دراسة بعض المعايير المناعية لمستضد متعدد السكريد للفطر *Aspergillus niger* في الارنب

غدير كاظم عبود* أ.م. د. نداء شهاب حمد* أ.م. د. فريال جميل عبد**

* كلية العلوم للبنات/ جامعة بابل **كلية العلوم/ جامعة بابل

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية تقييم كفاءة لقاح مستضد متعدد السكريد polysaccharide المعزول من جدار الفطر *Aspergillus niger* الذي تم عزلة من عينات القشع لمرضى مصابين بالتدرن الرئوي ومن التربة ايضا . فقد جرى تمنيع 6 من ذكور الأرانب النيوزلندية البيضاء بـالمستضد وبوجود مجموعة اخرى (عددها6 أرانب) كمجاميع سيطرة والتمنيع تم وفقا لبرنامج تمنيعي.

دلت نتائج الدراسة الحالية ان مستضد متعدد السكريد المعزول من السلالتين قد أدى الى حث الاستجابة المناعية الخلطية, تم تحديدها باستخدام فحص التلازن المباشر بالأنابيب لكلوبيولينات الزائدة الدودية والمصل وفحص الانتشار المناعي القطري لتحديد مستويات تركيز الكلوبيولينات المناعية IgM وIgG ومكونات المتمم C3 وC4 حيث كانت نتائج معدل عيار التلازن المباشر بالأنابيب لكلوبيولينات الزائدة الدودية للحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد الفطري 128 ولحيوانات السيطرة 1 وللأمصال 2560 للحيوانات الممنعة وهذه النتيجة اعلى مقارنة بحيوانات السيطرة 10 وعند قياس معدل تركيز الكلوبيولينات المناعية ومكوني المتمم لحيوانات الاختبار فقد ازداد فيها معدل تركيزIgG و IgM لحيوانات الاختبار الممنعة بمستضد متعدد السكريد مصدره مرضى التدرن والتربة مقارنة بحيوانات السيطرة وكذلك بالنسبة لمكون المتمم الثالث والمكون الرابع فقد ازداد تركيزه في حيوانات الاختبار الممنعة بمستضد متعدد السكريد مصدره مرضى التدرن وبمقدار اعلى من الحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد مصدره التربة وبالمقارنة مع حيوانات السيطرة ايضا.

كذلك أظهرت نتائج الدراسة ارتفاعا معنويا في مستوى تركيز الأجسام المضادة IgE لمجموعتي الحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد المعزول من مرضى التدرن ومن التربة بمقدار Iu/ml 1.1701±0.05811 , 1.0770±0.19355 بالمقارنة مع حيوانات السيطرة التي بلغ فيها مستوى IgE فيه 0.8723±0.08489 Iu/ml .

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus niger* , مستضد متعدد السكريد Polysaccharide .

المقدمة

الفطريات هي كائنات حية توجد في كل مكان ذات ضراوة محدودة في المضيف كامل المناعة او الصحي , أذ يتمكن النظام المناعي من التخلص منها ومع ذلك يصاب المضيف بعدوى الفطريات الانتهازية (Chai *et al* .,2009).

اكتشف جنس الرشاشيات لأول مرة عام 1729 من قبل الكاهن الإيطالي وعالم الأحياء بيبر انطونيو ميشلي , بعد ان قام بفحص ومشاهدة هذه الفطريات تحت المجهر فوجد انها على شكل مضخة رش المياه فأطلق عليها اسم Aspergillium وهو مشتق من الكلمة اللاتينية Spargere بمعنى رش وعلى هذا الأساس سمي الجنس بالرشاشيات (Bennett .,2010)

فالرشاشيات هي فطريات خيطية توجد في كل مكان في الطبيعة ويمكن التعرف عليها باستخدام اوساط زرعية مختلفة . العدد الكلي المسجل من أنواع الرشاشيات 205 نوع يضم 153 (75%) نوع موجود في الطبيعة و52 (25%) من الرشاشيات السريرية (Zeng *et al* .,2004) .

وصف الفطر *Aspergillus niger* لأول مرة من قبل العالم Tiechem في عام 1767 اذ يكون سطح مستعمرات هذا الفطر مغطى بتجمعات كثيفة من الكونيدات السوداء, تتخذ هذه المستعمرة في بداية النمو اللون الابيض , ثم تتحول بعد ذلك الى اللون الاصفر وعند اكتمال النمو تتحول إلى اللون الأسود (Emmons *et al* .,1977). حيث يعتبر الفطر *A. niger* احد انواع الرشاشيات وأكثرها انتشارا اذ يسبب العديد من الامراض التي تصيب الفاكهة والخضروات والفول السوداني وتسبب ما يدعى بالعفن الأسود (Samson *et al* .,2001).

فالـ *A.niger* هو نوع من الفطريات الخيطية التي تنتمي الى شعبة الفطريات الكيسية Ascomycota والتي تظهر تحت المجهر بشكل كونيديا محمولة على الحامل الكونيدي والتي تنتج لاجنسيا وتظهر هذه الخيوط بشكل شفاف زجاجي مقسم تدعمها خلايا القدم في القاعدة والتي تنشأ منها الحوامل الكونيدية (Haq *et al* .,2014).

يعتبر الجدار هو الجزء الحيوي في جميع الفطريات , الذي يحدد أو يسيطر على الشكل ويوفر الحماية للكائن ضد الظروف الخارجية , فالجدار الخلوي يمتلك المكونات الرئيسية المشاركة في عملية التضاعف ,الاستنساخ وتفاعل خلية مع خلية أخرى وتفاعلات المكونات الداخلية للخلية الواحدة وعلى الرغم من كون جدار الخلية صلب التركيب إلا أنه يسمح بتبادل المواد , النمو والتكيف مع الظروف الخارجية (Klutts *et al* .,2006).

ان الجزء الشائع في جدار الخلايا الفطرية هو متعدد السكريد (اكثر من 90 %) والاكثر وفرة فيه هو β-D- glucan (50-60 من متعدد السكريد لجدار الخلية) الذي يلعب دور مهما في بناء الهيكل واعطاء الصلابة والثبات للخلية وتحديد الشكل المظهري لها فهو بمثابة العمود الفقري لجدار الخلية الفطرية (Schachtschabel *et al* .,2013).

وان الجدار الخلوي للفطر *A. niger* مشابهة للجدار الخلوي للفطر *A. fumigatus* ,حيث يحتوي على العديد على صفوف من متعدد السكريد والذي يتضمن β-glucans, chitin, α-glucan, galactomannan, and mannoprotiens (Damveld *et al* ., 2008).

المواد وطرائق العمل

1-جمع العينات

جمعت 50 عينة تضمنت 25 عينة سريرية في الصباح الباكر من المرضى الوافدين لمركز التدرن والأمراض الصدرية في محافظة بابل والذين يعانون من مرض التدرن الرئوي , و25عينة تربة من مناطق بابل وضواحيها لغرض التحري عن تواجد الفطر *A.niger*

وضعت عينات القشع في قناني بلاستيكية معقمة ومحكمة الغلق ونقلت خلال فترة لا تزيد عن ساعة الى المختبر ليتم زراعتها في طبق بتري حاوي على وسط السابرويد دكستروز اكار (SDA) وحضنت لمدة 5±2 أيام بدرجة حرارة 37 مْ ،لغرض الحصول على عزلات الفطر *A.niger*.

