Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
سال نهم ، شماره سوم ، پاییز ۱۳۸۰ ، ص ۵۸

تهیه آنتی ژن خام سوماتیک از آسپرژیلوس فومیگاتوس برای تشخیص آسپرژیلوزیس

سید حسین میرهندی [۱]، دکتر فریده زینی [۲] بهرام نصر اصفهانی [۳]

چکیده

آسپرژیلوزیس ، عفونت قارچی مهم با عوامل علیتی متعدد از جنس آسپرژیلوس‌ها است که برحسب زمینه بیمار و پاتوژنز بیماری، دارای اشکال بالینی مختلفی است. تشخیص بالینی و نیز تشخیص آزمایشگاهی قارچ‌شناسی این بیماری غیراختصاصی و مشکل بوده اما روشهای سرولوژی می‌تواند جهت تشخیص و پیگیری درمان این بیماری کمک کننده باشد. این مطالعه از نوع تجربی و آزمایشگاهی و هدف آنان تهیهٔ آنتی‌ژن سوماتیک و آنتی‌سرم مربوطه برای انجام تستهای رسوبی جهت تشخیص انواع غیرمهاجم آسپرژیلوزیس، در کشور و بی‌نیازی از فرآورده‌های خارجی است. آسپرژیلوس فومیگاتوس به مدت ۳ روز در محیط سابوروگلوکز برات در حرارت $30^{\circ}C$ تکان داده شد. کلنی‌ها برداشت شده و به کمک شن دریایی در هاون چینی خرد و همگن شده و پس از استخراج عصاره سلولی و پالایش و تغلیظ آن به طریق زیرجلدی به خرگوش آزمایشگاهی تزریق و آنتی‌سرم فوق ایمن گرفته شد. آنتی‌ژن و آنتی‌سرم با روش کانترایمنوالکتروفورز ارزیابی شد. آنتی‌ژن تهیه شده دارای آنتی‌ژنیسیته کافی برای ایجاد تیتر بالایی از آنتی‌بادی در بدن حیوان و ایجاد واکنش با سرم حیوان ایمن و انسان بیمار بود. تعداد و الگوی خطوط رسوبی مشابه و قابل مقایسه با آنتی‌ژن و آنتی‌سرم استاندارد بود.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوزیس، آسپرژیلوس فومیگاتوس، آنتی‌ژن سوماتیک.

مقدمه

آسپرژیلوس‌ها قارچهای رشته‌ای با پراکندگی گسترده در محیط بوده و دارای تنوع گونه‌ای بسیار وسیعی می‌باشند. به نحوی که تعداد گونه‌های آن در مراجع مختلف بین ۹۰۰-۱۸۵ گونه ذکر شده است[۲،۱]. خوشبختانه اکثر این ارگانیسمها فاقد ویرولانس کافی برای ایجاد عفونت در انسان بوده و فقط ۱۲ گونه و آن هم در شرایط خاص میزبان، بیماری ایجاد می‌نمایند که مهمترین پاتوژن آنها آسپرژیلوس فومیگاتوس است. این قارچ به واسطهٔ دارا بودن آنزیمها و آنتی‌ژنهای مختلف نظیر فسفولیپاز، الاستاز و کلاژناز[۳] مسئول بیشترین موارد بیماری است. می‌توان گفت که اشکال آلرژیک بیماری کلاً توسط آسپرژیلوس فومیگاتوس ایجاد می‌شود[٤]. طیف بیماریهای حاصل از آسپرژیلوس‌ها بسته به پاتوژنز بیماری وسیع بوده و بطور خلاصه در جدول (۱) فهرست شده است. مسئله مهم در ارتباط با بیماری

۱- عضو هیئت علمی و دانشجوی PhD گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده بهداشت
۲- استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده بهداشت
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران
۳- مربی میکروبیولوژی دانشکده بهداشت
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی اصفهان

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- پاتوژنز اشکال مختلف آسپرژیلوزیس و ارزش کمکی سرولوژی در تشخیص آنها

