مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره سوم (پیاپی ۲۰) پاییز ۱۳۹۳
صفحات ۲۳۲-۲۲۵

Original Article

مقایسه فراوانی الگوی باندهای آلرژی زا در قارچ های *آلترناریا آلترناتا*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *پنیسیلیوم سیترینوم* در مواجهه با سرم بیماران آسمی به روش ایمونوبلاتینگ

آذر سبکبار*[۱]، امیر بختیاری[۲]، مژگان سقازاده[۳]

[۱] دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، [۲] کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد، کرج، البرز، [۳] استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم.

چکیده

سابقه و هدف: در پژوهش های مختلف نشان داده شده است که قارچ ها می توانند در افراد مستعد منجر به شکل گیری آسم آلرژیک شوند. از مهمترین قارچ های آلرژی زای شایع، می توان به *آلترناریا*، *آسپرژیلوس ها* و *پنیسیلینیوم ها* اشاره نمود. این مطالعه با هدف شناسایی و بررسی الگوی فراوانی باندهای آلرژی زا در قارچ های *آلترناریا آلترناتا*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *پنیسیلیوم سیترینوم* و همچنین مقایسه بین آنها انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۴۸ بیمار مبتلا به آسم و ۲۲ فرد سالم به عنوان کنترل انجام شد. در ابتدا قارچ ها کشت داده شده و عصاره سلولی آنها به روش انجماد و ذوب به دست آمد. اجزای پروتئینی با روش SDS-PAGE جداسازی شده و پس از انتقال به کاغذ نیتروسلولز، ایمونوبلاتینگ بر علیه سرم بیماران آسمی و گروه کنترل انجام شد.

یافته ها: پس از انجام ایمونوبلاتینگ برای *آلترناریا آلترناتا* ۶ باند آلرژی زای ۴۹ تا ۱۱۵ کیلودالتونی، برای *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ۴ باند آلرژی زای ۵۷ تا ۱۱۲ کیلودالتونی و برای *پنیسیلیوم سیترینوم* نیز ۵ باند ۳۷ تا ۱۲۷ کیلودالتونی شناسایی گردید.

نتیجه گیری: در بین قارچ های مورد بررسی، *آلترناریا آلترناتا* بیشترین باندهای آلرژی زا را داشت. به نظر می رسد باندهای دارای وزن مولکولی بالاتر، توانایی بیشتری را در تحریک اختصاصی IgE داشته باشند.

واژگان کلیدی: آسم، *آلترناریا آلترناتا*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *پنیسیلیوم سیترینوم*، ایمونوبلاتینگ-IgE

دریافت مقاله: اسفند ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۳

مقدمه

آسم یک بیماری التهابی می باشد که تحت تاثیر عوامل محیطی و ژنتیکی قرار دارد. در حال حاضر بیش از ۳۰۰ میلیون نفر از مردم دنیا به این بیماری مبتلا هستند. علل بروز آسم متنوع و مختلف می باشد. آسم بیماری پیچیده و چند عاملی است که عوامل آلرژیک و غیر آلرژیک در شکل گیری آن دخالت دارند (۳-۱). آلرژی، یکی از مهمترین دلایل شکل گیری آسم می باشد که منجر به آسم آلرژیک می گردد. یکی از عوامل محیطی که می تواند موجب آلرژی و به دنبال آن بروز آسم گردد، قارچ ها هستند. مطالعات زیادی نقش قارچ ها را در ایجاد بیماری های آلرژیک مورد بررسی قرار داده و به شناسایی اجزای آلرژی زای آنها پرداخته اند (۶-۴).

فراوانی آلرژی به قارچ ها از ۶ تا ۲۶ درصد در جمعیت عمومی، ۴۴ درصد در بین بیماران آتوپیک و ۸۰ درصد در بیماران آسمی گزارش شده است.

*) آدرس برای مکاتبه: کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۲۵۱۷۹۴۱۷ پست الکترونیک: a.sabokbar@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مهمترین قارچ های آلرژی زای شایع در خانواده آسکومیست ها قرار دارند. از این میان می توان به *آلترناریا آلترناتا* (*Alternaria alternate*)، *آسپرژیلوس* (*Aspergillus*)، *کلادوسپوریوم* (*Cladosporium*)، *پنیسیلینیوم* (*Penicillium*) و *ترایکو فایتون* (*Trichophyton*) اشاره نمود (۹-۷).

