Journal of Bioscience and Applied Research WWW.JBAAR.ORG

Effect of Some Environmental Factors and Antifungals on Growth of *Epidermophyton floccosum*

Dr. Talal Hussain Saleh

Misan University – College of agriculture – Plant Protection Department

Abstract :

Epidermophyton floccosum was isolated from infected patient with tinea unquium. The identification based on morphological and microscopic features.

The study showed that (SDA) was the best medium compared with (PDA). Optimum temperature of growth was 25°C on (SDA) for (14) days while the temperature 37°C showed great redaction in the growth. The optimum PH of growth was 6 on (SDA) at 25°C for (14) days while the PH 8 showed greatly reduction in the growth. The antifungals susceptibility tests showed that Terbinafine (TER) was high active agents for inhibition of growth that other antifungal (Itraconazole). While the results showed resistant to Fluconazole.

Introduction :المقدمة

الفطريات الجلدية(Dermatophytes) هي مجموعة من الفطريات التي لها القدرة على مهاجمة الأنسجة الكيراتينية في (الشعر – الأظافر والجلد) للإنسان والحيوان محدثة الإصابة المعروفة بـ(Dermatophytosis) والتي تقتصر على الطبقة الخارجية المتقرنة Amer *etal*., (2006)، حيث تستغل هذه الفطريات الكيراتين كمصدر للنتروجين (Forbs *etal*., 2007). تمتاز هذه الفطريات بأنها محبة للكيراتين (Keratinophilic) ومحللة له (Keratinolytic) وهذا يعني قدرتها على هضم الكيراتين خارج جسم الكائن الحي والموجودة في الطبقة الخارجية للجلد، الشعر والأظافر Ameen (2010)، وهذا يمثل الوسيلة الرئيسية في غزو جلد الإنسان والحيوان وبالتالي الإصابة بالأمراض الفطرية الجلدية (Sharma *etal*., 2012).

وقد أطلق اسم القوباء الحلقية (Ringuorm) أو السعفة (Tinea) على هذه الأمراض لما تحدثه من بقع دائرية والتي أصبحت واحدة من أهم الأمراض الجلدية ظهوراً في الإنسان (Tasang *etal*., 1996).

تضم الفطريات الجلدية حوالي (40) نوعاً تعود إلى ثلاث أجناس هي: Epidermophyton, Trichophyton وMicrosporum وهي من الفطريات الناقصة (Naradzay *etal*., 2006) بيئياً تصنف الفطريات الجلدية إلى ثلاث أنواع هي Anthropophilic حيث يكون الإنسان مسكنها الطبيعي وتنتقل من إنسان إلى آخر عن طريق التلامس أو استخدام أدواته الملوثة، والنوع الثاني هو Zoophilic والمضيف الرئيسي لها هو الحيوان أما النوع الثالث فهو Geophilic والتي تتواجد في التربة وتستطيع إصابة كلاً من الإنسان والحيوان وفي الأنواع الثلاث فان الفطريات تستطيع إصابة الإنسان (Pakshir & Hashemi, 2006).

يعد الفطر *Epidermophyton floccosum* من الفطريات البشرية (Anthropophilic) وهو واسع الانتشار حيث الإصابة بسعف الأظافر (Tinea unguium) وسعفة الفخذ (Tinea Cruris) وسعفة القدم (Tinea pedis) (Lacaz *etal*., 2002).

كما يعد هذا الفطر واحداً من نوعين يعودان إلى جنس *Epidermophyton*، الفحص المجهري للفطر يظهر بأن نموه متوسط السرعة حيث تتضح المستعمرة خلال (10) أيام، ظهر المستعمرة برتقالي إلى بني مع حواف صفراء، ظهور الكونيدات الكبيرة والتي تمتاز بجدارها السميك، ملساء، صولجانية ذات نهايات مدورة مع غياب الكونيدات الصغيرة (Ayorinde *etal*., 2013).

