پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۸۷ فروردین سال ۱۳۹۱ (۲۰-۱۰)

ارزیابی سطح سرمی آنتی ژن گالاکتومانان به منظور تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان

مجتبی نبیلی[۱]
طاهره شکوهی[۲]
قاسم جان بابایی[۳]
کامران علی مقدم[۴]
اردشیر قوام زاده[۴]

چکیده

سابقه و هدف: آسپرژیلوزیس مهاجم بیماری شدید و کشنده قارچی ناشی از گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس در بیماران دچار نوتروپنی، دریافت‌کنندگان پیوند مغز استخوان، بیماران دچار اختلالات خونی، گرانولوماتوز مزمن، دریافت‌کنندگان طولانی مدت داروهای استرویید و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. آنتی‌ژن گالاکتومانان (GM)، پلی‌ساکاریدی از دیواره سلولی قارچ آسپرژیلوس است که طی رشد و تهاجم به بافت از هایف قارچ آزاد می‌شود. شیوع آسپرژیلوزیس مهاجم بین ۱۵- ۱ درصد است و میزان کشندگی آن اگر تشخیص بیماری به تأخیر بیافتد به بیش از ۹۰ درصد می‌رسد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، سطح سرمی آنتی‌ژن گالاکتومانان در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی بخش انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری و گیرندگان پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهران در مدت یک سال مورد بررسی قرار گرفت. شش میلی‌لیتر خون از ۶۲ بیمار که دارای شرایط ورود به مطالعه بودند گرفته شد و تا زمان انجام آزمایش در $-۲۰^{\circ}C$ نگهداری شد. آنتی‌ژن GM موجود در نمونه‌های سرم گرفته شده از بیماران به روش الایزا و با استفاده از کیت Platelia™ *Aspergillus* EIA ارزیابی شد و نمونه‌های دارای مقادیر بیشتر از ۰/۵ به‌عنوان مثبت تلقی شد.

یافته‌ها: از ۶۲ بیمار مورد بررسی ۴۰ بیمار مرد و ۲۲ بیمار زن بودند. بیشترین میزان مرگ و میر به ترتیب در بیماران مبتلا به ALL (۳۱/۲ درصد)، AML و لنفوم غیر هوچکین(۲۵ درصد) و لنفوم هوچکین (۱۲/۵ درصد) رخ داد. تست GM در ۱۶ نمونه (۲۲ درصد) مثبت اعلام شد. بر اساس دستورالعمل اصلاح شده EORTC/MSG، ۱۸ (۲۹ درصد) بیمار از لحاظ ابتلاء به آسپرژیلوس مهاجم به تفکیک به صورت؛ ۵ مورد (۲۸ درصد) محتمل و ۱۳ مورد (۷۲ درصد) ممکن بودند. حساسیت و اختصاصیت آنتی ژن GM به‌ترتیب ۶۱ درصد و ۹۰ درصد بود.

استنتاج: روش الایزا ابزار تشخیصی مناسبی برای ردیابی آنتی‌ژن آسپرژیلوس در خون می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان یک تست غربالگری در بیماران در معرض خطر برای آسپرژیلوس مهاجم مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌ژن گالاکتومانان، آسپرژیلوزیس مهاجم، گیرندگان پیوند مغز استخوان، بدخیمی خونی

مقدمه

آسپرژیلوزیس مهاجم بیماری شدید و کشنده قارچی ناشی از گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس در بیماران دچار نوتروپنی، دریافت‌کنندگان پیوند مغز استخوان، بیماران دچار اختلالات خونی، گرانولوماتوز مزمن،

مولف مسئول: طاهره شکوهی- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: shokohi.tahereh@gmail.com

۱. دانشجوی دکتری قارچ شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، سازمان تامین اجتماعی استان گلستان

۲. گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳. گروه داخلی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۴. گروه داخلی، مرکز تحقیقات خون و انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت : ۹۰/۱۰/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۰/۱۰/۱۲ تاریخ تصویب : ۹۰/۱۲/۸

دریافت‌کنندگان طولانی مدت داروهای استرویيدی و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد(۶-۱). در سالیان اخیر وجود آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران بستری در بخش‌های انکولوژی و مراکز پیوند مغز استخوان که بیماران بستری در آن‌ها به دلیل شرایط ویژه در معرض آلودگی می‌باشند بسیار مورد توجه قرار گرفته است(۷). علی‌رغم پیشرفت‌های حاصل شده در روش‌های تشخیصی، آسپرژیلوزیس مهاجم هنوز به‌عنوان یک بیماری که به‌خوبی تشخیص داده نمی‌شود شناخته شده تشخیص قطعی آن قبل از مرگ بیمار و قبل از تکثیر فراوان عامل قارچی به سختی صورت می‌گیرد(۳). در سال‌های اخیر عفونت‌های فرصت‌طلب قارچی به علت پیشرفت‌های رایج پزشکی در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی منجر به افزایش جمعیت‌های این بیماران شده به‌صورت تهاجمی و کشنده ظاهر می‌شوند(۱۰-۸). از این رو مطالعات متعدی در کشورهای مختلف در زمینه تعیین معیارهای تشخیصی، روش‌های تشخیصی، اپیدمیولوژی، مدیریت و درمان آن در جمعیت‌های مختلف صورت گرفته است(۱۴-۱۱). شیوع آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران با وضعیت وخیم در مطالعات مختلف بسیار متفاوت می‌باشد(۱۷-۱۵). شیوع آسپرژیلوزیس مهاجم بین ۱۵-۱ درصد است و میزان کشندگی آن اگر تشخیص بیماری به تأخیر بیفتد به بیش از ۹۰ درصد می‌رسد(۳).

