جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شناسایی و رده‌بندی آسپرژیلوس‌های هوای شمال ایران، بررسی الگوی پروتئینی سلول‌ها در جنس‌ها وگونه‌ها

آرش چایچی نصرتی*[۱]، علیرضا خسروی[۲]، رسول زارع[۳]

۱*- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۴۹۳۳-۱۴۱۵۵

۲- دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، دپارتمان پاتوبیولوژی، گروه قارچ شناسی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۴۳۱۴-۳۱۵۸۵

۳- موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی ایران، دپارتمان رستنی‌ها، گروه قارچ شناسی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۱۴۵۴

achn_mycomune@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۳

چکیده

اکوبیولوژی مولکولی قارچ‌ها ارزشمند بوده و در ساماندهی رده‌بندی- تشخیص آزمایشگاهی آن‌ها سودمند است. با نگرش به ساماندهی تندرستی همگانی و نیز سنجش آلودگی‌های قارچ‌های هوای شمال ایران و برای پیشنهاد رده‌بندی درست آن‌ها بر پایه آشکارسازی الگوی پروتئینی جدایه‌های آسپرژیلوسی پهنه یادشده با شگرد بنگاه‌های ICPA و CBS نمونه‌برداری و جدایه‌ها شناسایی شدند. عصاره یاخته‌ای گونه‌های جدا شده با روش الکتروفورزی SDS – PAGE پروتئین‌ها بررسی شدند. سرانجام الگوی پروتئینی ویژه هرگونه در یک جدول همسنجی فراهم آمده است که یافته‌های ریختی را باورپذیرتر می‌سازد. ۲۴ جنس و گونه بدرستی شناخته شده با الگوی آنتی‌ژن‌های ویژه هریک؛ آسپرژیلوس فومیگاتوس (*33-35 and 43-44KD,:60KD*)، اسکلروکلیستا اورناتا (*66.2-68 and 116-120KD,:18 and 70KD*)، آسپرژیلوس اونگوئیس (*35 ,43-45 and 66.2KD,:37 and 150-200KD*)، آسپرژیلوس ترئوس (*,:35,70 and 150-200KD*)، آسپرژیلوس نیوئوس (*,:37 and 60KD*)، آسپرژیلوس ونتی‌ای (*,:40,37 and 60KD*)، آسپرژیلوس فلاووس (*116-120KD,:35 and 70KD*)، آسپرژیلوس سوژه(*60-66KD,:60 and 70KD*)، آسپرژیلوس پارازیتیکوس (*43-45KD,:33 and 70KD*)، آسپرژیلوس آلیاسئوس (*,:40,58 and 90KD*)، آسپرژیلوس نایجر (*,:37 and 40KD*)، آسپرژیلوس آواموری (*,:24 and 90KD*)، آسپرژیلوس کربوناریوس (*37,45 and 116KD,:37 and 70KD*)، آسپرژیلوس فتیدوس (*40-42KD,:33,35,70 and 150-200KD*)، آسپرژیلوس اوکراسئوس (*5-10KD,:33 and 70KD*)، آسپرژیلوس اوستیانوس (*27,34 and 50-55KD,:24,50 and 60KD*)، آسپرژیلوس ملئوس (*38KD,:24,33,35,50,60 and 90KD*)، آسپرژیلوس کاندیدوس (*90KD,:90KD*)، آسپرژیلوس پنیسیلیوئیدس، آسپرژیلوس اوستوس، آسپرژیلوس ورسیکالر، آسپرژیلوس اورایزه، آسپرژیلوس نیدولانس، آسپرژیلوس ژاپونیکوس (*,:24,33,37,40 and 50KD*) فراهم شده از پهنه در دست بررسی، به دست آمد که دوازده گونه از آن‌ها برای نخستین بار از گستره بوم شناختی شمالی ایران گزارش می‌شوند. سرانجام، دانش الگوی فراهم آمده از پروتئین‌ها نخستین و بزرگ‌ترین دستمایه آسان و کاربردی مولکولی در فرآیند بازشناسی و رده‌بندی الگوی بسیاری از گونه‌های آسپرژیلوس‌ها را بر پایه یافته‌های گستره "وب"پیش رو می‌گذارد. جدول‌های ویژه و همسنجه‌های پیش رو را می‌توان درست‌ترین و همه جانبه‌ترین شناسایی الگوی پروتئینی آنتی ژنی شناخته شده در جهان دانست.

کلمات کلیدی: ایران، شمال، آسپرژیلوس‌ها، اکوتاکسونومی، آنتی ژن‌ها.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

انگیزه میکروب‌شناسان در نگرش به آلودگی‌های قارچی در زیستگاه آدمی، در دهه‌های نزدیک افزایش بسیار یافته است و در ایران نیز همگام با دیگر پژوهندگان بدان بسیار پرداخته شده است (۱، ۱۸، ۲۵، ۳۴، ۴۲، ۴۳، ۴۷، ۵۹، ۶۰ و ۶۹). با افزایش روزافزون شناخت چگونگی آسیب پذیری آدمی و در پاسخ به نیازمندی‌های بهداشتی توده انسانی، شناخت هرچه بیشتر از میکروب‌ها فزونی گرفته و هر چه بیشتر بدان پرداخته می‌گردد (۶، ۷،۱۰، ۱۳، ۲۰، ۲۱، ۲۴، ۴۴، ۴۵، ۵۸، ۶۴ و ۷۵). آسپرژیلوس‌ها از پرشمارترین و جهانگسترترین میکروب‌های شناخته شده به شمار می‌روند و ارزش میکروب‌شناسی ماندگاری در بیماری‌ها و آلودگی خوراکی‌ها به دست آورده‌اند (۱۲، ۲۶، ۲۷، ۳۰، ۳۵، ۶۶). جای ناخشنودی دارد که توان و ارزش‌های آسپرژیلوس‌ها و فرآورده‌های آن‌ها در برابر توان آسیب رسانی و زیان آن‌ها کمتر است (۴، ۶، ۱۱، ۱۷، ۳۰، ۳۹ و ۵۲). بیماری‌ها و آزردگی‌های آسپرژیلوسی در جایگاه‌های بسته یا باز روز به روز افزایش یافته است و فهرستی از گروه‌ها و گونه‌های آسپرژیلوسی از این دیدگاه را Samson و همکاران (۶۶)گرد آورده اند. بیشتر قارچ‌های این فهرست همان‌هایی بوده‌اند که در پیرامون هر جایگاه یافت گشته‌اند (۱۴، ۲۶، ۳۰، ۳۶، ۵۴، ۶۶، ۶۷ و ۷۴).

آنتی‌ژن‌های آسپرژیلوسی پیکری یا تراوشی و رها شونده‌اند (۳، ۱۵، ۱۹، ۴۱ و ۴۶). سازماندهی توان، انگیزش، ساخت و رهاسازی آنتی ژن‌های آسپرژیلوسی بستگی زیادی به گروه، گونه، سویه یا انگیزش هر قارچ از سوی ویژگی‌های دمایی، رطوبت، نور، pH، یون‌های آلی و معدنی، هورمون‌ها و فرمون‌ها و نیز جوانی - پیری پرگنه کپکی و بسترها داشته‌اند و آنتی‌ژن‌های آسپرژیلوسی از پپتید و پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها و مولکول‌های گوناگون دیگر بوده‌اند (۴۱ و ۴۸). آنتی‌ژن‌ها می‌توانند پیکری (سوماتیک) و از ریسه یا کونیدی به دست آمده و یا فرآورده‌ای (متابولیک) بوده و از بستر رشد قارچ یا هوای پیرامون پرگنه‌ها فراهم شده که شاید بتوانند آلرژن (آزرنده) نیز باشند (۹، ۴۸، ۵۶ و ۵۷). پس از آنتی‌ژن‌های باز ترکیب یا نوترکیب کاربرد آنتی ژن‌های فراهم آمده از توده قارچی در بستر مایع که با همزدن همراه شده است ارزش کاربردی بیشتری دارد (۲۲ و ۳۲). گرمخانه گذاری قارچ در دماهای گوناگون برای فرآوری آنتی‌ژن‌ها نیز آزموده شده است و باور آنست که گذر از گستره دمایی ویژه هر جنس یا گونه به هنگام رشد آزمایشگاهی تا اندازه بیش از ۱۰-۵ درجهٔ سانتی‌گراد (۲۷ °c -۳۷°c) چندان ویژگی آنتی ژن‌هایی که به دست خواهند آمد را دگرگون نخواهد نمود (۵، ۴۰ و ۴۹). شاید بتوان این ویژگی را درباره گذشت زمان از هنگام کشت تا برداشت توده قارچی نیز به شمار آورد چرا که ویژگی آنتی‌ژن‌های توده‌های گوناگون از یک جدایه از هفته یکم تا سوم چندان دگرگون نشده و گوناگونی ناخواسته‌ای نداشته است (۵، ۳۲، ۴۰ و ۴۹). چنین پنداشته می‌شود که بهنگام ارزیابی آنتی‌ژن‌های به دست آمده از یک بستر رشد آنتی‌ژن‌ها بسیار زودتر (دو هفته در برابر سه هفته) در بستر آبی هویدا می‌شوند (۹، ۲۲ و ۷۲). آنتی‌ژن‌های پیکری را می‌توان دیواره‌ای، غشایی یا سیتوپلاسمی و آنتی‌ژن‌های عصاره کشت را می‌توان پیوسته به توده قارچی یا محلول در بستر دانست (۵۷). در آنتی‌ژن آسپرژیلوسی ۵۰-۱۰ درصد پروتئین که ۷۵- ۱۳ درصد توده گلیکوزیدی در پیکره خود