گونه های مختلف *پنیسیلیوم* به عنوان یکی از قارچ های آلرژی زا شناخته شده و از عوامل مهم در ایجاد بیماری آسم می باشند. در این میان، *پنیسیلیوم سیترینوم* بیشترین اجزای آلرژی زا را به خود اختصاص داده است. از مهمترین آلرژن های *پنیسیلیوم* می توان به Pec c24، Pec c19، Pec c2، Pec c18 و Pec c22 اشاره نمود (۱).

آسپرژیلوس فومیگاتوس در بین گونه های *آسپرژیلوس* از توانایی آلرژی زایی بیشتری برخوردار است. مهمترین عامل آلرژی زای *آسپرژیلوس فومیگاتوس* پروتئینی به نام Asp f1 می باشد. همچنین Asp f3 آلرژن مهم دیگر این قارچ می باشد که به IgE اختصاصی سرمی در ۹۴ درصد از بیماران حساس شده متصل می گردد. علاوه بر آن بیش از ۲۰ آلرژن دیگر برای این قارچ گزارش شده است (۱۰).

آلترناریا آلترناتا به عنوان یکی از مهمترین قارچ های آلرژی زا شناخته شده است. مطالعات همه گیر شناسی نشان داده که در نقاط مختلف جهان حساسیت به این قارچ ارتباط نزدیکی با پیشرفت بیماری آسم دارد (۱۱). تا کنون برای *آلترناریا آلترناتا* بیش از ۱۲ آلرژن شناسایی شده است. Alt a1 و Alt a2 به ترتیب از مهمترین آلرژن های این قارچ می باشند و تا کنون بیش از ۱۰ آلرژن دیگر از این قارچ مورد شناسایی و بررسی قرار گرفته است (۱ و ۱۲). با توجه به اهمیت این قارچ ها در توسعه بیماری های آلرژیک و آسم شناسایی الگوی آلرژن های قارچی می تواند در تشخیص بالینی بیماری های آلرژیک مورد استفاده قرار گرفته و مفید واقع شود. هدف از این مطالعه شناسایی و بررسی الگوی فراوانی باندهای آلرژی زا در قارچ های *آلترناریا آلترناتا*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *پنیسیلیوم سیترینوم* در مواجهه با سرم بیماران آسمی به روش ایمونوبلاتینگ بود.

مواد و روش ها

الف) کشت جدایه های قارچی: در این مطالعه قارچ های *آلترناریا آلترناتا*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *پنیسیلیوم سیترینوم* جدا شده از هوای بیرونی، از مرکز تحقیقات قارچ شناسی دانشگاه تهران تهیه گردیدند. در ابتدا قارچ های یاد شده در محیط سابورو گلوکز آگار (مرک، آلمان) به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ °C کشت داده شدند. سپس در محیط سابورو گلوکز مایع حاوی کلرامفنیکل به مدت ۱۲-۱۰ روز در دمای ۲۵ °C در انکوباتور شیکردار با دور ۱۰۰ g قرار گرفتند. کلنی های قارچی به همراه اسپورهایشان با استفاده از فیلتر کاغذی واتمن جداسازی شدند. پس از ۳ مرحله شستشو با PBS استریل، تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سیلیسیوس نگهداری گردیدند.

ب) تهیه عصاره خام سلولی: تودهٔ قارچ ها با استفاده از نیتروژن مایع و ساییدن توسط هاون چینی خرد شدند. به منظور شکستن سلول های هر یک از جدایه ها، از روش سایش مکانیکی به وسیله گلوله های شیشه ای استفاده گردید. همچنین از آنتی پروتئاز فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) نیز استفاده شد. برای انجام این مرحله ابتدا بافر شکننده بدین ترتیب تهیه شد (تریس۶۲/۵ میلی مولار، دی تیوتریتول ۱ میلی مولار، فنیل متیل سولفونیل فلوراید ۰/۲ میلی گرم در هر میلی لیتر، گلیسرول ۱۵٪ با pH ۶/۸). سپس جدایه های قارچی با بافر شکننده و پرل های شیشه ای (به قطر ۱ میلی متر) به ترتیب به نسبت ۲: ۱: ۲ مخلوط شدند. نمونه ها در ۳ مرحله ۱۵ دقیقه ای با فواصل ۵ دقیقه استراحت به منظور جلوگیری از گرم شدن، در مجاورت یخ خرد شدند. زمانی که بیش از ۸۰ درصد میسلیوم ها شکسته شد این مرحله خاتمه یافت (شکسته شدن میسلیوم ها با میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت).

