

تشخیص سریع آسپرژیلوزیس تهاجمی با روش تعیین آنتی ژن گالاکتومانان (مقاله مروری)

صادق خداویسی^۱، محمد تقی هدایتی^۲، بهروز داوری^۳، قاسم زمینی^۳

۱- کارشناس ارشد قارچ شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان. سنندج، ایران (مؤلف مسئول) تلفن: ۰۸۷۱-۶۶۳۱۲۹۱

sadegh_7392008@yahoo.com

۲- استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳- استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان. سنندج، ایران

چکیده:

آسپرژیلوزیس تهاجمی بیماری شدید و کشنده قارچی در بیماران با ضعف در سیستم ایمنی می باشد. تشخیص قطعی این بیماری، علیرغم پیشرفت های حاصل شده در روش های تشخیصی بسیار دشوار می باشد. در حال حاضر در کشور ما تشخیص بیماری در اغلب موارد بر اساس یافته های بالینی و رادیولوگرافی و روش های قارچ شناسی مشاهده مستقیم و کشت نمونه صورت می پذیرد. از طرفی هم با توجه به تهاجمی بودن و پیشرفت سریع بیماری در صورت عدم استفاده از روش های تشخیصی مناسب، کنترل بیماری با مشکل مواجه می باشند. بنابراین تشخیص در مراحل اولیه بیماری به وسیله روش های غیر تهاجمی سریع و اختصاصی جهت شروع هرچه سریعتر و پیگیری درمان های مؤثر بسیار ضروری می باشد. به همین منظور امروزه از تست های سرولوژی سریع مثل تعیین آنتی ژن گالاکتومانان در نمونه های مختلف بالینی مثل سرم، مایع برونکوآلئولار، ادرار، مایع مغزی نخاعی و بافت استفاده می شود. مطالعات نشان داده که تست آنتی ژن گالاکتومانان نسبت به روش های دیگر مثل کشت و رادیولوژی از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار می باشد. در کل این روش تشخیصی غیر تهاجمی، سریع و اختصاصی بوده و شروع هرچه سریعتر درمان های مؤثر را مجاز می کند و پزشکان را در مورد نوع درمان و یا پیگیری آن و سایر اقدامات کلینیکی توانمند می سازد. یقیناً مطالعات آینده نگر با طراحی مناسب، نمونه برداری سیستماتیک و استفاده از تعریف های توافق شده مورد نیاز می باشد تا عملکرد این تست تشخیصی در نمونه ها و جمعیت های مختلف بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

کلید واژه ها: آسپرژیلوزیس تهاجمی، آنتی ژن گالاکتومانان، تشخیص

وصول مقاله: ۹۰/۲/۲۴ اصلاحیه مقاله: ۹۰/۸/۸ پذیرش مقاله: ۹۰/۸/۱۴

مقدمه:

محیط های مختلف مثل وسایل و تجهیزات بیمارستانی و خاک گلدان های موجود در بیمارستان های کشور ما را نشان داده اند (۴-۲). این بیماری با میزان مرگ و میر بسیار بالا در بیماران با ضعف در سیستم ایمنی مثل؛ بیماران دچار نوتروپنی شدید، گرانولوماتوز مزمن، بدخیمی های خونی، دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان، سلول های بنیادی و سایر بافت ها، دریافت کنندگان داروهای استروئیدی، آنتی بیوتیک های وسیع الطیف به مدت طولانی

آسپرژیلوزیس تهاجمی (IA)^۱ بیماری شدید و کشنده ناشی از گونه های مختلف قارچ فرصت طلب آسپرژیلوس می باشد (۱). این عوامل بطور وسیع در محیط اطراف ما پراکنده می باشند. مطالعات صورت گرفته در این زمینه توزیع وسیعی از گونه های این قارچ بخصوص گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس و فلاووس در

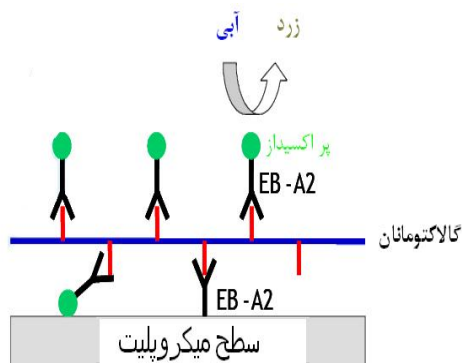
1-Invasive Aspergilosis

های ضد آسپرژیلوس در افراد با سیستم ایمنی مهار شده انجام پذیر نبوده و این تست ها جهت تشخیص بیماری در بیماران غیر نوتروپنیک با وضعیت وخیم مورد استفاده قرار نمی گیرد (۷). بعلت محدودیت این روش های تشخیصی و کشندگی بسیار بالای بیماری، استفاده از روش های غیر کشتی بر پایه تعیین آنتی ژن های قارچ آسپرژیلوس بسیار مفید بوده و با تشخیص بیماری در مراحل اولیه، شروع هرچه سریعتر درمان های مؤثر ضد قارچی را مجاز می کند. Sulahian و همکاران در اکثر بیماران مبتلا به بیماری IA، بررسی تعیین آنتی ژن در نمونه سرم را در تشخیص اولیه با ارزش تر از روش های دیگر مثل سی تی اسکن و روش های کشتی دانستند (۱۱). همچنین Maertens و همکاران نیز بیماران دریافت کننده سلول های بنیادی مشکوک به بیماری IA را به وسیله روش های رادیولوژیکی، سی تی اسکن های متعدد قفسه سینه، کشت های هفتگی و تست آنتی ژنی بصورت هفته ای ۲ بار مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که تشخیص به وسیله تعیین آنتی ژن GM در نمونه سرم حساستر و اختصاصی تر از سایر روش های مثل رادیولوژی، سی تی اسکن و کشت می باشد (۱۲). بر همین اساس امروزه از این تست در کنار روش های تشخیصی دیگر جهت تشخیص بیماران در معرض خطر بالای بیماری IA استفاده می شود و تعیین آنتی ژن بصورت ۲ بار در هفته می تواند تشخیص اولیه IA را تسهیل کند (۱۴ و ۱۳). در کل این روش تشخیصی سریع و اختصاصی بوده و شروع هرچه سریعتر درمان های مؤثر را مجاز می کند و پزشکان را در مورد اصلاح نوع درمان و یا پیگیری بیماری و سایر اقدامات کلینیکی توانمند می سازد. هرچند که، بعلت وجود نتایج مثبت و منفی کاذب در این تست توصیه می شود در تفسیر نتایج آن دقت لازم صورت گیرد و نتایج آن در کنار سایر روش های میکروبیولوژی و بالینی مورد بررسی قرار گیرد (۷).