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دارند یافت می‌شود. مولکول‌های فسفاتی تنها و تنها در کمتر از ۱ درصد آنتی‌ژن‌های فراهم آمده از ریسه‌ها دیده می‌شوند. همواره اندازه پلی پپتیدهای آنتی ژن از بسترهای ساختگی که پیچیدگی بیشتری داشته‌اند فراوان تر به دست آمده‌اند (۵). از قندها (به ویژه N گلیکوزیله) گلوکز بیش از گالاکتوز و سپس مانوز در ساختار آنتی ژن دیده می‌شوند و اندازه قند آنتی‌ژن‌های پیکری و بستر رشد نزدیک به یکدیگر بوده‌اند (۳۱، ۳۸ و ۷۳). ریخت‌شناسی پرگنه‌ها در هر بستری در چهار دوره رشد پرگنه آسپرژیلوسی یکسانی بسیاری نشان می‌دهند اگرچه باور برآنست که دوره اکسپوتانشیال برای بررسی‌های آنتی ژنی بهتر است. ارزشمندتر آنکه آنتی‌ژن‌های همه آسپرژیلوس‌ها که از دوره اکسپوتانشیال به دست آمده‌اند در الگوی فراهم شده با شگرد SDS – PAGE همانندی داشته و شاید تنها در اندازه و شناسه برخی نوارها (هتروژن) یگانگی نخواهند داشت که نشانگر کمی از ناهمانندی در اندازه و هموژنیسیتی پروتئین‌های آنتی ژنی است (۵ و ۹).

شمار بسیاری از آنتی‌ژن‌های آسپرژیلوسی شناخته و با نام گونه و شماره‌گذاری نامیده‌اند ($ASP\ f_{1...n}$). شاید بتوان آنتی‌ژن‌های شناخته شده را در چهار گروه بزرگ دسته‌بندی نمود؛ از بستر رشد آگاردار جامد گروه G_1: گلوکوآمیلاز β، آنالیل دی پپتیدیل پپتیداز، G_3: اورایزین زایلاناز F_3، کاتالاز β، زایلاناز G_1، G_4: α آمیلاز، گلوکوزیداز به دست آمده‌اند و در برابر از بستر رشد مایع گروه G_2: گلوکوآمیلاز A، زایلاناز G_2، آلفا گلوکوزیداز A، سلولاز، G_4: همانند آنچه پیشتر یاد شد ولی در پیوند با دیواره یاخته‌های شناور در مایع، G_3: همانند آنچه پیشتر یاد شد، جدا شده‌اند. روشن شده است که ژن‌های گلوکوآمیلاز A و زایلاناز G_2 در بستر جامد تنها انگیخته شده و هرگز تراوش نخواهند شد و تنها در بستر مایع تراوش خواهند گردید وآنتی ژن‌های cdA، cdB و cdC ایمنی‌زا بوده و از کونیدی و ریسه آسپرژیلوس‌ها فراهم می‌آیند و تنها cdE در فیکومایست‌های دیگر هم شناسایی شده‌اند (۴۸ و ۵۶). آرایه‌های الگوی پروتئین‌های جدا شده از آسپرژیلوس‌ها از ۱۳ کیلودالتون (KD) تا بیش از ۲۰۰ کیلودالتون می‌توانند باشند. در آسپرژیلوس فلاووس پروتئین‌های سیتوسولیک ۳۷، ۴۰، ۶۰ و ۹۰ کیلودالتون با بیش از ۹۰ درصد سرم بیماران دچار آلرژی قارچی آسپرژیلوما واکنش خواهند نمود و از این رو «تودهٔ جدایه‌های سیتوسولیک» خوانده می‌شوند (۳۸ و ۵۷). از ۳۳ نوار آنتی‌ژنی قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس، شماری با نوارهای دیگر گونه‌های آسپرژیلوسی همگون بوده و همخوانی داشته‌اند. از ۹ آنتی ژن آلرژن این گونه ۵ نوار (از ۹ نوار) با گونه فلاووس، ۴ نوار (از ۱۶ نوار) با گونه نیدولانس، ۴ نوار (از ۹ نوار) با گونه نایجر، ۴ نوار (از ۸ نوار) با گونه ترئوس یگانگی داشته‌اند (۹). می‌توان ۹ نوار آنتی‌ژنی آسپرژیلوس فلاووس را به چهار گروه بزرگ دسته‌بندی نمود. آنتی‌ژن سیتوسولیک/سیتوپلاسمیک Ag7 (۲۰۰-۵۰ کیلودالتون)، Ag13 (۷۱ کیلودالتون) و Ag5 (۳۵ کیلودالتون) که ایمنوژن هستند نیز Ag3 (۲۴ و ۱۸ کیلودالتون) که در برابر گرما پایدار و آلرژنیک بوده‌اند و سرانجام آنتی‌ژن ۱۸ کیلودالتونی ایمیونودومیننت نیست (۳۷). واکنشگری آنتی‌ژن‌های فومیگاتوسی گوناگون از ۴۸٪ تا ۸۷٪ گزارش شده است که نشانگر دشواری در انجام فرآوری آنتی‌ژن با یک روش یگانه و از یک جدایه یگانه در استانداردسازی آنتی‌ژن‌ها می‌باشد (۳۲). در بررسی آنتی‌ژن‌های آسپرژیلوس

نیدولانس برای بهره‌گیری در آزمون‌های شناسایی ایمنی شناختی بیماری‌ها (با روش SDS - Page) شماری از پلی پپتیدها یافت شده‌اند. پلی‌پپتیدهای فراهم آمده از اسپورها، ریسه‌ها و کونیدیو فورها همانندی بسیاری داشته و همچنین در بسیاری دیگر گونه‌های آزرنده و یا بیماری‌زای آسپرژیلوسی نیز یافت شده‌اند. چهارپپتید cdA، cdB، cdC و cdE در دیگر آسپرژیلوس‌های همگانی بوده و تنها cdE در دیگر جنس‌های قارچی نیز یافت شدند همگی این آنتی‌ژن‌ها هم از بستر جامد و هم از بستر مایع فراهم آمده‌اند (۵۶). باور بر آنست که پژوهش‌ها در شناسایی فرآورده‌های ساختاری و سوخت و سازی بسیاری از قارچ‌ها و کپک‌ها بویژه آسپرژیلوس‌ها همچنان نیازمند بهبود بخشی شگردها و نوین سازی شیوه‌ها می‌باشد (۴۶، ۶۵ و ۷۱).

مواد و روش‌ها

از نخستین روزهای اردیبهشت ماه تا روزهای پایانی مهر ماه در پهنه شمال ایران با پیروی از دستور کار نمونه‌برداری از جایگاه‌های بسته و باز (بنگاه CBS) (۲۶، ۳۰، ۵۲ و ۶۶) و از هر پنجاه هکتار مربع، شش پلیت دارای مالت اکستراکت گار، یست اکستراکت آگار، چاپک یست اکستراکت آگار، چاپک آگار، سابورودکستروز آگار و پوتیتودکستروز آگار همگی آمیخته با ۱۰۰ ppm کلرامفنیکل و ۵۰ppm تتراسایکلین، برای برداشت «یک گروه نمونه» به کار برده شدند (۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۵۲، ۶۱، ۶۲ و ۶۶). همه پلیت ها در دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و هوازی گرمخانه گذاری شدند آنگونه که یک پلیت از هر بستر کشت در تاریکی، دیگری در روشنایی و یک جفت در دورهٔ نور ـ تاریکی نگهداری شوند (۵، ۱۴، ۲۶، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۴۹، ۶۱، ۶۲ و ۶۶).

