

دراسة التصالب المناعي بين خميرة *Candida albicans* و فطر *Trichophyton rubrum* في الفئران

محمد جويد علوان وشيماء نبهان¹

الخلاصه

من اجل معرفة العلاقه المناعية بين مستضدات فطر *T.rubrum* و خميرة *C.albicans* في الفئران، استخدم (17) فأراً قسمت بصورة عشوائية الى ثلاثة مجاميع. تضم المجموعه الاولى (7) حيوانات منعت بمستضد *T.rubrum* بجرعه 0.5مل تحت الجلد وبعد مرور اسبوعين اعطيت نفس الجرعه كتنقيه وبعد شهر من التمنيع حقنت 0.5 مل من العالق الخميري لخميرة *C.albican* تحت الجلد. وتضم المجموعه الثانيه (5) حيوانات حقنت بنفس الجرعه والطريقه بخميرة *C.albicans* واعتبرت حيوانات سيطره موجبہ بينما عدت المجموعه الثالثه حيوانات سيطره سالبه وتحتوي على (5) حيوانات حيث حقنت 0.5مل من المحلول الملحي المتعادل المعقم تحت الجلد. تم اجراء فحص الحساسيه المتأخر بعد 27 يوما من تمنيع الحيوانات بواسطة حقن 0.1 مل من مستضد فطر *T.rubrum* في راحة القدم اليمنى لجميع حيوانات التجربه وتم قراءة النتائج بعد 20دقيقه و24 و48 ساعه من اجراء الفحص الجلدي. قتلت جميع الحيوانات بعد 15 يوما من اعطاء جرعة التحدي واخذت نماذج من بعض الاعضاء الداخليه للزرع الفطري والفحص المرضي النسيجي.

بينت نتائج فحص الحساسيه المتأخر بعد 27يوما من التمنيع بان مستضد فطر *T.rubrum* حفز استجابة مناعية خلوية في الفئران الممنعه بهذا المستضد ضد الاصابه بخميرة *C.albicans*. لذا يمكن الاستفادة من هذه النتائج في برامج التلقيح ضد خميرة *C.albicans* بعد اجراء الدراسات المستقبليه حولها في حيوانات التجارب الاخرى والحيوانات الحقلية.

Cross protection between *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans* in mice

Alwan, M.J. and Nabhan, S.^{II}

¹ وحدة الامراض المشتركة /كلية الطب البيطري/جامعة بغداد

^{II} Zoonosis unit, College of Vet .Medicine, University of Baghdad, Iraq.

SUMMARY

In order to know the cross –protection between antigene of *T.rubrum* and *C.albicans*,17 mice were used and they were divided into (3) groups,1st group(7 animals) was immunized with *T.rubrum* antigen,two doses, and injected S/C with virulent *C. albicans*,the 2nd group (5 animals) was infected with *C.albicans* and considered as positive control,3rd group was served as negative group which injected 0.5 ml of sterile normal saline s /c The results showed that the antigen of *T.rubrum* stimulated a good immune response in immunized mice against *C.albicans*.

المقدمه

تعد الفطريات من الاحياء المجهرية ذات الانتشار العالمي الواسع وهناك مايقارب من 150 نوع من الفطريات الممرضة للانسان والحيوانات(1)وتعد خميرة *Candida albicans* من اهم الفطريات الانتهازية الواسعة الانتشار في العالم وتسبب داء candidiasis الذي يصيب الانسان ومدى واسع من الحيوانات الاليفة والبرية(2,3) وعزلت ايضا من الحيوانات الاليفة ومن الطبيعة(4). يعد الجهاز الهضمي للانسان المخزن الطبيعي لهذه الخمائر ومنه تغزو المجرى الدموي بعد تحطيم او اختراق ظهارته وتنتشر الى بقية اعضاء الجسم عندما تتوفر الظروف الملائمة للاصابة(5) حيث تصيب هذه الخمائر معظم الاعضاء الداخليه كالجهاز التنفسي والقلب والسحايا وبطانة الفم والعظام والمفاصل فضلا عن الجلد والاطافر(6,7).