تؤثر بعض العوامل البيئية مثل درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني (PH) على النشاطات الانزيمية خارج خلوية مثل انزيم البروتينيز (Protinase) والفوسفوليبيز (Phospholipase) والكيراتينيز (Keratinase) وبالتالي على امراضية هذا الفطر (Lacaz *etal*., 2002).

إن الانتشار العالي للإصابات الفطرية الجلدية ومعرفة الفطر المسبب ونسبة انتشاره تساعد في إجراء المعالجة وهذا ما دفع العلماء لاستخدام مجموعة من المضادات الفطرية لمعالجة هذه الإصابات (Araj *etal*., 2004)، إن استخدام الأدوية الجهازية في معالجة الإصابات الفطرية الجلدية بدء يقل بسبب المشاكل التي تسببها هذه الأدوية لسميتها العالية والآثار الجانبية التي تتركها (Araujo *etal*., 2009).

في دراسة أجراها Abarca *etal*., (1990) حول تأثير درجة الحرارة على نحو 17 سلالة من الفطر *Epidermophyton* حيث وجد إن درجة الحرارة(28)°م و(31)°م هي الأفضل لنمو معظم السلالات.

كما أشار Farnoodian *etal*., (2009) إلى أن أفضل وسط لنمو الفطر *E. floccosum* هو (SDA) وان المضاد الفطري(Betamethasone) هو الأفضل في تثبيط نمو هذا الفطر.

المواد وطرائق العمل: Materials and Methods

1- جمع العينة:

تم الحصول على عينة من شخص مصاب بسعفة الأظافر (Tinea unguium) وذلك بمسح منطقة الإصابة بالكحول 70% ومن ثم أخذ جزء صغير من الأظافر المصابة والاحتفاظ بها لحين زراعتها.

2- تحضير الأوساط الزرعية:

أ- وسط سابروید – دکستروز اکار (SDA): Sabourauds Dextrose Agar

حضر هذا الوسط حسب طريقة Emmons *etal*., (1974) وحسب تعليمات الشركة المصنعة (Himedia) بإذابة (65) غم من هذا الوسط في 1000 مل من الماء المقطر وإضافة 0.5 غم/لتر من المضاد الفطري Cycloheximide كما تم إضافة 0.05 غم من المضاد الحيوي Chloramphenicol بعد التعقيم والتبريد.

استعمل هذا الوسط لعزل الفطر قيد الدراسة.

ب- وسط بطاطا – دکستروز أکار (PDA): Potato Dextrose Agar

حضر هذا الوسط بإذابة (39) غم منه في 1000 مل من الماء المقطر وحسب تعليمات الشركة المصنعة (Himedia).

استعمل هذا الوسط لاختبار قابلية الفطر على النمو فيه.

ج- وسط ایمونس سابروید – دکستروز أکار (ESDA): Emmons Sabourauds Dextrose Agar:

حضر هذا الوسط وحسب طريقة McGinnis (1980) بإذابة (20) غم من الدسكتروز، (10) غم من الببتون، (20) غم من الاكار وأكمل الحجم إلى 1000 مل من الماء المقطر وتم إضافة 0.05 غم من المضاد الحيوي Chloramphenicol بعد التعقيم والتبريد.

استعمل هذا الوسط لاختبار حساسية الفطر تجاه بعض المضادات الفطرية.

3- تحضير المحاليل:

أ- محلول هیدروکسید البوتاسیوم KOH ترکیز (10%)

حضر هذا المحلول بإذابة (10) غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر (McGinnis, 1980).

ب- المحلول الملحي الفسلجي:

حضر المحلول وحسب ما ورد في طريقة McGinnis (1980) وذلك بإذابة (8.5) غم من كلوريد الصوديوم (NaCl) في 100 مل من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 1000 مل.