در ادامه به منظور جدا ساختن پس مانده های سلولی و سلول های شکسته نشده، سوسپانسیون تهیه شده به لوله های مخصوص سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ g سانتریفیوژ گردیدند. سپس روماند به آرامی برداشته شد و مجدداً در همین دور و در همین مدت زمان سانتریفیوژ

Archive of SID

www.SID.ir

صورت گرفت. در نهایت عصاره خام به دست آمده پس از اندازه گیری مقدار پروتئین با روش برادفورد، در لوله های کوچک (میکروتیوب) تقسیم و تا مراحل بعدی کار در دمای ۲۰- درجه سیلیسیوس نگهداری شدند (۱۳).

ج) *انتخاب گروه بیماران و گروه کنترل:* بیماران ابتدا توسط پزشک متخصص ریه مورد معاینه قرار گرفتند (بیمارستان امام خمینی، بخش بیماران ریوی). از بین این افراد، بیماران مبتلا به آسم انتخاب گردیدند. تشخیص بیماری آسم بر اساس علایم بالینی، تاریخچهٔ بیماری، آزمون های تنفسی، نتایج آزمایشگاهی، سابقهٔ شخصی یا خانوادگی و ... توسط پزشک متخصص انجام گرفت. ضمن خون گیری پرسشنامه ای حاوی اطلاعاتی در زمینهٔ سن ، جنس، شغل، نوع بیماری آلرژیک، زمان شروع علایم بیماری، وجود یا عدم وجود سابقهٔ خانوادگی تکمیل گردید. برای گروه کنترل ۲۲ سرم از افراد سالم بدون علایم بیماری زیر نظر پزشک جمع آوری گردید. نمونه های سرم به دست آمده تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سیلیسیوس نگهداری شدند.

د) *بررسی محتوای پروتئینی عصاره به روش SDS-PAGE*

اجزای پروتئینی عصاره قارچی با استفاده از سدیم دودسیل سولفات ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز در یک سیستم بافری غیر پیوسته جداسازی گردید. ابتدا ژل جدا کننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده ٤ درصد با استفاده از محلول پایه آکریل آمید-بیس آکریل آمید ۳۰ درصد، بافر جداکننده (تریس ۱/۵ مولار، ۰/٤ SDS درصد، ۸/۸ pH)، بافر متراکم کننده (تریس ۰/۵ مولار، ۰/٤ SDS درصد، ٦/۸ pH)، آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد وزنی-حجمی و TEMED تهیه شد.

سپس ۳۰ میکرولیتر از عصاره قارچی (حاوی ۲۰۰ میکروگرم پروتئین) به مدت ۵ دقیقه با بافر نمونه حاوی ۲ مرکاپتو اتانول جوشانده شد. سپس نمونه ها و مارکر مولکولی (Pageruler unstained protein ladder, Fermentase Lithuania) بر روی ژل بارگذاری گردید (سیستم الکتروفورز mini tetra cell شرکت Biorad). پس از انجام الکتروفورز رنگ آمیزی ژل با استفاده از محلول رنگ کوماسی برلیانت بلو انجام شد و با استفاده از مارکر مولکولی به عنوان استاندارد اندازه باندهای پروتئینی برای هر قارچ مشخص گردید.

ه) *ایمونوبلاتینگ:* باندهای پروتئینی به دست آمده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید با استفاده از سیستم انتقال الکتریکی (mini trans blot Biorad) به کاغذ نیتروسلولز منتقل گردید. در این مرحله از بافر انتقال (تریس ۲۵ میلی مولار، گلیسین ۱۹۲ میلی مولار، ۰/۰۳ SDS درصد، متانول ۲۰ درصد و ۸/۳ pH) استفاده شد. انتقال با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۱ ساعت اتجام گرفت.

برش های کاغذی حاوی باندهای پروتئینی قارچ ها جهت انجام مرحله ایمونوبلاتینگ IgE اختصاصی بر علیه آنتی ژن های قارچی در مرحله اول به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق با بافر پوشاننده (PBS-Tween 20، NaCl 137 mM، KCl 2.7mM، Na2HPO4 10mM، KH2PO4 1.4mM و Tween 20 0.05%) حاوی BSA ۱/۵ درصد (شرکت سیگما) بر روی شیکر قرار داده شد. سپس با بافر شستشو (PBS-Tween 20) ۳ مرتبه، هر بار به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق شستشو داده شدند. در مرحله بعد کاغذ نیتروسلولز با مخلوط سرمی (Pooled Serum) بیماران و گروه سالم به طور جداگانه به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق گرماگذاری شد.