اشکال مختلف بالینی	پاتوژنز	ارزش روشهای سرولوژیکی در تشخیص
آسپرژیلوزیس آلرژیک (شامل آلوئولیت آلرژیک اکسترینسیک، آسپرژیلوزیس برونشی ریوی آلرژیک (ABPA)، آسم آسپرژیلوسی و سینوزیت آسپرژیلوسی آلرژیک)	ازدیاد حساسیت نوع ۱، ۳، ٤ نسبت به آنتی‌ژنهای متعدد قارچ	ردیابی آنتی‌بادیهای IgE و IgG در سرم بیمار با روشهای ID، CIE، IFA، IRA، الیزا و غیره مفید است. تست پوستی گاهی کمک‌کننده است.
آسپرژیلوما (توپ قارچی)	کلونیزاسیون قارچ در حفره‌های ریوی که به عللی مثل سل و سارکوئیدوز ایجاد شده است.	ردیابی آنتی‌بادی کمک‌کننده و مفید است. در ID تعداد زیادی خط رسوبی تشکیل می‌شود.
آسپرژیلوزیس مهاجم	بیماری خطرناک مرگ‌آور در اثر زمینه‌هایی همچون گرانولوسیتوپنی، تجویز آنتی‌بیوتیکهای وسیع‌الطیف و کورتیکواستروئیدها ایجاد می‌شود.	ردیابی آنتی‌بادی حتی با روشهای دقیق مثل RIA و الیزا موفق نیست. ردیابی آنتی‌ژنهایی همچون گالاکتومانان و ردیابی متابولیتهایی مثل D-مانیتول یا اسید اگزالیک سودمند است.
مسمومیت ناشی از توکسین‌های آسپرژیلوسی	یک حالت غیرعفونی که در اثر خوردن غلات آلوده به سموم قارچی نظیر آفلاتوکسین ایجاد می‌شود.	سرولوژی بی‌ارزش است.

آسپرژیلوزیس تشخیص به موقع و صحیح بیماري جهت شروع درمان است. متأسفانه علائم بالینی این بیماری همچون سایر بیماریهای قارچی سیستمیک، اختصاصی و پاتوگنومونیک نبوده و برای تشخیص کافی نیست. روشهای آزمایشگاهی میکروبیولوژیک (میکولوژیک) نظیر آزمایش مستقیم و هیستوپاتولوژی نیز علیرغم اعتبار و ویژگی خوب، فاقد حساسیت کافی بوده و از سوی دیگر مشکلات غامض نمونه‌برداری صحیح و در واقع عدم موفقیت در نمونه‌برداری را در بسیاری از موارد به همراه دارد. کشت و جداسازی قارچ گرچه برای شناسایی دقیق عامل علیتی بیماری ضروری است ولی بخاطر وفور عامل بیماری در محیط و یا وجود حالت ساپروفیتی آن در مجاری ریوی، تنها در کنار سایر شواهد تشخیص قابل اعتماد است [۶،۵]. در این میان روشهای سرولوژیک نظیر ردیابی آنتی‌بادی، آنتی‌ژن، متابولیتهای قارچی و اخیراً روشهای زیست‌شناسی مولکولی مثل PCR [۷] همراه با سایر ملاک‌های تشخیصی مفید و کارساز بوده و می‌تواند راهنمای خوبی برای پایه‌ریزی تشخیص، شروع درمان، پیگیری پاسخ بیمار به داروی ضدقارچی و پیش‌آگهی بیماری باشد[۱]. روشهای تشخیص سرولوژیک رایج برای اشکال مختلف آسپرژیلوزیس نیز در جدول ۱ آمده است. ملاحظه می‌شود که در آسپرژیلوزیس مهاجم ردیابی آنتی‌ژنهایی مثل گالاکتومانان ارزش تشخیصی بیشتری دارد ولی در انواع دیگر، بویژه آسپرژیلوزیس آلرژیک و آسپرژیلوما، ردیابی آنتی‌بادیها

