مقایسه واکنش گونه های آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نایجر با IgE سرم بیماران مبتلا به ازدیاد حساسیت تیپ یک

مهربان فلاحتی: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
مژگان ابراهیمی: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
علیرضا سالک مقدم: کلینیک آلرژی خورشید و مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
مریم رودباری: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
سمیه قنبری: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
کبری مختاریان: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
مجید خوش میرصفا: مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
***رضا فلک:** استادیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). Falak.r@iums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: آسپرژیلوس‌ها نقش قابل توجهی در بروز آلرژی‌های تنفسی دارند. هدف این مطالعه بررسی الگوی پاسخ ایمونولوژیک هومورال IgE گونه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نایجر با سرم بیماران دچار ازدیاد حساسیت تیپ یک به آسپرژیلوس‌ها بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی عصاره تهیه شده از قارچ‌های مورد نظر دیالیز و غلظت پروتئینی عصاره‌ها با روش برادفورد اندازه‌گیری شد و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها با الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید بررسی گردید. بیماران حساس و کنترل‌ها بر اساس علائم بالینی و تست پریک انتخاب شدند و با استفاده از سرم بیماران و روش‌های الایزا و وسترن بلات واکنش متقاطع IgE بین آلرژن‌های سوش‌های مورد نظر بررسی گردید.

یافته‌ها: در الکتروفورز عصاره گونه‌ها، باندهای پروتئینی در محدوده ۱۱ الی ۱۰۰ کیلودالتون مشاهده شد که باندهای پروتئینی واضح‌تر در محدوده ۴۶ تا ۱۰۰ کیلودالتون قرار داشتند. در آزمون الایزا اختلاف چشمگیری در واکنش سرم بیماران آلرژیک و گروه کنترل در مورد هر سه قارچ مشاهده شد. اما نتایج الایزای بیماران در سه گونه مطرح شده با هم اختلاف فاحشی نشان نمی‌داد. در وسترن بلات نیز باندهای شاخصی در وزن‌های مختلف مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: پروتئین‌های آلرژی‌زا در گونه‌های بررسی شده تاحدودی متفاوت هستند بنابراین تفاوت واکنش ایمنی بیماران می‌تواند مربوط به تفاوت زمینه ژنتیکی افراد مورد مطالعه، تفاوت سطح مواجه بیماران با قارچ‌های محیطی و یا تفاوت قدرت آلرژی‌زایی عصاره‌های مورد مطالعه و تکنیک‌های به کار رفته باشد.

کلیدواژه‌ها: ازدیاد حساسیت تیپ یک، سوش‌های آسپرژیلوس، الایزا، وسترن بلات

مقدمه

قارچ‌ها تقریباً می‌توانند در هر شرایطی، حتی در محدوده دمایی غیر فیزیولوژیک رشد کنند و باعث بروز بیماری‌های مختلف از جمله آلرژی شوند (۱). اسپورهای قارچی در تمام طول سال به مقدار زیادی در هوای آزاد وجود دارند و غلظت آن‌ها بسته به شرایط محیطی می‌تواند متغیر باشد (۲). مطالعه نوزادان آلرژیک نشان می‌دهد که رابطه مستقیمی بین تعداد اسپورهای قارچی معلق در هوا و تاثیر آن‌ها بر سلامت انسان وجود دارد (۳). به علاوه تراکم قارچ‌های آلرژی زای تنفسی در محیط‌های بسته تحت تاثیر عواملی چون رطوبت، تهویه، حضور حیوانات خانگی و پوشش گیاهی منطقه قرار دارد (۴). آسپرژیلوس‌ها عامل طیف وسیعی از بیماری‌های ریوی از قبیل مایستوما، آسپرژیلوزیس مهاجم، آسپرژیلوزیس برونکوپولمونری آلرژیک و واکنش‌های ازدیاد حساسیت تیپ یک تنفسی می‌باشند (۵). شیوع

آلرژی تنفسی به قارچ ها در مناطق گرم و مرطوب در افراد آتوپیک حدود ۳۰-۲۰ درصد و در افراد غیر آتوپیک حدود ۶ درصد تخمین زده شده است (۴). آلرژی تنفسی می تواند بر تمام گروه‌های سنی تاثیر بگذارد ولی این تاثیرات در کودکان شدیدتر است (۶). اسپور قارچ های فرصت طلب به خصوص گونه های مختلف آسپرژیلوس نظیر *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* به عنوان شایع ترین آئروآلرژن‌های قارچی در نظر گرفته می شوند (۷). شکل و دفعات تماس با ارگانیسم و همین طور نوع پاسخ ایمنی میزبان در بروز ازدیاد حساسیت به آسپرژیلوس‌ها موثرند (۸ و ۹). هر چند در بین آسپرژیلوس‌ها، گونه *آسپرژیلوس فلاووس* فراوانی بیشتری در محیط دارد، ولی عامل اغلب عفونت‌ها و آلرژی به آسپرژیلوس ها، گونه فومیگاتوس است (۹ و ۱۰). اطلاعات آزمایشگاهی نشان می دهند که بیماری زایی گونه فلاووس بیشتر از فومیگاتوس است ولی بزرگ تر بودن اسپورهای گونه فلاووس در مقایسه با فومیگاتوس موجب باقی ماندن آن ها در مجرای تنفسی فوقانی می شود (۱۱). بیماری زایی بالای *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به عوامل متعددی از جمله ساختار کونیدی های آن، ظرفیت آن برای رشد و سازگاری با شرایط نامطلوب محیط رشد، مکانیسم فرار از سیستم ایمنی و توانایی آن در آسیب زدن به میزبان بستگی دارد (۱۰). در بین قارچ های آلرژی زا گونه های آسپرژیلوس به علت وفور و آلرژنیسیته بالا اهمیت بیشتری در ایجاد آسم آلرژیک دارند (۱۲). به طوری که ازدیاد حساسیت به کپک ها در بیش از ۸۰٪ موارد آسم آلرژیک گزارش شده است (۱۳و ۱۴). تاکنون حدود ۳۰ آلرژن مختلف با وزن های مولکولی در محدوده عمدتاً ۱۱ الی ۹۰ کیلودالتون در آسپرژیلوس ها شناسایی شده است (۱۵). در این مطالعه میانکنش بین سه گونه رایج آسپرژیلوس با استفاده از سرم بیماران حساس به مخلوط آسپرژیلوس ها مقایسه گردید.

