مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 17 العدد 1 سنة 2012
ISSN-1997-2490 بهيجة عبيس حمود الخالدي

دراسة بعض الجوانب البيولوجية للفطريات المعزولة من التهابات قرنية العين لبعض المرضى المراجعين إلى مستشفى الديوانية التعليمي

بهيجة عبيس حمود الخالدي
كلية الطب /جامعة القادسية

الخلاصة :-

هدفت الدراسة الحالية الى عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لالتهاب قرنيات العيون لدى بعض المرضى المراجعين الى مستشفى الديوانية التعليمي ودراسة بعض الجوانب البيولوجية لها توصلت الدراسة الى إن نسبة عزل الفطريات من إصابات قرنية العين هي (40 %)و بلغ عدد العزلات الفطرية (49)عزلة تضمن (7) اجناس فطرية بالاضافة الى نوعين من خميرة .*Candida* sp احتل الفطر *Aspergillus* sp نسبة الصدارة (44.89 %) من بين الفطريات المعزولة في حين كانت نسبة عزل الفطر *Paecilomyces variotii* (2.04 %) فقط ، وأوضحت نتائج الكشف عن قابلية الفطريات على انتاج الافلاتوكسينات باستعمال وسط جوز الهند والامونيا إن نسبة إنتاج الافلاتوكسينات من قبل الفطريات المعزولة في هذه الدراسة هي (30.61 %) وان قدرة الإنتاج هذه كانت من قبل عدد من عزلات الفطر *Aspergills* sp فقط وقد سجل النوع *A.flavus* أعلى نسبة للإنتاج (88.8 %) و عند الكشف عن قابلية عزلات الفطريات على افراز انزيميProtease و Lipase وجد ان لجميع عزلات الفطريات القابلية على افراز هذين الانزيمين مع وجود تباين حسب الأجناس الفطرية وأنواعها كما ان لبعض الفطريات المختبرة القابلية على حل الدم مع الاختلاف في قطر منطقة التحلل والزمن اللازم للتحلل حسب جنس الفطر ونوعه وكانت النسبة المئوية لقابلية الفطريات على حل الدم هي (73.4 %) وكان اسرع انواع الفطريات حلا للدم هو الفطر *A.fumigatus* الذي حل الدم خلال ثلاثة ايام وبمنطقة تحلل 29 ملم في حين لم تبدي الخمائر أي قابلية لحل الدم.

المقدمة :-

تعد العين مرآة الإنسان بها يرى ويتمتع بالحياة و هي الحاسة الأولى من الحواس الخمسة لأهميتها للحياة منذ الولادة فالعناية بصحة العين ضروري جداً، و شيء مهم كباقي أجزاء الجسم. فهي كلها أجزاء تكمل بعضها بعضاً وتتأثر العين بأي شيء يؤثر على أي جزء من أجزاء الجسم الداخلية علاوةً على أنها معرضة إلى مؤثرات خارجية مثل الغبار ، الحشرات ، الحرارة العالية والبرودة وبالتالي تؤدي إلى حدوث أمراض كثيرة منها الأمراض الفطريةوغيرها (1).ونتيجة لكون العين تعد الجزء الاكثر تعرضا للهواء ومايحمله من ذرات غبار وإحياء مجهريه دقيقة كالفطريات والبكتريا فأنها تتعرض للإصابة بهذه الكائنات الدقيقة وخاصة عند حدوث أي خدش اوجرح في الأنسجة المبطنة للعين اذ سرعان ما تستوطن هذه الكائنات في الأنسجة المحطمة مسببة تلفا للعضو المصاب بصورة عامة و تعد الفطريات التي تم عزلها من العيون المصابة للإنسان والحيوان من الفطريات المهمة والتي تسبب العديد من أمراض العيون منها : التهاب الملتحمة Conjunctivitis ، التهاب القرنية (Keratitis) ، التهاب الجفن (Blepharitis)، التهاب باطن العين (Endophthalmitis)، التهاب البياض (Scleritis) ، التهاب الطبقة الوعائية البصلية (Uveitis) والتهاب محجر العين والعصب البصري وقد تؤدي الى فقدان العين كليا (26).

تعد اصابات الفطريات للعيون من المشاكل الصحية التي تزايدت بشكل كبير في الفترة الأخيرة حيث تسبب الفطريات نوعاً خطيراً من التهابات القرنية(Keratomycosis) قد يؤدي إلى فقدان البصر كليا، بالإضافة إلى التزايد المستمر في أمراض الفطريات التي تصيب العين نتيجة للاستخدام غير المحدود للكورتيزونات الموضعية كقطرة العين أو الكورتيزونات العامة حيث وجد ان الاستخدام الطويل الامد لمركبات الكورتزون والمضادات الحياتية تلعب دوراً في زيادة اصابة القرنية بالفطريات فضلاً عن ذلك فان استخدام العدسات اللاصقة التجميلية والتخدير الموضعي للعين في اثناء العمليات الجراحية وترقيع القرنية كلها تلعب دوراً مهماً في زيادة الاصابة وتعد عوامل مهيئة للاصابة وهناك عدد كبير من أجناس الفطريات المشتركة في إحداث هذه الالتهابات كالخمائر والفطريات الخيطية وغيرها(31). تعد إصابات قرنية العين المتسببة عن الفطريات واحدة من المشاكل المهمة والتي نالت اهتمام الجهات الصحية بسبب زيادة حدوثها من جهة وعدم كفاءة المضادات الفطرية المستخدمة في علاجها من جهة أخرى (30) وبذلك فان إصابات الفطريات لقرنية العين تستمر بالحدوث لعدم كفاءة المضادات الفطرية في الحد من حدوثها وقد تتطور هذه الإصابة إلى إن تؤدي إلى حدوث ثقب في

