عزل وتشخيص أنواع جنس *Aspergillus*spp. من الجهاز التنفسي للمصابين بالأمراض الرئوية المزمنة

نيران عبيد جاسم

كلية الصيدلة/جامعة القادسية

Mona_diabetis@yahoo.com

زهراء فلاح عزيز

كلية العلوم /جامعة القادسية

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية إلى عزل أنواع الجنس *Aspergillus*spp. من الإصابات الرئوية المزمنة في محافظة الديوانية , حيث جمعت عينات القشع من مرضى العيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية , وأخضعت العينات الى الفحص المجهري المباشروالتشخيص الزرعي والجزيئي بتقنية PCR,أظهرت النتائج أن(107)عزلة عائدة إلى جنس *Aspergillus* spp وبنسبة (28.08%) من المجموع الكلي للعزلات والبالغ (381) عزلة , وعلى مستوى الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* spp سجل *A. fumigatus* أعلى نسبة مئوية للتردد(29.9%) تلاه الفطر*A. niger*بنسبة (28.9%) وعزلت كذلك الأنواع*A. flavus*و *A.terreus* و *A. nidulans* بنسبة (18.7% , 12.14% , 2.8%)على التوالي , كما تم عزل الانواع *A.ochraceus*و *A.parasiticus* و *A.penicillioides*و*A.ustus*والتي تعتبر حسب الدراسات المتوفرة قد عزلت لأول مرة في مدينة الديوانية كذلك دلت النتائج على أن التشخيص الجزيئي ذو كفاءة عالية في التشخيص .

الكلمات الدالة:.*Aspergillus* spp , التشخيص الجزيئي بتقنيةPCR

Abstract

Study aims to isolate isolates fungus *Aspergillus* spp. Isolated from injuries chronic lung in the province of Diwaniyah, where the samples were collected sputum from patients clinic Advisory diseases thoracic and respiratory, and subjected the samples to a microscopic examination of direct and diagnosis pea and molecular technology, PCR, and the results showed (107) isolation of its ownership to the genus *Aspergillus* spp. and by (28.08%) of the total isolates and adult (381) isolation, while the level of species belonging to the genus *Aspergillus* spp. record *A. fumigatus* highest percentage of frequency (29.9%), followed by the fungus *A. niger* (28.9%), as well as the isolated species *A. flavus*and *A. terreus* and *A. nidulans*(18.7%, 12.14%, 2.8%), respectively, have also been isolated species *A. ochraceus, A.parasiticus, A.penicillioides* and *A.ustus* which are considered according to available studies has been isolated for the first time in the city of Diwaniya. The results also showed the level of diagnosis of type that molecular diagnostics has proved highly efficient in the diagnosis.

Keywords:*Aspergillus spp.* ,Molecular diagnosticPCRtechnology

المقدمة

تعد الإصابة بالأنواع المختلفة من الفطر.*Aspergillus* sppمن أكثر أنواع الإصابات الفطرية شيوعا والأكثر تكراراً من بين الأخماج المختلطة (Mixed infection) (Prescott *et al*., 2005) . كما تعتبر الأنواع التابعة لهذا الجنس ممرضة انتهازية (Opportunistic pathogenic)تنتشر بكثرة في التربة والهواء , وتتمكن من النمو في أي وسط حي , وتحدث الإصابة بها نتيجة لاستنشاق الابواغ Airborneإذ تتمكن من الوصول إلى الأسناخ الرئوية بأضعف تيار هوائي نتيجة لحجمها الصغير, والتي تؤدي إلى حدوث داء الرشاشيات الرئوي(Pulmonary aspergillosis)(اسماعيل , 2008) , بوجود عوامل تزيد من شدة الإصابة للمضيف , والتي تجعل الفطر قادر على تجاوز الخطوط الدفاعية الأساسية للمضيف , كما تسهم في تخريب النسيج الذي تستوطنه مثل العمر , الجنس , الضعف أو الوهن المناعي , السمنة , الأمراض الخبيثة , مرض السكري وتناول الأدوية المثبطة للمناعة كالمركبات الستيرويدية(steroid)ومرافقة مع بعض الامراض الرئوية المزمنة التي تعتبر مهيئ لحدوث الإصابة مثل السل الرئوي وخراجات الرئة والربو والتهابالقصبات