روش کار

۲-۱- تهیه لیزات قارچی و بررسی کیفی و کمی پروتئینی آن

۲-۱-۱- کشت میسلیوم آسپرژیلوس‌ها

حجم های مساوی از دو محیط Czapek Broth و محیط سنتتیک AOAC Broth مخلوط شد و به عنوان محیط کشت انتخابی آسپرژیلوس ها استفاده گردید. سوش های استاندارد *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به شماره ATCC204305 و آسپرژیلوس فلاووس به شماره CBS625/66 و آسپرژیلوس نایجر به شماره ATCC1105 در محیط کشت مایع تلقیح شد و فلاسک ها به مدت یک هفته در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس لایه قارچی تشکیل شده با سانتریفیوژ جدا گردید و پس از شستشو با بافر فسفات نمکی (Phosphat Buffered Saline-PBS)، توزین شد و برای تهیه لیزات سلولی مورد استفاده قرار گرفت (۹).

۲-۱-۲- لیز کردن میسلیوم‌ها

میسلیوم ها در بافر تریس ۵۰ میلی مولار pH=8 حاوی ۱۰ میلی مولار EDTA و ۱۰۰ میلی مولار NaCl و ۵ درصد وزنی SDS و ۱/۵ درصد حجمی Tween20 و ۱ درصد حجمی 2ME و مقدار کافی از مخلوط آنتی پروتئازها در هاون ساییده شدند. جهت تشدید شکسته شدن دیواره سلولی به سوسپانسیون سلولی ۱۰ درصد وزنی پرل شیشه ای (به قطر ۱۰۰-۵۰ میکرون) اضافه شد و محتویات به دفعات توسط ازت مایع منجمد گردید و محتوای منجمد شده با هاون سائیده شد تا دیواره میسلیوم ها شکسته شده و پروتئین های داخل سلولی و سطح سلولی آزاد شوند. این فرآیند فریز و دفریز و سائیدن ۱۰ بار تکرار شد تا از تخریب نسبی میسیلوم ها اطمینان حاصل شود. در نهایت خرد شدن کامل میسلیوم ها با میکروسکوپ نوری بررسی شد. عصاره به دست آمده به مدت ۴-۳ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه مخلوط گردید، سپس محتویات به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا شد و به منظور حذف نمک ها و ناخالصی ها به کیسه

دیالیز با منافذ ۴ کیلودالتون منتقل شد و در مقابل بافر فسفات پتاسیم (۱۰ میلی مولار) با pH=8 به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد روی شیکر مغناطیسی دیالیز گردید (۱۶ و ۱۷).

۲-۱-۳- سنجش غلظت پروتئینی و بررسی محتوای پروتئینی عصاره‌ها

میزان پروتئین عصاره دیالیز شده با روش برادفورد اندازه گیری شد و از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد پروتئین استفاده گردید. از الکتروفورز پروتئین ها روی ژل پلی اکریل آمید جهت تعیین وزن مولکولی ظاهری پروتئین های قارچی و بررسی الگوی الکتروفورز آن ها استفاده شد. در نهایت پروتئین های تفکیک شده با استفاده از کوماسی بلو رنگ آمیزی شدند و ژل رنگ آمیزی شده بین لایه های سلوفان قرار گرفت و اسکن شد (۱۸).

۲-۲- انتخاب افراد حساس و غیر حساس به آسپرژیلوس‌ها

با استفاده از عصاره تجاری مخلوط آسپرژیلوس‌ها (محصول شرکت Greer) از افراد آلرژیک مراجعه کننده به کلینیک آلرژی بیمارستان فیروزآبادی و کلینیک آلرژی خورشید آزمون پریک انجام شد. افراد بالغ با تاریخچه حساسیت به قارچ ها و برآمدگی بیش از ۳ میلی متر در آزمون پریک به عنوان افراد حساس به آسپرژیلوس و افراد بالغ فاقد هرگونه علائم آلرژی تنفسی و غذایی با آزمون پریک منفی در مقابل عصاره تجاری آسپرژیلوس ها به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. از کلیه داوطلبین شرکت کننده در این طرح فرم رضایت نامه کتبی اخذ گردید و مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی ایران مورد بررسی و تایید قرار گرفت (۱۷).

۲-۲-۱- بررسی ایمونوراکتیویته سرم بیماران

جهت بررسی ایمونوراکتیویته سرم با آسپرژیلوس‌ها از دو روش دیسک الایزا و الایزای طراحی شده با عصاره های تولید شده استفاده شد. به علاوه ایمونوراکتیویته بیماران با وسترن بلات مقایسه شد (۱۹).

۲-۲-۲- بررسی ایمونوراکتیویته با دیسک الایزا

جهت انجام دیسک الایزا از پلیت‌های از قبل مسدود شده استفاده گردید. بدین منظور ابتدا چاهک ها با آلبومین گاوی یک درصد به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق مسدود شدند سپس دیسک های تجاری گونه های آسپرژیلوس (شرکت Dr. Fooke) در چاهک های پلیت ۹۶ خانه چیده شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از سرم افراد حساس به هر چاهک اضافه شد و پلیت ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد روی شیکر صفحه ای قرار داده شد. چاهک ها ۴ مرتبه با بافر فسفات نمکی حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰ (Phosphate Buffered Saline Tween-20- PBST) شستشو داده شدند. بدین منظور بر روی دیسک ها ۲۵۰ میکرولیتر محلول شستشو اضافه شده و پس از ۲۰ ثانیه تکان دادن محتویات با پمپ خلأ تخلیه شد تا دیسک ها تا پایان کار در چاهک مربوطه باقی بمانند. پس از تخلیه کامل محلول شستشو بر روی دیسک ها ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی ضد IgE کونژوگه با HRP (شرکت پادتن علم) افزوده شد و پلیت ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بر روی شیکر قرار داده شدند. سپس دیسک ها ۵ مرتبه مانند مرحله قبل شستشو داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا- کروموژن (آب اکسیژنه-تترامتیل بنزیدین) به چاهک ها اضافه شد و پلیت ها ۱۵ دقیقه در شرایط تاریکی بر روی شیکر قرار داده شدند. جهت توقف واکنش به چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک یک مولار اضافه شد. سپس دیسک ها از داخل چاهک ها خارج شد و جذب نوری با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج‌های ۴۵۰ نانومتر در مقابل ۶۳۰ نانومتر خوانده شد (۱۹).

۲-۲-۳- بررسی ایمونوراکتیویته با الایزای غیرمستقیم

جهت بررسی ایمونوراکتیویته عصاره‌های تهیه شده با سرم بیماران از آزمون الایزای غیرمستقیم استفاده شد. ابتدا کف چاهک های ماکسی سورب (شرکت Nunc) با عصاره های تام پوشیده شدند.

