

## بررسی تاثیر آنتی ژن های کیست هیداتید بر سلول های سرطانی هلا

نصیر عارف خواه<sup>۱</sup>، دکتر هدایت اله شیرزاد<sup>۲</sup>، فاطمه موسوی<sup>۳</sup>، سیمین تقی پور<sup>۱</sup>، شیما دانش پور<sup>۳</sup>

دکتر حسین یوسفی دارانی<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup>گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۲</sup>گروه ایمنولوژی و میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۳</sup>گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲۸ اصلاح نهایی: ۹۲/۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۶

### چکیده:

زمینه و هدف: شیوع کیست هیداتیک در بیماران که به سرطان مبتلا هستند در مقایسه با جمعیت سالم پایین تر است. در این مطالعه اثر آنتی ژن های دفعی ترشحی، مایع کیست هیداتیک و آنتی ژن خام بر روی رشد سلول های سرطانی هلا بررسی شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آنتی ژن های دفعی ترشحی، مایع کیست هیداتیک و آنتی ژن خام از کیست های هیداتید تهیه و فرکشن های آنها با استفاده از سولفات آمونیوم جدا سازی شدند. این آنتی ژن ها به سلول های هلا اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. تعداد سلول های زنده و مرده در مقایسه با فلاسک کنترل شمارش شد و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون Jonckheere-Terpstra test آنالیز شدند و  $P < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: در سلول هایی که با فرکشن های آنتی ژن های دفعی ترشحی، مایع کیست هیداتیک و آنتی ژن خام تیمار شده بودند هر سه فرکشن در مقایسه با فلاسک شاهد به صورت معنی داری باعث کاهش رشد سلول های سرطانی شدند و فرکشن آنتی ژن خام به صورت معنی داری باعث مرگ سلول های سرطانی گردید. نتیجه گیری: آنتی ژن های مختلف کیست هیداتیک باعث مرگ سلولی در سلول های هلا می شوند؛ لذا پیشنهاد می گردد در مورد خاصیت ضد سرطانی این آنتی ژن ها تحقیقات بیشتری صورت گیرد.

واژه های کلیدی: کیست هیداتیک، آنتی ژن، سرطان، سلول های هلا.

### مقدمه:

(۳-۹)، توکسو پلازما گوندی (*Toxoplasma gondii*) (۱۰-۱۶)، توکسو کاراکنیس (*Toxocara canis*) (۱۷)، آکانتامبا کاستلانی (۱۸،۱۹) و پلاسمودیوم یونلی (۲۰) در حیوانات آزمایشگاهی نشان داده شده است. بررسی های در محیط *in vitro* نیز فعالیت ضد سرطانی انگل هایی مانند پروتواسکولکس کیست هیداتیک، تریپانوزوما کروزوی و توکسوپلازما گوندی تأیید نموده اند (۲۱،۱۷،۸،۲). در مطالعات قبلی ما نشان داده شد که پروتواسکولکس کیست هیداتیک تکثیر سلول های WEHI-164 و BHK را مهار می کند و همچنین این توانایی را دارد تا باعث مرگ سلولی در سلول های WEHI-164 در محیط کشت سلولی در آزمایشگاه شود

کیست هیداتیک مرحل لاروی کرم اکیوکوکوس گرانولوس (*Echinococcus granulosus*) است که عامل بیماری هیداتیدوز در انسان و حیوانات می باشد. این بیماری به عنوان یکی از مهمترین بیماری های مشترک که پستانداران مختلفی را در سیکل زندگی اش درگیر می کند، محسوب می گردد (۱). شیوع کیست هیداتیک در بیماران که به سرطان مبتلا بودند در مقایسه با جمعیت نرمال پایین تر بوده است (۱). ما در مطالعات قبلی نشان دادیم که پروتواسکولکس (*Protoscolices*) کیست هیداتیک بر رشد سلول های سرطانی در محیط کشت اثر می گذارد (۲). همچنین فعالیت ضد سرطانی انگل های مثل تریپانوزوما کروزوی (*Trypanosoma-cruzi*)

\*نویسنده مسئول: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، تلفن: ۰۹۱۳۳۸۱۲۸۰۵، E-mail: [yousofidarani@gmail.com](mailto:yousofidarani@gmail.com)

آمونیم ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد استفاده و برای اینکه سولفات آمونیم از فرکشن ها خارج شود، از کیسه های دیالیز استفاده شد.