المزمن أو الحاد (الجناحي , 2012) . تتخذ الفطريات ومنها جنس *Aspergillus* أساليب وراثية وفسلجيةمتعددة لتجنب دفاعات المضيف مسببة بذلك المرض والإصابة بواسطة افرازها الأنزيمات الخارج خلوية والذي يعد واحد من اهم عوامل الضراوة الكامنة في هذا الفطر(Alpsoy , 2010) . وعموماً يعني مصطلح Aspergillosis الالتهاب الذي تسببه فطريات *A. fumigatus* في الجهاز الرئوي القصبي ويمكن للأنواع الأخرى من الجنس مثل(*A.flavus, A. niger, A. terreus*)ان تصيب الرئة لتسبب طيف واسع من الأمراض الرئوية التي يتراوح مداها من تفاعلات فرط الحساسية الى الاصابة الجهازية المباشرة وغالباً ما تكون الأعراض والعلاماتالسريرية غير واضحة ولا تدل على نوع المسبب .وبشكل عام فان شدة الاصابة تعتمد على مناعة المضيف وضراوة الفطر .(Ines *et al.*, 2011) .ونظرناً لزيادة إصابات الحساسية والربوفي السنوات الأخيرة وانتشار الحالات المشجعة للإصابة بفطر *Aspergillus* استهدفت دراستنا الحالية عزل والتشخيص المولرفولوجي والمجهري والجزيئي للأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* , ولكون الفطريات الممرضة وفي أغلب الأحيانتظهر تباينا واضحاً حتى بين العزلات العائدة للنوع نفسه (شريف ,2012) لذلك تم اللجوء إلى استخدام التقنيات الجزيئية المعتمدة على دراسة تتابع قواعد ال DNA.في الكشف عن وجود الأنواع في هيئتها الجسمية أو التكاثرية كما أنها تكشف وجود الأنواع التي لا يمكن زراعتها والتي لا تعرف بإتباع طرق الفحص أو العزل التقليدي وحتى متبقيات الفطريات الميتة أو المنقوصة.

المواد وطرق العمل

العزل :تم عزل الفطريات المختبرة من حالات التهاب المجاري التنفسية السفلى (LRTIs) . حيث جمعت عينات القشع من مرضى العيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية والذين يعانون من سعال مصحوب بقشع مستمر لمدة طويلة وغير مستجيب للعلاج , بدء أولاً بتعقيم الفم والغرغرة بمحلول ملحي في الصباح الباكر وأخذت العينة من كل مريض ووضعت في قناني زجاجية معقمة , وأجري التحري الاولي عن وجود الفطريات بأتباع الفحص المجهري المباشر وباستخدام كمية من هيدروكسيد البوتاسيوم (10%KOH) . وفي نفس الوقت زرعت العينات باستخدام العيدان الخشبية المعقمة (Swabs)بأمرارها على سطح أطباق بلاستيكية أو زجاجية معقمة حاوية على الوسط الغذائي SabouraudDextrose Agar(SDA) والمحضر حسب تعليمات الشركة المجهزة Biomerieuxوالمثبتة على العبوة , وعقمت بالمؤصدة بدرجة (121مْ) لمدة (15) دقيقة , باستخدام الطريقة المباشرة للعزل (Direct plate method) (Warcup , 1950) . وحضنت الأطباق عند درجة حرارة28 ±2 مْ ولمدة سبعة أيام مع المتابعة اليومية .

التشخيص العزلات على مستوى النوع :

أتبعت مفاتيح التصنيف المذكورة من قبل(Quinn *et al*., (2002 و(Pitt and Hocking , 1997)في تشخيص عزلات جنس *Aspergillus*وذلك بدراسة الخصائص الشكلية المورفولوجية والمجهرية من حيث شكل المستعمرة ولونها وقوامها ونوع الغزل الفطري والرؤوس الكونيدية وشكل ولون الكونيدات وأبعادها ومن ثم أخذت عينة من كل مستعمرة ولقحت باستخدام تقنية تلقيح الأوساط الزرعية على وسطين زرعين اساسين للتشخيص Czapek Yeast Extract Agar (CZA) & Malt Extract Agar (MEA) وحضنت هذه عند درجة حرارة 25 مْ و 37 مْ,وكذلك شخصت باستخدام تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية (Konemane*t al*., 1978). وبعد ذلك تم تشخيصالعزلات بتقنية سلسة تفاعلات البلمرة PCR تبعاً لطريقة

(Logothetiet *al.*, 2009) وكذلك استخدمتالبوادئPrimersالمقترحة فيها كتشخيص توكيدي للأنواع جنس *Aspergillus*spp.