به تأخیر افتادن تشخیص قطعی، عدم درمان مناسب و به موقع و وجود بیماری‌های زمینه‌ای مختلف از دلایل بالا بودن مرگ و میر در این بیماران بوده است(۱۹). روش‌های استاندارد طلایی[1] برای تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم شامل بررسی‌های هیستوپاتولوژیک و کشت نمونه‌های بافتی است اما این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی هستند. آزمایشات پاتولوژی از نمونه‌های بافتی اغلب در طی بیوپسی از شش‌ها یا بیوپسی شش از طریق برانش[2] صورت می‌گیرد ولی متأسفانه ترومبوسایتوپنی شدید و شرایط وخیم کلینیکی که در این گروه از این بیماران وجود دارد مانع استفاده از این روش تهاجمی می‌گردد. روش‌های تشخیصی دیگر نیز مثل کشت خون، کشت نمونه‌های بافتی، کشت از برونکوآلوئولار لاواژ (BAL) در IA به‌ندرت مثبت و اغلب منفی می‌شود و ممکن است زمانی کشت جواب دهد که بیماری پیشرفت کرده باشد(۱۸). برای غلبه بر این محدودیت‌ها روش‌های مختلفی برای تشخیص سریع، حساس و اختصاصیت بالا برای IA به‌وجود آمد که شامل استفاده از روش‌های غیروابسته به‌کشت برپایه تعیین آنتی‌ژن‌های آسپرژیلوس مثل آنتی ژن گالاکتومانان در نمونه‌های بالینی می‌باشند(۲۰).

آنتی‌ژن گالاکتومانان (GM)[3]، پلی‌ساکاریدی از دیواره سلولی قارچ آسپرژیلوس است که طی رشد و تهاجم به بافت از هایف قارچ آزاد می شود. این آنتی‌ژن یک کربوهیدرات محلول در آب است و در نمونه‌های مختلف بالینی همانند، سرم، BAL[4]، ادرار، مایع مغزی نخاعی به وسیله روش الایزای ساندویچی شناسایی می‌شود. البته جهت تعیین این آنتی ژن از روش‌های دیگر سرولوژی مثل؛ آزمایش رادیو ایمنواسی (RIA)[5] و لاتکس آگلوتیناسیون (LA)[6] نیز استفاده می شود ولی مطالعات نشان داده‌اند که، این روش‌ها فقط در طی مراحل پیشرفته عفونت در بیشتر بیماران مشکوک به آسپرپیلوس مهاجم مثبت می‌گردد. علاوه بر این، آنتی ژن GM در نمونه‌های سرمی در آزمایش الایزا به میزان بیشتر و بسیار زودتر از سایر روش‌های سرولوژی شناسایی می‌شود. مطالعات نشان داده است که تعیین آنتی ژن GM یک روش با دقت و صحت بالا بوده قبل از بروز علایم کلینیکی و بسیار سریع‌تر از روش‌های بر پایه کشت مثبت شده و در تشخیص آسپرپیلوس مهاجم کمک‌کننده می‌باشد(۲۱). تعیین آنتی ژن GM در خون به مراحل مدیریت و پایش بیماری مثل تعیین سطح