اما عينات التربة فقد استعملت طريقة التخافيف في عزل الفطر وحسب دراسة (Abdel-Hafez,1982) حيث وُزِن 0.5 غم من التربة وعُلِّق في 100 مل من الماء المقطر المعقم , رج الخليط مدة دقيقة واحدة وترك لتستقر الابواغ الفطرية مدة 10 دقائق , أخذ 0.5 مل من المحلول لكل عينة تربة ووضع في طبق بتري معقم وحاوي على الوسط الزرعي PDA, وحُرِكّ الطبق حركة دائرية خفيفة لانتشار الوسط في كل الاتجاهات لتجانس الوسط واللقاح ثم تركت الاطباق لتتصلب وحضنت بدرجة حرارة 28 ±2 لمدة (7) أيام.

2- تشخيص الفطريات

تم تشخيص الفطريات عن طريق اخذ بصمة من حافة المستعمرة الفطرية بواسطة الشريط اللاصق الشفاف وتم تحميلها على قطرة من صبغة اللاكتوفينول ازرق القطن على شريحة زجاجية slide وفحصت على قوى التكبير مختلفة وتم تصوير الأجزاء المهمة تصنيفيا واعتمد في التشخيص على (Klich ,2002).

3-تحضير مستضد الفطري متعدد السكريد Polyssacharide من جدار خلايا الفطر *A.niger*

استخدمت طريقة (Veronica and Mackenzie, 1979 ; Chan *et al*., 2002) في التحضير وعلى النحو الاتي :

1- تم زراعة الفطر *A.niger* النقي والمعزول من عينة التربة والعينة السريرية على وسط السابرويد اكار ولمدة 2-3 يوم وفي درجة حرارة 37 مْ للحصول على مستعمرات مفردة نقية.

2- لقح وسط المرق المغذي Potato Dextrose Broth بعد تحضيره بإحدى المستعمرات المفردة للفطر *A.niger* وحضن في حاضنة هزازة لمدة 5-1 يوم وفي درجة حرارة 37 مْ ومع الرج المستمر Shaking بحدود 50 هزة/الدقيقة للحصول على كثافة نمو> 10^5/ml من الوسط.

3-تم نبذ خلايا الفطر بسرعة 3500 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق ثم اذيبت الخلايا في دارئ الفوسفات الفسيولوجي Phosphate-buffered saline(0.27mM كلوريد البوتاسيوم ,13.7mM كلوريد الصوديوم ,1mM دارى الفوسفات عند pH 7.4) مع اضافة 0.05% فينول ليتم مقارنتها مع انبوبة ماكفرلاند رقم(3) ثم اكمل الحجم لتتساوى كثافة الانبوبتان.

4- كسرت الخلايا باستعمال جهاز تكسير الخلايا لمدة 1-2 دقيقة.

5-

لاحقا نبذت الخلايا بسرعة 4000 دورة/ دقيقة والمجهز من الشركة الفرنسية LABO , تركت ولمدة 5 دقائق لغرض فصل السايتوبلازم عن بعدها الانبوبة في حمام مائي و لمدة 10 دقائق. فتغير اللون الى الاصفر دليل على وجود البروتين , تم فحص الانبوبة بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer وعلى طول موجي 550 نانوميتر. حيث ان مدى قياس البروتين يتراوح بين 550-570 نانو ميتر.

6- غسل الراسب الناتج بعد نبذ الخلايا بالماء الساخن بدرجة حرارة 50-60 درجة مئوية لمدة 7 مرات ففي كل غسلة تنبذ بسرعة 4000 دورة / دقيقة , يهمل الراشح ويأخذ الراسب.

7- يفحص الراشح وذلك بوضع قطرة من صبغة اللاكتوفينول الازرق على السلايد مع قطرة من الراشح للتأكد من كون الراشح عديم اللون ورائق فإذا ظهرت كونيدات او خيوط الفطر يجب الاستمرار بالغسل الى حين التأكد من عدم وجودها ثم يخزن بعدها بالتجميد.

8- اجري اختبار مولش للتأكد من وجود السكريات والطعام واجراء التعقيم المستمر للأقفاص المقسمة وذلك بإضافة قطرتان من كاشف الفا نفثول الى 2 مل لأربعة مجاميع بين الحين والاخر وتركت الحيوانات من محلول الاختبار (الراشح) ثم اضيف اليه 1 مل للتكيف مع البيئة الجديدة لمدة اسبوعين وكذلك للتأكد من حامض الكبريتك المركز بحذر على الحافة من سلامتها وخلوها من الأمراض , علمت الاقفاص الجانبية للأنبوبة ليكون النتيجة الموجبة وذلك بظهور حسب نوع المستضد وتاريخ كل جرعة معطاة.

طبقتين (الخفاجي ,2010) ان هذا الاختبار استخدم للكشف عن الكاربوهيدرات في مستخلص متعدد السكريد (plummer ,1978).

9- تم حساب كمية الكلوكوز والبروتين لمعرفة الفرق بين نسبتها لكلا العينتين .

a- فحص الكلوكوز Glucose test

اضيف 32 مايكروليتر من عينة المستضد على شريط مجهز من الشركة المانية (Reflotron –glucose Roche) بعدها وضع الشريط في جهاز Reflotron لقياس نسبة الكلوكوز.

b - فحص البروتين

اضيف 20 مايكروليتر من راسب المستضد الفطري لـ 1cc من كاشف البروتين Protein Kit

10- حفظ مستضد متعدد السكريد بالتجميد لحين الاستعمال في برنامج تمنيع الارانب.

4-الحيوانات المختبرية

استخدمت ذكور الأرانب النيوزلندية البيضاء بوزن 874 غرام-2 كيلوغراماً وعددها 12 ارنب, تم وضعها في اقفاص مع الانتباه لنظافة ماء الشرب والطعام واجراء التعقيم المستمر للأقفاص المقسمة للتكيف مع البيئة الجديدة لمدة اسبوعين وكذلك للتأكد من سلامتها وخلوها من الأمراض , علمت الاقفاص الجانبية للأنبوبة ليكون النتيجة الموجبة وذلك بظهور حسب نوع المستضد وتاريخ كل جرعة معطاة.

5- الاختبارات المناعية على الامصال والمواد الافرازية المناعية للزائدة الدودية للأرانب

1-5 فصل الامصال

سحب الدم من القلب بطريقة الطعنة (Heart Puncture) وباستخدام محاقن سعة 5 مل, ووضع الدم في انابيب لا تحتوي على مانع تخثر ثم نقلت الى المختبر لفصل الامصال بوضع الانابيب في جهاز المنبذة لمدة 5 دقائق وبسرعة 3000 دورة/دقيقة , ثم فصلت الأمصال باستخدام أنابيب باستور معقمة

ووضعت في أنابيب ابندروف (Frei *et al* ,.. 1995) استعملت الأمصال لأجراء الاختبارات اللاحقة.