قرنية العين ويتطلب الأمر حينها استبدال قرنية العين بأخرى اصطناعية او فقدان الرؤيا وفي حالات كثيرة يتطلب الامر استئصال العين بصورة كاملة (26) وبالنظر لاهمية هذا الموضوع وكثرة حدوث التهاب القرنية عند الفئات المختلفة من الاعمار وعدم الاهتمام بالمسببات الفطرية التي من الممكن ان تشترك في احداث هذه الالتهاب ارتاينا القيام بهذه الدراسة التي تهدف الى :

1 –عزل وتشخيص الفطريات والخمائر المرافقة لالتهاب قرنية العين .

2 –دراسة بعض الخصائص البايولوجية للفطريات والخمائر المعزولة من حالات التهابات قرنية العين كانتاج الانزيمات والسموم الفطرية .

طرائق العمل :-

1 – جمع العينات

جمعت(100) عينة سريرية متمثلة بمسحات من ملتحمة العين من مرضى مراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي /قسم العيون وللفترة من تموز 2010 ولغاية كانون الثاني 2011 اذ كان هؤلاء المرضى يعانون من التهاب قرنية العين بعد التشخيص من قبل الطبيب المختص ،اتبعت الطريقة المذكورة من قبل (11) اذ نقلت المسحات الماخوذة من عيون المرضى مباشرة لتنميتها على وسط وسط البطاطا والدكستروز Patato –Dextrose –Agar (PDA).المضاف اليه 250 ملغم /لتر من مضاد التتراسايكلين لمنع نمو البكتريا والذي تم تحضيره في مختبر المستشفى ،بعدها نقلت الاطباق الى مختبرات الكلية لغرض تنميتها في الحاضنة بدرجة حرارة (25 ± 2) مْ ولمدة سبعة ايام،بعدها شخصت الفطريات النامية وبالاعتماد على الصفات التشخيصية المظهرية التي ذكرها كل (5) وأعيدت عملية التنقية عدة مرات بنقل قرص من كل مستعمرة وزرعه في طبق (PDA) جديد.ثم أكد التشخيص بدراسة الصفات المجهرية باستخدام صبغة اللاكتوفينول الزرقاء(Lactophenol blue). وتم حساب النسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة بالاعتماد على المعادلة التالية (18).

$$\text{النسبة المئوية للتردد} = \frac{\text{عدد عزلات النوع الواحد}}{\text{العدد الكلي لجميع العزلات}} \times 100\ \%$$

2 -الكشف عن قابلية بعض الفطريات على إفراز الافلاتوكسين .

لغرض تنفيذ هذه التجربة استعمل وسط اكار مستخلص جوز الهندCoconut Extract Agar (CEA) ووفقا للطريقة التي ذكرها (24) حيث صب الوسط الزرعي بعد تعقيمه في اطباق بتري ثم اخذت اقراص بقطر0.5 سم من مستعمرات الفطريات النامية على وسط PDA وبمعدل ثلاث اطباق لكل عزلة بعدها حضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 25 ±2 مْ لمدة اسبوع .

أجري الكشف عن قدرة العزلات النامية على انتاج الافلاتوكسينات من خلال استخدام اوراق ترشيح مبللة بمحلول الامونيا بتركيز 20 % اذ وضعت ورقة واحدة في غطاء كل طبق حاوي على الفطر النامي على وسط CEA ثم حضنت الاطباق بصورة مقلوبة ولمدة (7- 14) يوم وبدرجة حرارة 25 ±2 مْ وتم مراقبة الاطباق كل يوم لملاحظة تغير لون قواعدها فاذا تغير لون قاعدة المستعمرة الى الاحمر او الاصفر او البرتقالي وبدرجات لونية مختلفة فان ذلك دليل على ان الفطر له القابلية على انتاج سموم الافلاتوكسين .

3.الكشف عن قابلية الفطريات المعزولة على انتاج انزيمي protease ، Lipase .

