

عنوان الاختراع

طرق جديدة في العزل والتشخيص والتوصيف الجزيئي
لخمائر الملاسيزيا المسببة للأمراض الجلدية للإنسان .

A new techniques in isolation , identification and
molecular characterization of *Malassezia spp*
associated with human skin diseases

اسماء المخترعين

أ.د. احسان عيدان السيمري *

م.د. فرقد مجيد الحمداني **

أ.د. خليل اسماعيل الحمدي ***

*: فرع الاحياء المجهرية-كلية الطب - جامعة البصرة

** :فرع التشريح والانسجة والاجنة- كلية طب الزهراء – جامعة البصرة

***: فرع الطب الباطني- كلية الطب - جامعة البصرة

١- عنوان الاختراع: طرق جديدة في العزل والتشخيص والتوصيف

الجزئي لفمائر الملاسيزيا المسببة للأمراض الجلدية للإنسان .

٢- موجز الاختراع

استخدمت طرق جديدة ومحورة ومنتقدة لغرض عزل وتشخيص- باستخدام اوساط زرعية محورة- وتوصيف انواع جنس الملاسيزيا- المعروفة علميا وعالميا بصعوبة عزلها وتشخيصها واستحالة الاحتفاظ بعزلاتها لمدة طويلة نسبيا والمجهولة صفاتها الوراثية بشكل خاص- المسببة للأمراض الجلدية للإنسان كما درست امراضيتها في الحيوانات المخبرية باستخدام تقنيات جديدة ومحورة تستخدم لأول مرة في هذا النوع من الدراسات.

اجريت هذه الدراسة للحصول على انواع مختلفة من جنس " الملاسيزيا" والتي تم عزلها من المرضى المصابين بمرض النخالية المبرقشة وباستخدام طرق مظهرية ودراسة جزئية فضلا على دراسة نسيجية مخبرية لمعرفة التغيرات الحاصلة في مرض النخالية المبرقشة.

شملت الدراسة خمسة وتسعين مريضا ٤٠ انثى بنسبة ٤٢,١% و ٥٥ مريضا ذكرا بنسبة ٥٧,٩% ، مصابين بالنخالية المبرقشة ، تراوحت اعمارهم بين (٤ الى ٧٣) سنة. من مجموع هؤلاء المرضى تبين ان ٨٥ عينة (والتي تشكل ٨٩,٥% من مجموع العينات) كانت موجبة التفاعل مع محلول البوتاسيوم هايدروكسايد والزرع المخبري ، بينما شكلت ١٠ عينات تفاعلا سلبيا.

بينت التوصيفات الاولية المعتمدة على التعامل المباشر مع محلول البوتاسيوم هايدروكسايد انها كانت تتصف بصفات شكلية "كرات اللحم والسيباكتي" ، وكان الفحص والتشخيص غير المباشر على الوسط الزرعي" وسط دكسون المحور" وقد اظهرت نتائج الفحص العياني والمجهري للمستعمرات الزرعية والتحليلات الكيماوية الحياتية ان نوع ال *Malassezia furfur* هو المسبب الرئيسي للاصابة بواقع ٢٩ حالة مرضية بنسبة ٤١,١% ، يتبعها الفطر *M. globosa* بواقع ٢٧ حالة مرضية وبنسبة ٢٨,٤% . فيما احتلت *M. restricta* اصابة ٩ حالات مرضية وبنسبة ٩,٥% .

ونسجل *M. Sympodialis* اصابة ٦ حالات وبنسبة ٦,٢% واحتلت *M.slooffiea* حالات ٤ وبنسبة ٤,٢% . وقد اثبت ان جنس ال *Malassezia furfur* يمثل نسبة ٢٥% من الذكور بينما شكل نفس الفطر نسبة ٥٠% من الاناث ويعتبر الجنس الاكثر ترددا بين مرضى النخالية المبرقشة.

كذلك تبين ان نسبة الاصابة لدى المرضى النخالية المبرقشة هي الاكثر شيوعا بين مجموع الاعمار من ١٢-٢٠ سنة وبنسبة ٢٦,٨% تتبعها مجموعة عمار ٢١-٢٠ سنة وبنسبة ٢٤,٢% فيما تبين النتائج ان نسبة الاصابة ب *M. furfur* كانت هي الاكثر شيوعا في هذه المجموعة.

وبالعودة الى مكان السكن فتبين نسبة توافق للمرضى المصابين النخالية المبرقشة والمتوزعين بين مركز المدينة واطرافها وبنسبة ٤٨,٤% في مركز المدينة ونسبة ٥١,٦% في اطرافها.

والملاحظ ان الاصابة ب *M. furfur* هي الاكثر شيوعا في اصابات اطراف المدينة وبنسبة ٦٩,٢% ، بينما شكلت ال *M.globosa* النسبة الاكبر في مركز المدينة وبنسبة ٧٠,٤% واستنادا الى التوزيع المهني وعادات التدخين فان النسبة الاكبر اصابه بالنخالية المبرقشة من فئة العمال الذكور وبنسبة ٣٢,٧% بينما تشكل الاصابة من غير العمال نسبة ٢٤,٢% وهي الاكثر في النساء . وقد تبين ايضا ان المرضى المصابين بالنخالية المبرقشة من الذكور والاناث كانت الاكثر وضوحا في النوع الثالث من الجلد وبنسبة ٥١,٦% . بينما *M. furfur* كانت متساوية تقريبا في اصابات النوع الثالث والرابع من انواع الجلود في الانسان وبنسبة ٤٨,٧% و ٤٦,٢% بالتعاقب . وهكذا الحال في الاصابة ب *M.globosa* اذ جاءت مضاعفة في اصابات النوع الثالث من الجلد مقارنة بالنوع الرابع وبنسبة ٥٩,٣% و ٢٩,٦% . في الوقت ذاته تكثر الاصابة في الجلود الدهنية للانسان وبنسبة ٧٠,٥% وفي كلا الجنسين .

ومن المناسب ذكره انه قد تم عزل كل الانواع بنسبة متفاوتة من المرضى ذوي الجلود الدهنية وخاصة *M. furfur* و *M.globosa* وبنسبة ٧١,٨% الى ٧٤,١% بالتعاقب ، في كلا الجنسين .

وقد لوحظ بان غالبية المرضى هم من غير المصابين بداء السكري وبنسبة ٩٥,٨% وفي حالات سلبية التاريخ العائلي كانت النسبة ٨٥,٣% وفي المرضى ذوو التاريخ السلبي لحالات الاصابة بامراض الحساسية ومن اللذين يشكو من التهابات الجلد وبنسبة عالية بلغت ٩٠,٥% . في عين الوقت شكلت الاصابة بالنخالية المبرقشة كانوا يعانون من كثرة وغزارة التعرق الجلدي .

اشارت الدراسة الى ان عودة الاصابه بالنخالية المبرقشه هي الاعلى في الذكور وبنسبة ٢٨,٩% ونسبة ٢٣,٠% في النساء المصابات حديثا ولاول مرة مع تغيرات احصائية ذات اهمية عالية.

شكل انتشار *M. furfur* تجانسا شبه متساوي في كلا الجنسين الذكور والاناث المصابين لاول مرة او الاصابة المتكررة وبنسبة ٥٥,٦% و٤٤,٤% على التعاقب .

وفيما يخص مدة المرض فقد تبين ان غالبية المصابين ب بالنخالية المبرقشه والمشخصين لفترة اصابة الاقل من السنة وبنسبة ٥٢,٦% . ان جميع اجناس "المالاسيزيا" هي الاكثر غلبه في هذه المجموعة العمرية.

واستنادا الى شدة المرض فان غالبية المرضى المصابين بالنخالية المبرقشه فهم الاكثر شدة وانتشار اكثر من البقع في المناطق المتأثرة بالاصابه وبنسبة ٥١,٦% وباستثناء *M. sympodialis* فان جميع اجناس "المالاسيزيا" هي الاكثر شيوعا في النوع الاكثر شدة ، ويشكل البدن المكان الاكثر اصابه من بقية اجزاء الجسم وفي الجنسين وبنسبة ٥٤,٧% تعقبها منطقة العنق وبنسبة ١٧,٩% وعلى منطقة الصدر وبنسبة ١١,٦%.

وهناك فروقات ذات دلالة احصائية علمية بين الجلد ومنطقة الاصابة بقيمة ٠,٠٥ اكبر او يساوي p . ويشكل *m.fuf ur* حضورا متميزا بين الاجناس الاخرى في منطقة البدن (Trunk) وبنسبة ٥٦,٤% بينما في المرضى المصابين ب بالنخالية المبرقشه مع شدة تلون في الجلد تكون شائعة في الجنسين وبنسبة ٥٢,٧% بينما تمثل بنسبة ٢٠,٥% في النساء ونسبة ٢٣,٥% في الذكور بينما ، حالات الاصابه وظهور بقع غامقة اللون عن الجلد الطبيعي في مناطق الاصابة هي الاكثر ظهورا في الذكور وبنسبة ٢٨,٤% عنه في النساء وبنسبة ٧,٤% .

وتنتشر *M.globosa* و *M.furfur* في مناطق الجلد الغامق من مناطق الاصابه في الرجال (وبنسبة ٥٦,٤% و ٥٩,٢% بالتعاقب) . مع فوارق ذات قيمة احصائية بين شدة اللون الغامق وبمعامل ٠,٠٥ اكبر اويساوي p.

تنتشر الاصابات القشرية في حالات الاصابه ب بالنخالية المبرقشه وفي كلا الجنسين وبنسبة ٥٠,٥% وتكون *M.furfur* الاكثر في الاصابة القشرية وبنسبة ٦٣,٠% .

ولمعرفة تاثير ال DNA في التحليلات الجينية فان منطقة ITS قد تم مضاعفتها من المزرعة النقية لثلاثين عينة من "المالاسيزيا" وتم توثيق نتائج PCR من الصيغات المختارة والمضخمة ITS,ITS1-5.85-ITS4 عن طريق ITS,ITS4 وV9G/ LS266. ان معدل تشخيص والتعرف عن طريق

PCR وتوزيع مناطق ITS قد اظهرت النتائج ان ١٣ عينة من الحامض النووي الريبوزي المنزوع الاوكسجين تم تضخيمها بتقنية ال PCR.

وقد وجدنا ضرورة تزامن الدراسة الحية (IN VIVO) لتوثيق اي اقتراحات والتي تغني العلاقة بين من النخالية المبرقشة ودور الفطر كعامل مساعد مسبب للمرض . وقد تم انتقاء الجردان البيضاء لهذا الغرض والتي تم تعريضها الى اجناس من "المالاسيزيا" بطرق اصابة مختلفة .

وقد بينت الدراسة ان *M. furfur* هي الوحيدة المسببة للتغيرات النسيجية المرضية لجلد الجردان والتي يمكن ذكر اهم تلك التغيرات للنماذج الجلدية في الجردان المصابة لتلك الفطريات المسببة للمرض بتقنيات الاصابة المذكورة سابقا والتي تشير جميعها الى وجود كميات من الفطر في منطقة الجلد السطحية في الوقت شهد منطقة الجلد (epidermis) بتزايد في الطبقة النسيجية للطبقات وكثرة الكيراتين والتهاب الجلد وقد لوحظ مصاحبة اعراض الالتهاب العام مع مصاحبة وجود خلايا التهابية كبيرة وان درجة الالتهاب ذات علاقة باعداد الخلايا الالتهابية والتي تنتشر وتغزو مكان الاصابة خاصة حول منابت جذريات الشعر الغائرة في الجلد.

1-Patent title:

A new techniques in isolation , identification and molecular characterization of *Malassezia spp* associated with human skin diseases

2-Patent summary

New methods and advanced axis for the purpose of isolating and diagnosing-using Group-centred community-known *Malassezia* genus-species characterization scientifically and internationally isolate and diagnose difficult and impossible to keep her retirements are relatively long and unknown genetic qualities particularly-causing skin diseases For human amraditha studied in laboratory animals using new techniques and the pivot used for the first time in this kind of studies.

This study was conducted to detect the various *Malassezia* species isolated from pityriasis versicolor patients by phenotypical and molecular methods with a study of histopathological experimental changes of PV.

A total of 95 patients [40 females (42.1%) and 55 males (57.9%)] with pityriasis versicolor were included in the study, their ages ranged between 4 -73 years. From the total number, 85(89.5%) samples were positive for KOH and cultures, while 10(10.5%) samples were negative. Primary screening of the isolates based on the direct methods with KOH that characterized by spaghetti and meat balls, indirect methods with cultivation on modified Dixon Agar, macro- and microscopy of the colonies and biochemical tests revealed that *Malassezia furfur* was the most frequent causative agent with 39 cases (41.1 %), followed by *M. globosa* 27 cases (28.4%), *M. restricta* 9 cases (9.5%), *M. sympodialis* 6 cases (6.3%) and *M. slooffiae* 4 cases (4.2%). In male, *M.furfur* obtained (35%), *M. globosa* (29%), *M. restricta* (9%), *M. sympodialis* (7%) and *M. slooffiae* was (5%). While in female, : *M.furfur* obtained (50%), *M. globosa* (27%), *M. restricta* (10%), *M. sympodialis* (5%) and *M. slooffiae* was (3%). PV patients were more common in the (12-20)years age group (36.8%), followed

by (21-30)years age group (24.2%), *Malassezia furfur* was predominant in this age group.

Regarding residency, semi-equal PV patients were observed in both central and peripheral regions (48.4% and 51.6% respectively), *Malassezia furfur* was more common in peripheral regions (69.2%), while *Malassezia globosa* was prevalent in central regions (70.4%). According to the Occupation and Smoking habits, most of the PV worker patients were males (33.7%) while PV non worker patients represented mostly by females(24.2%). High significant differences between gender $P \leq 0.01$, has been observed according to the occupation and smoking habits.

Most of the PV patients (male and female) were represented in Type 3 skin (51.6%). *M. furfur* is approximately equal in skin Type 3 and Type4 (48.7% and 46.2% respectively) , while *M. globosa* was twice the number in Type3 than Type4 (59.3% and 29.6% respectively). PV was found to be more frequent among patients with oily skin (70.5%) in both gender. All species were frequently detected in oily skin specially *M. furfur* and *M. globosa* (71.8% and 74.1% respectively). The majority of PV patients were non-diabetic (95.8%), non- positive family history was observed (85.3%) and non- positive allergy history mainly to atopy dermatitis (90.5%), while all the PV patients were suffering from profusion sweating (hyperhidrosis). The mode of recurrent infection of PV patients was higher among male (38.9%), while in female 23% of PV patients occurred for the first time (recent), and significant differences found between both sexes. *M.furfur* was more common in patients with recurrent infections (66.7%), while *M.globosa* was distributed semi equal in both recent and recurrent patients (55.6% and 44.4% respectively). Regarding duration of disease, most common PV patients have been shown in less than 1 year group (52.6%), All *Malassezia* species except *M. sympodialis* were predominant in the group less than 1year. According to the severity of the disease most of patients with PV were sever with more spread of patches on the affected area (51.6%) . All *Malassezia* species except *M. sympodialis* were more frequent in sever PV patients.

The trunk is the most infected area in both sexes (54.7%), followed by the neck (17.9%) and the chest (11.6%). There are significant differences between gender according to the lesion sites $P \leq 0.05$.

M.furfur was the most prevalent species on the trunk (56.4%). Pityriasis versicolor patients with hyperpigmented lesions were predominant in both sexes (53.7%), where it was represented in 30.5% of female and 23.5% of male patients, while hypopigmented

lesions were more common among males in comparison with females (28.4% vs 7.4%). *M.furfur* and *M.globosa* were predominant in hyperpigmented lesions (56.4% and 59.3% respectively), with significant differences between the pigmentation types $P \leq 0.05$. Scaly lesions were commonly found in PV patients in both genders (50.5%), *M.furfur* was equal in both scaly and mixed lesion types (35.9%), while *M.globosa* was predominant in scaly lesion type (63.0%).

To understand effects of rDNA sequences in phylogenetic analyses, the ITS region was amplified from pure cultures of 30 *Malassezia* species and sequenced the PCR products of amplified ITS ITS1-5.8S-ITS4 by ITS1/ITS4 and V9G/LS266 primer pairs. The identification rates by PCR and sequencing of ITS region showed reliable results between them. Significant variation was observed among PCR products for 13 *Malassezia* species ranged from 481.07bp and 860.76bp for (ITS1/ITS4 and V9G/LS266 primer pairs respectively) identified as *M.furfur* species, while 462.69 bp and 699.37bp for (ITS1/ITS4 and V9G/LS266 primer pairs respectively) identified as *M.globosa*. Phylogenetic analyses produced different trees relative to analyses with consensus sequences.

In vivo study was found necessary to document any suggestions that interest the relation between pityriasis versicolor and their possible yeast causative agents. The laboratory animals was the white rat, that induced by *Malassezia* species with different infection methods: Intradermal, spot and prick technique of injection. Results showed that *M.furfur* was the only species which represent the histopathological changes on the rat skin. The main histopathological changes of skin biopsy of infected rats with *Malassezia* species from various experimentally techniques showed moderate to large numbers of yeast in the corneum layer with epidermal hyperplasia, keratosis and dermatitis. Inflammation signs accompanied with large number of inflammatory cells can be observed, the inflammation associated with number of inflammatory cells infiltration and obvious around the hair follicles.

The results of the present study approved the relation between *Malassezia* and pityriasis versicolor

٣- مفصل الاختراع

أ- مقدمة الاختراع

جنس *Malassezia* هي خميرة ثنائية الشكل محبة للدهون تعتبر جزء من الميكروبات الطبيعية الموجودة على الجلد . مع ذلك من الممكن ان تغير من حالتها الرمية الى حالة انتهازية تحت ظروف خاصة مثل المناخ حار ، كثرة التعرق ، وضعف الجهاز المناعي حيث تستعمر الجلد البشري مما يمكنها من غزو طبقة القرنية من الجلد واختراقها والتصرف كعوامل مسببة للأمراض. ^{٣١ و٣٢}

جنس *Malassezia* هي واحدة من الاحياء الدقيقة لجلد الفقاريات البشرية وتلك ذات الدم الدافئ الذي يحتاج إلى الدهون كمتطلب غذائي مهم لبقائهم على قيد الحياة. هذا سوف يفسر السبب وراء غزو هذه الفطريات والتصاقها بالمناطق الجلدية الغنية بإفراز الزهم ، وارتفاع معدلات استعمار الجلد لدى البالغين الأصحاء وانخفاض معدل استعمارها لجلود الأطفال واعداد ما قبل البلوغ. ^{٤٠ و٤١ و٤٢ و٤٣}

انواع جنس ال *Malassezia* ممكن أن تسبب أنواع مختلفة من الأمراض الجلدية ، على سبيل المثال النخالية المبرقشة *Pityriasis versicolor*، التهاب الجريبات الملسيزية (*Pityrosporum*) ، التهاب الجلد الدهني ، قشرة الرأس ، حب الشباب الستيرويد ، التهاب الجلد التأتبي والصدفية ^{٨٠ و٩٠ و١٠٠}

النخالية المبرقشة هي عدوى *Malassezia spp* من الجلد. يُطلق عليه أحياناً اسم *tinea versicolor* ، على الرغم من استخدام مصطلح *tinea* بشكل صارم في حالات الإصابة بالفطريات الجلدية

Dermatophytes. يحدث مرض النخالية المبرقشة في جميع أنحاء العالم ، وهو الأكثر شيوعاً في المناخات الحارة والرطبة منه في المناخات الباردة والجافة. وغالباً ما يصيب الأشخاص الذين يتعرقون بشدة. قد يقل في أشهر الشتاء ويتكرر كل عام. في كثير من الأحيان يصيب النخالية المبرقشة الشباب البالغين من كلا الجنسين ، وهو أكثر شيوعاً عند الرجال منه في النساء. يمكن أن تؤثر أيضاً على الأطفال والمراهقين وكبار السن. يعتبر مقياس ظهور خلايا الخميرة المستديرة إلى البيضاوية ذات الشعيرات القصيرة المميزة (كرات اللحم والسباكتي) في الماضي واحداً من أكثر النتائج التشخيصية في الفحص المجهرى المباشر ، بالإضافة إلى التغيرات الالتهابية الطفيفة في الطبقة المحصنة من منطقة الإصابة من الجلد مع عدم وجود أضعف الاستجابات المناعية الخلوية والخلطية. على الرغم من حقيقة أن النخالية المبرقشة ذكرت لأول مرة في بداية القرن التاسع عشر ، إلا أن قدراً كبيراً من الارتباك والجدل قد اختتم البحث ودراسة هذه الفطريات، بسبب الاختلافات في التشكل ومتطلباتها الصعبة للنمو في المختبر. ^{١١ و١٢ و١٣ و١٤ و١٥}

عام ١٨٠١ ، كان Willan أول من لاحظ مرض النخالية المبرقشة ، مع إجراء المزيد من الدراسات وتعزيزها ، ثم اقترح Baillon في عام ١٨٨٩ ، أن جنس *Malassezia* هو العامل المسبب لمرض النخالية المبرقشة. ^{١٦ و١٧}

في العقود الماضية ، غيرت الدراسات الجزيئية تصنيف جنس *Malassezia* إلى حد كبير حيث تم توثيق التباين التسلسلي بين أنواع الملاسيزيا في جينات rRNA. علاوة على ذلك ، يمكن التعرف على أنواع *Malassezia* وتشخيصها بطرق تعتمد على خصائصها الكيميائية الحيوية ، ولكن هذه الطرق لا تملك الخصائص التمييزية الكافية وبسبب ذلك ، لا يمكن وصف الأنواع المحددة حديثاً. أضف إلى ذلك ، أن الأساليب الكيميائية الحيوية ليست مناسبة لتحقيق طريقة فورية للتشخيص. في الأونة الأخيرة ، تعتبر طرق النهج الجزيئية وطرق PCR للتمييز الدقيق لأنواع *Malassezia* هي الأكثر ملاءمة للتعرف والتشخيص ^{١٨ و١٩ و٢٠ و٢١ و٢٢}

ب- هدف الدراسة:

تهدف الدراسة الحالية الى ايجاد وتأكيد تحديث وتطوير طرق مختبرية مختلفة لغرض عزل وتشخيص أنواع مختلفة من *Malassezia* المرتبطة مع ظواهر سريرية مختلفة من النخالية المبرقشة من خلال التقنيات المورفولوجية والجزئية ، ثم دراسة التغيرات النسيجية المرضية لمرض النخالية المبرقشة باستخدام خزعة الجلد ، وعن طريق حقن نماذج الحيوانات تجريبيا مع أنواع *Malassezia* ولتحقيق هذا الهدف اجريت الدراسات التالية:

١- دراسة سريرية لمرضى Pityriasis Versicolor وتسجيل جميع الظواهر السريرية (العلاقة بين أنواع *Malassezia* ودورها كعوامل مسببة و / أو مسببات نقص تصبغ ، فرط تصبغ و حمامي erythematous من هذا المرض)

٢- الدراسة الديموغرافية للمرضى: الجنس والعمر والعوائل والتغذية والوضع الاجتماعي والاقتصادي وغيرها.

٣- عزل الملاسيزيا من جميع مراحل وموقع النخالية المبرقشة باستخدام اوساط زرعية محورة للفطريات.

٤-دراسة التمايز المورفولوجي بين أنواع مختلفة من *Malassezia* باستخدام الخصائص المجهرية والظاهرية.

٥- دراسة التمايز الجزيئي بين أنواع مختلفة من *Malassezia* باستخدام البرايمرات العامة والخاصة.

٦-تسلسل الحمض النووي للأنواع المعزولة مقارنة مع عزلات بنك الجينات القياسية.

٧-تحديد الأنواع الشائعة من الملاسيزيا المرتبطة بمرض النخالية المبرقشة في البشر .

تشمل الدراسة داخل الجسم الحي ما يلي:

أ- دراسة التغيرات المرضية في العدوى البشرية.

ب - حقن الحيوان المختبر (الفئران) مع أنواع *Malassezia* باعتماد طرق جديدة : الحقن داخل الجلد ، الحقن بطريقة البقع، والحقن بطريقة الوخز.

ج- تحديد السمات السريرية لجلد الفئران المصابة بالتهاب ، ومتابعة هذه التغيرات خلال فترات تتسلسلية.

د- تحديد التغيرات النسيجية المرضية للبشرة المحقونة بالمقارنة مع تلك في الإنسان.

ت- الفن السابق:

في اطار بحث الادبيات المستخدمة في اجراء البحوث المماثلة للسنتين الثلاثين الماضية تبين عدم عزل انواع جنس الملاسيزيا من أي من الامراض الجلدية البشرية وبالاحص في العراق وان الدراسات التي اجريت على الملاسيزيا كانت تختص بالعلاج الجراحي او الاثار النسيجية المتضررة او دراسة بعض الاختبارات الكيمياحياتية التي تصاحب التغييرات الدموية عموما . كما انه من المناسب القول بان الملاسيزيا المدروسة في هذه الدراسة تعزل وتنقى وتوصف جزئيا لأول مرة محليا ويمكننا الاشارة الى مجمل الدراسات التي تناولت خميرة الملاسيزيا او الخمائر عموما في العراق وهي كما يلي:

أظهر Sharquie ، وآخرون ، (٢٠٠١) ، بوضوح مدى تأثير العمر و انتشار *Pityrosporum orbiculare* على الجلد الطبيعي للأطفال العراقيين الأصحاء ، عندما أجروا دراسة على البشرة الطبيعية السريرية لمائة وعشرة أطفال أصحاء في بغداد خلال شهر أبريل إلى أكتوبر ١٩٩٨ . حيث نجحوا في عزل *P. orbiculare* على وسط زرع من - مستخلص الخميرة والبيتون و الجلوكوز - يحتوي على الكلورامفينيكول وسيكلو هكسيمايد، ومغطى بزيت الزيتون، وقد عزل الفطر من منطقة الجذع في ٧٧,٥٪ من الأطفال.

أظهر كرهوت وآخرون (٢٠١٢) في العراق بغداد أن *Malassezia globosa* كان أكثر الأنواع انتشاراً في مسببات آفات النخالية المبرقشة ، تليها *Malassezia furfur*. مع الأخذ في الاعتبار الدراسات السابقة التي أجريت للشعب العراقي ، أظهرت النتائج أن أكثر من ٩٠٪ من الأشخاص الأصحاء يحملون (*P. orbiculare*) *M. furfur* على أجسامهم كجزء من الكائنات الطبيعية للجلد (الربيعي ، ١٩٩١). وهذا يفسر زيادة حدوث هذا المرض بين الشعب العراقي. كان للآفات المنقشرة المصاحبة لمرض النخالية المبرقشة لون متغير تسبب بمشاكل تجميلية كبيرة خاصة تلك الموجودة في الأجزاء المكشوفة من جسم الإنسان، و من بين مائة عينة تم زرعها ، انتجت ٧٩٪ منها نمو لجنس *Malassezia* على الوسط الزرع. ومن بين هذه الأنواع ، كانت الأنواع الأكثر عزلاً هي *Malassezia globosa* التي تمثل ٤٠٪ (٥١٪) ، تليها *Malassezia furfur* ب ٢٤٪ (٣٠٪) و *Malassezia Symptodialis* ب ٨٪ (١٠٪).

حسن وآخرون (٢٠٠٩) بحثوا عن ٦٤ مريضاً يعانون من مرض النخالية المبرقشة الذين التحقوا بمستشفى بعقوبة العام. حيث سجلوا سريريا زيادة بالأفة البيضاء عن تلك ذات اللون البني الداكن (٦٧,٢٪ مقابل ٣٢,٨٪). كان موقع الإصابة أكثر تواترا على الرقبة (٤٠,٦٪) ، وبمعدل إصابة أعلى بكثير بين الذكور مقارنة بالإناث (٧٣,٤٪ مقابل ٢٦,٦٪). بالإضافة إلى ذلك ، كان معدل الإصابة أعلى بكثير (٤٥,٣٪) بين الفئة العمرية ٢٢-٣١ سنة مقارنة بالفئات العمرية الأخرى.

وضح العماري وآخرون (٢٠١٦) في دراسته أن الذكور كانوا أكثر إصابة بالنخالية المبرقشة من الإناث ، وان *Malassezia furfur* سجل نسبة عالية في المرضى الذكور بنسبة (٦٥٪) وفي موقع الصدر مع نسبة (٣٥,٠٪) من ستين مريضا ممن يراجعون مدينة الإمام الكاظمين ع الطبية .

ث-تفاصيل الفكرة

I-طرق العمل

الوسائط والكواشف

ازرق الفينول :

20 مل فينول

20 مل حامض اللبنيك

40 مل الجلسرول

20 مل ماء مقطر

تخلط الكواشف بدقة . تضاف لكل 100 ملل من lacto الفينول 0.05 مل من صبغة القطن المزرقة.

هيدروكسيد بوتاسيوم:(KOH)

10 غم هيدروكسيد بوتاسيوم

10مل الجلسرول

90مل ماء مقطر

تذاب عشرة جرامات من هيدروكسيد بوتاسيوم في 90 مل من الماء المقطر تماما ,ثم تضاف له 10مل من الجلسرول بالتدريج مع استمرار التحريك.

Sabouraud' s Dextrose Agar:

65 غم Sabouraud' s Dextrose Agar

1000مل الماء المقطر

تضاف 65 غم من وسط اكار السابورود في 1000 مل من الماء المقطر. يضبط الpH الى 6

ثم يعقم الوسط في جهاز 120°C autoclave لمدة 15 دقيقة. يضاف البنسلين بتركيز 0.4 مل\ L

والستربتومييسين بتركيز ٢ مل\ L و\Chlormphenicol بتركيز ٠.٥ غم\ L . ثم يضاف زيت الزيتون

المعقم لتوفير المتطلبات الدهنية للخميرة. (Al-Hammadani (1997).

modified Dixon's Agar:

Malt extract 18 غم

Pepton 6 غم

Bacto agar 10 غم

Ox-bile Desiccated 10 غم

Oleic acid 1 مل

Tween 40 5 مل

1 مل الجلسرول

500 مل المقطر الماء

تمزج المكونات ببعض الماء لمدة 15 دقيقة, ثم يضاف باقي الماء المغلى الى المكونات الاخرى ثم تغلى مرة اخرى يثبت PH الى 6 ثم يعقم الوسط فى جهاز 120°C autoclave لمدة 15 دقيقة. يضاف البنسلين بتركيز 0.4 مل\ L والستربتومييسين بتركيز 2 مل\ L و\ Chlormpenicol بتركيز 0.05 غم\ L .

:Esculin agar (EA)

يخلط 10 غم من البيبتون مع 1 غم من ferric ammonium citrate و 1 غم من esculin فى 1 لتر من الماء المقطر اضبط pH الى 7.4 واطافة 15 غم اجار. يذوب بالحرارة وتوزيع على انابيب بحجم 6 مل. يعقم الوسط فى جهاز 110°C autoclave لمدة 15 دقيقة. يمكن تخزينها بدرجة 6°C - 2 لمدة سنتين.

The modified Dixon Agar (mDixon) with L-Tryptophan

يتالف هذا المتوسط بنسبة 3.6% malt extract و 2% من desiccated Ox-bile و 1% من Tween 40 و 0.2% من كليسيرول و 0.2% من oleic acid و 0.05% كلورامفينيكول و 0.05% سايكلو هكسيمايد و 0.2% اكار. بعد التعقيم والتبريد الى 50 درجة مئوية يضاف filtered sterilized L-tryptophan بتركيز 0.6% الى المكونات الاخرى.

يسجل مظهرها وجود صبغة خاصة بعد الحضان بدرجة 32°C بعد مرور 1 - 7 ايام .

المرضى

تضمنت الدراسة ٩٥ مريضا (40من الاناث و 55من الذكور) ممن يعانون من الاصابة بمرض النخالية المبرقشة pityriasis versicolor . مع الاخذ بعين الاعتبار اداب مهنة الطب والمتطلبات التي تتبع اثناء اعداد هذه الدراسة ولا سيما جمع العينات المرضية تحت اشراف طبيب امراض جلدية وموافقة المرضى انفسهم.

قسم المرضى الى ست فئات عمرية

- ١- اقل من سنتين
- ٢- من ٢- ١١ سنة
- ٣- من ١٢ - ٢٠ سنة
- ٤- من ٢١ - ٣٠ سنة
- ٥- من ٣١ - ٤٠ سنة
- ٦- اكثر من 41 سنة

الخصائص السكانية تشمل نوع الجنس والعمر , والتدخين , والتغذية , والحالة الزوجية و مستوى التعليم والاقامة . وتشتمل الميزات السريرية خصائص خطورة المرض وتنقسم الى:

- ١- خفيف (عدد قليل من macules ٣-٥ فى موقع واحد)
- ٢- معتدلا (اكثر من ٥ macules فى منطقة معينة)
- ٣- الاكثر حدة (عدة بقع تشارك نسبة كبيرة من سطح الجسم)

هذا القرار اتخذ تحت اشراف طبيب امراض جلدية.