أستخلاصDNA:أستخلص الحامض النووي DNA من العزلات المنتخبةعلى الوسط الزرعي الصلب (SDA) , ثم أتبعت الخطوات المثبتة والمرفقة مع العدة المجهزة منالشركة (Bioneer) لاستخلاص DNA. وبعد ذلك مزج جزء منه مع صبغة بروميد الاثيديومEthidium bromide على هلام الأكاروزالمحضر بتركيز 1.5 % في (100) مل محلول دارئ TEB Buffer بتركيز (1X)ملى مولار المجهز من شركة (Bio Basic) لغرض التأكد من نقاوته بطريقة الترحيل الكهربائي .

تحضير محلول التفاعل لسلسلة تفاعلات البلمرة PCR: حُضر مزيج التفاعل (بحجم 50مايكرو ليتر) لسلسلة تفاعلات البلمرة بأتباع الخطوات المثبتة والمرفقة مع العدة AccuPower® PCR PerMixالمجهزة من الشركة (Bioneer)وكالاتي:

حُضر مزيج التفاعلفي أنابيب AccuPower® PCR PerMix tube الحاوية على مكونات تفاعل أنزيم البلمرة مع إضافة المكونات الاخرى لمزيج التفاعل. للجينات الاربعة الخاصة بالأنواع جنس .spp *Aspegillus* قد تم تجهيزها من شركة (Bioneer). بعد إكمال تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة تم غلق الأنابيب مع المزج بعناية بجهاز Vortex لمدة 5 ثوان , ونقلت الأنابيب الى جهاز المضخم الحراري Thermocyclerمن نوع Gencyclerلتفاعل أنزيم البلمرة لأجراء عملية التضخيم DNA Amplifation)DNA)بعد أن تم برمجته على وفق الظروف المثلى للدورات الحرارية Thermo cycling conditionsطبقاً لما ورد في (Logothetic*et al.*, 2009),

البادئات الDNA (DNAPrimers)

نوع البادئ	تسلسل القواعد النيتروجينية ('5→3')		حجم ناتج التضخيم
PEPI	F	CCA GTA CGT TGG TCT TCA ACT C	150 bp
	R	CAT CAC CAT GAC CAT CGT TTG CT	
PEPO	F	CGA CGT CTA CAA GCC TTC TGG AAA	200 bp
	R	CAG ACC GTC ATT GTT CTT GTC	
PEX	F	TAT GTC TTC CCC TGC TCC	250 bp
	R	CTA TGC CTG AGG GGC GAA	
ATA	F	CTA TTG TAC CTT GTT GCT TCG GCG	450bp
	R	AGT TGC AAA TAA ATG CGT CGG CGG	

الترحيل الكهربائي لناتج تفاعلات البلمرة: مزج (10) مايكرو ليترمن نواتج تضخيم الجينات مع (3) مايكرو ليتر من دارئ التحميل buffer loadingعلى سطح صفيحة زجاجية نظيفة . رفع المزيج بواسطة ماصة دقيقة الى الحفرة المخصصة في هلامالأكاروز بتركيز 1.5 %,حيث رحلت النماذج كهربائياً بفولتية مقدارها 80 فولت وب100 ملي أمبير ولمدة 55 دقيقة لتحديد الحجوم الجزيئةللDNA المستخلص والمضخم والذي يمثل نواتج (PCR).بالمقارنة مع القياسي DNA Ladder(100-2000 bp), وبعد ذلكورفعت صفيحة الهلام

من الجهازوعرضتللأشعة فوق البنفسجية بطول موجي (320) نانوميتر بواسطة صندوق الأشعة فوق البنفسجية , والتقطت صورة الهلام باستخدام كاميرا .

٣.حساب حساسية وخصوصية الاختبارات التشخيص :تم تقدير حساسية الاختبارات Sensitivity وخصوصيتهSpecificityبالاعتماد على (Thrusfield , 1986) وبالشكل التالي :

الفحص المجهري (KOH)	نتائج الزرع الفطري		المجموع
	Positive	**Negative**	
Positive	A	B	a + b
Negative	C	D	c + d
المجموع	a + c	b + d	a+c+b+d

الحساسية = وهي قابلية الاختبار على الكشف عن حالات الموجبة للنمو الفطري وتحسب بالمعادلة التالية : a/(c+a) الخصوصية = وهي قابلية الاختبار على الكشف عن الحالات السالبة للنمو الفطري وتحسب بالمعادلة التالية : d/(d+b) .

