<i>T. mentagrophytes</i>
				<i>M. canis</i>

شكل (٤-٨) يوضح تأثير جزيئات الفضة النانوية في النمو الشعاعي للفطريات المختبرة

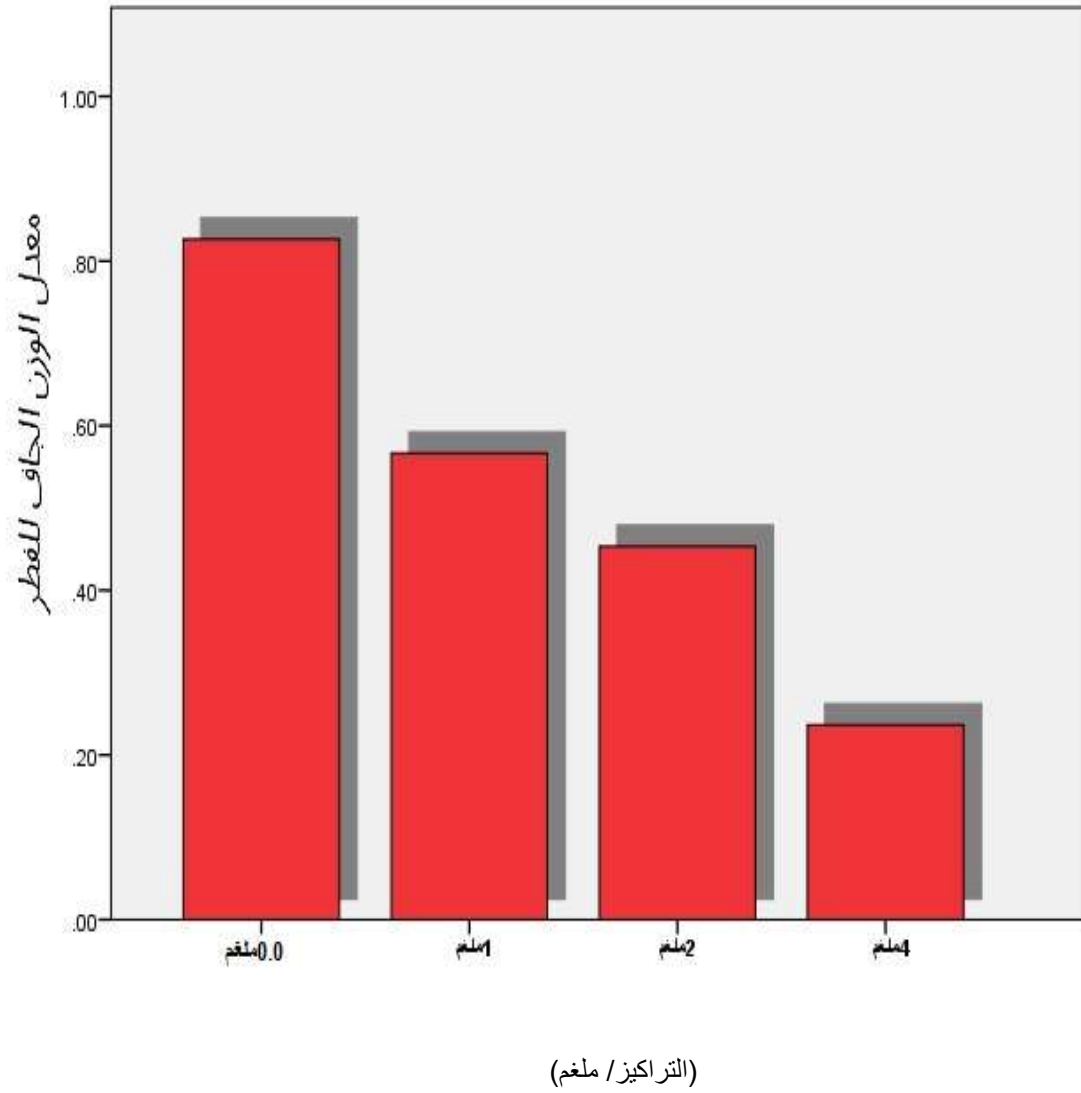
٤,١٠,٢ تأثير جزيئات الفضة النانوية في الوزن الجاف للفطريات المختبرة:

بينت نتائج الدراسة تأثير ايونات الفضة النانوية في الوزن الجاف للفطريات المختبرة كفاءة تثبيطية عالية في نمو الفطريات وتؤكد هذه النتائج نتائج اختبار هذه المادة في النمو الشعاعي للفطريات وتبين نتائج التحليل الاحصائي تأثير ايونات الفضة النانوية في الوزن الجاف وأن جميع التراكيز المستعملة قد أثرت بصورة معنوية ($p \leq 0.05$) في خفض معدلات الوزن الجاف لجميع الفطريات المختبرة وأعطت نتائج متفاوتة معنوياً بين التراكيز المستخدمة إذ بلغ الوزن الجاف للفطر *T.rubrum* 0.56 ± 0.08 بعد معاملته بتركيز ١ ملغم / لتر من جزيئات الفضة النانوية ، في حين كان الوزن الجاف للسيطرة 0.84 ± 0.02 ولا يوجد فرق معنوي بين هذا التركيز وتركيز ٢ ملغم / لتر على الوزن الجاف للفطر المذكور حيث بلغ وزنه عند معاملته بتركيز ٢ ملغم / لتر 0.45 ± 0.02 في حين كان هناك فرق معنوي كبير ($p \leq 0.05$) عند المقارنة بين معاملة السيطرة ومعاملة الفطر بتركيز ٤ ملغم / لتر حيث جعل الوزن الجاف ينخفض الى 0.23 ± 0.03 وكان متوسط التأثير التثبيطي 0.41 ± 0.05 ، كما مبين في الجدول (4-12) وشكل (4-12). أما بالنسبة للفطر *T.mentagrophytes* فأعطت التراكيز المستعملة لجزيئات الفضة النانوية فروقاً معنوية عند مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$) حيث ان معدل الوزن الجاف للمستعمرات بلغ 0.56 ± 0.12 عند تركيز ١ ملغم / لتر في حين كان الوزن الجاف للسيطرة 0.9 ± 0.1 وعند استعمال تركيز ٢ ملغم / لتر أصبح معدل الوزن الجاف للمستعمرات 0.30 ± 0.01 مما يدل على وجود فروق معنوية بين هذا الوزن ووزن السيطرة ، أما عند استخدام تركيز ٤ ملغم / لتر فقد بلغ معدل الوزن الجاف للمستعمرات 0.17 ± 0.02 وهذا التركيز يشكل اعلى نسبة تأثير على الوزن الجاف بالنسبة لهذا الفطر وكان متوسط التأثير التثبيطي 0.41 ± 0.05 ، كما مبين في الجدول (4-13) وشكل (4-13). أما بالنسبة للفطر *M.canis* فقد اثرت التراكيز المستعملة من جزيئات الفضة النانوية الى خفض معنوي ($p \leq 0.05$) في معدل الوزن الجاف لهذا الفطر حيث ان معدل الوزن الجاف للمستعمرات عند معاملتها بتركيز (١ ملغم / لتر) انخفضت الى 0.66 ± 0.18 اما عند تركيز ٢ ملغم / لتر فقد أصبح معدل الوزن الجاف 0.34 ± 0.02 وعند تركيز ٤ كلغم / لتر أصبح معدل الوزن الجاف للفطر 0.15 ± 0.01 حيث يتضح ان هذا التركيز أثر تأثيراً معنوياً كبيراً على معدل الوزن الجاف لهذا الفطر مقارنة مع الفطريات المختبرة الاخرى ، أما عن متوسط التأثير التثبيطي لجميع التراكيز كان 0.38 ± 0.09 كما مبين في الجدول (4-14) وشكل (4-14). هذه النتائج تؤكد التأثير التثبيطي الذي أحدثه أيون الفضة النانوي في معدل أقطار المستعمرات للفطريات المختبرة ولمعظم التراكيز المستعملة وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه Keuk-Jun K et al.(2009) وتتفق أيضاً مع ما جاء به Kvitek L et al.(2008).

جدول (٤-١١) تأثير ايونات الفضة النانوية على معدل الوزن الجاف للفطر *T.rubrum*

متوسط تأثير المعاملة	معدل الوزن الجاف للغزل الفطري (غم) \pm الخطأ القياسي			ايونات الفضة النانوية
	التركيز (ملغم/لتر) لايونات الفضة النانوية			
	٤ ملغم	٢ ملغم	١ ملغم	
0.41 ± 0.05^A	0.23 ± 0.03^{Ba}	0.45 ± 0.02^{aA}	0.56 ± 0.08^{aA}	ايونات الفضة النانوية
0.84 ± 0.02^B				السيطرة
0.017				$LSD_{0.05}$

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات \pm الخطأ لقياسي.
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية.
- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروق مهمة احصائياً بين التراكيز في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروق مهمة احصائياً بين المعاملات تحت مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD .

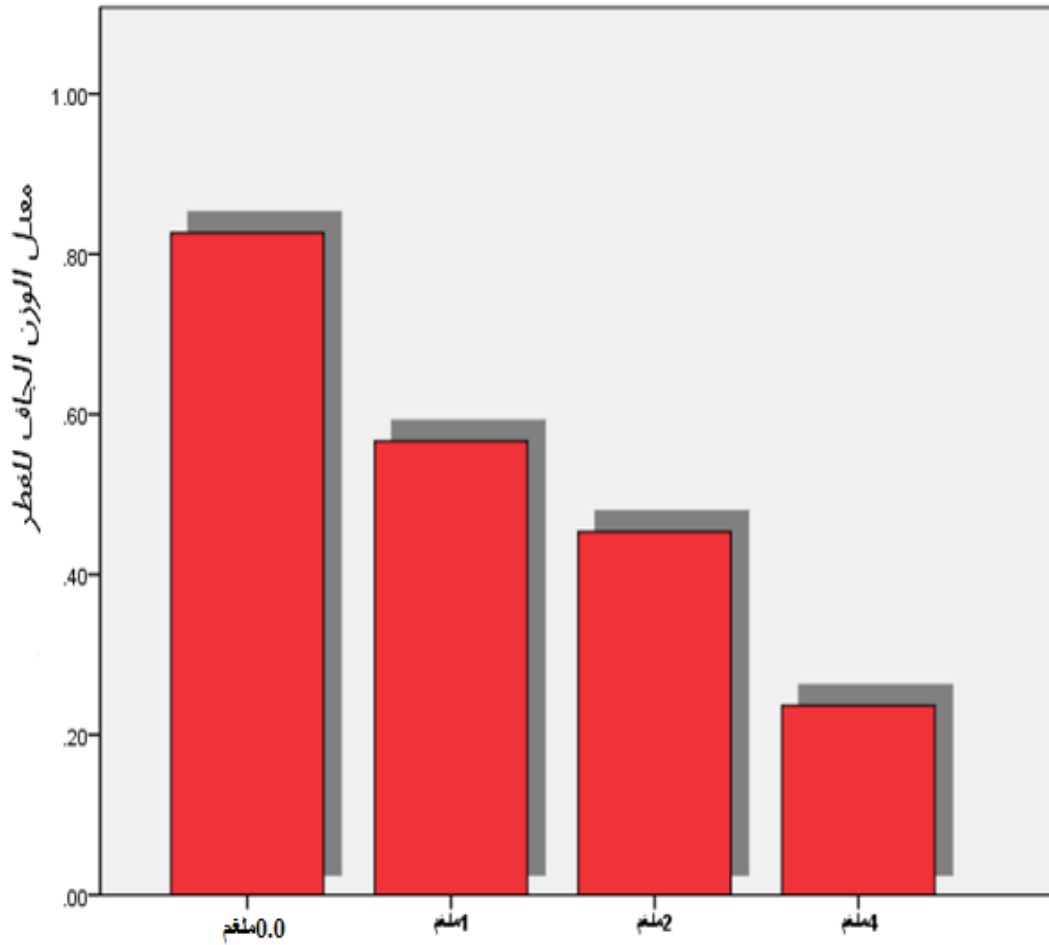


شكل رقم (٩-٤) معدل الوزن الجاف للفطر *T.rubrum* بتراكيز مختلفة لايونات الفضة النانوية

جدول رقم (١٢-٤) تأثير ايونات الفضة النانوية على معدل الوزن الجاف للفطر *T.mentagrophytes*

متوسط تأثير المعاملة	معدل الوزن الجاف للغزل الفطري (غم) ± الخطأ القياسي			ايونات الفضة النانوية
	التركيز (ملغم/التر) لايونات الفضة النانوية			
	٤ ملغم	٢ ملغم	١ ملغم	
0.41±0.05^A	0.17±0.02^{bA}	0.30±0.01^{Ba}	0.56±0.12^{aA}	ايونات الفضة النانوية
0.9±0.01^B				السيطرة 0.0 ملغم
0.021				LSD_{0.05}

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ لقياسي.
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية.
- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروق مهمة احصائياً بين التراكيز في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروق مهمة احصائياً بين المعاملات تحت مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD.



لايونات الفضة النانوية

(التركيز / ملغم)

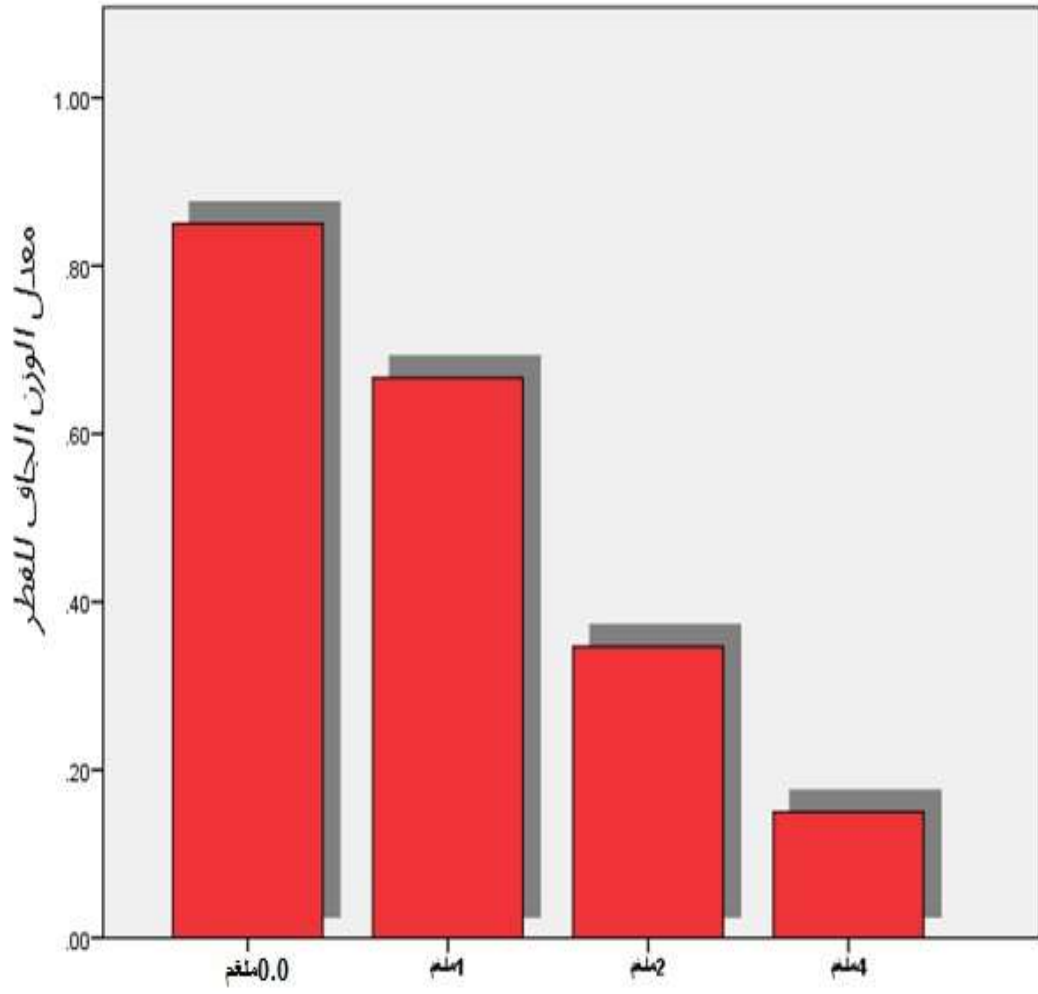
شكل رقم (٤ - ١٠)

جدول رقم (٤-١٣) تأثير ايونات الفضة النانوية على معدل الوزن الجاف للفطر *M.canis*

متوسط تأثير المعاملة	معدل الوزن الجاف للغزل الفطري (غم) ± الخطأ القياسي			ايونات الفضة النانوية
	التركيز (ملغم/التر) لايونات الفضة النانوية			
	٤ ملغم	٢ ملغم	١ ملغم	
0.38 ± 0.09^A	0.15 ± 0.01^{bA}	0.34 ± 0.02^{bA}	0.66 ± 0.18^{Aa}	ايونات الفضة النانوية
	0.85 ± 0.01^B			السيطرة 0.0 ملغم
	0.003			LSD _{0.05}

• تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ لقياسي.

- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية.
- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروق مهمة احصائياً بين التراكيز في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروق مهمة احصائياً بين المعاملات تحت مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي .LSD



(التراكيز / ملغم)

شكل رقم (٤-١) معدل الوزن الجاف للفطر *M.canis* بتراكيز مختلفة لايونات الفضة النانوية

٣,١٠,٤ تأثير جزيئات الفضة النانوية على الصفات المظهرية للخيط الفطرية:

ان انخفاض معدل نمو فطريات الاختبار الناتج عن تأثير جزيئات الفضة النانوية عادة مايكون مرفقاً بتغيرات مورفولوجية للهايفات النامية، يبدو ذلك واضحاً من خلال نتائج دراستنا الحالية متمثلة بنمو غير طبيعي للهايفات والكونيدات وان هذه التغيرات المورفولوجية الناتجة عن المعاملة بجزيئات الفضة النانوية تكون عامة في المجاميع الفطرية المختبرة كلها كما موضح بالشكل (٤-١٢).



نمو غير طبيعي للخيوط الفطرية ونقصان عدد الحواجز septum للفطر *T. rubrum* (40 x)



تظهر الماكروكونيديا ضامرة للفطر *M. canis* (40 x)

(40 x) *T. me*

[اكتب اقتباساً من المستند أو من ملخص نقطة هامة. يمكنك وضع مربع النص في أي مكان في المستند. استخدم علامة التثبيت "أدوات الرسم" لتغيير تنسيق مربع نص الاقتباس.]

ظهور انتفاخات في

أولاً: الاستنتاجات

استناداً إلى النتائج التي توصلت إليها الدراسة فإنه يمكن التوصل إلى الاستنتاجات الآتية:

(١) إن الفحص المجهرى المباشر يتميز بحساسية عالية في الكشف عن وجود الفطريات الجلدية وهو

بمثابة كشف اولي عن وجود الفطريات.

- (٢) ان النوع *T.rubrum* يأتي في مقدمة الانواع المسببة للإصابة.
- (٣) إن سعة الجسم تحتل المركز الأول بنسبة الإصابات الفطرية الجلدية.
- (٤) تحليل الشجرة الوراثية يوضح العلاقات التطورية بين الانواع مما يساعد في تشخيص الانواع المشكوك في تصنيفها.
- (٥) ان الاصابات الفطرية الجلدية تتأثر بعامل الجنس ومكان السكن.
- (٦) ان لجزيئات الفضة النانوية تأثير تثبيطي للفطريات الجلدية وخصوصاً عند التركيز ٤ ملغم.
- (٧) الفحص المجهرى للفطريات تحت تأثير جزيئات الفضة النانوية يعطي صورة واضحة عن حجم الضرر الحاصل في الكتلة الحيوية للفطريات المدروسة.

ثانياً: التوصيات

من النتائج التي تم التوصل اليها في هذه الدراسة فأنا يمكن ان نوصي بما ياتي:

- (١) اعتماد الطرق الجزيئية في التشخيص التأكيدي للفطريات.
- (٢) دراسة تأثير جزيئات الفضة النانوية على مختلف انواع الفطريات الجلدية.

- (٣) دراسة التأثير التازري لجزيئات الفضة النانوية مع بعض المضادات الحيوية والاسس الجزيئية التي يعتمد عليها الارتباط.
- (٤) اجراء دراسات للتعرف على الية ارتباط جزيئات الفضة النانوية مع خلايا الاحياء المجهرية.
- (٥) اجراء العديد من الدراسات على عدد اكبر من الفطريات ودراسة تأثير جزيئات الفضة النانوية عليها من اجل الاستفادة منها في تصنيع الادوية لمعالجة الامراض الفطرية.
- (٦) اجراء دراسات اخرى لجزيئات الفضة النانوية داخل جسم الكائن الحي (invivo) وباستخدام حيوانات مختبرية.

أولاً: المصادر باللغة العربية

- ابراهيم ، مصطفى رعد جواد (٢٠١٣). التحري عن بعض الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة والمقامة للمضادات الحيوية في بكتيريا المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات سريرية مختلفة في مدينة الديوانية. رسالة ماجستير / كلية العلوم / جامعة القادسية.
- الأيوبي، دجانه (٢٠١٣). تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) (Polymerase Chain Reaction)، الملتقى الوطني للموهوبات-أبن النفيس، جامعة الاميرة نورة، السعودية.
- ألنعمي، هبة يونس. (٢٠٠٧) تأثير مستخلص الثوم وزيته الطيار على نمو فطر الشعراوية الذقنية والكيراتينية للفطر. رسالة ماجستير / كلية الطب / جامعة تكريت.
- جاسم، هنده تحسين، (٢٠١١). دراسة مقارنة بين تأثير بعض المستخلصات النباتية والنواتج الخارج خلوية لبعض الانواع البكتيرية على نمو بعض الفطريات الجلدية مختبرياً. رسالة ماجستير، كلية العلوم / جامعة تكريت.
- حبيب، سامي، أسامة فضل البار (٢٠٠٨). نجاح تجربة استخدام تقنية النانو في الحج للقضاء على الفايروسات.
- الحمداني، عدنان حمد عبيد، طلال حسين، فاطمة عبد الحسين التميمي، (٢٠١٠). عزل وتشخيص الفطريات الجلدية الممرضة للانسان وأختبار حساسيتها الدوائية لدى المرضى المراجعين للمستشفى التعليمي في محافظتي الديوانية والنجف الاشرف، مجلة جامعة كربلاء العلمية / المجلد الثامن / العدد الثاني-علمي.