کشت سلولی مطابق آنچه قبلاً منتشر شده انجام گردید (۲). برای انجام آزمایش در چهار فلاسک به هر کدام ۷ میلی لیتر محیط کشت DMEM و ۱۰۰۰۰۰ سلول زنده اضافه شد. بعد از یک تا دو ساعت که سلول ها خوب در فلاسک جا گرفتند، ۲۵۰ لانداز فرکشن های آنتی ژنی که با سولفات آمونیم ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد تخلیص شده بودند، اضافه شد. به فلاسک چهارم ۲۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به عنوان شاهد منفی اضافه شد. همه فلاسک ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار قرار داده و سلول های زنده و مرده زیر میکروسکوپ شمارش شدند. در نهایت نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون Jonckheere-Terpstra test آنالیز آماری انجام گرفت.

### یافته ها:

نتایج این تحقیق نشان داد که بین سلول های مرده در فلاسک های ذکر شده، در مقایسه با فلاسک شاهد تفاوت معنی داری وجود دارد و در فرکشن A2 و A3 سلول های مرده بیشتر بوده است. علاوه بر این تعداد سلول های زنده در فلاسک های ذکر شد، در مقایسه با فلاسک تفاوت معنی داری داشت ( $P < 0.05$ ). همچنین فرکشن A2 و A3 بیشتر رشد سلول های سرطانی هلا را مهار کردند (جدول شماره ۱). موقعی که فرکشن های

(۲)؛ لذا به منظور شناسایی آنتی ژنی هایی از کیست هیداتیک که باعث مهار رشد سلول های سرطانی می شود، در این پژوهش اثر فرکشن های آنتی ژن های دفعی ترشحی، مایع کیست هیداتیک و آنتی ژن خام پروتواسکولکس بر روی رشد سلول های هلا مورد بررسی قرار گرفته است.

### روش بررسی:

در این مطالعه تجربی کیست هیداتید از گوسفند های آلوده از کشتارگاه اصفهان جمع آوری شد. بعد از اینکه با الکل سطح روی کیست ها ضدعفونی شد، مایع کیست هیداتید با سرنگ آسپیره و زیر میکروسکوپ جهت پیدا کردن پروتواسکولکس بررسی شد. مایع کیست های حاوی پروتواسکولکس در لوله های فالكون جمع آوری و به مدت ۲ دقیقه ۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. مایع بالای که شفاف و بی رنگ بود به عنوان مایع کیست هیداتیک در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. به رسوب که حاوی پروتواسکولکس بود ۵ سی سی محیط کشت DMEM اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد و سپس سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به عنوان آنتی ژن دفعی ترشحی پروتواسکولکس در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. مقداری از پروتواسکولکس ها نیز سونیکه گردید و به عنوان آنتی ژن های خام در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. در نهایت برای تهیه فرکشن ها از سولفات

**جدول شماره ۱: مقایسه آماری سلول های زنده و مرده (ضرب در ۱۰۰۰۰) رده سلولی Hela متأثر از فرکشن آنتی ژن خام خالص سازی شده با سولفات آمونیم ۲۰٪ (A1)، ۴۰٪ (A2) و ۶۰٪ (A3)**

گروه	میانگین و انحراف معیار سلول های زنده (X10000)	میانگین و انحراف معیار سلول های مرده (X10000)
شاهد منفی	۱۲/۶۷ ± ۰/۵۷۷	۲ ± ۰
فرکشن A1	۹/۱۷ ± ۰/۷۶۴	۳/۵ ± ۰/۵
فرکشن A2	۸ ± ۱	۳/۶۷ ± ۰/۵۷۷
فرکشن A3	۸ ± ۱	۳/۶۷ ± ۰/۵۷۷

شده با فلاسک شاهد وجود نداشت ( $P > 0/05$ ) (جدول شماره ۲). سرانجام موقعی که فرکشن های آنتی ژن مایع کیست هیداتیک که با سولفات آمونیوم ۲۰ درصد (C1)، ۴۰ درصد (C2) یا ۶۰ درصد (C3) تخلیص شده بودند به سلول های هلا اضافه گردیدند، مشخص شد که تعداد سلول های زنده در فلاسک ها در مقایسه با فلاسک شاهد تفاوت معنی داری دارد ( $P < 0/05$ )، ولی تعداد سلول های مرده تفاوت معنی داری نشان نداده است ( $P > 0/05$ ) (جدول شماره ۳).