النتائج والمناقشة

اولاً : أظهرت نتائج الفحص المجهري المباشر(10%)KOH نتيجة موجبة لتحري الأولي عن جنس *Aspergillus*في (36) عينة قشعمقابل (370)عينة سالبة من المجموع الكلي للعينات والبالغ (406) عينة قشع , وتم اختبار حساسية الفحص بالمقارنة بنتائج الزرع المختبري . فبلغت نسبة حساسية الفحص المجهري المباشر (7.29 %), في حين بلغت خصوصية الفحص (90.64 %)وكما مبين في الجدول (4) . جاءت النتائج مطابقة معما توصلت اليه(Al-Ameri, 2005) في كون الفحص المجهري المباشر لا يمكن الاعتماد عليه في اختبار كشف عن وجود أو عدم وجود الفطريات (Niazi , 2000)وأن ظهور بعض نتائج السالبة أو الموجبة كاذبة بالفحص المجهري المباشر يعود إلى عدة أسباب منها ظهور فطريات أخرى مثل *Pseudallescheria sp*. و *Scopulariopsis sp*. التي قد تربك الفحص أو تعطي تشخيصاً خاطئاً , وقد تكون ناتجة عن البكتيريا اللاهوائية وليست أصابه فطرية , أو وجود المايكوبلازم وغيرها من المسببات , إضافة إلى احتمالية حدوث الخطأ التجريبي , لذا فأن عزل الفطر على الوسط الزرعي يوفر وسيلة مفيدة جدا من أجل التشخيص (Batra *et al.*,2006).

جدول (4): نتائج الفحص المجهري والزرع الفطري لعينات القشع .

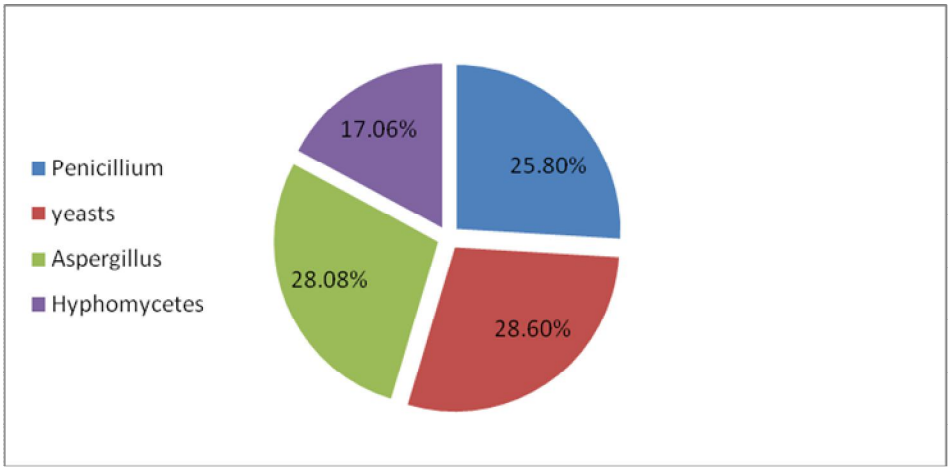
الفحص المجهري المباشر (KOH)	نتائج الزرع الفطري		المجموع
	Positive	**Negative**	
Positive	7	29	36
Negative	89	281	370
المجموع	96	310	406

ثانياً :نسبة الإصابة بفطر *Aspergillus* وأنواعه المعزولة

اعتماداً على نتائج الفحوصات المظهرية , المزرعية منهاوالمجهريةفي تشخيص العزلات اثبتت (107) عزلة عائديتهاإلى حنس*Aspergillus*تعود إلى (96) عينة قشع ,وذلك بعد تنميتهاعلى وسط (CZA) وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفية المعتمدة في عدد من المراجع ومنها Quinn *et al.*, (2002) و(Pitt and Hocking, (1997,وبذلك يكون جنس.*Aspergillus* sppقد شكل نسبة ظهور (26.35 %) من المجموع

الكلي للعينات والبالغة (406) عينة , وبنسبة تكرار (28.08%) من المجموع الكلي للعزلات الفطرية والبالغة (381) عزلةفطرية .وهذا بدوره يعتبر مؤشر عامل خطورة صحية قد يكون له دورُ في تفاقم الحالات المرضية الرئيسة وظهور أعراض التحسس لدى مراجعي العيادة الاستشارية للأمراض التنفسية والصدرية , حيث كان ثاني أكثر الأجناستكراراً بعد الخمائر مما يشير كذلك إلى دورها في إحداث التهاب الجهاز التنفسي الفطري والذي قد يكون محدد أو أدنى مما للفطريات الخيطية خاصة وأن خميرة *Candida* من المستوطنات الطبيعية لتجويف المجاري التنفسية مما يفسر ظهور الخمائر بأعداد عالية (الشبلي,2006). كما موضح بالشكل (1) .