نمونه های سرمی با PBS-Tween 20 به نسبت ۱ به ۲ رقیق شده بودند. پس از سه مرحله شستشو، نمونه ها با محلول حاوی آنتی IgE انسانی کونجوگه با آنزیم آلکالن فسفاتاز (شرکت سیگما A3525) با رقت ۱ به ۱۰۰۰ در PBS-Tween 20 به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق گرماگذاری شدند.

در ادامه پس از شستشو به نمونه ها معرف رنگ زا که در واقع سوبسترای آنزیم بود به مدت ۲۰ دقیقه اضافه شد. این معرف حاوی NBT (نیتروبلوتترازولیوم) و BCIP (۵ برمو-٤ کلرو- ۳ ایندولیل فسفات) می باشد. در پایان بر اساس مارکر مولکولی با استفاده از نرم افزار VUIDocMw Version 10.01 اندازه باندها به دست آمد.

و) *آنالیز آماری:* تحلیل داده های به دست آمده با استفاده از نسخه هجدهم نرم افزار *SPSS* و آزمون مربع کای

Archive of SID

www.SID.ir

انجام شد. سطح معنی داری بر روی p< ۰/۰۵ قرار داده شد.

یافته ها

در این مطالعه ٤٨ بیمار مبتلا به آسم و ٢٢ فرد سالم به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفته شد. پراکنش فراوانی بیماران و گروه کنترل در جدول ١ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از SDS-PAGE این سه قارچ در جدول ٢ آورده شده است. همان طور که ملاحظه می شود *آلترناریا آلترناتا*، با ٩ باند در مقایسه با دو قارچ دیگر دارای بیشترین باند (٤١٪) بوده و برای *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *پنیسیلیوم سیترینوم* به ترتیب ٧ و ٦ باند شناسایی گردید (شکل ١). این در حالی است که در مرحله ایمونوبلاتینگ تنها برخی از این باندها به عنوان آلرژن شناخته شدند.

نتایج حاصل از ایمونوبلاتینگ بر روی مخلوط سرمی بیماران آسمی نشان داد که *آلترناریا آلترناتا* با ٦ باند ٤٩ تا ١١٥ کیلودالتونی بیشترین باند آلرژی زا را دارا بوده است. *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با ٤ باند ٥٧ تا ١١٢ کیلودالتونی کمترین باند آلرژی زا را داشت.

پنیسیلیوم سیترینوم با ٥ باند آلرژی زا، ٣٧ تا ١٢٧ کیلودالتونی با IgE اختصاصی سرم بیماران آسمی واکنش نشان داد (جدول ٣). در این مطالعه از نظر آماری بین فراوانی باندها در گروه کنترل و بیمار ارتباط معنی داری وجود داشت.

جدول ١: فراوانی و اندازه باندهای پروتئینی به دست آمده از عصاره قارچ های *آلترناریا آلترناتا*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *پنیسیلیوم سیترینوم* با استفاده از تکنیک SDS-PAGE (اندازه ها بر حسب کیلو دالتون می باشد).

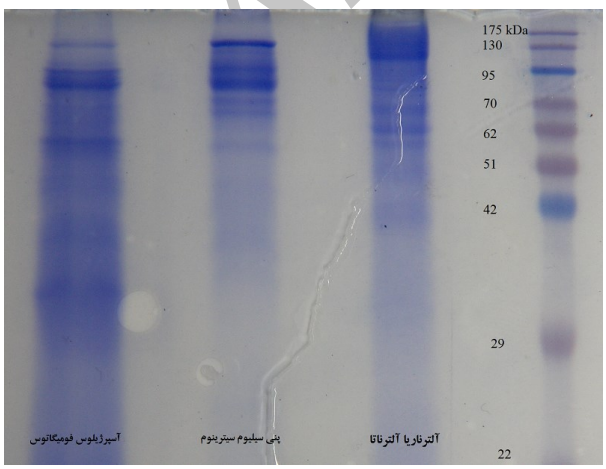
جنس و گونه	*آسپرژیلوس فومیگاتوس*	*پنیسیلیوم سیترینوم*	*آلترناریا آلترناتا*
وزن مولکولی باندهای پروتئینی	١١٢	١٢٧	١٧٨
	٨٠	٩١	١١٥
	٧١	٧٤	٨٣
	٥٤	٦٤	٦٧
	٤٤	٥٥	٦١
	٣١	٣٧	٥٦
	٢١		٤٩
			٣٨
			٢٢

جدول ٢: تعداد و فراوانی بیماران مورد مطالعه با تفکیک جنسیت و محدوده سنی.