في السنوات الحديثة, ازدادت نسبة الاصابه بالامراض الانتهازية كخمائر *Candidia albicans* مما دفع الباحثين الى ايجاد لقاحات فعالة ضد هذه الخمائر حيث اشار الباحثون (8), Luci et al. الى ان تمنيع الفئران بخميرة *C.albican* المقتولة بالحرارة الممزوجة مع ذيفان *E.coli* ادى الى حماية كلية ضد جرعة التحدي بخميرة *C.albicans*. ان المناعه الخلويه تلعب دورا مهما في مقاومة خميرة *C.albicans* وخاصة الخلايا اللمفيه التائيه CD4+T Lymphocytes والبلاعم الكبيرة فضلا عن السايبتوكاينات مثل انترفيرون كاما(IFN-gama)interferon والعوامل المنشطة لمستعمرات البلاعم Macrophages stimulating factors (9) لذا فان التحفيز الانوعي للبلاعم الكبيرة يمكن ان يحفز الاستجابة المناعية الخلوية حيث لوحظ تمنيع خنازير غينا بلقاح *Br.abortus*-S19 حفز استجابة مناعية ضد جراثيم *Nocardia asteroides* (10). ومن خلال مراجعة المصادر المتوفرة لدينا لم نجد دراسة تشير الى التصالب المناعي بين خميرة *C.albicans* ومستضدات فطر *Trichophyton rubrum* لذا صممت هذه الدراسة لمعرفة هذه العلاقة في الفئران.

المواد وطرائق العمل

العزلات الفطرية

تم الحصول على فطر *Trichophyton rubrum* من مستشفى الكاظمية التعليمي بعد عزله من اشخاص مصابين بالتهابات جلدية بين اصابع القدم اما خميرة *Candidia albicans* فقد تم الحصول عليها من كلية العلوم-جامعة بغداد وقد اجريت الاختبارات التأكيديه الخاصة بتشخيصها. الاوساط الزرعيه :استخدم وسط SDA لتنمية العزلات وادامتها وحسب تعليمات الشركة المنتجه.

المحاليل والصبغات: استخدم المحلول الملحي الفسلجي ومحلل داريء الفوسفات الملحي PBS الحاوي على Tween-0.01% وكذلك استخدمت صبغة اللاكتوفينول الزرقاء وصبغة الكرام.

تحضير مستضد *T.rubrum*

بعد التأكد من صحة العزلات تم زرع الفطر على اطباق زجاجية تحتوي على الوسط الزرعى SDA وحضنت بدرجة حراره 30مئوية لمده 10 ايام بعدها حصد النمو الفطري وذلك باضافة محلول PBS الحاوي على 0.01% من tween 80 لتسهيل عملية الحصاد بواسطة عصا زجاجية وجمع النمو في قناني زجاجيه معقمه ثم قطع الى اجزاء صغيرة بواسطة mortar and bestle المعقم وغسل الحصاد ثلاث مرات بمحلول PBS باستعمال جهاز المنبذ 1500 دوره/دقيقة لمده 10 دقيقه في كل مره باستخدام انابيب زجاجية معقمة وبعد ذلك وضع النموذج في حمام ثلجي بجهاز التكسير بالامواج فوق الصوتيه لمده 45 دقيقه على مدد متقطعة لغرض تكسير الفطر وللتأكد من التكسير الكامل للفطر تم استخدام صبغة اللاكتوفينول الزرقاء لملاحظة الخلايا الفطرية المتكسرة بعد ذلك تم نبذ العينه بجهاز المنبذ المبرد 10000 دوره/دقيقة لمده 30 دقيقه واخذ الطافي واجريت عليه الديلزة لمده ثلاثة ايام ثم وزع في قناني زجاجيه صغيرة وتم قياس كمية البروتين في المحلول بعملية البايوريت وكان تركيز البروتين 32ملغم/مل وحفظ النموذج في المجمدة لحين الاستخدام.