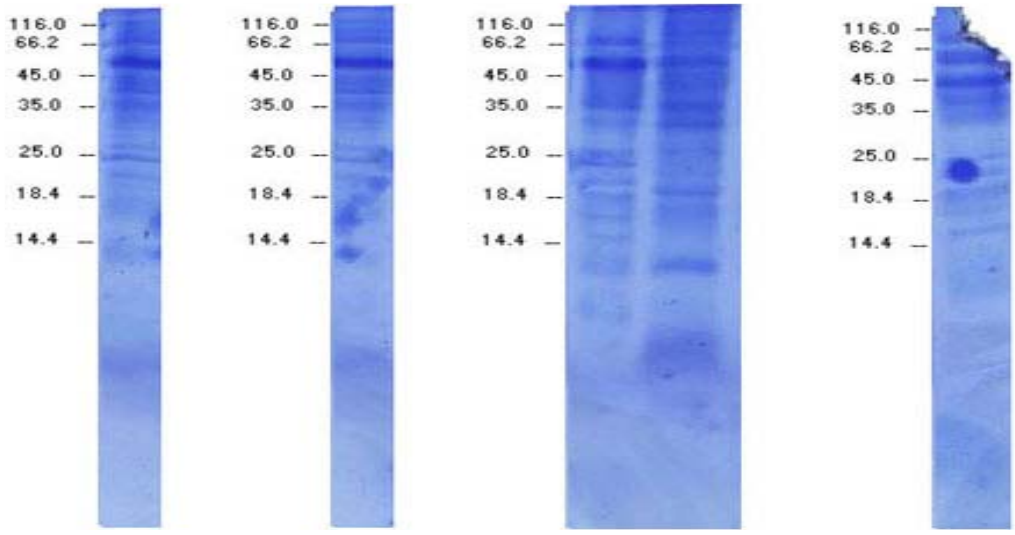
پرگنه‌های آسپرژیلوسی برگزیده، در پلیت‌های دارای چاپک دوکس آگار، چاپک یست اکستراکت آگار (با و بدون ۲۰ درصد سوکروز)، مالت اکستراکت آگار و چاپک دوکس آگار (با و بدون ۲۰ درصد سوکروز) با پیروی از دستور کار بنگاه ICPA برای بررسی‌های ریخت‌شناختی ماکرو و میکروسکوپی کشت، در دمای ۲ ± ۲۵ رشد داده شده و پس از ۳ و ۷ یا ۱۴ و ۲۵ و گاه ۳۰ روز بررسی و همزمان اسلاید کالچر از هر نمونه بربسترهای چاپک دوکس آگار و چاپک یست اکسترکت ۲۰٪ سوکروز برای هنجاری رشد با الگوی پیشین فراهم گشته و گرمخانه گذاری در ۳۷°c انجام نگردید (۲۶، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۵۱ و ۶۶). برای بررسی‌های ریخت‌شناختی رویه و پشت پرگنه‌های یک هفته‌ای تا دو هفته‌ای (در آسپرژیلوس‌های سیاه پرگنه‌های دو تا چهار هفته‌ای) برگزیده شدند. در همه نمونه‌ها با کمک لام‌های اسلاید کالچر میکرومتری یا عکسبرداری با کمک میکروسکوپ میکرو آنالایزر (Queen550/Leica®)انجام گردید (۱۴، ۲۶، ۳۰، ۵۵ و ۶۶). در پایان بر پایه الگوهای شناسایی گام به گام، «گروه گونه» و«گونه» آسپرژیلوسی و دسته بندی جدایه‌های فراهم آمده انجام گردید (۲۶، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۵۵ و ۶۶).

شگرد کشت در بستر مایع برای آماده‌سازی و انگیزش هرچه بیشتر و فراوان‌تر آنتی‌ژن‌ها، برای فراهم‌سازی آنتی‌ژن از جدایه‌های فراهم آمده برگزیده شد. یک لوپ فول دارای 10^5 فیالوسپور از آمیزه PBS و کونیدی‌های هر جدایه رشد یافته در پلیت چاپک اکستراکت آگار برداشت گردیده و به یک لوله فالکن

۵۰ میلی‌لیتری دارای بستر مایع چاپک دوکس براث دارای یک درصد مالت اکستراکت آگار بازکشت شد (۶۸). لوله‌های بازکشت شده با ۲۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۳±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و در دوره نور تاریکی - گرمخانه‌گذاری شدند (۵، ۱۶، ۴۸ و ۴۹). پس از هفت روز توده شناور یا ته نشین در مایع که همان رشته‌های نوزاده و کوچک (Pelett & Germ tube) قارچی کپکی بودند با کمک سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ هزار (در دقیقه) تا ۱۵ دقیقه ته نشین و برداشت شدند (۲ و۵). توده کپک رشته‌ای برداشت شده سه بار پیاپی با ۲۵ میلی‌لیتر PBS با کمک سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور تا ۱۵ دقیقه) شستشو و در گرمخانه ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در ۶ ساعت و هر توده تا ۴۸ ساعت در دسیکاتور خشک و سپس ۲ گرم از آن برداشت گردید. تودهٔ از هر رشته کپکی خشک در یک لوله فالکن ۱۵ میلی‌لیتری سه بار و هر بار سه بار پیاپی (هر ۷ دقیقه) با ۵ میلی‌لیتر نیتروژن مایع آمیخته و با کمک دستگاه هم زن لوله و گویچه‌های شیشه‌ای (پرل) خرد و در هر بار ۲۵ دقیقه خردسازی توده انجام شد تا آنکه ۷۰- (۶۰) -۵۰ درصد خردشدگی رشته‌ها دیده شود، به هر لوله فالکن ۵ میلی‌لیتر از بافر نمونه‌گیری و یک میلی‌لیتر استن سرد افزوده و با کمک سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ تا ۱۵ دقیقه سر مانده از ته نشین درشت‌تر جداسازی شد (۴۸ و ۶۸). برای هماهنگ‌سازی، اندازه پروتئین هر آمیزه به دست آمده از هر جدایه آسپرژیلوسی با روش برادفورد اندازه‌گیری انجام و نمونه‌های غلیظ تا اندازه ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رقیق شدند. نمونه‌های رقیق با کمک ۵ برابر استن سرد و یک برابر نمونه در سرمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد یک تا سه روز نگهداری و سپس در دور ۲۰۰۰۰ تا ۲۰ دقیقه در سرمای ۲۰- درجهٔ سانتیگراد سانتریفیوژ شدند. از ته نشست برداشت انجام شده و در نمونه‌های غلیظ رقیق‌سازی و در نمونه‌های رقیق دوباره غلیظ‌سازی به همین روش انجام گردید تا همه افشره‌های نمونه‌های آنتی‌ژنی دارای ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئین باشند (۲، ۴۱ و ۵۶).

به هر $۵۰\mu l$ نمونه $\frac{۱}{٤}$ بافر آماده‌سازی نمونه افزوده و سپس در حمام آب ۵±۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد تا ۲±۸ دقیقه فرآوری و تیمار شدند (۲، ۱۶ و ۴۸). به اندازه $۲۵\mu l$ از نمونه‌های آماده را در ناودان ژل نمونه‌گذاری پلی آکریلامید ۶٪ ریخته و سپس با ولتاژ ۲۰۰ و ۴۰ میلی‌آمپر در ژل پلی آکریلامید ۱۴ درصد (۱/۵ mm) رانده شدند تا نوارهای آنتی‌ژن‌های پلی پپتیدی در روند SDS – Page به بار آید (۲). به اندازه $۱۵\ \mu l$ از نشانگر پروتئین (Fermentas® SMO431) برای سنجش درستی روند انجام الکتروفورزیس و نیز سنجش آرایه‌ها و الگوهای نوارهای پدید آمده از پروتئین‌های جای گرفته و جدا از هم در پهنه ژل پلی آکریلامید (Acrylamide :Bis-Acrylamide ۳۷/۱:۵) که با رنگ‌های کومازی بریلیانت بلو (Coomassie Brilliant Blue R-250®/Sigma) و نیترات نقره (Silver nitrate stain ®/Sigma) برای راست آزمایی کارکرد رنگ کومازی بلو، رنگ آمیزی و آشکارسازی می‌شدند، به کار برده شد و سرانجام از ژل‌های آماده پس از رنگ زدایی عکس و سپس اسکن‌برداری شد (۲) (شکل ۱). همه داده‌هایی که نیازمند همسنجی‌های آماری برای آشکارسازی وابستگی‌ها، همبستگی‌ها یا همانندی‌ها و ناهمانندی‌های آماری بودند با کمک

نرم‌افزار آماری SPSS و کمک آزمون های T-test، Poissons و Anova بررسی شدند (۴۰).