2-5 عزل الكلوبيولينات الافرازية المناعية من الزائدة الدودية

استخدمت طريقة (Shnawa and Abid ,2005) في استخلاص البروتينات الإفرازية:

1- أخذت الزائدة الدودية من الأرانب عند تشريحها ووضعت في أطباق بلاستيكية معقمة ونظيفة تحتوي على المحلول الملحي الفورماليني وفتحت طوليا باستخدام مقص نظيف.

2- نظفت المحتويات بالغسل بمحلول الملح الطبيعي.

3- باستخدام 10 مل من محلول الملح الفورماليني جرفت الطبقة المخاطية ليعمل منها عالق.

4- نبذ العالق في جهاز المنبذة لمدة نصف ساعة بسرعة 3500 دورة / دقيقة .

5- أخذ الرائق وأضيف إليه حجم مساو من مادة Polyethyleneglycol بتركيز 6 %.

6- ترك لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة.

7- نبذ الخليط بسرعة 3500 دورة / دقيقة لمدة نصف ساعة .

8- أهمل الرائق وأذيب الراسب في 1 مل من المحلول الملحي الفورماليني والذي يمثل عالق الكلوبيولين المناعي الافرازي.

3-5 اختبار التراص بالأنابيب Tube agglutination test

استخدم هذا الاختبار للتحري عن وجود او عدم وجود خاصية ضدية للكلوبيولينات المناعية

المناعية الإفرازية والمصلية لكلا المستضدين وتحديد العيار (Garvey *et at* .,1977).

4-5 اختبار التراص المباشر بالأنابيب للأمصال

1- أخذت 10 أنابيب بسعة 5 مل نظيفة ومعقمة وأضيف 0.9 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي الى الانبوبة الأولى ثم أضيف 0.5 مل من المحلول الفسيولوجي إلى بقية الأنابيب.

2 - أضيف 0.1 مل من المصل المأخوذ الى الأنبوبة الأولى ومزجت المحتويات الأنبوبة جيدا.

3- نقل 0.5 مل من الأنبوبة الأولى الى الأنبوبة الثانية ومزجت المحتويات جيدا ثم نقل منها 0.5 مل إلى الأنبوبة الثالثة وهكذا حتى الأنبوبة التاسعة.

4- نقل 0.5 مل من الأنبوبة التاسعة الى الخارج ليصبح تسلسل التخافيف 10:1 , 20:1, 40:1, 80:1, 160:1, 320:1, 460:1, 1280:1, 2560:1 .

5- أضيف 0.5 مل من عالق المستضد لكلا الفطرين المعزولين والمحضر سابقا الى الأنابيب السابقة اعلاه.

6- مزجت الأنابيب جيدا ثم حضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة وبعد ذلك لوحظت النتيجة لوجود او عدم وجود تراص بظهور تراص متكتلة في قعر الأنبوبة.

فإذا حركت الأنبوبة حركة خفيفة أدت الى تطاير هذه التكتلات بشكل ندف مع بقاء الأنبوبة رائقا" فان هذا يدل على ايجابية الاختبار. أما إذا تطاير الراسب بشكل متجانس مسببة عكوره وضبابية في الأنبوب فإن هذا يدل على عدم وجود تفاعل

ضدي متراص للمستضدات ثم يسجل اخر تخفيف5-أضيف 0.2 مل من عالق اضداد المستضد لكلا أظهر تفاعلا ايجابيا أي العيار . الفطرين المعزولين والمحضر سابقا الأنابيب السابقة اعلاه.

تمثل الأنبوبة رقم 10 انبوبة السيطرة ومحتويات هذا الانبوب هي المحلول الملحي الطبيعي6- مزجت محتويات الأنابيب جيدا وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة ثم سجلت النتائج. 0.5 و0.5 مل من المستضد Garvey *et al* (.,1977).

7- تمثل الأنبوبة رقم 10 أنبوبة السيطرة فهي تحتوي على 0.2 مل من كل من المستضد الجرثومي ومحلول الملح الطبيعي Shnawa and Al Saadi (,2002).

5-5 اختبار التراص بالأنابيب للكلوبيولينات المناعية الإفرازية للزائدة الدودية في الارانب

1- اخذت 10 أنابيب بسعة 5 مل نظيفة ومعقمة وأضيف اليها 0.2 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي .

2- أضيف 0.2 مل من عالق الأضداد الى الأنبوبة الأولى ومزجت محتوياتهما جيدا.

3- نقل 0.2 مل من محتويات الأنبوبة الأولى الى الأنبوبة الثانية ومن الثانية الى الثالثة وهكذا حتى التاسعة.

4- نقل 0.2 مل من محتويات الأنبوبة التاسعة الى الخارج وهكذا اصبح تسلسل التخافيف 2:1 , 4:1, 8:1 , 16:1, 32:1, 64:1, 128:1.

6- قياس مستوى الكلوبيولينات المناعية IgM , IgG باستخدام الانتشار المناعي لشعاعي

تم قياس تركيز الكلوبيولينات المناعية بواسطة طبق الانتشار المناعي الشعائي (Radial Immunodiffusion plate) . واستخدم لهذا الغرض عدة (Kit) المجهزة من الشركة الايطالية (LAT s.r.l - Via Milano, 15/F) .

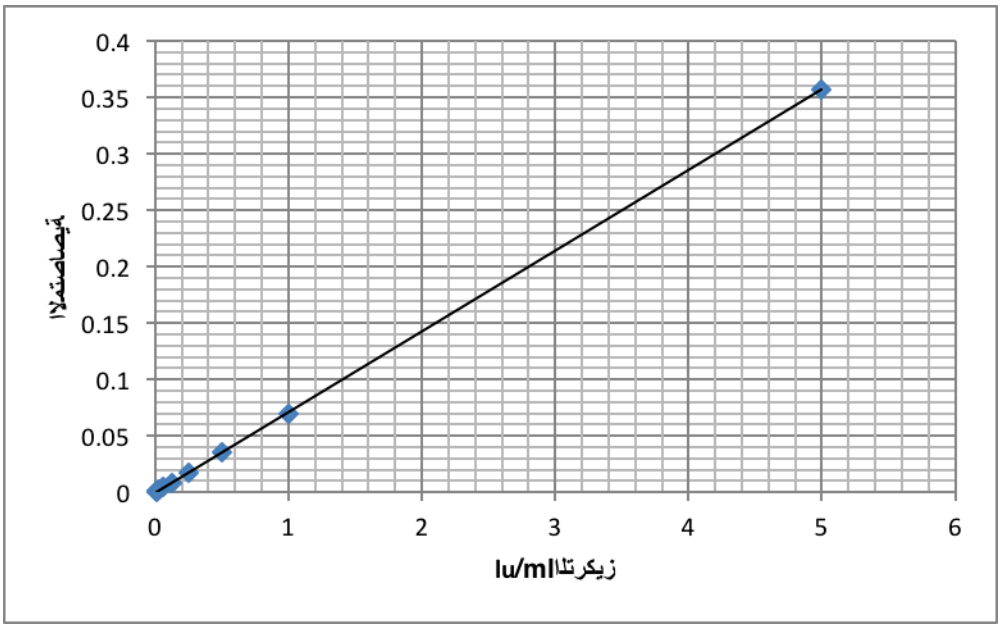
7- قياس تركيز مكوني المتمم الثالث C3 والرابع C4

تم قياس تركيز مكوني المتمم بواسطة طبق الانتشار المناعي الشعاعي (Radial Immunodiffusion plate). واستخدم لهذا الغرض العدة (Kit) المجهزة من الشركة الإيطالية (LAT s.r.l - Via Milano, 15/F) .