1. Gold standard
2. Transbronchial

3. Galactomannan
4. Bronchoalveolar Lavage
5. Radio Immune Assay
6. Latex Agglutination

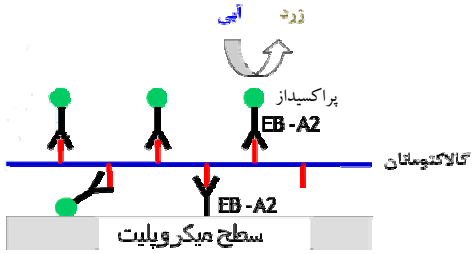
آنتی ژن، پاسخ بیمار به درمان‌های ضد قارچی و اصلاح نوع داروهای مصرفی کمک می‌کند. بنابراین با توجه به شیوع بالا و میزان مرگ و میر آسپرژیلوس مهاجم در بیماران بستری در بخش‌های انکولوژی و مراکز پیوند مغز استخوان و اهمیت تشخیص زودرس این بیماری و همچنین به‌علت بعضی محدودیت‌های روش‌های تشخیص سنتی، لزوم استفاده از روش‌هایی بر پایه غیر متکی به کشت همانند تعیین سطح سرمی آنتی ژن GM ضروری به‌نظر می‌رسد. لذا این مطالعه با هدف ارزیابی سطح سرمی آنتی‌ژن گالاکتومانان به منظور تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان صورت پذیرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، سطح سرمی آنتی‌ژن گالاکتومانان در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی بخش انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری و گیرندگان پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهران انجام پذیرفت. نمونه‌گیری از خون پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی از بیمار و یا همراهان با نظارت پزشک معالج، خود بیمار و یا همراهان وی انجام گردید. پرسشنامه بیماران به‌صورت محرمانه تکمیل شد و هیچ‌گونه مداخله اضافه‌ای درروند بالینی، تشخیص و درمانی بیمار صورت نگرفت. در این‌مطالعه بیماران دارای(۱) نوتروپنی ($<500mm^3$ به‌مدت بیشتر از ۱۰ روز) (۲)، تب بیش از ۹۶ ساعت علی‌رغم درمان آنتی بیوتیک‌های وسیع‌الطیف(۳)، تب بالای $>38^{\circ}C$ و یا کمتر از $<36^{\circ}C$ و (۴) استفاده طولانی‌مدت ازکورتیکواستروئیدها و ایمونوساپرسیوها به‌مدت ۳ هفته در ۶۰ روز گذشته وارد مطالعه شدند وافراد در حال مصرف آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مثل پیپراسیلین- تازاباکتام[1]، بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از عوامل بیفیدوباکتریوم، استافیلوکوک، سودوموناس به‌دلیل واکنش متقاطع با آنتی ژن GM و ایجاد نتایج مثبت کاذب در آزمایش سرولوژی و همچنین در صورت عدم رضایت بیمار از انجام خون‌گیری از جمعیت در حال مطالعه خارج می‌شدند. تمامی اطلاعات دموگرافیک و بالینی افراد مورد مطالعه شامل: سن، جنس، تاریخ نمونه‌گیری، شرح مختصری از علایم بیمار مثل تب بالای مداوم و یا عود مجدد، علایم نارسایی تنفسی حاد، یافته‌های CT، یافته‌های برونکوسکوپی، علایم عفونت سینوس، علایم عفونت CNS، بررسی میزان سلول‌های خونی مثل تعداد WBC و وجود نوتروپنی، انجام شیمی درمانی و تعداد دوره‌های شیمی‌درمانی، انجام رادیوتراپی و تعداد دوره‌های رادیوتراپی، نوع بدخیمی، درمان ضد قارچی، نام داروی ضد قارچی، زمان شروع داروی ضد قارچی در فرم اطلاعاتی ثبت شد و نمونه‌گیری از بیماران انجام گرفت. نمونه‌گیری دو بار در هفته شامل ۴ میلی‌لیتر خون داخل بطری کشت خون BHI بی‌فازیک و ۲ml داخل لوله فاقد ضد انعقاد انجام شد. نمونه‌ها در بسته‌های حاوی یخ و در کمترین زمان ممکن به آزمایشگاه تحقیقاتی قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی انتقال داده شد. در مطالعه حاضر از روش سرولوژیکی تعیین آنتی ژن GM در نمونه سرم همراه با سایر روش‌های تشخیصی دیگر همچون کشت جهت تشخیص آسپرپیلوس مهاجم استفاده شد. در این مرحله آنتی ژن GM موجود در نمونه‌های سرم گرفته شده از بیماران را به روش الایزا و با استفاده از کیت Platelia™ *Aspergillus* EIA شرکت Bio-Rad کشور فرانسه با Lot No؛ ۶۲۷۶۹ در آزمایشگاه تحقیقاتی قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران اندازه‌گیری شد. در تست تعیین GM از میکروپلیت‌هایی که به‌وسیله آنتی‌بادی ضدآنتی‌ژن GM که در ته چاهک‌ها پوشیده شده استفاده گردید سپس نمونه سرم و آنتی‌بادی تعیین‌کننده را اضافه و در ۳۷ °C به‌مدت ۹۰دقیقه انکوبه‌کرده سپس پلیت‌ها را شستشو و رنگ‌زا اضافه و ۳۰ دقیقه در ۳۰°C در

1. tazobactam

مکان تاریکی انکوبه می‌کنیم. سپس واکنش با H2SO4 متوقف شده در صورت وجود آنتی‌ژن رنگ زرد ایجاد می‌شود (برطبق دستور بروشور کیت Platelia™ *Aspergillus* EIA) (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره۱: شمای کلی تست تعیین گالاکتومانان در نمونه سرم یا نمونه شت و شوی برانش

به منظور تشخیص بیماری‌های تهاجمی در افراد در معرض خطر و همچنین طراحی مطالعات کارآزمایی بالینی جهت بررسی داروهای جدید و راهکارهای مدیریتی، سازمان اروپایی درمان و تحقیقات سرطان[1] (EORTC) و موسسه بین‌المللی آلرژی و گروه مطالعه‌ای بیماری قارچی (MSG)[2] یک تعریف استاندارد جهت عفونت‌های قارچی تهاجمی برای تحقیقات اپیدمیولوژیکی و کلینیکی وضع نموده است. در این تعریف افراد مشکوک به آسپرژیلوس مهاجم بر اساس عوامل میزبان، معیارهای کلینیکی و قارچ‌شناسی در سه دسته قطعی[3]، محتمل[4]، ممکن[5] دسته‌بندی شدند(۲۲).

تجزیه و تحلیل اطلاعات از نمونه‌های بیماران مورد مطالعه در جداول و فرم‌های اطلاعاتی ثبت گردید و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و graph pad (نسخه ۴) مورد تجزیه و تحلیل آماری شد.