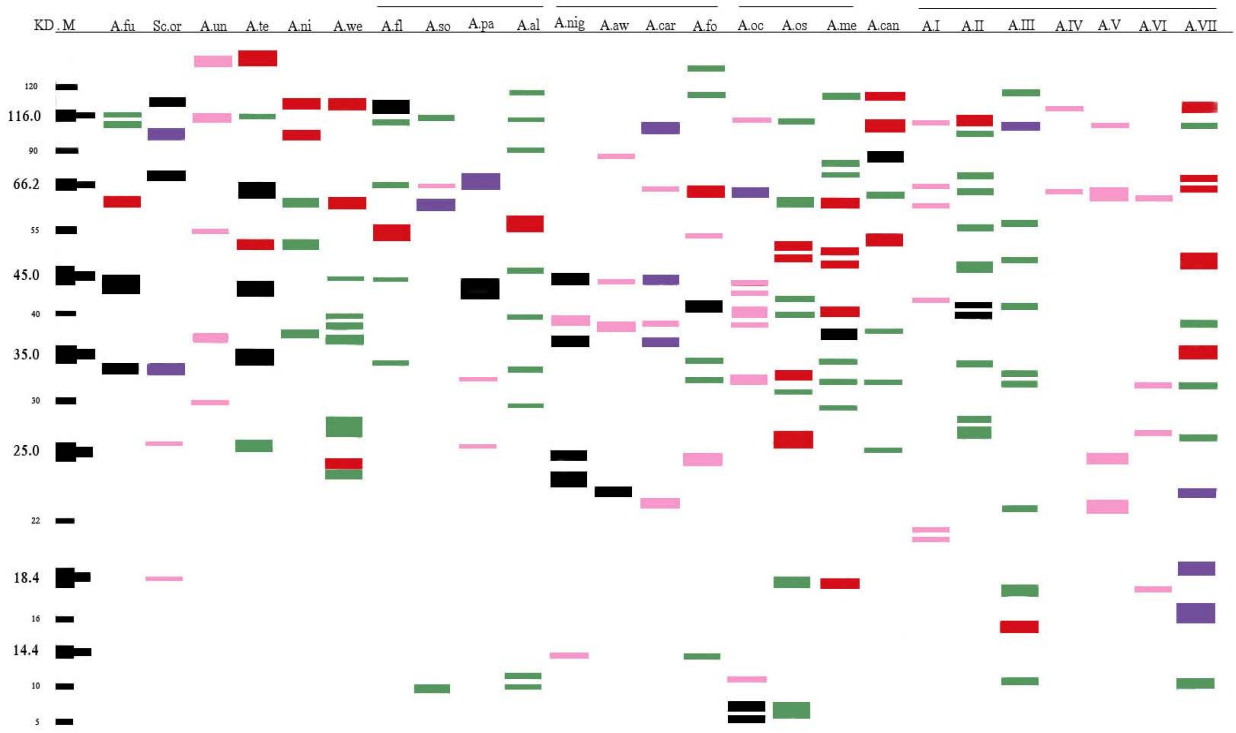
شکل۱: الگوی الکتروفورزی *Aspergillus* af *japonicus*(SDS-PAGE , 14%)

نتایج

بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس فومیگاتوس نشانگر آنست که نوارهای هموژن به سنگینی KD ۳۵-۳۳ و نوار هتروژن به سنگینی KD ۴۵-۴۳ را بایستی ویژه آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی اسکلروکلیستا اورناتا نشانگر آنست که نوارهای هموژن به سنگینی KD ۶۸-۶۶/۲ و KD ۱۲۰-۱۱۶ را بایستی ویژه آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس ترئوس نشانگر آنست که نوارهای هتروژن یا هموژن به سنگینی KD ۳۵، نوار هتروژن و گاه هموژن به سنگینی KD ۴۵-۴۳ و نوار هتروژن یا هموژن به سنگینی KD ۶۶/۲ را بایستی ویژه آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس فلاووس نشانگر آنست که نوار هتروژن یا هموژن به سنگینی KD ۱۲۰-۱۱۶ را بایستی ویژه آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس سوژه نشانگر آنست که نوار هموژن و گاه هتروژن به سنگینی KD ۶۶-۶۰ را بایستی ویژه آن دانست (P <۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس پارازیتیکوس نشانگر آنست که نوار هتروژن و گاه هموژن به سنگینی KD ۴۵-۴۳ را بایستی ویژه آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس کربوناریوس نشانگر آنست که نوارهای هموژن به سنگینی KD ۳۷، KD ۴۵ و هموژن KD ۱۱۶ را بایستی ویژهٔ آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس فتیدوس نشانگر آنست که نوار هتروژن یا هموژن به سنگینی KD ۴۲-۴۰ را بایستی ویژهٔ آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس اوکراسئوس نشانگر آنست که نوار هتروژن تک یا دوگانه با سنگینی KD ۱۰-۵ را بایستی ویژهٔ آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس اوستیانوس نشانگر آنست که نوارهای هتروژن به سنگینی KD ۲۷،

هموژن به سنگینی KD ۳۴ و هتروژن تک یا دوگانه به سنگینی KD۵۵-۵۰ را بایستی ویژهٔ آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس ملئوس نشانگر آنست که نوار هموژن به سنگینی KD ۳۸ را بایستی ویژهٔ آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس کاندیدوس نشانگر آنست که نوار هموژن به سنگینی KD ۹۰ را بایستی ویژهٔ آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی جدایه‌های *Aspergillus* af *terreus* نشانگر آنست که نوار هتروژن تک یا دو گانه به سنگینی KD ۴۳-۴۰ را بایستی ویژهٔ آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی جدایه‌های *Aspergillus* af *japonicus* نشانگر آنست که نوارهای هموژن یا هتروژن با سنگینی KD ۱۸/۴-۱۶/۴، هموژن یا هتروژن با سنگینی KD ۲۱-۲۰ و هموژن KD ۲۳ را بایستی ویژهٔ آن دانست (P<۰/۰۵) (جدول ۱).

جدول ۱: نمایه بخش‌ها و نوارهای الکتروفورزی گونه‌ها و جدایه‌های بررسی شده بر پایه جایگیری پروتئین‌های ویژه هر یک در برابر نوارهای الگو



کوتاه نوشته‌ها ؛ (Sc.) *Sclerocleista* ، (A.) *Aspergillus* ؛ *fumigatus*: fu ، *unguis*: un ، *terreus*: te، *niveus:* ni ، *wentii:* we ، *flavus*: fl ، *sojae:* so ، *parasiticus*: pa، *alliaceus*: al، *niger*: nig، *awamori*: aw، *carbonarius*: car، *foetidus* :fo ، *ochraceus*: oc ، *ostianus*: os، *melleus*: me، *candidus* :can ، M؛ مارکر (الگو)، KD؛ کیلو دالتون. رنگ‌ها؛ سیاه: 90-100% ، بنفش: 80-90% ، سرخ: 70-80%، گلی: 60-70% ، سبز: 50-60% از نمونه‌های بررسی شده را در بر داشته‌اند.