آنتی ژن دفعی ترشچی که با سولفات آمونیوم ۲۰ درصد (B1)، ۴۰ درصد (B2) و ۶۰ درصد (B3) تخلیص شده بود. به سلول های هلا اضافه گردیدند. نتایج آزمون آماری نشان داد که سلول های زنده در فلاسک ها در مقایسه با فلاسک شاهد تفاوت معنی داری دارند ( $P < 0/05$ ) و کمترین تعداد سلول زنده در فرکشن B2 قرار داشت. به عبارت دیگر فرکشن B2 بیشتر توانسته بود رشد سلول های سرطانی را مهار کند، ولی تفاوت معنی داری بین سلول های مرده در فلاسک های ذکر

**جدول شماره ۲: مقایسه آماری سلول های زنده و مرده (ضرب در ۱۰۰۰۰) رده سلولی Hela متأثر از فرکشن آنتی ژن دفعی ترشچی پروتواسکولکس کیست هیداتیک خالص سازی شده با سولفات آمونیوم ۲۰٪ (B1)، ۴۰٪ (B2) و ۶۰٪ (B3)**

گروه	میانگین و انحراف معیار سلول های زنده (X10000)	میانگین و انحراف معیار سلول های مرده (X10000)
شاهد منفی	$12/67 \pm 0/577$	$2 \pm 0$
فرکشن B1	$9/17 \pm 0/764$	$3/5 \pm 0/5$
فرکشن B2	$6/66 \pm 0/577$	$3/33 \pm 0/577$
فرکشن B3	$8/17 \pm 0/764$	$3/33 \pm 0/577$

**جدول شماره ۳: مقایسه آماری سلول های زنده و مرده (ضرب در ۱۰۰۰۰) رده سلولی Hela متأثر از فرکشن آنتی ژن مایع کیست خالص سازی شد با سولفات آمونیوم ۲۰٪ (C1)، ۴۰٪ (C2) و ۶۰٪ (C3)**

گروه	میانگین و انحراف معیار سلول های زنده (X10000)	میانگین و انحراف معیار سلول های مرده (X10000)
شاهد منفی	$11 \pm 1$	$1/33 \pm 0/577$
فرکشن C1	$10/33 \pm 0/577$	$1/833 \pm 0/764$
فرکشن C2	$11 \pm 1$	$1/667 \pm 0/288$
فرکشن C3	$9/5 \pm 0/5$	$1/83 \pm 0/288$

## بحث:

نتایج بررسی ها نشان داد که در سلول های تیمار شده با فرکشن آنتی ژن خام، تعداد سلول های مرده در مقایسه با فلاسک شاهد افزایش یافته است. علاوه بر این تعداد سلول های زنده در مقایسه با فلاسک شاهد نیز کاهش نشان داده است ولی در سلول های تیمار شده با

فرکشن های مایع کیست هیداتید و آنتی ژن دفعی ترشچی تعداد سلول های مرده با فلاسک شاهد تفاوت معنی داری نداشته است؛ اما هر دو فرکشن توانسته بودند رشد سلول های زنده را در مقایسه با فلاسک شاهد مهار نمایند. نتایج اثر فرکشن آنتی ژن خام مطالعات ما با

محیط کشت کاهش می دهد (۲۶). در مطالعه دیگر اثرات تولیدات دفعی ترشچی تریکوسترونژیلوس فرمیس روی رشد سلول های مختلف بررسی و نشان داده شده است که این تولیدات، تعداد سه تا از سلول های اپیتلیال روده ای را افزایش می دهند. از سویی این تولیدات تکثیر سلول های اپیتلیال تخمدان و فیروبلاست را مهار کرده و در نهایت هیچ اثری روی رشد هیاتوسیت ها نداشته اند (۲۷).

### نتیجه گیری:

با بررسی یافته های این مطالعه و سایر مطالعات بر روی اثر آنتی ژن های انگلی روی رشد سلول ها، می توان نتیجه گرفت که آنتی ژن های انگل کیست هیداتیک مانع رشد سلول های مختلف در محیط کشت آزمایشگاه می شوند. با این حال مکانیسم هایی که ممکن است در این روند درگیر باشند ناشناخته است و مطالعات بیشتری برای کشف این مکانیسم ها توصیه می شود.

### تشکر و قدردانی:

هزینه انجام این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تأمین گردیده است؛ که بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه و کلیه کسانی که ما را در انجام این طرح یاری رساندند تقدیر و تشکر به عمل می آید.