وهناك مميزات سريرية اخرى تضمنت مدة المرض مع تصبغ ونوع وموقع الافات، ومن جهة اخرى تضمنت لون البشرة , ونوع الجلد والامراض المرتبطة بها.

جمع العينات :

تم جمع ٩٥ عينة من مرضى pityriasis versicolor بشكل قشور جلدية اخذت بواسطة شفرة جراحية معقمة ثم نقلت بواسطة حاويات معقمة الى وحدة الفطريات في قسم الاحياء المجهرية حيث اجريت عليها طرق مباشرة وغير مباشرة للتشخيص.

الاختبارات الشكلية والمظاهر الزرعية

١ - الفحص المباشر

:KOH (Wet mount)

توضع قشور الجلد على شريحة نظيفة المزودة بقطرة ١٠% KOH (لاذابة المواد الكيراتينية) ثم تغطى بغطاء الشريحة وتمرر بلطف على لهب خفيف دون الغليان لمنع تبلور ال KOH ثم يفحص مباشرة تحت المجهر (40X).

الفينول القطن ازرق :

يحضر معلق الخميرة بواسطة اخذ loopful من المزرعة على شريحة زجاجية معقمة ثم تصبغ باضافة lacto phenol cotton blue مغطاة بغطاء الشريحة وتفحص تحت المجهر (40X) لمراقبة السمات microscopical لخلايا الخميرة.

٢ - الفحص غير المباشر

تلقح القشور الجلدية على وسط ال Sabouraud's dextrose agar المذكور آنفا في اطباق بتري ٩ سم ، وتحضن في بيئة رطبة بدرجة 32 الى 34 درجة مئوية لمدة اسبوعين على الاقل . اثناء النقل , يجب المحافظة على الترطيب العالي , على سبيل المثال كيس من البلاستيك .

السمات المورفولوجية لل *Malassezia*

الميزات المجهرية Microscopical

تكون خلايا الملاسيزيا بشكل يتراوح بين البيضاوي الى الاسطواني القصير , (٤-٥ × ٢-٢,٥ ملم (مع نشوء برعم احادي على قاعدة عريضة. تتنوع الاشكال تبعا لانواع الاملاسيزيا.

- *M furfur* الخلايا متغيرة الحجم والشكل بيضوي الى اسطواني الى (2.5 - 8 ملم × 1.5-٣

ملم) او globose بقطر (٥-٢,٥ ملم) مع نشوء برعم على قاعدة عريضة او اقل

عرضا ويمكن انتاج Pseudohyphae احيانا في بعض المزارع.

- *M sympodialis*. الخلايا بيضاوي الى اسطواني (٤-٢,٥ × ٣,٥-١,٥ ملم) مع نشوء

برعم احادي مستمر وقد تظهر البراعم من قاعدة ضيقة نسبيا.

- *M slooffiea*. الخلايا اسطوانية قصيرة (1,0-٤ × ١-٢ ملم), والتبرعم احادي مستمر على قاعدة عريضة. ولا يعرف بتكوين هذا النوع للخيوط الفطرية.
- *M globosa*. الخلايا الكروية (٨-٢,٥ ملم) والتبرعم احادي على قاعدة ضيقة. وبالمقارنة مع *M furfur* تكون صفات الـ *globosa* الشكلية المجهرية الطابع المستقر. تكون الـ *globosa*. خيوط قصيرة تشابه انابيب النباتات للـ *Candida albicans*. ومن جهة اخرى فانها تكون خيوط فطرية كاذبة دوما ما تتواجد في القشور الجلدية لمرض النخالية المبرقشة PV.
- *M restricta* الخلايا بيضاوي الى اسطواني (٢,٥-٤ × ١,٥-٣ ملم) مع نشوء برعم احادي مستمر وقد تظهر البراعم من قاعدة ضيقة نسبيا.

الميزات المظهرية Macroscopical

جميع انواع خمائر الملاسيزيا هي محبة للدهون, باستثناء *M pachydermatis*, لذلك في حالة النمو المختبري يجب ان يحفز النمو بالزيوت الطبيعية او غيرها من المواد الدهنية. الطريقة المستخدمة الاكثر شيوعا هو وسط Sabouraud dextrose اجار مع السايكلوهكسيمايد والاكثديون وزيت الزيتون، او كبديل اكثر شيوعا وتخصصا هو ديكسون اغار مع الجلسرول وال oleate احادية. وعلى أي من هذه الوسائط, تكون المستعمرات صفراء الى كريمة اللون، ملساء الى مجعدة قليلا، لامعة او باهتة مع حافات مفصصة قليلا. بعد مرور ٧ ايام في 32 درجة مئوية على وسط mDA (دكسن اكار المحور)، نلاحظ التنوع البيولوجي بين الانواع مثل:

- *M furfur* المستعمرة المفردة ذات قطر 4 الى 5 ملم باهتة اللون ذات طيات قليلة, زبدية الملمس الى ناعمة مع ارتفاع واضح وحواف مفصصة قليلا. طبيعة المستعمرة ملساء مع سهولة استحلاب الخلايا.
- *M sympodialis* المستعمرة المفردة ذات قطر ٦ الى ٨ ملم، مسطحة مرتفعة نوعا ما من الوسط، الكريمة شاحبة الى البني المصفر، اللامعة وملتساء زبدية الملمس, مع حواف ذات طيات دقيقة.

- *M slooffiea* المستعمرة المفردة مسطحة او نوعا مرتفعة ،ذات قطر ٣-٤ ملم ، لماعه وذات لون بني مصفر ، زبدية الملمس ,مع سطح شبه حشن وحواف ذات طيات دقيقة.
- *M globosa* المستعمرة المفردة مرتفعة ومجعدة ذات قطر ٣ الى ٤ ملم ، خشنة وجافة ، صفراء شاحبة ، قد تكون لماعه او باهتة ، مع حواف مفصصة بعض الشيء. في المزارع الاولية، تحاط المستعمرات بترسبات وفيرة كما في نوع ال *M sympodialis* المعقدة.
- *M restricta* المستعمرة المفردة صغيرة من 1 الى 2 ملم في المتوسط , مسطحة الى مرتفعة قليلا ، باهتة ذات لون بني مصفر شاحب ، قوية وجافة ، ذات حواف مفصصة ملساء مع بعض الارتفاع .

• التجارب البيولوجية و الكيمياء الحيوية:

➤ اختبار الكتاليز catalase Reaction

يستخدم هذا الاختبار بوضع قطرة من بيروكسيد الهيدروجين 3% وانتاج فقاعات الغاز يعتبر رد فعل ايجابى . (Guillot, et al., 1996).

➤ النمو على وسط ديكسون اغار المحور باستخدام درجات حرارة مختلفة (37°C ، 32°C ، 41°C)

يزرع معلق الخميرة (١٠° اخلية\مل) على وسط الدكسون اكار المحور المذكور مكوناته أنفا . تحضن الاطباق على درجات حرارة مختلفة (32°C ، 37°C ، 41°C) على التوالي.
(Prohic and Ozigovic, 2007).

➤ استخدام tween 20 ، 40 ، ٨٠

تحتاج خميرة ال *Malassezia* المحبة للدهون على متطلبات معقدة في الوسط الزرعي غنية بالدهون ، حيث وجدت هذه المتطلبات الخاصة مهمة لتشخيص وفصل الانواع الخمائر ، تختبر قدرة السلالات على تحقيق النمو على وسط

Sabouraud اجار (GPA) باستخدام 20, 40, 80, tween كل على حدة كمصدر اساسي ووحيد للدهون .

تؤخذ مقدار حلقتين من مزرعة خميرة الملاسيزيا بعمر 4-5 ايام وتعلق مع 3 مل من ماء منزوع المعادن معقم . يضاف هذا المعلق الفطري الى 18 مل السابروود اكار الذائب المحفوظ بدرجة 0C ثم يصب الخليط مباشرة في اطباق بتري 9 سم. تعمل حفر بقطر 2 ملم في هذه الاطباق بعد اكتمال تصلبها ، وتكرس هذه الحفر لاختبار ال tween 20 ، 40 ، 80 ، وتعلم بدءا من تركيز 20 باتجاه عقرب الساعة ، تملأ الحفر بمقدار 15 مايكرون تقريبا من كل منتج غير المعقم والمقسم بانابيب 2 mL eppendorf tubes .

ثم تحضن الاطباق لمدة 7-10 ايام بدرجة 32-34 درجة مئوية في بيئة رطبة . تقلب الاطباق رأسا على عقب في اليوم الثاني للحضن لمنع جفافها.

➤ وصف فعالية β - Glucosidase باستخدام متوسط Esculin

تمتلك انواع الملاسيزيا على انزيم β - Glucosidase القادر على تحليل الاصرة الكلوكوسيدية للاسكولين وتحرر الكلوكوز والاسكوليتين. يتفاعل الفينول مع الحديد لانتاج اللون الاسود.

تحقن الانابيب الحاوية على وسط الفينول بمزرعة الخميرة بطريقة الوخز المركزي باستخدام اسلاك البلاطين ، وتحضن بدرجة 32 درجة مئوية. بدون الحاجة الى احكام اغلاق غطاء الانابيب، تفحص يوميا لمدة 5 ايام. يثبت التفاعل الموجب بواسطة تغير لون الوسط الزرعي الى الاسود، بينما يثبت اختفاء اللون الاسود الافتقار لوجود فعالية هذا الانزيم.

➤ تحديد *Malassezia furfur* باستخدام L- tryptophan بدلا من البيتون

يستخدم وسط الدكسون المحور باستبدال البيتون بالترتوفان بكمية متساوية (0.6 %) للزرع وانتاج الصبغة. بعد تعقيم الوسط وتبريده بدرجة حرارة الغرفة ، تمسح خلايا

الخميرة على الوسط الزرعي باستخدام swab معقم . ثم تحسن الاطباق بدرجة ٣٢ درجة مئوية مدة ٢-٤ أسابيع. نلاحظ انتشار صبغة بنية خاصة خلال الوسط فقط لنوع ال *furfur* *Malassezia* وذلك لاستخدام هذه الخميرة بالذات للترتوفان كمصدر وحيد للنيروجين.

اختبار تحديد الهوية الجزيئية

اصبح من الواضح ان ثمة حاجة الى نهج الجزيئية لتشخيص افضل , وكذلك فهم ديناميات المجتمع لل *Malassezia* ، على سبيل المثال وجد ان 13.8% من العزلات المشخصة مظهرها كانت خاطئة بعد اجراء التشخيص الجزيئي و تحديد تسلسل الجزيئية باستخدام تحليل D1/D2 للحمض الريبى الديوكسى (LSU rDNA) ومنطقة ITS1+2 regions .
ومن الجدير بالذكر، ان ال PCR وطرق تسلسل القواعد المستخدمة لدراسة التنوع البايولوجي لخميرة الملاسيزيا ، وكذلك تلك المستخدمة لدراسة تركيب مجتمع الملاسيزيا على الجلد وعلم الاوثة الجزيئية غالبا ما تكون متماثلة والتمميز بينها ليس دائما واضحا.

▪ عزل الحمض النووي DNA

تم استخلاص الحامض النووي من ٣٠ عزلة باستخدام الخطوات التالية لاستخلاص genomic DNA من الخميره:

- ١- تخلط كمية قليلة من الخميرة النامية على وسط الدكسون اكار المحور مع ٣٠٠ ملغ من الخرز الزجاجية و ٣٠٠ مايكروليتر من lysis buffer (Tris-HCL 100mM Ph=8, EDTA 30mM, SDS 0.5% w/v) في 1.8ml cryotube ثم تسحق معا باستخدام جهاز homogenizer (Speed Mill Plus) لمدة دقيقة الى دقيقتين.
- ٢- ثم تسخن بدرجة 100°C لمدة ٢٠ دقيقة ثم تمزج مع ١٥٠ µl من استات الصوديوم.
- ٣- بعد ذلك, تحفظ بدرجة 20°C- لمدة 10 دقائق, ثم تطرد مركزيا فى 12000 غم لمدة 10 دقيقة بدرجة 4°C .

٤- ثم يستخرج الراشح بعد خلط المحلول السابق بنفس الحجم من الفينول -الكلوروفورم- ايزوامايل الكحول] (25:24:1) بعد طرده مركزيا 12000 g لمدة ١٠ دقيقة بدرجة 4⁰ C .

٥- ثم يستخرج الراشح بعد خلط المحلول السابق بنفس الحجم من الكلوروفورم بعد طرده مركزيا ١٢٠٠٠ غم لمدة ١٠ دقيقة بدرجة 4⁰ C .

٦- ثم يؤخذ الراشح الحاوي على DNA ويرسب باضافة كمية متساوية من الايزوبروبانول بدرجة 20⁰ C- لمدة عشر دقائق بعد طرده مركزيا ١٢٠٠٠ غم لمدة ١٠ دقيقة بدرجة 4⁰ C .

٧- يهمل الايزوبروبانول ويغسل ال DNA مع 300 µl من الايثانول ٧٠ % بعد طرده مركزيا ١٢٠٠٠ غم لمدة ١٠ دقيقة بدرجة 4⁰ C .

٨- ثم يهمل الايثانول ويجفف ال DNA ويرشح مع ٥٠ مايكروليتر من الماء المقطر المعقم بعد خلطه قليلا.

*يستخدم ١ مايكروليتر من المحلول الناتج من الاستخلاص كقالب لتفاعل ال PCR .

* يكشف عن ال DNA المستخلص باستخدام الترحيل الكهربائي على جل الاكاروز مع الاثيديوم برومايد تحت ال U.V. transiluminator

▪ اعداد برنامج ال PCR

تم تضخيم منطقة 5.8S من الحامض النووي الرايبوسومي rDNA complex والمناطق المجاورة من ITS1 and ITS2 باستخدام زوجين من البادئات هما (ITS1-ITS4) و (V9G - LS266). ويشمل البرنامج الخطوات التالية:

١- اعداد البادئات primers

تم تجهيز زوجي البادئات اعلاه بواسطة شركة Iran \ Cinna Gen بشكلها المجفف بالتجميد . ثم تم تذويبها في ماء مقطر معقم منزوع الايونات للوصول الى ١٠ ملم كتركيز نهائي ثم خزنت بالتبريد العميق لحين الاستخدام كما موضح في الجدول ادناه:

جدول (٢-٣) البادئات المستخدمة في تفاعل الـ PCR

primers	Sequences (5'-3')	Size of Product	References
ITS1	(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')	~509 bp	(White, <i>et al.</i> , 1990)
ITS4	(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	~509 bp	(White, <i>et al.</i> , 1990)
V9G	(5' TTACGTCCCTGCCCTTTGTA 3')	~1700 bp	(Ende & Hoog, 1999)
LS266	(5' GCATTCCCAAACAACCTCGACTC 3')	~1700 bp	(Masclaux, <i>et al.</i> , 1995)

٢- اعداد خليط تفاعل الـ PCR.

اجريت تفاعلات الـ PCR باستخدام جهازين Thermo-cycler and Flex Cycler حيث يوضح الجدول (٢-٤) المكونات الداخلة في هذه التفاعلات.

جدول (٤-٢) المكونات المستخدمة في تفاعل الـ PCR.

No.	Components	Volume (µl)	Concentration
1	Red pre-mix*	12.5	1X
2	ITS1 or V9G primers(30 pmol)	1	0.5 µ
3	ITS4 or LS266 primers(30 pmol)	1	0.5 µ
4	Template DNA	1	<250 ng
5	Nuclease Free water	Up to a final volume of 25 µl	N.A

***Red pre-mix:** عبارة عن مزيج رئيسي للـ PCR يحوي كل المكونات المطلوبة للتفاعل عدا قالب الـ DNA والبادئة وتشمل (٢٥ مايكروليتر من 2 Taq DNA Polymerase × Master Mix Red) (Ampliqon; Skovlunde, Denmark).

٣- برنامج التضخيم

يظهر الجدول ادناه شروط التفاعل باستخدام زوج البادئات ITS1 - ITS4

جدول (٥-٢ أ) برنامج التضخيم الـ PCR باستخدام زوج البادئات ITS1 - ITS4 .

No. of cycle	Steps	Temperature	Time min.
1	Initial denaturation	95 ⁰ C	5.00
35	Denaturation	95 ⁰ C	0.35
	Annealing	55 ⁰ C	0.50
	Elongation	72 ⁰ C	1.00
1	Final extension	72 ⁰ C	7.00

اما الجدول ادناه يوضح شروط التفاعل باستخدام زوج البادئات V9G- LS266

جدول (٥-٢ ب) برنامج التضخيم الـ PCR باستخدام زوج البادئات V9G- LS266

No. of cycle	Steps	Temperature	Time min.
1	Initial denaturation	95 ⁰ C	5.00
40	Denaturation	95 ⁰ C	0.35
	Annealing	52 ⁰ C	0.50
	Elongation	72 ⁰ C	2.00
1	Final extension	72 ⁰ C	7.00

٤- الكشف عن منتجات PCR.

تم ترحيل الحامض النووي المضخم باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي مع الاكاروز جل ١,٢ % وال TBE buffer المصبغة بصبغة الاثيديوم برومايد ، ثم يكشف عنها بجهاز ال Gel Documentation للتأكد من صحة تضخيم الـ PCR .

٥- التسلسل

لتمييز تلك العزلات التي لم يكن التشخيص المظهري والجزئي مفيد بشكل واضح ، اضافة الى ادخال بيانات تسلسل السلالات في البصرة ، تم اخضاع ١٣ عزلة لاختبار تسلسلها. نقلت نواتج ال ITS PCR لكل عينة معزولة باستخدام زوج البادئ V9G and LS266 الى انبوب ١,٥ مايكروليتر ثم ارسلت لاختبار التسلسل باستخدام محلل وراثي ABI Prism™ 3730 لشركة Microsynth سويسرا . تم تحرير التسلسلات الناتجة وارسالها الى NCBI database باستخدام معايير قياسية لتحديد هوية الانواع الهامة. 20-26

٦- تحليل النشوء والتطور

لبحث العلاقات الوراثية تم تحليل تسلسل النيوكليوتايد لمنطقة ال ITS1-ITS2 للحامض النووي الرايبوسومي لكل من العزلات ال ١٣ لخميرة الملاسيزيا ، باستخدام MEGA 5.05 ومقارنتها مع الانواع المختلفة للملاسيزيا الموجودة في بنك الجينات ، (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) . تم هذا التحليل باستخدام نظام (UPGMA) المتضمن تسلسل ITS1-ITS2 لفطر *Aspergillus niger* (NT_166520.1) كمجموعة خارجية.

دراسة داخل الجسم الحي

استهدفت الدراسة الحالية اثبات وتحديد امكانية تحقيق النظرية الجرثومية تجريبيا بحث مرض النخالية المبرقشة (المعزول من الانسان) في نموذج حيواني، وتحديد التشابه بين هذا المرض في الانسان والجرذان. استخدم ٢٠ حيوان مختبري من نوع الجرذان البيضاء (*Rattus norvegicus*) ، تبلغ بالعمر بين شهر الى شهرين ووزنها يتراوح بين ١٥٠-٢٠٠ غم ، حيث تم تنميتها تحت ظروف قياسية. تم تقسيم الجرذان الى مجاميع (كل مجموعة تحوي ٦ جرذان عدا مجموعة السيطرة تحوي جردين):

١. مصابة بالحقن داخل الجلد. Intradermal.

٢. مصابة بتقنية البقع ، (الاحتفاظ بالمسبب المرضي ضمن منطقة محددة).

٣. مصابة بتقنية الوز (احداث شقوق في طبقة البشرة). الشكل(2-2)

٤. مجموعة السيطرة دون اي اصابات , تحقن بال normal saline .

جميع الفئات المذكورة اعلاه مقسمة الى مجاميع فرعية وكل واحدة تصاب على حده بمستخلصات الخميرة) باستثناء مجموعة السيطرة:

- ١- 1ممل من معلق Malassezia. furfur (١٠^٨-١٠^٩ خلية) لمزرعة فنية.
 - ٢- 1ممل من معلق Malassezia globosa (١٠^٨-١٠^٩ خلية) لمزرعة فنية.
- شوهدت الامراضية والتغيرات السريرية على جلد الفئران بعد مرور اسبوعين.

دراسة التغيرات النسيجية المرضية

درست التغيرات النسيجية histopathologically للجردان المصابة و مجموعة السيطرة بواسطة اخذ قطعة جلد بيضوية الشكل ذات قطر 10 ملم، تم تثبيتها بالفورمالين ١٠ ٪ . ثم اخذت مقاطع بسك 6mm وتم تصبيغها بنوعين من الصبغات الاولى Hematoxylin- Eosin والثانية PAS (periodic acid Schiff's) stain للكشف عن الكلايوجين في الانسجة ، ثم طمرت هذه المقاطع بالبرافين. تصطبغ الكلايوجين والميوسين والفطريات بلون احمر مزرق بينما تصطبغ الانوية بلون ازرق.



شكل (٢-٢) تقنية الوخز (احداث شقوق في طبقة البشرة).

التحليل الاحصائي

تم اجراء التحليل الاحصائي للبيانات باستخدام برنامج (SPSS) اصدار ٢٤ ، ٢٠١٦ . حيث استخدمت اختبارات Chi-square (χ^2) and Fisher's Exact لتحديد الاختلافات بين مجاميع الدراسة . اجريت مقارنات للنسب بواسطة crosstab باستخدام اختبار مربع كاي لتقييم اهمية الفرق بين المجموعات ، بمستوا معنوي يقدر ب $P < 0.05$ وبمستوى معنوي عالي يصل الى $P < 0.001$.

ج-نتائج الاختراع

١-النتائج التقليدية

الخصائص الديموغرافية للمرضى

تضمنت الدراسة ٩٥ مريضا بالنخالية المبرقشة (٤٠ انثى و ٥٥ ذكر) ، تتراوح اعمارهم بين ال ٤-٧٣ سنة. 85 عينة (89.5%) من المجموع الكلي للمرضى سجلوا نتائج ايجابية لاختبار ال KOH والزرع على وسط الدكسون المحور والذي يحوي المتطلبات الخاصة لنمو خميرة الملاسيزيا ، بينما سجلت ١٠ عينات (10.5%) نتيجة سلبية.

يبين الجدول (٣-١) توزيع الخصائص الديموغرافية تبعا للجنس ، والتي اظهرت النتائج التالية:

- ١- الفئات العمرية :هناك اختلافات كبيرة بين الذكور والاناث $P>0.05$ ،والمصابون بال PV كانوا الاكثر ضمن الفئة العمرية (١٢-٢٠ سنة فى كلا الجنسين، الشكل (٣-١) بينما هناك اختلافات كبيرة بين الفئات العمرية فى كل جنس بمفرده وكذلك ضمن الاجمالي. $P\leq 0.05$.
- ٢- الإقامة والحالة الزوجية :هناك اختلافات كبيرة بين الذكور والاناث فى هذه الجماعات الشكل (٣-٢ و ٣-٣) على التوالى , (سواء فى كل جنس وحده او ضمن الاجمالي. $P>0.05$
- ٣- المهنة :هناك اختلافات كبيرة بين الذكور والاناث الشكل (٣-٤) اما كل جنس على حده؛ $P\leq 0.05$ فى لا توجد فروق كبيرة بين اجمالى عدد المجموعات. $P>0.05$
- ٤- عادة التدخين :-اختلافات كبيرة بين الذكور والاناث للمرضى المدخنين وغير المدخنين ، الشكل (٣-٥) وكذلك ضمن العدد الاجمالي و كل جنس وحده ف. $P\leq 0.05$
- ٥- التغذية :لا توجد اختلافات كبيرة بين الذكور والاناث الشكل (٣-٦), $P>0.05$ فى حين سجلت اختلافات كبيرة بين نوع التغذية فى كل جنس على حده وكذلك ضمن الاجمالي $P\leq 0.05$

جدول (٣-١) الخصائص الديموغرافية لمرضى النخالية المبرقشة

P القيمة	المجموع		الذكور		الاناث		المتغيرات
	العدد(%)		العدد(%)		العدد(%)		
	95	100.0	55	57.9	40	42.1	
.721	3	3.2	2	2.1	1	1.1	2-11سنة
	35	36.8	18	18.9	17	17.9	12-20سنة
	23	24.2	16	16.8	7	7.4	21-30سنة
	22	23.2	12	12.6	10	10.5	31-40سنة
	12	12.6	7	7.4	5	5.3	> 41سنة
	وقدره0.001		وقدره0.001		وقدره0.001		قيمةP
.793	46	48.4	26	27.4	20	21.1	وسط
	49	51.6	29	30.5	20	21.1	الاجهزة الطرفية
	.689		95).		0.1		قيمة P
وقدره 0.001	37	38.9	32	33.7	5	5.3	عامل
	27	28.4	4	4.2	23	24.2	غير موظف
	31	32.6	19	20.0	12	12.6	اخرين
	.403		وقدره0.001		وقدره0.001		قيمة P
وقدره 0.001	79	83.2	40	42.1	39	41.1	لا
	16	16.8	15	15.8	1	1.1	نعم
	وقدره0.001		وقدره0.001		وقدره0.001		قيمة P
.930	48	50.5	28	29.5	20	21.1	الزواج
	47	49.	27	28.4	20	21.1	Un-متزوج
	.921		0.1		0.1		قيمة P
-وامتد نطاق	87	91.6	50	52.6	37	38.9	مختلطة
	3	3.2	3	3.2	0		منتجات اللحوم
	5	5.3	2	2.1	3	3.2	النباتية
	وقدره0.001		وقدره0.001		وقدره0.001		قيمة P

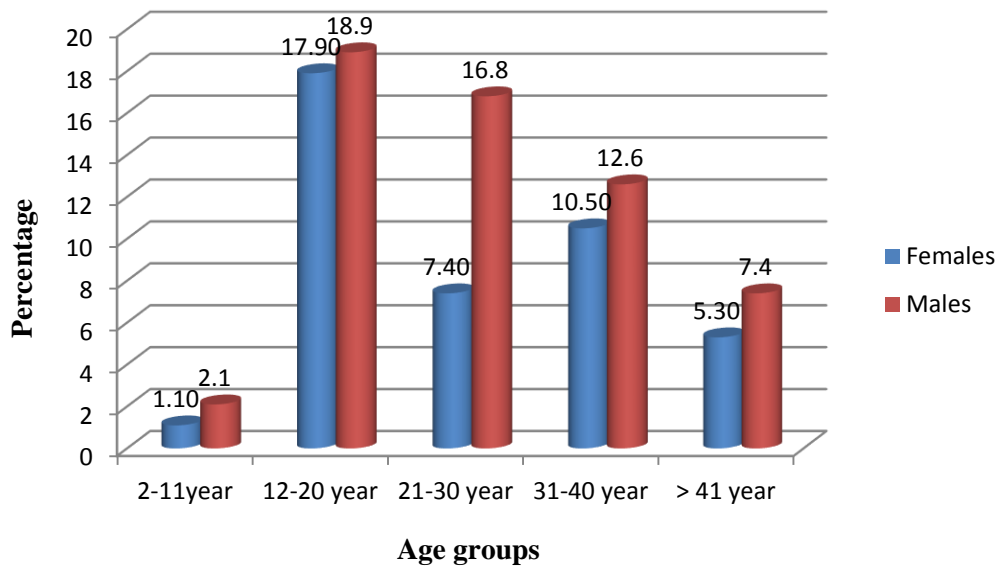


Figure 3.1 Distribution of PV patients according to age groups and gender

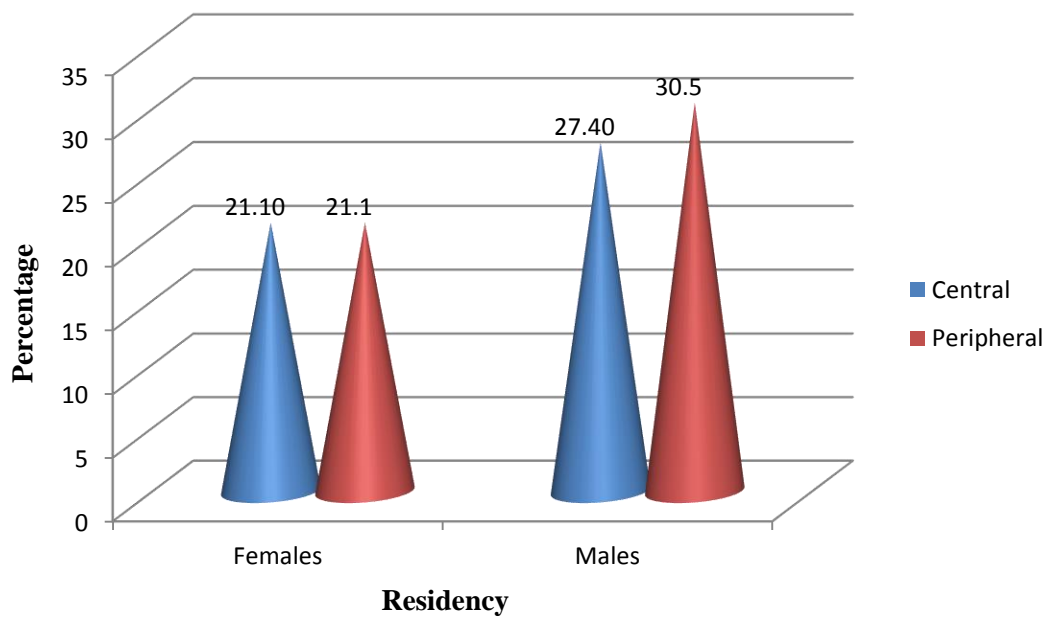


Figure 3.2 Distribution of PV patients according to residency and gender

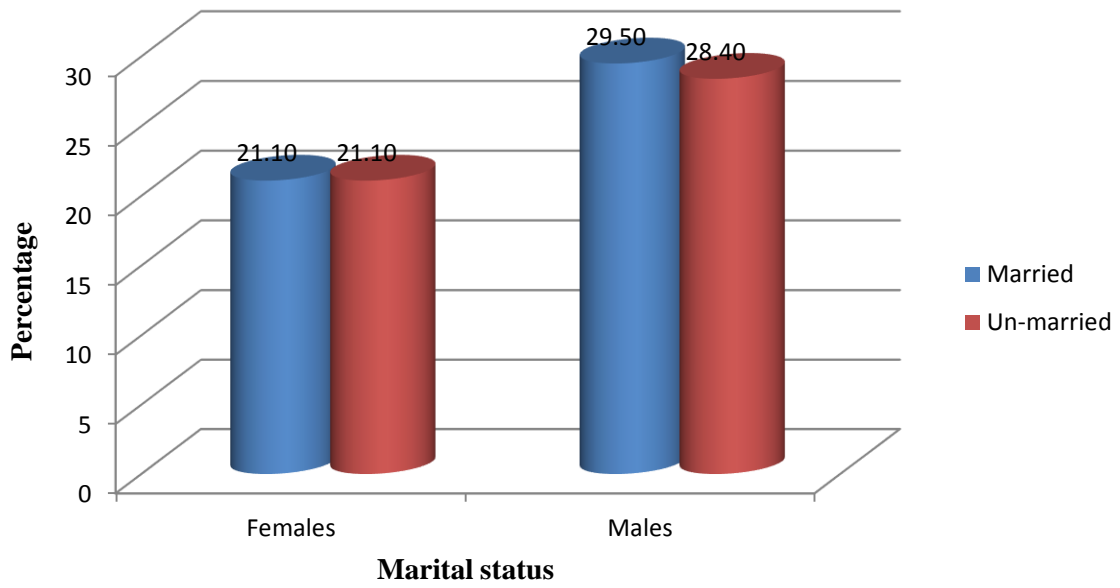


Figure 3.3 Distribution of PV patients according to marital status and gender

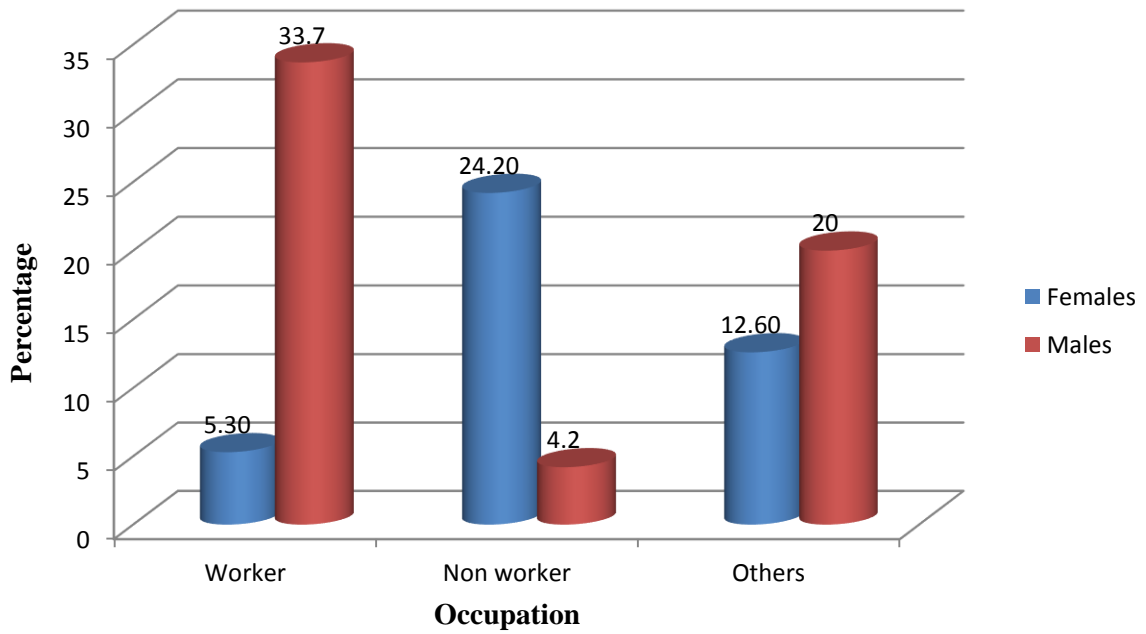


Figure 3.4 Distribution of PV patients according to occupation and gender

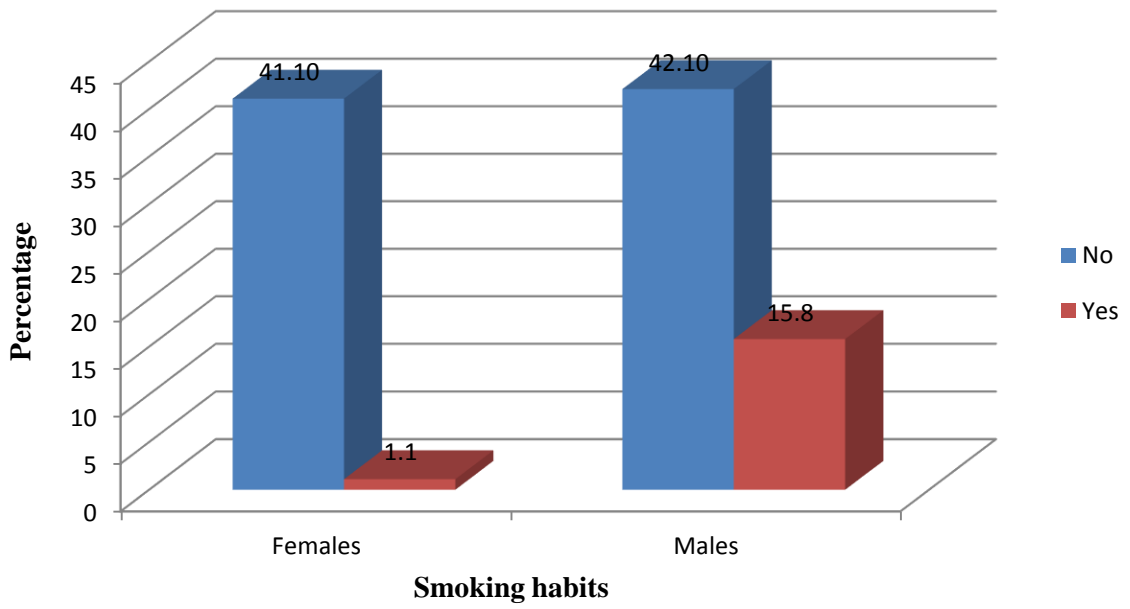


Figure 3.5 Distribution of PV patients according to smoking habits and gender.