بحث

پس از سال‌های دهۀ ۷۰ با افزایش شمار درخواست‌های بالینی - آزمایشگاهی برای بررسی قارچ‌ها به ویژه آسپرژیلوس‌ها نخستین بررسی‌های هدفمند از سوی Hearn و همکاران (۱۹) بر افشرده ریسه کپک های آسپرژیلوسی فرآوری شده و شناسایی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن‌ها به انجام رسیده است. از آن هنگام که ایشان آسپرژیلوس فومیگاتوس، فلاووس، ترئوس، نایجر و نیدولانس را برگزیده‌اند، تا امروز تنها آسپرژیلوس کلاواتوس و گهگاه آسپرژیلوس اوستوس، اورایزه و یا سوژه به این فهرست که دربردارندۀ پرارزش‌ترین آسپرژیلوس‌های بیماری‌زا و آزرنده می‌باشند افزوده شده است (۵، ۸، ۴۸، ۶۵ و ۷۰) و در برابر پژوهش پیش رو به بیش از بیست گونه و همزمان بدان‌ها پرداخته و به این فهرست بیش از دیگران افزوده است (۷ و ۴۵) (جدول ۱). پیرو پژوهش‌های ناپیوسته و گاه به گاه، Kurup و همکاران (۳۱، ۳۲ و ۳۳) وی گروهی پژوهشی را سازماندهی نموده در سراسر دهۀ ۷۰ و ۸۰ میلادی، بررسی‌های هدفداری را گام به گام بر آنتی ژن‌های آسپرژیلوسی به انجام رسانیده‌اند و ارزشمندترین دستاورد پژوهش ایشان شناسایی کمپلکس آنتی ژنی CS2 ویژۀ آسپرژیلوس فومیگاتوس بوده است. با کمک شگردهای گوناگونی از فرآوری افشره بخش‌های گوناگون شماری از گونه‌های آسپرژیلوسی، فراهمسازی الگوی آنتی ژن‌ها و شناسایی آن‌ها، فراهمسازی آنتی‌بادی‌های ویژه شناساگر آن‌ها یا آشکارسازی گونه‌ها ارزش چنین بررسی‌هایی روزافزون بوده است تا آنجا که همواره و با کاربرد شگردهای آزمایشگاهی گوناگون یا نوین و «روز آمد» چنین پژوهش‌هایی همچنان انجام پذیرفت(۵، ۹، ۱۵، ۱۶، ۲۲، ۲۳، ۳۲، ۳۸، ۴۰، ۴۱، ۴۸، ۴۹، ۵۴، ۵۶، ۵۷ و ۷۳). روشن است که شگردهای گوناگونی برای فرآوری آنتی ژن در دست است یا آزموده شده‌اند که هیچیک را روشی بهینه و همه‌پذیر ندانسته‌اند (۳۳ و ۴۰). هرچه زودتر قارچ از بستر خود جدا شده و در آزمایشگاه برای فراهمسازی آنتی ژن به کار برده شود بهتر و پذیرفته‌تر است و آنتی‌ژن‌های فراهم آمده از کونیدی یا ریسه پدید آمده در بستر مایع برتر می‌باشند (۴۰ و ۵۶) در این پژوهش با بکارگیری دانسته‌های یادشده توانسته‌ایم آنتی‌ژن‌های بسیار گوناگونی را از گونه‌های هدف جداسازی و ویژگی هریک از آن‌ها را در وابستگی به گونه‌هایی یگانه را آشکار سازیم که بسیاری از آن‌ها تاکنون شناسایی نشده بوده‌اند (۳۱، ۳۲، ۳۳، ۴۱ و ۵۴) (جدول ۱) (شکل ۱). بررسی الگوی الکتروفورزی اسکلروکلیستا اورناتا نشانگر آنست که نوارهای هموژن به سنگینی KD ۳۵-۳۳ و KD ۱۱۶-۱۱۰ را نیز می‌توان ویژه آن بشمار آورد (P< ۰/۱). با بررسی الگوی الکتروفوزی آسپرژیلوس اونگوئیس از آنروکه هیچیک از نوارهای بدست آمده در بیش از نیمی از نمونه‌ها دیده نشده‌اند نمی‌توان گمان درستی به ویژگی هر یک از آن‌ها داشت. بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس ترئوس نشانگر آنست که نوارهای هموژن به سنگینی KD ۵۵-۵۰ و نیز هتروژن KD ۱۲۰< را می‌توان ویژه آن بشمار آورد (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس نیوئوس نشانگر آنست که نوارهای هموژن و گاه هتروژن به سنگینی KD ۱۱۶-۱۱۰ و نوار هتروژن یا هموژن به سنگینی KD ۱۲۰-۱۱۶ را می‌توان ویژه آن دانست (P<۰/۱). بررسی الگوی

الکتروفورزی آسپرژیلوس ونتی ای نشانگر آنست که نوارهای هموژن به سنگینی KD ۶۶-۶۰ و هتروژن یا هموژن KD ۱۲۰-۱۱۶ را می‌توان ویژه آن دانست (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس فلاووس نشانگر آنست که نوار هتروژن یا هموژن به سنگینی KD ۵۵ را نیز می‌توان ویژه آن بشمار آورد (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس سوژه نشانگر آنست که نوار هموژن به سنگینی KD ۶۶/۲ را نیز می‌توان ویژه آن به شمار آورد (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس پارازیتیکوس نشانگر آنست که و نوار هتروژن و گاه هموژن به سنگینی KD ۷۰-۶۶/۲ را نیز می‌توان ویژه آن به شمار آورد (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس آلیاسئوس نشانگر آنست که نوار هتروژن و گاه هموژن به سنگینی KD ۶۰-۵۵ را می‌توان ویژهٔ آن دانست (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس نایجر نشانگر آنست که نوارهای هتروژن به سنگینی KD ۲۳، هموژن به سنگینی KD ۲۵، هموژن KD ۳۷ و شاید هموژن KD۵۰-۴۵ را می‌توان ویژهٔ آن دانست (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس آواموری نشانگر آنست که نوار هموژن به سنگینی KD ۲۳ را می‌توان ویژهٔ آن دانست (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس کربوناریوس نشانگر آنست که نوارهای هتروژن تک یا دوگانه KD ۲۳، هموژن و گاه هتروژن KD ۳۹ و هموژن KD ۶۶/۲ را نیز می‌توان ویژهٔ آن به شمار آورد (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس فتیدوس نشانگر آنست که نوار هموژن به سنگینی KD ۶۶/۲ را نیز میتوان ویژهٔ آن به شمار آورد (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس اوکراسئوس نشانگر آنست که نوار هموژن به سنگینی KD ۶۶/۲ را نیز می‌توان ویژهٔ آن به شمار آورد (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس اوستیانوس نشانگر آنست که نوارهای هتروژن به سنگینی KD ۲۷، هموژن به سنگینی KD ۳۴ و هتروژن تک یا دوگانه به سنگینی KD۵۵-۵۰ را بایستی ویژهٔ آن دانست (P<۰/۰۵). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس ملئوس نشانگر آنست که نوارهای هموژن و گاه هتروژن به سنگینی KD ۱۸/۴، هموژن KD ۴۲، هتروژن تک یا دوگانه به سنگینی KD۵۳-۵۰ و هموژن KD ۶۶-۶۰ را نیز می‌توان ویژهٔ آن به شمار آورد (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی آسپرژیلوس کاندیدوس نشانگر آنست که نوارهای هموژن به سنگینی KD ۱۱۶ و هموژن KD ۱۲۰-۱۱۶ را نیز می‌توان ویژهٔ آن به شمار آورد (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی جدایه‌های *Aspergillus* af *terreus* نشانگر آنست که نوار هموژن با سنگینی KD ۱۱۶ را می‌توان ویژهٔ آن به شمار آورد (P<۰/۱). بررسی الگوی الکتروفورزی جدایه‌های *Aspergillus* af *japonicus* نشانگر آنست که و نوارهای هتروژن با سنگینی KD ۳۶-۳۵، هتروژن و گاه هموژن KD ۵۰، هتروژن تک یا دو گانه با سنگینی KD ۷۰-۶۶ و هموژن و گاه هتروژن KD ۱۱۶ را نیز می‌توان ویژهٔ آن به شمار آورد (P<۰/۱) (جدول ۱).

Longbottom و همکاران (۳۷) به خوبی نشان داده‌اند که آنتی ژن Ag7 با سنگینی KD ۲۰۰-۱۵۰ و Ag 13 (KD ۷۰) را می توان در گروه آنتی ژن‌های ویژه گونهٔ فومیگاتوس بشمار آورد. Ag 5 (KD ۳۳) ویژه‌ترین، و نیز Ag 3 که در فرآوری با پالایش در ژل

آگارز در تراز KD ۲۴ و در فرآوری با SDS – Page تراز KD ۱۸ جای می‌گیرد همانند Ag 5 (KD ۳۵) واکنش نموده است. اگرچه به سختی می‌توان دستاوردهای الگوی الکتروفورتیک پیشنهاد شده از سوی دیگر پژوهندگان که با به کارگیری شگردهایی دور از SDS – Page فراهم آمده‌اند را با دستاوردهای پژوهش پیش رو سنجید باری همسنجی دستاوردهای ما نشانگر برتری بیگمان در توان بهینه جداسازی و شناسایی همبستگی گونه‌ای و وابستگی به جنس در آنتی ژن‌هاست (۷ و ۴۱) (جدول ۱).