ج- صبغة اللاكتوفينول:

حضرت هذه الصبغة حسب طريقة Ellis (1994) بإذابة المواد: أزرق القطن (0.05 غم)، الكليسرول (40 مل)، بلورات الفينول (20 غم)، حامض اللاكتيك (20 غم)، ماء مقطر (20 مل).

4- التعقيم:

عقمت جميع المواد بالموحدة (Autoclave) وبدرجة حرارة 120 °م وضغط 12 باوند/ انچ^2 ولمدة 20 دقيقة، بينما عقمت الزجاجيات بالفرن الكهربائي بدرجة 180 °م ولمدة ساعة واحدة أما المضادات الفطرية فقد عقمت باستخدام مرشحات دقيقة وبقطر 0.22 مايكرومتر.

5- عزل وتشخيص الفطر:

بعد أن تم مسح منطقة الأظافر المصابة بالكحول (70%) لغرض إزالة جميع الملوثات من الأظافر المصابة أخذت قطعة صغيرة من الأظفر ووضعت في محلول KOH تركيز (10%) لمدة (2-1) دقيقة وبعد ذلك تم تنميتها في إطباق حاوية على الوسط (SDA) الصلب والحاوي على المضاد الفطري Cychoheximide والمضاد الحيوي Chloramphenicol وحضنت الأطباق في درجة حرارة 25 °م ولمدة (14-7) يوم. وبعد ظهور النمو تم نقل جزء من المستعمرة الفطرية إلى شريحة زجاجية تحتوي على صبغة اللاكتوفينول، تم تشخيص الفطر بالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرة بالإضافة إلى الصفات والخصائص المجهرية والمتضمنة شكل الكونيدات الكبيرة وأبعادها وبمساعدة المصادر (Ellis, 1994; DeHoog and Gurro, 1995) ولغرض حفظ العزلة نقلت أجزاء من المستعمرة إلى أوساط مماثلة (Slant) حاوية مع الوسط (SDA) وحضنت بدرجة 25 °م ثم حفظت في الثلاجة بعد حصول النمو لحين الاستخدام.

6- تأثير بعض العوامل البيئية على نمو الفطر ***Epidermophyton floccosum***

أ- الأوساط الزرعية:

تم تنمية الفطر على وسطين زرعيين هما: وسط سابروید – دكستروز اكار (SDA) ووسط بطاطا دكستروز اكار (PDA) وذلك بأخذ قرص بقطر (10) ملم من حافة المستعمرة بعمر (7-10) يوم ووضعه في مركز الوسط الزرعي وحضنت بدرجة 25 °م ولمدة (14) يوم وبعدها تم قياس قطر النمو، كررت هذه العملية للوسطين (SDA) و (PDA) – (Al Hamadani, 1997).

ب- درجة الحرارة:

تم قياس نمو الفطر بدرجات حرارة مختلفة (25 ,30 , 37) °م وذلك بأخذ قرص بقطر (10) ملم من حافة المستعمرة بعمر (7-10) يوم ووضع في مركز الطبق الحاوي على الوسط (SDA) وحضن لمدة (14) يوم تم حساب قطر النمو ولدرجات الحرارة الثلاث.

ج- الرقم الهيدروجيني:

تم حساب نمو الفطر عند الأرقام الهيدروجينية المختلفة وهي (4 ,6 ,8) من خلال أخذ قرص بقطر (10) ملم من حافة المستعمرة الفطرية وبعمر (7-10) أيام حيث وضع في مركز الطبق الحاوي على الوسط (SDA) وحضنت لمدة 14 يوم وبدرجة حرارة 25 °م، تم حساب قطر المستعمرة الفطرية وللأرقام الهيدروجينية الثلاث.