- الخفاجي، صابرين عبد الامير، (٢٠٠١). مسح الاصابة بالاخماج الفطرية الجلدية وتقويم كفاءة مستخلصات الشاي الاخضر والدارسين في نمو الفطر *T.mentagrophytes* في محافظة بابل. ماجستير، كلية العلوم / جامعة بابل.
- الطائي، سعاد ريحان عواد (٢٠٠١). تأثير مستخلصات نباتية على نمو فطريات جلدية معزولة من مرضى مصابين بأمراض جلدية وعلى نمو بعض أنواع البكتريا المرضية. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة تكريت.
- عبد الكريم، نصير قحطان (٢٠٠٧). وبائية الامراض الجلدية للتلاميذ في منطقة تكريت، كلية الطب / جامعة تكريت.
- عبد علي، فاطمة الزهراء، حسين، (٢٠١٤). أنتشار الاصابات الفطرية الجلدية والتشخيص التقليدي والجزئي للفطرين *T.rubrum* و *M.gypseum* وظروف نموها وأمكانية السيطرة عليهما بأستخدام مستخلصات النباتات الطبية. رسالة ماجستير، كلية العلوم / جامعة بابل.
- القيسي، أعراف حارث عبد الوهاب (٢٠٠٦). دراسة الوبائية والتداخل البكتيري للفطريات الجلدية *Dermatophytes*، رسالة ماجستير، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد.
- كردي، عزام محمد، محسن قطرغي (٢٠٠٢). علم الاحياء المجهرية والطفيلية، مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية، سوريا.
- محمد، عبد العظيم والريس ، عبد الهادي (١٩٨١). فسلجة النبات ، الجزء الثاني (١). مؤسسة دار الكتب للطباعة.
- محي الدين، محمد عمر ورقبياء علي جيجان (٢٠١٣). أنتاج انزيم *polgalactyronase* من عفن *Aspergillus niger* المتحمل للحرارة والمنتجة للانزيم وتشخيص العزلة الاكثر انتاجاً. مجلة العلوم الزراعية العراقية، العدد ١ ، المجلد ٤٤ ، ص ٩٧-١٠٥.
- نخيلان، عبد العزيز مجيد (٢٠١١). الفطريات الطبية ، الطبعة الاولى / عمان- دار دجلة ٢٠١١.

ثانياً: المصادر باللغة الاجنبية

- Abid-Ali, Wesam Jasim (2010). Effect of some antifungals & medicinal herbal against dermatophytes isolated from *Tinea capitis* in AL-Diwaniya governorate.
- Ahmed M, Alsalihi MS, Siddiqui MK (2010). Silver nanoparticle applications & human health. *Clin.chim. Acta*.
- Ajello, L.(1974). Natural history of dermatophytes and related fungi. *Mycopathologia*. 53:93-110.
- Ajello, L.(1977). Milestones in the history of medical mycology. The dermatophytes. In: *Recent advances in medical Veterinary mycology.*, Uni.of Tokyo.press. Tokyo, Japan. Pp.3-11.
- Ales pana C, Milan K, Renata V, Robert P, Jana S, Vladimir K, Petr H, Radek Z, Libor K. Antifungal activity of silver nanoparticales against *Candida spp*. *Biomaterials*.(2009), 30, 6333-6340.
- Alexopules, C.G.; Mims, C.W. and Blackwell, M.(1996). *Introductory mycology*. 4th .ed John Wiley & Sons, New York.
- Arthur, R; Wilkineson, D.S; Ebling, F.J; champion, R.H. and Burton, J.L.(1986). *Textbook of Dermatology*. 4th ed. Vol.1, Blackwell Sci., Publ. Oxford.

- Bassaly, M., Miale A., and Prasad A.S.(1993). Studies on Pityriasis alba, Arch Dermatology.;82:871.
- Beneke, E & Rogers, A.(1980). Medical mycology manual. 4th ed. Burgess publishing printer, USA.
- Benson., (2002). Microbiological application Lab. Manual. 8th ed., the McGraw-Hill companies, Inc. USA. 22-105p.
- Bronson, D. M., D. R. Desai, S. Barsky, and S. M. Foley. (1983). An epidemic of infection with *Trichophyton tonsurans* revealed in a 20- year survey of fungal infections in Chicago. J Am Acad Dermatol. 8:322-30.
- Brooks, G. F. ; Butel, J. S. & Morse, S. A. (2001). Jawetz , Melnick and Adelbergs . Medical microbiology. 23th. ed.McGraw – Hill . U.S.A.
- Chin, J. (2000). Control of communicable diseases. 7th ed., Washington, pp:147-153.
- Chouela E.(1997). Head louse infestations: Epidemiologic survey and treatment evaluation in Argentinian school children. **International Journal of Dermatology.**; 36(11):821.
- Clayton, Y.M. and Midgley, G.(1989). Identification of agent of superficial mycoses in medical Mycology a practical approach. Evans S.E.G.V.&M.D. Richardson ed., I.R.L. press. Oxford Uni.Pp: 65-95.
- Collee, J.;Fraser, A.; Marmion, B. & Simon, A.(1996). Makie and McGartney practical medical Microbiology. 14th . Ed Churchill Livingstone. New York. 1978.
- David, J.H.(1986). Medical Microbiology, Boston and Toronto printed in the USA.
- De-hoog, G.S. and Guarro, J.(1995). Atlas of clinical fungi.
- Demang, C.; Contet-audonneau, N.; Kombila, M.; Miegerville, B. & Percebois, G. (1992). *Microsporum gypseum* complex in man and animals. J. Med. Vet. Mycol., 30: 301 – 303.
- Di Salvo, A. (2004). MBIM Microbiology and immunology on line, Internet.