یافته ها

درمطالعه حاضر تمامی بیماران بستری در بخش‌های بیمارستان‌های مورد مطالعه از نظر شرایط و معیارهای ورود به مطالعه بررسی شدند. از این بین، تعداد ۷۰ بیمار دارای معیارهای ورود، ۸ بیمار به علت عدم رضایت همراهان بیمار از مطالعه خارج و در نهایت ۶۲ بیمار بررسی شدند. از این تعداد بیمار ۴۰ بیمار (۶۴/۵ درصد) مرد و ۲۲ بیمار (۳۵/۵ درصد) زن بودند. حداقل سن بیماران ۲ سال و حداکثر ۷۴ سال بود. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه ۳۲/۱۷ سال بود. میزان مرگ و میر در بیماران مورد مطالعه ۳۳/۹ درصد بود که از ۶۲ بیمار مشکوک به آسپرژیلوزیس مهاجم؛ ۲۱ بیمار فوت کردند. بیشترین میزان مرگ ومیر به ترتیب در بیماران مبتلا به ALL[6] (۳۱/۲ درصد)، AML[7]، لنفوم غیرهوچکین (۲۵ درصد) و لنفوم هوچکین (۱۲/۵ درصد) بود. بیشترین بدخیمی در افراد مورد بررسی به ترتیب ALL با فراوانی ۱۹ (۳۰/۶ درصد)، AML با فراوانی ۱۴ (۲۲/۶ درصد)، لنفوم هوچکین با فراوانی ۱۱ (۱۷/۷ درصد) بود. در بررسی‌های به‌عمل آمده از علایم و نشانه‌های بالینی بیماران مورد مطالعه، بیشترین علایم به ترتیب مربوط به تب بالا و مداوم (۸۳/۹ درصد)، بی‌حالی و ضعف (۶۲/۹ درصد)، سرفه (۲۲/۶ درصد) و تب بالا و پایین‌رونده (۱۴/۵ درصد) بود. در این مطالعه ۵۶ بیمار (۹۰/۳ درصد) دارای نوتروپنی بودند. بیشتر بیماران ۶۰ نفر (۹۶/۸ درصد) تحت شیمی درمانی قرار داشتند. در بررسی‌های به‌عمل آمده در سی‌تی‌اسکن از سینوس ۵ بیمار (۸/۱ درصد) افزایش ضخامت موکوزال سینوس ماگزیلاری، اتموئیدال، اسفنوئیدال و درگیری دوطرفه مشاهده شد. در سی‌تی‌اسکن مغز یک مورد آتروفی مغز و یک مورد ضخامت هیپوفیز مشاهده شد. در سی‌تی‌اسکن ریه سه مورد (۴/۸ درصد) انفیلتراسیون منتشر دیده شد. هر چند که علایم اختصاصی سی‌تی‌اسکن آسپرژیلوس مهاجم در بیماران نوتروپنیک شامل Halo sign و

1. European Organization for Research and Treatment of Cancer
2. Mycosis Study Group
3. Proven
4. Probable
5. Possible

6. Acute Lymphoblastic Leukemia
7. Acute Myeloid Leukemia

Air crescent است ولی در هیچ‌یک از این بیماران دیده نشد. در بررسی‌های کشت خون در نوبت اول ۹۰/۳ درصد (۵۶ نفر) نتیجه منفی داشتند و در ۱ نفر (۱/۶ درصد) کاندیدا آلبیکنس و در ۴ نفر (۶/۵ درصد) باکتری مشاهده گردید. باکتری‌ها شامل استافیلوکوک ارئوس (۳ نفر) و انتروباکتر (۱ نفر) بود. در کشت‌های خون نوبت دوم و سوم نتیجه همگی کشت ها منفی شد. کشت خون از نظر آسپرژیلوس در ۱۰۰ درصد بیماران منفی بود.

اندازه گیری آنتی ژن گالاکتومانان در سرم:

در مطالعه حاضر، بررسی آنتی ژن GM به وسیله تست الایزای ساندویچی در نمونه‌های سرم در ۷۲ نمونه (۵۰ نمونه نوبت اول و ۲۲ نمونه نوبت دوم) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مثبت روش آنتی‌ژن GM با کاتاف ۰/۵ در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در مطالعه حاضر ۱۳ بیمار، تست GM آن‌ها مثبت شد که در ۳ بیمار (۶ درصد) تست تعیین آنتی ژن GM با کاتاف بیشتر از ۰/۵ در هر دو نوبت مثبت بود که در کل ۱۶ نمونه (۲۲ درصد) با کاتاف بیشتر از ۰/۵ مثبت اعلام شد. براساس اطلاعات موجود و بررسی‌های به‌عمل آمده حساسیت و اختصاصیت این تست به‌ترتیب ۶۱ درصد و ۹۰ درصد بود.

در مطالعه حاضر با توجه به بررسی‌های بالینی و آزمایشگاهی صورت گرفته و تجزیه و تحلیل نتایج علایم بالینی بیماران (مثل یافته‌های رادیوگرافی، سی‌تی‌اسکن و تظاهرات و علایم کلینیکی)، عوامل میزبان، زمینه‌ای و آزمایشات قارچ شناسی (مانند کشت و اندازه‌گیری آنتی ژن GM) بر اساس دستورالعمل اصلاح شده EORTC/MSG، ۱۸ (۲۹ درصد) بیمار از لحاظ ابتلاء به آسپرژیلوس مهاجم به تفکیک به صورت؛ ۵ مورد (۲۸ درصد) محتمل و ۱۳ مورد (۷۲ درصد) ممکن بودند (جدول شماره ۲). در مطالعه حاضر میزان مرگ و میر در بین افراد محتمل و ممکن آسپرژیلوس مهاجم ۵۵/۶ درصد بود. از ۱۳ بیماری که تست GM آن‌ها مثبت شده بود ۹ بیمار (۶۹ درصد) فوت کرده بودند.