8- قياس تركيز IgE في مصل الارانب

تم قياس تركيز IgE حسب تعليمات الشركة ال

مصنعة Human



شكل (1) منحني المعايرة القياسي لتركيز IgE للأرنب

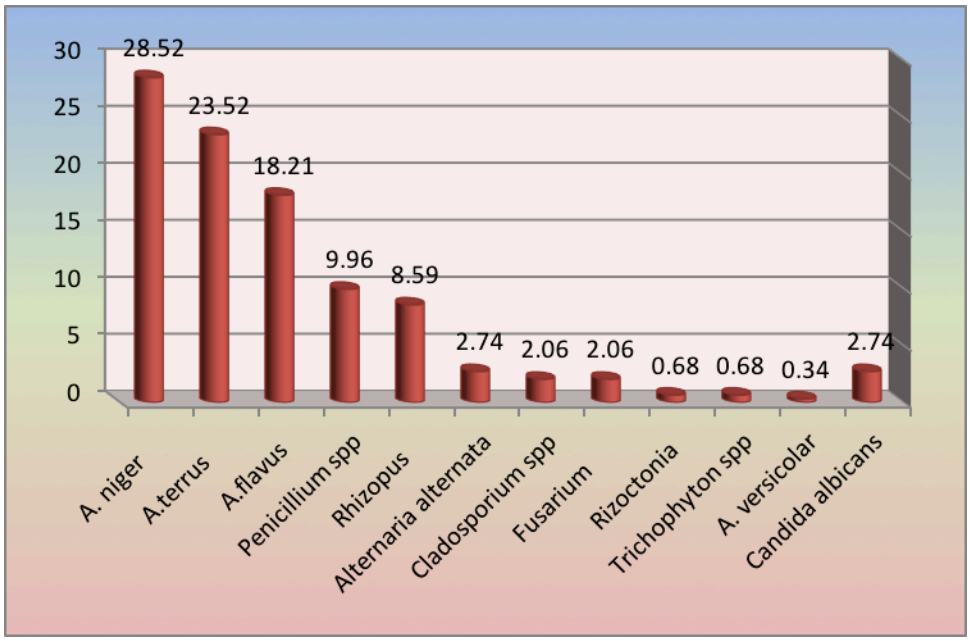
9- التحليل الاحصائي

حللت النتائج إحصائيا باستخدام اختبار تحليل التباين باتجاه واحد Anova one way كما واستخدم اقل فرق معنوي Least Significant Difference (LSD) للبحث عن وجود الفروق المعنوية بين المعاملات المختلفة باستعمال البرنامج الإحصائي الشامل (SPSS) الإصدار (Version-22) عند مستوى احتمال ($P<0.05$) وثبتت النتائج بشكل (المعدل الحسابي ± الانحراف المعياري) (محمود, 2013).

النتائج والمناقشة

1- العزل والتشخيص

عُزِلَ وشُخِص 291 عزلة تعود الى 12 نوع فطري معزول من 25 عينة تربة حيث كان عدد عزلات الفطر *Aspergillus spp* هي الاكثر تواجدا من بين الانواع المعزولة خلال فترة الدراسة حيث يبين الشكل (2) ان اعلى نسبة تردد هي للأنواع الثلاثة من جنس *Aspergillus* : *A.niger* و *A.terreus* ثم *A.flavus* حيث ان نسبة ترددها 28.52%, 23.52% , 18.21 % وعلى التوالي , يليها من حيث التردد *Penicillium spp* بنسبة 9.96 % والفطريات الاخرى بنسب متفاوتة



الشكل (2) النسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة من التربة .

وان اختلاف تردد هذه الفطريات يختلف حسب درجة الحرارة وطبيعية الوسط الغذائي المناسب وكذلك الدالة الهيدروجينية المناسبة لنمو هذه الفطريات. فقد ذكر (Ababutain ,2011) ان درجة الحرارة والرطوبة النسبية من العوامل المؤثرة على نمو الفطر *A.niger* ووجد Al-Garni *et al.*,(2007) ان نمو الفطر المذكور يزداد بزيادة الرطوبة النسبية وان الرطوبة المنخفضة تمنع نمو هذا الفطر .كما وجد (Alwakeel ,2008) ان درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر *A.niger* هي 30 مْ بينما وضح Al-Garni (*et al* ., 2007) ان درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر هي25 مْ .

اما بالنسبة للعينات السريرية والمعزولة من عينات القشع لمرضى التدرن فكانت اعلى نسبة ظهور للاخماج التي يسببها جنس *Aspergillus* spp الذي ظهر بثلاثة انواع كانت الاعلى نسبه 48 % تعود للنوع *A.niger* وكما هو موضح في الجدول (1)

جدول (1) الأنواع الفطرية المعزولة من العينات السريرية ونسب ظهورها.

الانواع الفطرية	عدد العزلات	النسبة المئوية للظهور %
Aspergillus. niger	12	% 48
Aspergillus. fumigatu	4	% 16
Aspergillus. terreus	4	% 16
Aspergillus.flavus	3	% 12
Penicillium spp	2	% 8
Rhizopus oryzae	2	% 8
Cladosporium spp	1	% 4
Candida albicans	8	% 32
عدد العزلات الكلية	36	

أن النتائج أعلاه تتفق مع نتائج توصل اليهاهو أكثر الانواع انتشارا يليه *A. fumigatus* وهي ناجي وآخرون , (2006) من أن الفطر *A. niger* الاكثر شيوعاً في الاخماج الفطرية ومن ثم *A.*

flavus و *A. terreus* . وكذلك تتفق مع نتائج السكريات الطبيعة شيوعا في كل المستضدات الفطرية ,لذلك فان أستجابة الضد للمستضد هو كنتيجة لوجود هذه السكريات المشتركة.

التنفسي التي اظهرت ان اعلى ظهور كان للجنس *A.niger* من بين العزلات الفطرية تلاها الفطر *A.fumigatus* ثم *A.flavus* ، ثم الانواع الفطرية *A.terrus* *Pencillium marneffei.* *A . alternatae* *Rhizopus oryzae*، *Cladosporium cladosporioides*، *Mucor spp.* *Fusarium solani*. اما بالنسبة للخمائر فقد اظهرت خميرة *C.albicans* اعلى نسبة اصابة من مجموع العزلات .

2-تحضير مستضد متعدد السكريد للفطر *A.niger*

تم تحضير مستضد متعدد السكريد المعزول من التربة ومن العينات السريرية لمرضى التدرن الرئوي وذلك لدراسة قدرته على حث الاستجابة المناعية في الحيوان المختبري واتفقت هذه الدراسة مع Tsai and Cousin (1993) بان متعدد السكريد الموجود في الخيوط الفطرية هو نشط مناعيا وان الكلوكوز والكالكتوز والمانوز هي اكثر

3-عيارات الاضداد المتخصصة لمستضدات الفطر *A.niger*.