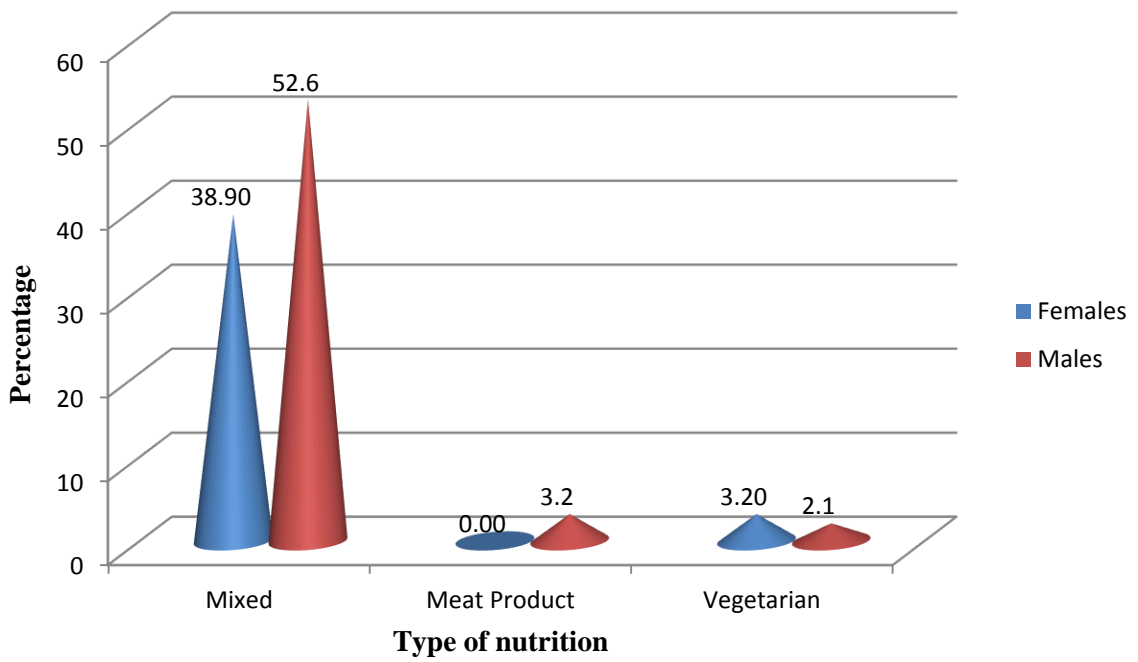


Figure 3.6 Distribution of PV patients according to nutrition and gender

الخصائص السريرية للمرضى

وفيما يلي بعض النتائج التي تعنى بالخصائص السريرية والعلامات والاعراض للمرضى وفقا لاستبيان وتصميم هذه الدراسة التي تظهر في الجدول (٢-٣ ، ٣-٣ ، ٤-٣ على التوالي).

الجدول (٢-٣) يبين ان معظم المرضى 51.6% (ذكور واناث) ممثلة في الجلد من النوع الثالث Type 3 skin شكل (٣-٧). ولا يوجد اختلافات كبيرة بين الجنسين، $P > 0.05$. بينما هناك اختلافات كبيرة بين انواع الجلد الذكور والاناث كل على حده وكذلك في اجمالي المرضى. $P \leq 0.01$ وحسب طبيعة الجلد، وجد مرض النخالية المبرقشة اكثر تواترا بين المرضى ذو الجلود الدهنية 70.5% في كلا الذكور والاناث شكل (٣-٨). مع اختلافات كبيرة بين طبيعة الجلد في كل جنس على حده وضمن اجمالي المرضى. $P \leq 0.05$.

معظم مرضى النخالية المبرقشة لا يمتلكون تاريخ مرضي عائلي موجب 85.3% شكل (٣-٩)، وغير مصابين بداء السكري ٩٥,٥% شكل (٣-١٠)، ولا يمتلكون أي تاريخ موجب للحساسية وخاصة ل atopy dermatitis ٩٠,٥% شكل (٣-١١). وقد سجلت ملاحظة هامة في هذه الدراسة ان جميع المرضى PV يعانون من اسرافا في التعرق hyperhidrosis.

الجدول ٢-٣ الخصائص السريرية للمرضى

P القيمة	المجموع	الذكور	الاناث	المتغيرات	
	العدد(%)	العدد(%)	العدد(%)		
	95 100.0	55 57.9	40 42.1		
.690	5 5-3	2 2.1	3 3.2	T2	انواع البشرة
	49 51.6	28 29.5	21 22.1	T3	
	40 42.1	24 25.3	16 16.8	T4	
	1 1.1	1 1.1	0	T5	
	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	قيمة P	
.339	4 4-2	2 2.1	2 2.1	التنظيف الجاف	طبيعة الجاد
	67 70.5	42 44.2	25 26.3	الزيتية	
	24 25.3	11 11.6	13 13.7	طبيعية	
	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	قيمة P	
.090	14 14.7	11 11.6	3 3.2	ايجابيا	تاريخ العائلة
	81 85.	44 46.3	37 38.9	السلبي	
	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	قيمة P	
.744	4 4-2	2 2.1	2 2.1	مرض السكري	الامراض المرتبطة
	91 95.8	53 55.8	38 40,0	Non-Diabetic	
	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	قيمة P	
(204);	9 9.5	7 7.4	2 2.1	ايجابيا	تاريخ الحساسية
	86 90.5	48 50.5	38 40,0	السلبي	
	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	قيمة P	

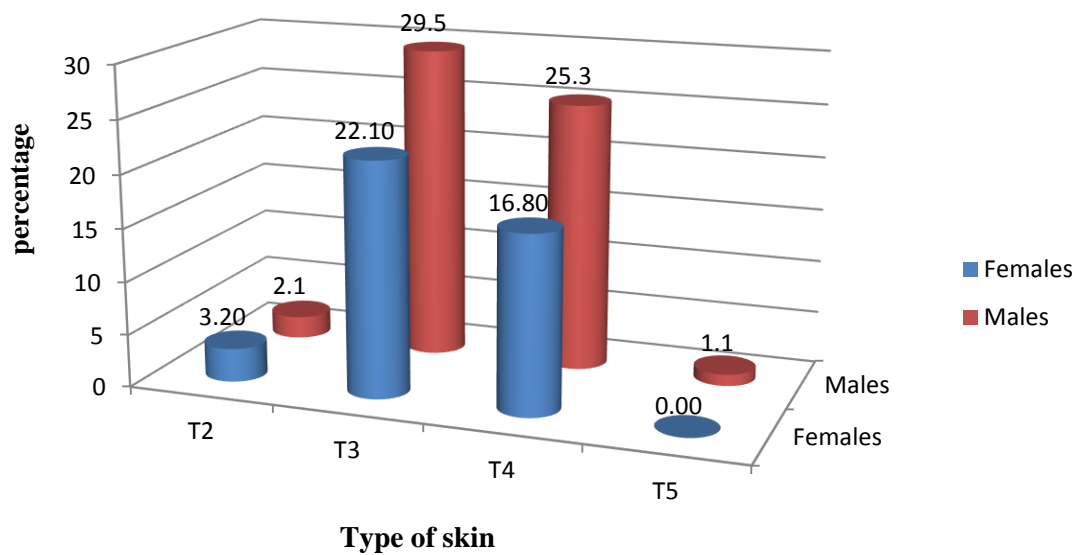


Figure 3.7 Distribution of PV patients according to skin type and gender

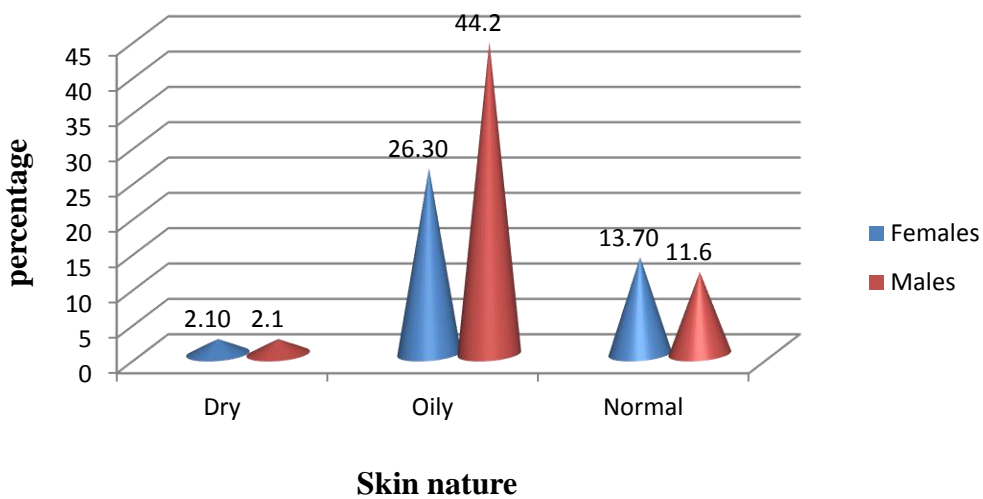


Figure 3.8 Distribution of PV patients according to skin nature and gender

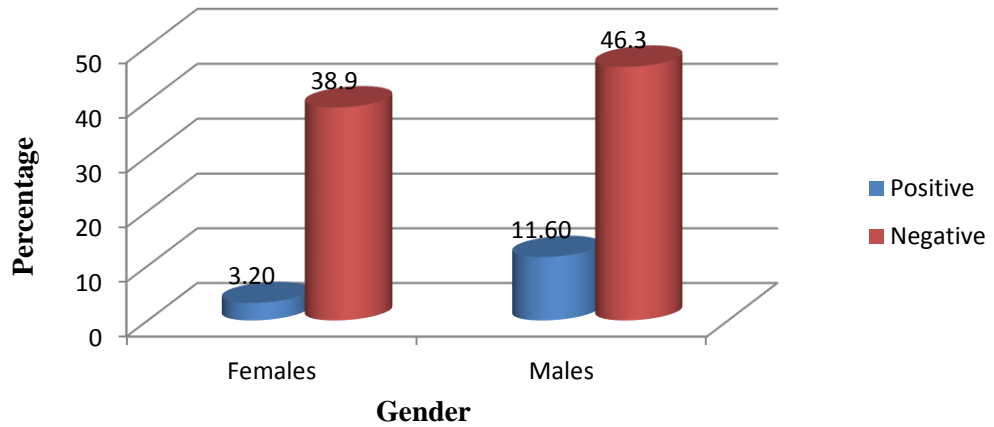


Figure 3.9 Distribution of PV patients according to family history and gender

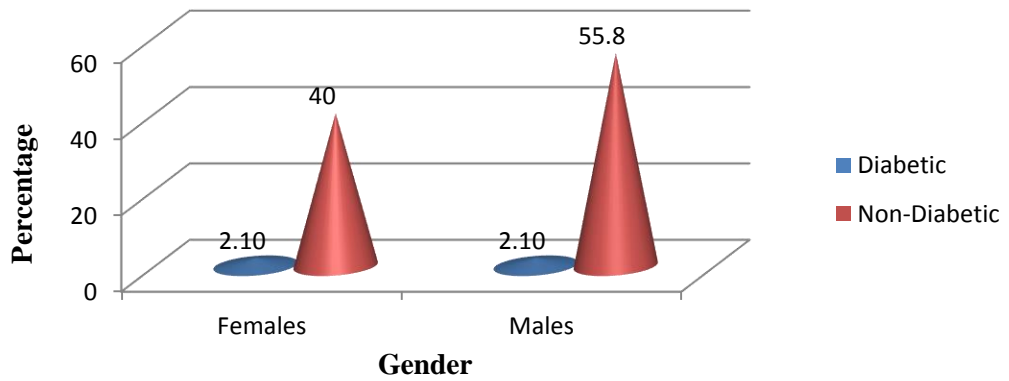


Figure 3.10 Distribution of PV patients according to associated disease and gender

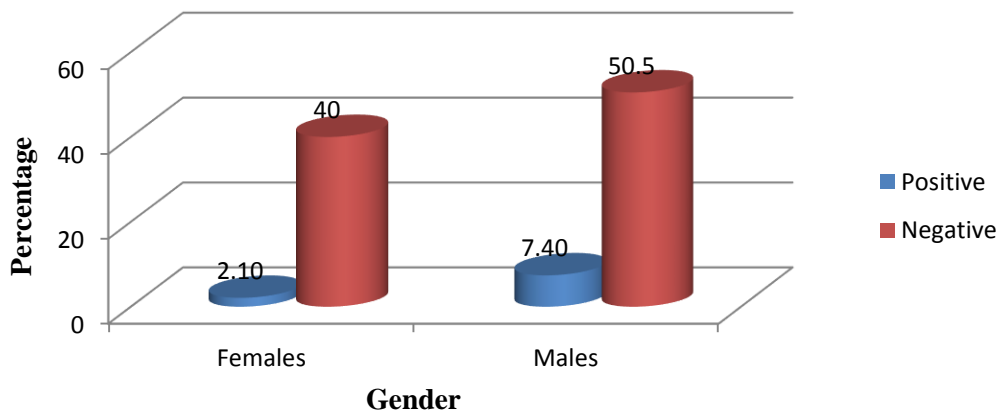


Figure 3.11 Distribution of PV patients according to allergy history and gender

ويبين الجدول (٣-٣) ان طريقة العدوى المتكررة لل PV اعلى بين المرضى الذكور 38.9% شكل (٣-١٢) ، فى حين ان 23% من الاناث لمرضى ال PV كانت طريقة الاصابة للمرة الاولى (recent) لشكل (٣-١٣) ولوحظت فوارق معنوية كبيرة بين الجنسين .وفيما يتعلق بمدى الاصابة بمرض ال PV فإن اغلبية المرضى 52.6% كانوا ضمن المجموعة اقل من عام واحد الشكل (٣-١٤) ، مع اختلافات كبيرة بين مدة المرض فى كل جنس على حده وضمن اجمالي المرضى . $P \leq 0.05$. حسب درجة خطورة المرض، فإن معظم المرضى لل PV من النوع الحاد severe مع انتشار اكثر للافات patches على منطقة الاصابة 51.6% الشكل (٣-١٥) ، ولا توجد فوارق هامة بين الجنسين $P > 0.05$ بينما هناك اختلافات كبيرة بين حدة المرض الشديد او متوسطة او خفيفة فى الذكور والاناث كل على حده وكذلك فى اجمالي المرضى . $P \leq 0.05$.

جدول (٣-٣) توزيع مرضى النخالية المبرقشة تبعا لعلامات المرض والجنس

P القيمة	المجموع	الذكور	الاناث	المتغيرات	
	العدد(%)	العدد(%)	العدد(%)		
		95 100.0	55 57.9	40 42.1	
.030	40 42.1	18 18.9	22 23.2	Recent	طريقة الاصابة
	55 57.9	37 38.9	18 18.9	Recurrent	
	0.1	وقدره 0.001	P Value		قيمة P
.995	50 52.6	29 30.5	21 22.1	Less than 1 Y	مدة المرض
	27 28.4	16 16.8	11 11.6	1-3 y	
	7 7.4	4 4.2	3 3.2	3-5 y	
	11 11.6	6 6.3	5 5.3	more than 5 y	
	0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	قيمة P
.656	33 34.7	17 17.9	16 16.8	Mild	شدة المرض
	13 13.7	8 8.4	5 5.3	Moderate	
	49 51.6	30 31.6	19 20.0	Severe	
	0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	قيمة P

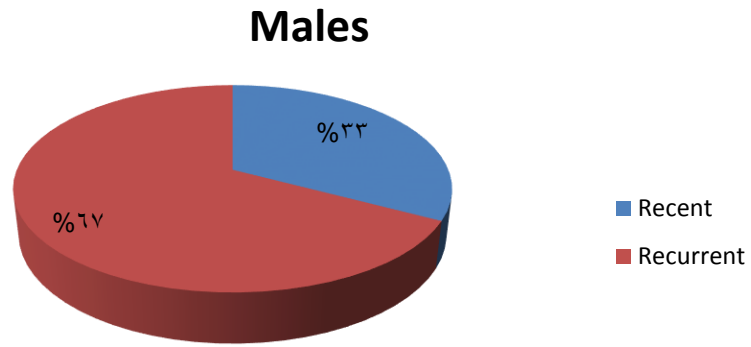


Figure 3.12 : Distribution of PV male patients according to recent and recurrent infection

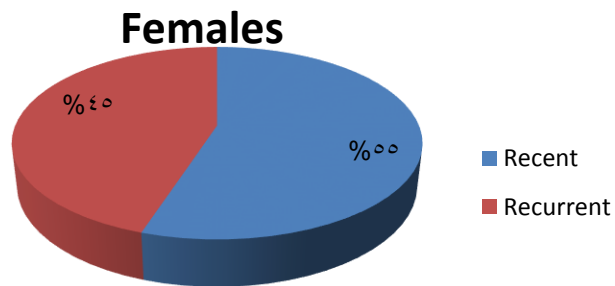


Figure 3.13 : Distribution of PV female patients according to recent and recurrent infection

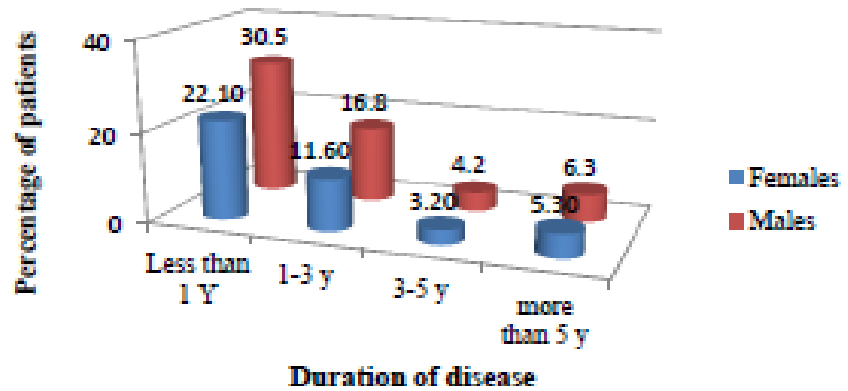


Figure 3.14: Distribution of PV patients according to the duration of disease and gender

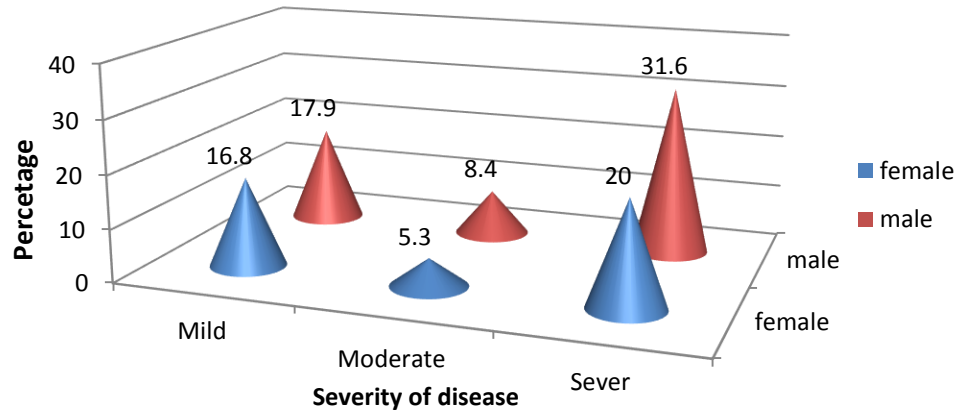


Figure 3.15: Distribution of PV patients according to the severity of disease and gender

يبين الجدول (٣-٤) توزيع انتشار البقع lesion لمرضى ال PV ونوع الجنس . وجد ان منطقة الجذع هي المنطقة الاكثر اصابة في كلا الجنسين ٥٤,٧% (الذكور شكل ٣-١٦) و (الاناث شكل ٣-١٧)، تتبعها منطقة الرقبة ١٧,٩% ثم منطقة الصدر ١١,٦% . هناك اختلافات معنوية بين الجنسين حسب موقع البقع في الجسم و اختلافات كبيرة في هذه مواقع للذكور والاناث كل على حده وكذلك في اجمالي المرضى $P \leq 0.05$.

وفيما يتعلق بلون البقع لمرضى ال PV ، فإن مرضى النخالية المبرقشة مع البقع ال hyperpigmented هي الاكثر ترددا في كلا الجنسين ٥٣,٧% ، حيث تمثلت بنسبة ٣٠,٥% في الاناث و ٢٣,٥% من الذكور شكل (٣-١٨) . بينما وجد ان البقع من نوع ال hypopigmented هي الاكثر شيوعا في الذكور عنه في النساء (٢٨,٤% و ٧,٤% على التوالي) شكل (٣-١٩) و شكل (٣-٢٠) . وهناك اختلافات معنوية بين الجنسين حسب تلون البقع و اختلافات كبيرة بين تلون البقع في الذكور والاناث كل على حده وكذلك في اجمالي المرضى $P \leq 0.05$. وقد وجدت البقع القشرية Scaly في كلا الجنسين في مرضى ال PV ٥٠,٥% شكل (٣-٢١) مع اختلافات كبيرة بين نوع البقع في الذكور والاناث كل على حده وكذلك في اجمالي المرضى. $P \leq 0.05$

الجدول (٣ - ٤) توزيع مرضى النخالية المبرقشة تبعا لخصائص البقع lesion والجنس

P القيمة	المجموع	الذكور	الإناث	المتغيرات	
	العدد(%)	العدد(%)	العدد(%)		
	95 100.0	55 57.9	40 42.1		
.057	17 17.9	11 11.6	6 6.3	Neck	موقع البقع
	1 1.1	1 1.1	0 0.0	Face	
	11 11.6	2 2.1	9 9.5	Chest	
	7 7.4	3 3.2	4 4.2	Back	
	1 1.1	0 0.0	1 1.1	Abdomen	
	6 6.3	3 3.2	3 3.2	Chest & back	
	52 54.7	35 36.8	17 17.9	Trunk	
	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	قيمة P	
.010	34 35.8	27 28.4	7 7.4	Hypo	لون البقع
	51 53.7	22 23.5	29 30.5	Hyper	
	4 4.2	2 2.1	2 2.1	Erythematous	
	6 6.3	4 4.2	2 2.1	Hypo & Hyper	
	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	قيمة P	
.147	11 11.6	3 3.2	8 8.4	Itchy	النوع البقع
	48 50.5	28 29.5	20 21.1	Scaly	
	27 28.4	18 18.9	9 9.5	Mixed	
	9 9.5	6 6.3	3 3.2	None	
	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	قيمة P	

Males

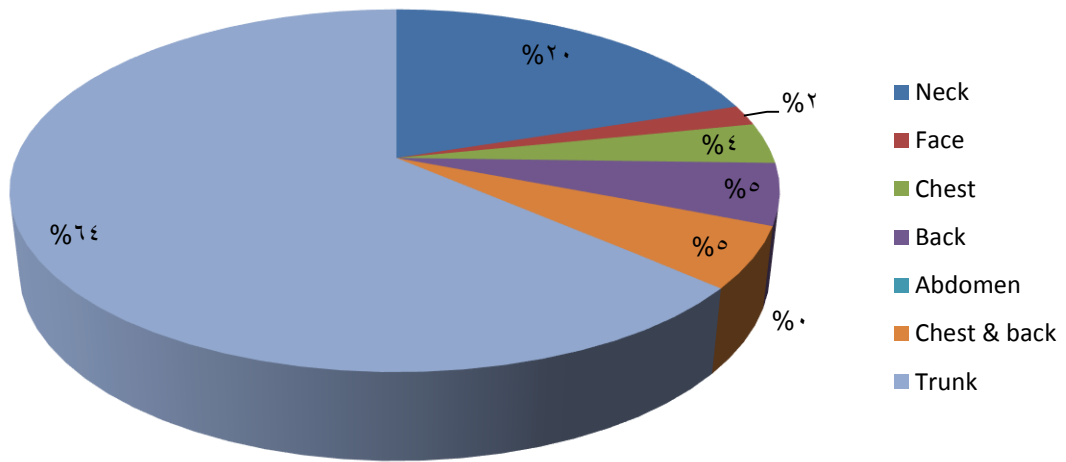


Figure 3.16: Distribution of PV male patients according to the lesion site

Females

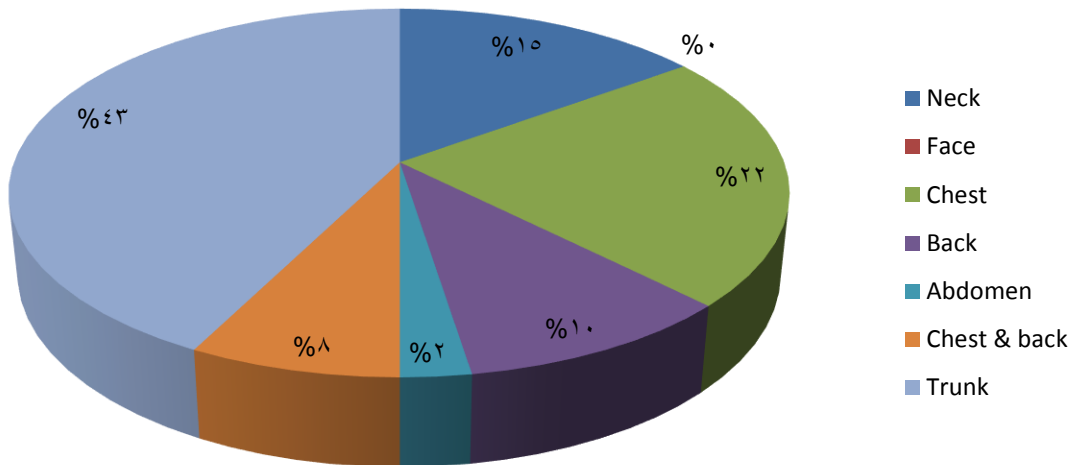


Figure 3.17: Distribution of PV female patients according to the lesion site

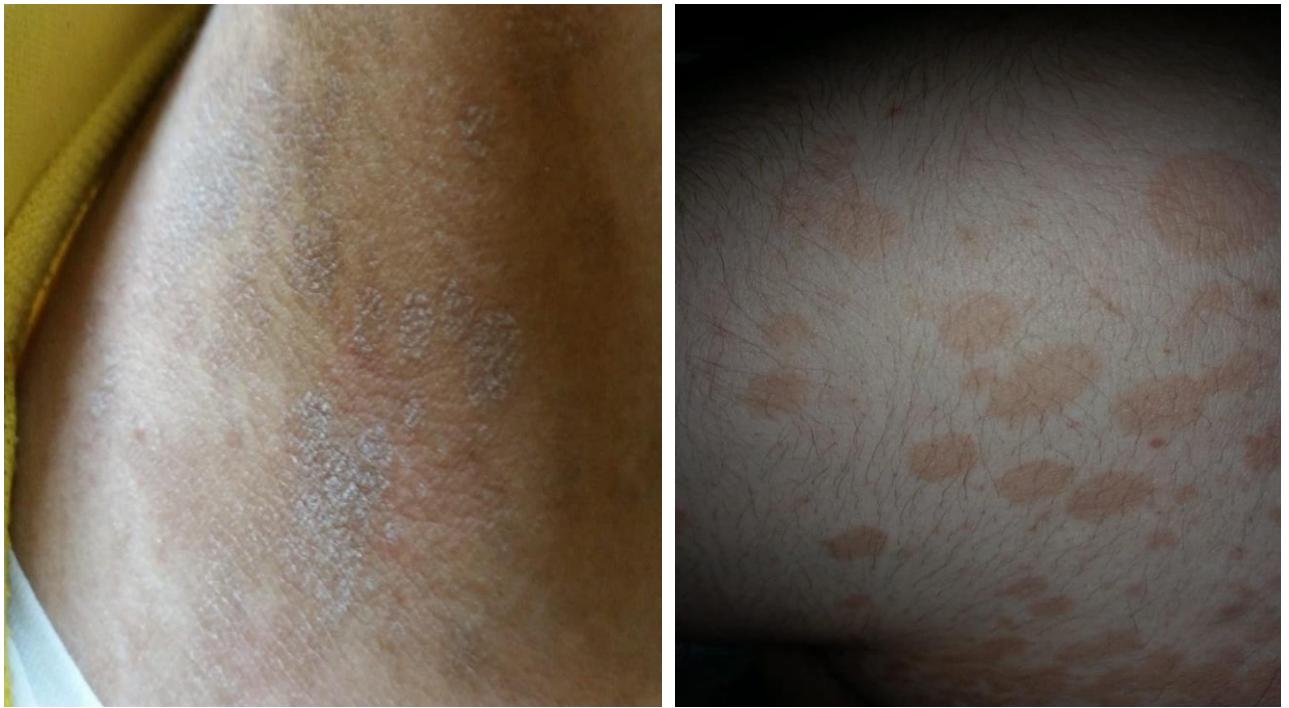


Figure 3.18 PV patients with hyperpigmentation lesions



Figure 3.19 PV patients with hypopigmentation lesions

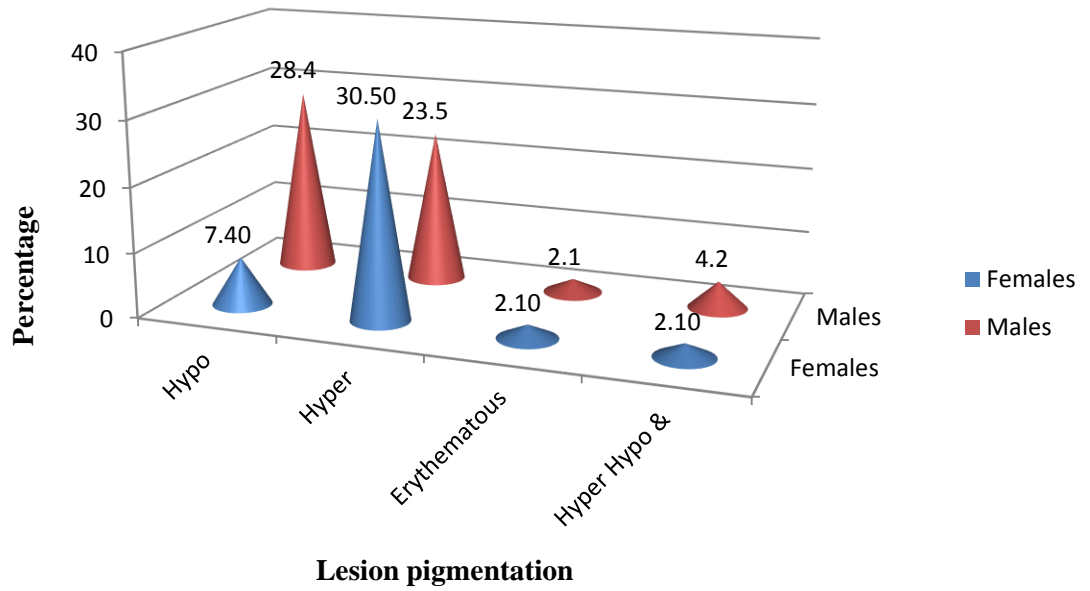


Figure 3.20: Distribution of PV patients according to lesion pigmentation and gender