Puente و همکاران (۵۶) افشره فراهم آمده از کنیدی‌های آسپرژیلوس نیدولانس را با کمک SDS – Page سنجیده‌اند تا بتوان آن‌ها را به جای آنتی‌ژن‌های ریسه‌ای دیگر گونه‌های آسپرژیلوسی به کار بست. همسنجی با گونه‌های دیگر نشان داد که چهار بخش از آنتی‌ژن‌ها در دیگر گونه‌ها نیز یافت می‌شوند. ایشان بهترین شناسایی از الگوی آنتی ژنی آسپرژیلوس نیدولانس را که دربردارندهٔ پروتئین‌هایی با سنگینی KD ۲۰۰-۱۳ دانسته‌اند و خود نیز شش نوار (ایمنوراکتیو) را به دست داده‌اند (۵۷). نامگذاری استاندارد آنتی‌ژن‌های آسپرژیلوسی با به کارگیری کوتاه نوشته‌ها ($A.f_{1(I)}\ldots A.f_n$ یا $A.x_{1(I)}\ldots A.x_n$) از سوی Sporik و همکاران (۷۳) گروه‌ها و بخش‌های ایمنوراکتیو را بسامان‌تر نموده است، ایشان A. f1 (I) را در آسپرژیلوس فومیگاتوس شناخته‌اند که ویژه رشته‌ها بوده و هرگز در کنیدی‌ها به دست نمی‌آید و یافتن آن نشانهٔ برخورد با چهرهٔ رویشی کپک بوده یا نشان‌دهنده جوانه زنی و رویش اسپور در نمونه می‌باشند. ایشان دریافته‌اند که ۶۵ درصد جدایه‌های به دست آمده از هوای جایگاه‌های بسته، ۸۰ درصد جدایه‌های به دست آمده از گیاهان زنده یا مرده (جایگاه‌های باز) چنین آنتی ژنی را به بار می‌آورند و کمتر می‌توان چنین آنتی‌ژن‌هایی را از فرآوردهٔ آنتی‌ژنی رشته‌های فراهم آمده از جدایه‌های بدست آمده از هوای جایگاه‌های باز یا بسته به دست آورد از اینرو در پژوهش پیش رو برای فراهمسازی آنتی‌ژن‌های آسپرژیلوسی از زیتوده‌های قارچی فراهم آمده از اسپورهای دارای لوله‌های زایا سرانجامی بهتر از دیگران یافته‌ایم همچنین در برابر این یافته‌ها در پژوهش پیش رو توانسته‌ایم شماری چند از آنتی‌ژن‌های آسپرژیلوسی ایمینودومینانت را تنها در همسنجی با داده‌های در دسترس دیگر پژوهندگان از جدایه‌های بررسی شده به دست آوریم (۷) (جدول ۱) (شکل ۱).

Calera و همکاران (۵) گزارش نموده‌اند که فراتا میکو و همکاران وی گلیکوپروتئین های KD ۵۸ و لاتگه و همکاران وی گلیکوپروتئین های KD ۱۸ را ویژه بخش‌های آنتی ژنی گونهٔ فومیگاتوس دانسته‌اند. ایشان گزارش کالرا و همکاران وی را در درستی کاربرد آنتی ژن‌های همگون ریسه و یا کنیدی فراهم آمده از آسپرژیلوس نیدولانس را به جای دیگر آسپرژیلوس‌های بیماری‌زا پذیرفته‌اند و دستاوردایشان را ارزشمندترین الگوی پروتئینی به دست آمده از SDS – Page برای گونهٔ نیدولانس دانسته اند. پیرو ایشان Lopez Medrano و همکاران وی (۳۸) چهار بخش از نوارهای پایه و واکنشگر آسپرژیلوس فومیگاتوس را شناسایی نمودند که در آزمون‌های پرشماری ایمنوراکتیو بوده‌اند. این نوارها KD ۹۰، KD ۶۰، KD ۴۰ و KD ۳۷ سنگینی داشته و همگی N گلیکوزیله می‌باشند. از این پس کمپلکس بخش

سیتوپلاسمی (CFC) برای نامیدن این گروه از آنتی ژن‌ها در دیگر گونه‌ها همچون نیدولانس نیز به کار گرفته می‌شوند. Segurado و همکاران وی (۶۸) نیز نوارهای دوگانه KD ۵۰ و KD ۳۳ را نیز به یاری SDS – Page و رنگ آمیزی نقره در آسپرژیلوس فومیگاتوس شناسایی نموده و نیز در آسپرژیلوس نیدولانس هم یافته‌اند که از ویژگی ایمنودومینسی برخوردار می‌باشند.امروزه شگردهای مولکولی پروتئومیکس و ژنومیکس توانسته‌اند بیست ژن فراهم آورنده آنتی ژن‌های الگوی آسپرژیلوسی در گونه‌های این جنس را به ما بشناسانند و شمار آنتی ژن‌های استانداردی (Asp f n)از یک تا بیست فراهم آورند که از این میان Asp f 1 تا Asp f 6 ویژه‌ترین و بیشترین واکنش را به نمایش می‌گذارند (۳۱ و ۵۴). Medina و همکاران (۴۱) نیز در بررسی پروتئین های تراوشی آسپرژیلوسی با شگرد MS/MS (– 1,2 DE) از میان ۵۱ پروتئین، چهارده پروتئین نوین و ناشناخته را برای نخستین بار در آسپرژیلوس‌ها گزارش نموده‌اند. از اینرو باور بر آنست که پژوهش‌ها در شناسایی فراورده‌های ساختاری و سوخت و سازی بسیاری از قارچ‌ها و کپک‌ها بویژه آسپرژیلوس‌ها همچنان نیازمند بهبود بخشی شگردها و نوین سازی شیوه‌ها می‌باشد و همچنان الگوهای الکتروفورتیک بر دیگر شگردها سودمندی و کاربردی برتر نیز آسانی شایانی در بکارگیری دارند که کارایی دستاوردهای ما بویژه در ردهبندی مولکولی قارچ‌های آسپرژیلوسی را می‌نمایاند (۵۴ و ۶۵).

گزارش الگوی پروتئین آنتی‌ژن‌های جدایه‌های آسپرژیلوسی در این پژوهش بزرگترین گزارش بر پایه شمار بسیاری از گونه‌های آسپرژیلوسی یکجا و همزمان در یک بررسی پژوهشی در جهان بوده و در ایران نیز برای نخستین بار انجام و گزارش می‌گردد (۳۱، ۴۱، ۵۴ و ۶۵). همچنان و تا به امروز شگرد یا روندهای همه پسندی برای جداسازی، فرآوری، ارزش گذاری و نیز به کارگیری آنتی‌ژن‌های بخش‌های گوناگون کپکی و آسپرژیلوسی پیشنهاد نشده است پس بایستی هماهنگ، همراه و همگام با دیگر پژوهندگان جهانی، در ایران نیز ارزش بسیاری از شیوه‌های دیرپا یا نوپا سنجیده شود تا هرچه زودتر دستاوردی همگانی فراهم آید. استان‌های شمال ایران بیشترین شمار ایرانیان را در پهنه‌ای کوچک در خود جای داده‌اند، پیشنهاد می‌گردد آزردگی‌های پنهان قارچی در شهروندان و گروه‌های پیشه‌ای وابسته بررسی گردد. پیشنهاد می‌گردد تا یک بنگاه پژوهش‌های قارچ شناسی محیطی پدید آید تا سرپرستی و راهبری پژوهش‌هایی از این دست را در کشور بدست گیرد (۲۱، ۴۹، ۵۴، ۵۶، ۶۵ و ۷۴).