تحضير خميرة *C.albicans*: تم زرع الخميرة على الوسط الزرعى SDA لمده 72ساعة وبدرجة حراره 30 مئوية بعد ذلك تم حصاد الخميرة باستخدام PBS المعقم وتم عد خلايا الخميرة بواسطة شريحة عد خلايا الدم البيضاء وكان عدد الخلايا 10⁸ خليه لكل مل.

تصميم التجربة

استخدم في هذه الدراسة 17 من الفئران البيضاء السويسرية من كلا الجنسين بعمر 6-8 اسبوع تم الحصول عليها من معهد المصول واللقاحات وقسمت الحيوانات بصورة عشوائيه الى 3 مجاميع وكما يلي:

1-المجموعة الاولى وتضم 7 فئران منعت بمستضد الفطر *T.rubrum* وبجرعة 0.5مل تحت الجلد وبعد مرور اسبوعين اعطيت نفس الجرعة كتقوية وبعد شهر من التمنيع حقنت بالعالق الخميري لخميرة *C.albicans* وبجرعة 0.5مل تحت الجلد.

2-المجموعة الثانية وتضم 5 حيوان حقنت بنفس الجرعه والطريقه من خميرة *C.albicans* واعتبرت حيوانات سيطرة موجبة.

3-المجموعة الثالثة وتضم 5 حيوانات حقنت 0.5 مل من المحلول الملحي الفسلجي المعقم تحت الجلد واعتبرت حيوانات سيطره سالبه.

اجراء فحص فرط الحساسية المتأخر

تم اجراء فحص الحساسية المتأخر بعد 27يوما من تمنيع الحيوانات بواسطة حقن 0.1مل من مستضد *T.rubrum* في راحة القدم اليمنى للحيوانات الممنعه وغير الممنعه وتم قراءة النتائج بعد 20دقيقه و24و48 ساعة من اجراء الفحص.

روقت الحيوانات بعد جرعة التحدي وسجلت الأعراض السريرية التي ظهرت عليها وتم قتل جميع حيوانات التجربة بعد 15يوما من اعطاء جرعة التحدي واخذت نماذج من بعض الاعضاء الداخلية للزرع الفطري ودراسة التغيرات المرضية المجهرية حيث ثبتت عينة بحجم 1X1سم في 10% من محلول الفورمالين الداريء المتعادل لمدته 4 يوم بعد ذلك اجريت عمليات تحضير الشرائح الزجاجيه الروتينية وحسب طريقة Luna⁽¹⁰⁾.

النتائج

نتائج فرط الحساسية المتأخر.

يبين جدول(1) نتائج فحص الحساسية المتأخر بعد 27 يوما من التمنيع حيث كان المعدل الحسابي لفرق التشنج في راحة القدم. 1.7 و 1.04 و 0ملم بعد 20 دقيقة و 24 و 48 ساعة من اجراء الفحص على التوالي وكذلك لوحظ احمرار في مكان الحقن في جميع الحيوانات بعد 20 دقيقة الا انه قل في 24 ساعة واختفى في 48 ساعة من الفحص الجلدي اما حيوانات السيطرة السالبة فلم تظهر أي تغير في سمك راحة القدم قبل وبعد الحقن بمستضد التريكوفاييتين .

الاعراض السريرية

لم تلاحظ أية اعراض مرضية على الحيوانات الممنعة بعد جرعة التحدي طيلة فترة التجربة بينما لوحظ اعراض الضعف والخمول على حيوانات السيطرة الموجبة بعد جرعة التحدي وخاصة في اليوم الثامن بعد الحقن حيث فقدت ثلاثة حيوانات منها بصرها وهلكت في اليوم التاسع بعد الحقن.