www.SID.ir

Archive of SID

بخصوص آنتی‌بادیهای رسوبی ارزشمند است. هدف این مطالعه تهیه آنتی‌ژن و آنتی‌سرم کنترل لازم برای انجام تستهای سرولوژیک مبتنی بر ردیابی آنتی‌بادی، در داخل کشور بوده است. این قبیل مطالعات در کشورهای پیشرفته چند دهه سابقه دارد[۱۰،۹،۸،۶]. ولی متأسفانه در همان کشورها نیز هنوز به نتیجه قطعی و مسجل نرسیده است و تحقیقات همچنان برای تهیهٔ آنتی‌ژنی با حساسیت، ویژگی و کارایی بالا ادامه دارد. در ایران تا آنجا که ما اطلاع داریم این کار اولین گامها در این زمینه است و تلاش مؤلفین بر این است که با ادامه این مسیر تحقیقاتی درآینده بتوانند با استانداردسازی و ارزیابی آماری این آنتی‌ژنها و نیز تهیه فرآورده‌های لازم برای سایر عفونت‌های سیستمیک قارچی، آن را بصورتی قابل استفاده برای آزمایشگاههای مرجع کشور ارائه نمایند. در این صورت بواسطه دسترسی ساده‌تر به این مواد بیولوژیک ضمن اینکه موارد بیشتری از بیماری کشف و درمان می‌گردند، قدمی در راستای خودکفایی کشور و رفع نیاز از فرآورده‌های خارجی خواهد بود.

روش بررسی

این پژوهش از نوع تجربی و آزمایشگاهی است که در راستای تولید مواد آزمایشگاهی صورت گرفته است و روش نمونه گیری بدین شرح می باشد : قارچ از یک بیمار مبتلا به فرم سیستمیک بیماری جدا شد و پس از کشت روی اسلاید شیشه‌ای و با توجه به مشخصات ماکروسکوپی (ویژگیهای کلنی) و میکروسکوپی (نحوه کونیدی‌زائی) بعنوان آسپرژیلوس فومیگاتوس تشخیص داده شد. قارچ به لوله محتوی محیط چاپکس آگار منتقل و مدت ۵ روز در ۳۷°C نگهداری شد. ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۱٪ توئین ۸۰ (Merck 822187) به سطح کلنی‌های رشد یافته اضافه و پس از تکان شدید، کونیدیها (اسپورها)ی بی‌شمار سطح کلنی برداشت و بصورت سوسپانسیونی حاوی 10^8 عدد کونیدی در میلی‌لیتر تنظیم و در ٤°C نگهداری گردید. ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مذکور به محیط مایع گلوکز (۲٪) پپتون (۱٪) منتقل و مدت ۳ روز در ۳۰°C با استفاده از شیکر الکتریکی ۱۲۰ بار در دقیقه تکان داده شد. کشتها روی کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شده و کلنی‌های متعدد کروی متشکل از توده‌های میسلیومی قارچ جداسازی و پس از ۳ بار شستشو با آب مقطر و آبگیری با پمپ الکتریکی، مدت ٤٨ ساعت در ٤٠°C- نگهداری گردید. سپس قطعات چند میلی‌متری کلنی‌ها در هاون چینی محتوی حدود ۱۰ گرم شن دریایی (Merck 7712) و ۱۰ میلی‌لیتر بافر بی‌کربنات آمونیوم (Merck 1131) ۵۰ میلی‌مولار قرار داده شد. پس از قرار دادن هاون در ظرف یخ، میسلیوم‌ها را در هاون خرد و همگن کرده و آنتی‌ژن حاصله پس از دو بار سانتریفوژ در ٤°C و با دور ٤۰۰۰ در دقیقه، جهت جداسازی املاح و پروتئین‌های کوچک اضافی مدت ٤٨ساعت در مقابل آب مقطر استریل دیالیز (Sigma D-0655) و سپس مدت ۳٦ ساعت جهت تغلیظ و افزایش میزان پروتئین در واحد حجم در مقابل پلی‌اتیلن گلیکول ٦۰۰۰ (۱۰٪ $\frac{W}{V}$) (Merch 807491) دیالیز گردید. پس از سانتریفوژ نهایی و عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر، میزان پروتئین آنتی‌ژن با روش براد فورد اندازه‌گیری و در ۲۰°C- نگهداری گردید. جهت تهیه سرم هیپرایمیون مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از آنتی‌ژن با غلظت پروتئینی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، با حجم مساوی ادجوان کامل فروند مخلوط و بصورت زیر جلدی به خرگوش آزمایشگاهی تزریق و این کار ٤ بار دیگر طی ٤ هفته با ادجون ناقص فروند تکرار و ۱۰ روز پس از آخرین تزریق، سرم حیوان جداسازی و در ۲۰°C- نگهداری شد. جهت اجرای تست کانترایمنوالکتروفورز [۱۱]، ۲/۸ میلی‌لیتر از آگارز ۱٪ به اسلایدهای میکروسکوپی ۷۵×۲۵ میلی‌متر اضافه و حفراتی به قطر ۳ میلی‌متر و به فاصله ۵ میلی‌متر در آنها ایجاد و هر کدام از حفرات روبرور با مقدار ۱۰ میکرولیتر آنتی‌ژن و آنتی‌بادی پر گردیده و در تانک الکتروفورز محتوی بافر و رونال pH = ۸/۲ (۱/٤ گرم دی‌اتیل باربیتوریک اسید، ۵ گرم سدیم دی‌اتیل باربیتوریک، یک گرم کلرور سدیم در یک لیتر آب) قرار داده و جریان الکتریسیته به میزان ۲ میلی‌آمپر به ازای هر اسلاید به مدت ۲ ساعت برقرار گردید. خطوط رسوبی