3-1 التلازن بلأنابيب Tube agglutination test للأمصال .

اوضحت نتائج التلازن بالانابيب مع مصل حيوانات الاختبار الممنعة بمستضد متعدد السكريد للفطر A.*niger* التي بلغ عددها ستة حيوانات وثلاثة اعتبرت كحيوانات سيطرة , اظهرت حيوانات الاختبار مستضدية جهازية بمعدل عياري 2560 اما حيوانات السيطرة فأعطت مستضدية جهازية بمعدل عياري 10, وكما مبين بالجدول(2). وتتفق هذه النتائج مع عباس واخرون (2010) الذين بينوا ان اعلى مستضدية جهازية كانت لامصال الحيوانات الممنعة بالغزول الفطرية للفطر *A.fumigatus* .

جدول (2) معدل عيارات الاضداد الجهازية المتخصصة بمستضد متعدد السكري للفطر*A.niger* في الارانب .

مجاميع الحيوانات	دد الحيوانات	معدل عيار الضد	عيار الضد لحيوانات السيطرة 3 لكل مستضد
جموعة مستضد متعدد السكريد زول من جدار *A. niger* مصدره التربة	3	2560	10
جموعة مستضد متعدد السكريد زول من جدار *A. niger* مصدره مرضى التدرن	3	2560	10

2-3 اختبار التراص بلأنابيب Tube agglutination test للكلوبيولينات الافرازية للزائدة الدودية في الأرانب.

تم التحري من خلال اختبار التراص بالانابيب عن الاستجابة المناعية (الجهازية والموضعية) المتخصصة بمستضدات متعدد السكريد لجدار الفطر *A.niger* من خلال اجراء فحوصات التلازن المباشر بالانابيب لكلوبيولينات الزائدة

الدودية لحيوانات الاختبار الممنعة بهذا بالمستضدالمعاملة بمستضد متعدد السكريد للـ *A.niger* عيارا وكذلك لحيوانات السيطرة. موضعيا بلغ 128 اما حيوانات السيطرة فأعطت

بينت نتائج التراص بالانابيب مع الكلوبيولينات عيارا موضعيا بلغ 1 وكما هو مبين في الجدول (3). المناعية المعزولة من الزائدة الدودية للحيوانات

جدول (3) معدل عيارات الاضداد الموضعية المتخصصة بمستضد متعدد السكري للفطر *A.niger* في الارانب.

مجاميع الحيوانات	عدد الحيوانات	معدل عيار الضد	معدل عيار الضد لحيوانات السيطرة 3 لكل مستضد
مجموعة مستضد متعدد السكريد المعزول من جدارالفطر *A. niger* مصدره التربة	3	128	1
مجموعة مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار الفطر *A. niger* مصدره مرضى التدرن	3	128	1

فمن خلال الجدول (2) والجدول (3) نلاحظهذا مطابقا لنتائج الدراسة الحالية في زيادة عيارية ارتفاع في عيارية الاضداد لمصول الحيواناتالاجسام المضادة ضد الفطر *A.niger* بالنسبة الممنعة بمستضدات متعدد السكريد لجدارللحيوانات الممنعة بهذا المستضد الفطري. وايضا الفطر *A.niger* مقارنة مع حيوانات السيطرة . وقدلاحظ زيادة في عيارية الاضداد للكلوبيولينات اشارت الدراسات الى ان المستضدات الجرثومية لهاالمناعية للزائدة الدودية لحيوانات الاختبار الممنعة تاثير في تنشط الخلايا التائية المساعدة (Th2)بمستضد متعدد السكريد للفطر *A.niger* مقارنة للاستجابة الاولية الخلطية و ربما يكون لها دوربلحيوانات السيطرة .

محفزا لانتاج خلايا الذاكرة البائية او محفزا لنشاط فقد بين Greenberger ,(2002) بان مستوى هذه الخلايا في الاستجابة الثانوية وزيادة في وظيفتهاالاجسام المضادة في المصل يزداد نتيجة الاستجابة في لانتاج الضد (Thomas *et al* .,2000) وجاءالمناعية الخلطية بوجود داء الرشاشيات .

مصدره مرضى التدرن وبمقدار 351.77 mg/dl± 2322.63 وبمقدار mg/dl 417.25±2051.56 في الحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره التربة مقارنة

4- قياس مستوى الاضداد IgM , IgG باستخدام الانتشار المناعي .

استخدمت طريقة الانتشار المناعي الشعاعيمع حيوانات السيطرة التي بلغ مقدار نسبة Radial immunodifussion(RID) لتقديرالكلوبيولين المناعي IgG فيها 415.77 تركيز الكلوبيولينات المناعية lgG وlgM الموجودة1246.26±mg/dl وكما هو مبين في الجدول (4). في مصول الارانب الممنعة بمستضدات متعددوجد من خلال هذه الدراسة وجود فروق معنوية السكريد لجدار الفطر *A.niger* . وعلى مستوى احتمالية P <0.05 بين المجموعتين

حيث بينت النتائج حدوث ارتفاع في مستوىالاولى والثانية بالمقارنة مع مجموعة حيوانات تركيز الكلوبيولين المناعي IgG للحيوانات الممنعةالسيطرة . بمستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A.niger*

هي احد المعايير الاساسية لتشخيص داء الرشاشيات

وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Kurup القصيبي التحسسي (Greenberger ,2002). فقد and Kumar, (1991) بان هنالك مستويات عالية وجد انه كنتيجة لاستجابة الاجسام المضادة ضد انواع من الامينوكلوبيولينات IgE والاجسام المضادة IgG الرشاشيات ترتفع الاجسام المضادة IgA, IgG,IgE المتخصصة بالفطر *A. fumigatus* في مصل (Bhatnagar *et al* .,1993).
الاشخاص المصابين بداء الرشاشيات التحسسي واثبت Kurup وجماعته (1990) الى ان القصيبي الرئوي وفرط وجود خلايا الحمضة في الدم الجسم المضاد IgG المتخصص بـ *A. fumigatus* المحيطي والرئة ايضا. ومطابقة لدراسة (De هو الاكثر شيوعا في مرضى ورم الرشاشيات. وفي Repentigny and Reiss ,1984) حيث وجد ان دراسة اخرى بأستخدام المجهر الالكتروني تمنيع الارانب وريديا بجدار خلايا الفطر .A وباستعمال مسحات رفيعة حاوية على كونيدات *fumigatus* يعطي افضل استجابة من الاجسام خيوط الرشاشيات الى ان هذه الخيوط والكونيدات المضادة IgG ضد هذا المستضد. وان الكشف عن تتفاعل مع الاجسام المضادة IgE ,IgG في مصل المستويات العالية من الاجسام المضادة للـ IgG , مرضى داء الرشاشيات (Kurup and Kumar IgE في المصل والمتخصصة بالـ *A. fumigatus* ,1991
.)

جدول (4) معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgG (mg/dl) في مصل الارانب الممنعة بمستضد متعدد السكريد للفطر *A.niger*.