مشاهده می شود (۵ و ۶). بیماری حتی در بیماران فاقد هر گونه ریسک فاکتور مشخص و نیز بیماران دچار وضعیت وخیم که به مدت طولانی در بخش مراقبت های ویژه بستری (ICU) می شوند نیز رخ می دهد (۸). بیماران در بخشهای اونکولوژی و ICU از طریق منابع مختلفی بخصوص از طریق دستگاه تنفسی در تماس با گونه های قارچی می باشند که در صورت عدم پیشگیری، تشخیص و درمان به موقع منجر به پیشرفت بیماری در این بیماران می شوند (۸). بقای بیماران مبتلا به این بیماری به طور کلی کم و در حدود ۳۰-۵۰٪ است که اکثراً "بعلت عدم اثبات تشخیص بیماری در مراحل اولیه آلودگی و عدم شروع زود هنگام درمان های ضد قارچی برای بهبود وضعیت بیماران می باشد (۹). علائم بالینی IA شامل وجود تب، افزایش ترشحات تنفسی، افزایش نیاز به اکسیژن و خلط خونی می باشد که اختصاصی بیماری نیستند. همچنین تشخیص بیماری با استفاده از تصاویر رادیولوژی نیز در اثر تظاهرات غیر طبیعی مثل آتلاکتازی و همچنین تنفس مصنوعی در اکثر بیماران محدود بوده و علائم اختصاصی در سی تی اسکن مثل؛ halo sign و air crescent sign که بیشتر در بیماران دارای نوتروپنی نیز مشاهده می شود دارای حساسیت کم و حدود ۵٪ می باشند. اغلب روش های تشخیصی دیگر مثل بررسی های هیستوپاتولوژیک و کشت نمونه های بافتی نیز بعلت وضعیت های زمینه ای نامناسب بیماران مثل ترومبوسیتوپنی و شرایط وخیم کلینیکی انجام پذیر نمی باشند. بعلاوه در بازنگری نمونه های مثبت اعلام شده توسط کشت و بررسی های هیستوپاتولوژیک، اکثراً دارای نتایج منفی بوده و این روش ها حساسیت لازم را برای تعیین آلودگی خصوصاً در مراحل اولیه عفونت را دارا نمی باشند (۱۰). با توجه به اینکه تولید آنتی بادی در بیماران دچار نقص ایمنی مبتلا به IA کم می باشد، بنابراین تشخیص آنتی بادی

1 - Intensive care unit

۱۹۹۰ بصورت استاندارد و فراوان در دسترس قرار گرفت. امروزه کیت *The platelia Aspergillus antigen immunoassay* ساخت شرکت Bio-Rad که مورد تأیید سازمان کل غذا و دارو (FDA) قرار گرفته قابل دسترس در بازار می باشد. در این تست از مونوکلونال آنتی بادی های که با مصون سازی رت (موش صحرایی) به وسیله مسیلیوم های قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس به دست می آید استفاده می شود. این آنتی بادی قادر به تشخیص اپی توپ GM که شامل (۱- β گالاکتوفورانوز می باشد و با چندین گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ورسیکالر، آسپرژیلوس ترئوس واکنش می دهد (۲۰). در شکل شماره ۱ مراحل این تست نشان داده شده است.



شکل شماره ۱- شمای کلی تست تعیین آنتی ژن گالاکتومانان به وسیله آزمایش الیز

از آنجا که برای به دست آوردن نتایج دقیق باید آزمایش ها به طور تخصصی انجام شود و همچنین پزشکان نیز باید از منافع و محدودیت های این آزمایش در نمونه های مختلف مطلع بوده تا از آن به درستی در درمان و مدیریت وضعیت بیماران مبتلا به IA استفاده کنند. این مطالعه به صورت مروری و با هدف بررسی استفاده های کلینیکی و محدودیت های تست تشخیصی تعیین آنتی ژن GM در نمونه های مختلف بالینی جهت تشخیص IA صورت گرفته است.

اساس تست:

آنتی ژن گالاکتومانان (GM)^۱ پلی ساکارید دیواره سلولی قارچ آسپرژیلوس است که در طی رشد و تهاجم به بافت، آزاد می شود و در نمونه های بالینی به وسیله آزمایش الیزای قابل دسترس در بازار (*Platelia Aspergillus*; Bio Rad) به وسیله مونوکلونال آنتی بادیهای رت (EB-A2) قابل آشکار سازی می باشد (۱۵). این آنتی ژن را به وسیله روش های دیگر مثل RIA^۲، EIA^۳ و آگلوتیناسیون لانکس نیز می توان تعیین کرد (۱۳ و ۱۶). ولی این روش ها نسبت به روش الیزا دارای محدودیت های (تشخیص ۱۵ng/ml آنتی ژن در مقابل ۱ng/ml) می باشند. از آنجا که GM یک کربوهیدرات محلول در آب است می توان آنرا علاوه بر سرم، در سایر نمونه های به دست آمده از بیمار مثل BAL، ادرار، CSF و نمونه های بافتی نیز تعیین کرد. در مطالعات زیادی از نمونه های فوق، جهت تشخیص IA استفاده شده است (۱۷-۱۹).