- Edmonds, P.(1978). Microbiology, an environmental perspective Macmillan publishing Co.Inc.
- Ellis, D.H.(1994). Clinical mycology: The human opportunistic mycosis. Gillingham printers Pty. Ltd. Australia.
- Emmons, W. Chester; Binford, H.; Champman & UTZ, P. John(1974). Medical mycology, second edition, printed in the USA.
- Essien, J. P. and Akpan, E. J. (2004). Antifungal activity of ethanolic leaf extract of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn . Against ring worm pathogens. Global J. Pure Appl. Sci., 10: 37-41.
- Estrada J.S., and Morris R.I.(2000). Pediculosis in a school population. **Journal of school Nurse**; 16(3):35.
- Faggi, E., Pini, G. & Campisi, E.(2002). PCR fingerprinting for identification of common species of dermatophytes. J Clin Microbiol 40, 4804-4805.
- Faggi, E., Pini, G., Campisi, E., Bertellini, C., Difonzo, E & Mancianti, F.(2001). Applications of PCR to distinguish common species of dermatophytes. J Clin Microbiol 39, 3382-3385.
- Fatemeh Noorbakhsh, sassan R, Ahmed R.S.,(2011)Silver nanoparticules alone and with combination of Antifungal drug on dermatophytes pathogen *Trichophyton rubrum*. International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics.
- Fathi H.I. and AL-Samarai A.G.M.(2000). Tinea capitis in Iraq: Laboratory result. East. Medit. Health J.
- Fathi H.I. and AL-Samarai A.G.M.(2002). Tinea capitis in Iraq: Laboratory results. East. Medit. Health J.;6(1):138-48.
- Gordon, M. A. (1994). The occurrence of dermatophytes *Microsporum gypseum* as saprophyte in soil. J. Invest., Dermatol., 20: 201 – 206.
- Graser, Y., De Hoog, S. & Summerbell, R. C.(2006). Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. Med Mycol 44, 199-209.

- Habif, T.P. (1996). Superficial fungal infections. In: Habif P, ed. Clinical dermatology: a color guide to diagnosis and therapy. 3rd ed. St. Louis: Mosby. 362-408.
- Hay, R.J. and Moore, M. (1998). Mycology. In: Textbook of Dermatology by Champion, R.H.; Burton, J.L.; Burns, D.A. and Breathnaen, S.M., Vol. 2, Blackwell Science.
- Hmawndi, Nahla Jawhar Kareem. (2006). Antifungal activities of extract of some plants grown naturally in Kurdistan. This is of agriculture science. University of Sulaiman.
- Hong H.K. (1995). Infestation rate of head lice in primary children in Incheon, Korea. **Korean journal of parasitology.**; 33(3): 244.
- Howard, B.J.; Klass, J.; Wessifeld, A.; Rubin, J. and Titon R.C. (1987). Clinical and pathogenic Microbiology. The C.V Mosby company St. Louis. Washington, D.C. Toronto.
- Hussain, N. J. (2008). Combined effect of some antifungal agents and extracts of eucalyptus and cinnamon plants against some of dermatophytes. Thesis \ College of Medicine – Baghdad University.
- Inanir I. (2002). Prevalence of skin conditions in primary school children in Turkey: Differences based on SOCIO-economic factors. *Pediatric Dermatology.* 19(4):309.
- Jinantana, J. and Sariah.M. (1997). Antagonistic effect of Malaysian isolates of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* or *Sclerotium rolfsii*. *Pertanika, J. Topical Agriculture Science.* 20:38-41 P.
- Joseph M. Torres-Rodriguez and Olga Lopez-Jodra (2000). Epidemiology of nail infection due to keratinophilic fungi. *Revista Ibero americana de Micologia Apdo.* 699, E-48080 Bilbao (Spain).
- Joseph, M.D. (2004). Natural history of tinea pedis. *Am. Mfd. Sci.* 327:77-78.
- Jousson, O., Lechenne, B., Bontems, O., Capoccia, S., Mignon, B., Barblan, J., Quadroni, M. & Monod, M. (2004). Multiplication of an ancestral gene encoding

secreted fungalysin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* & *Microsporum*. *Microbiology* 150,301-310.

- Kamiabi F., and Nakhaei F.H.(2005). Prevalence of pediculosis capitis and determination of risk factors in primary school children in Kerman. **Eastern Mediterranean Health Journal**. 11(5):988.
- Kao.G.F.(2002). Tinea capitis. American. Society of dermatopathol.
- Kavanagh K (2005). Fungi biology and application, J Wiley.
- Keuk-Jun K, Woo S.S, Bo Kyoung S, Seok-Ki M, Jong G.L. Antifungal activity and mode of action of silver nanoparticules on *Candida albicans*. *Biometals*. (2009), 22: 235-242.
- Kim K.J, Sung WS, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee DG. Antifungal effect of silver nanoparticules on dermatophytes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**.(2008), 18,1482-4.
- Koneman, E.W.; Roberts, G.D. and Wright, S.H.(1978). Practical Laboratory mycology. The Williams and Wilkins company Baltimore, **USA Journal of Medicinal Plants Research**.
- Kvitek L, Panacek A, Soukupova J, Kolar M, Vecerova R, Pucek R. (2008), effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticules (NPS). *Journal of physical chemistry: parts C*, 112:5825-34.
- Kwon-Chung, K.J.K& Bennett, J.E.(1992) *Medical Mycology*. Williams and Wilkins. London.
- Leung, A. Y. (1980). *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*. John Wiley & Sons. New York .
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. & Pedersen, J.(2000). Application of PCR to the identification of dermatophytes fungi. *J Med Microbiol* 49, 493-497.
- Liu, D.; pearce, L., Lilley , G.; Coloe, S.; Baird, B. & Pedersen, (2002) Longman Singapor publishers Ltd, pp. 695.

