Archive of SID

مقاله پژوهشی

تهیه آنتی ژن متابولیک آسپرژیلوس فومیگاتوس برای تشخیص سرولوژیک آسپرژیلوزیس

سیدحسین میرهندی *، سید امیر غیاثیان **

چکیده:

آسپرژیلوزیس بیماری قارچی سیستمیک مهم با صور بالینی متعدد است که تشخیص بالینی و میکروبیولوژیک آن مشکل بوده اما تشخیص سرولوژیک آن برای بعضی از حالتهای بالینی (آسپرژیلوما و آسپریلوزیس آلرژیک) ساده و مفید است. این مطالعه به منظور تهیه آنتی‌ژن متابولیک و آنتی‌سرم مربوطه از مهمترین عامل آسپرژیلوزیس یعنی آسپرژیلوس فومیگاتوس جهت انجام تستهای سرولوژیک و تشخیص بیماری انجام شد.

قارچ از بیمار جدا گردید و به مدت ۵ هفته در محیط مایع گلوکز پپتون کشت داده شد و پس از جداسازی توده قارچی و پالایش محیط کشت، آنتی‌ژنهای ترشحی قارچ جدا گردیده به حیوان آزمایشگاهی تزریق شد و آنتی‌سرم مربوطه جداسازی گردیده و مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنتی‌ژن تهیه شده قادر به ایمن‌سازی خرگوش بود و با سرم حیوان ایمن شده و نیز با سرم انسان بیمار در تست ایمنودیفوزیون بخوبی واکنش نشان داد. تعداد و الگوی باندها مشابه آنتی‌ژن استاندارد بود.

پس از استانداردسازی این آنتی‌ژن ساخت داخل کشور، می‌توان با هزینه بسیار کمتر و دسترسی ساده‌تر، تست‌های تشخیصی سرولوژیک آسپرژیلوزیس را انجام داده و از معرفهای خارجی بی‌نیاز شد.

کلیدواژه ها: آسپرژیلوزیس / آسپرژیلوس فومیگاتوس / آنتی ژن متابولیک

مقدمه:

آسپرژیلوزیس طیفی از بیماریهایی است که در اثر قارچهای جنس آسپرژیلوس ایجاد می‌شود. آسپرژیلوس‌ها قارچهای رشته‌ای (کپکی) هستند که اسپورهای آنها در طبیعت اعم از خاک، هوا، آب، گیاهان و مواد غذایی پوسیده و تقریباً همه جا وجود داشته و در حالت طبیعی بصورت گندروی (ساپروفیتی) و غیربیماریزا است. اما گاهی در شرایط خاصی که عمدتاً به وضع دفاعی و زمینه‌ای میزبان و تا حدودی به ویرولانس قارچ مربوط است، این قارچ پاتوژن شده و صور بالینی متفاوتی را ایجاد می‌نماید(۱). تا بحال حدود ۱۸۵ گونه آسپرژیلوس شناخته و توصیف شده است(۱) که فقط ۱۲ گونهٔ آن در بیماریزایی انسان و حیوان دخالت داشته و از نمونه‌های بالینی جدا شده است(۲).

چهار حالت بیماریزایی برای آسپرژیلوزیس مطرح است: ۱-مسمومیت ناشی از خوردن سموم قارچی که در اثر خوردن مواد غذایی آلوده به متابولیت‌های سمی آسپرژیلوس(مثل آفلاتوکسین) ایجاد می‌شود و کلاً یک بیماری غیر عفونی است. ۲- آسپرژیلوزیس آلرژیک که به صورتهای مختلف مثل آسم، آلوئولیت آلرژیک