اولین بار در اواخر دهه ۱۹۷۰ پیشنهاد شد که از مونوکلونال آنتی بادی ها جهت تشخیص بیماری IA استفاده شود و در اوایل دهه

- 1-Galactomannan
- 2-Radio Immuno Assay
- 3-Enzyme immunoassay

اختصاصیت	حساسیت	روش ها
٪۶۰	٪۹۴	تصاویر رادیولوژی قفسه سینه
٪۹۳	٪۲۸	تصاویر سی تی اسکن: Halo sign و air crescent sign
٪۹۲	٪۵۰	کشت نمونه BAL
٪۸۹	٪۹۰	تعیین آنتی ژن گالاکتومانان در نمونه سرم
٪۹۹	٪۹۴	تعیین آنتی ژن گالاکتومانان در نمونه BAL

جدول ۱ - مقایسه حساسیت و اختصاصیت روش های مختلف تشخیص IA (۱۲).

تعیین گالاکتومانان در نمونه سرم:

در طول دهه اخیر اکثر مطالعات از تعیین آنتی ژن GM در نمونه سرم، بعنوان یک روش معتبر و مهم برای تشخیص اولیه IA استفاده می کنند. به کار گیری این تست در نمونه های سرم مورد تایید FDA بوده و قادر به شناسایی ۱ ng/ml آنتی ژن می باشد و از آن می توان در پیگیری پاسخ به درمان های ضد قارچی نیز استفاده کرد (۲۶ و ۲۵). آنتی ژن GM در سرم بیماران در عرض ۸-۵ روز (محدوده ۲۷-اروز) قبل از نشانه ها و علائم بالینی مشهود IA قابل تشخیص می باشد (۲۵). حساسیت و اختصاصیت این تست در سرم بیماران دچار سرطان خون به ترتیب ۹۲/۶٪- ۵۰٪ و ۹۹/۶٪-۹۴٪ گزارش شده و همچنین ارزش اخباری مثبت و منفی آن در موارد آسپرژیلوزیس مهاجمی تایید شده بین ۹۳٪- ۸۵٪ و ۹۸/۷٪-۹۵٪ در مطالعات مختلف متغیر بوده است (۲۷ و ۲۸). Pfeiffer و همکاران در یک مطالعه متآنالیز بزرگ با بررسی ۲۷ مطالعه صورت گرفته در طی سال های ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۵ ارزش تشخیصی تست تعیین آنتی ژن GM در نمونه سرم در موارد تشخیص داده شده IA، نشان دادند که حساسیت و اختصاصیت

آنتی ژن GM آسپرژیلوس علاوه بر سرم در سایر مایعات بدن بیماران دچار IA مثل؛ ادرار، CSF، مایع پلور، BAL و نمونه های بافتی نیز وجود دارد. اگر چه این نمونه ها مورد تأیید FDA نبوده ولی در بسیاری مواقع مثلاً تعیین آنتی ژن در نمونه مایع لاواژ برونکو آلوئولار (BAL)^۱ بهتر از سرم گزارش شده است (۲۰) و مطالعات زیادی در سطح جهان برای تشخیص بیماری از این نمونه استفاده کرده اند (۲۲ و ۲۱ و ۱۹). در صورت درگیری سیستم عصبی مرکزی (CNS)^۲ نیز اغلب از مایع مغزی نخاعی (CSF)^۳ جهت تعیین آنتی ژن GM استفاده می شود (۲۳ و ۱۸). آنتی ژن در ادرار نیز یافت می شود اما نسبت به سرم دارای حساسیت کمتری می باشد (۲۴ و ۱۹ و ۱۷). در جدول ۱، حساسیت و اختصاصیت روش های مختلف تشخیص IA نشان داده شده است

- 1- Bronchoalveolar lavage
- 2-central nervous system
- 3 -cerebrospinal fluid

توسط کونیدی آسپريژيلوس آزاد می شود، تعيين آن در مایع BAL جهت تشخيص عفونت آسپريژيلوزيس نسبت به انجام کشت و روش های PCR که قادر به تشخيص مراحل هایفی و کونیدیایی از یکدیگر نبوده مناسب تر میباشد (۳۵ و ۳۴). کاتاف های مختلف از طیف ۰/۵ تا ۱ng/ml برای تعيين آنتی ژن GM به وسیله platelia ELISA در مایع BAL توصيف شده است (۳۶). Li Yang Hsu و همکاران در مقاله متآنالیز و مرور سیستماتیک، با بررسی دقت و درستی تست تعيين آنتی ژن GM در نمونه های BAL جهت تشخيص بیماری IA نشان دادند که بررسی این آنتی ژن در موارد Proven IA و probable دارای حساسیت ۹۰٪ (۹۶-۷۹)، اختصاصیت ۹۴٪ (۹۶-۹۰)، ارزش اخباری مثبت ۱۴/۷۸ (۲۴/۹-۸/۸۹) و ارزش اخباری منفی ۱۰٪ (۲۴-۴) می باشد (۳۷). بنابراین تعيين آنتی ژن GM در نمونه های BAL جهت تشخيص موارد بیماری Proven IA و IA probable دارای حساسیت و اختصاصیت مناسبی می باشد.