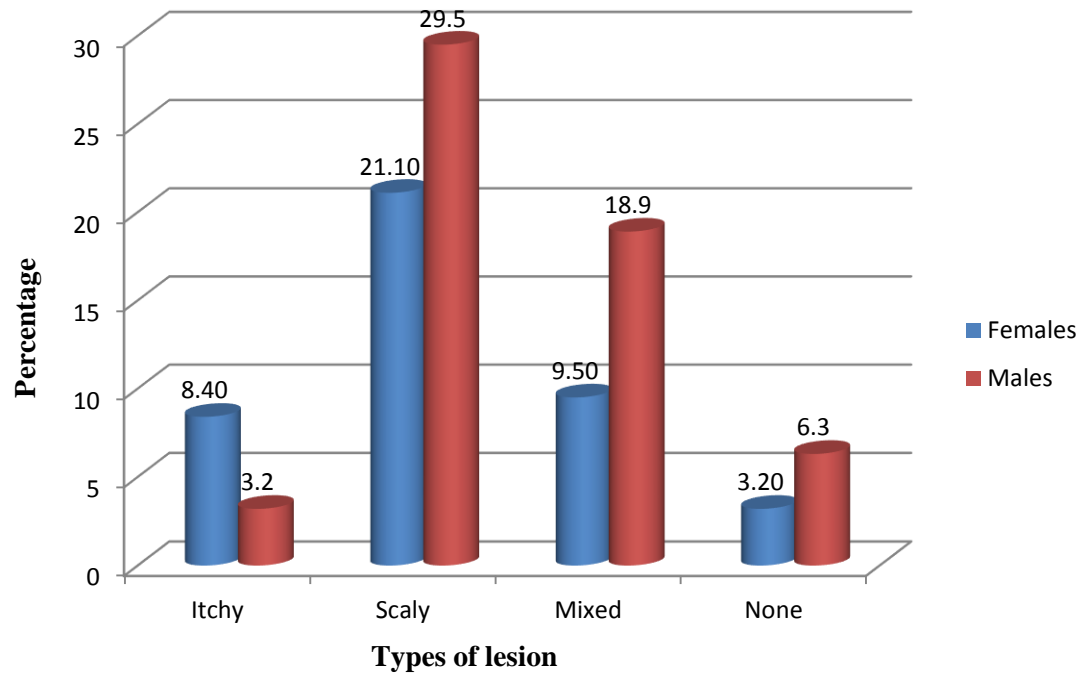


Figure 3.21: Distribution of PV patients according to lesion type and gender

٣- الدراسة الفطرية الوصفية Mycological results using phenotypic methods

بين الفحص الاولي للعزلات بالاعتماد على طرق مباشرة للفحص باستخدام ١٠ % KOH بوجود ما يسمى كرات اللحم والسباكتي شكل (٣- ٢٢) ، وطرق غير مباشرة باستخدام الزرع على وسط الدكسون المحور بالاضافة الى طرائق فحص المستعمرات مجهريا ومظهريا مع الاختبارات الكيمياء الحيوية ، ان نوع ال *Malassezia furfur* سجل في ٣٩ حالة (٤١,١ %) وهو العامل المسبب الاكثر ترددا ، يتبعه *M. globosa* حيث سجل في ٢٧ حالة (٢٨,٤ %) ، ثم *M.restricta* في تسع حالات (٩,٥ %) ، و *M. sympodialis* في ست حالات (٦,٣ %) واخيرا *M. slooffiae* في اربع حالات (٤,٢ %) ، جدول (٥-٣) شكل (٣- ٢٣ و ٣- ٢٤) .

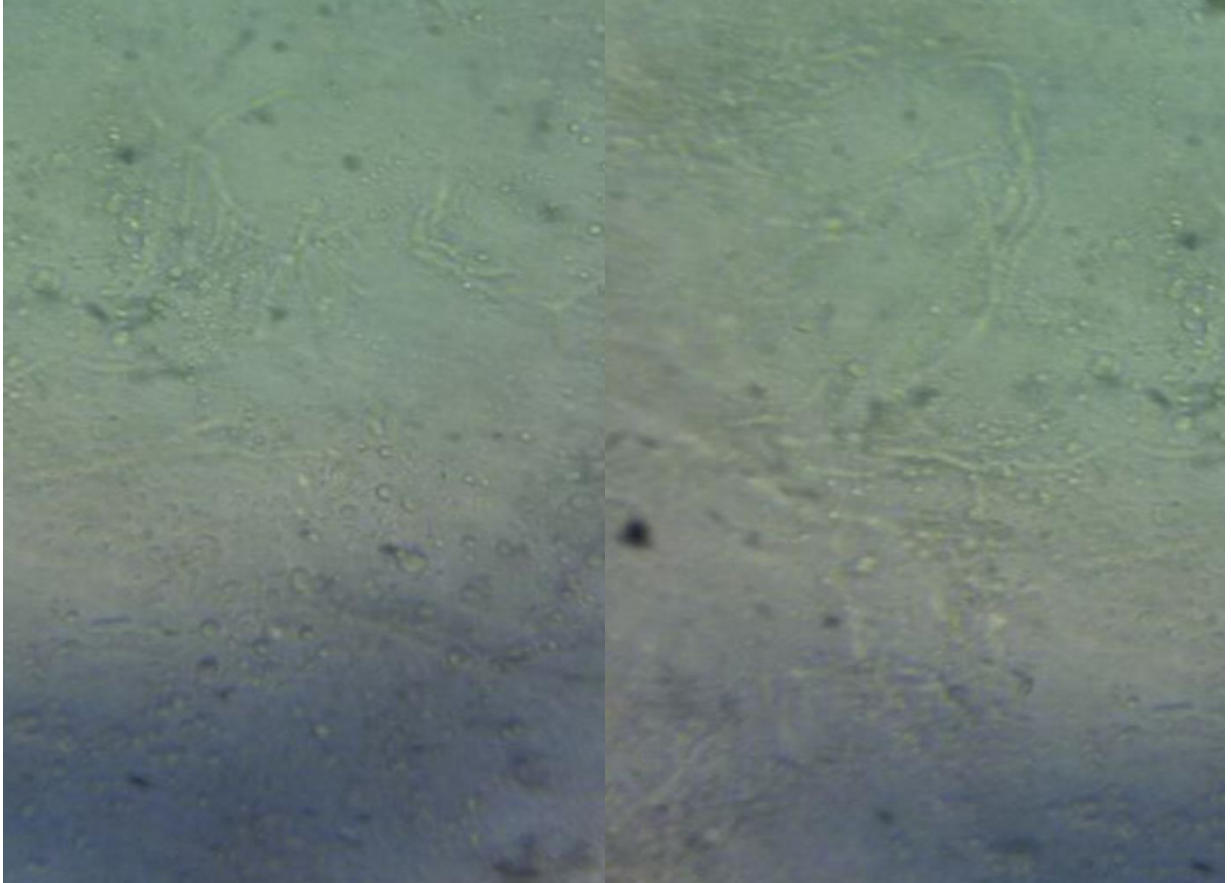


Figure 3.22: Hyphae and yeast (spaghetti and meat balls) with KOH

الجدول (٣ - ٥) العلاقة بين انواع ال Malassezia و الجنس

قيمة	المجموع		الذكور		الاناث		الانواع Malassezia
	العدد (%)		العدد (%)		العدد (%)		
	95	100.0	55	57.9	40	42.1	
.540	100.0	39	48.7	19	51.3	20	م . furfur
	100.0	27	59.3	16	40.7	11	م . globosa
	100.0	9	55.6	5	44.4	4	م . restricta
	100.0	6	66.7	4	33.3	2	م . sympodialis
	100.0	4	75.0	3	25.0	1	م . slooffiae
	100.0	10	80.0	8	20.0	2	السلبي
	.995		نسبة 0,05		وقدره 0.001		قيمة P

Males

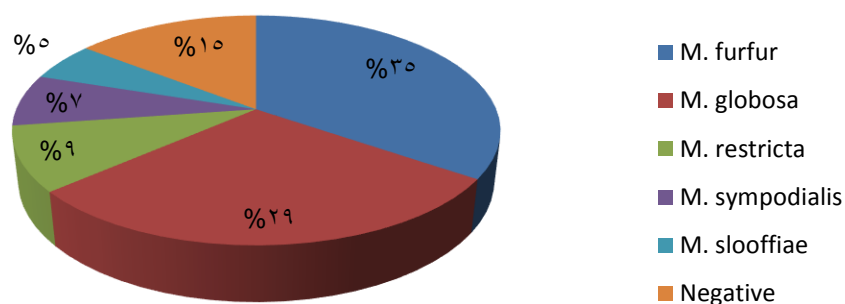


Figure 3.23: Distribution of *Malassezia* species among PV male patients

Females

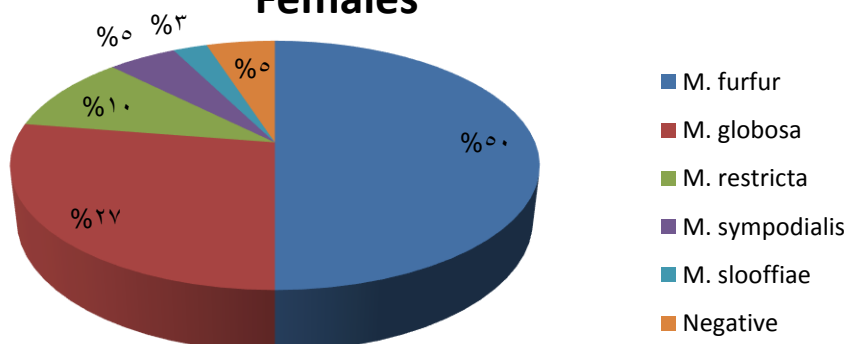


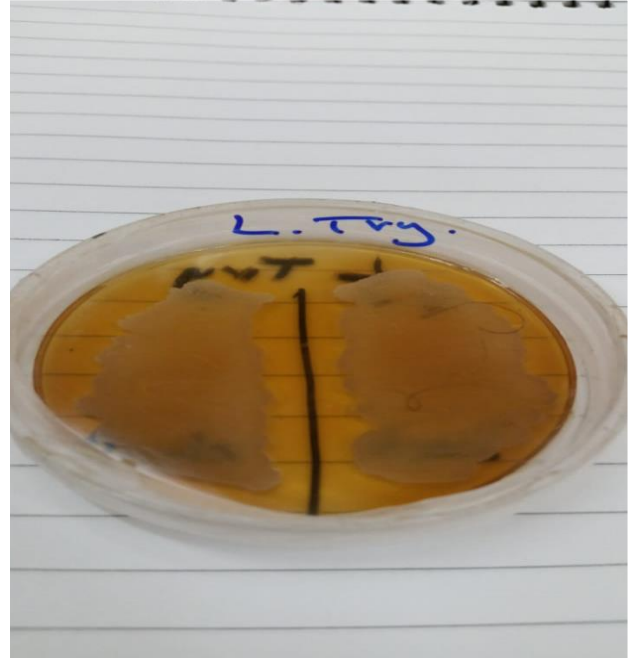
Figure 3.24: Distribution of *Malassezia* species among PV female patients

* نود الإشارة الى ان الصور التي ستعرض الان حصرية وخاصة بالدراسة الحالية وهي نتائج الطرق الجديدة المعورة والايوساط الجديدة المطورة وطرق العمل المبتكرة

1: *Malassezia furfur*



Macroscopical features
Growth on Modified Dixon
Agar



L-Tryptophane Dixon Agar
Positive (brown pigmentation)



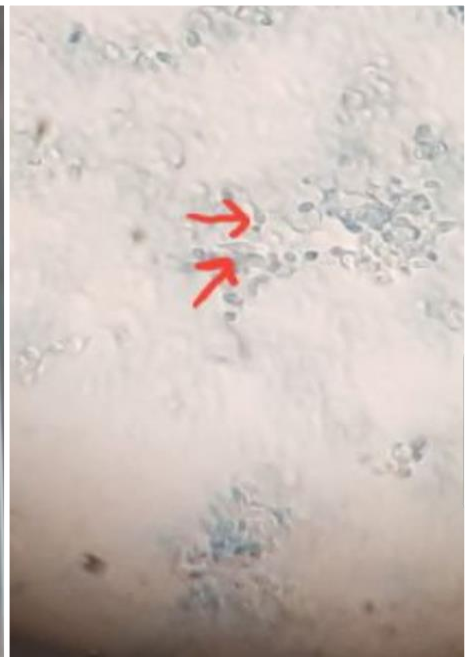
Esculin Test
variable



Growth on M Dixon
Agar Positive Growth
on 41°C



Catalase test
Positive

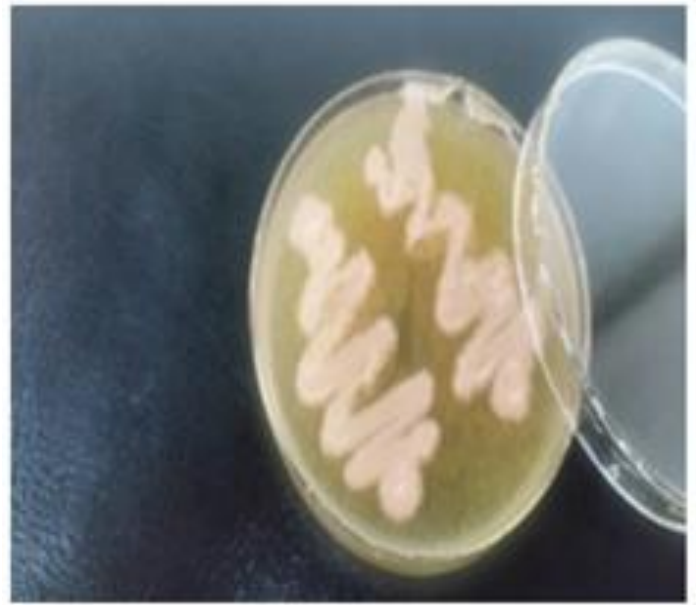


Microscopical features

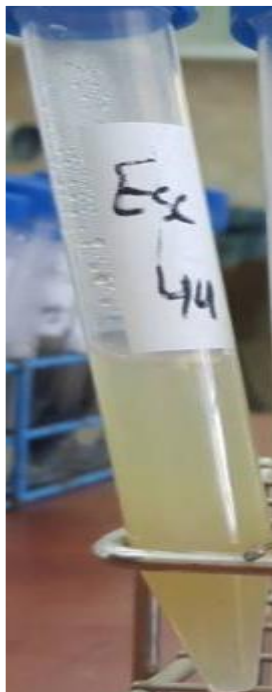
2: *Malassezia globosa*



Macroscopical features
Growth on m Dixon agar



L-Tryptophane Dixon Agar
Negative



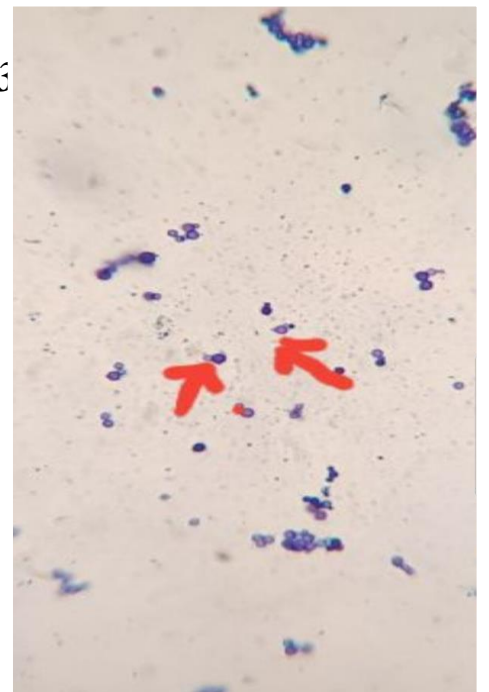
Esculin test
Negative



Growth on M Dixon
Agar- Negative Growth
on 37°C & 41°C



Catalase test
Positive



Microscopical features

3: *Malassezia restricta*



Macroscopical features
Growth on m Dixon agar



L-Tryptophane Dixon Agar
Negative



Esculin test
Negative



Growth on M Dixon
Agar- Negative Growth
on 41°C

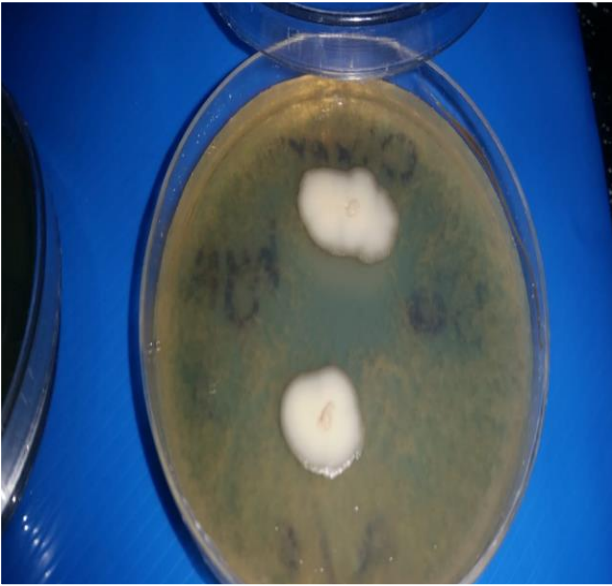


Catalase test
Negative

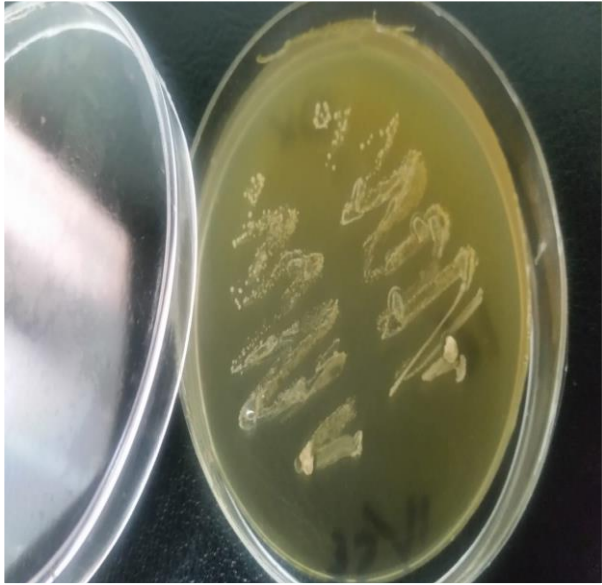


Microscopical features

4: *Malassezia sympodialis*



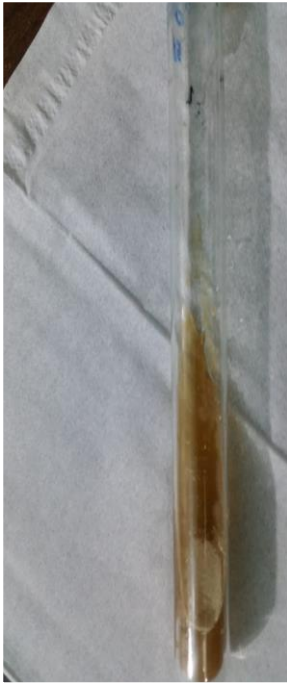
Macroscopical features
Growth on m Dixon agar



L-Tryptophane Dixon Agar
Negative



Esculin test
Positive



Growth on M Dixon
Agar- Positive
Growth on 41°C

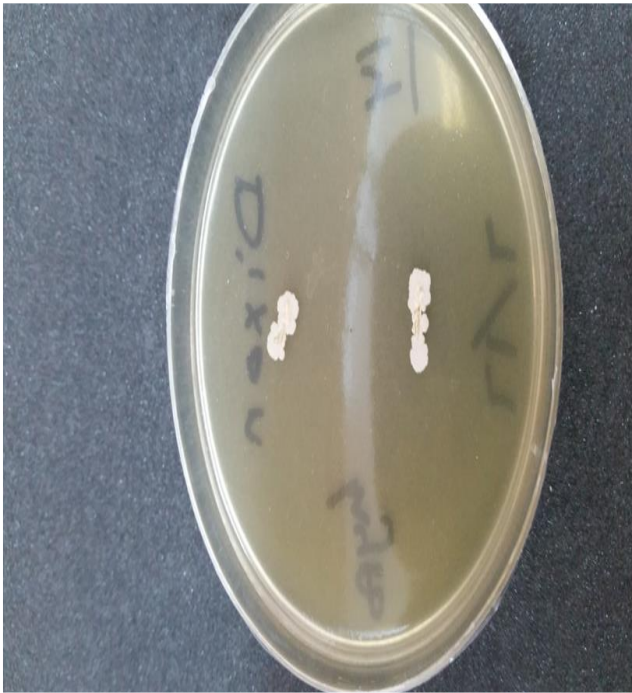


Catalase test
Positive



Microscopical features

5: *Malassezia slooffiae*



Macroscopical features
Growth on m Dixon agar



L-Tryptophane Dixon Agar
Negative



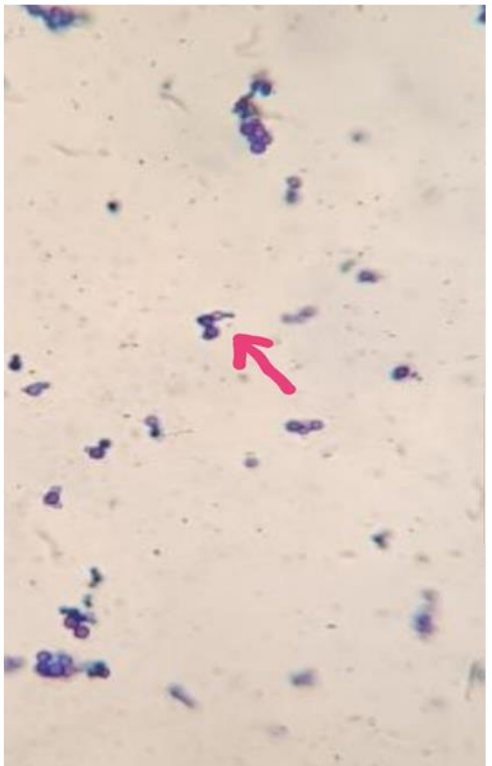
Esculin test
Negative



Growth on M Dixon
Agar -Positive
Growth on 41°C



Catalase test
Positive



Microscopical features

العلاقة بين الانواع *Malassezia* الخصائص الديموغرافية والسريرية

الاصابات المتكررة بمرض النخالية المبرقشة يمكن ان تكون لها علاقة وثيقة مع انواع ال *Malassezia* التي تسبب الاصابة . تهتم هذه الدراسة باهمية العلاقة بين هذه الانواع الفطرية وبين المتغيرات الديمغرافية و السريرية المختلفة. الجداول التالية تبين هذه النتائج.

يبين الجدول (٦-٣) ان نوع ال *Malassezia furfur* كان سائدا في الفئة العمرية ١٢- ٢٠ سنة

(30.8%) تليها ٢١ - ٣٠ سنة ثم ٣١ - ٤٠ سنة سنة بالتساوى (23.1%) شكل (٣- ٣٠) . هناك

اختلافات معنوية بين الانواع المختلفة وجميع الفئات العمري $P \leq 0.05$ باستثناء الفئة العمرية (٢١ - ٣٠) سنة.

الجدول (٦ - ٣) العلاقة بين انواع ال *Malassezia* و العمر

قيمة P	المجموع	الفئات العمرية					الانواع <i>Malassezia</i>					
		>40 عاما	31-40 سنة	21-30 سنة	12-20 سنة	2-11 سنة						
		العدد (النسبة المئوية)	العدد(%)	العدد(%)	العدد(%)	العدد(%)						
.527	00.0 39	١٧,٩	7	٢٣,١	9	٢٣,١	9	٣٠,٨	12	5-1	2	م <i>furfur</i> .
	00.0 27	11-1	3	18-5	5	25.9	7	40.7	11	3-7	1	م <i>globosa</i> .
	00.0 9	11-1	1	11-1	1	33.3	3	44-4	4	0.0	0	م <i>restricta</i> .
	00.0 6	0.0	0	66.7	4	16.7	1	16.7	1	0.0	0	م <i>sympodialis</i> .
	00.0 4	25.0	1	50.0	2	25.0	1	0.0	0	0.0	0	م <i>slooffiae</i> .
	00.0 10	0.0	0	10.0	1	20.0	2	70,0	7	0.0	0	السلبى
	00.0 95	12-6	12	23-2	22	٢٤,٢	32	36-8	35	3-2	3	المجموع
	.995	وقدره0.001	وقدره0.001	0.1	وقدره0.001	وقدره0.001	وقدره0.001	وقدره0.001	وقدره0.001			قيمة P

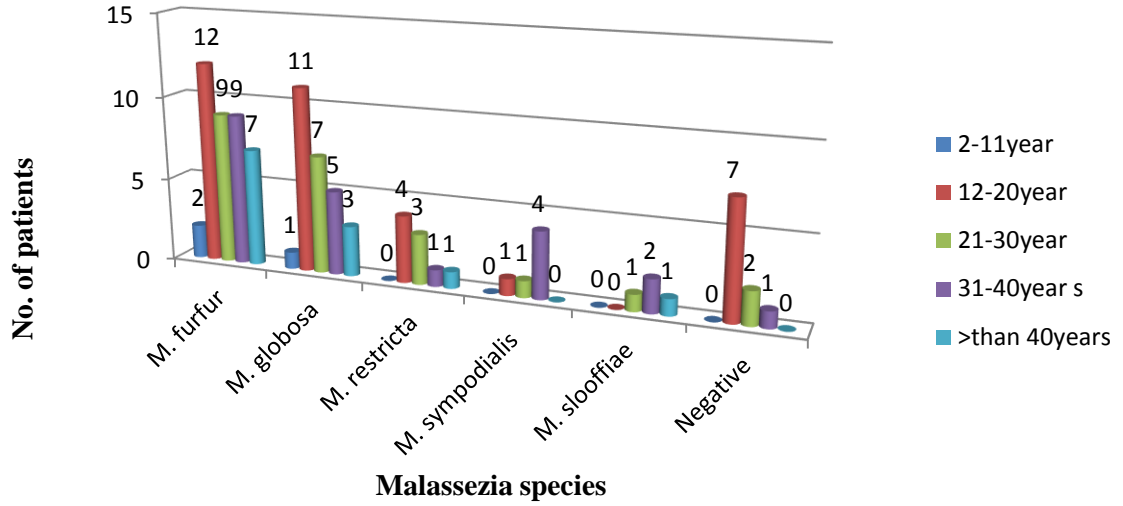


Figure 3.30: Distribution of *Malassezia* species with age groups among PV patients

يوضح الجدول (٣-٧) ما يلي :

١- تبعا للاقامة , فان نوع الـ *Malassezia furfur* كانت اكثر شيوعا في المناطق الريفية 69.2 % , بينما يسود نوع *Malassezia globosa* في مركز المدينة (70.4%) مع وجود اختلافات معنوية $P \leq 0.05$. الشكل (٣-٣١)

٢- بشأن انواع البشرة , فان نوع الـ *Malassezia furfur* كانت متساوية تقريبا في نوع البشرة الثالث والرابع (٤٨,٧ % و ٤٦,٢ % على التوالي) ، في حين ان *Malassezia globosa* كانت ضعفى عدد في النوع الثالث عنه في النوع الرابع (٥٩,٣ % و ٢٩,٦ % على التوالي) . وهناك اختلافات كبيرة بين كل نوع من انواع الفطريات في جميع انواع الجلد. الشكل (٣-٣٢) . $P \leq 0.05$.

٣- تم عزل جميع الانواع من الجلود الدهنية خاصة *Malassezia furfur* و *globosa* (٧١,٨ % و ٧٤,١ % على التوالي) ، وهناك اختلافات كبيرة بين كل نوع من انواع الفطريات في طبيعة الجلد. الشكل (٣-٣٣) $P \leq 0.05$.