وأن نسبة العزل لجنس*Aspergillus*المسجلة بالدراسة الحالية سبق وأن سجلت في دراسة (Al-Ameri(2005 والتي أجرت دراسة عن مسببات الالتهابات الرئوية في محافظة الديوانية , كذلك تتفق النتائج مع دراسة (الغالي, 2006) و(الجناحي , 2012) , وقد بينت العديد من الدراسات حول العالم أن الفطريات الرمية هي التي تسود في الجهاز التنفسي ومنها ما ذكره (عبود , 2006) ويعود ذلك إلى طبيعة نمو هذه الأحياء حيث تعتبر القناة التنفسية مكان مناسب لنموها فهو مكان رطب ودرجة حرارة مناسبة مع وجود المغذيات فضلاً عن العوامل المؤهلة كانسداد الرئوي المزمن و السكري و الاستخدام المفرط للمضادات الحياتية (LeonarRocio*et al*., 2011)

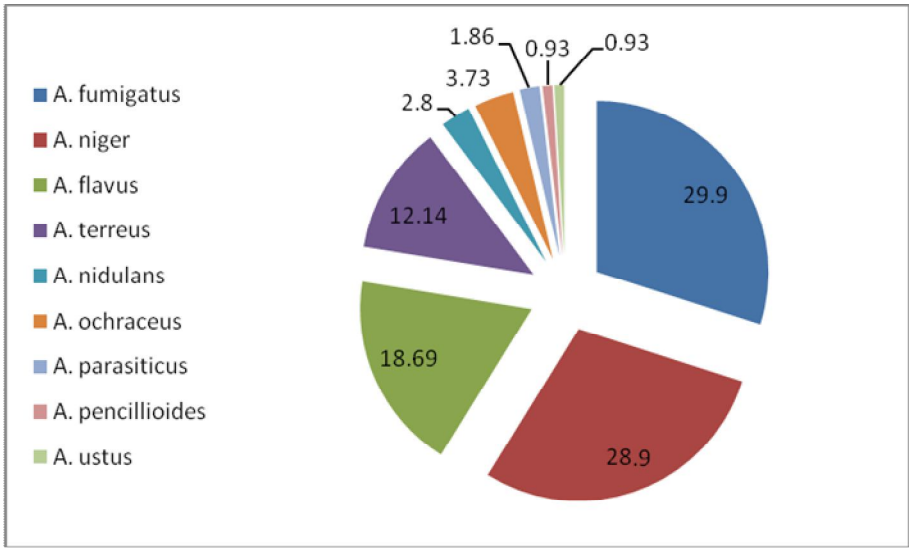


الشكل (1) النسبة المئوية لتردد الإصابة الفطرية في عينات القشع .

أما على المستوى الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* سجل الفطر *A.fumigatus* أعلى نسبة مئوية كانت للإصابة وكانت(29.9%) وتلاه الفطر *A.niger* بنسبة (28.9%) في حين سجل*A. flavus* و *A. terreus* نسبة (18.69%)و(12.14%) على التوالي , وأن سيادة هذه الأنواع الاربعة جاءت مطابقة لما وجدته (Al-Ameri(2005, كما تم في هذه الدراسة عزل الفطريات *A. ochraceus* , *A. parasiticus* للمرة الأولى على المستوى المحلي في عينات القشع وبذات النسبة التي سجلها عبود (2006) في محافظة ذي قار, وكذلك سجل أقل نسبة عزل للنوعين *A. ustus*, *A.penicillioides*(0.93%)وللمرة الأولى في محافظة الديوانية من حالات التهاب الجهاز التنفسي , ومن الضروري إحداث الإصابة التجريبية بهذه الفطريات مستقبلاً للتأكد من أمراضيته وعومل الضراوة التي تمتلكها . كما مبين بالجدول (١) والشكل (2).