* عضو هیأت علمی گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

** عضو هیأت علمی گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

www.SID.ir

Archive of SID

اکستریتسیک، آسپرژیلوزیس برونشی ریوی آلرژیک و سینوزیت آسپرژیلوسی آلرژیک تظاهر می نماید و در واقع این بیماریها نوعی واکنش ازدیاد حساسیت نسبت به آنتی‌ژنهای متعدد قارچ است. ۳- آسپرژیلوما که در این فرم بیماری در یک حفره از قبل موجود در ریه یا مجاری ریوی (بعلت زمینه‌هایی مثل سل، سارکوئیدوز،فیبروزسیستیک و برونشکتازی)، یک توده قارچی بصورت تومور مانند رشد می‌کند. ۴- آسپرژیلوزیس مهاجم که وضعیتی خطرناک بوده و در افرادی که به عللی نظیر بیماریهای نئوپلاستیک، مصرف کورتیکو استروئیدها، تومورهای اندوکرین، بدخیمی‌های خونی، بیماری گرانولوماتوز مزمن (CGD) و غیره دچار نوتروپنی شده‌اند یا فونکسیون نوتروفیل‌های خون آنها دچار نقص است، رخ می‌دهد.

مشکل اساسی در ارتباط با آسپرژیلوزیس، تشخیص صحیح و بموقع، به منظور اقدام به درمان سریع بیماری است. معتبرترین و اختصاصی‌ترین روش تشخیصی، روشهای قارچ شناسی شامل آزمایش مستقیم، هیستوپاتولوژی و کشت و جداسازی قارچ عامل است ولی این روش‌ها علیرغم اعتبار زیاد، از یک سو از لحاظ نمونه‌برداری بسیار مشکل و پیچیده بوده و مصائب زیادی را برای بیمار و کادر پزشکی بهمراه دارد و از سوی دیگر فاقد حساسیت کافی است و از جانب سوم زمان نسبتاً زیادی را می‌طلبد(۳،۴). از جمله رویکردهای جدید برای تشخیص این بیماریها روشهای سرولوژیک مبتنی بر ردیابی آنتی‌بادی، آنتی ژن یا متابولیت‌های قارچی ایجاد شده در بدن می‌باشد. این روشها به واسطهٔ امکان نمونه برداریهای مکرر و انجام تستهای مختلف،در جهت تشخیص بیماری، پیگیری درمان و نیز ارزیابی پاسخ بیمار به داروهای ضد قارچی بسیار مفید و مؤثرند(۱).

در دو فرم بالینی آسپرژیلوزیس یعنی آسپرژیلوما و آسپرژیلوزیس آلرژیک ردیابی آنتی‌بادی برای تشخیص بیماری بسیار مفید و با ارزش است(۵). در این مطالعه تلاش بر این بوده است که با استفاده از امکانات داخل کشور آنتی‌ژن و آنتی‌سرم لازم برای انجام تستهای سرولوژیک مبتنی بر ردیابی آنتی‌بادی جهت تشخیص بیماریهای فوق‌الذکر تهیه گردد. اینکار در کشورهای توسعه یافته سابقه زیادی دارد(۸-۳،۶) ولی در ایران اولین گامها در این مسیر است و امیدواریم با تلاش بیشتر و طی پژوهش‌های آینده، آنتی‌ژنهای تهیه شده بصورتی قابل عرضه و استاندارد تهیه گردد تا ضمن اینکه موارد بیشتری از بیماری کشف و درمان می‌گردد، از منابع بیگانه در این زمینه نیز بی‌نیاز گردیم.

روش کار:

آسپرژیلوس فومیگاتوس از یک بیمار مبتلا به سینوزیت قارچی جدا شده و با توجه به خصوصیات مرفولوژیکی میکروسکوپی و ماکروسکوپی کلنی تشخیص داده شد. قارچ در محیط پپتون (۱٪) گلوکز (۴٪) آگار (۲٪) کشت، خالص و نگهداری گردید. جهت تهیه سوسپانسیون کونیدیایی، قارچ به همان محیط ولی حاوی ۲٪ گلوکز (جهت تقویت اسپورزایی) منتقل شد. پس از ۵ روز انکوباسیون در C ° ۳۰ و رشد کافی قارچ و ایجاد تعداد بی‌شمار کونیدی در سطح محیط، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۱٪ توئین ۸۰ به سطح محیط اضافه و پس از تکان شدید، اسپورهای(کونیدیها) قارچی جدا شده و پس از شمارش آنها با لام هماسیتومتر به میزان 10^8 عدد در هر میلی‌لیتر تنظیم و در C ° ۴ نگهداری شد.