الجدول (٣ - ٧) توزيع انواع الملاسيزيا مع الإقامة ونوع البشرة وطبيعة الجلد

قيمة	المجموع	السلبى	الانواع <i>Malassezia</i>					المتغيرات
			<i>slooffiae</i>	<i>sympodi alis</i>	<i>restricta</i>	<i>globosa</i>	<i>furfur</i>	
			لا النسبة (المنوية)	لا النسبة (المنوية)	لا النسبة (المنوية)	لا (%)	لا (%)	
	95 100	10 10.6	4 4-1	6 6.3	9 9.5	27 28.4	39 41.1	
الإقامة								
.068	46 48.4	5 50.0	2 50.0	3 50.0	5 55.6	19 70.4	30-8 12	Central
	49 51.6	5 50.0	2 50.0	3 50.0	4 44.4	8 29.6	69.2 27	Peripheral
	0.1	95).	95).	95).	0.1	وقدره 0.001	وقدره 0.001	P Value
انواع البشرة								
.474	5 5-3	0 00.0	1 25.0	0 00.0	0 00.0	2 7.4	2 5-1	T2
	49 51.6	5 50.0	3بالاف دولارات الولايات	1 16.7	5 55.6	16 59.3	19 48.7	T3
	40 42.1	5 50.0	0 00.0	5بنسبة 83.3 فى المائة.	4 44.4	8 29.6	18 46.2	T4
	1 1.1	0 00.0	0 00.0	0 00.0	0 00.0	1 3.7	0 00.0	T5
	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	P Value
طبيعة الجلد								
698	4 4-2	1 10.0	0 00.0	0 00.0	0 00.0	1 3.7	2 5-1	Dry
	67 70.5	8الرسمى	3بالاف دولارات الولايات	4 66.7	4 44.4	20 74.1	28 71.8	Oily
	24 25.3	1 10.0	1 25.0	2 33.3	5 55.6	6 22.2	9 23.1	Normal
	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	P Value

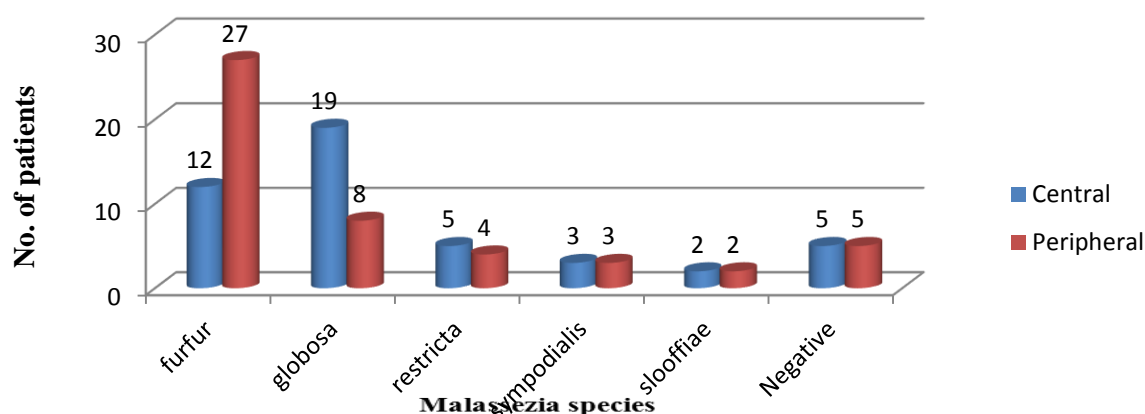


Figure 3.31: Distribution of *Malassezia* species with residency among PV patients

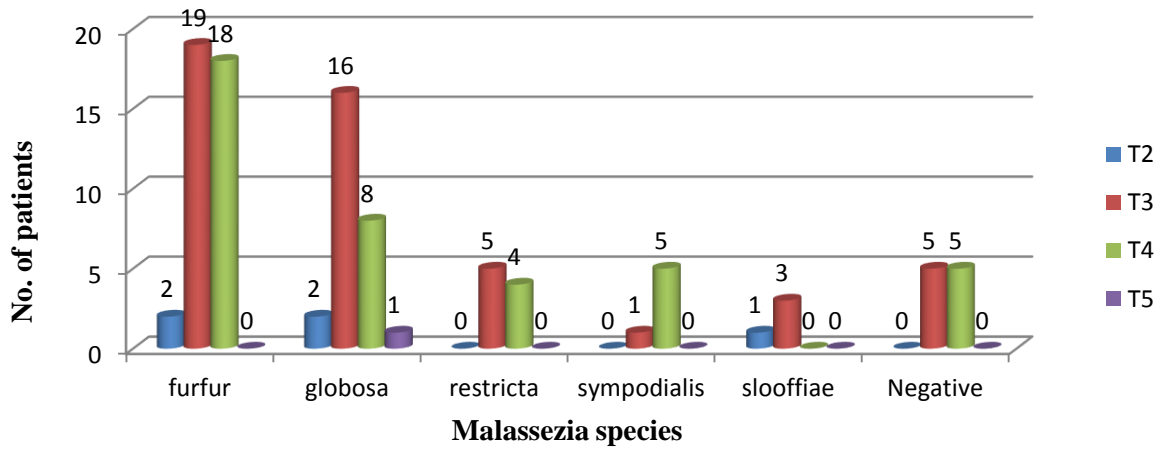


Figure 3.32: Distribution of *Malassezia* species with skin types among PV patients

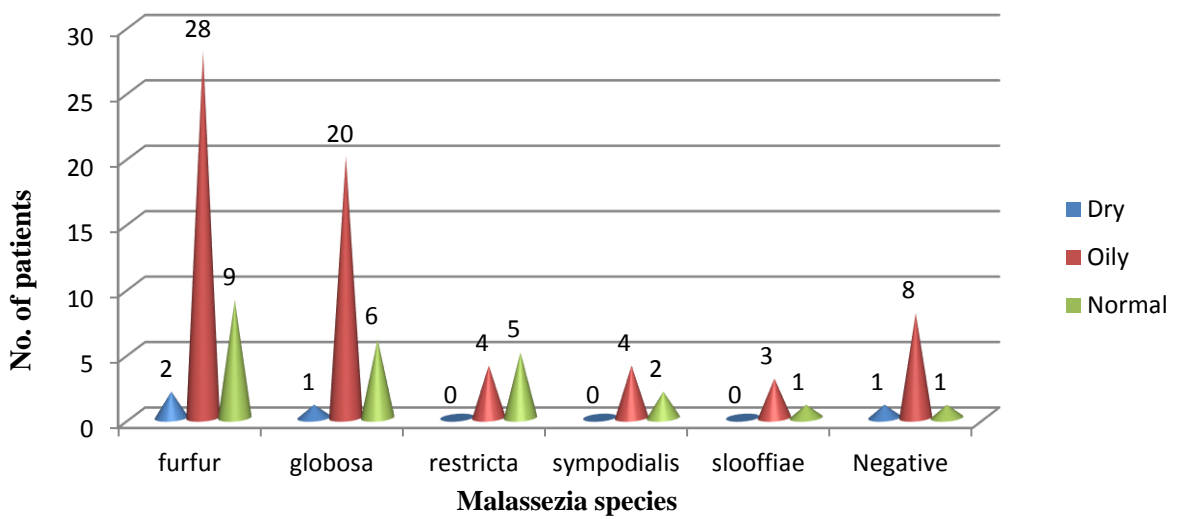


Figure 3.33: Distribution of *Malassezia* species with skin nature among PV patients

يبين الجدول (٣ - ٨) العلاقة بين انواع الـ *Malassezia* وارتباطها بمواصفات المرض *versicolor* pityriasis:

- طريقة الإصابة: وجد ان النوعين *M.furfur* و *M.sympodialis* هما السائدان في المرضى الذين يعانون من اصابات متكررة (66.7 %) مع وجود اختلافات معنوية, $P \leq 0.05$ ، بينما نوع الـ *Malassezia globosa* شبه متساوي في كلا المرضى الذين يعانون من اصابات متكررة او تلك التي سجلت لأول مرة (٤٤,٤ % و ٥٥,٦ % على التوالي) مع عدم وجود فوارق معنوية. $P > 0.05$.
- مدة المرض: جميع الانواع المعزولة عدا النوع *Malassezia sympodialis* هي الاكثر ترددا ضمن مجموعة اقل من سنة واحدة ، مع سيادة نوعي الـ *M.furfur* و *Malassezia globosa* (١٨,٩ % و ١٥,٨ % على التوالي) مع وجود اختلافات كبيرة بين هذه المجموعات. $P \leq 0.05$.

٣- شدة المرض: جميع الانواع ما عدا *sympodialis* هي الاكثر ترددا في مرضى النخالية المبرقشة
 الاكثر حدة ، مع سيادة نوعي ال *M.globosa* و *M.furfur* (٥٦,٤% و ٥١,٩% على التوالي)
 ، مع وجود اختلافات معنوية بين انواع حدة المرض $P \leq 0.05$ الشكل (٣ - ٣٤)

الجدول (٣ - ٨) توزيع الانواع *Malassezia* حسب طريقة الاصابة ومدة وشدة المرض.

قيمة	المجموع	السلبى	<i>Malassezia</i> الانواع					المتغيرات
			<i>slooffiae</i>	<i>sympodialis</i>	<i>restricta</i>	<i>globosa</i>	<i>furfur</i>	
			العدد(%)	العدد(%)	العدد(%)	العدد(%)	العدد(%)	
	95 100	10 10.6	4 4-1	6 6.3	9 9.5	27 28.4	39 41.1	
وضع المرض								
.614	40 42.1	4 40,0	2 50.0	2 33.3	4 44.4	15 55.6	13 33.3	Recent
	55 57.9	6,28 فى المانة	2 50.0	4 66.7	5 55.6	12 44.4	26 66.7	Recurrent
	0.1	0,025	95).	وقدره0.001	0.1	0.1	0.001	وقدره0.001
مدة المرض								
(201).	50 52.6	8 8.4	2 2.1	2 2.1	5 5-3	15 15.8	18 18.9	Less than 1 Y
	27 28.4	0	1 1.1	4 4-2	2 2.1	10 10.5	10 10.5	1-3 y
	7 7.4	2 2.1	0	0	1 1.1	1 1.1	3 3.2	3-5 y
	11 11.6	0	1 1.1	0	1 1.1	1 1.1	8 8.4	more than 5y
	وقدره0.001	وقدره0.001	0.1	نسبة0,05	0.9	وقدره0.001	وقدره0.001	P Value
شدة المرض								
.758	33 34.7	3 30.0	1 25.0	3 50.0	3 33.3	9 33.3	14 35.9	Mild
	13 13.7	2 20.0	0	1 16.7	3 33.3	4 14.8	3 7.7	Moderate
	49 51.6	5 50.0	3	2 33.3	3 33.3	14 51.9	22 56.4	Sever
	وقدره0.001	وقدره0.001	وقدره0.001	وقدره0.001	.995	وقدره0.001	وقدره0.001	P Value

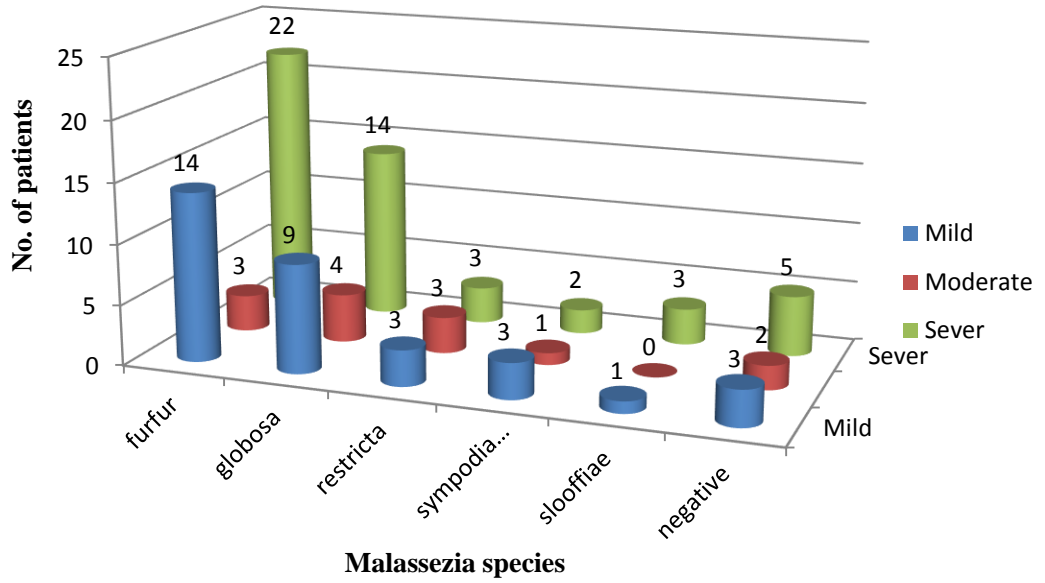


Figure 3.34: Distribution of *Malassezia* species with severity of disease among PV patients

يوضح الجدول (٣-٩) العلاقة بين الانواع *Malassezia* ومواصفات الافة المرضية (البقع)

١- موقع الافات : جميع الانواع المعزولة هي اكثر ترددا في منطقة الجذع ثم الرقبة والصدر، وان نوع ال *furfur* هو الاكثر شيوعا في الجذع (٥٦,٤%) وهناك اختلافات معنوية في كل نوع مع منطقة الاصابة. $P \leq 0.05$ الشكل (٣-٣٥)

٢- تصبغ الافات : سجل النوعين *furfur* و *globosa* الاكثر سيادة (٥٦,٤% و ٥٩,٣% على التوالي) في الافات مفرطة التصبغ hyperpigmented مع وجود اختلافات معنوية بين انواع التصبغ للافات. $P \leq 0.05$ الشكل (٣-٣٦)

٣- انواع الافات : سجل نوع م *furfur* بشكل متساو في كلا الافات القشرية والمختلطة (٣٥,٩%) ، بينما سجل نوع ال *globosa* سيادة في الافات القشرية فقط (٦٣,٠%) . وهناك اختلافات معنوية في كل نوع فطري مع نوع الافات. $P \leq 0.05$ الشكل (٣-٣٧)

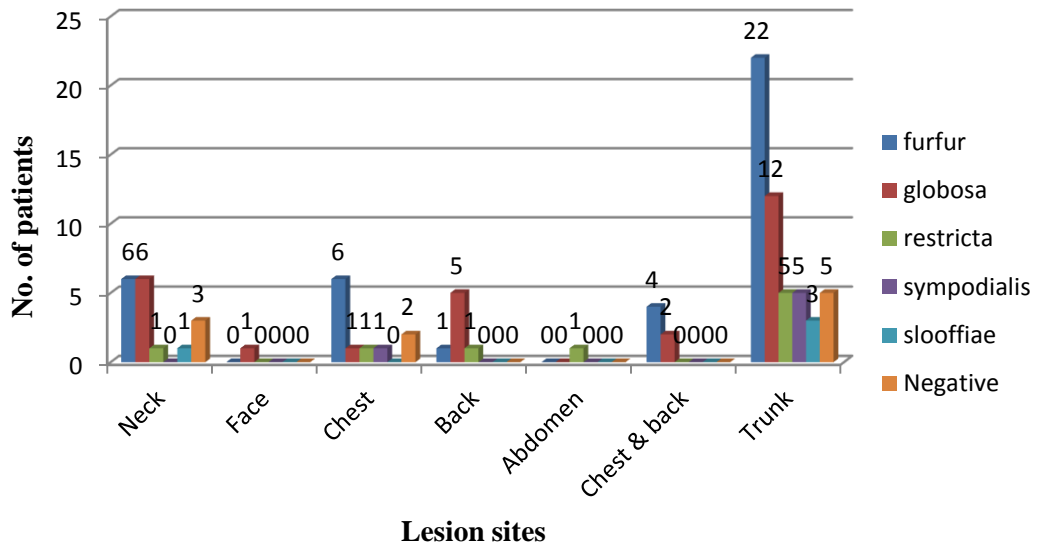


Figure 3.35: Distribution of *Malassezia* species with lesion sites among PV patients

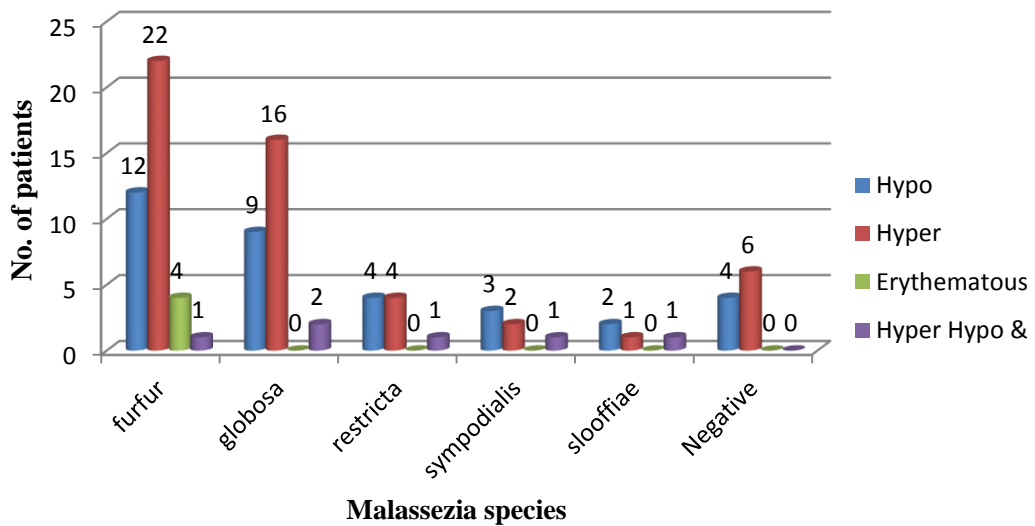


Figure 3.36: Distribution of *Malassezia* species with lesion pigmentation among PV patients

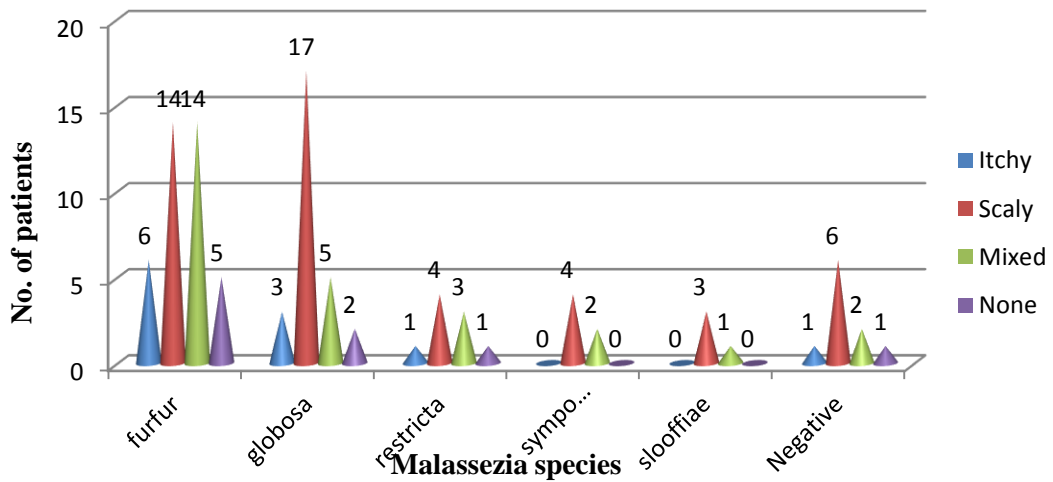


Figure 3.37: Distribution of *Malassezia* species with lesion type among PV patients

يوضح الجدول (٣ - ١٠) العلاقة بين الانواع Malassezia مع تاريخ العائلة والامراض المصاحبة وتاريخ وجود الحساسية. وكانت النتيجة الرئيسية ان جميع الانواع الفطرية السائدة في مرضى ال PV سلبية تاريخ العائلة وغير مرض السكرى و تاريخ الحساسية السلبية للمرضى.

الجدول (٣ - ١٠) توزيع الانواع Malassezia حسب تاريخ العائلة و الامراض المصاحبة والحساسية

قيمة P	المجموع	السلبى	الانواع Malassezia					المتغيرات
			<i>Slooffia-e</i>	<i>Sympodi</i>	<i>restricta</i>	<i>globosa</i>	<i>furfur</i>	
			العدد (%)	العدد (%)	العدد (%)	العدد (%)	العدد (%)	
	95 100	10 10.6	4 4-1	6 6.3	9 9.5	27 28.4	39 41.1	
تاريخ العائلة								
.024	14 14.7	5 50.0	0 00.0	0 00.0	1 11.1	2 7.4	6 15.4	ايجابيا
	81 85.	5 50.0	4 100.0	6 100.0	8 88.9	25 92.6	33 84.6	السلبى
	وقدره 0.001	95).	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001
المرتبطة بالمرض								
.844	4 4-2	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	2 2.1	2 2.1	مرض السكرى
	91 95.8	10 10.5	4 4-2	6 6.3	9 9.5	25 26.3	37 38.9	NonDiabetic
	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	قيمة P
تاريخ الحساسية								
.550	9 9.5	2 2.1	1 1.1	1 1.1	1 1.1	1 1.1	3 3.2	ايجابيا
	86 90.5	8 8.4	3 3.2	5 5-3	8 8.4	26 27.4	36 37.9	السلبى
	وقدره 0.001	نسبة 0,05	0.1	0.1	وقدره 0.001	وقدره 0.001	وقدره 0.001	قيمة P

٣- نتائج الدراسة الجزيئية والوراثية

استخلاص الحامض النووي

اظهرت نتائج استخلاص الحامض النووي ان ثلاثون عزلة اعطت حزمة مفردة على جل الاكاروز. شكل

(٣ - ٣٨)

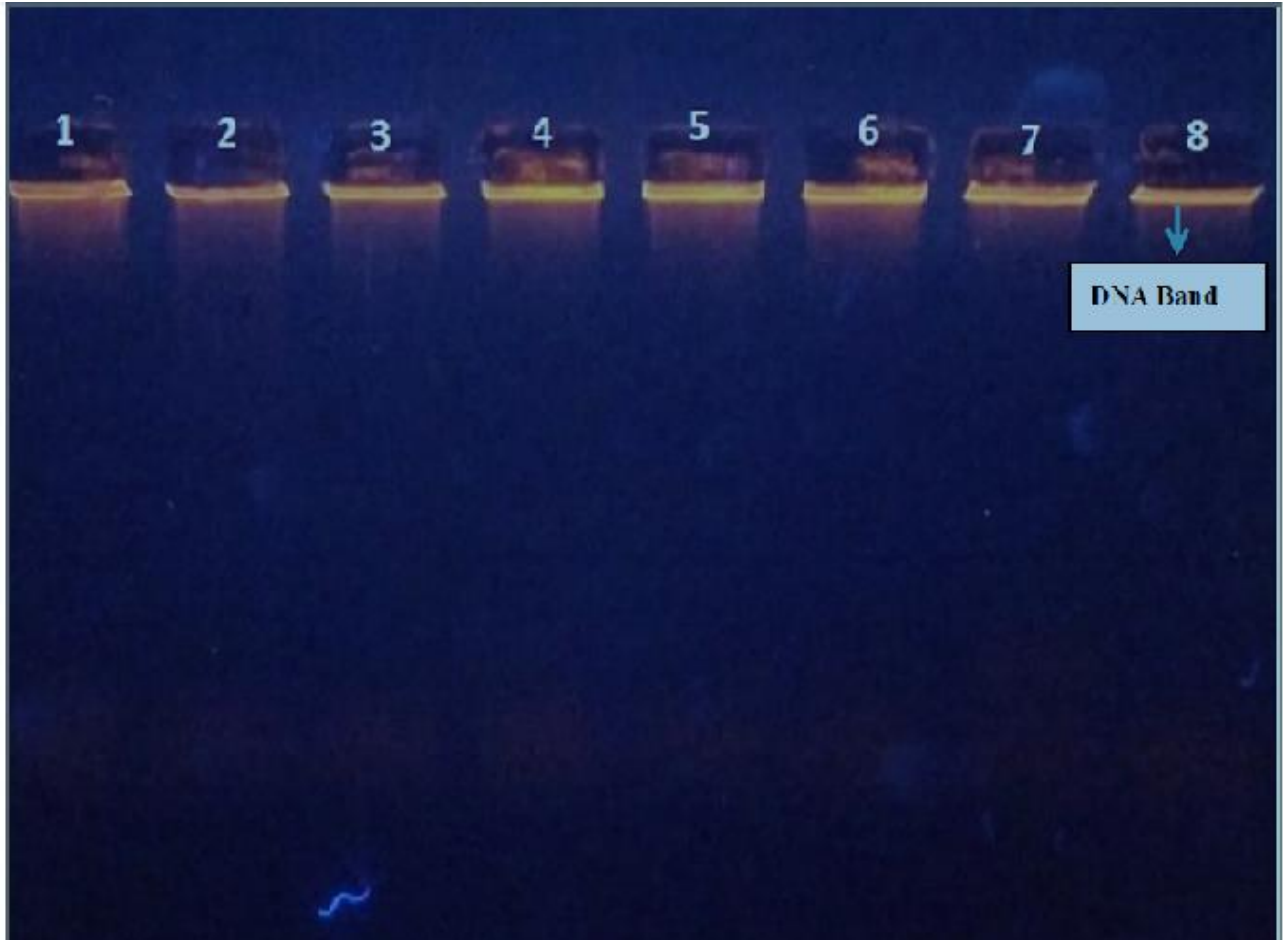


Figure 3.38: Single bands of DNA on Agarose Gel. 0.8% agarose gel electrophoresis analysis for genomic DNA extracted from *Malassezia* isolates. Lanes : 1-8 genomic DNA

الكشف والتضخيم باستخدام تقنية ال PCR

حسب نتائج PCR ال فان ثلاثة عشر عينة (43.3%) من الحمض النووي الريبي تم تضخيمها بعد برنامج (PCR) باستخدام زوجين من البادئات ، الاول ITS1 - ITS4 شكل (٣ - ٣٩ a و b) والثاني V9G - LS266 شكل (٣ - ٤٠)



Figure 3.39 a: Electrophoresis of Agarose gel 1.2% (100 voltage for 60 minutes) with PCR products of *Malassezia* species (ITS1 - ITS4 primers), demonstrated by Gel Doc System, show that M: DNA Ladder (100-1200bp), 1-4 samples are *M.furfur*, 5 is a negative sample

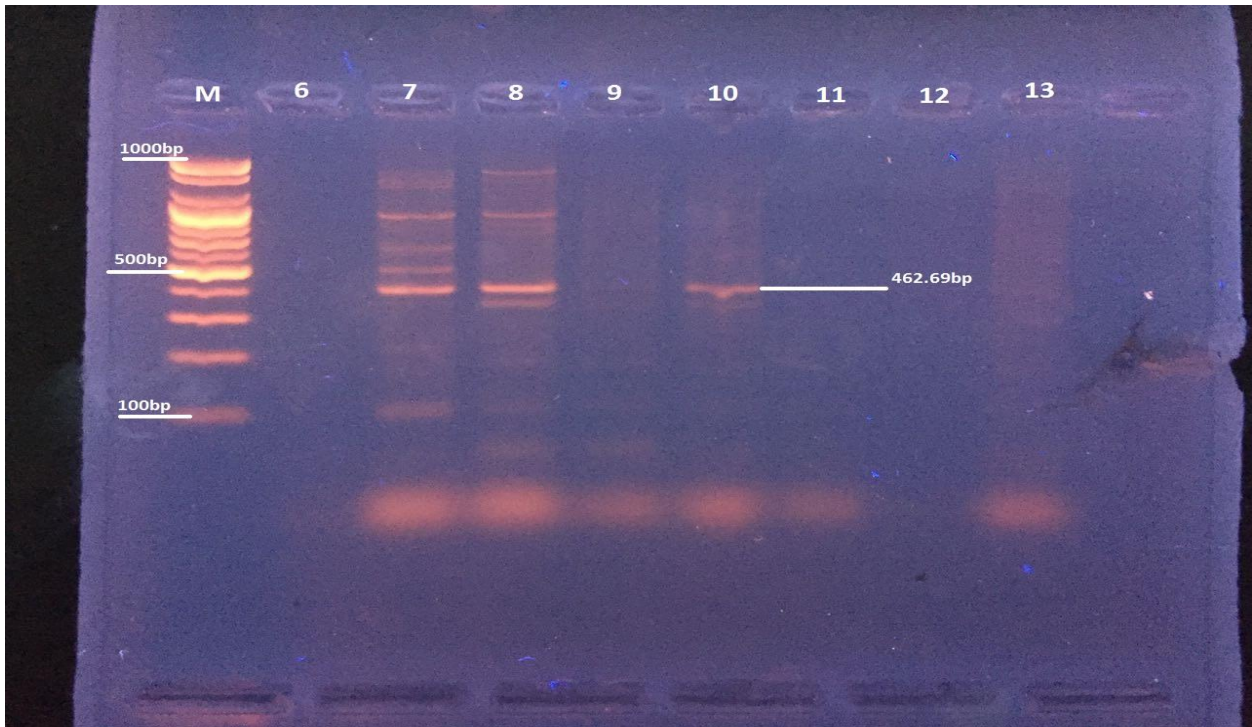


Figure 3.39 b: Electrophoresis of Agarose gel 1.2% (100 voltage for 60 minutes) with PCR products of *Malassezia* species (ITS1 - ITS4 primers), demonstrated by Gel Doc System, show that M: DNA Ladder (100-1200bp), 7,8 and 10 samples are *M.globosa*, 6,9,11-13 are negative samples

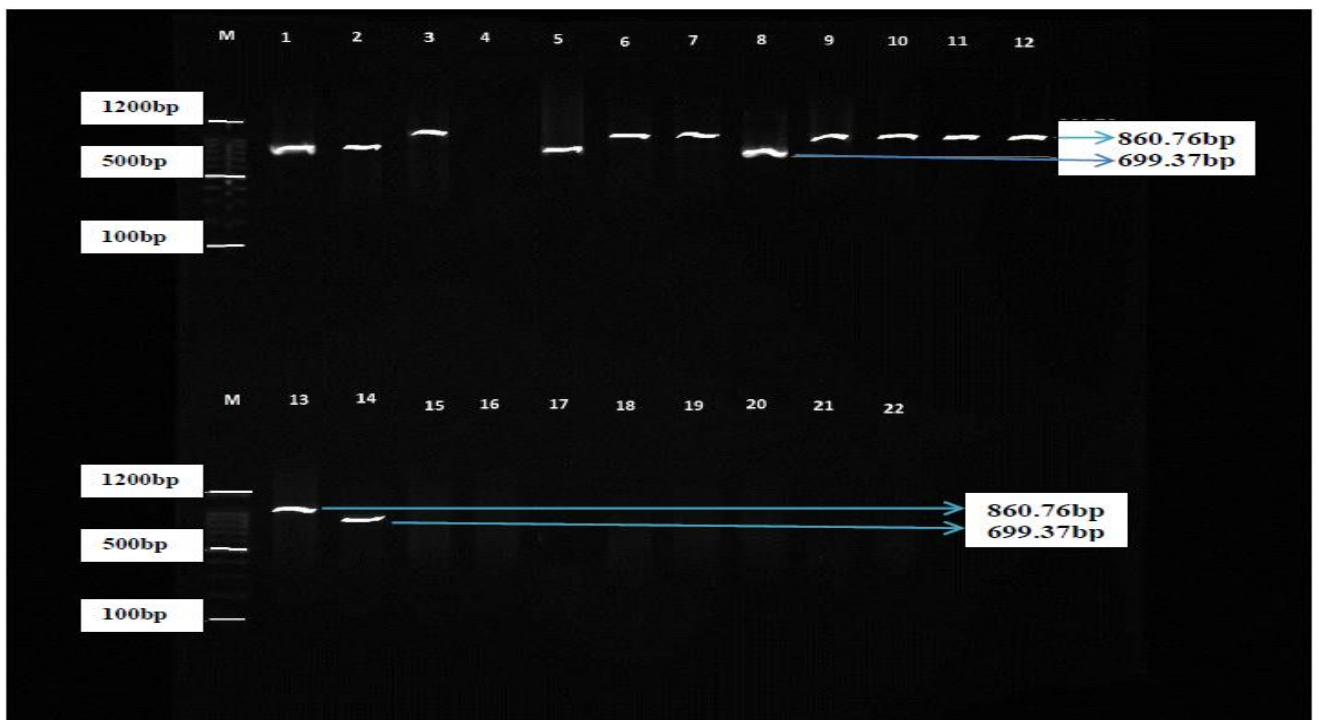


Figure 3.40: Electrophoresis of Agarose gel 1.2% (100 voltage for 60 minutes) with PCR products of *Malassezia* species (V9G - LS266 primers), demonstrated by Gel Doc System, show that M: DNA Ladder (100-1200bp), 3,6,7,9-13 samples are *M.furfur* and 1,2,5,8,14 samples are *M.globosa*, 4,15-22 are negative samples.