جدول (١) : المجموع الكلي والنسبة المئوية للأنواع جنس *Aspergillus* المعزولة خلال الدراسة من المرضى القناة التنفسية

أنواع جنس*Aspergillus*المعزولةMicheliexLink	عدد العزلات	النسبة المئوية للتكرار(%)
AspergillusfumigatusFersenium	32	29.90
Aspergillusniger Van Tieghen.	31	28.97
Aspergillusflavus Link & Fries.	20	18.69
Aspergillusterreus Thon.	13	12.14
Aspergillusnidulans(Eidam) Wint.	3	2.80
AspergillusochraceusK.Wilh.	4	3.73
AspergillusparasiticusSpeare.	2	1.86
AspergilluspenicillioidesSpegazzini.	1	0.93
Aspergillusustus(Bainier)Thom & Church.	1	0.93
مجموع العزلات الكلي	107	100

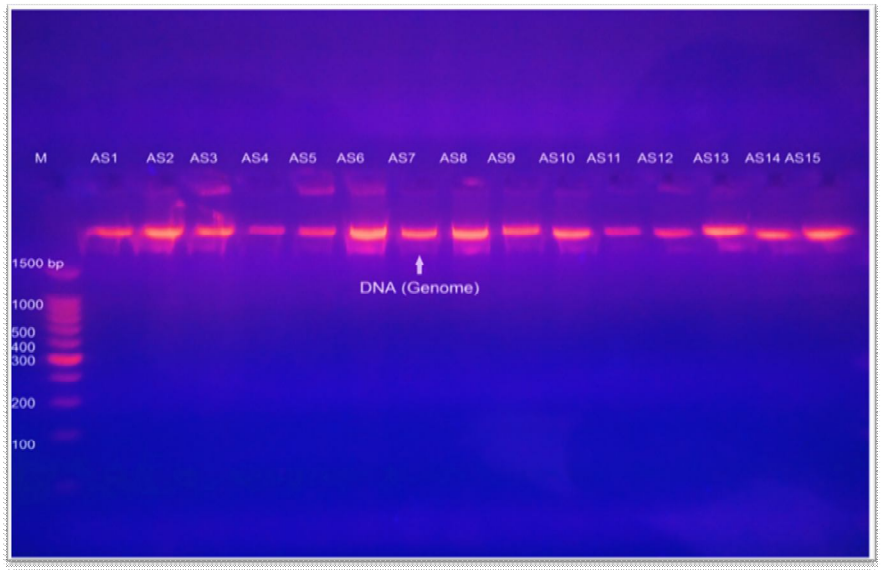


الشكل (2) النسبة المئوية لتردد الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* في عينات القشع .

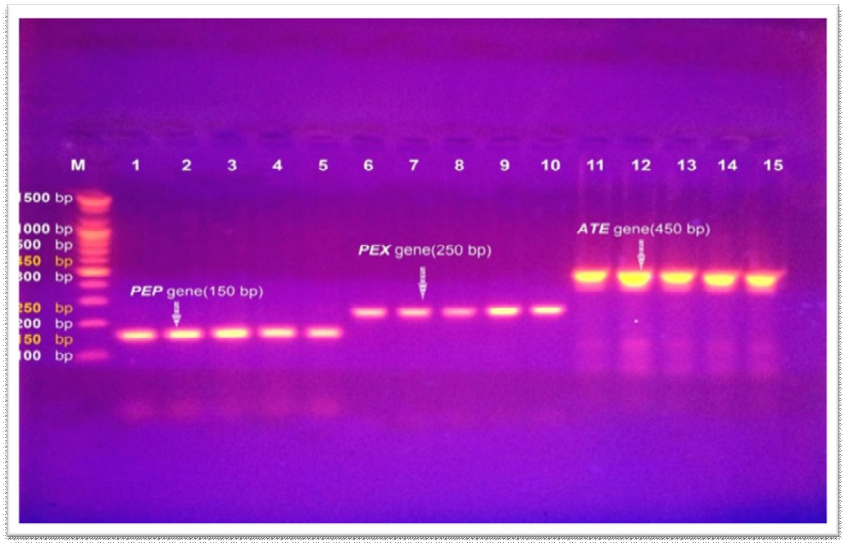
ثالثاً : التشخيص ألتوكيدي بطريقة الPCR لبعض العزلات :

أن اعتماد الطريقة التقليدية لتشخيص الأعفان ومنها جنس*Aspergillus* spp. , والقائمة على تحديد المعايير المورفولوجية , لم تعد كافية بسب تداخل هذه المعايير مع غيرها من الأنواع التي تصنف ضمن الانواع الأخرى لجنس *Aspergillus* والتي تزيد عن 300 نوع (Samson , 1994) , فضلاً عن التباين الوراثي فيما بينها , فمزارع الأحياء المجهرية وإن انتمت إلى المجموعة نفسها تتباين وراثياً في خصائص