- Manthiriyappan Suresh Kumar, Dessy Yovita Siswanto & Ching-Kang Lee, J.Mater.Chem. (2010). Magnetic antimicrobial nanocomposite based on bacterial cellulose & silver nanoparticle.
- Martin, E.S. (2002). Tinea pedis. **Medicine journal**, 3:1-15.
- Matsumoto, I.(1996). Fungal diseases in dermatology principles and practice clinical mycology. John Wiley and Sons. Ltd NewYork. 103-129.
- Matsumoto, T. & Ajello, L. (1987). Current taxonomic concepts pertaining to the dermatophytes and related fungi. **International journal of dermatology** 26:491-499.
- Mc Ginnis, M.R.(1980). Laboratory handbook of medical mycology. Academic press, USA. P:661.
- Midley, G.;Clayton, Y.M.&Hay, R.J.(1997) Medical Mycology. Mosby. Solfe Publishing London,115Pp.
- Miorin, P.L.; Junior, N.C.; Custodia, A.R.; Brezt, W.A. and Marcucci, M.C.(2002). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca*.
- Monod M.; Capoccia S.; Lechenne B.; Zaugg C.; Holdom M. and Jonsson C.,(2002). Secreted proteases from pathogenic fungi-Int.J.Med.Microbiol.; 292(5-6): 405-419.
- Monod, M.; Capoccia, S.; Lechemne, B.; Zaugg, C.; Holdom, M and Jousson, C.(2002). Secreted proteases from pathogenic fungi-Int. J. Med. Microbiol.; 292(5-6): 405-419.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Rami-rez JT, Yacaman MJ (2005). The bacterial effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 16:2346-2353.
- Muhsin, T.M. and Salih, T.H.(2001). Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in southern Iraq. Mycopath.;150(2):49-52.

- Nicolas, A.S. & Baden, H.P. (1991). Pathophysiology of Dermatologic disease. 2nd ed., MC Graw-Hill.
- Ninet, B., Jan, I., Bontems, O., Lechenne, B., Jousson, O., Panizzon, R., Lew, D. & Monod, M.(2003). Identifications of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. J Clin Microbiol 41,826-830.
- Odom, R.B.; James, W.D. and Berger, T.G.(2000). Andrews diseases of the skin. 9th ed., W.B.S. Saunders company, Pp. 367-370.
- Onsberg, P. (1979). Dermatophytes species, microscopic and cultured examination. Mycopath., 67 (3): 153 – 155.
- Pal S, Tak YK, Song JM, Does (2007) 27(6):1712-20. The antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticles. A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol.
- Pinto, M.M.; Gencale, E.; Rossi, M.H.; Felicio, J.D.; Medina, C.S.; Fernandes, M.J.B. and, Simoni, I.C.(2001). Study of some plants Oils effect on *Aspergillus flavus* L.growth on Corn. **Brazilian Journal of Microbiology**. 32,127Pp.
- Qin, Yimin, (2005). Silver containing alginate fibers and dressings. **International wound. Journal** 2(2): 172-6.
- Rahim, G.F. (1966). A survey of fungi causing tinea capitis in Iraq. Brit.
- Richardson, M & Elewski, B. (2000). Superficial fungal infections Health Press. Oxford UK.
- Richardson, M.D & Warnock, D.W (2003). Fungal infection Diagnosis and Management. 3rd Edition. Blackwell Publishing.
- Rinaldi, M.G. (2000). Dermatophytoses :epidemiological and microbiological update. J.Am. Acad. Dermatol., 43:120-124.
- Rippon, J.W.(1988). Medical mycology. In: The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes, W.B. Saunders, Philadelphia, 3rd ed., P.196.
- Roberts, S.O.B. and Mackenzie, D.W.R.(1986). Mycology. In: Textbook of dermatology by Rook, A.J.; Wilkinsos, D.S.; Ebling, F.J.G. champion, R.H. and Burton, J.L.(eds). Vol.2, 4th ed., Blackwell Scien. Public. London. Pp 885-896.

- Ross, F. C. (1983). Introductory Microbiology. Bell and Howell Co.
- Ross, F.C. (1983). Introductory Microbiology. Bell & Howell company. Columbus Ohio, USA.
- Sambrook, J.; Fritsh, E.F., & Maniatis, (1989). Molecular cloning, Laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Samsungs Silver Nano washer Ads reportedly exaggerated, (2005).
- Seeliger, H.P.R. (1985). The discovery of *Achrion Schoenleinii* facts and stories. *Mykose*, 28:161-182.
- Springer (2006). Atlas of fungal infection.
- Sutton, D.A.; Fathergill, A.W. and Rinaldi, M.G.(1998). Guide to clinicalling significant fungi: *Am. Fam. Physician.*,(65): 2095-2102.
- Thrusfield, M. (1986). Veterinary epidemiology, Butterworth & Co.Ltd, London.
Journal of Medicinal plants Research. 7(3):343-345p.
- Tsuboi, R.; Ko, IK., Takamori, K. and Ogawa, H.(1989). Isolation of keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic PH. *Inf and Imm.*;57(11): 3479-3483.
- Tsuboi, R.; KO,Ik.; Takamori, K. and Ogawa, H.(1989). Isolation of keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic PH. *Inf. and Imm*; 57(11):3479-3483.
- Wegner Z., (1994). Racewicz M., and Stanczak J. occurrence of pediculosis capatis in a population of childrens from Gdnask Sopot, Gdynia, and Vicinities. *Applied parasitology.* 35(3):220.
- Weitzman I. and Summerbell R.C.(1995). The dermatophytes *Clin. Microbial. Rev.* 8: 240-259.
- Wessels, M.R.(1996). Harrison's principles Internal Medicine. 4th ed, Donnelley & Sons. Inc. Pp:86-91.
- Williams, H.C.(1993). The epidemiology of Onychomycosis in Britain. *Br.J. Permatol.*,129: 101-109.