خضعت العزلات الـ ١٣ من الحمض النووي الرايبى المستخلص لاجراء التسلسل وظهرت النتائج

التالية :تحديد ثماني عينات تابعة للنوع *Malassezia furfur* وخمس عينات تابعة للنوع

M.globosa مع تنزيل انتظام التسلسلات alignment لكل نوع معزول:

Malassezia furfur isolate POL.10.11.IIIA 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: KC152898.1 Length: 848 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 848

نقاط	نتوقع	الهويات	الفجوات	ستراند
1567بت(848)	0.0 (0)	848/848(100%)	0/848 (0%)	بالاضافة الى Plus/
استفسار 60				
1 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCTGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTAGTGAAA				
Sbjct 1 60				
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCTGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTAGTGAAA				
استفسار 120				
61 GCAAGGGCCAGCCATACGGACGGCGCTACTCGCGTACAACGTCTCTGGCGCCCAACTTTA				
Sbjct 61 120				
GCAAGGGCCAGCCATACGGACGGCGCTACTCGCGTACAACGTCTCTGGCGCCCAACTTTA				
استفسار 180				
121 CACAATATCCACAAACCCGTGTGCACCGTTTGGATGAGTAGGCCTCCTCGCGAGGCAGAC				
Sbjct 121 180				
CACAATATCCACAAACCCGTGTGCACCGTTTGGATGAGTAGGCCTCCTCGCGAGGCAGAC				
استفسار 240				
181 TCTCCAATCCATTTCTACCAAACCTCGTATGGTTGTATGAACGTGGAAATCGTTGGACCGT				
Sbjct 181 240				
TCTCCAATCCATTTCTACCAAACCTCGTATGGTTGTATGAACGTGGAAATCGTTGGACCGT				
استفسار 300				
241 AACTGGCCAACAACCAATAATAACAACCTTCGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCATCGAT				
Sbjct 241 300				
AACTGGCCAACAACCAATAATAACAACCTTCGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCATCGAT				
استعلام 360				
GAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAAT				
Sbjct 301 360				
GAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAAT				
استفسار 420				
361 CTTTGAACGCACCTTGCGCTCCATGGTATTCGTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGCCGTGA				
Sbjct 361 420				
CTTTGAACGCACCTTGCGCTCCATGGTATTCGTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGCCGTGA				
استفسار 480				
421 ATTCTCTCTCCCAAGCGGTTGCGATTGCACTGCTTTGGCGGACGAGGTTGGATGGGTGC				
Sbjct 421 480				
ATTCTCTCTCCCAAGCGGTTGCGATTGCACTGCTTTGGCGGACGAGGTTGGATGGGTGC				
استفسار 540				
481 TTCTGCCTGTTTCGAAGAAACAGGCTCGCCGAAATGCATTAGCGCCTTTGGGACACAC				
Sbjct 481 540				
TTCTGCCTGTTTCGAAGAAACAGGCTCGCCGAAATGCATTAGCGCCTTTGGGACACAC				
استفسار 600				
541 TCTGCAAACCGCTCTGAAAGGGAGGGCGGCAGAGGGGATGGAGGAATCCGCCCGTCAGC				

TCTGCAAACCGCTCTGAAAGGGAGGGCGGCAGAGGGGATGGAGGAACTCCGCCCGTCAGC Sbjct 541 600
601 TATACCAAACCTTTGCCCCAGGCAAGCGCATGGCATGATACGTCATTTGCTATGTGTGCGT 660 استفسار
|||||
TATACCAAACCTTTGCCCCAGGCAAGCGCATGGCATGATACGTCATTTGCTATGTGTGCGT Sbjct 601 660
661 CCTGAGGCAAGGGGCCGATGTGGTGCCTTTGTCACTCTGTGGGTGTGTTGGTGCGCTACC 720 استفسار
|||||
CCTGAGGCAAGGGGCCGATGTGGTGCCTTTGTCACTCTGTGGGTGTGTTGGTGCGCTACC Sbjct 661 720
721 AATCCTGCGTGGAGGCTGGTCTGTGCGCAAGCATGGAGCAGTTCTTGTGAACGCATTCCC 780 استفسار
|||||
AATCCTGCGTGGAGGCTGGTCTGTGCGCAAGCATGGAGCAGTTCTTGTGAACGCATTCCC Sbjct 721 780
781 TTTTTCATTTCTGGTCTCAAATCAGGTAGGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCATTAA 840 استفسار
|||||
TTTTTTCATTTCTGGTCTCAAATCAGGTAGGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCATTAA Sbjct 781 840
841 GCGGAGGA 848 استفسار
|||||
GCGGAGGA Sbjct 841 848

Score

Expect Identities Gaps Strand
1567 bi (848) 0.0() 848/848(100%) 0/848(0%) Plus/Plus
Query 1 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCTGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTAGTGAAA 60
|||||
Sbjct 1 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCTGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTAGTGAAA 60
Query 61 GCAAGGGCCAGCCATACGGACGGCGCTACTCGCGTACAACGTCTCTGGCGCCCAACTTTA 120
|||||
Sbjct 61 GCAAGGGCCAGCCATACGGACGGCGCTACTCGCGTACAACGTCTCTGGCGCCCAACTTTA 120
Query 121 CACAATATCCACAAACCCGTGTGCACCGTTTGGATGAGTAGGCCTCCTCGCGAGGCAGAC 180
|||||
Sbjct 121 CACAATATCCACAAACCCGTGTGCACCGTTTGGATGAGTAGGCCTCCTCGCGAGGCAGAC 180
Query 181 TCTCCAATCCATTTCTACCAAACCTCGTATGGTTGTATGAACGTGGAAATCGTTGGACCGT 240
|||||
Sbjct 181 TCTCCAATCCATTTCTACCAAACCTCGTATGGTTGTATGAACGTGGAAATCGTTGGACCGT 240
Query 241 AACTGGCCAACAACCAATAATAACAACCTTCGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCCATCGAT 300
|||||
Sbjct 241 AACTGGCCAACAACCAATAATAACAACCTTCGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCCATCGAT 300
Query 301 GAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAAT 360
|||||
Sbjct 301 GAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAAT 360
Query 361 CTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGGAGTGCCGTGA 420
|||||
Sbjct 361 CTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGGAGTGCCGTGA 420
Query 421 ATTCTCTCTCCCCAAGCGGTTGCGATTGCACTGCTTTGGCGGACGAGGTTGGATGGGTGC 480
|||||
Sbjct 421 ATTCTCTCTCCCCAAGCGGTTGCGATTGCACTGCTTTGGCGGACGAGGTTGGATGGGTGC 480
Query 481 TTCTGCCTGTTTCGCAAGAAACAGGCTCGCCCCGAAATGCATTAGCGCCTTTGGGACACAC 540
|||||
Sbjct 481 TTCTGCCTGTTTCGCAAGAAACAGGCTCGCCCCGAAATGCATTAGCGCCTTTGGGACACAC 540
Query 541 TCTGCAAACCGCTCTGAAAGGGAGGGCGGCAGAGGGGATGGAGGAACTCCGCCCGTCAGC 600
|||||
Sbjct 541 TCTGCAAACCGCTCTGAAAGGGAGGGCGGCAGAGGGGATGGAGGAACTCCGCCCGTCAGC 600
Query 601 TATACCAAACCTTTGCCCCAGGCAAGCGCATGGCATGATACGTCATTTGCTATGTGTGCGT 660
|||||
Sbjct 601 TATACCAAACCTTTGCCCCAGGCAAGCGCATGGCATGATACGTCATTTGCTATGTGTGCGT 660
Query 661 CCTGAGGCAAGGGGCCGATGTGGTGCCTTTGTCACTCTGTGGGTGTGTTGGTGCGCTACC 720
|||||
Sbjct 661 CCTGAGGCAAGGGGCCGATGTGGTGCCTTTGTCACTCTGTGGGTGTGTTGGTGCGCTACC 720
Query 721 AATCCTGCGTGGAGGCTGGTCTGTGCGCAAGCATGGAGCAGTTCTTGTGAACGCATTCCC 780
|||||
Sbjct 721 AATCCTGCGTGGAGGCTGGTCTGTGCGCAAGCATGGAGCAGTTCTTGTGAACGCATTCCC 780

Query 781 TTTTTCATTTCTGGTCTCAAATCAGGTAGGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCATTAA 840
 |||
 Sbjct 781 TTTTTCATTTCTGGTCTCAAATCAGGTAGGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCATTAA 840
 Query 841 GCGGAGGA 848
 |||
 Sbjct 841 GCGGAGGA 848

Malassezia globosa strain 149.1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: KM454161.1 Length: 813 Number of Matches: 1
Range 1: 49 to 813

نقاط	نتوقع	الهويات	الفجوات	ستراند
1413	0.0 () (765)	765/765(100%)	0/765 (0%)	بالإضافة الىPlus/
استفسار 60				1 TCATTAGTGAAGATTCAAGGGCCAGCCATACAGACGTACAATAAGTGTGTCTCTGGCGGC
Sbjct 49 108				TCATTAGTGAAGATTCAAGGGCCAGCCATACAGACGTACAATAAGTGTGTCTCTGGCGGC
استفسار 120				61 TCGTATCCACTATAACATCCATAAAACCCGTGTGCACTGTTAAGGAGTAAGAAAGAAGGGGA
Sbjct 109 168				TCGTATCCACTATAACATCCATAAAACCCGTGTGCACTGTTAAGGAGTAAGAAAGAAGGGGA
استفسار 180				121 GGGAGAGAGTGCATGTGCTTTGCATATAACTCTCTCTCTTTCTCTTCCTTTCTCTCTCTG
Sbjct 169 228				GGGAGAGAGTGCATGTGCTTTGCATATAACTCTCTCTCTTTCTCTTCCTTTCTCTCTCTG
استفسار 240				181 GTTAATTACACAAACTCGTATGGATTTGTATGAACGTGAGATATATCGTTGGACCGTCAC
Sbjct 229 288				GTTAATTACACAAACTCGTATGGATTTGTATGAACGTGAGATATATCGTTGGACCGTCAC
استفسار 300				241 TGGCCAACAAATATAACACAACCTTTGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCCATCGATGAAG
Sbjct 289 348				TGGCCAACAAATATAACACAACCTTTGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCCATCGATGAAG
استعلام 360				AACGCAGCGAAACGCGATAGGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTT
Sbjct 349 408				AACGCAGCGAAACGCGATAGGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTT
استفسار 420				361 GAACGCACCTTGCGCTCTATGGTATTCCGTAGAGCATGCCTGTTTGAGTGCCGTGAATTC
Sbjct 409 468				GAACGCACCTTGCGCTCTATGGTATTCCGTAGAGCATGCCTGTTTGAGTGCCGTGAATTC
استفسار 480				421 TCCCATCCCAAGCGGTTTTTATCAAAGAATTGCTAGGCGAAGGGGTTGAGATGGGCGTTG
Sbjct 469 528				TCCCATCCCAAGCGGTTTTTATCAAAGAATTGCTAGGCGAAGGGGTTGAGATGGGCGTTG
استفسار 540				481 TTATAACTGCTTTTCTTCTCTAGAAAAGCTCGCCCGAAAAACAGCTAACGCCTCTGGGCC
Sbjct 529 588				TTATAACTGCTTTTCTTCTCTAGAAAAGCTCGCCCGAAAAACAGCTAACGCCTCTGGGCC
استفسار 600				541 ACTTTGCATCCGCTTCTCTGAGGGGAGAAGCGGCCAAGCGCGCTCTGATCATCAGGCATA
Sbjct 589 648				ACTTTGCATCCGCTTCTCTGAGGGGAGAAGCGGCCAAGCGCGCTCTGATCATCAGGCATA
استفسار 660				601 GCATGATACGTCATTTGCTATGCTGTAGGAGAGCATTTGGTTGTGGTTATACCGCGTGCG

GCATGATACGTCATTTGCTATGCTGTAGGAGAGCATTGGTTGTGGTTATACCGGTGCG Sbjct 649 708

661 TTATTTTTTTTTTGC AAACGCAAAGAAAAAAGCCCCCTTTCATTTCTGGTCTCAAATC 720 استفسار
|||||
TTATTTTTTTTTTGC AAACGCAAAGAAAAAAGCCCCCTTTCATTTCTGGTCTCAAATC Sbjct 709 768

721 AGGTAGGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 765 استفسار
|||||
AGGTAGGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA Sbjct 769 813

Score Expect Identities Gaps Strand

1413 bits(765) 0.0() 765/765(100%) 0/765(0%) Plus/Plus

Query 1 TCATTAGTGAAGATTCAAGGGCCAGCCATACAGACGTACAATAAGTGTGTCTCTGGCGGC 60
|||||
Sbjct 49 TCATTAGTGAAGATTCAAGGGCCAGCCATACAGACGTACAATAAGTGTGTCTCTGGCGGC 108
Query 61 TCGTATCCACTATACATCCATAAACCCGTGTGCACTGTTAAGGAGTAAGAAAGAAGGGGA 120
|||||
Sbjct 109 TCGTATCCACTATACATCCATAAACCCGTGTGCACTGTTAAGGAGTAAGAAAGAAGGGGA 168
Query 121 GGGAGAGAGTGCATGTGCTTTGCATATAACTCTCTCTTTCTCTTCTCTCTCTCTG 180
|||||
Sbjct 169 GGGAGAGAGTGCATGTGCTTTGCATATAACTCTCTCTTTCTCTTCTCTCTCTCTG 228
Query 181 GTTAATTACACAAACTCGTATGGATTTGTATGAACGTGAGATATATCGTTGGACCGTCAC 240
|||||
Sbjct 229 GTTAATTACACAAACTCGTATGGATTTGTATGAACGTGAGATATATCGTTGGACCGTCAC 288
Query 241 TGGCCAACAAATATAACACAACCTTCGACAACGGATCTCTTGTTCTCCCATCGATGAAG 300
|||||
Sbjct 289 TGGCCAACAAATATAACACAACCTTCGACAACGGATCTCTTGTTCTCCCATCGATGAAG 348
Query 301 AACGCAGCGAAACGCGATAGGTAATGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCGAATCTTT 360
|||||
Sbjct 349 AACGCAGCGAAACGCGATAGGTAATGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCGAATCTTT 408
Query 361 GAACGCACCTTGCCTCTATGGTATCCCGTAGAGCATGCCTGTTTGAGTGCCGTGAATTC 420
|||||
Sbjct 409 GAACGCACCTTGCCTCTATGGTATCCCGTAGAGCATGCCTGTTTGAGTGCCGTGAATTC 468
Query 421 TCCCATCCCAAGCGGTTTTTATCAAAGAATTGCTAGGCGAAGGGGTTGAGATGGGCGTTG 480
|||||
Sbjct 469 TCCCATCCCAAGCGGTTTTTATCAAAGAATTGCTAGGCGAAGGGGTTGAGATGGGCGTTG 528
Query 481 TTATAACTGCTTTTCTCTCTAGAAAAGCTCGCCGAAAAACAGCTAACGCCTCTGGGCC 540
|||||
Sbjct 529 TTATAACTGCTTTTCTCTCTAGAAAAGCTCGCCGAAAAACAGCTAACGCCTCTGGGCC 588
Query 541 ACTTTGCATCCGCTTCTCTGAGGGGAGAAGCGGCCAAGCGCGCTCTGATCATCAGGCATA 600
|||||
Sbjct 589 ACTTTGCATCCGCTTCTCTGAGGGGAGAAGCGGCCAAGCGCGCTCTGATCATCAGGCATA 648
Query 601 GCATGATACGTCATTTGCTATGCTGTAGGAGAGCATTGGTTGTGGTTATACCGGTGCG 660
|||||
Sbjct 649 GCATGATACGTCATTTGCTATGCTGTAGGAGAGCATTGGTTGTGGTTATACCGGTGCG 708
Query 661 TTATTTTTTTTTTGC AAACGCAAAGAAAAAAGCCCCCTTTCATTTCTGGTCTCAAATC 720
|||||
Sbjct 709 TTATTTTTTTTTTGC AAACGCAAAGAAAAAAGCCCCCTTTCATTTCTGGTCTCAAATC 768
Query 721 AGGTAGGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 765
|||||
Sbjct 769 AGGTAGGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 813

Phylogenetic Analysis of *Malassezia* species تحليل النشوء والتطور

تم تحليل النشوء والتطور لثلاثة عشر عزلة من الملاسيزيا بواسطة MEGA ٥,٠٥ ومقارنتها مع تسلسلات انواع مختلفة من جنس ال *Malassezia* في قاعدة بيانات بنك الجينات ، حيث لوحظ تلاق واضح

بين انواع ال *Malassezia* المعزولة في هذه الدراسة و تلك الموجودة في قاعدة بيانات بنك الجينات .

الشكل (٣ - ٤)

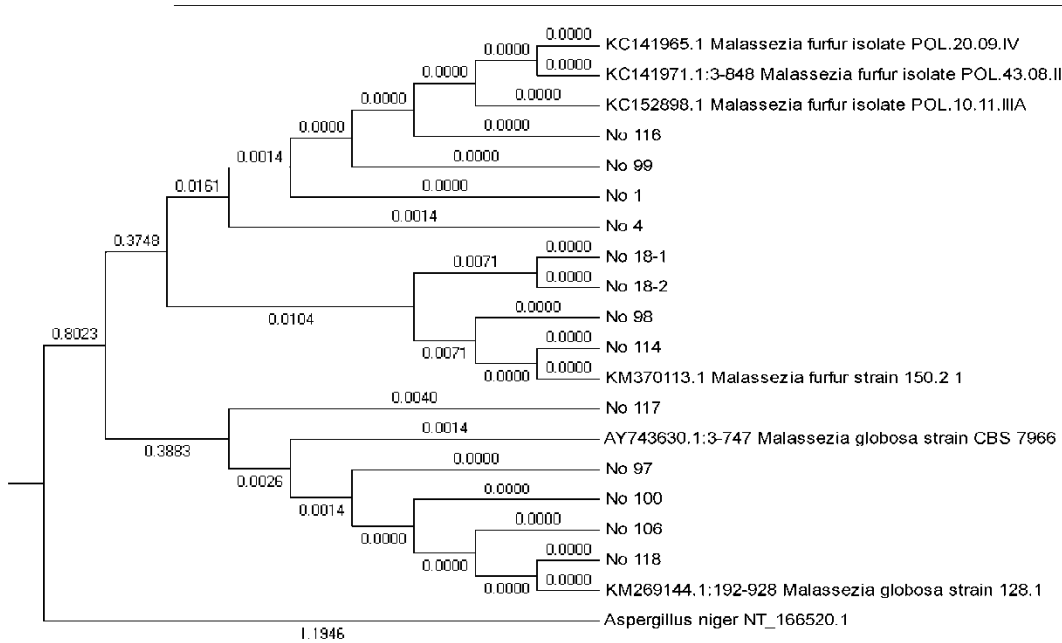


Figure 3.41: Phylogenetic Tree Analysis of *Malassezia* species isolates.

٤-نتائج الدراسة النسيجية المرضية The Histopathological Study Results

* نود الإشارة الى ان الصور التي ستعرض الان حصرية وخاصة بالدراسة الحالية وهي نتائج الطرق الجديدة المصورة وطرق العمل المبتكرة في الحقن والتصبيغ

العلامات السريرية

اظهرت العديد من الجرذان المصابة بنوع *Malassezia furfur* المعزول في هذه الدراسة بواسطة

طريقة الوخز حدوث افات جلدية دنيا مع التهاب احمراري للجلد خفيفة الى معتدلة وكذلك طفح جلدي

popular في منطقة الاصابة بعد مرور ٧ ايام من الحقن ، واصبح الجلد يحوي قشور مع

وجود سلوك الحكه بين ٨-١٤ يوم من الحقن . صورة (٣ - ١)

واظهرت الدراسة ان الحالية ان *Malassezia furfur* وليس *globosa* هي للعامل المسبب الرئيسي

للاصابة بالمرض في الجرذان.



A

B



C

D

Picture (3.1) clinical signs of rats infected with *Malassezia furfur* (A,B after 7days ; C,D between 8-14 days)

١- الفحص الامراضي النسيجي للجلد باستخدام صبغة الهيماتوكسيلين والايوسين:

1- Intradermal

اظهرت النتائج الاخيرة للعينات الجلدية للفئران المصابة بال *Malassezia furfur* بهذه الطريقة، وجود ارتشاح حاد للخلايا الالتهابية على طبقة الادمة السطحية ، مع فرط التقرن المعتدل للبشرة epidermis hyperkeratosis بينما بدت الادمة كنسيج رابط كثيف مع كمية كبيرة من الالياف الكولاجينية غير منتظمة تتخلل انوية خلايا ال fibroblasts كما لوحظ عدد متغير من بصيلات الشعرة المرتبطة مع الغدد الدهنية . (Pic3. 2-4) وعلاوة على ذلك ، كشفت النتائج وجود بصيلات غير طبيعية تؤدي الى ضمور وانحلال وتصيغ بصيلات الشعرة و وجود وصلات قرنية و عدد كبير من الخلايا التي تحتوى على مواد الصباغة في النسيج الرابط المحيط بالعضلات الهيكلية تحت طبقة ال hypodermis ، كذلك لوحظ وجود اوعية دموية كبيرة تقع اسفل منطقة hypodermis مع وجود الاوعية الدموية الشعرية مكتضة ضمن هذه الطبقة. (Pic3. 5-7)

2- Spot technique

اظهر الفحص بالمجهر الضوئي لمقاطع الجلد التابعة للجرذان المصابة بال *Malassezia* بطريقة البقع لمناطق مختلفة في الساق والكتف وكذلك الظهر ، حدوث تغيرات التي تميل الى ان تكون محصورة في طبقة البشرة epidermis . معظم هذه التغيرات بشكل تجمع مركزي للخلايا الالتهابية بالقرب من الطبقة السطحية للبشرة ، مع تضخم الخلايا الكيراتينية الحويصلية، التهاب الادمة ، مع ارتشاح ال macrophage وكريات الدم البيضاء العدلة وعدد من ال mast cells ، مع فرط التقرن المعتدل وترسب منتظم للالياف الكولاجينية . (Pic3. 8,9)

اظهرت مقاطع اخرى ان الاصابة سببت تلف لمعظم بصيلات الشعر وانكماش للغدد الدهنية . (Pic3.10)

٣- Prick technique (scratching)

اشارت النتائج الحالية الى تغيرات نسيجية حادة لقطع الجلد المختلفة التي تعود الى الجرذان المصابة بالملاسيزيا بطريقة الوخز (تكوين شقوق) ، حيث تضمنت هذه التغيرات تنشيط وكثرة انتشار الخلايا الكيراتينية ، تدمير حاجز البشرة ، اصابة بصيلات الشعر مع عدم ملاحظة dermal papillae . بالرغم من تخصص الاصابة بطبقة الكيراتين ، غير ان الالتهاب ممكن ان يمتد الى الادمة وطبقات تحت الجلد عن طريق مهاجمة بصيلات الشعر . (Pic3.11)

اظهرت مقاطع الجلد المأخوذة من منطقة الكتف والظهر للجرذان المصابة بهذه الطريقة ، انحلال وتدمير البشرة تبدأ من ال stratum corneum وال spinosum تؤدي الى الانتشار وال acanthosis . وقد ظهرت كريات الدم البيضاء العدلة والخلايا البلعمية مع ال mast cells بمواقع مختلفة من مناطق الاصابة . (Pic3. 12-14)

مقاطع اخرى من كتف الفئران المصابة اظهرت فرط التقرن بشكل متموج في الطبقة القرنية، مع امتداد الفجوات الى غمد جذر خلايا البشرة التي تحيط بصيلات الشعر ، وتصبغ ملحوظ لطبقة الخلايا القاعدية . (Pic3. 15,16)

ع-السيطرة دون اية اصابة

اظهرت الملاحظات النسيجية لمقاطع الجلد العائدة الى جرذان السيطرة ، ان الجلد يتألف من سطح البشرة و طبقات الادمة ، حيث تمتد البشرة باتجاه الاسفل لتكون حليمات الادمة الذي يعتبر المفترق بين الطبقتين ، تحت الادمة ، هناك طبقة ال (subcutaneous) hypodermis التي تتألف من نسيج رابط مفكك مع الواح من الخلايا الدهنية . تتكون طبقة البشرة من نسيج طلائي حرشفي كيراتيني متعدد الطبقات ، بينما تحوي الادمة خلايا اكثر مع الاوعية الدموية وحزم كثيفة من الالياف الكولاجينية تنتشر بترتيب منتظم ، كما تظهر مشتقات البشرة بشكل

طبيعي مثل بصيالات الشعر وغمد الجذر مع مقاطع واضحة للغدد الدهنية مع الاقنية الافرازية الموجودة في الادمة ، اضافة لوجود اعداد كبيرة من الاوعية والشعيرات الدموية حيث تستقر هذه الطبقة على حزمة من العضلات الملساء . (١٨ ، ١٧ - ٣ Pic)

الصور من ١٨-١ خاصة بتصبيغ الهيماتوكسلين - ايوسين

الفحص النسيجي باستخدام صبغة : ٢-Skin histopathological examination stained with PAS

PERIODIC ACID SCHIFF

الصور من ١٩ - ٢٦ خاصة بصبغة ال PAS

لم تظهر العوامل الفطرية في مقاطع الجلد المصبغه بال H&E بينما في المقاطع المصبغة بال PAS ظهرت خيوط وسبورات الفطر في الطبقة القرنية لاغلب مقاطع الجلد .

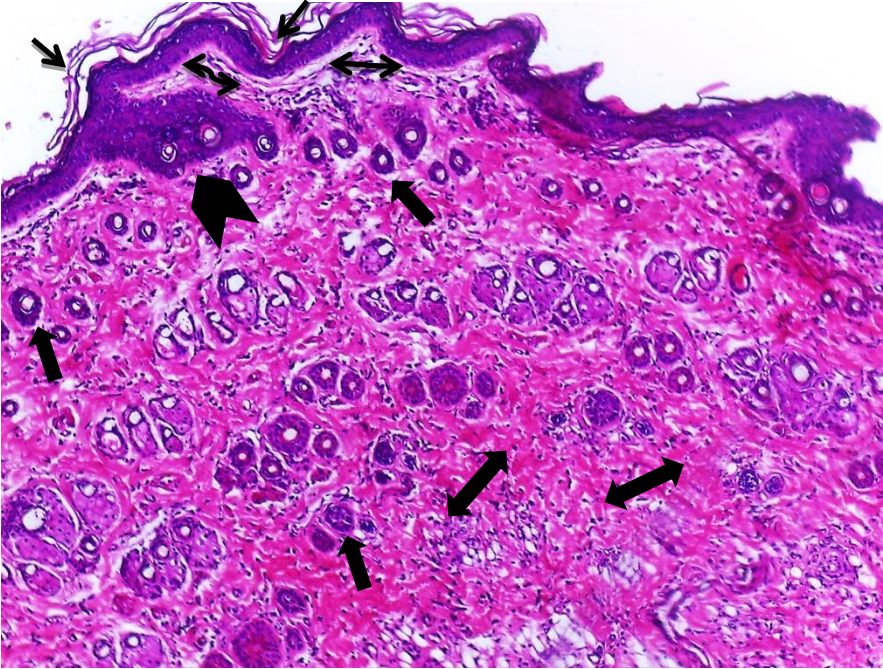
جميع المقاطع من جلد الجرذان المصابة والمحضرة والمصبغة بصبغة ال Periodic Acid Schiff والمعاملة مع فطر الملاسيزيا ، كانت منظمة بشكل جيد ، ومعرفة مظهرها وتعتبر مناسبة جدا لتشخيص انواع الملاسيزيا من الخمائر الممرضة الاخرى . (Pic3. 19-21)

اظهرت النتائج الحالية ان خميرة *Malassezia furfur* والتي اخترقت الطبقة القرنية كونت بعض الاحيان تجمع او غلاف على سطح البشرة مع الحطام الخلوي . في بعض مقاطع الجلد ، وجدت سبورات الخميرة على الطبقة السطحية للبشرة بشكل كروي او بيضوي ، بلون وردي ، مع وجود برعم من جهة واحدة بشكل طوق . (Pic3. 22,23)

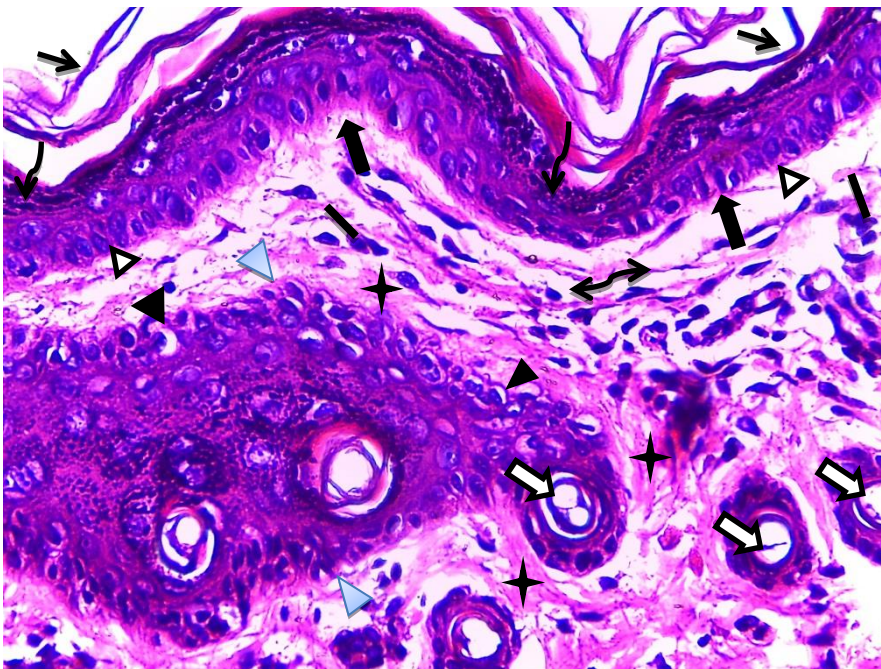
كما اظهرت مقاطع جلد الجرذان المصبغة بال PAS والمصابة بالملاسيزيا بطريقة الحقن تحت الجلد ، ترسب كثيف لخلايا الخميرة بشكل globose الى بيضاوي ، والتبرعم يعطي طوق كبير حيث تنشأ منه البراعم الصغيرة . ممن الممكن ملاحظة الخمائر ووحدات الخيوط الفطرية بشكل واضح ، اظهرت جميع المقاطع علامات الالتهاب المرتبطة مع عدد كبير من الخلايا الالتهابية . (٢٤ . ٣ Pic)

كما بين الفحص النسيجي لهذه المقاطع وجود اعداد متوسطة الى كبيرة من الخمائر داخل الطبقة القرنية مع فرط تقرن البشرة والتهاب الجلد . وهذا الالتهاب عادة ما يصاحب عدد من الخلايا الالتهابية المنتشرة والواضحة حول بصيالات الشعر . (Pic3.25,26)

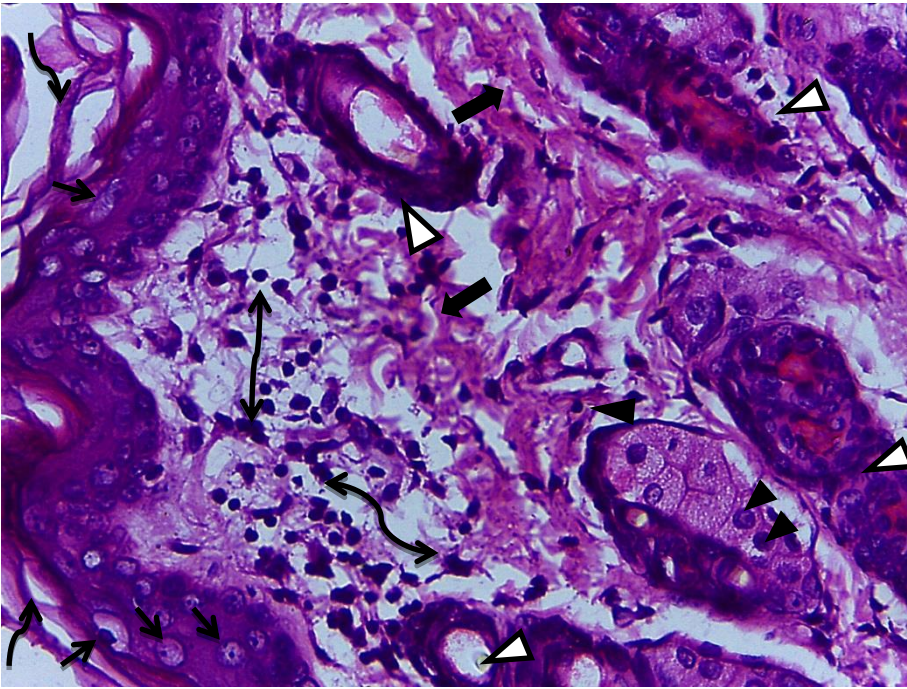
HEMATOXYLIN & EOSIN STAINING



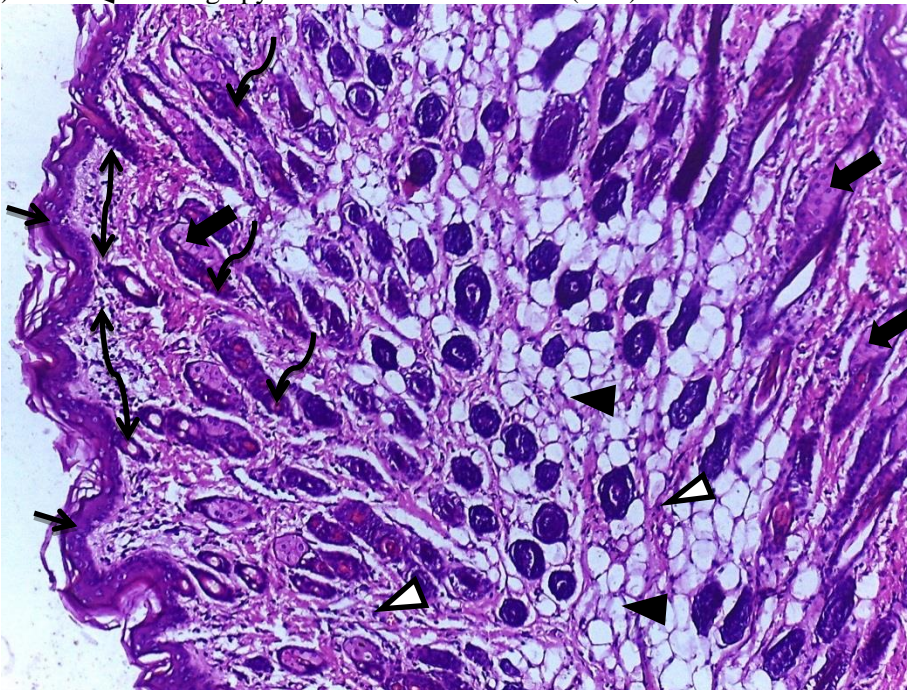
Picture(۳-۲) Infected rat skin with *Malassezia furfur* showing moderate hyperkeratosis(↘), sever sign of inflammation(↔), dilated irregular rete ridge(➤), hair follicles with variable size(↑), collagenous fibers and fibroblast(↔) H&E stain (10X).