www.SID.ir

Archive of SID

تشکیل شده پس از شستشو در سیترات سدیم ۲٪ باکوماسی بلو ۱٪ رنگ‌آمیزی شد.

نتایج

در طی این طرح تحقیقاتی آنتی‌ژن پیکره‌ای (سوماتیک) مهمترین عامل آسپرژیلوزیس یعنی آسپرژیلوس فومیگاتوس تهیه گردید. پروتئین آنتی‌ژن در حد ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تنظیم گردیده و پس از تزریق به حیوان آنتی‌سرم فوق (هیپرایمیون) با تیتر ×× بدست آمد. بدین ترتیب قابلیت آنتی‌ژنیک معرف تهیه شده ارزیابی گردیده و سرم کنترل مثبت لازم برای آزمایشات In vitro تحصیل گردید. آنتی‌ژن با آنتی‌سرم حیوانی و آنتی‌سرم چند نمونه بیمار در تست کانترایمنوالکتروفورز واکنش مثبت داد. آنتی‌ژن تهیه شده با آنتی‌ژن استاندارد شده ساخت انستیتوپاستور فرانسه (Sanofi diagnositc pasteur) مقایسه گردید و ملاحظه شد که تعداد و الگوی باندها مشابه است(شکل ۱). با تکیه بر این آزمایشها و تجربیات که با امکاناتی ساده به انجام رسیده، می‌توان پژوهشهای تکمیلی بعدی را به انجام رسانده و پس از ارزیابی و استانداردسازی آن را جهت انجام آزمایشهای محوله به آزمایشگاههای مرجع ارائه نمود.

تصویر ۱ : واکنش آنتی ژن و آنتی سرم در تست کانتر ایمنوالکتروفورز: ۱-آنتی ژن متابولیک با آنتی سرم خرگوش ایمن ۲-آنتی ژن سوماتیک با آنتی سرم خرگوش ایمن ۳-آنتی ژن انستیتو پاستور فرانسه با آنتی سرم خرگوش ایمن ٤-آنتی ژن متابولیک با سرم بیمار ٥- آنتی ژن سوماتیک با سرم بیمار ٦- آنتی ژن انستیتو پاستور فرانسه با سرم بیمار