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی تست تعیین آنتی ژن GM در نمونه‌های سرم در موارد بیماران مشکوک به آسپرژیلوزیس مهاجم در بین مبتلایان به بدخیمی‌های خونی بخش انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری و گیرندگان پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهران سال ۱۳۸۹

نوبت نمونه تست تعیین آنتی ژنGM	نوبت اول	نوبت دوم	مجموع
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
کاتاف بیشتر از ۰/۵	۱۳ (۲۶)	۳ (۱۳/۶)	۱۶ (۲۲)

جدول شماره ۲: اطلاعات مربوط به۱۸ بیمار محتمل و ممکن آسپرژیلوزیس مهاجم در بین مبتلایان به بدخیمی های خونی بخش انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری و گیرندگان پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهران سال ۱۳۸۹

ردیف	سن و جنس	نارسایی تنفسی	علائم رادیوگرافی و CT	بیماری زمینه ای	نوتروپنی	IA طبقه بندی	عاقبت بیمار
۱	۲/مرد	+	انفیلتراسیون ریه، افزایش ضخامت سینوس ماگزیلار، آتروفی مغز	HLH	–	Probable	فوت
۲	۲۴/مرد	–	–	ALL	+	Possible	زنده
۳	۲۲/زن	+	–	ALL	+	Probable	فوت
۴	۴۲/زن	–	–	ALL	+	Possible	فوت
۵	۵۶/مرد	–	–	لنفوم	+	Possible	فوت
۶	۷۴/مرد	–	–	CLL	–	Probable	زنده
۷	۱۸/مرد	+	انفیلتراسیون منتشر در هر دو لوب	ALL	+	Probable	فوت
۸	۵۰/مرد	–	–	AML	+	Possible	فوت
۹	۵۰/زن	+	–	لنفوم هوچکین	+	Probable	فوت
۱۰	۴۷/مرد	–	–	لنفوم هوچکین	+	Possible	فوت
۱۱	۶۰/مرد		–	لنفوم	+	Possible	زنده
۱۲	۱۴/مرد	–	–	ALL	+	Possible	زنده
۱۳	۹/زن	–	–	آنمی فانکونی	+	Possible	فوت
۱۴	۲۹/زن	+	افزایش ضخامت سینوس ماگزیلاروا‌تموئیدال وبای لترال	لنفوم هوچکین	+	Possible	زنده
۱۵	۲۰/مرد	–	افزایش ضخامت سینوس ماگزیلاروا‌سفنوئیدال	لنفوم هوچکین	+	Possible	زنده
۱۶	۲۴/مرد	–	افزایش ضخامت سینوس ماگزیلار	AML	+	Possible	زنده
۱۷	۴۸/مرد	+	–	AML	+	Possible	زنده
۱۸	۶۰/مرد	+	–	لنفوم	+	Possible	فوت

بحث

درمان‌های تجربی در گروه‌های در معرض خطر دارای معایب زیادی از جمله سمیت، افزایش هزینه بیماران به دلیل درمان غیر مؤثرمی‌باشد(۲۴،۲۳). از طرف دیگر برای درمان‌های انحصاری شناسایی بیماران در معرض خطر[1] ضرورت دارد بنابراین انجام آزمایشات حساس و سریع مورد نیاز است. این مطالعه با هدف شناسایی آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران بدخیمی خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان باروش تشخیصی ELISA انجام شد.

در مطالعه حاضر میزان و شیوع آسپرژیلوزیس مهاجم در ۶۲ بیمار مبتلا به بدخیمی خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان مورد مطالعه با روش تشخیصی الایزا، ۲۲ درصد بوده است که نشان دهنده شیوع بالای این بیماری در این گروه‌های در معرض خطر می‌باشد. از آن‌جایی‌که بیمارستان شریعتی تهران و بیمارستان امام خمینی ساری دو مرکز ارجاعی مهم برای این گروه‌های در معرض خطر می‌باشد این میزان می‌تواند منعکس‌کننده بالا بودن شیوع این بیماری در ایران در این افراد باشد. مطالعات مختلف شیوع آسپرژیلوزیس مهاجم این بیماری را از ۱۵-۱ درصد گزارش کردند(۳). اما برخی شیوع را در اتوپسی بیماران مبتلا لوسمی حاد ۴۱ درصد گزارش کردند(۲۸،۲۷). برخی دیگر شیوع را ۷ درصد گزارش کردند(۲۶). در مطالعه حاضر شیوع محتمل و ممکن آسپرژیلوزیس مهاجم از بین ۳۳ بیمار مبتلا به لوسمی حاد ۲۱ درصد (۷ بیمار) گزارش شد. بعضی از مطالعات میزان مرگ و میر را ۶۰ درصد گزارش کرده، متذکر شده‌اند که با تعویق درمان میزان مرگ و میر افزایش می‌یابد(۳). در مطالعه Shohan و همکاران میزان مرگ و میر ۹۵ درصد گزارش شده است(۲۹). در مطالعه بدیعی و همکاران از ۱۴ بیماری که توسط روش مولکولی PCR-ELISA نتایج مثبتی برای آسپرژیلوزیس داشتند ۵ بیمار علی‌رغم درمان ضد قارچی (۳۵/۵ درصد) فوت کردند(۳۰). میزان مرگ‌ومیر ناشی از آسپرژیلوزیس مهاجم در گیرندگان پیوند بیش از ۹۰ درصد می‌باشد و عامل ۱۵-۱۰ درصد از تمامی مرگ و میرهای گیرندگان پیوند در سال اول، آسپرژیلوزیس مهاجم می‌باشد(۳۱). در مطالعه حاضر میزان مرگ و میر ناشی از آسپرژیلوزیس مهاجم در گیرندگان پیوند مغز استخوان ۴۵ درصد بود. اختلافات موجود در میزان شیوع در گزارشات مختلف می تواند ناشی از عوامل و مشکلات خاصی همانند استفاده از روش‌های تشخیصی مختلف مانند روش سنتی (کشت خون)، مولکولی و تعیین آنتی ژن گالاکتومانان، عدم انجام بیوپسی به علت خطر آفرین بودن ناشی از ترومبوسایتوپنی این روش در بیمارانی که شرایط بحرانی دارند و عدم انجام اتوپسی می باشد. متأسفانه در این مطالعه با توجه به عدم امکان انجام روش بیوپسی و اتوپسی پس از مرگ از بیماران مشکوک به آسپرژیلوزیس مهاجم جهت بررسی های پاتولوژی و تأیید قطعی آن، هیچ مورد قطعی آسپرژیلوزیس مهاجم گزارش نگردید.