بدین منظور عصاره ها با بافر بی کربنات سدیم ۰/۲ مولار pH=9.0 رقیق شدند تا محلول پروتئینی با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بدست آید. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر کدام به چاهک های الایزا اضافه شد و پلیت ها یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس چاهک ها سه بار با PBST شستشو داده شدند و به هر کدام ۲۵۰ میکرولیتر آلبومین گاوی دو درصد اضافه شد و پلیت ها ۲ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند تا نواحی خالی چاهک ها مسدود شوند. پس از دو بار شستشو ۵۰ میکرولیتر از سرم بیماران (افراد حساس) و کنترل منفی (افراد غیر حساس) به چاهک ها اضافه شد و پلیت ها مجدداً ۲ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند. سپس پلیت ها ۴ بار شستشو داده شد و ۵۰ میکرولیتر Anti IgE کونژوگه با بیوتین (شرکت Abcam) با رقت ۱:۱۰۰۰ به چاهک ها اضافه شد و پلیت ها یک ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند. سپس چاهک ها ۵ بار شسته شد و ۵۰ میکرولیتر استرپتوآویدین کونژوگه با HRP (شرکت Sigma-Aldrich) با رقت ۱:۱۰۰۰۰ به چاهک ها اضافه شد و پلیت ها ۴۵ دقیقه در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند. پس از ۶ بار شستشو ۵۰ میکرولیتر سوبسترا-کروموژن (آب اکسیژنه-تترامتیل بنزیدین) به چاهک ها اضافه شد و بعد از ۲۰ دقیقه نگهداری در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد مقدار ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک یک مولار به هر یک از چاهک اضافه شد و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر در مقابل فیلتر مرجع ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری شد (۱۷ و ۱۹).

۲-۲-۴- بررسی ایمونوراکتیویته با وسترن بلات

برای بررسی ایمونوراکتیویته سرم ها با باندهای پروتئینی از وسترن بلاتینگ استفاده شد. این روش در مقایسه با تست الایزا می تواند وزن ظاهری باندهای واکنشگر و شدت واکنش را نشان دهد. بدین منظور ابتدا پروتئین ها با استفاده از SDS-PAGE روی ژل ۱۲/۵ درصد تفکیک شدند و پروتئین ها با استفاده از روش نیمه خشک از داخل ژل بر روی غشاء PVDF منتقل شدند. غشاء در نهایت با پانسو اس رنگ آمیزی شد و استریپ یا نوارهای حاوی پروتئین بریده شد و هر نوار برای بررسی واکنش یک سرم مورد استفاده قرار گرفت. پس از رنگ بری، نواحی فاقد پروتئین، توسط آلبومین سرم گاوی مسدود شدند. بدین منظور ابتدا نوارها در قایقک های پلیت مخصوص قرار داده شد و به هر کدام یک میلی لیتر آلبومین دو درصد استفاده شد و پلیت های حاوی نوارها ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد بر روی راکر قرار داده شدند. سپس نوارها دو بار با PBST شستشو داده شد و بر روی آن ها یک میلی لیتر سرم رقیق شده (سرم ها به نسبت ۱:۳ با PBS رقیق شدند) اضافه شد و نوارها ۴ ساعت بر روی راکر در دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند. پس از ۳ بار شستشو (هر بار ۵ دقیقه) یک میلی لیتر Anti IgE کونژوگه با بیوتین (شرکت Abcam) با رقت ۱:۲۰۰۰ بر روی نوارها اضافه شد و پلیت ها یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بر روی راکر قرار گرفتند. پس از سه بار شستشو (مجموعاً به مدت ۱۵ دقیقه) نوارها با یک میلی لیتر استرپتوآویدین کونژوگه با HRP (شرکت Sigma-Aldrich) با رقت ۱:۱۰۰۰۰ مجاور شدند و پلیت ها ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بر روی راکر قرار گرفتند. پس از ۳ بار شستشو، استریپ ها بر روی یک صفحه پلاستیکی قرار داده شدند و در اتاق تاریک به مدت یک دقیقه با سوبسترای کمی لومینسانس (شرکت پارس توس) مجاور شدند. پس از مرتب کردن نوارها، از فیلم های حساس رادیوگرافی برای مشخص کردن نواحی واکنشگر استفاده شد. در نهایت فیلم های رادیوگرافی در محلول ظهور و ثبوت قرار گرفتند تا باندهای واکنشگر قابل مشاهده شوند (۱۹ و ۲۰).

بررسی آماری

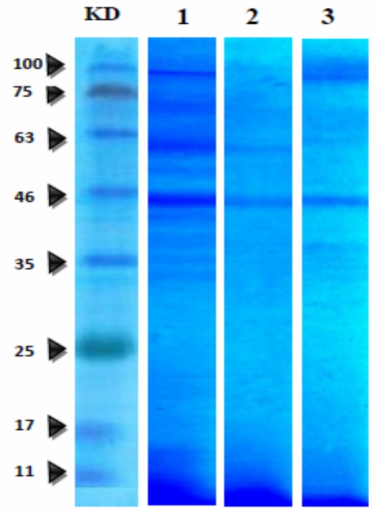
نتایج مطالعه حاضر با استفاده از نرم افزارآماری SPSS version18 مورد تجزیه و تحلیل‌قرار گرفت. بدین منظور جهت محاسبه همبستگی بین نتایج، از آزمون پیرسون و جهت تعیین نقطه Cut off از

آزمون ROC استفاده شد. همچنین رسم نمودار ها توسط نرم افزار Prism5 انجام شد.