سن (سال)	بیماران آسمی (٤٨ نفر)		گروه کنترل (٢٢ نفر)	
	مرد (نفر)	زن (نفر)	مرد (نفر)	زن (نفر)
کمتر از ٢٠	٦	٧	٣	٣
٢١-٤٠	٨	٩	٣	٤
٤١-٧٠	٩	٩	٤	٥
جمع	٢٣	٢٥	١٠	١٢

جدول ٣: نتایج حاصل از بررسی پاسخ ایمنی بیماران آسمی در آزمایش Pooled Serum (اندازه باندها بر حسب کیلو دالتون می باشد).

جنس و گونه	*آلترناریا آلترناتا*	*آسپرژیلوس فومیگاتوس*	*پنیسیلیوم سیترینوم*
وزن مولکولی باندهای ایمونوبلاتینگ	١١٥	١١٢	١٢٧
	٨٣	٨٠	٩٢
	٦٧	٧١	٧٤
	٦١	٥٤	٦٤
	٥٦		٣٧
	٤٩		



شکل ١: تصویر SDS-PAGE بر روی عصاره به دست آمده از قارچ ها.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

قارچ های ساپروفیت به طور گسترده ای در طبیعت پراکنده اند و امکان انتشار اسپورهایشان از راه هوا وجود دارد. بنابراین انسان ها از طریق تنفس با آنها در تماس هستند. آلرژی به عنوان یک پاسخ سیستم ایمنی به آلرژن های خارجی تعریف شده و افرادی که مستعد می باشند، با تنفس کنیدی این قارچ ها تحت تاثیر علایم این پاسخ ایمنی قرار می گیرند. بررسی ها نشان می دهد که میزان آلرژی تنفسی به قارچ ها در افراد آتوپیک بین ۲۰ تا ۳۰ درصد و در افراد غیر آتوپیک در حدود ٦ درصد می باشد (١٤ و ١٥). از این رو آلرژی تنفسی قارچی مورد توجه بوده و مطالعات زیادی به بررسی آلرژن های قارچ هائی مانند *پنیسیلیوم*، *آسپرژیلوس* و *آلترناریا* پرداخته اند. *پنیسیلیوم سیترینوم* دارای آلرژن های مختلفی می باشد. مطالعات نشان می دهد که آلرژن های اصلی آن در حدود ۳۰ تا ٣٤ کیلودالتون می باشد و از طریق تست ایمونوبلاتینگ به وسیله IgE اختصاصی سرم بیماران آسمی شناسایی شده است. از آن جمله می توان به یک پروتئین ۳۳ کیلودالتونی اشاره نمود که یک آلکالین سرین پروتئاز می باشد (١٦). در مطالعه حاضر ٥ باند آلرژن از طریق روش ایمونوبلاتینگ با استفاده از IgE اختصاصی سرم بیماران آسمی بر علیه عصاره قارچی *پنیسیلیوم سیترینوم* به دست آمد. این باندها به ترتیب دارای وزن مولکولی ٣٧، ٦٤، ٧٤، ٩٢ و ١٢٧ کیلودالتون بودند. از این میان باند ٣٧ کیلودالتونی به آلرژن های اصلی به دست آمده در مطالعه دیگران نزدیک است. در برخی گزارشات باندهایی تا ٦٤ و ٦٨ کیلودالتون نیز برای *پنیسیلیوم نوتاتوم* گزارش شده است (١٧). اما باندهای سنگین ٧٤، ٩٢ و ١٢٧ کیلودالتونی به دست آمده در این مطالعه کمتر گزارش شده است.

آلرژن های زیادی از ١١ تا ٦٨ کیلودالتون برای *آسپرژیلوس فومیگاتوس* گزارش شده است که به صورت Asp f1 تا Asp f37 نام گذاری شده است. از این میان Asp f1 تاAsp f18 از مهمترین آنها می باشند (١٨).