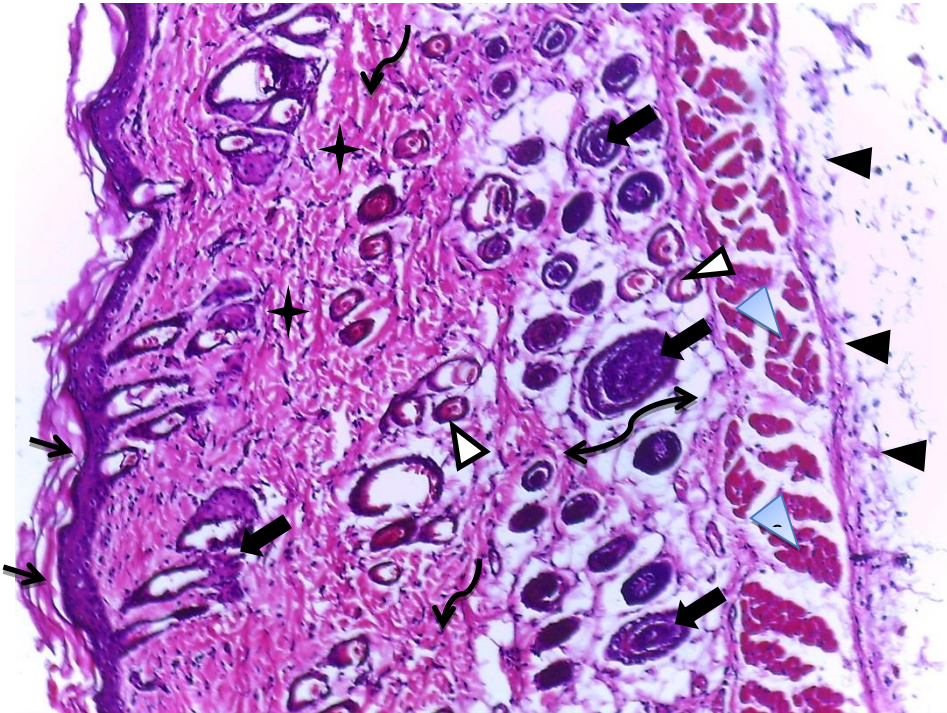
Picture(۳-۳) Infected rat skin with *Malassezia furfur* showing keratin deposition(↘), hyperpigmentation of stratum corneum(↘), dilated irregular rete ridge(↙), vacuolated keratinocytes (↓), the basal cells(↑) were small and arranged on basement membrane(↑), inflamed dermis(↔), large amount of collagen fibers(★) and fibroblast(↓) around the atrophied hair follicles (↓). H&E stain (40X).



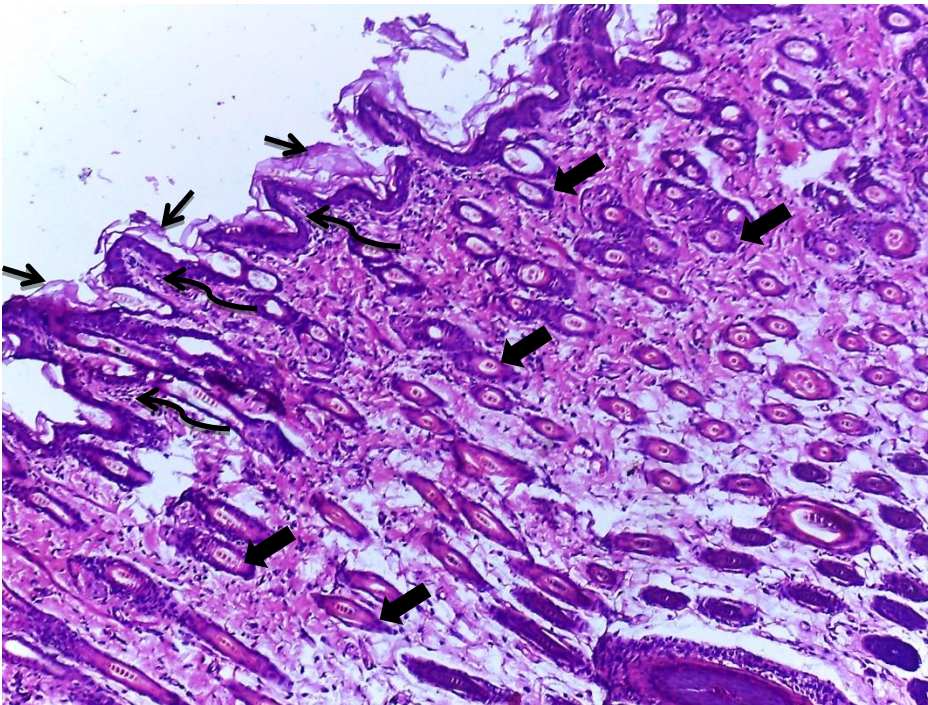
Picture(٧-٤) Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed vacuolated keratinocyte some with hyperchromatic nuclei(→), moderate deposition of keratin(↪), inflammatory cells(↔), irregular arrangement of collagenous fibers(↪), degenerated hair follicles(△) and adipocytes of sebaceous gland(◀) with large pyknotic nuclei. H&E stain (40X).



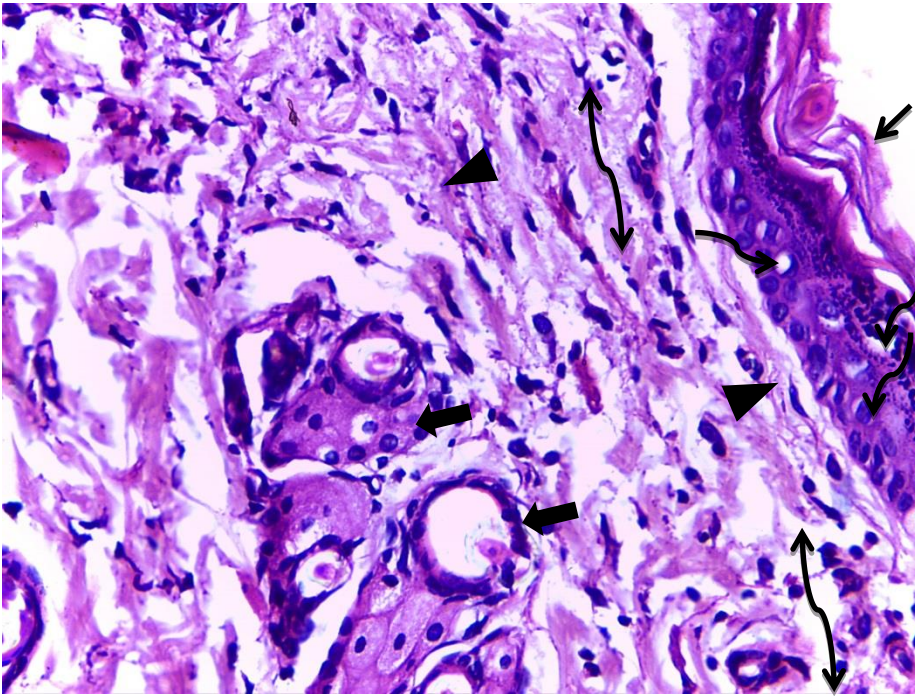
Picture(٧-٥) Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed thin epidermis(→), severe dermatitis(↔), congested hair follicles(↪), simple alveolar shrinkage sebaceous gland(↪) with large amount of adipose tissue(◀) and strand of collagen fibers(△) distributed randomly. H&E stain (10X).








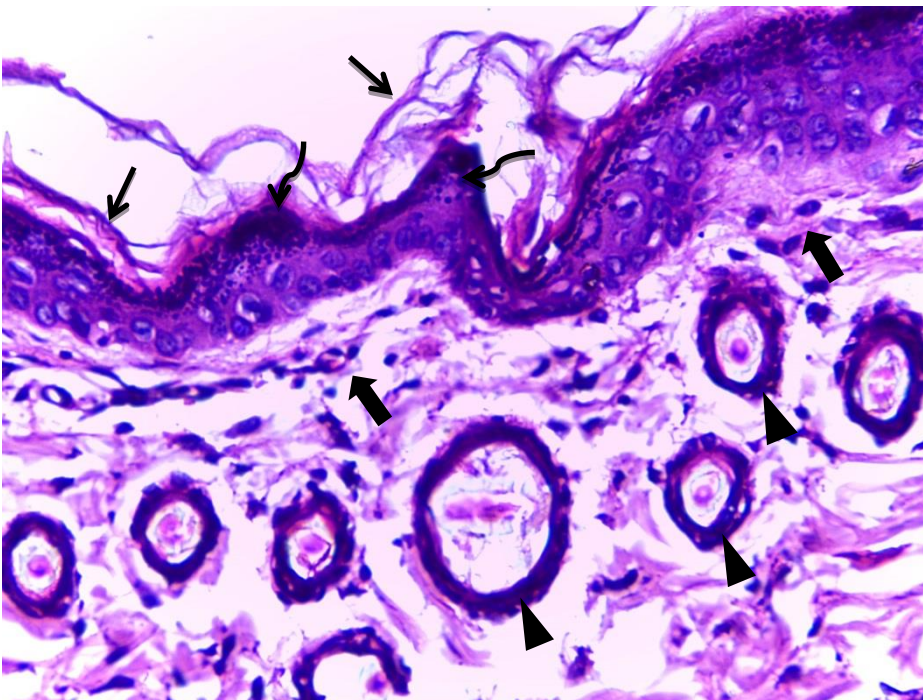
Picture(٣-٦) Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed stratum corneum(↘), variable size of hair follicles(↙) either in the dermis layer(★) or the hypodermis(↔) with large amount of collagen fibers(↘), also pigment containing cells in the connective tissue(▲)surrounded skeletal muscles(▲)beneath the hypodermis and congested capillaries(△)found through the hypodermis. H&E stain (10X).







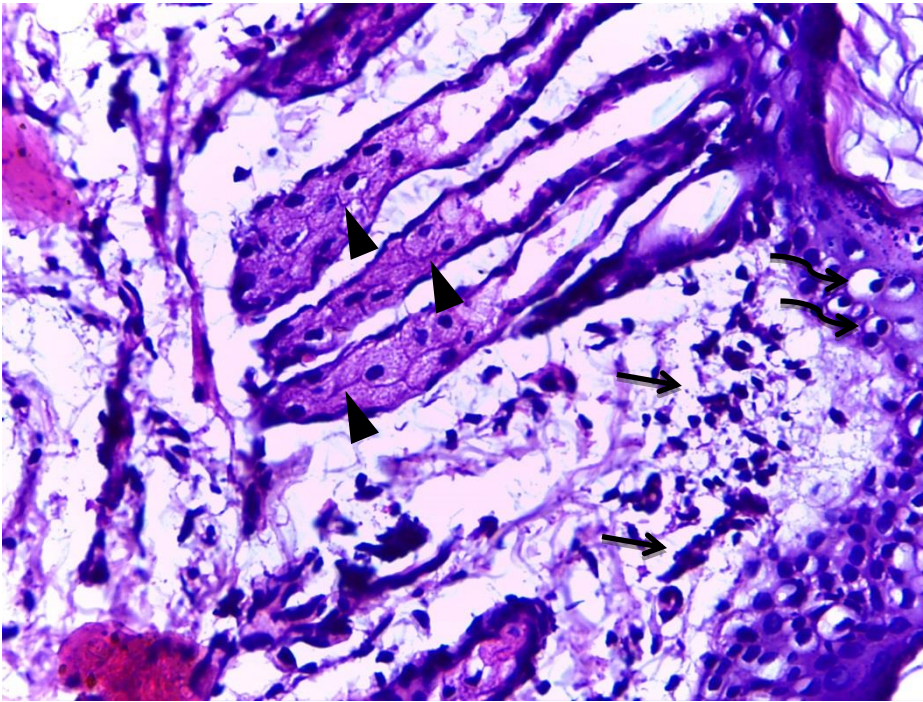
Picture(٣-٧) Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed acanthosis epidermis (↘), dermatitis (↙), large amount of atrophied hair follicles(↙) and less amount of collagen fibers arranged randomly . H&E stain (10X).



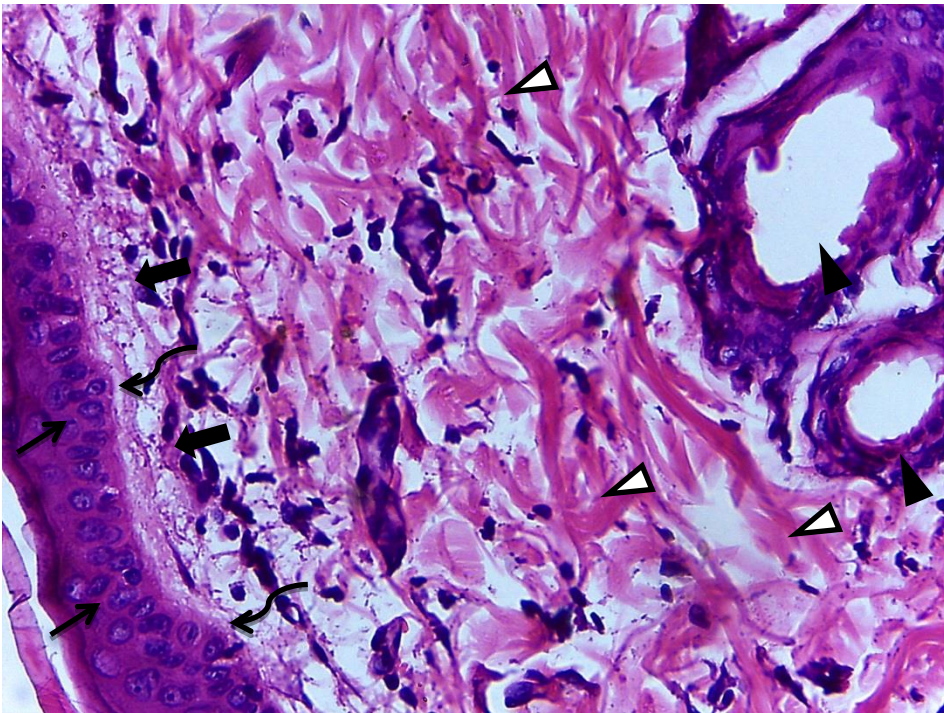
Picture(7-8) Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed mild keratin deposition() , vacuolated keratinocytes () , mild inflammatory cells() , regular deposition of collagen fibers() and normal hair follicles surrounded with sebaceous glands() . H&E stain (40X).



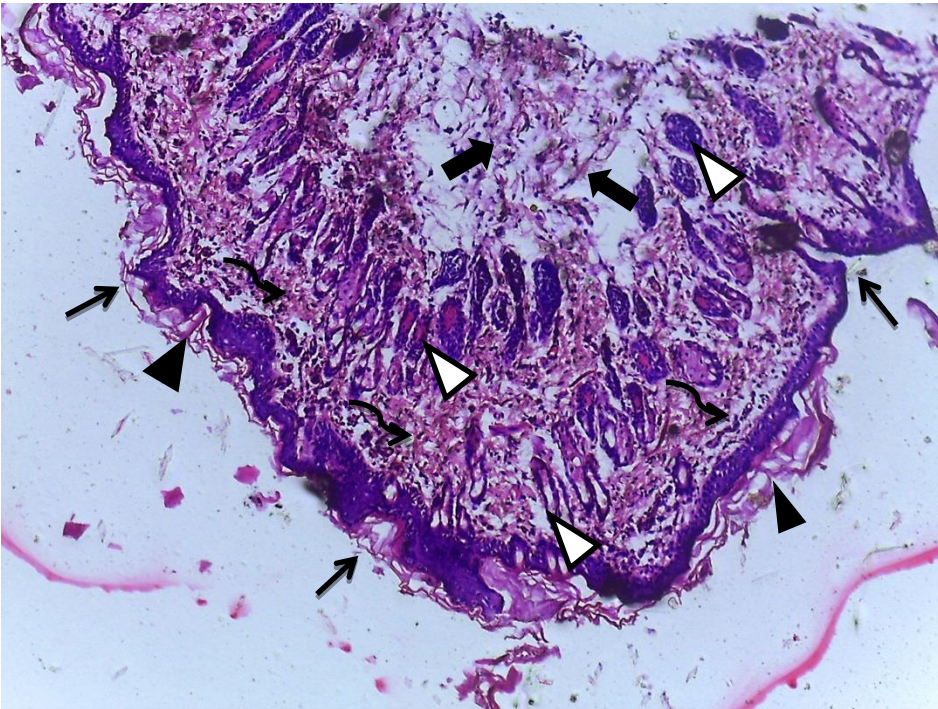
Picture(7-9) Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed moderate keratin deposition() on epidermis, acanthosis() , mild perivascular inflammation() and mild atrophied hair follicles() . H&E stain (40X).



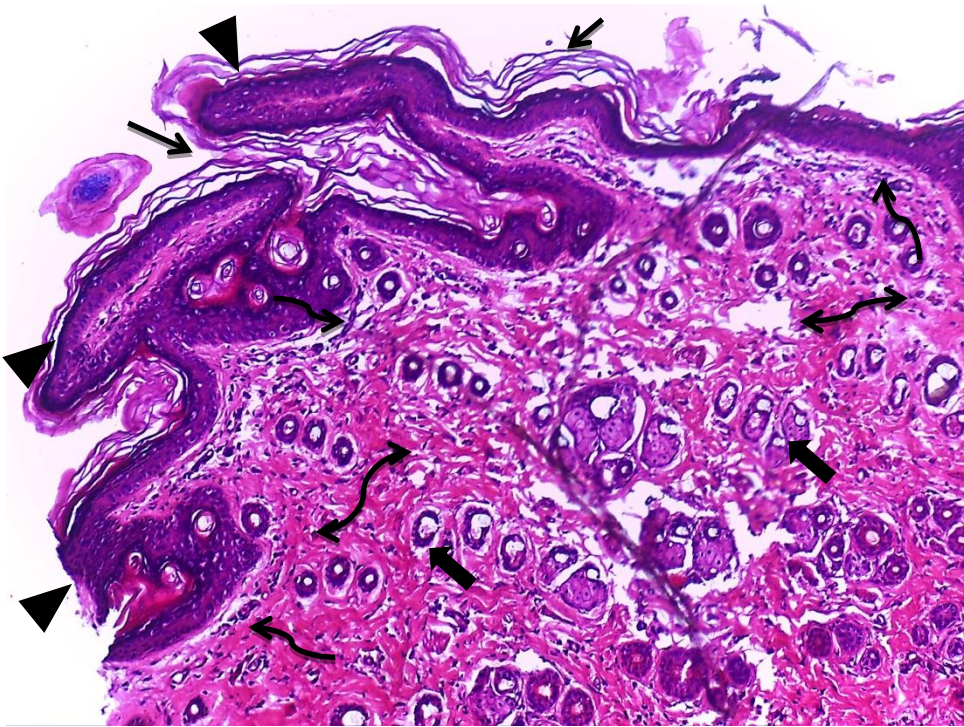
Picture(3-10) Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed focal aggregation of inflammatory cells (→), vacuolated keratinocytes(↪),shrinking sebaceous glands(▲). H&E stain (40X).



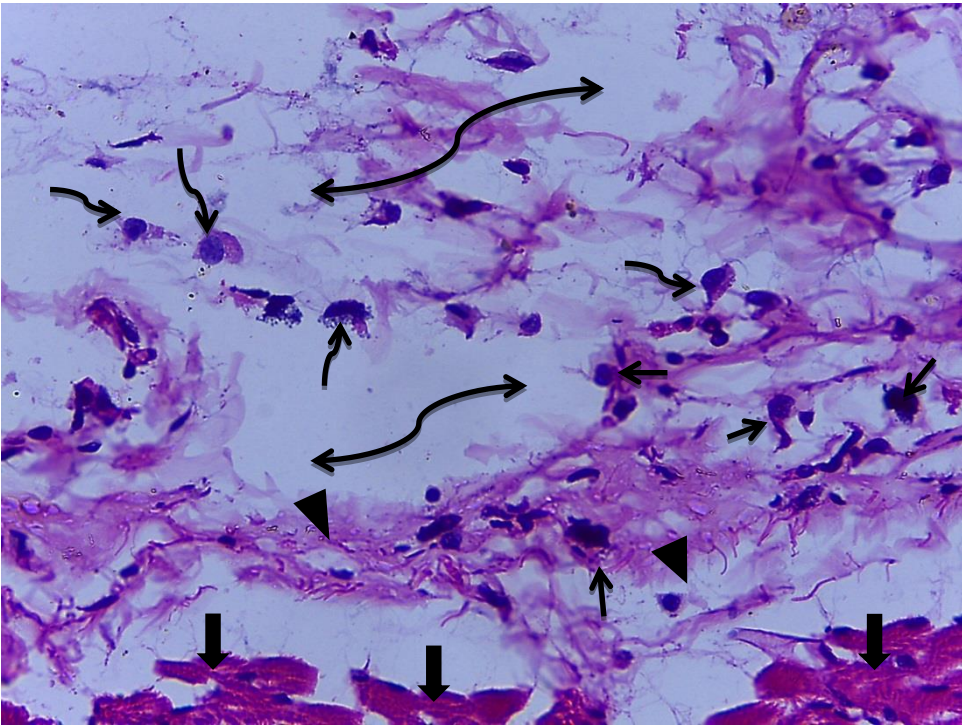
Picture(3-11) Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed irregular arrangement of epidermis cells (↔), dermatitis(←), absence of dermal papillae(↪), irregular collagen fibers(▲) and degenerated hair follicles(▲). H&E stain (40X).



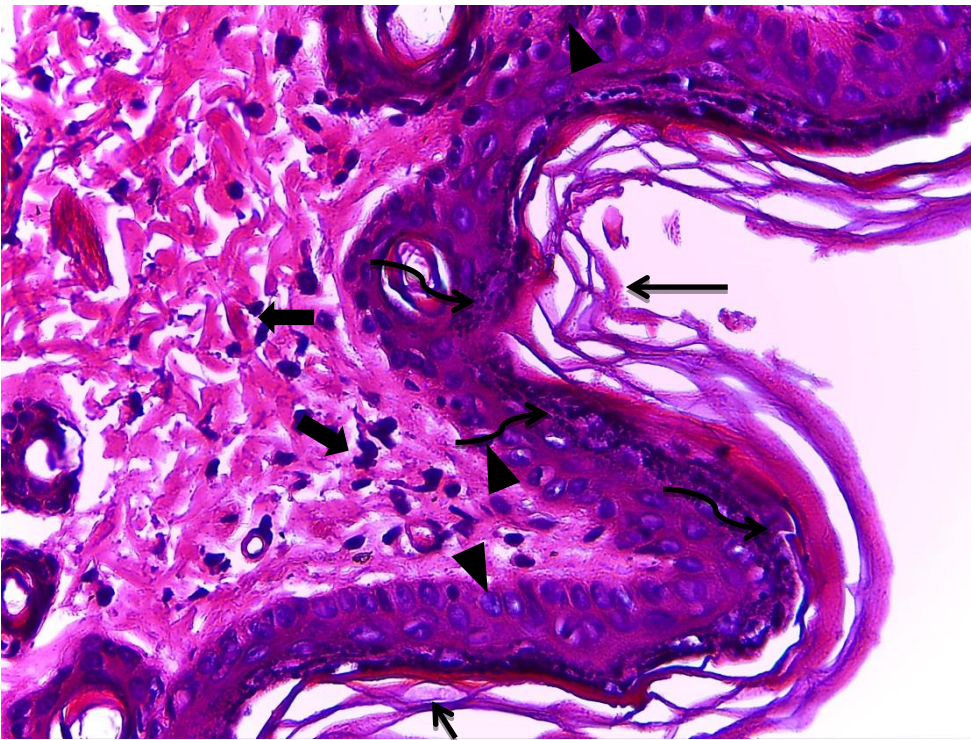
Picture(٣-١٢) Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed destruction of epidermis(↪), sever inflammation (dermatitis)(↪) extended to the deep layer(↪), deposition of keratin(↪), degenerated and atrophied most of hair follicles(↪). H&E stain (10X).



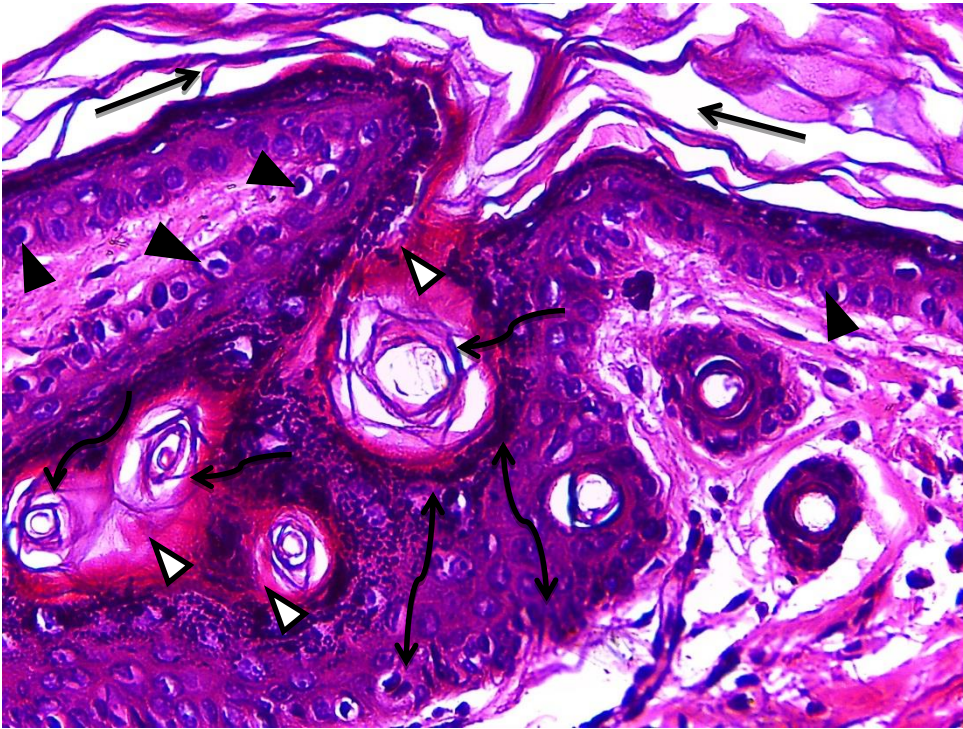
Picture(٣-١٣) Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed hyperkeratosis(↪), acanthosis(↪) perivascular inflammation(↪), heavy deposition of collagen fibers(↔) and atrophied hair follicles (↪). H&E stain (10X).



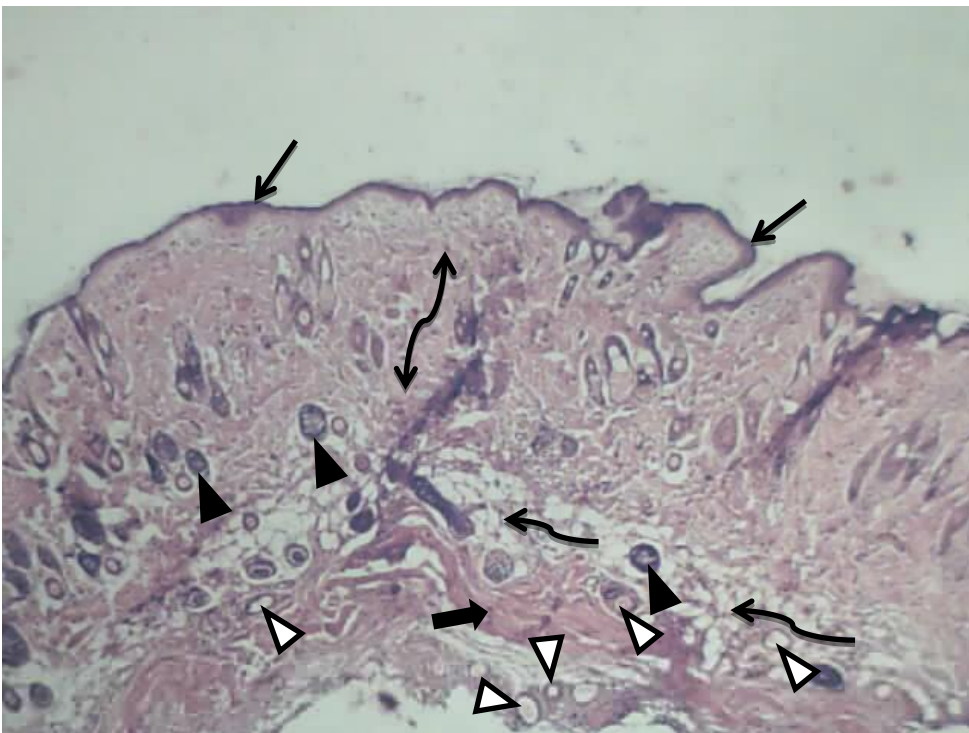
Picture 3-18 Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed the subcutaneous layer(↔) with variable inflammatory cells(←), mast cells(↷), loose connective tissue(▲) and sections of smooth muscle(↓). H&E stain (40X).



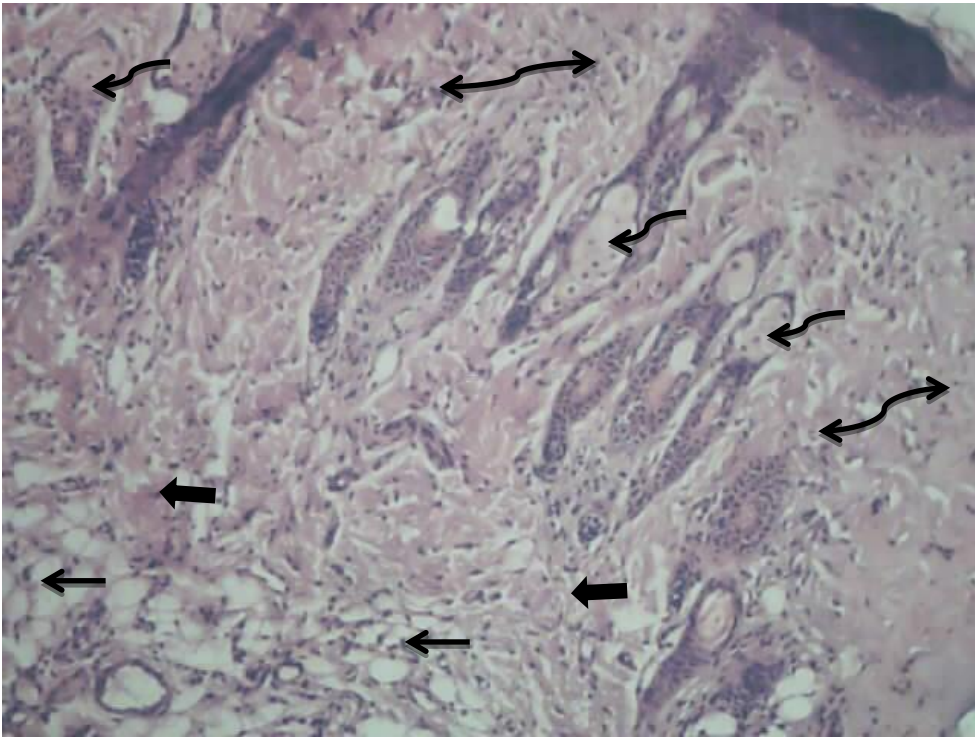
Picture 3-19 Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed hyperkeratosis wavy basket(↔), hyperpigmentation(↷), active keratinocytes(▲) and inflammatory cells(←). H&E stain (40X).



Picture ٣-١٦ Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed acanthosis(←), hyperkeratosis with keratin deposition(↔), abnormalities of hair follicles(↙), vacuolated epidermis cells(▲) and keratotic deposition(▽). H&E stain (40X).

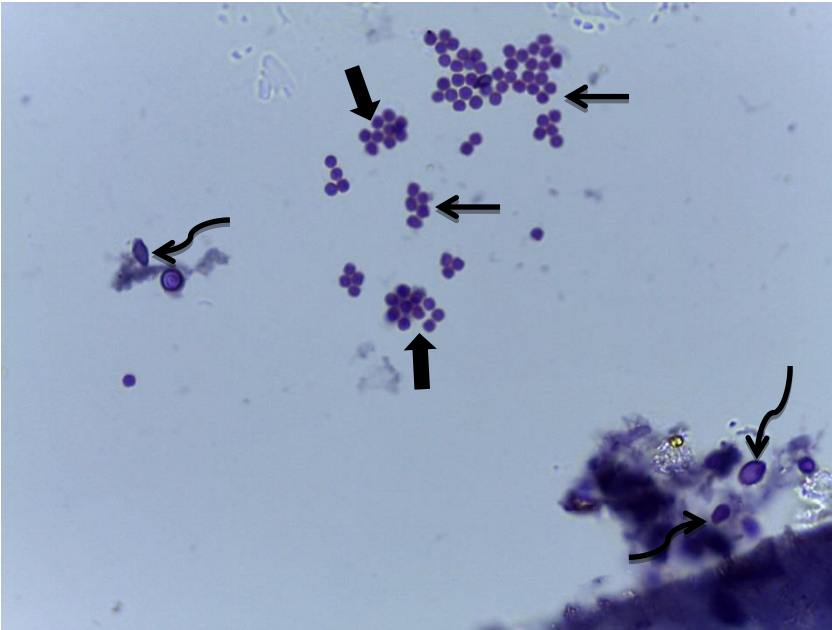


Picture ٣-١٧ Normal rat skin (control) showed the surface epidermis layer(←), wide dermis(↔) and hypodermis(↙), number of hair follicles(▲) and regular strands of collagenous fibers(↗), number of blood capillaries visible on hypodermic layer(▽). H&E stain (10X).