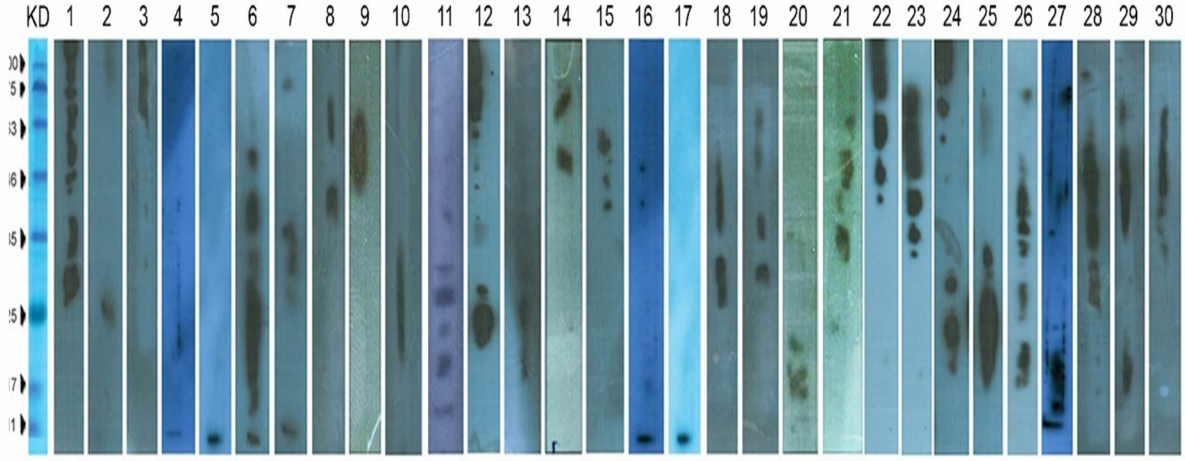
یافته‌ها

غلظت پروتئینی عصاره های خام با روش برادفورد سنجیده شد که به ترتیب در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ۱۲۵۴ میلی گرم در میلی لیتر، در *آسپرژیلوس فلاووس* ۲۵۰۰ میلی گرم در میلی لیتر و در *آسپرژیلوس نایجر* ۱۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر بود. جهت سهولت انجام آزمون های ایمونواسی غلظت همه عصاره ها روی ۵۰۰ میلی گرم در میلی لیتر تنظیم شد. الکتروفورز نشان داد که یک اسمیر ممتد و تعدادی باند پروتئینی در محدوده ۱۱ تا ۱۰۰ کیلودالتون همه عصاره ها وجود دارد و در هر سه گونه، در محدوده ۴۶ تا ۱۰۰ کیلودالتون پروتئین هایی با وزن های مشابه بیشتری مشاهده می شود (شکل ۱). همانطور که شکل ۲ نشان می دهد، آزمون وسترن بلات اختلافاتی را در رابطه با ایمونوراکتیویته آسپرژیلوس ها با سرم های مختلف نشان می دهد. با وجود این، همانطور که دیده می شود تشابهاتی نیز بین ایمونوراکتیویته هر یک از بیماران با لیزات هر سه گونه مورد مطالعه دیده می شود.

در روش الایزا نیز اختلاف چشمگیری در جذب نوری سرم های افراد حساس و غیر حساس مشاهده شد که نتایج هر یک از بیماران در جدول



شکل ۱- الکتروفورز عصاره خام پروتئینی گونه های آسپرژیلوس. *به ترتیب از چپ به راست*: استاندارد یا شاخص وزن مولکولی ۱۱ تا ۱۰۰ کیلودالتون، ۱- عصاره آسپرژیلوس فومیگاتوس ۲- عصاره آسپرژیلوس نایجر ۳- عصاره آسپرژیلوس فلاووس



شکل ۲- پروتئین های واکنشگر در سه گونه آسپرژیلوس در وسترن بلات؛ به ترتیب ۱ تا ۱۰ آسپرژیلوس نایجر، ۱۱ الی ۲۰ آسپرژیلوس فلاووس و ۲۱ الی ۳۰ آسپرژیلوس فومیگاتوس هستند.

جدول ۱- نتایج دیسک الایزا و الایزای غیرمستقیم با عصاره خام برای بیماران حساس به آسپرژیلوس ها همراه با نتایج آزمون پریک با عصاره مخلوطی از آسپرژیلوس ها (شرکت Greer)

	مخلوط تجاری آسپرژیلوس ها	*آسپرژیلوس نایجر*		*آسپرژیلوس فومیگاتوس*		*آسپرژیلوس فلاووس*	
سرم بیماران	نتیجه آزمون پریک (قطر برآمدگی به میلی متر)	دیسک الایزا	الایزا با عصاره خام	دیسک الایزا	الایزا با عصاره خام	دیسک الایزا	الایزا با عصاره خام
نمونه ۱	۵	۲/۳	۰/۴۶۷	۱/۹۲۳	۰/۳۰۵	۲/۲۳۲	۰/۳۲۷
نمونه ۲	۵	۱/۷۸۶	۰/۴۱۸	۱/۸۷۸	۰/۴۲۲	۲/۳۲۱	۰/۳۸۱
نمونه ۳	۴	۲/۴۲۱	۰/۳۴۲	۲/۱۴۵	۰/۳۰۵	۱/۹۸۵	۰/۴۳۳
نمونه ۴	۶	۱/۱۴۲	۰/۸۹۶	۱/۲۵۹	۰/۷۸۸	۲/۱۸۸	۰/۸۷۵
نمونه ۵	۶	۲/۳۹۹	۰/۶	۱/۵۶۱	۰/۹۹	۲/۹۸۸	۰/۴۷۵
نمونه ۶	۳	۳/۴۸۸	۰/۳۲۳	۲/۲۶۹	۰/۳۹۸	۲/۷۷	۰/۲۸۸
نمونه ۷	۸	۳/۳۱۲	۰/۸۶۱	۲/۸۵	۱	۲/۱۲۸	۰/۴۹۷
نمونه ۸	۴	۳/۴۰۶	۰/۳۸۷	۲/۲۷	۰/۳۵۸	۲/۸۳۳	۰/۴۲۸
نمونه ۹	۴	۳/۳۹۸	۰/۴۰۷	۳/۲۱۸	۰/۳۶۲	۲/۶۲۴	۰/۴۱۰
نمونه ۱۰	۴	۲/۸۷۶	۰/۴۸۲	۲/۸۹۴	۰/۴۰۷	۲/۹۶۶	۰/۴۰۵
نمونه ۱۱	۲	۲/۲۰۲	۰/۳۵۰	۲/۸۰۶	۰/۳۱۹	۲/۷۹۸	۰/۳۷۷
نمونه ۱۲	۵	۲/۲۹۶	۰/۸۲۵	۱/۶۸۸	۰/۷۴۳	۲/۵۱۷	۰/۴۴۶
نمونه ۱۳	۴	۲/۵۶۴	۰/۴۳۴	۱/۷۰۴	۰/۴۴۶	۲/۵۵۱	۰/۴۷۹
نمونه ۱۴	۴	۲/۵۴۲	۰/۳۷۸	۲/۴۷۴	۰/۳۵۳	۲/۸۷۲	۰/۳۱۱
نمونه ۱۵	۵	۲/۹۳۲	۰/۸۵۷	۱/۵۷۶	۰/۵۷۵	۲/۱۹	۰/۵۰۲
نمونه ۱۶	۳	۲/۸۳۷	۰/۴۶۲	۲/۱۶۸	۰/۳۸۲	۲/۵۴۱	۰/۴۳۸
نمونه ۱۷	۵	۲/۹۳۳	۰/۷۶۵	۲/۵۲۸	۰/۶۵۶	۲/۵۰۳	۰/۷۶۸
نمونه ۱۸	۶	۲/۹۸۹	۰/۸۶۵	۲/۰۸۲	۰/۵	۲/۸۵۲	۰/۶۶۵
نمونه ۱۹	۳	۳/۱۷۲	۰/۳۴۴	۲/۶۸۷	۰/۳۹۴	۲/۸۰۷	۰/۳۸۰
نمونه ۲۰	۳	۱/۳۱۳	۰/۳۷۴	۱/۵۵۸	۰/۳۴۳	۱/۹۵۱	۰/۳۲۸