الحيوانات	IgG (mg/dl) M±S.D.
مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره التربة	**2051.56±417.25** [a]
مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره مرضى التدرن	**2322.63±351.77** [a]
مجموعة السيطرة	1246.26±415.77 [b]

a: هنالك فروق معنوية مع السيطرة b ولا يوجد فرق معنوي بين المجموعة الاولى والثانية

ويوضح الجدول (5) حدوث زيادة في معدل 269.00±33.82 وكما هو مبين في الجدول (5). تركيز الكلوبيولين المناعي IgM لجميع حيوانات وكانت هنالك فروق معنوية مع المجموعة الثالثة الاختبار الممنعة فقد بلغ معدل تركيزه mg/dl لحيوانات السيطرة. وجد (Hohl and 327.86±92.22 للحيوانات الممنعة بمستضد متعدد Feldmesser ,2007) سيادة الاجسام المضادة السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره IgG,IgM في مصول مرضى مصابين بداء مرضى التدرن وبمقدار 137.69 mg/dl±318.23 الرشاشيات الغازي. وان الكشف عن الاجسام للحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد المعزول المضادة المتخصصة ضد انواع الرشاشيات هي من جدار *A. niger* مصدره التربة وبالمقارنة مع وسيلة تشخيصية مهمة لتشخيص اشكال داء حيوانات السيطرة التي كان تركيز الكلوبيولين الرشاشيات (Puente *et al* .,1991). المناعي IgM فيها اقل من باقي المجاميع mg/dl

جدول (5) معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgM (mg/dl) في مصل الارانب الممنعة بمستضد متعدد السكريد للفطر *A.niger*.

الحيوانات	IgM(mg/dl) M±S.D.
مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره التربة	a 318.23±137.69
مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره مرضى التدرن	a 327.86±92.22
مجموعة السيطرة	b 269.00±33.82

a:هنالك فروق معنوية مع السيطرة b ولا يوجد فرق معنوي بين المجموعة الاولى والثانية

5 - قياس تركيز مكوني المتمم C3 وC4.

من المعروف وعلى المدى الطويل ان مكونات المتمم هي جزء لايتجزء من المناعة الذاتية (Lambris *et al* ,2008) فهو احد العناصر الرئيسية الفعالة في خط الدفاع الاول لمناعة الجسم ضد الممرضات(Bohlson *et al* .,2007) ولكن في السنوات الاخيرة اصبح من المعروف وبشكل متزايد ان مكونات المتمم مهمة في تحريض واستجابة مراحل المناعة المتكيفة , خصوصا في استجابة الخلايا البائية من خلال تثبيط او تنشيط هذه الخلايا وانتاج الاجسام المضادة وكذلك التاثير على وظائف الاجسام المضادة اللازمة للجسم(Nakayama *et al* ., 2008) فنظام المتمم الوسيط الاولي لتفاعلات الاضداد والمستضدات ويتالف هذا النظام من 20 نوعا او أكثر من البروتينات المختلفة كيميائيا ومناعيا والموجودة في بلازما الدم بصورة طبيعية وتشكل15% من بروتينات البلازما تقريبا ويختلف المتمم عن الضد في الصفات الكيميائية والحيوية والمناعية ويكون عطوبا بدرجة حرارة 56 م° لمدة نصف ساعة (Coering *et al* .,2008).

عند قياس تركيز مكوني المتمم C3 و C4الموجودة في مصول الارانب الممنعة بمستضدات الفطر *A.niger* باستخدام طريقة الانتشار المناعي الشعاعي(RID) , تبين حدوث زيادة في معدل تركيز المتمم C3 لجميع حيوانات الاختبار الممنعة فقد بلغ معدل تركيزه mg/dl 232.00±27.45 للحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره مرضى التدرن وبمقدار mg/dl 106.92± 230.80 للحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره التربة وبالمقارنة مع حيوانات السيطرة التي بلغ تركيز المتمم C3 فيها اقل من باقي المجاميع 69.40 mg/dl ±160.03 وكما هو مبين في الجدول (6). ولم تظهر اي فروق معنوية بين هذه المعاملات الثلاثة . ان هذه الزيادة في تركيز المتمم C3 تحصل نتيجة لارتباطة بسطح الكونيدات الفطرية . وتبين لاحقا ان هنالك اختلافات في تفاعل اجناس الرشاشيات مع نظام المتمم المناعي , فسلسلة بدء تنشيط مسار نظام المتمم يختلف حسب حالة هذه الكونيدات ساكنة, منتفخة او تشكل خيوط فطرية (Kozel ,1996) حيث يتم تنشيط المسار البديل للمتمم بواسطة الكونيدات الساكنة, بينما يزداد الاعتماد على المسار الكلاسيكي في حالة الكونيدات المنتفخة او الهايفات Cole (1981,) وان تفعيل المسار البديل يحدث عند تمكن المتمم C1q المشتق من C1 من التعرف والارتباط بالمستقبل Fc الموجود على سطوح الاجسام المضادة IgM,IgG والتي ترتبط بالمستضد المناسب, وان

هذا الاختلاف في بدء تفعيل المتمم يحدث نتيجةمن المرجح ان الكونيدات الساكنة تغير الطبقة اختلاف الشكل الخارجي المظهري لسطوح هذهالخارجية لها عند نضوجها وبالتالي يكون مصل الكونيدات , فالسطح الخارجي للكونيدات الساكنةالجسم اجسام مضادة لها شائعة نسبيا , ويبدأ المسار يكون املس , شمعي ومحاط بطبقة كارهة للماء إلكلاسيكي مع الكونيدات النتفخة والهايفات نتيجة وهذه الطبقة الخارجية تكون ضعيفة مناعيا وهيتفعيله بواسطة المسار البديل وبوجود المانان نادرا ماتوجد في البيئة مما يؤدي الى عدم وجودالمرتبط بالبروتين على سطوح هذه الاجسام المضادة الخاصة بها في مصل الدم, فلذلكالفطريات(Kozel ,1996).

جدول (6) معدل تركيز مكون المتمم C3 (mg/dl) في مصل الارانب الممنعة بمستضد متعدد السكريد للفطر *A.niger*.

الحيوانات	C3(mg/dl) M±S.D.
مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره التربة	**230.80±106.92**
مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره مرضى التدرن	**232.00±27.45**
مجموعة السيطرة	**160.03±69.40**

نلاحظ من خلال النتائج أن معدل تركيزللجسم (Jaskowski ,1999). ربما يعود الاختلاف المتمم C4 لحيوانات الاختبار الممنعة بمستضد متعدفي معدل الاستجابة المناعية ولمختلف المعاير السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدرهالاخرى لمستضد متعدد السكريد لنفس الفطر مرضى التدرن قد بلغ تركيزه mg/dl 4.57± والمعزول من مصدرين مختلفين ,كون كونيدات 9.36 46.86±29.30 للحيوانات الممنعة بمستضدالفطر المعزول من التربة متواجدة في البيئية التي متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدرفعيش فيها وعلى النباتات وفي كل مكان فالكائن في التربة وبالمقارنة مع حيوانات السيطرة التي كانتعرض مستمر بحكم طبيعية الحياة التي نعيشها تركيز المتمم C4 فيها mg/dl 15.61± فيكون التأثير اقل , اما شدة الضراوة لمتعدد السكريد 27.90وكما هو مبين في الجدول (7). حيث ظهرتالمعزول من مرضى التدرن فالفطر يكون سبق وان فروقات معنوية بين المجموعة الاولى والثانية معتاقلم للعيش في درجة حرارة الجسم وبذلك يكون الثالثة . فطر ضاري .