A. أنزيم Protease. (Gelatinase).

تم الكشف عن قابلية العزلات الفطرية على إفراز أنزيم Protease (Gelatinase) باستخدام طريقة الأطباق Plate (assay) وكالاتي:

لقحت الأطباق الحاوية على الوسط الزرعي Nutrient Gelatin Agar بالفطريات المراد اختبارها من خلال نقل جزء من المستعمرات النامية على وسط P.D.A بعمراسبوع واحد على شكل قرص قطره 5 ملم باستخدام ثاقب فليني مع ترك طبق من غير تلقيح للسيطرة وبواقع مكررين لكل حالة،حضنت الأطباق بالحاضنة عند درجة حرارة 37 مْ لمدة ثلاثة أيام ،أخرجت الأطباق من الحاضنة وأضيف لها (5-2)قطرة من كاشف محلول كبريتات الامونيوم على سطح الوسط الزرعي الحاوي على المستعمرات وترك لمدة 30 دقيقة،سكب الفائض من الكاشف وسجلت النتائج من خلال ملاحظة تكون مناطق شفافة (Clear Zone)حول المستعمرات النامية المحللة للجيلاتين (14) وحسبت قيمة التحلل والمتمثلة بنسبة قطر المستعمرة إلى قطر المستعمرة +منطقة التحلل (22) . فإذا كانت القيمة=1 فهذا يعني أن العزلات غير قادرة على إفراز هذا الأنزيم وإذا كانت اقل من 1 واكبر من 0.69 يعني أن قابلية العزلات على إفراز هذا الأنزيم منخفضة وإذا كانت القيمة اقل من 0.69 واكبر من 0.30 يعني إن قابلية العزلات على إفراز هذا الأنزيم جيدة وإذا كانت القيمة اقل من 0.30 فهذا يعني إن قابلية العزلات على إفراز الأنزيم عالية جدا.

B. أنزيم Lipase

لقحت الإطباق الحاوية على وسط الاختبار(البيتون المدعم بالتوين 20) بالعزلات المراد اختبارها من خلال نقل جزء من المستعمرات على شكل قرص بقطر 5 ملم من عزلات الفطريات باستخدام الثاقب الفليني مع ترك طبق دون تلقيح للسيطرة وبواقع مكررين لكل حالة،حضنت الأطباق بعد ذلك بالحاضنة في درجة حرارة 37مْ ولمدة ثلاثة أيام، سجلت النتائج من خلال قياس أقطار مناطق الترسيب (Precipitation Zone)المتكونة حول المستعمرة (14).وتم حساب قيمة منطقة الترسيب أيضا بالاعتماد على طريقة(22).

4-الكشف عن قابلية الفطريات على حل الدم

اختبرت قابلية 12 نوعا من الفطريات المعزولة على حل الدم مختبريا وقد استعمل في هذا الاختبار وسط اكار الدم الأساس المضاف اليه 5 % من دم الانسان بعد تعقيمه بالموصدة ،صب الوسط الزرعي باطباق بتري وبعد تصلب الوسط نقل جزء من المستعمرة الفطرية الى الطبق بأستعمال ثاقب فليني ،حضنت بعدها الإطباق بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 2 -14 يوم ودونت النتائج على اساس حساب قطر منطقة التحلل حول المستعمرة والزمن اللازم لحصول التحلل (9).

النتائج والمناقشة -:

أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن نسبة عزل الفطريات من إصابات قرنية العين هي (40 %) ،أذ أن 40 مسحة من المسحات الكلية التي جمعت من المرضى أعطت نتيجة موجبة للنمو الفطري على وسط PDA. في حين لم تعطي المسحات الأخرى أي نمو فطري على هذا الوسط وقد يعود السبب في ذلك إلى إن المسبب هو بكتيري أو فايروسي (16).

بلغ عدد العزلات الفطرية (49)عزلة تضمن (7) اجناس فطرية بالاضافة الى نوعين من خميرة *Candida* sp ،احتل الفطر *Aspergillus* sp نسبة الصدارة (44.89 %) من بين الفطريات المعزولة وبثلاثة انواع هي *A.flavus* بنسبة تردد (18.36) *A. niger*، (14.28)و *A.fumigatus* (12.24).يليه كل من الفطرين *Fusarium soloni* و *Alternaria alternata* بنسبة (10.20 %) للفطرين على التوالي ،اما الفطريات *Penicillium chrysogenum* و *Exserohilum rostratum* و*Chaetomium globosum* و*Paecilomyces variotii* فكانت نسبها (8.16 %) ،(6.12 %)، (4.08 %) و(2.04 %) وبالنسبة للخمائر فتم عزل نوعين من خميرة *Candida* sp وهما *C.albicans* و *C.lypolytica* وبنسبة تردد (8.16 %) و(6.12 %) على التوالي .جدول (1).

جدول (1) أعداد العزلات والنسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة من اصابات قرنية العين .

ت	الأجناس الفطرية المعزولة	عدد العزلات	النسبة المئوية للتردد
1	*Aspergillus flavus*	9	18.36
2	*Aspergillus niger*	7	14.28
3	*Aspergillus fumigatus*	6	12.24
4	*Fusarium soloni*	5	10.20
5	*Alternaria alternata*	5	10.20
6	*Penicillium chrysogenum*	4	8.16
7	*Exserohilum rostratum*	3	6.12
8	*Chaetomium globosum*	2	4.08
9	*Paecilomyces variotii*	1	2.04
10	*Candida albicans*	4	8.16
11	*Candida lipolytica*	3	6.12
12	Total	49	% 99.96

جاءت نتائج دراستنا هذه مقاربة لنتائج دراسة (1) حول الفطريات المسببة لالتهابات العيون ،حيث عزلت انواع مختلفة لفطر *Aspergillus* spp منها:- *Asp. fumigatus* ، *Asp. flavus* و *Asp. niger* وكذلك الفطرين *Alternaria alternata* و *Exserohilum rostratum* .