۱ نشان داده شده است. نتایج دموگرافیک سنجش ایمونوراکتیویته سرم بیماران با عصاره خام آسپرژیلوس ها با استفاده از روش های دیسک الایزا و الایزای غیرمستقیم در جدول ۲ آورده شده است. بعلاوه همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود، آنالیز آماری نتایج الایزا با استفاده از آزمون همبستگی پیرسون، با فرض استقلال نتایج نمونه های مثبت در هر سه گونه آسپرژیلوس مورد مطالعه، همبستگی (Correlation) خاصی بین جذب نوری سرم بیماران با نتایج آزمون پریک (قطر برآمدگی حاصل از واکنش به میلی متر) آن‌ها نشان نداد.

نتایج نقطه ای تعیین Cut off و مقایسه روش‌های دیسک الایزا و الایزا با عصاره خام در هر سه گونه آسپرژیلوس در نمودار ۱ آورده شده است. تصویر سمت چپ نمودار ۱ نتایج دیسک الایزا را برای هر سه قارچ مطالعه شده در کنار کنترل ها نشان می دهد. همان طور که خط تمایز نشان می‌دهد در این روش جذب نوری بالاتر از ۰/۶ مثبت و کمتر از ۰/۶ منفی محسوب می شود. نمودار سمت راست نتایج الایزا با عصاره تام را برای هر سه قارچ مورد مطالعه در کنار کنترل منفی ها نشان می دهد. همان طور که خط تمایز نشان می‌دهد جذب نوری بالاتر از ۰/۲ مثبت و کمتر از ۰/۲ منفی محسوب می شوند. البته در آسپرژیلوس فلاووس یک مورد جذب نوری ۰/۴ در مورد کنترل منفی مشاهده شد که به نظر می رسد مثبت کاذب باشد.

نمودار ۲ میزان حساسیت و اختصاصیت نتایج حاصل از الایزا با عصاره تام سوش های مورد مطالعه و محدوده زیر منحنی ROC آنها را نشان می دهد. در مورد *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *نایجر* قرابت صد درصد بین نتایج الایزای غیر مستقیم با دیسک الایزا دیده شد. در مورد *آسپرژیلوس*

جدول ۲- اطلاعات مربوط به جذب نوری سرم بیماران با روش دیسک الایزا و الایزای غیرمستقیم با عصاره خام آسپرژیلوس ها

	آسپرژیلوس نایجر		آسپرژیلوس فومیگاتوس		آسپرژیلوس فلاووس	
	دیسک الایزا	الایزا با عصاره خام	دیسک الایزا	الایزا با عصاره خام	دیسک الایزا	الایزا با عصاره خام
کمترین جذب نوری	۱/۱۴۲	۰/۳۲۳	۱/۲۵۹	۰/۳۰۵	۱/۹۵۱	۰/۲۸۸
بیشترین جذب نوری	۳/۴۸۸	۰/۸۹۶	۳/۲۱۸	۱	۲/۹۸۸	۰/۸۷۵
میانه	۲/۵۵۳	۰/۴۴۸	۲/۱۵۶	۰/۴۰۲	۲/۵۴۶	۰/۴۳۰۵
میانگین	۲/۵۷۰	۰/۵۴۱	۲/۱۷۶	۰/۵۰۲	۲/۵۳۰	۰/۴۶۰
انحراف معیار	۰/۶۶۷	۰/۲۱۳	۰/۵۳۹	۰/۲۱۸	۰/۳۳۱	۰/۱۴۹
خطای معیار	۰/۱۴۹	۰/۰۴۷	۰/۱۲۰	۰/۰۴۸	۰/۰۷۴	۰/۰۳۳

جدول ۳- میزان همبستگی بین نتایج الایزا با نتایج آزمون پریک

آزمون پیرسون	آسپرژیلوس نایجر	آسپرژیلوس فومیگاتوس	آسپرژیلوس فلاووس
ضریب همبستگی r	-۰/۰۳۹۱	-۰/۲۱۶	-۰/۲۴۰
R2	۰/۰۰۱	۰/۰۴۶	۰/۰۵۷
P value	۰/۸۶۹	۰/۳۶۰	۰/۳۰۷
تفاوت آماری	غیر محسوس	غیر محسوس	غیر محسوس

جدول ۴- مقایسه عملکرد دیسک الایزا و الایزای غیرمستقیم با عصاره توتال

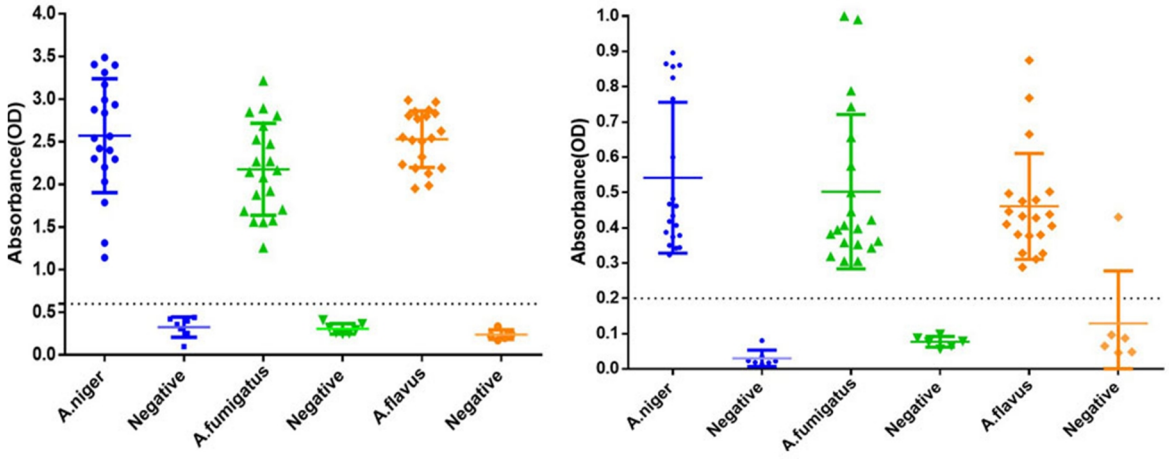
روش آزمایش	گونه‌های آسپرژیلوس	حساسیت آزمایش	ویژگی آزمایش	تعداد مثبت کاذب	تعداد منفی کاذب
دیسک الایزا	نایجر	٪۱۰۰	٪۱۰۰	-	-
	فومیگاتوس	٪۱۰۰	٪۱۰۰	-	-
	فلاووس	٪۱۰۰	٪۱۰۰	-	-
الایزا با عصاره خام	نایجر	٪۱۰۰	٪۱۰۰	-	-
	فومیگاتوس	٪۱۰۰	٪۱۰۰	-	-
	فلاووس	٪۸۳/۳۳	٪۱۰۰	۱	-