فالمتمم دورا هاما في توجيه دفاعات المضيف ضد
الاصابات الجرثومية وفي تنشيط الحالة الالتهابية

جدول(7) معدل تركيز مكون المتمم C4 (mg/dl) في مصل الارانب الممنعة بمستضد متعدد السكريد للفطر *A.niger*.

الحيوانات	C4(mg/dl) M±S.D.

مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره التربة	a 29.30±9.36
مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره مرضى التدرن	a 46.86±4.57
مجموعة السيطرة	b 27.90±15.61

6- قياس مستوى تركيز IgE في مصل الارانب.

اظهرت نتائج الدراسة ارتفاع معنويا في مستوى تركيز الاجسام المضادة IgE بين مجموعة الحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A.niger* مصدره مرضى التدرن بالمقارنة مع حيوانات السيطرة التي بلغ فيها مستوى IgE فيه 0.8723±0.08489 Iu/ml وكذلك ارتفع ولكن بمعدل اقل في امصال الارانب الممنعة بمستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره التربة 1.0770±0.19355 Iu/ml وبالمقارنة مع حيوانات السيطرة ايضا, وكما هو مبين في جدول (8).

immunoglobulin وخاصة النوع IgE تلعب دور مهم لدى مرضى الحساسية فهي تسبب تحسسا في جدار الجهاز التنفسي مؤدية الى انتاج كمية كبيرة من IgE . واشارت الدراسات الى ان مرضى الحساسية الذين يعانون من التهابات في المجرى التنفسي نتيجة دخول الممنعات Allergen اما بكتيرية او فطرية او فايروسية تحصل لديهم استجابة التهابية تؤدي الى تضيق في المجرى التنفسي وزيادة في تكوين المواد المخاطية المؤدية الى تحلل نسيج الخلايا المبطنة للقناة التنفسية (Halken , 2004; Soderstrom *et al.,* 2011) وفقاً للدراسات العديدة في بايولوجيا الهواء Aerobiology وجد أن معظم فطريات الهواء ذات التأثير المحسس للإنسان هي ضمن مجموعة الفطريات الناقصة ومن الأجناس التي سجلت سيادة وتفوقا في أعدادها جنس *Aspergillus* الأمر الذي يسهل وصولها الى المجرى التنفسي وبالتالي الأسناخ الرئوية عن طريق الاستنشاق بأضعف تيار هوائي مؤدية إلى حدوث داء الرشاشيات الرئوي (Pulmonary Aspergillosis) (اسماعيل ,2008) .

حيث ظهر ارتفاع في مستوى تركيز IgE في امصال الارانب الممنعة بمستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A.niger* مصدره مرضى التدرن بمقدار 1.1701±0.05811 Iu/ml بالمقارنة مع حيوانات السيطرة التي بلغ فيها مستوى IgE فيه 0.8723±0.08489 Iu/ml وكذلك ارتفع ولكن بمعدل اقل في امصال الارانب الممنعة بمستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره التربة 1.0770±0.19355 Iu/ml وبالمقارنة مع حيوانات السيطرة ايضا, وكما هو مبين في جدول (8).

فقد اشارت نتائج الدراسة الحالية الى وجود تباين مؤخرا فرط وجود خلايا الحمضة في الدم المحيطي ونخاع العظم بالتزامن مع ارتفاع مستوى IgE المتخصص ضد للرشاشيات في مصل مجموعه السيطرة , ويعود السبب الى ان الاصابة للفئران المصابة بداء الرشاشيات الرئوي(Murali *et al* .,1992) وان اختبار قياس الاجسام المضادة بالحساسية ادت الى تحفيز فعالية الجهاز المناعي مما ادى الى تحفيز عدد اكبر من الخلايا اللمفاوية البائية IgE في المختبر يكون مفيد في حالة الاشخاص الذين لايستطيعون الخضوع لاختبار الجلد (Smits *et al* ., 2003) وبالتالي زيادة في انتاج الاجسام المضادة ومنها النوع IgE ، فقد وجد ان الكلوبيولينات المناعية .

جدول (8) متوسط تركيزIgE (Iu/ml) في مصل الارنب الممنعة بمستضد متعدد السكريد للفطر *A.niger* وباستخدام تقنية الاليزا (Iu/ml)

الحيوانات	IgE(lu/ml) M±S.D.
مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره التربة	[a] 1.0770±0.19355
مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار *A. niger* مصدره مرضى التدرن	[a] 1.1701±0.05811
مجموعة السيطرة	[b] 0.8723±0.08489

a: هنالك فرق معنوي بين مجموعه المرضى ومجموعة السيطرة فقط ولا يوجد فرق معنوي بين مجموعة التربة والسيطرة

صفاء للنشر والتوزيع . جامعة بابل . ص:249-205

.

المصادر

إسماعيل , محمد طاهر ,عبير الكفري (2008).كتاب الطفيليات والفطور الطبية . منشورات جامعة دمشق - كلية الطب البشري. ص: 458 .

الخفاجي, نور سلمان كاظم (2010). دراسة بكتريولوجية ومناعية لبكتريا *Citrobacter freundi* في الأرانب . رسالة ماجستير, كلية العلوم- جامعة بابل.

عباس, محمد قاسم فرج اكرام. السامرائي, عبود. العميد, اسيل ابراهيم مظفر.(2010). دراسة بعض أوجه الاستجابة المناعية لعفن الرشاشيات الدخناء *Aspergillus fumigatus* في الارانب المحلية. مجلة القاديسية لعلوم الطب البيطري.المجلد,9 العدد(1).

محمود , إيهاب عبد السلام محمود (2013) . تحليل البرنامج الإحصائي SPSS . الطبعة الأولى , دار

المعموري, اشراق عبد الأمير (2011). دراسة مايكروبايلوجية ومناعية لمرضى اصابات الجهاز التنفسي . رسالة ماجستير, كلية العلوم-جامعة بابل.

ناجي , وداد ناجي , محمد صبري وحسنين خليل (2006) . دراسة لبعض التغيرات النسيجية للفئران المصابة تجريبياً ببعض الفطريات المعزولة من مرضى التدرن الرئوي البشري . مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية . المجلد (12) , العدد (3)

.

Ababutain, M.I. (2011). Aeromycoflora of some eastern provinces of Saudi Arabia. *Indoor. Built .Environment*. 22(2):388-394.

Abdel-Hafez, S.I. (1982) . Thermophilic and thermotolerant fungi in the desert soil in Saudi Arabia . *Mycopathologia* . 80: 15-20.

Al-Garni, S.M.; Kabli ,S.; Al-Shehrei,F. and Al- Ganawi,Z. (2007).

Cohen, H. and Schifferli, D.M.(2000) Mucosal an systemi immune response to dimeric fimbriae expressed by *Salmonella enteric* serovar typhimurium. *Immun* . 68:3129-3139.

Cole, G. T. (1981). Architecture and chemistry of the cell walls of higher fungi, *In* D. Schlessinger (ed.), Microbiology.American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 227–231.