قد يعود السبب في ذلك الى ان هذه الفطريات هي من الفطريات المتواجدة في الهواء وفي ذرات الغبار فقد يؤدي تعرض العين بصورة طبيعية الى الهواء اوعند لمس العين باليد الى دخول الفطريات الى العين واصابة اجزاؤها المختلفة بهذه الفطريات وخاصة عند المرضى ضعيفي المناعة ممن كانوا يستخدمون مركبات الكورتزون والمضادات الحياتية الاخرى لفترات طويلة او من هم يعانون من امراض اخرى كالسكري والسل الرئوي وغيرها . (8). اوقد يعود السبب الى تعرض العين للكلم وتخريش الغشاء المخاطي المبطن للعين باداة كانت ملوثة بهذه الفطريات مما يؤدي الى اصابة العين ومما يساعد الفطريات على الاصابة هي افرازها للسموم التي تساهم في زيادة الامراضية وتحطيم اجزاء العين . (29).

اما بالنسبة للفطريات *Penicillium chrysogenum* و*Chaetomium globosum* و*Paecilomyces variotii* فلاتوجد دراسة سابقة تم فيها عزل هذه الفطريات من اصابات العيون على حد علمنا ،وتعد هذه الفطريات من الفطريات السامة التي لها القابلية على إنتاج مركبات ايضية ثانوية لها تأثيرات على الأنظمة الحيوية في الحيوانات المختبرية كالأرانب والجرذ الأبيض اوقد يعود سبب تواجدها في التهاب قرنية العيون في هذه الدراسة الى تعرض العين الى خدش اواصابة حادة اوممن هم يرتدون العدسات الملوثة بهذه الفطريات(31) .

أما الخمائر التي عزلت من التهاب قرنيات العيون فهي *Candida albicans* و*C.lipolytica* وتتناقض نتائج دراستنا هنا مع ما توصل إليه (15) آ ذ أشار إلى إن *C.tropicals* و *Cryptococcus neoformans* هما الخميرتان السائدتان في تقرح قرنية العين .وقد يعود سبب شيوع خميرة *Candida* sp في التهاب قرنية العيون إلى الضعف المناعي للأشخاص المصابين نتيجة لتناولهم الأدوية الكابحة للمناعة بسبب الإصابة بإمراض أخرى لم تدرس في هذا البحث إذ تستغل هذه الخمائر الضعف المناعي لدى الأشخاص (25) ،أو بسبب استخدام العدسات الملوثة بهذه الخمائر حيث عزلت من أشخاص كان بعضهم يرتدي العدسات اللاصقة التجميلية و كذلك عدم تنظيف العدسات اللاصقة قبل استعمالها أو بعد نزعها وهذا ما بينه أيضا (7) كما تم عزلها من بعض الأشخاص الذين تم اجراء عملية سحب الماء الابيض وزرع عدسة لهم وكذلك من ربات البيوت العاملات بشكل مستمر بحديقة المنزل حيث يمسحن عيونهن بايديهن الملوثة بتراب الحديقة. وجاء هذا مقارب لما توصل اليه (21)حيث عزل هذه الخميرة من عدة حالات لالتهاب قرنية العين من اشخاص تم اجراء عدة عمليات جراحية لهم منها عمليات زرع عدسات جديدة للعين او عمليات ترقيع القرنية وباعتبار هذه الخميرة من الخمائر الانتهازية التي تستغل ضعف المناعة في منطقة العملية وكذلك بسبب تلوث بعض المواد والأدوات المستخدمة في العملية أحيانا بهذه الخميرة مما أدى إلى حدوث مثل هذه الإصابة.

2 – الكشف عن قابلية الفطريات على افراز الافلاتوكسينات .

أوضحت نتائج الفحص الكيماوي باستعمال وسط جوز الهند والامونيا إن نسبة إنتاج الافلاتوكسينات من قبل الفطريات المعزولة في هذه الدراسة هي (30.61 %) وان قدرة الإنتاج هذه كانت من قبل عدد من عزلات الفطر *Aspergills* sp فقط أذ تغيرت قواعد المستعمرات الفطرية إلى اللون الأحمر والبرتقالي وذلك بمجرد ملامسة سطح المستعمرة الفطرية لبخار الامونيا المستخدم ككاشف عن سموم الافلاتوكسين وقد سجل النوع *Asp.flavus* أعلى نسبة للإنتاج (88.8 %) يليه النوع *Asp. fumigatus* بنسبة (66.6 %) ومن ثم النوع *Asp. niger* بنسبة (42.8 %) في حين لم تستجب بقية الفطريات المعزولة لهذا الاختبار.جدول (2).