فلاووس ۹۲ درصد داده های حاصل از الایزا در محدوده زیر منحنی قرار داشتند که نشان دهنده قرابت قابل قبول این دو روش ایمونو اسی بود.

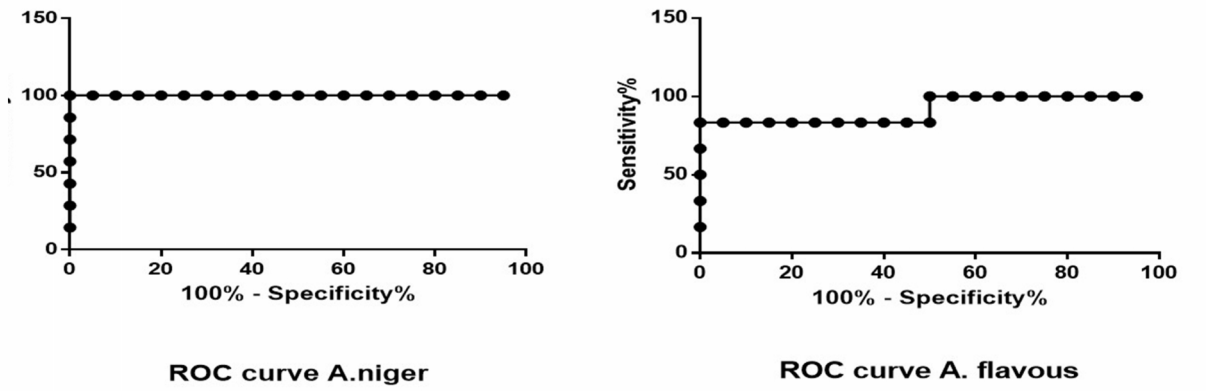
جدول ۴ نشان می دهد که روش دیسک الایزا و الایزا با عصاره خام عملکرد نزدیکی دارند ولی در یک مورد در روش الایزا با عصاره تام آسپرژیلوس فلاووس مثبت کاذب مشاهده شد. در وسترن بلات نیز در هر سه گونه آسپرژیلوس، پروتئین های واکنش گری با وزن مولکولی متفاوت در محدوده ۱۱ الی ۱۰۰ کیلودالتون مشاهده شدند. برای انجام وسترن بلات از نمونه سرم تعدادی از افراد حساس یعنی بیماران شماره ۱ تا ۱۰ مطرح شده در جدول الایزا (جدول ۱) استفاده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

در ارتباط با کشت سوش ها با توجه به اینکه رشد گونه های آسپرژیلوس در چاپکس براث به تنهایی به کندی انجام می شود، بنابراین با افزودن اسید آمینه ها و یون های ضروری رشد، شرایط تکثیر قارچ بهینه و محیط برای رشد سریع تر آنها مهیا شد. به علاوه شرایط رشد قارچ ها مانند میزان محیط کشت، دما و زمان رشد نیز برای به دست آوردن عصاره پروتئینی پایدار و مناسب باید مد نظر باشد. در دیواره سلولی قارچ های رشته ای نسبت به مخمرها درصد کیتین بیشتری وجود دارد که در استحکام دیواره نقش مؤثری دارد. بنابراین شکستن دیواره قارچ های رشته ای مانند آسپرژیلوس ها مشکل تر است (۲۱ و ۲۲). در این مطالعه برای بهتر لیز کردن سلول های قارچی از مخلوطی از مکانیسم های فیزیکی و شیمیایی استفاده شد. در مراحل اولیه کار با استفاده از دفعات محدود فریز کردن و سائیدن میسلیوم (۳ الی ۴ مرتبه) و حتی با افزودن ازت مایع و پرل شیشه ای نتیجه دلخواهی به دست نیامد و غلظت پروتئینی عصاره پایین بود. بنابراین برای رفع مشکل از بافر لیز کننده، حاوی دترجنت های یونی



نمودار ۱- نمودار نقطه ای تعین cut off برای بررسی ایمونوراکتیویته سرم بیماران برای گونه های مختلف آسپرژیلوس با روش دیسک الایزا (سمت چپ تصویر) و الایزای غیر مستقیم با استفاده از عصاره خام قارچ ها (سمت راست تصویر).



نمودار ۲- بررسی میزان حساسیت و اختصاصیت آسپرژیلوس نایجر (سمت چپ) و آسپرژیلوس فلاووس (سمت راست) با منحنی ROC. در مورد آسپرژیلوس نایجر صد درصد داده های حاصل از الایزا با عصاره توتال در محدوده زیر منحنی قرار گرفته و نشان دهنده قرابت عملکرد الایزای غیر مستقیم با عصاره تام و دیسک الایزا است. در مورد آسپرژیلوس فلاووس نیز حدود ۹۲ درصد داده های حاصل از الایزا با عصاره تام در محدوده زیر منحنی قرار گرفته و بازهم نشان دهنده قرابت نتایج الایزای غیرمستقیم با عصاره تام و دیسک الایزا است.