در مطالعه حاضر بیشترین میزان بیشترین میزان مرگ و میر در بیماران به ترتیب ALL (۳۰/۶ درصد)، AML (۲۲/۶ درصد) و لنفوم هوچکین (۱۷/۷ درصد) بود. در مطالعه بدیعی و همکاران در بین ۱۹۴ بیمار مورد مطالعه از نظر آسپرژیلوزیس مهاجم، ۳۷/۹ درصد بیماران AML ، ۱۹/۹ درصد ALL، لنفوم ۱۴/۳ درصد و بقیه بیماران بیماری‌های زمینه‌ای آنمی‌آپلاستیک، پان سایتوپنی، لوسمی میلوئیدی مزمن داشتند(۳۰). در مطالعه Ramirez و همکاران بیشترین میزان مرگ و میر آسپرژیلوزیس مهاجم در بین بیماران با بیماری زمینه‌ای لوسمی ۴۷ درصد، لنفوم ۲۹ درصد، میلوما ۲۲ درصد، آپلازی ۱۰ درصد گزارش کردند. در این مطالعه ۴۶ درصد این بیماران دارای نوتروپنی بودند(۳۲). در مطالعات Hebart از ۸۴ بیمار مورد مطالعه از نظر آسپرژیلوزیس مهاجم بیماری‌های زمینه‌ای به ترتیب