مطالعات قبلی یعنی مرگ سلولی در سلول های فایروسارکومای WHEI-164 توسط پروتواسکولکس کیست هیداتید هماهنگی دارد (۲). علاوه بر این هر سه آنتی ژن به صورت معنی داری باعث کاهش رشد سلول های سرطانی شدند. اثر بعضی از آنتی ژن های انگلی روی مهار سلول های سرطانی در بررسی های دیگر نشان داده شده است. به طور مثال پروتئین gp82 باعث القای مرگ سلولی در سلول های ملانوما می شود (۲۲). در بررسی های دیگر نشان داده شد که بعضی از آنتی ژن ها اثر مهاری یا تحریکی روی سلول های مشخصی دارند. علاوه بر این بعضی آنتی ژن ها هیچ اثری روی تکثیر یا مرگ سلول ها در محیط کشت ندارند؛ به عنوان مثال مایع کیست هیداتید و آنتی ژن B اثر فرا تنظیمی روی بیان CD86 و اثر فرو تنظیمی روی بیان CD1a دارند (۲۳). همچنین اثر مایع کیست هیداتید روی تمایز سلول های مونوسیت انسانی به دندرتیک سل نشان داده که حضور مایع کیست هیداتید بیان CD14 را افزایش می دهد و بیان CD1a را پایین می آورد (۲۴).

از سویی تولیدات دفعی ترشچی لارو اکینوкокوس مولتی لوکولاریس باعث القا آپوپتوز در سلول های دندرتیک در *in vitro* می شود (۲۵). همچنین تولیدات آنتی ژن های دفعی ترشچی نماتود روده ای و نماتوديروس باتوس، تعداد سلول های اپیتلیال را در

### منابع:

- Hemmings S, Conner A, Maffulli N, Morrissey D. Cardiovascular disease risk factors in adolescent British South Asians and whites: a pilot study. *Postgrad Med.* 2011 Mar; 123(2): 104-11.
- Magkos F, Patterson BW, Mohammed BS, Mittendorfer B. A single 1-h bout of evening exercise increases basal FFA flux without affecting VLDL-triglyceride and VLDL-apolipoprotein B-100 kinetics in untrained lean men. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Jun; 292(6): E1568-74.
- Magkos F, Tsekouras YE, Prentzas KI, Basioukas KN, Matsama SG, Yanni AE, et al. Acute exercise-induced changes in basal VLDL-triglyceride kinetics leading to hypotriglyceridemia manifest more readily after resistance than endurance exercise. *J Appl Physiol.* 2008 Oct; 105(4): 1228-36.
- Harrison M, O'Gorman DJ, McCaffrey N, Hamilton MT, Zderic TW, Carson BP, et al. Influence of acute exercise with and without carbohydrate replacement on postprandial lipid metabolism. *J Appl Physiol.* 2009 Mar; 106(3): 943-9.

5. Wooten JS, Biggerstaff KD, Ben-Ezra V. Responses of LDL and HDL particle size and distribution to omega-3 fatty acid supplementation and aerobic exercise. *J Appl Physiol*. 2009 Sep; 107(3): 794-800.
6. Jafari A, Saeidi S, Zekri R, Malekirad A. Comparison of static and dynamic resistance exercise effects on some functional cardiovascular indices, plasma lactate and peripheral blood leukocytes in healthy untrained women. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2012 May; 14(1): 66-76.
7. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Cordova A, Pons A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav*. 2005 Jan; 84(1): 1-7.
8. Lira FS, Yamashita AS, Uchida MC, Zanchi NE, Gualano B, Martins E Jr, et al. Low and moderate, rather than high intensity strength exercise induces benefit regarding plasma lipid profile. *Diabetol Metab Syndr*. 2010; 2: 31.
9. Magkos F, Wright DC, Patterson BW, Mohammed BS, Mittendorfer B. Lipid metabolism response to a single, prolonged bout of endurance exercise in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Feb; 290(2): E355-62.
10. Banerjee SK, Maulik SK. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutr J*. 2002 Nov; 1: 4.
11. Emami F, Naghsh tabrizi B. Evaluation the effect Garlet tablet on serum lipid profile. *Med J hamedan Univ Med Sci*. 2006; 13(2): 37-40.
12. Ohaeri OC. Effect of garlic oil on the levels of various enzymes in the serum and tissue of streptozotocin diabetic rats. *Biosci Rep*. 2001 Feb; 21(1): 19-24.
13. Khorri V, Naebpour M, Mir-Abbasi A, Salehi A. The effects of liquid extract of *Allium sativum* on the basic and speed-dependent electrophysiological properties of isolated atrioventricular nodal of rabbit. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2007; 9(3): 57-64
14. Duda G, Suliburska J, Pupek-Musialik D. Effects of short-term garlic supplementation on lipid metabolism and antioxidant status in hypertensive adults. *Pharmacol Rep*. 2008 Mar-Apr; 60(2): 163-70.
15. Powolny AA, Singh SV. Multitargeted prevention and therapy of cancer by diallyl trisulfide and related *Allium* vegetable-derived organosulfur compounds. *Cancer Lett*. 2008 Oct; 269(2): 305-14.
16. Williams MJ, Sutherland WH, McCormick MP, Yeoman DJ, de Jong SA. Aged garlic extract improves endothelial function in men with coronary artery disease. *Phytother Res*. 2005 Apr; 19(4): 314-9.
17. Jeon BD, Kim JH, Ryu S. Differences of garlic powder ingestion and exercise training on blood lipids, MDA and SOD in rats. *Life Sci*. 2009; 19(10): 1337-45.
18. Yoon G. Effect of garlic supplement and exercise on plasma lipid and antioxidant enzyme system in rats. *Korean J Nutr*. 2006; 39(1): 3-10.
19. Koseoglu M, Isleten F, Atay A, Kaplan YC. Effects of acute and subacute garlic supplement administration on serum total antioxidant capacity and lipid parameters in healthy volunteers. *Phytother Res*: 2010 Mar; 24(3): 374-8.
20. Nakhostin-Roohi B, Babaei P, Rahmani-Nia F, Bohlooli S. Effect of vitamin C supplementation on lipid peroxidation, muscle damage and inflammation after 30-min exercise at 75% VO<sub>2</sub>max. *J Sports Med Phys Fitness*. 2008 Jun; 48(2): 217-24.
21. Dill DB, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol*. 1974 Aug; 37(2): 247-8.
22. Tietz NW. *Clinical guide to laboratory tests*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: PA WB Saunders; 1995.