در مطالعه حاضر ٤ باند به وزن مولکولی ٥٤، ٧١، ٨٠ و ١١٢ کیلودالتون برای *آسپرژیلوس فومیگاتوس* شناسایی شد. از این میان دو باند ٥٤ و ٧١ کیلودالتونی از نظر اندازه به باندهای گزارش شده نزدیک می باشد. دو باند ٨٠ و ١١٢ کیلودالتونی تا کنون گزارش نشده است.

برای *آلترناریا آلترناتا* در پژوهش حاضر ٦ باند آلرژن از ٤٩ تا ١١٥ کیلودالتون با وزن مولکولی ٤٩، ٥٦، ٦١، ٦٧، ٨٣ و ١١٥ کیلودالتون شناسایی گردید. مهمترین آلرژن این قارچ Alt a1 با وزن مولکولی ٣١ کیلودالتون می باشد. این باند در مطالعه حاضر با روش ایمونوبلاتینگ مشاهده نشد (١٩).

اگرچه در بین الگوی باندی به دست آمده از SDS-PAGE باند ٣٨ کیلودالتونی مشاهده می شود، اما در مرحله ایمونوبلاتینگ و مواجهه آنتی ژن های به دست آمده از عصاره قارچ با سرم بیماران آسمی این باند آلرژن تشخیص داده نشد.

از آنجائی که در این مطالعه از مخلوط سرمی یکسان علیه عصاره هر سه قارچ استفاده شد، امکان مقایسه بین آنها فراهم گردید. نتایج نشان می دهند در بین سه قارچ مورد مطالعه، *آلترناریا آلترناتا* با ٦ باند آلرژن بیشترین باند و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با ٤ باند کمترین باند را دارا می باشد.

برای *پنیسیلیوم سیترینوم* نیز ٥ باند آلرژن شناسایی شد. اگرچه افزایش تعداد باندها الزاماً به معنای شدت بیشتر بیماری زایی قارچ نمی باشد. اما این نتایج تنها نشان می دهد *آلترناریا آلترناتا* در مقایسه با دو قارچ دیگر باندهای آلرژن بیشتری دارد.

در پژوهش حاضر بررسی آلرژن های قارچی نشان داد که در الگوی پروتئینی هر سه قارچ باندهایی با وزن مولکولی بالا، بیش از ۸۰ کیلودالتون، مشاهده گردید که در مطالعات دیگران تا کنون، کمتر گزارش شده است (١).

به نظر می رسد که تفاوت در موقعیت های جغرافیایی، ویژگی های بومی قارچ ها در نقاط مختلف جهان و تفارت های احتمالی در روش کار را بتوان به عنوان دلایلی برای توضیح این اختلافات ذکر نمود. اگرچه وجود دلایل احتمالی دیگری را نمی توان رد کرد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که در بین قارچ های های مورد مطالعه *آلترناریا آلترناتا* بیشترین باند آلرژن را به خود اختصاص داده است. همچنین به نظر می رسد باندهایی با وزن مولکولی بالا، که در این مطالعه به دست آمد، توانائیی ایجاد آلرژی و تحریک تولید IgE اختصاصی علیه خود را دارا می باشند. نتایج نشان داد که ارتباط بین آسم و آلرژن های قارچی وجود دارد و در جمعیت ایرانی آلرژن های شناسایی شده توانایی ایجاد آسم آلرژیک را دارند. با این وجود انجام بررسی های بیشتر می تواند نتایج دقیق تر و روشن تری را در اختیار گذارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران گرامی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و جناب آقای قنبر قنبری به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Denning DW, O'Driscoll BR, Hogaboam CM, Bowyer P, Niven RM. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. Eur Respir J. 2006; 27: 615-626.
2. Bracken MB, Belanger K, Cooksonn WO, Triche E, Christiani DC, Leaderer BP. Genetic and perinatal risk factors for asthma onset and severity: A review and theoretical analysis. Epidemiol Rev. 2002; 24: 176-189.
3. World Health Organization (WHO). Health topics. Risk Factors. Available at http://www.who.int/topics/risk_factors/en/ (Accessed 12 December 2010).
4. Żukiewicz-Sobczak, W. The role of fungi in allergic diseases. Postep Derm Alergol. 2013; 30 (1): 42-45.
5. Bezerra GFDB, de Almeida FC, Neto da Silva MAC, Nascimento ACB, Meireles Guerra RN, Viana GMDC. Respiratory allergy to airborne fungi in São Luís-MA: clinical aspects and levels of IgE in a structured asthma program. J Asthma. 2014; 51(10): 1028-1034.
6. Knutsen, A P, Bush RK, Demain JG, Denning DW, Dixit A, Fairs A, Greenberger PA. Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. J Allergy Clin Immunol. 2012; 129(2): 280-291.
7. Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB. Fungal allergens. Clin Microbiol Rev. 1995; 2: 161-179.
8. Torres-Rodríguez JM, Pulido-Marrero Z, Vera-García Y. Respiratory allergy to fungi in Barcelona, Spain: Clinical aspects, diagnosis and specific treatment in a general allergy unit. Allergologia et immunopathologia. 2012; 40(5): 295-300.
9. Sharma R, Gaur SN, Singh VP, Singh AB. Association between indoor fungi in Delhi homes and sensitization in children with respiratory allergy. Med Mycol. 2012; 50(3): 281-290.
10. Crameri R, Garbani M, Rhyner C, Huitema C. Fungi: the neglected allergenic sources. Allergy. 2014; 69(2): 176-185.
11. Khosravi AR, Chabavizadeh J, Shokri H, Tajbakhsh H. Evaluation of the sensitization of poultry workers to *Aspergillus fumigatus* and *Cladophilophora carrionii*. J Mycol Med. 2009; 19: 104-109.