العزل الفطري

بينت نتائج العزل الفطري عدم عزل خميرة *C.albicans* من الاعضاء الداخلية للحيوانات الممنعة بعد اسبوعين من تعرضها لجرعة التحدي الا ان خميرة *C.albicans* عزلت من الاعضاء الداخلية لحيوانات السيطرة الموجبة (جدول:2) وكانت كثافة العزل الخميري من الطحال والكلى اكثر من بقية الاعضاء.

التغيرات المرضية

لم تسجل تغيرات مرضية عيانية واضحة في الاعضاء الداخليه التي فحصت للحيوانات الممنعة سوى تضخم الطحال بينما لوحظت بقع نزفية على سطح الكبد واحتقان الرئة والكليتين والطحال والدماغ في حيوانات السيطرة الموجبة واما مجهريا لوحظ تكثيف خلوي لمفي حول الاوعية الدموية في الكبد والكلية وبين الالياف العضلية للقلب في الحيوانات الممنعة فضلا عن فرط تنسج اللب الابيض للطحال. كذلك لوحظ ارتشاح شديد للخلايا اللمفية في النسيج الخلالي للرئة (شكل:1). اما في حيوانات السيطرة الموجبة فقد تميزت التغيرات المرضية المجهرية بتشتت اللب الابيض للطحال وتخر الخلايا اللمفية (شكل:2) وارتشاح شديد للبلاعم الكبيره في اللب الاحمر مع وجود الخميرة محاطة بالخلايا البلعمية وملتصقة بها (شكل 3).

ولوحظ ايضا بؤر متعددة من الاورام الحبيبه في النسيج الخلالي للرئة مع وجود البلاعم الكبيرة والعدلات داخل تجاويف الاسناخ الرئويه (شكل:4)

جدول(1): يوضح فرق التثخن في راحة القدم وقطر الاحمرار (ملم) بعد 27 يوما من تمنيع الفئران

بمستضد *T. rubrum*

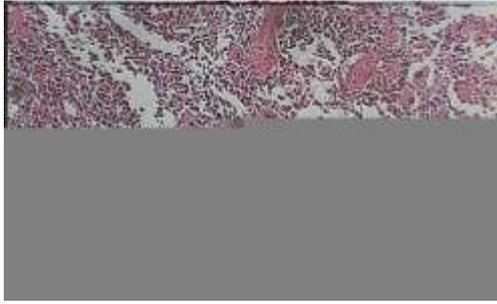
قراءة الفحص بعد			رقم الحيوان
48 ساعة	24 ساعة	20 دقيقة	

درجة الاحمرار	فرق التثخن	درجة الاحمرار	فرق التثخن	درجة الاحمرار	فرق التثخن	
-	0.4	-	0.6	++	1.5	1
-	0.4	-	0.5	++	1.5	2
-	0.4	+	1.8	+++	2	3
-	0.55	-	0.75	++	2	4
-	0.7	++	1.4	+++	1.9	5
-	0.3	-	1.2	++	1.7	6
-	0.3	-	1.2	+++	1.8	7
-	0.	-	0.2	++	0.3	8
-	0	-	0.2.	+	0.2	9
-	0.	-	0.1	+	0.2	10
-	0	-	0.1	++	0.2	11
-	0	-	0.1	+	0.1	12
	0.38		1.04		1.7	المعدل

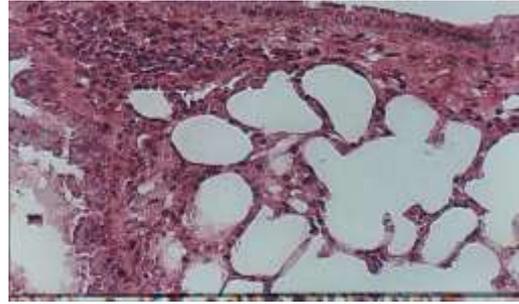
جدول (2): يوضح عزل خميرة *Candida albicans* من الاعضاء الداخليه لحيوانات السيطره الموجبه

رقم الحيوان	الكبد	الطحال	الكليه	الرئنه	الدماغ	القلب	الامعاء
-------------	-------	--------	--------	--------	--------	-------	---------