در مطالعه ای آنتی ژن گالاکتومانان در ۳۰ تا ۴۳٪ از نمونه های BAL بدست آمده از ۳۸ نفر مبتلا به IA ریوی مثبت گزارش گردید (۳۸). تعيين آنتی ژن در این نمونه ها و خصوصا در مواردی که با مشاهدات سی تی اسکن همراه می باشد منجر به تشخيص و درمان سریع بیماری می شود. چنانچه در یک مطالعه آینده نگر تعيين گالاکتومانان همراه با انجام سی تی اسکن با قدرت تفکیک بالا در بیماران با اختلالات هماتولوژیک مبتلا به IA مقادیر ارزش اخباری مثبت و منفی ۱۰۰٪ گزارش گردید (۳۶). جدول ۲ نتایج تست تعيين GM نمونه سرم و BAL بیماران IA نشان داده شده است.

این تست در بیماران IA قطعی به ترتیب ۷۱٪ و ۸۹٪ بوده و دارای ارزش اخباری مثبت ۶۲-۲۵٪ و ارزش اخباری منفی ۹۸-۹۲٪ می باشد و مشخص گردید که استفاده از تعيين آنتی ژن GM در بیماران مبتلا به فاکتورهای خطر IA مثل بدخیمی های خونی، دریافت کنندگان پیوند HSCT، پیوند اعضا سخت، مثل ریه و حتی بیماران غیرنوتروپنی بسیار مفید و با ارزش می باشد (۲۹). از عوامل اصلی مؤثر در اختصاصیت آزمایش، مقدار کاتاف برای تعريف نتایج مثبت و نیازمندی های لازم جهت اثبات نتایج مثبت به صورت مداوم جهت طبقه بندی نتایج مثبت حقیقی می باشد. نتایج مثبت کاذب تست در نمونه های سرم بزرگسالان از ۵/۷ تا ۱۴٪ بوده که این ممکن است به علت تشخيص نامطمئن موارد باشد (۳۲-۳۰) و در بیماران اطفال و نوزاد این نتایج بیشتر و ممکن است تا ۸۳٪ هم برسد (۳۳ و ۱۱). دلایل واکنش های کاذب در نمونه های سرم، تقریباً ناشناخته باقی مانده ولی مصرف داروهای پاپیراسیلین - تازاباکتام^۱ در بزرگسالان، واکنش متقاطع ایی توپهای گونه های بیفیدیوباکتریوم، درمان با سیکلوفسفامید، نوع رژیم غذایی در نوزادان، آلودگی های آزمایشگاهی و مشکلات تکنیکی از دلایل نتایج مثبت کاذب در این نمونه بیان شده اند (۳۲ و ۳۱).

تعيين گالاکتومانان در نمونه BAL:

ریه ها معمولا محل اولیه ورود کونیدی های آسپريژيلوس می باشند و اکثر موارد IA در ریه رخ می دهد. با توجه به اینکه آنتی ژن GM در جریان خون به وسیله نوتروفیل های گردشی از بین می رود و از طرفی هم خود قارچ برای زنده ماندن در بافت ریه می تواند کپسوله می شود، تحقیقات نشان داده که نمونه BAL می تواند نمونه مناسبی برای اندازه گیری GM در بیماران IA باشد (۷). از آنجاییکه GM غالبا^۲ در مرحله رشد هایف و کمتر

4- piperacillin- tazobactam

جدول ۲- نتایج تست تعیین GM در ۷۲ نمونه سرم و BAL کنترل شده به وسیله بررسی هیستوپاتولوژی (۳۹).

تعداد بیماران			نتایج الیزا*	
کل	بیماران با عدم ابتلا به IA** (n=۴۶)	بیماران مبتلا به IA (n=۲۶)		
۱۴	۳	۱۱	مثبت	سرم
			منفی	
			کل	
۷۲	۴۶	۲۶	مثبت	BAL
			منفی	
			کل	

نکات: *سطح کاتاف تست برای نتایج مثبت: ۰/۵ ng/ml

** بیماران با عدم مبتلا به IA = نبود تهاجم هایفی قارچ اسپرژیلوس به بافت.

تعیین گالاکتومانان در نمونه ادرار:

تعیین GM در نمونه های ادرار مثل سرم ۱ng/ml می باشد (۱۹).

Ansorg و همکاران در بررسی موارد IA تایید شده و دارای علائم کلینیکی، با استفاده از تغلیظ ادرار و تست آگلوتیناسیون لاتکس با طولانی کردن زمان واکنش تا ده دقیقه، حساسیت و اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت و منفی پیش بینی شده آنتی ژن GM در ادرار را به ترتیب ۵۷٪، ۵۳٪، ۳۱٪ و ۷۷٪ گزارش کردند (۱۷). محققان با مقایسه حساسیت روش الیزا جهت تعیین آنتی ژن GM در نمونه های سرم، ادرار و BAL در ۱۰۵ بیمار دچار اختلالات هماتولوژیک تحت درمان با آمفوتریسین B آنتی ژن GM فقط در نمونه ادرار ۲ تا ۵ بیمار مبتلا به IA آشکار گردید و تغلیظ ۱۰ برابری ادرار تنها در یک نمونه ادرار اضافی نتیجه مثبت را ایجاد کرد (۱۹). اختصاصیت تست در نمونه ادرار را با افزایش زمان واکنش، تغلیظ ادرار و آزمایش حداقل ۲ نمونه متوالی ادرار و استفاده از کاتاف های بالاتر می توان بهبود داد.