1. High Risk

شامل لوسمی حاد (۳۹ بیمار)، لوسمی میلوئیدی مزمن (۲۵ نفر) لنفوم (۹ نفر)، سندرم میلودیسپلاستیک (۶ نفر)، مولتیپل میلوما (۲ نفر)، آنمی آپلاستیک (۲ نفر) و تالاسمی (۱نفر) بودند(۳۳). امروزه در بسیاری از مطالعات و مراکز از روش‌های تشخیصی سریع مثل تعیین آنتی‌ژن GM به‌خصوص در نمونه‌های BAL و سرم استفاده می‌شود که در تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم بسیار کمک‌کننده می‌باشد. در یک مطالعه آینده‌نگر صورت گرفته در بیماران نوتروپنیک مبتلا به آسپرژیلوزیس مهاجم نشان داده شد که حساسیت تست تعیین آنتی‌ژن GM در نمونه سرم معادل ۹۰ درصد می‌باشد(۳۴). در مطالعه White وهمکاران که بر روی ۱۱۶ بیمار مشکوک به آسپرژیلوزیس مهاجم تست GM را انجام داده بودند حساسیت این تست ۷۶/۷ درصد نشان داده شد(۳۵). به کارگیری نمونه BAL در بیماران آسپرژیلوزیس مهاجم به‌خصوص در بیمارانی که نوتروپنیک نیستند جهت تشخیص بسیار مفید می‌باشد، زیرا سلول‌های نوتروفیل موجود در جریان خون با اتصال به رسپتور مانوز آنتی‌ژن های GM این آنتی‌ژن ها را پاک‌سازی می‌کنند و سطح این آنتی ژن در سرم کاهش یافته در نهایت حساسیت تست تعیین آنتی ژن GM در نمونه سرم پایین می آید. از این رو توصیه شده است که در این بیماران تست تعیین آنتی‌ژن‌های GM بر روی ریه که اولین ناحیه ورود کونیدی آسپرژیلوس بوده در صورت ژرمیناسیون و تهاجم به بافت این ناحیه آنتی ژن GM در مایعات درون ریه آزاد می‌شود؛ متمرکز شود(۳۶). در مطالعه هدایتی و همکاران که بر روی نمونه‌های BAL جهت تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران بستری ICU انجام شد، ۴ مورد (۳۰/۸ درصد) ممکن و ۹ مورد (۶۹/۲ درصد) محتمل گزارش گردید(۴۰). در مطالعه دیگری از همین محققین حساسیت و اختصاصیت تست تعیین آنتی‌ژن GM با کاتاف بیشتر از ۰/۵ در نمونه‌های BAL به ترتیب ۹۲ درصد و۶۶ درصد منتشر شد(۴۱). اگرچه تست GM حساسیت و اختصاصیت بالایی را در این مطالعه نسبت به PCR نشان داد اما این تست قادر به شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس نیست و همان‌طور که می دانیم امروزه بعضی از گونه‌های آسپرژیلوس نسبت به داروهای ضد قارچی مقاومت‌هایی را از خود نشان داده‌اند. بنابراین استفاده از تست‌هایی نظیر Real-Time PCR/FRET که امکان و توانایی شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس را دارد با ارزش می‌باشد. دلایل مختلفی برای این مسأله بیان شده است در مطالعه Sanguinetti و همکاران که بر روی ۲۴ نمونه BAL تهیه شده از بیماران قطعی و محتمل روش‌های Real Time PCR و GM با هم مقایسه شد که ۱۰۰ درصد نمونه‌ها با تست GM مثبت بود در حالی‌که ۹۰ درصد نمونه‌ها با تست Real Time PCR مثبت شده بود یعنی ۲ بیمار علی‌رغم مثبت شدن GM تست Real Time PCR آن‌ها منفی شده بود. در بررسی‌های به‌عمل آمده مشخص شد که نتیجه PCR منفی ممکن است به‌دلیل نتیجه عفونت بیماران با دیگر گونه‌هایی باشد که در آن مطالعه از پرایمر و پروب‌های اختصاصی آنان استفاده نشده بود. دلیل دیگر این‌که مثبت شدن ELISA ممکن است در نتیجه وجود دیگر قارچ‌های رشته‌ای نظیر گونه‌های پنی‌سیلیوم باشد که ایجاد واکنش متقاطع در آزمایش GM می کند(۳۹-۳۷). در مطالعه حاضر ۸۵ درصد بیمارانی که آنتی‌ژن GM آن‌ها مثبت شده بود داروی آمفوتریسینB مصرف کرده بودند که این نشان‌دهنده این است که داروی آمفوتریسین بر روی این تست تأثیر چندانی نداشته علی‌رغم مصرف دارو باز هم تست مثبت شده است. در همین مطالعه تمامی بیمارانی که فوت کرده آزمایش GM آن‌ها مثبت شده بود نیز همگی داروی آمفوتریسین B مصرف کرده بودند اما به علت این‌که احتمالاً تشخیص به‌موقع نبوده دارو دیگر اثری نداشته است.

روش الایزا ابزار تشخیصی مناسبی برای ردیابی آنتی ژن آسپرژیلوس در خون می‌باشد اما امکان و توانایی شناسایی گونه‌های مختلف

آسپرژیلوس را ندارد بنابراین تست GM همراه با روش Real Time PCR/FRET که روش بسیار مناسبی برای تشخیص گونه‌های آسپرژیلوس در بیماران با بدخیمی‌های خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان است در غربالگری بیماران در معرض خطر متقارن با یکدیگر برای تأیید تشخیص IA بسیار مناسب می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب قدردانی و سپاس خود را از همکاری صمیمانه و حمایت‌های مالی معاونت محترم تحقیقات و فناوری و پرسنل مسئولیت‌پذیر دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز تحقیقات خون و انکولوژی و پیوند مغز استخوان، بیمارستان شریعتی تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران ابراز می‌داریم. نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از بیماران و پرسنل صدوق هر دو مرکز به خصوص سرکارخانم عذرا مهدوی سرپرستار و سرکارخانم رشیدی پرستار بخش انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری که در اجرای این تحقیق با صبر و حوصله ما را یاری کردند اعلام می‌دارند. این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد قارچ‌شناسی آقای مجتبی نبیلی می‌باشد.

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۶۱- ۸۸ است که منابع مالی آن به طور مشترک توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز تحقیقات خون و انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تامین شده است.

References

1. Vandewoude KH, Vogelaers D, Blot SI. Aspergillosis in the ICU- The new 21st century problem? Med Mycol 2006, 44(Supple): S71-S76.
2. Lewis M, Kallenbach J, Ruff P, Zaltzman M, Abramowitz J, Zwi S. Invasive pulmonary aspergillosis complicating influenza A pneumonia in a previously healthy patient. Chest 1985; 87(5): 691-693.
3. Stevens DA, Kan VL, Judson MA, Morrison VA, Dummer S, Denning DW, et al. Practice guidelines for diseases caused by Aspergillus. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2000; 30(4): 696-709.
4. Vandewoude KH, Blot SI, Depuydt P, Benoit D, Temmerman W, Colardyn F, et al. Clinical relevance of Aspergillus isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. Crit Care 2006; 10(1): R31.
5. Verweij PE, Denning DW. The challenge of invasive aspergillosis: increasing numbers in diverse patient groups. Int J Infect Dis 1997; 2: 61-63.
6. Patterson TF. Advances and challenges in management of invasive mycoses. Lancet 2005; 366(9490): 1013-1025.
7. Wingard JR, Anaissie EJ. Fungal Infections in the Immunocompromised Patient. 1st ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group; 2005. p. ш-v.
8. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, et al. Use of Real-Time PCR on Blood Samples for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. Clin Infect Dis 2001; 33(9): 1504-1512.
9. Joseph Wheat L, Walsh T. Diagnosis of Invasive Aspergillosis by Galactomannan Antigenemia Detection using an enzyme immunoassay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27(4): 245-251.