+	-	+	+	++	+++	+	1
+	-	+	+	+	+++	++	2 *
+	+	-	+	++	++	+	3*
-	-	+	++	++	+++	++	4*
+	-	+	+	+	++	+	5



شكل (2) مقطع نسجي في طحال احدى
حيوانات السيطرة الموجبة يوضح تشتت
اللب الابيض وتخر الخلايا اللمفية
(H&E X100)



شكل (1) مقطع نسجي في رئة احدى
الحيوانات الممنعة يوضح الارتشاح
الخواوي الشديد في متن الرئة
(H&E X400)



شكل (4) مقطع نسجي في رئة احدى حيوانات
السيطرة الموجبة يبين ارتشاح العدلات والخلايا
وحيدة النواة في الاسناخ الرئوية مع وجود الاورام
الحبيبية في متن الرئة (H&E X400)



شكل (3) مقطع نسجي في طحال احدى
حيوانات السيطرة الموجبة يبين الارتشاح
الشديد للعدلات والبلاعم الكبيرة في اللب
الاحمر مع وجود الفطر تحيطه الخلايا
الالتهابية (H&E X400)

المناقشة

ان ظهور الاعراض السريرية على حيوانات السيطرة الموجبة بعد اصابتها بخميرة *C.albicans* كفقدان البصر وهلاك ثلاثة حيوانات منها في اليوم التاسع بعد الاصابة يشير الى ضراوة الخميرة وانتشارها في الجسم عبر الدم واحداث تغيرات مرضية شديدة في الاعضاء الداخلية وكذلك اصابة العين. علما ان هذه الحيوانات لم تثبط مناعيا.

ان خميرة *C.albicans* تمتلك العديد من عوامل الضراوة ومنها انزيم aspartyle protease و phospholipase وهذه العوامل تعمل على تحطيم انسجة المضيف وجزيئات الاضداد وتزيد مقاومة الخميرة لعملية البلعوم وتساعد الخميرة على الارتباط بنسيج المضيف والتكاثر ومن ثم دخولها الدورة الدموية والانتشار الى كل الاعضاء الداخلية للجسم محدثة تغيرات مرضية تنخرية قيحية ولاسيما في الكبد والطحال (13,12) وكذلك فان خميرة *C.albicans* تصل الى العين عن طريق الدم fungal haematogenous spread مسببه التهاب العين Endophthalmitis وفقدان البصر (14).

اوضحت نتائج فرط الحساسية المتأخر بان مستضد فطر *T.rubrum* حفز استجابة مناعية خلوية اظهرت كفاءة جيدة ضد الاصابه بخميرة *C.albicans* حيث وفرت حماية بنسبة 100% ضد جرعة التحدي بهذه الخميرة الضارية (حيث انه على الرغم من كون هذه الخميرة تعد من الفلورا الطبيعية في الجسم لكن هناك عوامل تساعد على احداث الاصابة بها مثل انخفاض مناعة الجسم) فضلا عن عدم وجود عزل خميري من الاعضاء الداخلية للحيوانات الممنعه مقارنة بحيوانات السيطرة الموجبة حيث عزلت الخميرة من الاعضاء الداخلية التي فحصت. تلعب الاستجابة المناعية الخلوية دورا مهما

ضد الاصابة بخميرة *C.albicans* من خلال الخلايا اللمفية التائية CD4+ T cells ومختلف السايبتوكينات مثل-interferon gama,interleukins,granulocyte macrophage colony stimulating factor and the macrophage effector cells (17,16,15) لذا نعتقد بان مستضد فطر *T.rubrum* حفز استجابة مناعية حطمت خميرة *C.albicans* في الحيوانات الممنعة ويتضح ذلك من عدم وجود تغيرات مرضيه مهمه عيانيا او مجهريا في الاعضاء الداخلية للحيوانات الممنعة مقارنة بالتغيرات الشديدة التي سجلت في حيوانات السيطرة الموجبة