سپاسگزاری

این پژوهش تنها با تاییدات حوزه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی و با پرداخت بخشی از هزینه آن به انجام رسیده است. پژوهندگان از کمک‌های فنی پژوهشکده چای ایران و دانش دکتر منصور بیات، دکتر سید جمال هاشمی هزاوه، دکتر لیلا مدیری، مهندس تقی شکرگزار و نادر صبوری املشی بهره‌مند بوده‌اند و سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

1. Amin, R. and Bokhari, M.H., 1979. Survey on atmospheric fungus spores in shiraz, Iran. Ann. Aller. 42: 246 – 47.
2. Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. and Struhl , K., 2002. Short Protocols in

Molecular Biology (5th ed), J. Wiley Sons. Vol: 1,2:unit :1 and 10 pp.
3. Bis, W.A., 1990. Immunological studies of the activity of Aspergillus flavus link. I: Antigen analysis and evaluation of its chemical composition and toxicity. Med. Dosw. Mikrobiol. [Pub. Med]. 42 : 143 – 8.
4. Burge, H.A., 2001. Fungi: Toxic killers or unavoidable nuisances? Ann. Aller. Asthma. Immuno. 87: 52 – 56.
5. Calera, J.A.; Lopez Medrano, R.; Ovejero, C.; Puente, P. and Leal, F. 1994. Variability of Aspergillus nidulans antigens with media and time and temperature of growth. Infec. Immuni. 2: 322 – 33.
6. Chaichi Nosraty, A.; Modiri, L. and Fayezi, M., 2006. An investigation on Tea garden air fungal Pollution in the north of Iran, Gilan province eastern region, ISI Web of Knowledge , ISI Current Contents connect, (International) ISI Proceedings, IMC 8, Cairns. p: 143-47.
7. Chaichi Nosraty, A.; Khosravi, Ar.; Zare, R.; Bayat, M.; Modiri, L. and Saboori Amlashi, N., 2010. An investigation on taxonomic identification of aerial aspergillus species in the North of Iran, an assay on protein pattern profiles of the genera, species and allergen antigens, IMC 9 Proceedings, Edinburgh. p:3: 189.
8. De Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gene, J. and Figueras, A., 2000. Atlas of Clinical Fungi. Central Bureau voor schimmelcultures, Utrecht, Nitherlands (2 nd ed). Vol: 1.1-1248 pp.
9. De Magaldi, S.W. and Mackenzi, D.W., 1984. Specifity of antigens from pathogenic Aspergillus species. II: Studies with line immune - electrophoresis. Sabouraudia. 22: 395 – 402.
10. Douwes, J., 1998. Respiratory health effects of indoor microbial exposure: A contribution to the development of exposure assessment methods.Ph.D thesis,Agricultural university of wageningen, The Netherlands. 1-171 pp.
11. Etzel, R.A., 2002. Mycotoxins, J. A. M. A. 287: 425 – 427.
12. Filtenborg, O.; Frisvad, J.C.; Lund, F. and Hrane, U., 1992. Simple identification procedure for spoilage and toxigenic mycoflora of foods. In: Modern methods in food mycology (eds. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. and King, A.D.). Elsevier, Amsterdam, pp 263 – 273.
13. Flannigan, B.; Samson, R.A. and Miller, J.D., 2001. Microorganisms in home and indoor work environments. Diversity, Health Impacts, Investigation and Control. Horwood, Reading. UK, pp 13-23.
14. Gams, W.; Hoekstra, E.S. and Aptroot, A., (eds.) 1998. CBS Course of Mycology (4th ed) Centraalbureu Voor Schimmelcultures, Baarn,1- 165 pp.
15. Gautam, P.; Madan, T.; Gade, W.N. and Usha Sarma, P., 2006. Immuno – Proteomic analysis of secretory proteins of Aspergillus fumigatus with specific IgE immunoreactivity. Ind. J. Clin. Biochem. 21: 12 – 19.
16. Green, B.J.; Mitakakis, T.Z. and Tovey, E.R., 2003. Allergen detection from 11 fungal species before and after germination. J. Allergy. Clin. Immunol. 111: 285 – 9.
17. Hardin, B.D.; Kelman, B.J. and Saxon, A., 2002. Adverse human health effects associated with molds in indoor environment, Evidence based statement of the American college of Occupational and Environmental Medicine, Under the auspices of the Acoem council on scientific affairs, Approved on October 27.
18. Hariri, A.R.; Ghahary, A.; Naderinasab, N. and Kimberlin, C., 1978. Airborne fungal spores in Ahwaz, Iran. Ann. Aller. 40 : 349 – 52.
19. Hearn, V.M.; Proctor, A.G. and Mackenzie, D.W., 1980. The Preparation and partial characterization of antigenic fractions obtained from the mycelial walls of several Aspergillus species. J. Gen. Microbiol. 119 : 41 – 9.
20. Hedayati, M.T.; Mohseni Bandpi, A. and Moradi, S., 2004. A survey on the pathogenic fungi in soil samples of potted plants from Sari hospitals, Iran. Jor. Hospit. Infec. 58: 59 – 62.

21. Heidarian, R.; Nikkhah, M.J.; Peyambari, M. and Ormaz, B., 2006. Study on fungal contamination on pistachio seed in Kerman province, Iran and some new fungi for Iranian pistachio mycoflora. Acta. Horti. 726: 615 – 17.
22. Helbling, A. and Reimers, A., 2003. Immunotherapy in fungal allergy. Curr. Allergy. Asthma. Rep. 3: 447 – 53.
23. Helbling, A.; Reese, G.; Horner, W.E. and Lehrer, S.B., 1994. Current aspects of fungal spores allergy, Schweiz. Med. Wochenschr. [Pub. Med]. 124: 885 – 92.
24. Ichinoe, M.; Saito, T. and Okano, K., 2001. The occurence of alfatoxin producing strains in the imported Iranian pistachio nuts. Mycotoxins. 51: 109 – 114.
25. Khosravi, A.R.; Shokri, H.; Yahyarayat, R. and Soltani, M., 2004. Isolation of toxigenic and nontoxigenic fungi form feed stuffs refered to the center of mycology. J. Facul. Vet. Med. Univ, Tehran. 59: 221 – 26.
26. Klich, M.A., 2002a. Identification of Common Aspergillus Species. C.B.S, Utrecht, Netherlands .1-116 pp.
27. Klich, M.A., 2002b. Biogeography of Apsergillus species in soil and litter. Mycologia. 94: 18-34.
28. Klich, M.A. and Pitt, J.I., 1988a. The theory and practice of distinguishing species of the Aspergillus flavus group. In: Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics (eds. R.A. Samson and J.I. Pitt). New York, Plenum Press. p: 211 – 220.
29. Klich, M.A. and Pitt, J.I., 1988b. A laboratory guide to common Apersillus species and their teleomorphs. Commonw. Scient. & Indust. Res. Organization (CSIRO), Division of food processing , North Ryde, Nsw , Australia.1 – 116 pp.
30. Kozakiewicz, Z., 1989. Aspergillus species on stored products. Mycological Papers. 161: 1 – 188 pp.
31. Kurup, V.P., 2005.Aspergillus antigens: which are important? Med. Mycol. 43: 5189 – 96.
32. Kurup, V.P.; Fink, J.N.; Scribner, G.H. and Falk, M.J., 1977. Antigenic variability of Aspergillus fumigatus strains. Microbios. 19: 191 – 204.
33. Kurup, V.P. and Kumar, A., 1991. Immunology of Aspergillosis. Clin. Microbiol. Rev. 4 : 439-56.
34. Lacey, J., 1988.The microbiology of cereal grains from areas of Iran with a high incidence of Oesophageal canser. J. Stor. Prod. Res. 24: 39 – 50.
35. Lacey, J., 1991. Aerobiology and health: The role of airborne fungal spores in respiratory disease. In: Frontiers in Mycology (ed. Hawksworth, D.L.) CAB International, Wallingford.p:157 – 185.
36. Larone, D.H., 2005. Medically important fungi, a guide to identification. (5th ed). Elsevier, New York, 1 – 230 pp.
37. Longbottom, J.L.; Harvey, C.; Taylor, M.L.; Austwick, P.K.; Fitzharris, P. and Walker, C.A., 1989. Characterization of immunologically important antigens and allergens of Aspergillus fumigatus. Int. Arch. Allergy. Appl. Immonol. 88: 185 – 6.
38. Lopez Medrano, R.; Ovejero, M.C.; Calera, J.A.; Puente, P. and Leal, F., 1995. Aspergillus fumigatus antigens. Microbiology. 141: 2699 – 704.
39. Marasas, W.F.O. and Nelson, P.E., 1984. Mycotoxicollogy. Introduction to the mycology, plant pathology, chemistry, toxicology and pathology of naturally occurring mycotoxicoses in animals and man. Pennsylvania state University Press.1- 104 pp.
40. Martinez, J. and Torres, J.M., 1985. Chracterization of exoantigens of Aspergillus. Study of factors influencing their quality. Allergo. Immunopathol. [Pub. Med]. 13: 501 – 8.
41. Medina M.L.; Haynes P.A.; Breci, L. and Francisco, W.A., 2005. Analysis of secreted proteins from Aspergillus flavus. Proteomics. 5: 3153-61.
42. Miller, J.D., 2001. Mycological investigations of indoor environments. In: Microogranisms in home and indoor work environments. Diversity, Health Impacts, Investigation and Control. (eds. Flannigan et al.). Harwood, Reading UK. p: 231 – 246.