بحث

آسپرژیلوس‌ها همچون سایر قارچها موجوداتی ظاهراً ساده اما دارای پیچیدگیهای ساختمانی و بیوشیمیایی زیادی هستند که موجب تنوع آنتی‌ژنیک وسیعی در آنها در سطح گونه و استرین می‌گردد. این تنوع بیوشیمیایی و آنتی‌ژنیک ذاتی از یک سو، و عدم ارتباط علمی نزدیک و ایده‌آل بین محققین مختلف در جهان از سوی دیگر و مجهول بودن نوع و ساختار آنتی‌ژن یا آنتی‌بادیهای مؤثر در پاتوژنیسیته از جانب سوم، موجب شده که معرف استاندارد و شناخته شده‌ای برای انجام تستهای سرولوژیک و مقایسه کردن نتایج تحقیقات مختلف، وجود

www.SID.ir

Archive of SID

نداشته باشد[۱۲]. این مسئله باعث شده که اغلب شرکتهای بین‌المللی سازنده آنتی‌ژن برای تشخیص آسپرژیلوزیس از آنتی‌ژن خام (Crud Antigen) استفاده کنند[۱۲]. آنتی‌ژن خام گرچه اشکالاتی همچون کاهش ویژگی تست و وجود واکنش متقاطع بین گونه‌های مختلف عامل بیماری را دارد، اما در عوض حساسیت خوب و سهولت تهیه آن باعث رغبت محققین به آن شده است. انواع آنتی‌ژن خام متفاوت بوده شامل سوماتیک، متابولیک، آنتی‌ژن سلول سالم (Intact cell) و غیره است. در این تحقیق آنتی‌ژن سوماتیک (پیکره‌ای) آسپرژیلوس فومیگاتوس تهیه گردید. آنتی‌ژن سوماتیک دارای ترکیبات دیواره سلولی و سیتوپلاسمی قارچ بوده و زوائد سلولی توسط سانتریفوژ، و مواد واجد وزن مولکولی اندک توسط دیالیز جدا می‌گردد. این آنتی‌ژن دارای ترکیبات پروتئینی و پلی‌ساکاریدی متعددی است و می‌تواند انواع آنتی‌بادیهای رسوبی ایجاد شده در بدن بیمار را نشان دهد [۱۲]. تست‌های سرولوژیک بکار رفته برای تشخیص آسپرژیلوزیس نیز متنوع و مختلف است. رایج‌ترین این تستها عبارتند از: انتشار در ژل، ایمنوالکتروفورز متقابل، ایمنوفلورسنت غیرمستقیم، الیزا و رادیوایمنواسی[۱٤]. در بین این تستها، تست رسوبی کانترایمنوالکتروفورز (CIE) به واسطهٔ حساسیت و سرعت بسیار مطلوب، سادگی اجرای آن و ارزانی تست بخاطر مصرف مقادیر کم مواد لازم، مورد توجه می‌باشد و به خاطر این مزایا در این تحقیق از این روش استفاده شد. با تیتر کردن آنتی‌ژن می‌توان از موارد منفی کاذب احتمالی مطمئن شد [۱۲]. این تست در مطالعات محققین مختلف بکار رفته و نتایج خوبی داشته است [۱۳،۱۲،۱۱]. تستهای رسوبی ردیابی آنتی‌بادی در تشخیص انواع آلرژیک آسپرژیلوزیس (نظیر ABPA و نیز آسپرژیلوما) بسیار مفید و مؤثرند. مروری بر مقالات نشان می‌دهد که ۱۰۰-۷۰٪ بیماران مبتلا به آسپرژیلوزیس برونشی ریوی آلرژیک از لحاظ LgG رسوبی ضد آسپرژیلوس مثبت هستند [۱٤]. در بیماران مبتلا به آسپرژیلوما نیز به خاطر تماس مداوم و طولانی‌مدت قارچ با سیستم ایمنی میزبان ۹۹٪ بیماران دارای خطوط رسوبی متعدد بوده و لذا ردیابی آنتی‌بادی با آنتی‌ژنهای پیکره‌ای می‌تواند به خوبی در تشخیص این بیماری بکار رود [۱۵]. در این تحقیق تلاش بر این بوده است که با استفاده از امکانات محدود در داخل کشور، مواد بیولوژیک لازم برای تشخیص سرولوژیک عفونتهای آسپرژیلوسی تهیه گردد. بدیهی است که فرآورده تهیه شده وقتی می‌تواند بعنوان یک معرف آزمایشگاهی استاندارد، مورد استفاده همه آزمایشگاههای مرجع قرار گیرد که با تعداد از نظر آماری معنی‌داری از بیماران مبتلا و نیز تعداد قابل توجهی از افراد سالم به عنوان کنترل آزمایش شود و حساسیت، ویژگی و کارایی آن ارزیابی گردد. این کار هم‌اکنون توسط مؤلفین در حال انجام است و امید می‌رود طی مقالات بعدی نتایج به اطلاع محققین برسد. ضمن اینکه تلاش براین است که معرفهای لازم برای تشخیص سرولوژیک سایر عفونتهای قارچی نظیر کاندیدیازیس و کریپتوکوکوزیس نیز تهیه و استاندارد گردد.