و غیر یونی استفاده شد. بافر لیز کننده حاوی مواد مختلفی نظیر تریس به عنوان عاملی با ظرفیت بافری بالا و مقادیر جزئی از EDTA به عنوان عامل شلاته کننده یون های دو ظرفیتی و مهار کننده عمومی پروتئازها، ۲-مرکاپتواتانول به عنوان عامل احیاء کننده و شکننده پیوندهای دی سولفیدی، کلرور سدیم به عنوان عامل ایجاد قدرت یونی و جلوگیری کننده از تغییر ساختار پروتئین‌ها، دترجنت هایی نظیر سدیم دودسیل سولفات و توئین ۲۰ جهت کاهش میانکنش بین مولکول ها و تسهیل آزادسازی پروتئین ها از سلول‌ها در کنار مخلوطی از آنتی پروتئازها بود. به علاوه تعداد دفعات فریز و دفریز کردن و سائیدن اسپورهای قارچی با ازت مایع تا ۱۰ مرتبه و زمان مخلوط شدن شدید عصاره سلول های لیز شده تا ۳ ساعت افزایش داده شد تا باندهای واضحی در الکتروفورز عصاره پروتئینی مشاهده شود. قارچ ها می توانند فعالیت پروتئازی قوی از خود نشان دهند و این فعالیت با افزایش مدت زمان کشت افزایش می یابد، بنابراین در روند تهیه عصاره خام از مهارکننده های اختصاصی پروتئازها مانند Pepstatin وPMSF و مهارکننده های غیر

اختصاصی مانند EDTA در روند تهیه عصاره خام استفاده شد تا از تخریب پروتئین های آزاد شده جلوگیری گردد. الکتروفورز عصاره خام نهایی بر روی ژل پلی آکریلامید الگوی الکتروفورز قابل مقایسه با مطالعات پیشین را نشان داد (۲۱ و ۲۲). آنتی بادی مورد بررسی در این مطالعه IgEهای اختصاصی ضد قارچ ها بود. با توجه به اینکه این کلاس آنتی بادی کمترین مقدار ایمونوگلوبولین‌های سرم را تشکیل می دهد، شناسایی آن بسیار مشکل تر از سایر آنتی بادی‌هاست. لذا از تکنیک های الایزا و وسترن بلات با ویژگی و حساسیت بالا استفاده گردید. با توجه به اینکه پاسخ آلرژیک به قارچ ها معمولاً ضعیف تر از پاسخ ایمنی به گرده گیاهان می باشد لذا، جهت شناسایی بهتر پاسخ های ایمونولوژیک از سیستم استرپتاویدین و بیوتین استفاده شد. همچنین جهت تشدید پاسخ ها زمان انکوباسیون سرم ها یا بلات ها و جهت جلوگیری از واکنش های غیر اختصاصی زمان بلاک کردن بلات ها نیز به یک شب افزایش داده شد. با انجام تغییرات فوق پاسخ های بهتری حاصل گردید. در روش دیسک الایزا و الایزا با عصاره خام تفاوت فاحشی در جذب نوری سرم ها مشاهده شد که به علت غلظت پروتئینی بالاتر دیسک ها و همچنین شست و شوهای ضعیف‌تر در دیسک الایزا به علت وجود دیسک ها در چاهک‌ها بود ولی نتایج هر دو روش با هم تطابق داشت و نشان دهنده قرابت عملکرد هر دو روش بود.

در این مطالعه نیز مانند مطالعات دیگر، پروتئین‌های ایمونوژنیک متفاوتی در وسترن بلات مشاهده شد که عمدتاً در محدوده وزنی ۱۱ تا ۸۵ کیلودالتونی قرار داشتند. در یکی از مطالعات مشابه که به بررسی واکنش آلرژن‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* با سرم افراد حساس پرداخته بود نیز ۱۱ پروتئین متصل شونده به IgE در محدوده وزنی ۱۳/۳ الی ۹۸/۶ کیلودالتون مشاهده شد. در مطالعه حاضر در عصاره *آسپرژیلوس نایجر* نیز ۵ پروتئین متصل شونده به IgE در محدوده وزنی ۳۴ تا ۸۱ کیلودالتون شناسایی شد، در حالی که در مطالعه دیگر در عصاره *آسپرژیلوس فلاووس* ۷ پروتئین متصل شونده به IgE در محدوده وزنی ۲۸ تا ۶۵ کیلودالتون مشاهده شد و در تحقیقی که توسط لی و شارما انجام شد در عصاره *آسپرژیلوس نایجر* فقط پروتئین ۳۴، ۱۸ و ۷۰ کیلودالتونی گزارش شد. اغلب محققین آلکالاین و واکوئلار سرین پروتئاز ۳۴ کیلودالتونی را آلرژن اصلی عصاره آسپرژیلوس فلاووس گزارش کرده اند. برخی نیز سرین پروتئاز ۳۴ کیلودالتونی را آلرژن اصلی *آسپرژیلوس نایجر* معرفی کرده اند. بنابراین پروتئین های آلرژنیک شناسایی شده در عصاره خام آسپرژیلوس در مطالعات مختلف متفاوت بوده و این تفاوت شاید به علت زمینه ژنتیکی متفاوت جمعیت بیماران مورد مطالعه، تفاوت سطح مواجه محیطی بیماران و یا تفاوت قدرت آلرژی زایی عصاره های مورد استفاده و کیفیت و نحوه عصاره گیری آن ها باشد (۲۳). از طرفی ممکن است آنتی بادی های ضد کربوهیدرات ها در تفاوت نتایج نقش داشته باشد (۲۲). هر چند سعی شد عصاره تهیه شده استاندارد شود لیکن با توجه به عدم دریافت گواهی های اعتبارسنجی، از نظر اخلاقی امکان بررسی توانمندی این عصاره ها در آزمون پریک بر روی بدن بیماران وجود نداشت که از محدودیت های کار محسوب می شود.

به طور کلی الکتروفورز عصاره گونه‌های مورد مطالعه حضور باندهای پروتئینی متعدد در محدوده وسیعی از وزن مولکولی را نشان داد که باندهای پروتئینی واضح‌تر در محدوده پروتئین های با وزن متوسط و عمدتاً ۴۰ کیلودالتون به بالا مشاهده می شد. هر چند در مورد هر سه قارچ مطالعه شده آزمون الایزای غیرمستقیم اختلاف زیادی در واکنش IgE اختصاصی سرم بیماران آلرژیک و گروه کنترل منفی نشان داد، اما نتایج الایزای بیماران برای گونه های مطالعه شده شبیه هم بود. این موضوع نشان می دهد که آلرژن های قارچی با هم تشابهاتی دارند که این تشابهات می توانند در بروز واکنش های ایمنی متقاطع اهمیت داشته باشند.

تقدیر و تشکر

این طرح پژوهشی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران (طرح شماره ۲۳۴۰۶) در بخش ایمونوشیمی گروه و مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشکده پزشکی انجام گردیده است. بدین وسیله از همکاری های بی دریغ خانم معصومه نجفی کارشناس مسئول آزمایشگاه ایمونوشیمی که در راه اندازی آزمایش‌ها ما را همراهی کردند، صمیمانه تشکر می‌نماییم.