43. Moallaei, H.; Zaini, F.; Pihet, M.; Mahmoudi, M. and Hashemi, J., 2006. Isolation of keratin -ophilic fungi from soil samples of forests and farm yards. Iran. J. Pub. Health. 35: 62 – 9.
44. Modiri, L.; Chaichi Nosraty, A.and Fayezi, M., 2006. An investigation on Tea processing houses air fangal Pullotion in the north of Iran, Gilan province eastern region, ISI Web of Knowledge, ISI Current Contents connect ,(International) ISI Proceedings, IMC8, Cairns. p: 225- 29.
45. Modiri, L. and Chaichi Nosrati, A., 2010. Isolation and identification of Aspergillus species from tea processing houses air in the North of Iran; the first report of some new Aspergillus species for Iran, IMC 9 Proceedings, Edinburgh. p:2: 172.
46. Notermans, S.H.W.; Cousin, M.A.; De Ruiter, G.A. and Rombouts, F.M., 1998. Fungal immunotaxonomy. In: Chemical fungal taxonomy (eds. Frisvad, J.C., Bridge, P.D. and Arora, D.K.). Marcel Dekker, New York. pp: 121 – 152.
47. Nourian, A.A.; Badali, H.; Khodaverdi, M.; Hamzehei, H. and Mohseni, S., 2007. Airborne mycoflora of Zanjan, Iran. Int. J. Agri. Boil. 9: 628 – 30.
48. Oda, K.; Kakizono, D.; Yamada, O.; Iefuji, H.; Akita, O. and Iwashita, K., 2006. Proteomic analysis of extracellular proteins from Aspergillus oryzae under submerged and solid – state culture conditions. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3448 – 57.
49. Odds, F.C.; Ryan, M.D. and Sneath, P.H., 1983. Standardization of antigens from Aspergillus fumigatus. J. Biol. Stand. 11: 157 – 62.
50. Okuda, T.; Klich, M.A.; Seifert, K.A. and Ando, K., 2000. Media and incubation effects on morphological characteristics of Penicillium and Aspergillus. In: Intergration of Modern Taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus Classification (eds. R.A. Samson and J.I. Pitt). Harwood Academic Publishers. Reading, U.K. p: 83 – 99.
51. Pitt, J.I., 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. Brit. Med. Bull. 56: 184 – 92.
52. Pitt, J.I. and Hocking, A.D., 1997. Fungi and food spoilage. Blackie Academic & Professional, London. (2nd ed). 1- 593 pp.
53. Pitt, J.I.; Samson, R.A. and Frisvad, J.C., 2000. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: Intergration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification (eds. R.A. Samson and J.I.Pitt). Harwood Academic Publishers. Reading, U.K.p: 9 – 49.
54. Pitt, J.I. and Samson, R.A., 2007. Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs, Stud Mycol. 2007; 59: 67–70.
55. Powell, K.A.; Renwick, A. and Peberdy, J.F., (eds.) 1994.The genus Aspergillus: from taxonomy and genetics to industrial application. Plenum press, New York.1-374 pp.
56. Puente, P.; Ovejero, M.C.; Fernandez, N. and Leal, F., 1991. Analysis of Aspergillus nidulans conidial antigens and their prevalence in other Aspergillus species. Infect. Immuni. 59: 4478 – 85.
57. Puente, P.; Fernandez, N.; Ovejero, M.C. and Leal, F., 1992. Immunogenic potential of Aspergillus nidulans subcellular fractions and their polypeptide components. Mycoses. 35: 235 – 41.
58. Ramin, A.G., 2003.The study of aflatoxins and their producing agents in bread used in ruminat food stuffs. J. Facul. Vet. Med. Univ. Tehran. 58: 347 – 41.
59. Razzaghi Abyaneh, M.; Shams Ghahfarokhi, M.; Allameh, A.A.; Kazeroon Shiri, A.; Ranjbar Bahadori, S.; Mirzahoseini, H. and Rezaee, M.B., 2006. An survey on distribution of Aspergillus section flavi in corn field soils in Iran: Population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonicacid and sclerotia production .Mycopathologia 161: 183 – 92.
60. Saberi Riseh, R.; Javan Nikkhah, M.; Heidarian, R.; Hosseini, S. and Soleimani, P., 2004. Detection of fungal infectious agent of wheat grains in store- pits of markazi province, Iran. Communic. Agri. App. Biol. Sci. 69: 541 – 4.
61. Samson, R.A., 1994a. Taxonomy current concepts in Aspergillus. In: biotechnology

handbooks, Aspergillus ,Vol .7 (ed. J.E. Smith). Plenum Publishing Co. New york. 1 – 22 pp.
62. Samson, R.A., 1994b. Current systematics of the genus Aspergillus. In: The genus Aspergillus, From Taxonomy and Genetics to industrial application (eds. K.A. Powell., A.Renwick and J.F. Peberdy). Plenum Press, London. p: 261 – 276.
63. Samson, R.A. and Gams, W., 1986. Typification of the Aspergillus species and associated teleomorphs. In: Advances of penicillium and Aspergillus systematics (eds. Samson, R.A. and J.I. Pitt,), Plenum Publ. p: 31 – 54.
64. Samson, R.A. and Hoekstra, E.S., 1994. Common fungi occurring in indoor environments. In: Health implications of fungi in indoor environments (eds. R. A. Samson et al.), Elsevier, Amsterdam, p: 541 – 587.
65. Samson, R.A. and Varga, J., 2007. Aspergillus systematics in the genomic era. Studies in Mycology. 59.1-206 pp.
66. Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C. and Filtenborg, O., 2000. Introduction to food and Air – Borne Fungi 6th ed. Barn, The Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Netherlands .1-389 pp.
67. Samson, R.A.; Houbraken, J.; Summerbell, R.C.; Flannigan, B. and Miller, J.D., 2001. Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In: Microorganisms in Home and Indoor work Environments (eds. B. Flannigan, R.A. Samson and J.D. Miller). Taylor and Francis, New York. p: 287 – 292.
68. Segurado, M.; Lopes Aragon, R.; Calera, J.A.; Fernandes Abalos, J.M. and Leal, F., 1999. Zinc regulated biosynthesis of umminodominant antigens from Aspergillus spp. Inf. Immuni. 67: 2377 – 82.
69. Shadzi, S.; Zahraee, M.H. and Chadeganipour, M., 1993. Incidence of airborne fungi in Isfahan, Iran. Mycoses. 36: 69 – 73.
70. Shelton, B.G.; Kirkland, K.H.; Dana Flanders, W. and Morris, G.K., 2002. Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States, App. Environ. Micro. 68: 1743 – 53.
71. Smedsgaard, J., 1997. Micro – scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. J. Chromatogr. A 760: 264 – 270.
72. Tsai, G.J. and Cousin, M.A, 1993. Partial purification and characterization of mold antigens commonly found in foods. App. Environ. Microbial. 59: 2563 – 71.
73. Sporik, R.B.; Arruda, L.K.; Woodfolk, J.; Chapman, M.D. and Platts Mills, T.A., 1993. Environmental exposure to Aspergillus fumigatus allergen (Asp fI). Clin. Exp. Allergy. 23: 326 – 31.
74. Young, L.S., 1990. Aspergillosis. In: Tropical and Geographic Medicine, 2nd ed. (eds. K.S. Warren and A.A.F. Mahmoud). McGraw Hill, New York .p: 933 – 940.
75. Zad, S.J. and Khosravi, A., 2000. Investigation on important seed borne fungal diseases of dominant rice cultivars in Mazandaran (Iran). Mede. Facul. Landbou. Toege. Boil. Weten. Univ. Gent. 65: 587 – 92.