10. Rello J, Esandi ME, Mariscal D, Gallego M, Domingo C, Valles J. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: report of eight cases and review. Clin Infect Dis 1998; 26(6): 1473-1475.
11. Meersseman W, Lagrou K, Johan M, Van Wijngaerden E. Invasive Aspergillosis in the Intensive Care Unit Aspergillosis in the ICU. Clin Infect Dis 2007; 45(2): 205-215.
12. Ampel NM. Diagnosing Invasive Aspergillosis in ICU Patients. Published in Journal Watch Infectious Diseases January 16, 2008. Available: http://www.jwath.org/cgi/collectiomArchive/editors_pick_hiv_aids. Accessed June 5, 2011.
13. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170(6): 621-625.
14. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. J Infect 1996; 33(1): 23-32.
15. Esteban A, Fernández-Segoviano P. Is autopsy dead in the ICU? Intensive Care Med 2003; 29(4): 522-525.
16. Ascioglu S, Rex JH, de Paw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. Clin Infect Dis 2002; 34(1): 7-14.
17. Segal BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173(7): 707-717.
18. Wheat LJ. Approach to the diagnosis of invasive aspergillosis and candidiasis. Clin Chest Med 2009; 30(2): 367-377.
19. Vallés J, Mesalles E, Mariscal D, del Mar Fernández M, Peña R, et al. A 7-year study of severe hospital-acquired pneumonia requiring ICU admission. Intensive Care Med 2003; 29(11): 1981-1988.
20. Bulpa PA, Dive AM, Garrino MG, Delos MA, Gonzalez MR, Evrard PA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease patients with invasive pulmonary aspergillosis: benefits of Intensive care? Intensive Care Med 2001; 27(1): 59-67.
21. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis 2002; 34(1): 7-14.
22. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Denning, Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/ MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 2008; 46(12): 1813-1821.
23. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. Clin Infect Dis 2001; 33(5): 641-647.
24. O'Shaughnessy EM, Forrest GN, Walsh TJ. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: recent advances

and new challenges. Curr Treat Options Infect Dis 2003; 5: 507-515.

25. Latgé JP. Aspergillus fumigatus and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12(2): 310-350.
26. Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S, Strom BL, Lusk EJ, Cassileth PA. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. Ann Intern Med 1984; 100(3): 345-351.
27. Duong M, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Olivier M, Bergeron MG. Kinetic study of host defense and inflammatory response to Aspergillus fumigatus in steroid-induced immunosuppressed mice. J Infect Dis 1998; 178(5): 1472-1482.
28. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. J Infect Dis 1997; 175(6): 1459-1466.
29. Shoham S, Hinestrosa F, Moore J Jr, O'Donnell S, Ruiz M, Light J. Invasive filamentous fungal infections associated with renal transplant tourism. Transpl Infect Dis 2010; 12(4): 371-374.
30. Badiee P, Kordbacheh P, Alborzi A, Ramzi M, Shakiba E. Molecular detection of invasive aspergillosis in hematologic malignancies. Infection 2008; 36(6): 580-584.
31. Paterson DL, Singh N. Invasive aspergillosis in transplant recipients. Medicine (Baltimore) 1999; 78(2): 123-138.
32. Ramírez M, Castro C, Palomares JC, Torres MJ, Aller AI, Ruiz M, et al. Molecular detection and identification of Aspergillus spp. from clinical samples using real-time PCR. Mycoses 2009; 52(2): 129-134.
33. Hebart H, Löffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Böhme A, et al. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. J Infect Dis 2000; 181(5): 1713-1719.
34. Hartemink KJ, Paul MA, Spijkstra JJ, Girbes AR, Polderman KH. Immunoparalysis as a cause for invasive aspergillosis? Intensive Care Med 2003; 29(11): 2068-2071.
35. White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. Clin Infect Dis 2006; 42(4): 479-486.
36. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. Am J Respir Crit Care Med 2008; 177(1): 27-34.
37. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L, et al. Comparison of Real-Time PCR, Conventional PCR, and Galactomannan Antigen Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Hematology Patients for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. J Clin Microbiol 2003; 41(8): 3922-3925.
38. Costa C, Costa JM, Desterke Ch, Botterel F, Cordonnier C, Bretagne S. Real-Time PCR Coupled with Automated DNA Extraction and Detection of Galactomannan Antigen in Serum by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. J Clin Microbiol 2002; 40(6): 2224-2227.

39. Verweij PE, Weemaes CM, Curfs JH, Bretagne S, Meis JF. Failure to detect circulating Aspergillus markers in a patient with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 2000; 38(10): 3900-3901.
40. Hedayati MT, Khodavaisy S, Alialy M, Mahdavi Omran S, Habibi MR. Invasive aspergillosis in intensive care unit patients from Iran. Proceedings of the 5th Advances Against Aspergillosis conference; 2012 Jan 26-28; Istanbul, Turkey.
41. Khodavaisy S, Hedayati MT, Alialy M, Habibi MR. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid in intensive care unit patients at risk for invasive aspergillosis. Proceedings of the 5th Advances Against Aspergillosis conference; 2012 Jan 26-28; Istanbul, Turkey.