برای تهیه آنتی‌ژن مقدار ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون فوق‌الذکر به فلاسک ۵ لیتری حاوی ۱۲۵۰ میلی‌لیتر محیط سابورودبرات (Difco 03822-01) اضافه گردیده و پس از چند ثانیه تکان دادن،مدت ۵ هفته در حالت ثابت در حرارت C ° ۳۰ نگهداری شد. پس از اطمینان از عدم آلودگی باکتریایی، قارچهای رشد یافته در سطح محیط، روی کاغذ صافی، جداسازی و پس از اتوکلاو کردن دور ریخته شد. مایع محیط کشت که در واقع حاوی متابولیت‌هاو ترشحات مختلف قارچ است،جهت جداسازی املاح و مواد آلی مربوط به محیط کشت، مدت ۴۸ ساعت در۴درجه سانتیگراد با استفاده از کیسهٔ دیالیز با cut off معادل ۱۲۰۰۰ دالتن (Sigma D-0655) در مقابل آب مقطر دیالیز گردید. سپس جهت تغلیظ و افزایش میزان پروتئین در واحد حجم مدت ۳۶ ساعت در مقابل پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (۱۰٪) (Merck 807491) دیالیز گردیده مدت یک ساعت با دور ۶۰۰۰ و در C ° ۴ سانتریفوژ گردیده و سرانجام از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده با روش برادفورد پروتئین آن اندازه‌گیری وبه میزان۱ میلیگرم در میلی لیتر تنظیم شد

www.SID.ir

Archive of SID

و به عنوان آنتی‌ژن متابولیک در C ° ۲۵- نگهداری گردید.

جهت تهیه سرم فوق ایمن مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از آنتی‌ژن متابولیک با ۰/۵ میلی‌لیتر ادجوان کامل فروند بخوبی مخلوط و بصورت زیر جلدی به خرگوش سفید آزمایشگاهی تزریق شد. همان آنتی‌ژن با ۰/۵ میلی‌لیتر ادجوان ناقص مخلوط و چهار بار طی ۴ هفته به همان خرگوش تزریق گردید و بعد از ۱۰ روز سرم حیوان را جدا کرده و پس از اطمینان از تیتر کافی آنتی‌بادی بعنوان آنتی‌سرم هیپرایمیون در°C ۳۵- نگهداری گردید.

برای انجام تست ایمنودیفوزیون(ID) یک گرم آگاروز را (fluka 5072) در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و به ۵۰ میلی‌لیتر بافروروناL(۱/۴ گرم دی‌اتیل باربیتوریک اسید، ۵ گرم سدیم دی‌اتیل باربیتوریک و یک گرم کلرور سدیم در یک لیتر آب) اضافه گردید. ۶ میلی‌لیتر از این محلول به پلیت‌های شیشه‌ای به قطر ۵ سانتیمتر ریخته شد به نحوی که آگار به قطر ۶ میلی متر در سطح پلیت تشکیل شود. حفره‌ای به قطر ۱۲ میلی‌متر در مرکز با ۵۰۰ میکرولیترآنتی سرم پر شد و ۶ حفره محیطی به قطر ۲/۵ میلی‌متر و به فاصله ۵ میلی‌متر از حفره مرکزی ایجاد شد و با ۲۵ میکرولیتر آنتی‌ژن پر گردید. پلیت‌ها دو روز در C ° ۳۷ نگهداری و خطوط رسوبی تشکیل شده و بدون رنگ آمیزی مطالعه شد.