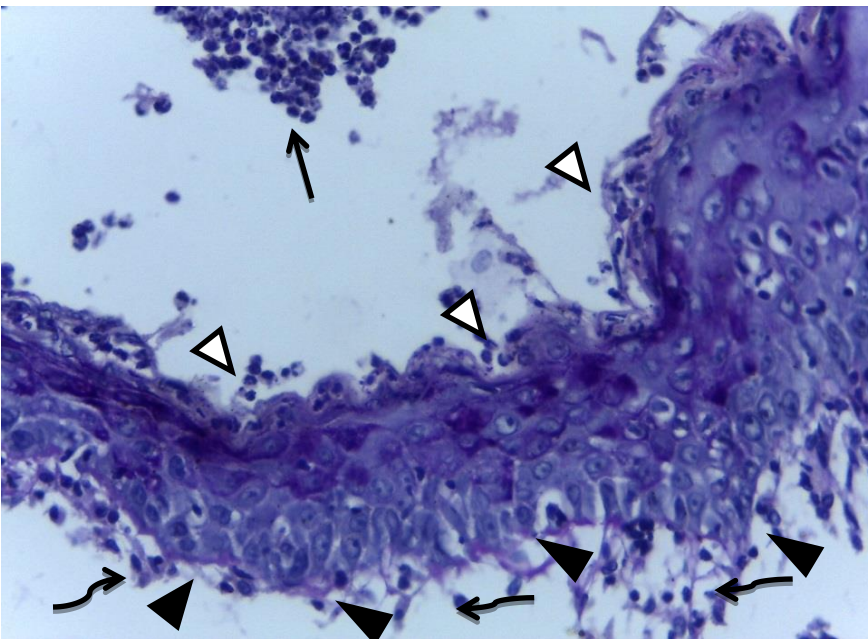


Picture 3-1^ Normal rat skin (control) showed normal dermis layer (↔), normal sebaceous glands (↖) with central nuclei, pads of adipocytes (↔) and heavy collagen fibers (↖). H&E stain (40X).

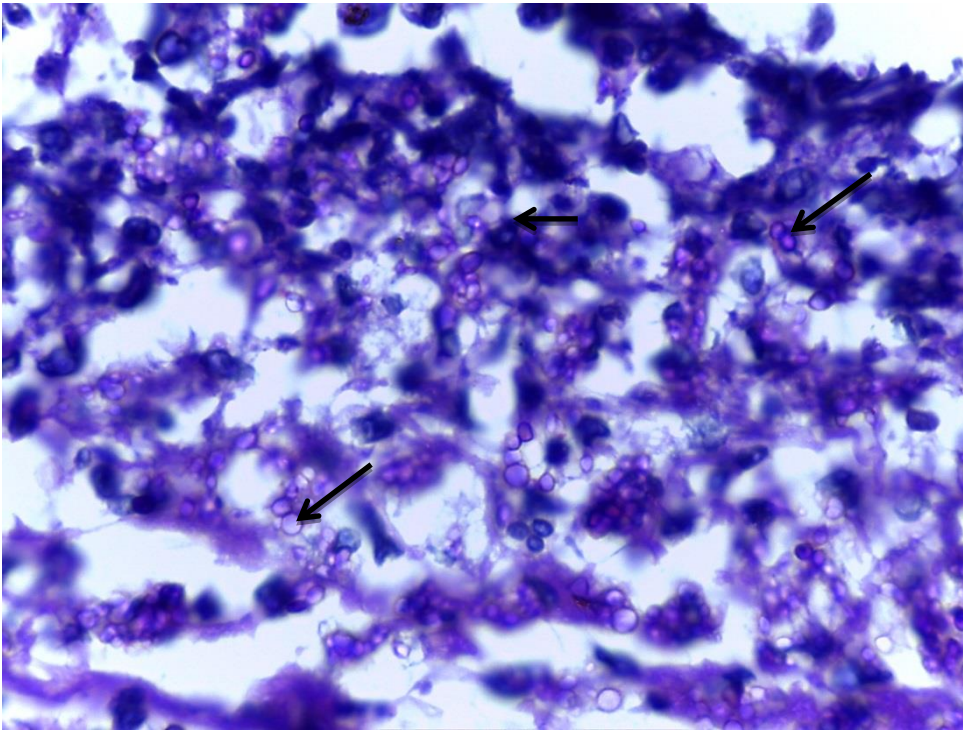
Skin histopathological examination stained with PAS :



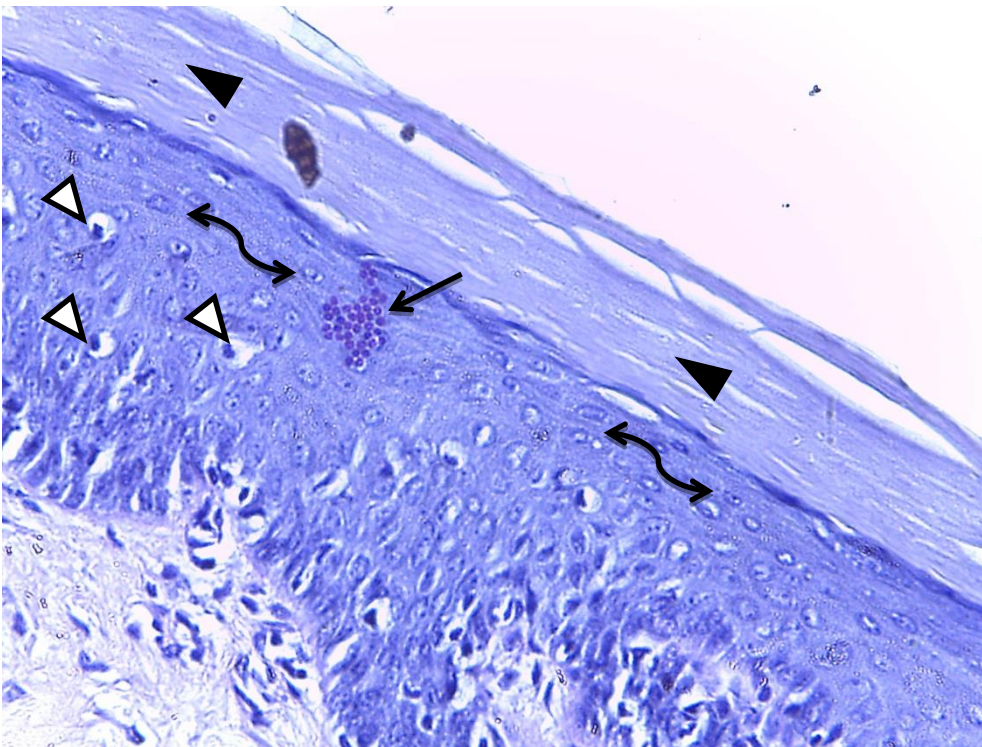
Picture ٣-١٩ Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed isolated yeast spores (←) near the surface layer of skin, some form collarette (←), others start to form sprout (←). PAS (40X)



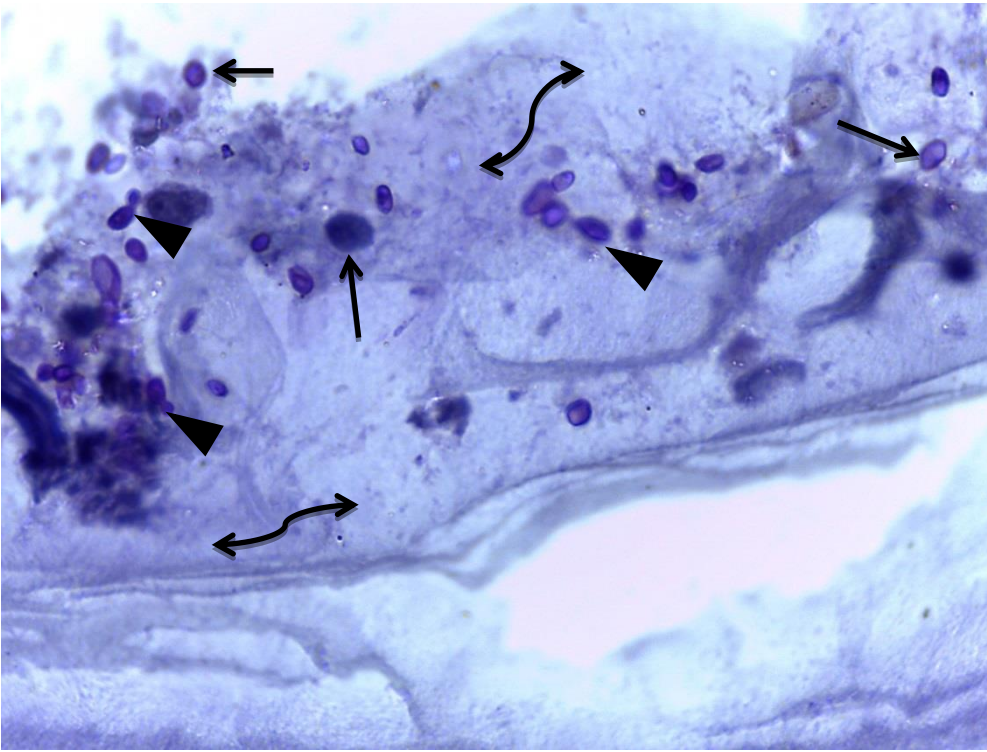
Picture ٣-٢٠ Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed large number of spores (←) some that attached on surface corneum (◁), others reached to the dermis (←) and hyphae formed (▴). PAS (10X).



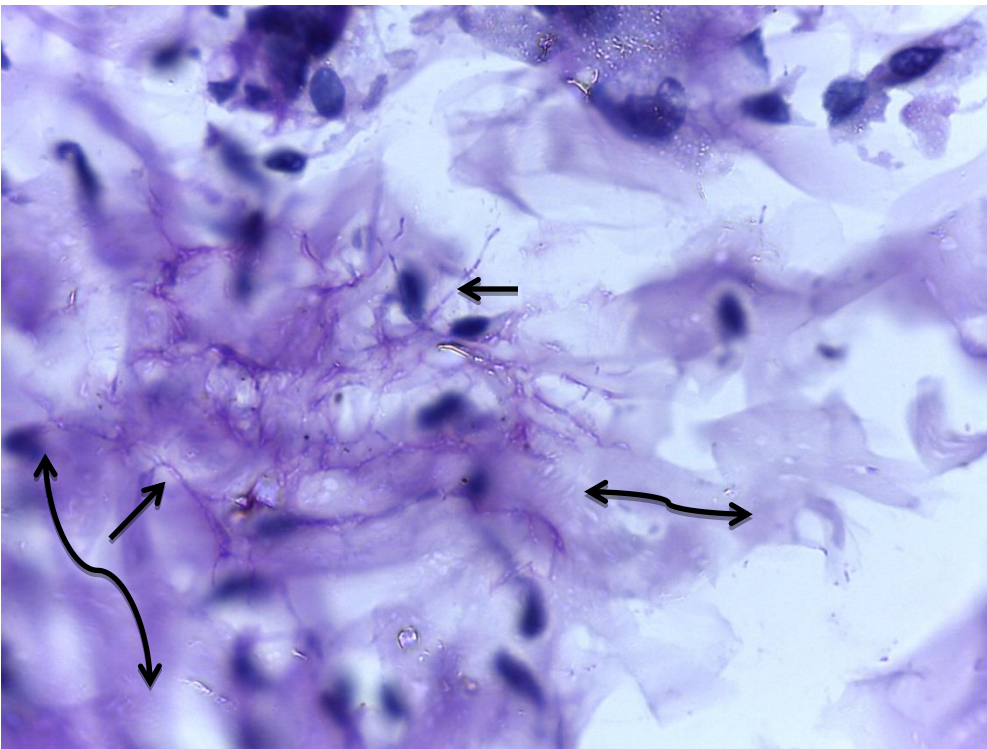
Picture 3-21 Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed large number of spores within dermis layer (←) and destruction of this layer. PAS (40X).



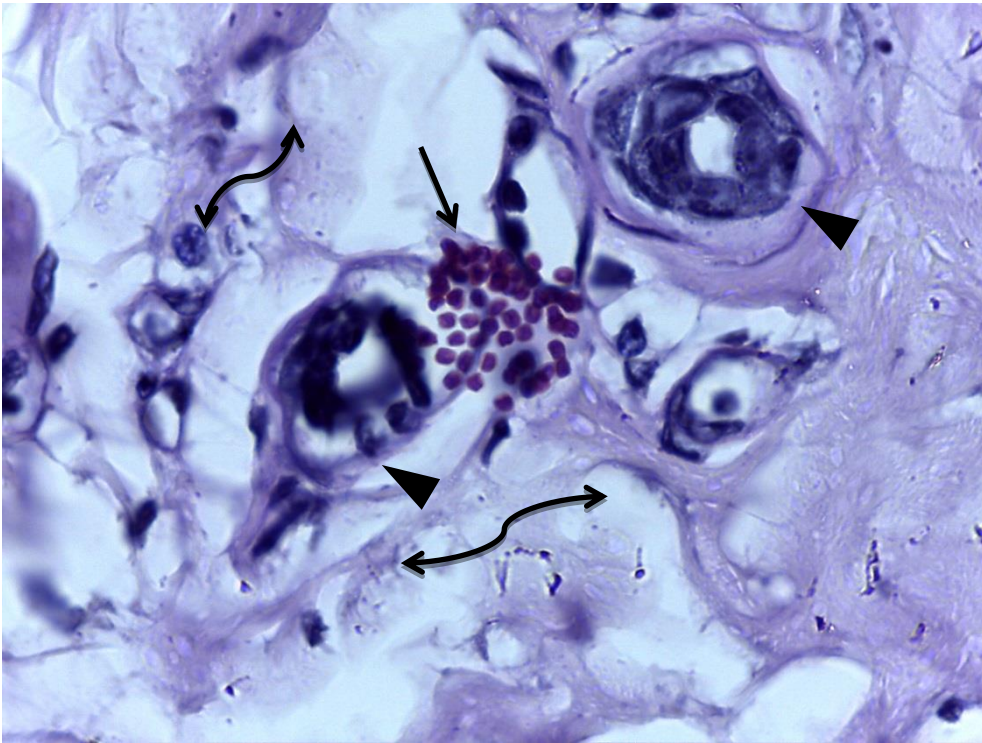
Picture 3-22 Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed aggregation of spores (↔) on the surface layer of the epidermis (→), hyperkeratosis (▲), vacuolated keratinocytes (△). PAS (10X).



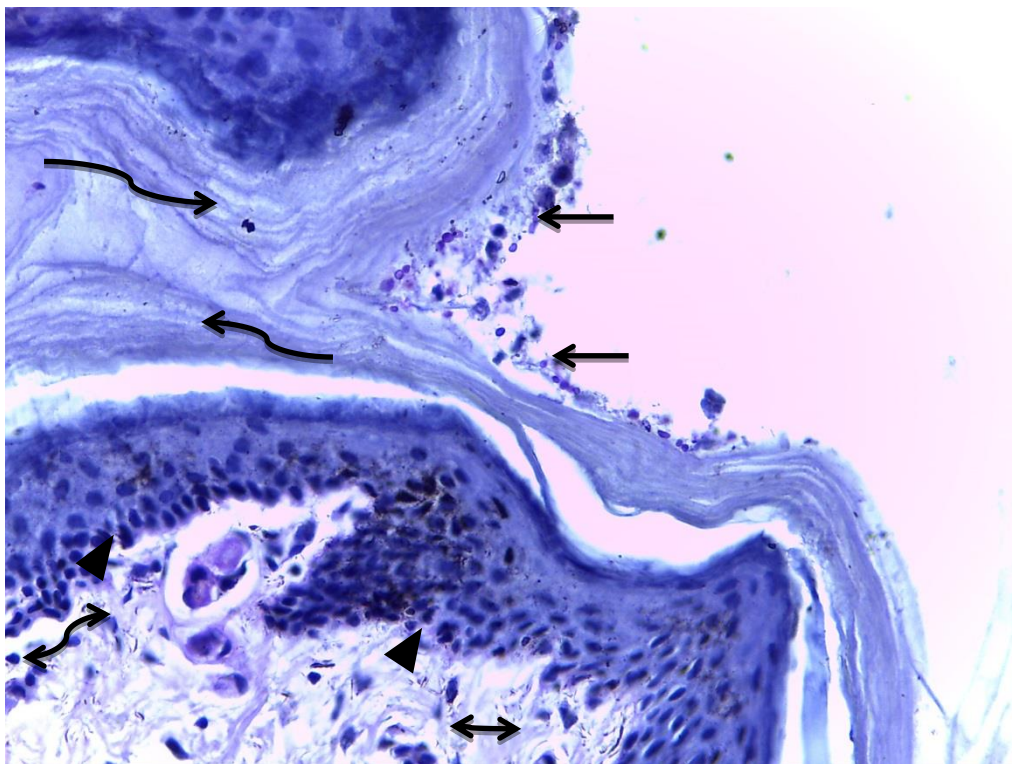
Picture ٣-٢٣ Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed spores (↔) with cellular debris(↔) and some spores budding and form sprouting (▲). PAS (40X).



Picture ٣-٢٤ Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed large number of hyphae(↔) as segmented filaments, stained pink, embedded within amorphous substance (↔). PAS (40X).



Picture 3-20 Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed number of yeast spores (→) stained pink, near the hair follicle (▲) within flamed dermatitis (↔). PAS (40X).



Picture 3-26 Infected rat skin with *Malassezia furfur* showed number of yeast spores embedded within the keratin (→), hyperkeratosis (←), epidermis hyperplasia (▲) and dermatitis (↔). PAS (10X)

٤- تطبيقات الاختراع

- أ- استخدام طرق جديدة في العزل والتشخيص الكفوء لخمائر الملاسيزيا من الحالات المرضية تستخدم لأول مرة في هذه الدراسات وهي عراقية الفكرة والاصالة.
- ب- عزل وتنقية وتصنيف خمائر الملاسيزيا من مرضى النخالية المبرقشة.
- ت- استخدام طرق جديدة في التوصيف الجزيئي لأنواع جنس الملاسيزيا
- ت- امكانية استخدام الطرق الجديدة في احداث المرض واثبات النظرية الجرثومية للاستدلال على المسبب وعلاقتة بالمرض.

٥- مميزات الاختراع

- ١- كفاءة الطرق الشكلية والفطرية المحورة والجديدة المستخدمة في عزل وتشخيص خمائر الملاسيزيا.
- ٢- طرق العمل المحورة والجديدة والايوساط الزرعية المحورة تمكنت من عزل خمائر الملاسيزيا والاحتفاظ بها فترة طويلة نسبيا بالمقارنة مع الدراسات الاخرى وهذه تسجل لأول مرة عالميا
- ٣- أعطت ٨٩,٥ ٪ من العينات التي تم جمعها من المرضى الذين يعانون من PV نتائج إيجابية ل KOH والمزارع لأنواع *Malassezia*.
- ٤- كان *Malassezia furfur* العامل المسبب السائد لل PV ، يليه *M. globosa* و *M. restricta* و *M. sympodialis* و *M. slooffiae*.
- ٥- كانت أكثر الظواهر السريرية والديمغرافية شيوعًا في المرضى الذين يعانون من PV هي الفئة العمرية بين (٢٠-١٢) عامًا ، النوع ٣ من الجلد ، البشرة ذات الطبيعة الزيتية ، تاريخ عائلي غير مصاب بالسكري ، غير إيجابي ، مدة أقل من عام واحد ، و الوضع المتكرر للعدوى.
- ٦- تباين كبير بين منتجات PCR لأنواع *Malassezia* تراوحت ما بين bp٤٨١,٠٧ و bp٨٦٠,٧٦ للأزواج ITS1 / ITS4 و V9G / LS266 على التوالي على أنه *M. furfur* ، بينما احتدم من bp٤٦٢,٦٩ و bp٦٩٩,٣٧ ل ITS1 / ITS4 و V9G / LS266 أزواج بريمر التي تم تحديدها على التوالي باسم *M. globosa*.
- ٧- اثبتت الطرق الجديدة المستخدمة في الدراسة الوراثية كفاءتها في التوصيف الجزيئي والوراثي لخمائر الملاسيزيا.

٨- - استطاعت ملاسيزيا فور فور النمو وتكوين تجمع وفير من الأبواغ والخيوط في الطبقة القرنية للجرذ التجريبي الذي حقن داخل الأدمة مع تعليق الخميرة مما تسبب في ظهور علامات التهاب مع تضخم البشرة. وهذ الظاهرة تسجل لأول مرة عالميا.

٩- طرق العمل الجديدة المستخدمة في حقن الحيوانات المختبرية تستخدم هنا لأول مرة وقد اثبتت فعاليتها في اثبات النظرية الجرثومية للمرض وتاكيد كون الملاسيزيا مسببا اكيدا لمرض النخالية المبرقشة للانسان

٦- الادعاءات (عناصر الحماية)

العناصر الجديدة في الاختراع المراد حمايتها

- ١ - طرق جديدة في العزل والتشخيص والتوصيف الجزيئي لخمائر الملاسيزيا المسببة لأمراض الجلدية للإنسان
- ٢ - استنادا الى عنصر الحماية الاول يمكن استخدام الطرق الجديدة والمحورة في العزل الكفوء وتشخيص لخمائر الملاسيزيا وهي طرق عراقية الاكتشاف وتستخدم لأول مرة في مثل هذه الدراسات .
- ٣ - استنادا الى عنصر الحماية الاول يمكن استخدام الطرق الجديدة المطورة في الدراسة الحالية في التوصيف الجزيئي لأنواع جنس الملاسيزيا من الناحية الجزيئية.
- ٤ - استنادا الى عنصر الحماية الاول يمكن اعتماد طرق الدراسة الحالية في تأكيد الارتباط المعنوي الوثيق بين خمائر الملاسيزيا والأمراض الجلدية للإنسان وبالأخص مرض النخالية المبرقشة
- ٥ - استنادا الى عنصر الحماية الاول نؤكد كفاءة الطرق المستخدمة في الدراسة الحالية داخل الجسم IN VIVO في دراسة علاقة المرض بمسببه الجرثومي.
- ٦ - استنادا الى عنصر الحماية الاول فان الطرق المستخدمة في الدراسة الحالية ونتائجها وأشكالها وصورها تسجل لأول مرة محليا واقليميا وقد اثبتت فعاليتها في الحفاظ على انواع جنس الملاسيزيا المعروفة علميا بصعوبة عزلها وتشخيصها والاحتفاظ بها.

- 1- Al-Ammari Abbas M. , Al-Attraqhchi Azhar A.F. and Al-Ahmer Saife D. (2016) Molecular Charecterization of *Malassezia furfur* isolated from patients with pityriasis versicolor compared to healthy control in Baghdad, Iraq. J Fac. Med. Baghdad. 58, 1: 85-89.
- 2-Al-Hammadani A. H. A. (1997) Enzymic activity, purification of keratinase and roteinase and their roles in the pathogenicity and immunogenicity of clinical isolates and yeast. PhD. Thesis, College of Education, University of Basrah.
- 3-Aljebre S.H., Alzayir A.A., Abdulghani M. and Osman O.O. (2001) Pigmentary changes of tinea versicolour in dark-skinned patients. Int. J Dermatol. 40:273-275.
- 4-Allen H.B. , Goyal K. , Ogrich L. and Joshi S. (2015) Biofilm formation by *Malassezia furfur/ovale* as a possible mechanism of pathogeisis in tinea versicolor. J Clin. Exp. Dermatol. Res 6, 311: 2-4.
- 5-Almeida S.R. (2008) Immunology of dermatophytosis. Mycopathologia. 166: 277-283.
- 6-Al-Rubaie, M.G. (1991) Clinic-epidemiological study of pityriasis versicolor in Baghdad. M.Sc. thesis. College of Medicine, University of Al- Mustansiriya.
- 7-Al-Saimary I.E.A. (1993) A Study of Dermatophytosis In Basra, Iraq. Al-Mustansiriya J Sci. 9 (1) : 6-9.
- 8-Ambujavalli B.T. (2016) Characterization of clinical isolates of *Malassezia* by phenotypic and genotypic methods including scanning electron microscopy studies standardization of two novel media for isolation speciation and demonstration of bio film production. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy (Ph.D.) Department of Microbiology, Sri Ramachandra University, India.
- 9-Archana B.R., Beena P.M. and Kumar S. (2015) Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolour in Kolar Region, Karnataka. Indian J Dermatol. 60(3): 321.
- 10-Cafarchia C., Dell'Aquila M., Traversa D., Albrizio M., Guaricci A., De Santis T. and Otranto D. (2010) Expression of the μ -opioid receptor on *Malassezia pachydermatis* and its effect in modulating phospholipase production. Med. mycol. 48: 73-78.

- 11-Cafarchia C., Dell'Aquila M.E., Traversa D. and Albrizio M. (2009) Expression of the micro-opioid receptor on *Malassezia pachydermatis* and its effect on modulating phospholipase production. *Med. Mycol.* 19:1–6.
- 12-Charan U.P., Peter C.V. and Pulimood S.A. (2013) Impact of hand eczema severity on quality of life. *Indian Dermatol. Onl. J.* 4(2): 102-105.
- 13-Chastain M.A., Reed R.J. and Pankey G.A. (2001) Deep dermatophytosis, report of 2 cases and review of the literature. *Cutis.* 67: 457–462.
- Chen T.A. and Hill P.B. (2005) The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet. Dermatol.* 16: 4–26.
- 14-Gang H.U., Wei Y. and Feng J. (2010) *Malassezia* infection, is there any chance or necessity in refractory Acne?. *Chin. Med. J.* 123(5): 628-632.
- 15-Ghosh S.K., Dey S.K., Saha I., Barbhuiya J.N., Ghosh A. and Roy A.K. (2008) Pityriasis versicolor, a clinicomycological and epidemiological study from a tertiary care hospital. *Indian J Dermatol.* 53(4):182-185.
- 16-Giusiano G.E. (2006) *Malassezia*. Current knowledge and study perspectives. *Rev. Argent. Microbiol.* 38(1):41–8.
- 17-Giusiano G., de los Angeles Sosa M., Rojas F., Vanacore S.T. and Mangiaterra M. (2010) Prevalence of *Malassezia* species in pityriasis versicolor lesions in northeast Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* 27:71-74.
- 18-Juncosa M.T., Gonzalez C.A. and Alayeto O.J. (2002). Cutaneous colonization by *Malassezia spp.* in neonatos. *An. Esp. Pediatr.* 57: 452-456.
- 19-Kallini J.R., Riaz F. and Khachemoune A. (2014) Tinea versicolour in dark-skinned individuals. *Int. J Dermatol.* 53:137-141.
- 20-Kaneko T., Makimura K., Onozaki M., Ueda K., Yamada Y., Nishiyama Y. and Yamaguchi H. (2005) Vital growth factors of *Malassezia* species on modified CHROMagar Candida. *Med. Mycol.* 43: 699-704.
- 21-Luecke S., Backlund M., Jux B., Esser C., Krutmann J. and Rannug A. (2010) The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pig. Cell Melan. Res.* 23: 828-833.
- 22-Mahmoud Y.A.G., Metwally M.A., Mubarak H.H. and El Zewawy N. (2014) Molecular typing of *Malassezia furfur* and *Malassezia globosa* isolated from Tinea versicolor patients, based on Total protein extract and DNA finger print profiles. *J Adv. Biol.* 5: 749-763.

- 23-Mancianti F., Rum A. , Nardoni S. and Corazza M. (2001) Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* species isolates. *Mycopathol.* 149:131-135.
- 24-Mansour A. and Al-Hamdi K. I. (2008) Prevalence of Pityriasis versicolor among diabetics in Basrah. *Arch. Med. Sci.* 4:443–446.
- 25-Nura M.S., Sani N.M., Abubakar M.M. and Kutama A.S. (2016) Review of the current status of Tinea Versicolor in some parts of Nigeria. *Int. J Sci. Eng. Sci.* 2(1) : 201-217.
- 26-Pantazidou A. and Tebruegge M. (2007) Recurrent tinea versicolor, treatment with itraconazole or fluconazole?. *Arc. Dis. Childhood.* 92(11): 1040-1042.
- 27-Prohić A. and Ozegovic L. (2007) *Malassezia* species isolated from lesional and non-lesional skin in patients with pityriasis versicolor. *Mycoses.* 50: 58–63.
- 28-Rao G.S., Kuruvilla M., Kumar P. and Vinod V. (2002) Clinico-epidermiological studies on tinea versicolor. *Indian J Dermatol. Venereol. Leprol.* 68(4): 208-209.
- 29-Rathnapriya N. (2008) Identification of *Malassezia* species in pityriasis versicolor. M.D. Degree Examination (Microbiology). The Tamil Nadu Dr. M.G.R. Medical University Chennai, India.
- 30-Romani L (2004) Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 1–13.
- 31-Rosenthal M., Goldberg D., Aiello A., Larson E. and Foxman B. (2011) Skin microbiota, microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infec. Gen. Evo. J.* 11(5) : 839-348.
- 32-Saadatzadeh M.R., Ashbee H.R., Cunliffe W.J. and Ingham E. (2001) Cell-mediated immunity to the mycelial phase of *Malassezia* spp. in patients with pityriasis versicolor and controls. *Bri. J Dermatol.* 144(1) : 77-84.
- 33-Salahi-Moghaddam A., Davoodian P., Jafari A. and Nikoo M.A. (2009) Evaluation of pityriasis versicolor in prisoners, a cross-sectional study. *Indian J Dermatol. Venereol. Leprol.* 75(4): 379-382.
- 34-Tarazooie B., Kordbacheh P., Zaini F., Zomorodian K., Saadat F., Zeraati H., Hallaji Z. and Rezaie S. (2004) Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. *BMC Dermatol.* 4: 5-10.
- 35-Turner G.A., Hoptroff M. and Harding C.R. (2012) Stratum corneum dysfunction in dandruff. *Internat. J Cos. Sci.* 34(4): 298-306.

- 36-Van den Ende A. and De Hoog G. (1999) Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. Stud. Mycol. 43: 151-162.
- 37-Venugopal P.V. and Venugopal T.V. (1992) Superficial mycoses in Saudi Arabia. Aus. J Dermatol. 33(1):45-48.
- 38-Viani F.C., Dos Santos J.I., Paula C.R., Larson C.E. and Gambale W. (2001) Production of extracellular enzymes by *Microsporum canis* and their role in its virulence. Med. Mycol. 39: 463–468.
- 39-Vuran E., Karaarslan A., Karasartova D., Turegun B., Sahin F. (2014) Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor lesions with a new multiplex PCR method. Mycopathol. 177(1-2): 41-49.
- 40-WHO (World Health Organization). (2002) Basics of quality assurance for intermediate and peripheral laboratory. (2nd). East. Medit. Ser. 2: 23-26, 84-111, 112-124.
- 41-WHO. (2003) Basic histopathology and anatomical pathology services. East. Medit. Ser. 23: 7-39.
- 42-Zampino M., Osti F., Corazza M. and Virgili A. (2007) Prevalence of pityriasis versicolor in a group of Italian pregnant women. J Eur. Aca. Venereol. 21: 1249-1252.
- 43-Zarei Mahmoudabadi A., Mossavi Z. and Zarrin M. (2009) Pityriasis versicolor in Ahvaz, Iran. Jun. J Microbiol. 2: 92-96.
- 44-Zarei Mahmoudabadi A., Zarrin M. and Azish M. (2014) Detection of *Malassezia* species isolated from patients with Pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis using nested-PCR. Jen. J Hea. Res. 5: 1-4.
- 45-Zeid M.H.A., El Mohamady A.S.A., EL Fangary M.M., Saudi W.M., Allah T.N.A., Mohamed T.M. and Mahmoud M.T. (2015) Molecular and conventional identification of *Malassezia* spp. in *Malassezia* spp.-associated dermatoses. J Egy. Wom. Dermatol. Soc. 12: 68-76.
- 46-Zomorodian K., Mirhendi H., Tarazooie B., Zeraati H., Hallaji Z. and Balighi K. (2008) Distribution of *Malassezia* species in patients with psoriasis and healthy individuals in Tehran, Iran. J Cut. Pathol. 35:1027-1031