با توجه به اینکه جمع آوری و تهیه نمونه ادرار نیاز به روش های تهاجمی نداشته و حجم زیادی از آنرا می توان مورد آزمایش قرار داد، می تواند نمونه مناسب جهت تعیین آنتی ژن باشد. در بررسی نمونه های ادرار بیماران دچار IA رویی نشان داده شد که حداقل مقداری از آنتی ژن GM گردشی در خون از طریق کلیه ها دفع می شود (۱۷). با تغلیظ ادرار می توان نتایج مثبت را در نمونه ادرار بیماران با سطوح کم GM افزایش داد. هنوز اطلاعات کمی در مورد فارماکوکینتیک آنتی ژن GM و کلیرانس کلیوی آن در دست می باشد. با بررسی بلات های ادرار بیماران دچار نوتروپنی به وسیله آنتی بادیهای ضد GM (EB-A1)، گالاکتومانان با وزن های مولکولی بیشتر از ۴۵ کیلو دالتون و یک باند ضعیف حدود ۲۱ کیلو دالتون دیده شده است (۴۰). بعد از ۲۴ ساعت تزریق داخل وریدی آنتی ژن GM به خرگوش های دارای سیستم ایمنی کامل، ۳۵٪ به داخل ادرار ترشح گردید. آستانه های

نمی شود (۴۴). کشت نمونه CSF هم بندرت نتایج مثبت می دهد (۴۵). نتایج سی تی اسکن و یافته های بیوشیمیایی CSF هم اغلب اختصاصی نمی باشند (۴۶، ۴۷). آنتی ژن GM در نمونه های CSF به دست آمده از بیماران دچار آسپرژیلوزیس CNS با استفاده از روش های الیزا، RIA و وسترن بلات تعیین می گردد (۴۸). کاتاف مناسب در نمونه CSF نسبت به نمونه سرم کمتر می باشد. میانگین گالاکتومانان CSF در بیماران $10/52 \text{ ng/ml}$ و در موارد کنترل $0/287 \text{ ng/ml}$ می باشد (۱۸). خلاصه ای از مطالعات تعیین گالاکتومانان در نمونه CSF در جدول ۳ آمده است.

حساسیت و اختصاصیت تست الیزا در بررسی بیماران با آسپرژیلوزیس پیشرفته CNS که نتایج کشت منفی در نمونه های CSF داشتند و بر عکس نتایج PCR در همه نمونه ها مثبت بوده، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ گزارش شده است (۴۶). تعیین آنتی ژن GM با استفاده از این روش می تواند ۴۵ روز قبل از نتایج کشت مثبت قابل تعیین باشد و در تشخیص بیماری در مراحل اولیه کمک کننده باشد. این در حالیست که در بیماران با مننژیت ناشی از آسپرژیلوس، ۹ ماه قبل از کشت مثبت CSF نتایج آنتی ژن GM نیز مثبت می شود (۵۰). هرچند که در نمونه CSF بیماران IA رویی فاقد آسپرژیلوزیس سیستم اعصاب مرکزی نیز آنتی ژن های قارچی یافت شده است (۱۸).

تعیین آنتی ژن در نمونه ادرار بوسیله تست های تجاری در دسترس هنوز کاملاً مورد استفاده قرار نمی گیرد (۴۱). از نقاط ضعف اصلی تعیین آنتی ژن GM در نمونه ادرار، وجود نتایج مثبت کاذب از ۸ تا ۴۷٪ است که در روش الیزا ۸٪ و روش آگلوتیناسیون لاتکس ۴۲٪ می باشد (۱۷). از دلایل عمده آن وجود آلودگی های ادرار ناشی از قارچ های موجود در هوا و محیط است که با منوکلونال آنتی بادیهای EB-A2 واکنش متقاطع می دهند و در مواردی هم آنتی ژن GM ادراری ناشی از آلودگی های کلیوی بوده اند. همچنین استفاده از مواد سرکوب کننده سیستم ایمنی با واکنش های کاذب نمونه ادرار نیز مرتبط می باشد (۴۲). نتایج منفی کاذب ادرار نیز گاهی اوقات گزارش شده است که اکثراً با واکنش های منفی کاذب سرم مرتبط می باشند. وجود آنتی بادی های ضد آسپرژیلوس که با آنتی ژنهای گردشی باند می شود ممکن است در نهایت منجر به کاهش مقادیر GM عبوری از کلیه ها و کاهش حساسیت تستی شود (۴۳).

تعیین گالاکتومانان در نمونه CSF :

سیستم اعصاب مرکزی (CNS) پس از ریه دومین مکان از لحاظ آلودگی و ۲۰-۱۰٪ از همه موارد IA را شامل می شود (۱۸). پیش آگهی IA در CNS تقریباً در بیماران با وضعیت سیستم ایمنی سالم بسیار ضعیف بوده و تشخیص آن خیلی دشوار می باشد و حتی بیوپسی مغز هم همیشه منجر به تشخیص واضحی

جدول ۳- تعیین آنتی ژن GM در نمونه های CSF بیماران دچار اسپرژیلوزیس CNS

مطالعه (منبع)	دسته بندی بر اساس معیار EORTC-MSG	تعداد بیمار	وضعیت زمینه ای بیماران	روش تعیین آنتی ژن GM	تعداد نتایج مثبت تست تعیین آنتی ژن GM
Kami et al. (۴۶)	Proven	۵	سرطان خون	Pastorex and Platelia	۴
Machetti et al. (۴۷)	Probable	۱	پیوند مغز استخوان	Platelia	۱
Nenoff et al. (۴۹)	Proven	۱	دیابت ملیتوس	Pastorex	۱
Viscoli et al. (۱۸)	Probable	۵	پیوند مغز استخوان	Platelia	۵
Moling et al. (۵۰)	Probable	۱	Chronic alcohol abuse	Pastorex and Platelia	۱