7- اختبار حساسية الفطر ***E. floccosum*** تجاه بعض المضادات الفطرية:

تم اختبار حساسية الفطر *E. floccosum* تجاه المضادات الفطرية التالية: (TER) Terbinafine، (FLZ) Fluconazole، (ITR) Intraconazole، حيث استخدمت طريقة الانتشار من الأقراص ولأجل ذلك اتبعت الخطوات التالية:

أ- تحضير اللقاح الفطري:

تم تحضير اللقاح الفطري وذلك من خلال أخذ جزء صغير من مستعمرة الفطر *E. floccosum* النامية على الوسط (SDA) باستخدام أبرة معقمة ووضعه في أنبوبة محكمة الغلق تحتوي على 5 مل من المحلول الملحي الفسلجي ورج المحلول بشكل جيد (McGinnis, 1980).

ب- تحضير المضادات الفطرية:

من أجل الحصول على المحلول الأساس للمضادات الفطرية المستخدمة وبتركيز (10000) مايكروغرام/مل فقد اتبعت طريقة McGinnis (1980) وذلك بوضع 5 مل ما مادة Dimethyl Sulfoxide (DMSO) بتركيز 100% في أنبوبة محكمة الغلق ثم أضيف لها 50 غرام من كل مضاد فطري بعدها رج المحلول بشكل جيد حيث يمثل هذا المحلول الأساس بتركيز (10000) مايكروغرام/مل، ولأجل تحضير محلول مخفف بتركيز 1000 مايكروغرام/مل من المحلول الأساس للمضادات الفطرية فقد تم إضافة 10 مل من محلول (DMSO) تركيز 100 % إلى 1 مل من المحلول الأساس تركيز 10000 مايكروغرام/مل، تركت المحاليل بدرجة حرارة المحتبر لحين الاستخدام.

ج- تحضير أقراص المضادات الفطرية:

حضرت الأقراص وفق طريقة McGinnis (1980) من خلال تحضير 100 قرص ورقي من أوراق الترشيح (Whitman No.3) وبقطر 6 ملم حيث عقمت هذه الأقراص بالموصدة وجففت في الفرن بدرجة(50) °م ولمدة ساعة بعد أن ثبت على الأقراص رمز المضاد الفطري المستخدم، حيث وضعت في قناني محكمة الغلق، بعد ذلك أضيف 1 مل من المحلول المخفف للمضاد الفطري تركيز 1000 مايكروغرام/مل إلى كل قنينة تحتوي على 100 قرص ليصبح تركيز كل قرص دائري ما يعادل 10 مايكروغرام/مل من المضاد الفطري.

د- الاختبار:

وفقاً لما جاء في طريقة Casals, (1979) تم أخذ 0.2 مل من اللقاح الفطري ونشره على سطح الوسط الزرعي (ESDA) والمحضر سلفاً في أطياف بتري باستعمال قضيب زجاجي على شكل حرف(L).

تركت الأطباق لمدة نصف ساعة بعد ذلك وبواسطة ملقط معقم وضعت الأقراص على سطح الوسط الزرعي وبواقع قرص واحد لكل مضاد فطري، حضنت الأطباق في درجة حرارة (25) °م ولمدة (4-7) أيام بعدها تم قياس منطقة تثبيط النمو حول كل قرص والتي تمثل المنطقة الخالية من أي نمو للفطر (Prize *etal*., 1990).