23. Zhang XH, Lowe D, Giles P, Fell S, Connock MJ, Maslin DJ. Gender may affect the action of garlic oil on plasma cholesterol and glucose levels of normal subjects. *J Nutr.* 2001 May; 131(5): 1471-8.
24. Benkeblia N. Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. *Braz Arch Biol Techn.* 2005; 48(5): 753-59.
25. Satitvipawee P, Rawdaree P, Indrabhakti S, Ratanasuwan T, Getn-germ P, Viwatwongkasem C. No effect of garlic extract supplement on serum lipid levels in hypercholesterolemic subjects. *J Med Assoc Thai.* 2003 Aug; 86(8): 750-7.
26. Huby F, Hoste H, Mallet S, Fournel S, Nano JL. Effects of the excretory/secretory products of six nematode species, parasites of the digestive tract, on the proliferation of HT29-D4 and HGT-1 cell lines. *Epithelial Cell Biol.* 1995; 4(4): 156-62.
27. Huby F, Nano JL, Mallet S, Hoste H. Effects of the excretory/secretory products of *Trichostrongylus colubriformis* on the growth of different cell lines. *Int J Parasitol.* 1999 May; 29(5): 697-702.

## Effects of hydatid cyst antigens on Hella cells *in vitro*

Arefkhah N (MSc student)<sup>1</sup>, Shirzad H (PhD)<sup>2</sup>, Mosavi F (MSc)<sup>3</sup>, Taghipor S (MSc)<sup>1</sup>,  
Daneshpor S (MSc)<sup>3</sup>, Yousofi-Darani H (PhD)<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Parasitology and Mycology Dept., Sharekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran;

<sup>2</sup>Immunology Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran;

<sup>3</sup>Parasitology and Mycology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.

Accepted: 28/July/2013      Revised: 1/June/2013      Received: 18/Dec/2012

**Background and aims:** The prevalence of hydatid cyst in patients with cancer is lower than those of normal population. In this study the effect of different extractions of hydatid cyst antigens on growth of Hella cancer cells has been investigated *in vitro*.

**Methods:** In this experimental study, crude protoscolices antigen, protoscolices ES antigen and hydatid fluid antigen were prepared and fractions of these antigens were using salting out method. These fractions were added to Hella cell line and incubated for 48h. Then the number of alive and dead cells was counted in comparison to appropriate control. Analysis of data was carried out using SPSS software and Jonckheere–Terpstra test. P<0.05 was considered as significant.

**Results:** In cell cultures treated with mentioned fractions, all 3 fractions significantly decrease the growth of Hella cancer in comparison to control cell culture. Also fractions of crude protoscolices antigen significantly increase the growth of Hella cancer cells.

**Conclusion:** Different extracts of hydatid cyst antigens inhibitory effects on Hella cell's growth in culture medium. Further work is recommended an anti-cancer property of these antigens.

**Keywords:** Antigene, Cancer, Hydatid cyst, Hella cells.

Cite this article as: Arefkhah N, Shirzad H, Mosavi F, Taghipor S, Daneshpor S, Yousofi-Darani H. Effects of hydatid cyst antigens on Hella cells *in vitro*. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013 Dec, Jan; 15(5): 65-71.

---

**\*Corresponding author:**

Mycology and parasitology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.  
Tel: 00989132812805, yousofidarani@gmail.com