آشکارسازی هایف اسپرژیلوس در برش های بافتی دارد و یک تشخیص کلی را فراهم می کند (۵۴). این روش نسبت به بررسی های هیستوپاتولوژیکال با رنگ آمیزی های اختصاصی برای اثبات وجود آلودگی مرسوم نمی باشد. همچنین از منوکلونال آنتی بادی Mab -Wf -AF1 برای بررسی برش های بافتی در پارافین به دست آمده از بیماران دچار IA استفاده می شود (۵۲). این آنتی بادی ها با دیواره سلولی، تیغه میانی و سیتوپلاسم گونه های اسپرژیلوس واکنش می دهند و برای گونه های فومیگاتوس، فلاووس، نایجر اختصاصی می باشند. در نمونه های بافت نکروزی استفاده از تکنیک های ایمونوهیستوشیمیایی بسیار مفید تر است. از آنجا که تغییر در نوکلئیک اسیدها بر عملکرد روش های مولکولی اثر می گذارد در حالیکه بر آنالیز های ایمونو هیستوشیمیایی کمتر محتمل است. زیرا حتی باقیمانده های اسپرژیلوس در سیتوپلاسم سلول های فاگوسیت را هم می توان بوسیله این روش آشکار کرد (۵۴، ۵۱). در یک گزارش موردی

تعیین گالاتومانان در نمونه های بافتی:

هرچند که اثبات اسپرژیلوس در بافت بعنوان یک استاندارد طلایی برای تشخیص IA است ولی فقط بعد از تعیین هویت قارچ های کشت داده شده از بافت است که تشخیص نهایی می شود. زیرا مورفولوژی میکروسکوپی تعداد زیادی از قارچ های با دیواره شفاف دیگر مثل سدوسپوریوم و فوزاریوم در بافت، اغلب غیرقابل تشخیص از گونه های اسپرژیلوس هستند و بیشتر از ۷۰٪ از بافتهای دارای هایف از لحاظ نتایج کشت منفی هستند (۵۱). در مواقع نتایج منفی کشت از تکنیک های دیگری مثل PCR و ایمونو هیستوشیمیایی بعنوان یک ابزار موفق برای تشخیص سریع در سطوح گونه استفاده می شوند (۵۲). بررسی بافتی ایمونوهیستوشیمیایی به وسیله ۲ منوکلونال آنتی بادی تجاری جدید برای گالاتومانان (Mab-WF-AF-1 و EB-A1) انجام می شود (۵۳). منوکلونال آنتی بادی EB-A1 عملکرد خوبی در

جهت تعیین GM در نمونه بیوپسی مغز با استفاده از تست آگلوتیناسیون لانکس، ابتدا بافت را در نرمال سالین قرارداداده و سپس سانتریفیوژ کرده و در نهایت از روش آگلوتیناسیون لانکس برای تعیین آنتی ژن GM استفاده شد. در این بررسی نتیجه تست مثبت شد، اما آلودگی قارچی با ارزیابی میکروسکوپی و کشت بافت تایید نشد. مشخص گردید که سوپ پنبه ای مورد استفاده در تهیه نمونه مغزی منجر به ایجاد واکنش کاذب شده است. احتمال می رود سلولز عامل واکنش کاذب باشد (۵۳).

تعیین گالاتومانان در سایر نمونه ها:

به وسیله روش الیزا سطح ۵۰ ng/ml آنتی ژنی GM در مایع کیست ۲ بیمار دچار کلیه پلی کیستیک گزارش گردیده است. اگر چه کشت نمونه این مایعات مثبت نشد ولی در کشت از اپی تلیوم، کلیه گونه های پنی سلیم و پسلیومایسس رشد کردند که احتمال داده شد که این قارچ ها در روش الیزا ایجاد واکنش متقاطع نموده باشند (۵۵). همچنین در یک پسر بچه ۴ ساله با بیماری زمینه ای گرانولومای مزمن مبتلا به آسپرژیلوزیس تهاجمی، آنتی ژنی GM در آبه subphrenic وی تعیین شد (۱۹). در یک گزارش دیگر هم سطوح بالای از آنتی ژن GM (۴۰ ng/ml) در دو آسپیراسیون آبه subphrenic تعیین گردید و کشت هر دو نمونه از لحاظ آسپرژیلوس فومیگاتوس مثبت شد و همچنین DNA آسپرژیلوس در سرم بیمار تشخیص داده شد، ولی از لحاظ آنتی ژن GM گردشی منفی شد؛ که احتمالاً به دلیل کپسوله شدن قارچ و ممانعت از تراوش آنتی ژن ها به سرم باشد. همچنین GM در نمونه های چرک به دست آمده از بیمار دچار رینوسینوزیت قارچی نیز گزارش شده است (۳۹).

نتیجه گیری:

بررسی مطالعات مختلف نشان می دهد که تعیین آنتی ژن GM در مقایسه با روش های تشخیصی دیگر از حساسیت و اختصاصیت بالاتری برخوردار می باشد و حتی در بسیاری از موارد سریعتر از بروز علائم و نشانه های بالینی و رادیولوژی و حتی کشت مثبت می شود و در تشخیص اولیه بیماری بسیار کمک کننده می باشد. اندازه گیری آنتی ژن GM در نمونه های سرم، ادرار، مایع BAL و CSF یک ابزار مطمئنی برای تشخیص اولیه و پیگیری مراحل درمانی IA می باشد. با تعیین آنتی ژن به صورت سریالی بخصوص در نمونه های سرم و BAL می توان از وضعیت عفونت در طی درمان آگاهی پیدا کرد. از این رو توصیه می شود برای بدست آوردن نتایج دقیق در استفاده از شاخص های سرولوژیکی مثل GM و تفسیر نتایج مثبت یا منفی این تست ها دقت لازم صورت گیرد و همچنین پزشکان نیز باید از محدودیت های این آزمایشات مطلع بوده تا از آن به درستی در درمان و مدیریت وضعیت بیماران استفاده کنند.