ملحق (١) استمارة استبيان للمرضى

التاريخ:

رقم النموذج:

الاسم:

الجنس:

منطقة الإصابة:

منطقة السكن:

الأعراض السريرية:

حكة:

تساقط شعر:

نتيجة الفحص المجهرى المباشر:

نتيجة الزرع المختبري:

ملحق (٢) قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA بجهاز Nanodrop.

No.	Concentration (ng/l μ)	Purity 260/280
<i>T1</i>	6.9	2.17
<i>T2</i>	9.9	1.47
<i>T3</i>	6.8	2.18
<i>T4</i>	8.7	2.10
<i>T5</i>	34.5	1.51
<i>T6</i>	6.6	1.78
<i>T7</i>	5.7	2.12
<i>T8</i>	9.7	1.43
<i>T9</i>	8.1	2.02
<i>T10</i>	11.8	1.85
<i>M1</i>	15.2	1.54
<i>M2</i>	5.7	2.10
<i>M3</i>	6.9	1.88
<i>M4</i>	12.8	1.47
<i>M5</i>	9.7	1.76
<i>M6</i>	9.2	1.75
<i>M7</i>	7.3	1.87
<i>M8</i>	10.2	2.08
<i>M9</i>	10.6	1.78
<i>M10</i>	8.7	1.81

حيث أن:

M: *Microsporium spp.* و *T*: *Trichophyton spp.*

Summary:

This study was conducted to investigate the fungi that causes skin diseases of human. One hundred samples were collected from people who suspected to infect with fungal skin disease from patients coming to Al-Diwaniya teaching hospital from beginning of October 2013 till the end of May 2014. These samples from (skin ,hair and nail). All samples that taken from patient were subjected to direct examinations by using wet touch of (KOH 10%) solution. At the same time the samples were grew on sabroud media to determine the type of fungal skin diseases of human.

The direct examination shows positive results of 72 samples which represent 72% while for laboratory growth results, its shows 65 samples with positive results 65%.

There are three types of *Trichophyton* fungus had been isolated which are *T.rubrum* 28 isolates, *T.mentagrophytes* 16 isolates and *T.schoenleinii* 4 isolates and there was one type of genus *Microsporum* which is *M.canis* 24 isolates.

The results show that Tinea corporis infection is the common and its more among females than males where it is 26.39% and 13.89% respectively, then Tinea capitis which is 19.4% in males which is higher than in females which represents 13.89% while Tinea unguium was in females more than males which was in females 16.67% while in males 9.72%.

The percentage of fungal skin infection was differ according to the location where the number of infections in the rural area for all types of Tinea were more than the number of infection in the urban area where the number of infected people with Tinea corporis was 18 which represent 25% while in the urban the number was 11 which represent 18.28% while the number of infected people with Tinea capitis in the rural area were 16 which represent 22.22% and the infected in the urban were 8 which represent 11.11%. While Tinea unguium the number of infected people in the rural 10 which represent 13.89% and in the urban 9 people which represent 12.5%. The diagnosis of isolated fungi depended on phenotype of fungal growth and microscopic examination, in addition to special tests for

diagnosing skin fungal infections. Also the PCR was used for diagnosis and the work had been completed by using genotypic tree for fine diagnosis and detection the fungal species. The result were send to the genes bank site to be sure about the fungus type through comparison with the registered fungi in this site and by using MEGA6 program for genetic tree analysis of type (unweighted pair group method with arithmetic mean).

The results of analysis shows clear converge of local *Trichophyton* spp. Isolates with *Trichophyton rubrum* in comparison with other types that appears in the genetic tree analysis while *Microsporium* diagnosed through genetic tree analysis of type (up GMA tree) and the result of analysis shows clear converge of local *Microsporium* spp. Isolates with *Microsporium canis* compared with other types of genetic tree analysis.

The effect of silver nanoparticles that is used against growth of *T.rubrum*, *T.mentagrophytes* and *M.canis*. The results show that all the concentrations used were effective in stopping of growth of *T.mentagrophytes* when deal with the standard measure when dealt with concentration of 4 mg/l the more effective in stopping of radiating growth of the fungus. Regarding the fungus *T.rubrum* the concentrations of 4 mg/l more effective in stopping of growth while there was no difference for 1mg/liter concentration. Regarding the fungus *M.canis*, the mentioned concentrations had large effect on fungal colonization growth compared with the standard and this fungus more than other fungi affected by nano silver ions.

**Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Al-Qadisiyah
College of Science**



**Molecular characterization of some dermatophytic fungi
in Al-Diwania province and the effect of silver nano
particles on their growth**

A Thesis

**Submitted to the Council of The College of Science University of Al-
Qadisiyah as partial Fulfillment of The requirements for the Degree of
Master of Science in Biology / Microbiology**

By

Noor Jassim Mohammed

Supervision by

Asst.Prof.Dr.Neeran Obaid Jassim

2015 A.D.

1437 A.H.