لاتتفق نتائج دراستنا هذه مع ماتوصل اليه (3) الذي اشار الى ان جميع الانواع الفطرية المختبرة في دراسته ومنها الانواع المذكورة في دراستنا لها القابلية على انتاج الافلاتوكسينات بأستثناء *Penicillum* وكذلك مع ماتوصلت اليه (4) التي اشارت الى ان اغلب الانواع الفطرية المختبرة اعطت كشفا موجبا لانتاج الافلاتوكسينات بطريقة اختبار الامونيا باستثناء الفطرين *Mucor* sp و *Fusarium* sp وقد يعود سبب الاختلاف في النتائج الى اختلاف العزلات المستخدمة في الاختبار . تبين من خلال نتائج الدراسة ان هناك تفاوت في درجة اللون الحمر في قواعد مستعمرات العزلات المنتجة للافلاتوكسين وان هذا التفاوت في اللون ربما يعود الى اختلاف قدرة العزلات على انتاج الافلاتوكسينات وهذا ماذكره (24) حيث ذكرا ان درجة اللون الاحمر تعزى الى الكميات المنتجة من الافلاتوكسينات فالعزلة ذات اللون الاحمر الغامق تدل على قدرتها على انتاج كميات كبيرة من الافلاتوكسينات. تنتج الافلاتوكسينات من قبل انواع الجنس *Aspergillus* sp واهما النوع *Asp.flavus* وبعض انواع الجنس *Pnicillum* فضلا عن الفطر *Rhizopus* sp وتعد الافلاتوكسينات من اخطر السموم الفطرية المعروفة بتأثيراتها المسرطنة عند تعرض الكائن الحي لها ،فضلا عن كونها تسبب حالات التنخر Necrosis للانسجة الحية عند افرازها فيها من قبل الفطريات ممايؤدي الى موت النسيج اوجعله بؤرة لاستيطان مسببات مرضية اخرى كالبكتيريا والطفيليات (12). تعد العين من الاعضاء الحساسة جدا في الجسم من حيث التركيب النسيجي وبهذا فأن تواجد الفطريات المنتجة للافلاتوكسينات فيها يعد من المشاكل الصحية الخطرة التي تهدد هذا العضو لماتسببه هذه السموم من نخر وتخديش للانسجة الحية مما يؤدي الى فقدان سلامة العين وقد يتطلب الامر التداخل الجراحي والذي لم يعد مجديا في مثل هذه الحالات خصوصا وان المضادات الفطرية المستخدمة قد تقضي على الفطر المنتج للسموم غير انها غير قادرة على القضاء على مركبات السموم الفطرية كونها مركبات ثابتة تجاه المضادات والمطهرات وحتى درجات الحرارة العالية (30).

جدول (2) أعداد العزلات والنسبة المئوية للفطريات المنتجة لسموم الافلاتوكسين والمعزولةمن اصابات قرنية العين

ت	الأجناس الفطرية والخمائر المعزولة	عدد العزلات المختبرة	العدد والنسبة المئوية للعزلات المنتجة للافلاتوكسين
1	*Aspergillus flavus*	9	8 (88.8 %)
2	*Aspergillus niger*	7	3 (42.8 %)
3	*Aspergillus fumigatus*	6	4 (66.6 %)
4	*Fusarium soloni*	5	-
5	*Alternaria alternata*	5	-
6	*Penicillum chrysogenum*	4	-
7	*Exserohilum rostratum*	3	-
8	*Chaetomium globosum*	2	-
9	*Paecilomyces variotii*	1	-
10	*Candida albicans*	4	-
11	*Candida lipolytica*	3	-
12	Total	49	% 30.61

- = تعني عدم انتاج الافلاتوكسين

3.الكشف عن قابلية الفطريات المعزولة على انتاج انزيمات protease ، Lipase

A. أنزيم Protease. (Gelatinase).

عند الكشف عن قابلية عزلات الفطريات على افراز انزيمProtease وجد ان لجميع عزلات الفطريات القابلية على افراز هذا الانزيم مع وجود تباين حسب الأجناس الفطرية وأنواعها ،أذ تراوحت الفعالية الانزيمية لها بين (0.37 - 0. 62) ووجد ان اعلى فعالية للانزيم كانت للفطر*Aspergillus fumigatus* (0.37) واقل فعالية انزيمية كانت للفطر *a Alternaria alternat*وهي (0.62) جدول (3).

لاتتفق نتائج دراستنا هذه مع ماتوصلت اليه (4) والتي اشارت الى ان اعلى فعالية لانزيم البروتيز كانت عند الخميرة *Candida albicans* وهي 0.38 واقل فعالية لهذا الانزيم كانت عند الفطر *Mucor* sp وهي0.71 .كما اشار(6) الى ان قيم الفعالية لانزيم البروتيز في *Candida albicans* تتراوح بين 0.16 -0.28 وقد يرجع هذا الاختلاف الى الاختلاف في عدد العزلات المستخدمة فضلا عن تأثير عوامل التجربة .

تلعب انزيمات البروتيز دورا كبيرا في امراضية الفطريات حيث تعمل هذه الانزيمات على تحلل البروتينات المتواجدة في الانسجة الحية ويؤدي ذلك الى فقدان التركيب الطبيعي للنسيج مما يسهل انتشار الفطر داخله ومن ثم حدوث الاصابة(19).وقد يعود سبب تقرح قرنية العيون الى فعل انزيمات البروتينات التي تفرزها الفطريات عند تواجدها في موضع الاصابة (23).