همچنین مطالعات آینده نگر با طراحی مناسب با نمونه برداری سیستماتیک و استفاده از تعریف های توافق شده جهت مقایسه تعیین آنتی ژن GM در این نمونه های بالینی با هم و ارزش تشخیصی آنها مورد نیاز هست تا بتوانیم عملکرد تعیین آنتی ژن GM را در نمونه های مختلف با هم مقایسه کنیم. بعلاوه داشتن اطلاعات مناسب بیشتر از کینیتیک GM در نحوه رهاسازی و پاک سازی آن طی دوره عفونت در گروه های مختلف بسیار کمک کننده می باشد.

References:

1. Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:161–72.
2. Hedayati MT, Mayahi S, Movahedi M, Shokohi T. A study on fungal flora of tap water as a potential reservoir of fungi in hospitals from Sari city, *Journal de Mycologie Médicale* 2011;21:10-14
3. Hedayati MT, Mohseni-Bandpi A, Moradi S. A survey on the pathogenic fungi in soil samples of potted plants from Sari hospitals, Iran. *J Hosp Infect* 2004;58:59-62.
4. Hedayati MT, Mohammadpour RA. A survey on the mycological contamination of the air and the equipment of operating rooms of 17 hospitals. *J Med Faculty Guilan Univ Med Sci* 1999;8:56-61.
5. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34:909–17.
6. Husain S, Paterson DL, Studer SM, Crespo M, Pilewski J, Durkin M, and et al: Aspergillus galactomannan antigen in the bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Transplantation*. 2007;83:1330–1336.
7. Hedayati MT, Khodavaissy S, Aliali M. A review on invasive aspergillosis in patients admitted to intensive care unit with emphasis on diagnostic methods. *J Mazand Univ Med Sci* 2009;20:99-112 (Persian).
8. Khodavaissy S, Alialy M, Mahdavi Omran S, Habibi MR. The evaluation of fungal flora of respiratory tract in patients admitted to Intensive Care Units of Sari and Babol hospitals, 2009-2010. *Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences* 2011;54:177-184 (Persian).
9. Koenraad H, Vandewoud E. Aspergillosis in the ICU – The new 21st century problem? *Medical Mycology* 2006;44:71-76.
10. Roosen J, Frans E, Wilmer A, Knockaert D, Bobbaers H. Comparison of premortem clinical diagnoses in critically ill patients and subsequent autopsy findings. *Mayo Clin Proc* 2000;75:562–7.
- 11- Sulahian A, Boutoboul F, Ribaud P, Leblank T. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer* 2001;91:311-318.
- 12- Maertens J, Vaneldere J, Verhaegen J, Verbeken E. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 2002; 186:1297-1306.
- 13- Wheat LJ. Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. *Transpl Infect Dis* 2003; 5:158-166.
- 14- Pinel C, Fricker Hidalgo H, Lebeau B, Garban, F, Hamidfar R, Ambroise T P, and et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:2184–6.
- 15- Stynen D, Sarfati J, Goris A, Prevost M C, Lesourd M, Kamphuis H, and et al. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*. *Infect Immun* 1992;60:2237–45.
- 16- Hopwood V, Johnson EM, Cornish JM, Foot AB, Evans EG, Warnock DW. Use of the Pastorex *Aspergillus* antigen latex agglutination test for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Pathol* 1995;48:210–3.
- 17- Ansorg R, Heintschel von Heinegg E, Rath PM. *Aspergillus* antigenuria compared to antigenemia in bone marrow transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:582–9.
- 18- Viscoli C, Machetti M, Gazzola P, Gazzola P, De Maria A, Paola D, et al. *Aspergillus galactomannan* antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002;40:1496–9.

- 19- Salonen J, Lehtonen OP, Terasjarvi MR, Nikoskelainen J. Aspergillus antigen in serum, urine and bronchoalveolar lavage specimens of neutropenic patients in relation to clinical outcome. *Scand J Infect Dis* 2000;32:485-90.
- 20- Ruhnke M, Scheer C, Otto K, Maschmeyer G, Schwartz S. Value of galactomannan detection (Platelia Aspergillus) from bronchoalveolar lavage samples for diagnosis of aspergillosis [abstract M-1029]. In: Program and abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Chicago). Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003. P.462.
- 21- Siemann M, Koch-dorfeler M. The Platelia Aspergillus ELISA in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* 2001;44:266-272.
- 22- Roger TR, Haynes KA, Barnes RA. Value of antigen detection in predicting invasive pulmonary aspergillosis. *Lancet* 1990;336:1210-3.
- 23- Weiner MR, Fetchick J, Peacock J, Foshee S, Corman L, Cohen M, Koym P. Fungal meningitis immunodiagnosis by detection of candidal and Aspergillus antigens in cerebrospinal fluid. Abstr 1096, 24 th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Boston, Massachusetts, 1-5 October 1979.
- 24- Haynes KA, Latge JP, Rogers TR. Detection of Aspergillus antigens associated with invasive infection. *J Clin Microbiol* 1990;28:2040-4.
- 25- Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Scholten RJ, Hooft L, Reitsma J B, Bijlmer AH, and et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients (Review). *John Wiley & Sons, Ltd* 2008;10:1-90.
- 26- Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005;5:609-622.
- 27- Mclughlin L, Balajee A, Leisinger W. Bio-Rad Platelia Aspergillus EIA detection of Aspergillus galactomannan antigen in human serum: performance evaluation in a large bone marrow transplant center. *Imedex USA Inc. Focus on Fungal Infections* 2002;12:20-22.
- 28- Herbrecht R, Letscher B V, Oprea C, Waller J, Campos F, Villard O, and et al. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol* 2002;20:1898-906.
- 29- Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006;42:1417-27.
- 30- Sulahian A, Touratier S, Ribaud P. False positive test for Aspergillus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. *N Engl J Med* 2003;349:2366-7.
- 31- Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, Van Lint MT and et al. False-positive galactomannan Platelia Aspergillus test results for patients receiving piperacillintazobactam. *Clin Infect Dis* 2004;38:913-6.
- 32- Mennink-Kersten MA, Klont RR, Warris A, Op den Camp HJ, Verweij PE. Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in aspergillus antigen detection. *Lancet* 2004;363:325-7.
- 33- Siemann M, Koch-Dorfler M, Gaude M. False-positive results in premature infants with the Platelia Aspergillus sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycoses* 1998;41:373-7.
- 34- Verweij PE, Latge JP, Rijs AJ, Melchers W J, De Pauw B E, Hoogkamp KJ A and et al. Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1995;33:3150-3.
- 35- Raad I, Hanna H, Huaranga A, Sumoza D, Hachem R, Albitar M. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis using polymerase chain reaction-based detection of aspergillus in BAL. *Chest* 2002; 121:1171-6.