النتائج: **Results**

أظهرت الدراسة الحالية أن للعوامل البيئية تأثير في نمو الفطر *E. floccosum* فعند دراسة تأثير الأوساط الزرعية على نمو هذا الفطر، أظهر قدرة كبيرة على النمو في الوسط (SDA) وعند درجة (25) °م حيث بلغ قطر النمو (30.5) ملم بينما بلغ قطر نموه عند الوسط (PDA) (24) ملم (جدول 1). وعند دراسة تأثير درجة الحرارة على نمو الفطر *E. floccosum* من خلال اختبار ثلاث درجات حرارة هي (25 ,30 ,37) °م ولمدة حضانة 14 يوم وعند الوسط (SDA) ان أفضل درجة حرارة لنمو الفطر كانت 25 °م اذ بلغ معدل قطر النمو عند هذه الدرجة (31) ملم بينما بلغ قطر النمو عند درجة الحرارة 30 °م (22) ملم في حين كان النمو بطيئاً جداً عند درجة الحرارة 37 °م حيث لم يتجاوز قطر النمو (4) ملم (جدول 1). وكان للرقم الهيدروجيني (PH) تأثير هو الآخر على نمو هذا الفطر حيث أظهرت الدراسة الحالية ان أفضل رقم هيدروجيني لنمو *E. floccosum* هو 6 عند الوسط (SDA) وبدرجة حرارة (25) °م ولمدة حضانة 14 يوم، حيث بلغ قطر النمو عند هذا الرقم (29) ملم بينما بلغ قطر النمو عند الرقم الهيدروجيني 4 (14) ملم في حين انخفض معدل النمو بدرجة كبيرة جداً عند الرقم الهيدروجيني 8 فلم يتجاوز قطر النمو 3 ملم (جدول 1). أما فيما يخص اختبار الحساسية الدوائية فقد أظهر المضاد الفطري Terbinafine قدرة عالية في تثبيط نمو الفطر حيث بلغ قطر منطقة التثبيط (63) ملم بينما بلغ قطر منطقة التثبيط عند المضاد الفطري Itraconazole (50) ملم أما عند المضاد الفطري Fluconazole فقد أظهر الفطر مقاومة لهذا المضاد حيث لم يحصل هناك أي تثبيط للنمو (جدول 2).

جدول (1): تأثير بعض العوامل البيئية على نمو الفطر ***E. floccosum***

الفطر المعزول	الأوساط الزرعية		درجات الحرارة			الرقم الهيدروجيني		
	الأقطار مقاسة بـ(mm)		الأقطار مقاسة بـ(mm)			الأقطار مقاسة بـ(mm)		
	SDA	PDA	25 °C	30°C	37°C	4	6	8
E. floccosum	30.5mm	24mm	31mm	22mm	4mm	14mm	29mm	3mm

جدول **(2)**: اختبار الحساسية الدوائية للفطر ***E. floccosum*** تجاه بعض المضادات الفطرية

قطر منطقة التثبيط مقاسة بـ**(mm)**			الفطر المعزول
FLZ	**ITR**	**TER**	
—	**50mm**	**63mm**	***E. floccosum***

المناقشة: **Discussion**

بينت الدراسة الحالية قدرة الفطر *E. floccosum* على النمو بشكل واضح وكبير على الوسط (SDA) مقارنة بالوسط (PDA) وهذا يعود إلى أن الوسط (SDA) يحتوي بالإضافة إلى السكر والذي يستطيع الفطر *E. floccosum* من استغلاله كمصدر للكاربون بينما لا يستطيع تحليل السكريات المتعددة كالنشأ والسليلوز ومشتقاته والموجودة في البطاطا (Philpot,1977) فانه يحتوي على الببتون وبنسبة 1 % والذي يخلو منه الوسط (PDA) والمعروف ان الببتون يحتوي على نسبة من النتروجين تصل إلى (Kurbanoglur 13 % and Algur, 2002). وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه (Farnoodian, *etal*., 2009) أما فيما يخص درجة الحرارة فقد كانت درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر هي 25 °م حيث بلغ قطر النمو (31) ملم ان ذلك يتطابق مع ما ذكره Monod *etal*., (2002) من ان درجة الحرارة المثلى لنمو بعض الفطريات الجلدية ومنها الفطر *E. floccosum* هي بين (27 – 25) °م وان بطئ النمو بشكل كبير عند درجة الحرارة (37) °م يعود إلى ان فعالية انزيمات النمو تتأثر بارتفاع درجة الحرارة حيث يؤدي ذلك إلى تلف التركيب البروتيني للانزيم (Weitzman and Summerbell, 1995).