نتایج:

دستاوردهای این مطالعه را می‌توان به قرار زیر خلاصه نمود: ۱- فیلترهٔ محیط کشت به عنوان آنتی‌ژن متابولیک لازم برای انجام آزمایشات سرولوژی تشخیص آسپرژیلوزیس تهیه گردید. ۲- آنتی‌ژن مزبور در مواجهه با سیستم ایمنی حیوان آزمایشگاهی قادر به تحریک تولید تیتر بالایی (۱:۲۵۶) از آنتی‌بادی گردید و با سرم حیوان واکنش داده موجب تشکیل باندهای رسوبی شد. ۳- آنتی‌ژن با آنتی‌سرم چند بیمار انسانی به عنوان نمونه واکنش داده و خطوط رسوبی مشاهده شد.۴- آنتی‌ژن تهیه شده ، با آنتی‌ژن استاندارد شده ساخت انستیتو پاستور فرانسه (sanofi diagnositic Pasteur 61682,67681) از لحاظ واکنش با سرم بیماران مقایسه گردید و مشاهده شد که تعداد و الگوی باندها مشابه است. ۵- تجربیات حاصل از این مطالعه اساس و مقدمه‌ای برای پژوهشهای تکمیلی بعدی است.

بحث:

علائم بالینی در تشخیص انواع آسپرژیلوزیس ارزش تشخیصی چندانی نداشته و پاتوگنومونیک نیست. روشهای تشخیصی قارچ شناسی(میکروبیولوژیک) نظیر آزمایش مستقیم و روشهای بافت‌شناسی نیز با وجود اعتبار و ویژگی بسیار خوب از حساسیت کمی برخوردارند. با توجه به وفور اسپورهای آسپرژیلوس در محیط و آلودگی احتمالی مجاری تنفسی با این اسپورها، کشت نیز روش مطمئنی برای تشخیص بیماری نیست(۴،۶). اما روشهای سرولوژی به دلائلی که در مقدمه ذکر شد می‌توانند در راستای تشخیص و تعیین پیش‌آگهی بیماری مفید و مؤثر باشند(۱). روشهای سرولوژیک در تشخیص آسپرژیلوزیس متنوع و متعدد بوده از جمله (ELISA، IFA، RIA، CIE، ID) و هر کدام مزایا و معایب خود را دارند. روش ایمنودیفوزیون (ID) از جمله روشهای رایجی است که در این پژوهش به کار گرفته شد. انجام این تست ساده بوده و نیاز به مواد امکانات و کادر ماهر ندارد و لذا می‌تواند به راحتی در آزمایشگاه بکار رود. مطالعات سرولوژیک که توسط Evans ، Longbottom و Rippon انجام یافته است، مشخص کرده است که ID می‌تواند تست رسوبی مناسبی برای افتراق انواع بالینی آسپرژیلوزیس باشد و در کنار سایر شواهد کلینیکی و پاراکلینیکی بسیار کمک کننده است(۱۰-۸).

در بین انواع بالینی آسپرژیلوزیس، برای تشخیص نوع مهاجم ردیابی آنتی ژن های قارچی مفیدتر از ارزیابی آنتی‌بادی است(۵) ولی درانواع آسپرژیلوما و آسپرژیلوزیس برونشی ریوی آلرژیک بواسطهٔ مواجهه نسبتاً طولانی مدت میزبان با آنتی‌ژنهای قارچی پاسخ دفاعی بدن به قدر کافی تحریک شده و آنتی‌بادی IgG به میزان قابل ردیابی در بدن تولید می‌شود و لذا این تست‌ها با اعتبار کافی به کار می‌رود. تجربیات نشان می‌دهد که ۱۰۰٪-۷۰٪ بیماران مبتلا به ABPA از لحاظ IgG رسوبی ضد آسپرژیلوسی مثبت هستند(۵). در بیماران مبتلا به آسپرژیلوما ۹۹٪-۹۸٪ بیماران واجد باندهای رسوبی متعدد بوده و لذا ردیابی آنتی‌بادی می‌تواند به خوبی در تشخیص بکار رود(۱۱).