تمتلك فطريات *Trichophyton spp* عدة انواع من المستضدات مثل: Glycopeptide وتشمل D.galactose وD-mannose والبروتينين (18) وكذلك متعدد السكريد polysacchride والذي يتالف من galactomannans و I,II glucan اضافة الى الانزيمات الحالة I,II,III keratinase ويوجد تصالب مناعي بين مستضدات المجموعة الواحدة من الفطراو الفطريات الاخرى (19) وتحفز هذه المستضدات استجابة مناعيه متمثلة بفطر الحساسية او مايسمى Trichophytin reaction حيث ان فطر الحساسية اما ان يكون اني (immediate) نتيجة لوجود الضد في المجرى الدموي او متاخر delayed نتيجة للاستجابة المناعية الخلوية (20,21) لذا فان ظهور تفاعل جلدي بعد 20 دقيقة من اجراء الفحص الجلدي في الدراسة الحالية يشير الى ان مستضد فطر *T.rubrum* حفز استجابة مناعية خلوية وخطية وتوافقت هذه النتيجة مع ماذكر من قبل Basarab et al., (22). وقد بين Grappel et al., (23) بان هنالك تصالب مناعي بين مستضد mannann الخميرة *Candida spp* و *Microsporium quinckeanum* ولذلك نعتقد بان مستضدات الفطر *T.rubrum* لربما حفزت الاستجابة المناعيه في الحيوانات الممنعة ضد جرعة التحدي بخميرة *C.albicans* اما عن طريق التحفيز غير المتخصص للبلاعم الكبيرة والخلايا اللمفية التائية CD4+ Tcells و CD8+ Tcells او ان مستضدات *T.rubrum* تشابه مكونات خميرة *C.albicans* وحفزت استجابة مناعية متخصصة ضد هذه الخميرة. وهذا يفسر فطر التنسج اللمفي في الطحال والتكثيف الخلوي اللمفي في بعض الاعضاء الداخلية حيث ان فطر تنسج الانسجة اللمفية يدل على تحفيز الاستجابة المناعية (10).

هناك دراسات سابقة اشارت الى ان التمنيع بخميرة *C.albicans* الميته لا يحفز استجابة مناعية ضد جرعة التحدي (24) وان تمنيع الحيوانات بالخميرة الحية توفر استجابة مناعية جيدة ضد الاصابة بخميرة *C.albicans* (25) الا ان التمنيع بالخميرة الحية ربما يؤدي الى الاصابه بهذه الخميرة. لذلك اتجهت بعض الدراسات الى التمنيع بمكونات خميرة *C.albicans* واعطت استجابة مناعية واضحة مثل mannoprotein (26) لحد الان لم يسجل وجود لقاح فعال وامين ضد الاصابة بخميرة *C.albicans*

في الانسان والحيوانات والدراسة الحالية بينت بان مستضد فطر *T.rubrum* وفر حماية كاملة ضد الاصابة بخميرة *C.albicans* الضارية ولذلك يمكن استخدام هذا المستضد مع مستضدات اخرى لتقوية الاستجابة المناعية ضد هذه الخميرة

REFERENCES.