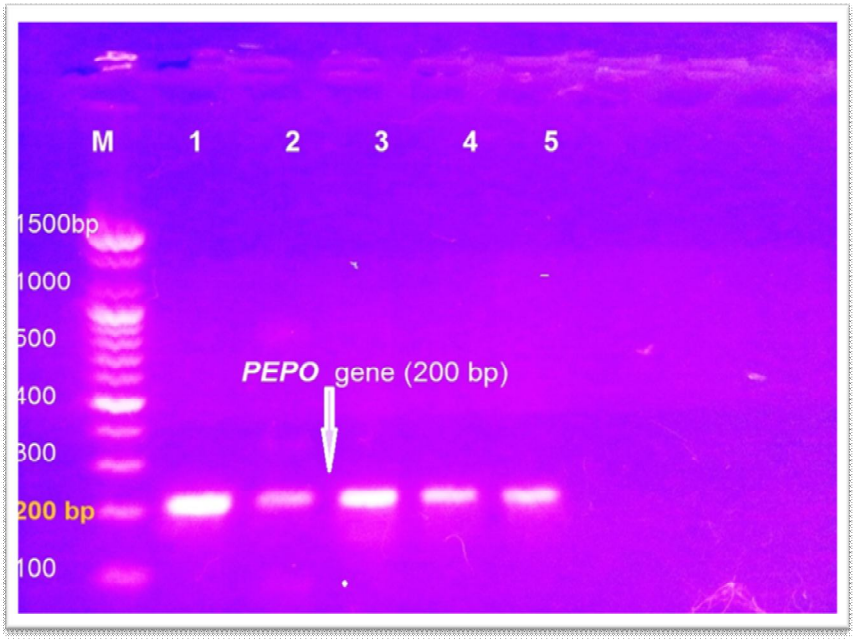
نموها وصفاتها المورفولوجية , ولا يعني التباين بالضرورة الاختلاف في البناء الوراثي لاسيما بين المزارع والعزلات التي تنتمي إلى الجنس والنوع ذاتها بل قد يكون نابع عن استجابة المزارع أو العزلات للظروف البيئية (محي الدين وجيجان , 2013) . لذا فقد قمنا في هذه الدراسة بتشخيص الجزيئي لما يربو عن (20) عزلة نقية عائدة إلى *A. niger* , *A. fumigatus* , *A. flavus* , *A. terreus* فوجد أن حجوم نواتج تضخيم للجينات المدروسة RFLP للأنواع المنتخبة قد بلغت 450 , 250 , 200 , 150 زوج قاعدة نيتروجينية لكل نوع على التوالي , مما أعطى فرصة التميز بينها . كما موضح فب الشكل (4) و (5). واتفقت نتائج هذه الدراسة مع ما وجده (Logotheticet *al*., 2009)الذي تمكن من دراسة (59) عزلة من جنس *Aspergillus* .spp تعود إلىستة أنواع مختلفة , من بينها (13) عزلة تعود الى *A.niger* و(17) عزلة *A. fumigatus* و (16) عزلة*A. flavus* و (8) عزلات*A. terreus*وباستعمالبوادئ لجينات معينة Primers لجينات معينة , انه يمكن التميز بين هذه الأنواع بتحليل نواتج تضخيم amplicons هذه الجينات بطريقة PCR من خلال الترحيل الكهربائي.



الشكل(3) :: الترحيل الكهربائيلل DNA على هلام الاكاروز .



الشكل (4) نواتج تضخيم الجينات (*ATE* , *PEX* , *PEP*) لعزلات الفطر *Aspergillus* spp. بأستعمال تقنية PCR .العزلات (1,2,3,4,5) العائدة للفطر *A. niger* أظهرت نتيجة موجبة لجين *PEP* , العزلات(6.7.8.9.10) العائدة للفطر*A.fumigatus* أظهرت نتيجة موجبة لجين *PEX*, والعزلات(11,12,13,14,15) العائدة للفطر *A.terreus* أظهرت نتيجة موجبة لجين *ATE*



الشكل (5): نواتج تضخيم الجين (*PEPO*) لعزلات الفطر *Asp. flavus* بأستعمال تقنيةSingle PCR .

المصادر :

أسماعيل , محمد طاهر ,عبير الكفري (2008).كتاب الطفيليات والفطور الطبية , منشورات جامعة دمشق – كلية الطب البشري .(458صفحة).