جدول (3)قابلية الفطريات المعزولة على افراز انزيم Proteaseبعد فترة حضانة (4)أيام وعند درجة حرارة 37 مْ

الأجناس الفطرية والخمائر المعزولة	قطر منطقة التحلل (ملم)	قطر المستعمرة (ملم)	قطر المستعمرة + قطر الهالة الشفافة(ملم)	الفعالية الانزيمية
Aspergillus flavus (5)	±0.228	±0.711 8	46	0.39
Aspergillus niger (4)	0.4±26	±0.0524	50	0.48
Aspergillus fumigatus(3)	±0.1230	±1.818	48	0. 37
Fusarium soloni(3)	±0.39	±0.121	30	0.7
Alternaria alternate (3)	±0.114	±0.5123	37	0.62
Penicillum chrysogenum(4)	±0.217	±0.4618	35	0.51
Exserohilum rostratum(3)	±0.114	±0.1412	26	0.46
Chaetomium globosum(2)	0.8±12	±0.0515	27	0.55
Paecilomyces variotii(1)	0.16+18	±0.0712	30	0.4
Candida albicans(2)	±0.215	±0.510	25	0.4
Candida lipolytica(3)	±0.29	±0.098	17	0.47

B.الكشف عن قابليةالعزلات على افراز انزيم Lipase .

أوضحت النتائج المبينة في الجدول(4) قدرة الأجناس الفطرية على افراز انزيم Lipase وبعد حساب قيمة الفعالية الانزيمية لهذا الانزيم وجد إن أعلى فعالية إنزيمية لهذا الإنزيم كانت عند الخميرة *Candida lipolytica* حيث بلغت الفعالية (0.24) يليها في ذلك الفطر*Chaetomium globosum* إذ بلغت فعالية إنزيم اللايبيز فيه (0.38). في حين كانت اقل فعالية إنزيمية لهذا الإنزيم عند الفطر *Fusarium soloni* إذ بلغت (0.67).جدول (4).

تتفق نتائج دراستنا هذه مع ماأشار إليه (11) إذ وجد في دراسته إن أعلى فعالية إنزيمية لأنزيم اللايبيز كانت لخميرة *Candida lipolytica* حيث بلغت (0.26) ،في حين أشار (10) إلى إن أعلى فعالية إنزيمية لإنزيم اللايبيز كانت للفطر *Penicillum chrysogenum* إذ بلغت (0.42) ،وكما اشرنا سابقا فقد يعود هذا الاختلاف إلى الاختلاف في عدد العزلات المستخدمة اونتيجة لاختلاف الظروف المختبرية .

احتل موضوع انتاج انزيم اللايبيز من قبل الفطريات حيزا واسعا في الدراسات البحثية وذلك لماتمتلكه بعض الفطريات من قابلية عالية على انتاج هذا الانزيم من جهة ولاهمية الانزيم المنتج من جهة ثانية ،فقد اشار كل من (27),.و(20) , الى ان انزيم اللايبيز المنتج من قبل بعض الفطريات جلب اهتمام مؤسسي الصناعات الغذائية وخاصة الاجبان ،اذ تنتج بعض أنواع الفطر *Penicillum* إنزيم اللايبيز والتي استخدمت لغرض انضاج الاغذية واعطاؤها النكهة االمرغوبة بعد دراسة مواصفاتها.

ولكن مايثير الانتباه هو مااشار اليه الباحث (17) الى ان انزيمات اللايبيز والبروتييز تعد من عوا مل الضراوة التي تستخدمها الفطريات عند تواجدها داخل جسم الكائن الحي والتي من شأنها ان تعمل على الجدار الخلوي للخلية الحية ومن ثم حله،كما ان انزيمي اللايبيز والبروتيز عرفا بمقاومتهما لفعل المضادات الحياتية.

جدول (4)قابلية الفطريات المعزولة على افراز انزيم Lipase بعد فترة حضانة (4)أيام وعند درجة حرارة 37 مْ

الأجناس الفطرية والخمائر المعزولة	قطر منطقة التحلل (ملم)	قطر المستعمرة (ملم)	قطر المستعمرة + قطر الهالة الشفافة(ملم)	الفعالية الانزيمية
(9) *Aspergillus flavus*	±0.222	±0.7123	45	0.51
(7) *Aspergillus niger*	±0.433	±0.0524	47	0.51
(6)*Aspergillus fumigatus*	±0.1222	±1.825	47	0.53
(5)*Fusarium soloni*	±0.310	±0.121	31	0.67
(5) *Alternaria alternate*	±0.115	±0.5123	38	0.60
(4)Penicillum chrysogenum	±0.218	±0.4618	36	0.5
(3)*Exserohilum rostratum*	±0.110	±0.1412	22	0.54
(2)*Chaetomium globosum*	±0.524	±0.0515	39	0.38
(1)*Paecilomyces variotii*	0.16+14	±0.0712	26	0.46
(4)*Candida albicans*	±0.215	±0.510	25	0.4
(3)*Candida lipolytica*	±0.225	±0.098	33	0.24