- 36- Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, van der Schee C, Hoogsteden HC, de Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography– based broncho-alveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol* 2003; 121:448–57.
- 37- Li Yang Hsu, Ying Ding, Jason Phua, Liang-Piu Koh, Douglas S Chan, Kay-Leong Khoo. Galactomannan testing of bronchoalveolar lavage fluid is useful for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematology patients. *BMC Infectious Diseases* 2010;10: 44-51.
- 38- Seyfartg HJ, Nenoff P, Winkler J, Krahl R, Haustein UF, Schauer J. Aspergillus detection in bronchoscopically acquired material: significance and interpretation. *Mycoses* 2001;44:356–60.
- 39- Kaufmann-Lacriox C, Rodier MH, Jacquemin JL, Goujon JM, Klossek JM. Detection of galactomannan for diagnosis of fungal rhinosinusitis. *J Clin Microbiol* 2001;39:4593–4.
- 40- Haynes KA, Latge JP, Rogers TR. Detection of Aspergillus antigens associated with invasive infection. *J Clin Microbiol* 1990;28:2040–4.
- 41- Hurst SF, Reyes GH, McLaughlin DW, Reiss E, Morrison CJ. Comparison of commercial latex agglutination and sandwich enzyme immunoassays with a competitive binding inhibition enzyme immunoassay for detection of antigenemia and antigenuria in a rabbit model of invasive aspergillosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:477–85.
- 42- Hashiguchi K, Niki Y, Soejima R. Cyclophosphamide induces falsepositive results in detection of aspergillus antigen in urine. *Chest* 1994;105:975–6.
- 43- Bennett JE, Friedman MM, Dupont B. Receptor-mediated clearance of Aspergillus galactomannan. *J Infect Dis* 1987;155:1005–10.
- 44- Gripshover BM, Ellner JJ. Chronic meningitis, principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000, p:997–1009.
- 45- Coates M, Wilson J. Central nervous system aspergillus infection complicating renal transplantation. *Australas Radiol* 2001;45:338–42.
- 46- Kami M, Ogawa S, Kanda Y, Tanaka Y, Machida U, Matsumura T et al. Early diagnosis of central nervous system aspergillosis using polymerase chain reaction, latex agglutination test, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Haematol* 1999;106:536–7.
- 47- Machetti M, Zotti M, Veroni L, Mordini N, Van Lint M, et al. Antigen detection in the diagnosis and management of a patient with probable cerebral aspergillosis treated with voriconazole. *Transpl Infect Dis* 2000;2:140–4.
- 48- Ray P, Chakrabarti A, Jatana M, Sharma BS, Pathak A. Western blot analysis of cerebrospinal fluid for detection of Aspergillus antigens. *Mycopathologia* 1995;131:103–6.
- 49- Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid A tool for diagnosing aspergillosis in ICU patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:27–34.
- 50- Moling O, Lass-Floerl C, Verweij PE, Porte M, Boiron P, Prugger M, and et al. Case reports: chronic and acute aspergillus meningitis. *Mycoses* 2002;45:504–11.
- 51- Tarrand JJ, Lichterfeld M, Warraich I, Luna M, Han XY, May GS, et al. Diagnosis of invasive septate mold infections: a correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination. *Am J Clin Pathol* 2003;119:854–8.
- 52- Choi JK, Mauger J, McGowan KL. Immunohistochemical detection of Aspergillus species in pediatric tissue samples. *Am J Clin Pathol* 2004;121:18–25.
- 53- Dalle F, Lopez J, Caillot D, Cuisenier B, Ecarnot LA, Bonnin A, and et al. False-positive results caused by cotton swabs in commercial Aspergillus antigen latex agglutination test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:130–2.

- 54- Pierard GE, Arrese EJ, Pierard-Franchimont C, Thiry A, Stynen D. Immunohistochemical expression of galactomannan in the cytoplasm of phagocytic cells during invasive aspergillosis. *Am J Clin Pathol* 1991;96:373-6
- 55- Miller-Hjelle MA, Hjelle JT, Jones M, Mayberry WR, Dombrink-Kurtzman M A, Petersonet SW, and et al. Polycystic kidney disease: an unrecognized emerging infectious disease? *Emerg Infect Dis* 1997;3:113-27.

Archive of SID