الجناحي , فرقد عبد الإله الجناحي (2012) . تأثير مستخلصات نبات البنبر*Cordiamyxa*في نمو الفطريات المعزولةمن مرضى الأخماج الرئوية في مدينة الديوانية . رسالة ماجستير, كليـــة التربيـــة –جامعـــة القادسية .

الشبلي , ماجد كاظم عبود(2006) . تأثيرات العزلات السريرية لخميرة المبيضـــات *Candida albicans* دراسة بايلوجيةونسيجية مرضية في محافظة الديوانية . أطروحة دكتوراه-جامعة القادسية .

شريف , فياض محمد شريف (2012) . الفطريات الطبية . الذاكرة للطباعة والنشر . (468 صفحة).

الغالبي , حيدر حبيب حطيحط (2006). التأثيراتالخلطية لبعض المضادات الفطرية ومستخلصات نبات الثوم والأس تجاهبعض الفطريات الرئوية الأنتهازية . رسالة ماجستير , كلية التربية – جامعة القادسية .

عبود , ميثاق ستار (2006) . دراسة بعض الجوانب البايولوجية للفطريات والخمائر الأنتهازية المعزولة من عينات سريرية مختلفة من مستشفى الناصرية العام – محافظة ذي قار . رسالة ماجستير , كلية التربية – جامعة ذي قار.

محي الدين , محمد عمر ورقيباء علي جيجان (2013). إنتاج أنزيم POLGALACTYRONASE مـــن عفن *Aspergillusniger*المتحمل للحرارة والمنتجة للأنزيم وتشخيص العزلة الأكثر أنتاجـــاً. مجلـــة العلوم الزراعية العراقية –العدد1-المجلد 44-ص97-105 .

Al-Ameri,N.O.(2005).Astudy of taxonomy Epidemiolory of pulumonarymycoticin fectionin Al-Qadisyia Province .Ph.D.Thesis.Collage of Education -Al-QadisyiaUniversit

Alpsoy, L.(2010). Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities . Afr . J. Biotechl.,9(17);2474-2481p.

Batra, V.,B. Asmar and J. Y. Ang. (2006). Aspergillosis. eMedicine D:/Medical Mycology/eMedicine-Aspergillosis Article by VandanaBatra MD.htm.

Collee, J.G. ; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. & Simons ,A.(1996). Practical medical Microbiology .4th ed. Churchill Livingston. New York .978p.

Ines, F.M.; Almedia,H.M.; Lourdesrdes, M.;Sara,M.O.;Santos,M.S.; Freitas, J.M.;Gasper, N.C.& Fernando, (2011). Mycobiot and aflatoxin B1 In feed for farmed sea Bass

.Koneman, E.W.;Roberts, g.d.;& Wright , S.H.(1978). Practical Laboratory mycology . The Williams & Wilkins Company Baltmore, U.S.A.

Leonar, R.E. C.& Rocio, o. (2011). Malaurtiration and Gastrointestestional and Respiratory Infection in children : Apublic healthy problem. 1174-1205p.

Logotheti,M.;A.Tseleni ; G.,Arseenis, and N., Legakis. (2009). Multiplex PCR for the discriminatioation of A. fumigatus A. flavus ,A, niger and A. terreus. Journal of Micobiologgical methods . 79;209-211p.

Niazi ,A.D.(2000). Statistical Analysis In Medical Research . Republic of Iraq . AL.-Nedrien university.

Obrien , H. E. , J. L. Parrent, J. A. Jackson, J-M. Moncalvo and R. Vilgales . (2005). Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples . Appl Environ Microbiol.,71(9):5544-5550..

Pitt, J.I. and A.D.,Hocking (1997) . Fungi and food Spoilage. Blackie Academic professional, 366-368p.

Prescott, C.M.;Harley , J.P.;Klein ,D.A.(2005). Micobiology . 6thedn ., Mcgraw-Hill Companies., U.S.A. 924p

Quinn, P.J.; Carter . M.G.; markey , B.&Carter , G.R.(2002). Clinical Veterinary Microbiology, M. Wlof, London.

Samson, R.A.(1994). Current systematics of the genus *Aspergillus.*In the genus *Aspergillus* . From Taxonomy and to industrial Application . Plenum press, London ; 261-279.

Thrusfield, M.(1986). Veterinary epidemiolory, Butterworth &Co.Ltd, London

Wilkins, R.L.:Dextex , J.R. and Gold , P.M. (2007). Respiratory Disease Case Study Approach to Patient Care. 3rded.F.A.Davis Company. California.

Warcup, J.H.(1950). The soid plate method for Isolation of fungi from soid. Nature Iondo. 66:118- 120p.