4-الكشف عن قابلية الفطريات على حل الدم

أظهرت نتائج الدراسة ان لبعض الفطريات المختبرة القابلية على حل الدم مع الاختلاف في قطر منطقة التحلل والزمن اللازم للتحلل حسب جنس الفطر ونوعه وكانت النسبة المئوية لقابلية الفطريات على حل الدم هي (73.4 %) في حين لم تبدي الخمائر أي قابلية لحل الدم وكان اسرع انواع الفطريات حلا للدم هو الفطر *Asp.fumigatus* الذي حل الدم خلال ثلاثة ايام وبمنطقة تحلل 29 ملم وجاء بعده الفطر *Asp. flavus* الذي حل الدم خلال خمسة ايام وبمنطقة تحلل 23 ملم وبعده الفطر *Asp.niger* الذي حل الدم خلال ستة ايام وبمنطقة تحلل 20 ملم اما الفطريات ،*Alternaria alternata* ، *Penicillum chrysogenum* ، *Exserohilum rostratum*، *Chaetomium globosum* و *Paecilomyces variotii* التي تمكنت من حل الدم خلال 7 -9 أيام وبمناطق تحلل 22 ملم ،23 ملم ،24 ملم ،25 ملم و14 ملم على التوالي في حين كان الفطر *Fusarium soloni* اقل كفاءة في حل الدم من بقية الفطريات الاخرى اذ حل الدم خلال 9 ايام وبمنطقة تحلل 11 ملم . جدول (5). تتفق نتائج دراستنا هذه مع ماتوصلت اليه (2) و (4) في كون الفطر *Asp.fumigatus* هو اكفأ الانواع الفطرية في حل الدم واقلها كفاءة هو الفطر *Fusarium soloni* وكما هو معروف ان الفطر *Asp.fumigatus* يعد من المسببات المرضية الاكثر اهمية من بين الانواع التابعة للجنس *Aspergillus* (13). وقد يعود سبب قابلية الانواع الفطرية على حل الدم الى امتلاك هذه الفطريات عوامل ضراوة مثل افرازها بعض الانزيمات

المحللة وخاصة اللايبيز والبروتينيزاو انتاجها للسموم الفطرية وهذا متوصلنا اليه في النتائج اعلاه . اشار (28) الى ان قابلية الفطريات المعزولة من اصابات العيون على حل الدم له دور كبير في زيادة خطر الاصابة وتعرض العيون لاصابات اخرى من شأنها ان تؤدي الى استئصال العين بكاملها .

جدول (5)قابلية الفطريات المعزولة على افراز انزيم Lipase بعد فترة حضانة (4)أيام وعند درجة حرارة 37 مْ

الأجناس الفطرية والخمائر المعزولة	عدد العزلات المختبرة	عدد العزلات المسببة للتحلل	قطر منطقة التحلل (ملم)	زمن التحلل (يوم)
Aspergillus flavus	9	9	1.3±29	5
Aspergillus niger	7	6	1.2±26	6
Aspergillus fumigatus	6	6	0.11±33	4
Fusarium soloni	5	4	1.3±11	9
Alternaria alternata	5	4	1.2±22	8
Penicillum chrysogenum	4	3	1±23	8
Exserohilum rostratum	3	1	1.1±24	7
Chaetomium globosum	2	2	1.4±25	7
Paecilomyces variotii	1	1	0.16+14	8
Candida albicans	4	-		
Candida lipolytica	3	-		
Total	49	36 (% 73.4)		

- = غير محللة للدم

المصادر :-

- 1-البدري ،داليا عبد الكريم (2002) عزل وتشخيص الفطريات المسببة لالتهابات العيون في الانسان والحيوان .رسالة ماجستر ،كلية الطب البيطري –جامعة بغداد.
- 2 _الطويل ،رنا صالح جبار(2003)عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لتربة بعض مدارس ومساجد وفنادق مدينة الديوانية ،رسالة ماجستر ،كلية العلوم –جامعة بابل.
- 3 _عبد الحسين ،محمد محسن (2001) دراسة حول الفطريات الانتهازية المصاحبة لالتهابات الاذن الوسطى في محافظة القادسية.رسالة ماجستير،كلية التربية –جامعة القادسية .
- 4 -عبود ،ميثاق ستار (2006) دراسة بعض الجوانب البايولوجية للاعفان والخمائر الانتهازية المعزولة من عينات سريرية مختلفة في مستشفى الناصرية العام –ذي قار.رسالة ماجستير ،كلية التربية –جامعة ذي قار.

5-Bhutta ,A. and Ahmed (1989).Seed –brone fungal pathogens of maize in pakistan .Journal of science industrially research,32:107-109.

6-Birman ,G.,Alert ,D.,Dang ,Y.(1997). Endogenous endophthalmitis caused by *Candida alibicans* in a healthy women , Opthalmol , 113 : 593 – 5 .

7-Ccodere F., Anderson R.l .,(1982) .Bilateral *Candida albicans* dacryocystitis with facial cellulitis, can J ophthalmol , 17:176-7 .

8-Chang ,D.K.,Sart .F.P.,Jone ,A.O.(1994). Fungal Endophthalmitis : are port of two cases Bull soc Belge. Opthalmol , 250: 63 – 6 .

9-Collee,J.G,; Fraser, A.G.; Marmion,B.P. and Simmons, A. (1996).Practical Medical Microbiology.14th ed .Churchill Livingstone, London.pp.:106-716.