كما أظهرت الدراسة الحالية ان للرقم الهيدروجيني تأثير على نمو الفطر، فقد أظهرت ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لنمو الفطر *E. floccosum* هو (6) حيث بلغ قطر النمو عند هذا الرقم (29) ملم يليه الرقم الهيدروجيني (4) حيث بلغ قطر النمو عنده (14) ملم بينما لم يتجاوز قطر النمو (3) ملم عند الرقم الهيدروجيني (8) وهذا ما يتفق مع ما ذكره Farnoodina *etal*., (2009) من أن أفضل نمو للفطر *E. floccosum* هو عند الرقم الهيدروجيني ما بين (6-7)، بينما يعود انخفاض معدل قطر المستعمرة الفطرية عند الرقم الهيدروجيني (8) إلا ان هذا الرقم غير ملائم لنمو أغلب الفطريات (Tanner, 1997).

بينت نتائج الدراسة الحالية إلى ان الفطر *E. floccosum* كان أكثر تحسساً للمضاد الفطري Terbinafine حيث أظهر هذا المضاد قدرة تثبيطية بلغت (63) ملم يليه المضاد Intraconazole (50) ملم بينما لم يظهر المضاد الفطري Fluconazole أي قدرة تثبيطية حيث ابدى الفطر مقاومة لهذا المضاد، ان ذلك يعود بالأساس إلى أن المضاد الفطري Terbinafine ذو مديات فعالة واسعة في معالجة الإصابات الفطرية وخاصة الجلدية التي تصيب الأظافر والناتجة عن الإصابة بالفطر *E. floccosum* كما انه ذو فعالية عالية وكبيرة في معالجة داء الأظافر الفطري (Onychomycosis) (Gupta and Kohli, 2003).

ان عدم قدرة المضاد الفطري Fluconzacole على تثبيط نمو الفطر *E. floccosum* في هذه الدراسة يعود إلى ان هذا المضاد متخصص في علاج حالات الإصابة بداء المبيضات (Candidiasis) والمتسببة عن الخميرة *Candida* بالإضافة إلى أن الوسط الزرعي الذي أجري فيه الاختبار وهو (SDA) يمتلك مركبات تتداخل أو تتعارض مع هذا الاختبار (Singh *etal*., 2007) وقد كانت هذه النتيجة متوافقة مع ما توصل إليه (Elhan *etal*., 2014).

المصادر : **References**

1- Abarca,L.; Caba, F.J.; Brangulat, R. and Brugera, T. (1990). The growth of *Epidermophton floccosum* and *E. stockdalea* at different temperatures. *Mycopathologia*, **112**(3): 154-163.

2- Al-Hamadani, A.H. (1997). Enzymic activity, purification of keratinase and protinase and their roles in the pathogenecity and immunogenicity of clinical isolates of dermatophytes and yeast. Ph. D. Thesis, College of Education, University of Basrah. Pp. 121.

3- Ameen, M. (2010). Epidemiology of superficial fungal infections, clin. *Dermatol*. **28**(2): 197-201.

4- Amer, S.; Aly, M.M.; and Sabbagh, S. (2006). Bicontrol of dermatophytes using some plant extracts and actinomycetes filtrates. *Egyptin journal of Biotechnology*. 315 – 330.

5- Araj, G.F.; Racoubian, E.S. and Daher, N.K. (2004). Etiological agents of dermatophytes infection in Lebanon. *J. Med. Liban*. **52**(2): 59-63.

6- Araujo, C.R.; Miranda, K.C.; Fernandes, O.F.L.; Soares, A.J.; and Silva, M.R.R. (2009). Invitro susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifugal agents by broth microdilution method. *Revista de instituto de medicina Tropical de Sao Paulo*. **51**: 9 – 12.

7- Ayorind, A.F.; Adesanya, O.O.; and Alaran, O.A. (2013). A microbiological study of dermatophyte infection among primary school children in Mowe, Ogun State, Nigeria; current Research *journal of Biological Sciences*; **5**(5): 205 – 209.