منابع

1. Rogers CA. Indoor fungal exposure. Immunol Allergy Clin North Am, 2003; 23(3):501-18.

2. Horner W, Helbling A, Salvaggio J, Lehrer S. Fungal allergens. Clin Microbiol Rev, 1995;8(2):161-79.

3. Osborne M, Reponen T, Adhikari A, Cho SH, Grinshpun SA, Levin L, et al. Specific fungal exposures, allergic sensitization, and rhinitis in infants. Pediatr Allergy Immunol, 2006; 17(6):450-7.

4. Wüthrich B. Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase. Int Arch Allergy Immunol, 1989; 90(Suppl 1):3-10.

5. Miller WT. Aspergillosis: a disease with many faces. Semin Roentgenol, 1996; 31(1):52-66.

6. Singh A, Kumar P. Common environmental allergens causing respiratory allergy in India. Indian J Pediatr, 2002; 69(3):245-50.

7. Yu CJ, Chiou SH, Lai WY, Chiang BL, Chow LP. Characterization of a novel allergen, a major IgE-binding protein from Aspergillus flavus, as an alkaline serine protease. Biochem Biophys Res Commun, 1999; 261(3):669-75.

8. Tabatabaee A, Farhadi M, Shamshiri AR, Nourbakhsh S, Mohammadi SH, Falak R; Fungal infection in patients with nasal polyposis in two groups with high and normal serum IgE referred to Rasoul-e-Akram hospital for ENT surgery. J Iran University Med Sciences, May 2006; 13(50):99-105..

9. Hedayati M, Pasqualotto A, Warn P, Bowyer P, Denning D. Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology, 2007; 153(6):1677-92.

10. Abad A, Fernández-Molina JV, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, et al. What makes Aspergillus fumigatus a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. Rev Iberoam Micol, 2010; 27(4):155-82.

11. Pasqualotto AC. Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus. Med Mycol, 2009; 47(Sup1):S261-70.

12. Agarwal R, Gupta D. Severe asthma and fungi: current evidence. Med Mycol, 2011; 49(Sup1):S150-7.

13. Simon-Nobbe B, Denk U, Pöll V, Rid R, Breitenbach M. The spectrum of fungal allergy. Int Arch Allergy Immunol, 2008; 145(1):58-86.

14. Zanjani LS, Bakhtiari A, Sabokbar A, Khosravi AR, Bahonar A, Memarnejadian A. Sensibilisation of asthmatic patients to extracted antigens from strains of Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus and Aspergillus niger. J Mycol Med, 2012; 22(1):58-63.

15. Fukutomi Y, Taniguchi M. Sensitization to fungal allergens: Resolved and unresolved issues. Allergol Int, 2015; 64(4):321-31.

16. Falak R, Sankian M, Noorbakhsh R, Tehrani M, Assarehzadeghan MA, Jabbari Azad F, Abolhasani A, Varasteh AR; Identification and characterization of main allergic proteins in Vitis vinifera vitis. Food Agric Immunol, 2013; 24(3): 255-268.

17. Falak R, Sankian M, Tehrani M, Jabbari Azad F, Abolhasani A, Varasteh AR; Clinical and laboratory investigation of oral allergy syndrome to grape. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2012; 11(2): 147-155.

18. Soukhtanloo M, Falak R, Sankian M, Varasteh AR. Generation and characterization of Anti-Chitinase Monoclonal Antibodies. Hybridoma (Larchmt), 2011; 30(2): 145-151

19. Mohammadi M., Falak R., Mokhtarian M., Khoramizadeh M.R., Sadroddiny E., Kardar G.A.; Identification and characterization of main allergic proteins in cooked wolf herring fish; Iran J Allergy Asthma Immunol, 2016; 15(5):363-371.

20. Falak R, Varasteh AR, Ketabdar H, Sankian M; Expression of grape class IV chitinase in Spodoptera frugiperda (Sf9) insect cells. Allergol Immunopath (Madr), 2014; 42(4):293-301.

21. Klimek-Ochab M, Brzezińska-Rodak M, Żymańczyk-Duda E, Lejczak B, Kafarski P. Comparative study of fungal cell disruption scope and limitations of the methods. Folia Microbiol (Praha), 2011; 56(5):469-75.

22. Falak R, Sankian M, Ketabdar H, Moghadam M, Varasteh AR; The role of anti-CCD antibodies in grape allergy diagnosis. Rep Biochem Mol Biol, 2013; 1(2).

23. Vermani M, Vijayan VK, Agarwal MK. Identification of Aspergillus (A flavus and A niger) Allergens and Heterogeneity of Allergic Patients' IgE Response to them. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2015; 14(4):361-9

Comparison of IgE-reactivity of Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavous and Aspergillus niger with type 1 hypersensitive patients' sera

Mehraban Falahati, PhD, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Mojhgan Ebrahimi, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Alireza Salek Moghadam, MD, PhD, Khorshid Allergy Clinic and Immunology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Maryam Roudbary, PhD, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Somayeh Ghanbari, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Kobra Mokhtarian, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Majid Khosh Mirsafa, Immunology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
***Reza Falak,** PhD, Immunology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, (*Corresponding author). Falak.r@iums.ac.ir

Abstract

Background: Aspergillus species have crucial role in respiratory allergy. This study was aimed to evaluate the pattern of IgE-mediated immune response to common aspergillus species including Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavous, Aspergillus niger in type I aspergillus-hypersensitive patients' sera.

Methods: In this experimental study, the prepared protein extract of Aspergillus species were dialyzed and the protein concentrations were measured by Bradford method. The protein patterns were checked by SDS-PAGE. The allergic patients and controls were selected based on their clinical history and skin prick test results. The cross-reactivity of allergens were determined by ELISA and Western-blotting using allergic patients' and controls' sera.

Results: SDS-PAGE showed that the molecular weight of most of aspergillus proteins are between 11-100 kDa with typical bands between 46-100 kDa. ELISA showed that there is a significant difference between the serum-immunoreactivity of patients and negative controls for each of studied species. However, we did not find significant difference between the immunoreactivity of the patients with the studied fungal species. Western-blotting also detected various typical IgE-reactive proteins for each of aspergillus species.

Conclusion: The IgE-reactive pattern of aspergillus species showed a slight difference. The variation of the immunoreactivity of the aspergillus species could be due to the genetic variations, difference in the environmental predisposition with saprophyte molds or non-equal allergenic potency of the extracts.

Keywords: Type 1 hyper-sensitivity, Aspergillus species, Western blotting, ELISA