10-David,Z.B.(2009). Health effects of *Penicillum chrysogenum* in human.Food.Addit.Contam.18(8):230-300

11-Doczi,I.(2006).Studies of human pathogenic fungi :Development of identification schemes ,use of molecular genetic methods for their detection and evalution of their susceptibilities .PhD .thesis .Dep.Clin.Micro.F aculty of medicine ,University of Szeged ,Hungary.

12-Elaraki ,F.K. and Benkerroum ,F.L.(2001).Aflatoxins in food and feed :Occurance ,Legislation an activation by physical methods .Food chemistry ,59:57-60.

13-Ellis,D.H.(2002).An Introduction to medical mycology .www. Mycology .Adelaide .edu. aa.

14-Hankin,L.and Anagnostakis,S.L.(1975). Use of soild media for detection of enzymes production by fungi Mycologia .67:597-607.

15-Javier ,M.H.(2009). Endophthalmitis caused by *Candida albicans,* 13:281-7 .

16-Jawetz,E.;Melnik,J.L.;Adeberg,E.A.;Brook,G.F.;Butel,J.S.and Morse ,S.A.(2004).Medical microbiology 24th. ed.Appleten and lang New York.Connctical.pp:45-60

17-Kaliski,S.R.;Beene,M.L.,and Mattman,L.(2006).fugal lipases ,J. A .M. A. 34(6):148-1207.

18-Krebs, C. J. (1978). Ecology: The Experimental Analysis Distribution and Abundance . Harper and Row Publisher, New York .PP: 820 .

19-Mazzola, M.(2002).Mechanisms of natural soil suppressiveness for pathogenic fungi .Plenum .Press ,Nerw York.

20-Molimard,P. H. (2008).Dairy food review: Compounds involved in the flavor of surface mould ripened cheese:Origins and properties.Journal of dairy science,79:169-184.

21-Muccioli. C. , Belffort. R. , Neves. R. (1995). Limbal and choroidal cryptococcosis infection in AIDS , AMJ. Opthalmol ,120: 539-40.

22-Price,M.F.;Wilkinson,I.D. and Gentry,L.(1982).Plate method for detection of phosphor lipase activity in *Candida albicans*.Sabouraudia 20:7-14.

23-Saha ,R. and DAS ,S. (2006). Mycological profile of infectious keratitis from Delhi .Indian .J.Med .Res.123:159-164.

24-Saito ,M. and Machida ,S.(1999).Arapid identification method for aflatoxin producing strains *Asp.flavus* and *Asp.parasiticus* by ammonia vapor .Mycoscience.40:205 -208.

25-Suzuki,T.(2004). Two cases of keratomycosis caused by yeast .JPAJ. Clin .Opthalmol .,58:65-9.

26-Thomas P.A,(2003) .Mycotic karatitis , an underestimated mycosis , J Med . vet. Mycol , 32: 235-56 .

27-Tsunehiko,K.;Kanae,A.;and Hiroko ,K.(2007). Identification of analogous *Geotrichum candidum* strains isolated from surface mold ripened soft cheese and raw milk.Bio.Lab.Nara.Univer.of Educ.Takabatake.Nara .Pp:78-98.

28-Wang ,W., and Fung .B.(2009) .Direct Fungal inFection of the eye in Britain , trans Opthalmol Soc UK, 89:727-41.

29-Weitzman I, Summerbell R.C.(1995).The dermatophytes , clin Microbilo. Rev , 8 : 240 .

30-Xie,I.,Dong ,G. and Shi.W.Y. (2001).Treatment of fungal keratitis by penetrating keratoplasty .Br.J.Ophthalmol.85:1070-1074.

31-Zhong ,W.X.,Sun ,Y. Zhao ,W.Shi,Y. and Xie .I.(2007). Retrospective study of suppurative keratitis in 1054 Patients .Chin .J.Ophthalmol.43:245-250.

A study of some biological sides for fungi isolated from keratitis case in some patients attended to al-Diwanyia teaching hospital

Baheeja Abees Hmood Alkhalidi
Medicine college
Al-qadisyia university

Abstract:-

The recent study aimed isolation and identification of fungi associated with keratitis in some patients attended to Al-Diwanyia teaching hospital and study of some biological sides of it ,the results of study showed percentage of isolation was (40%) and total number of fungal isolates was (49) included (7)fungal genus in addition to two species of *candida* sp , take highest rate of isolation(44.89%) was to *Aspergillus* sp while rate of isolation of *Paecilomyces variotii* was only (2.04%) . Results of chemical test by Coconut Extract Agar medium showed the rate of aflatoxin production by isolated fungi in this study was (30.61%) and this ability of production was by number of isolates of *Aspergills* sp only , *A.flavus* reported highest rate for production (88.8%) ,when detection for ability of fugal isolates on secretion of Protease and lipase enzymes we found all isolates of fungi had ability to secretion of these enzymes with variable according to genus and species of fungi so some of tested fungi had ability to hemolytic of blood with different in diameter of lysis zone and time which necessary for lysis according to genus and species of fungi where percentage for ability of fungi to hemolytic of blood was (73.4%) where *A.fumigatus* was faster than other fungi by lysis of blood in three day in lysis zone (29)ml ,while yeast did not appear any ability to lysis of blood.