- 1-Kendrick B, The fifth kingdom Ontario, Canada, Mycological Publications 1985; P.363.
- 2-Odds FC, *Candida* and Candidosis. 2nd ed, London, Baillier Tindall 1988.
- 3-Mok WY, Luizao RC, Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. Appl. Environ Microbiol, 1984; 47:390-394.
- 4-Mok WY, deCarvalho J, Association of anurans with pathogenic fungi. Mycopathologia. 1985; 92:37-43.
- 5-Eras P, Goldstein MJ, Sherlock P, *Candida* infection of the gastrointestinal tract. Med. 1972; 51:367-379.
- 6-Nakamura Y, Masuhara T, Ito-Kuwa S, Induction of experimental *candida* arthritis in rats. J. Med. Vet Mycol. 1991; 29:179-192.
- 7-Soll DR, Multiple *candida* strains in the course of single systemic infection. J. Clin. Microbiol. 1988; 26:1448-1459.
- 8-Lucia CF, Elly C, Patricia M, Judith ED, John DC, Effectiveness of a vaccine composed of heat-killed *Candida albicans* and a novel mucosal adjuvant, LT(R192G) against systemic Candidiasis. Microbiol. Immun. 1998; 70:13-27.
- 9-Romani L, Mencacci A, Interleukin-12 but not interferon gamma production correlates with induction of T helper type-1 phenotype in murine candidiasis. Eur. Immunol. 1994; 24:909-915
- 10-Alwan MJ, The influence of *Brucella abortus* strain -19 vaccine on pathogenesis of *Nocardia asteroides*. The Veterinarian. 1999; 9:80-85.
- 11.-Luna LGC, Manual of histologic staining, methods of the armed forces institute of pathology. 3rd ed McGraw-Hill. New York. 1967.
- 12-Segal F, Sandovsky-Losica H, Basis for *C.albicans* adhesion and penetration, Biomedical Mycology, eds Jacobs PH. Nall L, Marcel, New York. 1996.
- 13-Edwards JE, *Candida* species, principles and Practice of infectious diseases, 4th ed, Mandell GL. Bennert, JE. Dolin, R. Churchill Livingstone, New York, 1995; 2289-22305.
- 14-Cohen M, Montgomerie JZ, Hematogenous endophthalmitis due *C.albicans*: Report of two cases and review, Clin. Infect. Dis. 1993; 17:270-272
- 15-Fukazawa Y, Cassone A, Mechanism of cell mediated immunity in fungal infection. J. Med. Vet. Mycol. 1994; 32:123-131..

- 16-Romani L, Mencacci A, Nneutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated imunity in murine candidiasis.J.Exp.Med.1992;176:19-25.
- 17-Smith PD, Lamerson CL, Granulocyte-macrophage colony-stimulatingfactor augments human monocyte fungicidal activity*C.albicans*.J.Infect.Dis. 1990; 161:999-1005.
- 18-Barker SAO, Basarab O, Cruick-shank CND, Galactomannan peptides of *Trichophyton mentagrophytes*.Carbohyd.Res. 1967;3:325-332.
- 19-Grappel SF, Blank F, Bishop CT, Immunological studies on dermatophytes.IV.Chemical structures and serological reactivities of polysaccharides from *Microsporum praecox*,*Trichophyton ferrugineum*,*Trichophyton sabouraudii* and *Trichophyton tonnsurans*.J.Bacteriol. 1969;97:23-26.
- 20-Blank F, The chemical composition of the cell walls of dermatophytes.Biochim.Biophys.Acta. 1953;10:110-113.
- 21-Gell PGH, Coombs RRA, Clinical aspects of immunology.P.317.Black well .Oxfprd.1962.
- 22-Basarab OM, How J, Cruick-shank CND.Immunological relationships between glycoprotein of *Microsporum canis*,*Trichophyton rubrum*,*T.mentagrophytes* and other fungi.Sabouraudia. 1968;6:119-126.
- 23-Grappel SF, Blank F, Bishop CT, Immunological studies on dermatophytes.I.Serological reactivities of neutral polysaccharides with rabbit antiserum to *M.quinckeanum*.J.Bacteriol.1967;93:1001-1008.
- 24-Giger DK, Domer JE, McQuitty JT, .Experimental murine candidiasis;Pathological and immune responses to cutaneous inoculation with *C.albicans*.Infect. Immun. 1978; 19:496-509.
- 25-Giger DK, Domer JE, Moser SA, McQuitty JT, Experimental murine candidiasis:Pathological and immune responses in T-lymphocyte-depleted mice.Infect.Immun. 1987; 21:729-737.
- 26-Mencacci A, Torosantucci A, Spaccapelo R, C Cassone A, A mannoprotein constituent of *albicans* that elicits different levels of delayed type hypersensitivity,cytokine production and anticandidal protection in mice.Infect.Immun. 1994; 62:5353-5360.