Damveld, R.A.; Franken, A.; Arentshorst, M.; Punt, P.J.; Klis, F.M.; Van den Hondel , C.M.J.J.and Ram, A.F.J.(2008). A Novel Screening Method for Cell Wall Mutants in Aspergillus niger Identifies UDP-Galactopyranose Mutase as an Important Protien in Fungal cell Wall Biosynthesis. Genetics Society of America.

De-Repentigny, L. and Reiss, E.(1984) Curren trends in immunodiagnosis of candidiasis and aspergillosis. *Rev Infect*.6:630-312.

Emmons, C. W. ; Binford, C. H. ; Utz, J. P. and Kwon-Chung, K. J.(1977) Medical mycology.3rd. ed. Lea & Febiger. Philadelphia, U.S.A.

Frei, J. ; Heuck, C. ; Riesen,W. and Laug , I.T.(1995). Production of basic diagnostic laboratory reagents. WHO regional publication, Eastern Mealitterranean series.

Garvey,J.S.; Cremev, N.E. and Sussdrof , D.H. (1977). Method In

Alwakeel, S.S. (2008). Indoor fungal and bacterial contaminations on household environment in riyadh, Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci*. 15: 113-119.

Bennett J. W. (2010). "An Orerview of the genus Aspergillus" Aspergillus. Molecular Biology and Geno-mics. Caister Academic press. ISBN 978-1-904455-53-0.

Bhatnagar, P.K.; Banerjee, B.; Shah, A. et al .(1993). Probable of IgG subclasses in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. Serodiagn. Immunother. *Infect*. 5:123-124

Bohlson, S. S.; Fraser, D. A. and Tenner, A. J. (2007). Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol. Immunol.* 44: 33–43.

Chai ,L.Y.; Netea ,M.G.; Vonk, A.G . and Kullberg ,B.J.(2009) Fungal strategies forovercoming host innate immune response, *Med. Mycol.* 47:227-236.

Chan,C.; Woo,P.Y.; Leung, A.P.; Lau, S.P.; Che, X.; Cao, L. and Yuen, K . (2002) Detection of Antibodies Specific to an Antigenic Cell Wall Galactomannoprotein for Serodiagnosis of Aspergillus fumigatus Aspergillosis . *American. J. clin.Microb*.P: 2041-2045.

Kurup, V.P. and Kumar, A. (1991). Immunodiagnosis of Aspergillosis. *Clini. Microbiol.Rev.*4(4):439-456.

Kurup, V.P.; Resnick, A.; Klbfleish, J. and Fink, J.N.(1990). Antibody isotype responses in *Aspergillus* induced diseases. *J.Lab. Clin. Med.*115:298-303.

Lambris, J. D.; Ricklin, D.and Geisbrecht, B. V. (2008). Complement evasion by human pathogens. *Nat. Rev Microbiol.* 6*:* 132–142.

Murali, P.S.; Dai, G.; Kumar, A,; Fink, J.N. and Kurup, V.P.(1992). *Aspergillus* antigen induced eosinophil differentiation in amurine model. *Infect Immun*. 60:1952-1956.

Nyland, J. (2009). Innate (Non specific) Immune response. *Med. Microbiol* .MBIM650.Email: jnyland@uscmed.sc.edu.

Plummer, D. T. (1978). An Introduction to Practical Biochemistry. McGraw-Hill Book Company Limited.

Puente, P.; Ovejero, M. C.; Fernández, N. and Leal, F.(1991).Analysis of *Aspergillus nidulans* conidial antigens and their prevalence in other *Aspergillus* species. *Infect. Immun.* 59(12):4478.

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: Microogranisms in Home and Indoor Work Environments. New York: Taylor & Francis. pp. 287–292. ISB.

Immunology. 3th. Ed. Pp,53-267. Addison-Wesley publishing Company.

Greenberger, P.A.(2002). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Allergy. Clin. Immunol*.110:685-962.

Halken, S. (2004). Prevention of allergic disease in childhood clinical and epidemiological aspects of primary and secondary prevention .*Pediatr. Allergy. Immunol* .16:9-32.

Haq , I.U.; Nawaz, a.; Mukhtar, h. and Ahmed , W.(2014). Isolation and Identification of Glucose Oxidase Hyper Producing Strain of *Aspergillus niger*. *J. British. Micro. Res.* 4(2): 195-205.

Hohl, T.M and Feldmesser, M.(2007). *Aspergillus fumigatus* principle of pathogenesis and host defence. *Eukaryotic .cell*. 6(11):1953-1963.

Jaskowski, T. D.; Martins, T. B.; Litwin, C. M. ; Hill, H. R. (1999). Comparison of three different methods for measuring classical pathway complement activity. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 6 (1) , 137–139.

Klich, M.A.(2002). Identification of Common *Aspergillus* Species. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmel cultures.

Klutts, J.S.; Yoneda, A.; Reilly, M.C.; Bose, I.; Doering, T.L. (2006). Glycosyltransferases and their products: cryptococcal variations on fungal themes. *FEMS Yeast Research*., 6 (4), 499-512.

Kozel, T.R.(1996). Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* (1):34-46.

Tsai, G.J. and Cousin, M.A. (1993).Partial purification and haracterization of mold antigens commonly found in foods.*Applied and Environmental Microbiology*.59 (8):2563-2571.

Veronica, M.H. and Mackenzie, D.W.R .(1979). The preparation and chemical composition of fractions from *Aspergillus fumigatus* wall and protoplasts possessing antigenic activity.*General. Microb*.112:35-44.

Zeng, R.; Luo, S.; Shi, Y.(2004) Allelopathic effects of secalonia acid F produced by *Aspergillus japonicus* on *Zea mays*. *Ying.Yong. Sheng.Tai. Xue.Bao*.15: 145-148.

Schachtschabel, D.; Arentshorst, M.; Nitsche, B.M.; Morris, S.; Nielsen, K.F. et al. (2013). The Transcriptional Repressor TupA in *Aspergillus niger* Is Involved in Controlling Gene Expression Related to Cell Wall Biosynthesis, Development, and Nitrogen Source Availability. *PLoS One*. 8(10): 78102.

Shnawa, I. M. S. and Abid, F. G. (2005). The role of carbohydrate binding complement components. The lactins in plotting the immunophyltic tree of vertebrate. Al-Qady. Sci. J. of Vet. Med.4:1-5.

Shnawa, I.M.S. and Al Saadi, M.A.(2002).Gut mucosal immunoglobulin separation practical characterization and utility as infection probe. Iraq. *J. Microb*.13(3).

Smits, W.L.; Letz, K.L.; Evans ,T.S.; Giese, J.K. (2003).Evaluating the response of patients undergoing both allergy skin testing and in vitro allergy testing with ImmunoCAP Technology system. *J. Am. Acad. Nurse. Practitioners* 5:415-23.

Soderstrom, L.; Lilja, G.; Borres, M. and Nilsson C.(2011) .An explorative study of low levels of allergen – specific IgE and clinical allergy symptoms during early childhood .*Allergy* . 10 : 1398-9995.

Thomas, J.K.; Goldsby, R.A.; and Osborne.(2000). Immunology .4th ed . W.H. Freeman &Combany.New York.