آنتی ژن های مفید بری تشخیص سرولوژیک آسپرژیلوزیس عبارتند از آنتی ژن های سوماتیک

www.SID.ir

Archive of SID

(پیکره‌ای)، آنتی ژن های متابولیک (صافی محیط کشت) و آنتی‌ژنهای سلولی دست نخورده (intact cell). همگی این آنتی‌ژنها در مطالعات مختلف و در روشهای سرولوژیک متفاوت با موفقیت بکار رفته‌اند(۱۲). در تحقیق حاضر تهیه آنتی‌ژن متابولیک مد نظر بوده است. تهیه این آنتی‌ژن نسبتاً ساده و قابل تکرار بوده و حاوی فراورده‌های آنتی‌ژنیک متعدی مثل مواد دیواره سلولی (پلی‌ساکاریدها)، پروتئین‌های خارج سلولی(آنزیم‌ها) و مواد متنوعی در ارتباط با متابولیسم ثانویه یا اتولیز قارچ می‌باشد(۱۲). آنتی‌ژن متابولیک در طی پروسه بیماری در بدن ترشح شده و بر علیه آنها آنتی‌بادی سنتز می‌شود و لذا ساخت این آنتی‌ژنها در خارج از بدن می‌تواند آنتی‌بادیهای مربوطه را در بدن ردیابی نماید.

در مجموع می‌توان اظهار داشت طی این پژوهش، ۱- اساس یک سری تجربیات پایه‌گذاری شد تا بتوان به مدد تجربه و مهارتی که از این رهگذر حاصل می‌شود دستاوردهای پیشرفته‌تر و مفیدتری را به ارمغان آورد. ۲- با استفاده از امکانات و نیروهای داخل کشور مواد بیولوژیک لازم برای تشخیص سرولوژیک آسپرژیلوزیس تهیه گردید و بدین ترتیب می‌توان از مواد ساخت کشورهای بیگانه بی‌نیاز بود. ۳- با تهیه معرفهای تشخیصی و دسترسی ساده‌تر و ارزان‌تر آزمایشگاههای مرجع به این مواد، موارد بیشتری از بیماری تشخیص داده شده و درمان می‌گردد. بدیهی است این آنتی‌ژن تهیه شده، وقتی می‌تواند بعنوان یک معرف استاندارد آزمایشگاهی بطور روتین در آزمایشگاهها مورد استفاده قرار گیرد که با تعداد معنی‌داری از بیماران مورد آزمایش قرار گرفته، حساسیت، ویژگی و کارآیی آن مشخص شود .

سپاسگزاری:

این مطالعه طی طرح پژوهشی مصوب با اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است که بدینوسیله از همکاری نامبردگان قدردانی می گردد.

منابع:

1. Ajello L , Hay RJ. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infection. Vol 4. Medical mycology. New York: Arnold , 1998.
2. Kwon Chung KJ, Bennet JE . Medical mycology. Philadelphia: Lea and Febiger, 1992.
3. Kurup VP, Fink JN. Evaluation of methods to detect antibodies against Aspergillus fumigatus. Am So Clin Patholog 1978 ; 69 (4): 414-17.
4. Kim SJ , Chaparas SD. Characterization of antigens from Aspergillus fumigatus. Am Rev Resp Dis 1987; 118: 547-552.
5. Murphy JW. Fungal infections and immune respons. New York: Plenum , 1993.
6. Brummund W. Aspergillus fumigatus-specific antibodies in allergic bronchopulmonary Aspergillusis and Aspergilloma: Evidence for a polyclonal antiboly response. J Ciln Microbiol 1987; 251: 5-9.
7. Hearn VM. Preparation of Aspergillus fumigatus antigens and thier analysis by two dimentional immunoeloctrophoresis. J Med Microbiol 1980; 13 : 451-458.
8. Longbottom JL , Austwick PKC. Antigens and allergens of Aspergillus fumigatus, part I . J Allergy Clin Immunol 1986; 78: 9-14.
9. Evans EGV, Richardson MD. Medical Mycology: A practical approach. London: IRL , 1988.
10. Rippon J W. Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycets. Philadelphia: W.B. Saunders , 1988.
11. De Coster A, Dierckx P, Grivignee A. Aspergilloma in : Aspergillus and Aspergillosis. New York: Plenum , 1988.
12. Howard DH. Fungi pathogenic for humans and animals. New York: Pekker , 1983.

www.SID.ir