8- Casals, J.B. (1979). Tablet sensitivity testing of pathogenic fungi. *J. clin. Pathol*. 32: 719.

9- De Hoog, G.S. and Guarro, J. (1995). Atlas of clinical fungi centraalbureau voors chimmel cultures. Universitar Rovira in Virgili, Netherlands, Spain. Pp: 720.

10- Elham, A.; Ali, R.; Marale, G.; and Ali, Z. (2014). The susceptibilities patterns of dermatophytes species from Ahvaz to several antifungals. *Internation Journal of Analytical pharmaceutical and Biomedical Sciences*.

11- Ellis, D.H. (1994). Clinical mycology. The human opportunistic mycoses. Gillingham printers pty. Lts. Australia. P: 166.

12- Emmons, C.M.; Binford, C.H. and UTZX, J.P. (1974). Medical mycology. 2nd. Edi. Lea & Febiger. Philadelphia. Pp: 508.

13- Farnoodian, M.; Yazdanparast, S.A., and Sadri, M.F. (2009). Effects of environmental factors and selected antifungal agents on arthroconidia production in common species of *Trichophyton* Genus and *Epidermophyton floccosun*. *Journal of Biological Sciences*. **9**(6): 561 – 566.

14- Forbes, B.A.; Sahm, D.F.; Weissfeld, A. S. and Bailey, W.R. (2007). *Bailey and Scott's Text Book of Diagnostic microbiology*. 12th Edn., Mobsy Elsevier, st. Louis, Mo.

15- Gupta, A. and Kohli, Y.(2003). Invitro Susceptibility testing of ciclopirox, Terbinafine, Ketozole and Itraconazole against dermatophytes and non dermatophytes and invitro evaluation of combination and fungal activity. *British Journal of Dermatol*, **149**(2): 296 – 305.

16- Kurbnoglur, E.B. and Algur, O.F. (2002). Use of Ram Horn Hydrolyste as apepton for bacterial growth. *Turk. J. Biol.*, **25**: 115 – 123.

17- Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.; Vaccari, E. M.H. and Melo, N.T. (2002). *Tratado de Mecologia medical*. Sarvior. Sao Paulo, p:1104.

18- McGinnis, M. R. (1980). Laboratory handbook of medical mycology. Academic press, New York. P: 356.

19- Mondo, M.; Capoccia, S.; Lechenne, B.; Zaugg, C.; Holdom, M. and Jousson, C. (2002). Secreted proteses from pathogenic fungi. *Int. J. Med. Microbial*.

20- Naradzay, J. F.; Rubeiz, N. and Tannous, Z. (2006). Tinea http://www.emedicine.com/emerg/topic592.html.

21- Pakshire, K. and Hashemi, J. (2006). Dermatophytesis in Karaj, Iran. *Indian. J. Dermatol*. **51**: 262 – 264.

22- Philpot, C.M. (1977). The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophytes. Sabouraudia, **15**: 141 – 150.

23- Prize, C.; Paul, M, and Bazerque, P. (1990). An antibiotic assay by the agar well diffusion method. *J. Actobiologiae*. **14**: 113 – 115.

24- Sharma, A.; Chandra, S. and Sharma, M. (2012). Difference in keratinase activity of dermatophtes at different environmental conditions is an attribute of adaptation to parasitism. *Mycoses*. **55**(5): 410 – 415.

25- Singh, J.; Zaman, M and Gupta, A.K. (2007). Evaluation of microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *Med Mycol*. **45**: 595 – 602.

26- Tanner, R. S. (1997). Cultivation of bacteria and fungi in: Manual of environmental microbiology (ed. Hurs, C.J.; Knudsen, G.R.; mclnerney, M.J.; Stetzenbach, L.D. and Walter, M.V.) American society for microbiology, Washington. Pp: 52 – 60.

27- Weitzna, I. and Summerbell, R.C. (1995). The dermatophytes clin. *Microbial. Rev*. **8**(2): 240 – 259.