Archive of SID

www.SID.ir

12. Bush RK, Sánchez H, Geisler D. Molecular cloning of a major *Alternaria alternata* allergen, rAlt a2. J Allergy Clin Immunol. 1999; 104: 665-671.

13. Brad ford MM. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Analyt Biochem. 1976; 72: 248-254.

14. Shen HD, Hwa Han SH. Characterization of allergens of *Penicillium* and *Aspergillus* species. J Microbiol Immunol Infect. 1998; 31: 141-145.

15. Shen HD, Lin WL. Allergenic components in three different species of *Penicillium*: cross reactivity among major allergens. Clin Exp Allergy. 1996; 26: 444-451.

16. Harold S, Novey MD. Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma. J Allergy Clin Immunol. 1985; 76: 819-825.

17. Shen HD, Tam MF, Chou H, Hwa Han SH. The importance of serine proteinases as aeroallergens associated with asthma. Int Arch Allergy Immunol. 1999; 119: 259-264.

18. 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: 58-63.

19. Chruszcz M, Chapman MD, Osinski T, Solberg R, Demas M, Porebski PJ, Minor W. *Alternaria alternata* allergen, Alt a 1: A unique β-barrel protein dimer found exclusively in fungi. J Allergy Clin Immunol. 2012; 130(1): 241-247.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 3, October 2014

Original Article

Evaluation and identification of allergenic bands caused by *A. alternata, P. citrinum* and *A. fumigatus* in the asthmatic patients using immunoblotting approaches

Azar Sabokbar[1], Amir Bakhtiari[2], Mojgan Saghazadeh[3]

[1]Associated Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran.
[2]M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Several studies have shown that fungi can cause allergenic asthma in the susceptible persons. Among these fungi, *Alternaria, Penicillium* and *Aspergillus* species are more common in this cases. This study was performed to detect and to compare allergenic bands in *A.alternata, P.citrinum* and *A.fumigatus*.

Materials & Methods: This cross-sectional study was performed on 48 patients afflicted to asthma and 22 healthy controls. The fungi were grown and their extract crude were obtained using the liquid nitrogen. The protein fractions were isolated by SDS-PAGE and after electrotransfering and transfer of the bands into the nitrocellulose membrane, the proteins were used for immunoblotting against the sera obtained from patients and controls.

Results: Based on the immunobloting test, 6 protein allergenic bands for *A. alternata* (49-115 kDa), 4 protein bands for *A. fumigatus* (57-112 kDa) and 5 protein bands for *P. citrinum* (37-127 kDa) are detected in these samples.

Conclusion: The highest amount of allergic band belonged to *A. alternate*. The bands with higher molecular weights were more effective in stimulation of IgE.

Keywords: Asthma, *Alternaria alternata, Aspergillus fumigatus*, *Penicillium citrinum*, IgE-immunoblotting.

Correspondence to: Azar Sabokbar

Tel: +989125179417

E-mail: a.sabokbar@yahoo.com

Journal of Microbial World 2014, 7(3): 225-232.

Archive of SID

www.SID.ir