سپاسگزاري

از معاونت پژوهشی ، دانشکده بهداشت و دانشگاه علوم پزشکی تهران و خانمها بهناز سلطانیان، نیلوفر شارقی و نسرین قرائیان بخاطر همکاریهایشان در انجام این پژوهش تشکر می‌شود

www.SID.ir

Archive of SID

Rreferences

1- Ajello L, Hay R.J. ***Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections Vol 4: Medical mycology, 1998, Arnold. New York .***

2- Rippon Medical mycology. ***The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycets.*** 1998, Saunders. Philadelphia

3- Ghannoun M.A. ***Extracellular phospholipases as universal virulence factor in pathogenic fungi.*** Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 1998 39(2): 55-9.

4- Kwon-Chung K.J., Bennet J.E. ***Medical mycology.*** Lea and febiger 1992, Philadelphia.

5- Kim, S.J. and Chaparas, s.D . ***Characterization of antigens from Aspergillus fumigatus Ame.*** Rev. Resp. Dis 1987 vol 118: 547-552.

6- Kurup, V.P. and Fnk, J.N. ***Evaluation of methods to detect antibodies against Aspergillus fumigatus.*** Ame. So Clin. Patholog. 1978 vol 69: No: 4, 414-417.

7- Yamakami Y, Hashimoto A . ***PCR detection of DNA spesific for Aspergillus Species in serum of patients with invasive aspergillosis.***

8- Brummund W. ***Aspergillus fumigatus-specific antibodies in allergic bronchopulmonary aspergillosis and aspergilloma: Evidence for a polyclonal anitbody response.*** J. Clin. Mic. 1987, 25, 1: 5-9.

9- Hearn, V.M. et al. ***Preparation of Aspergillus fumigatus antigens and their analysis by two dimensional immunoelectrophoresis,*** J. Med. Microbial 1980, vol: 13: 451-458.

10- Longbottom J.L. and Austwick ***.P.K.C. Antigens and allergens of Aspergillus fumigatus part I.*** J. Allergy. Clin. Imunol. 198, 78: 9-14.

11- Mackenzie D.W.R and Philpot C.M. ***Counterimmunoelectrophoresis as a routine mycoserological procedure.*** Mycopathology 1976, 57(1).

12- Howard D.H. ***Fungi pathogenic for humans and animals.***1983 Pekker, Inc. New York.

13- Evans, EGV and Richardson, M.D. ***Medical Mycology a practical approach.***1988 IRL press , New York.

14- Murphy J.W,Friedman, H,and Bendienilli, M. ***Fungal infections and immune response.***1992, Plenum press , New York.

15- De Coster, A., Dierckx, P. and Grivignee A. ***Aspergilloma in Aspergillus and Aspergillosis .***1988 , Plenum press ,USA.

www.SID.ir