

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

محمد تقی هدایتی<sup>۱</sup>، صادق خداویسی<sup>۲</sup>، بهروزداوری<sup>۳</sup>، قاسم زمینی<sup>۳</sup>

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

۲- کارشناس ارشد قارچ شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گردستان. سندج، ایران (مؤلف مسئول) تلفن: ۰۸۷۱-۶۶۴۱۲۹۱؛ sadegh\_7392008@yahoo.com

۳- استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گردستان. سندج، 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 در اغلب موارد تشخیص بیماری بر اساس یافته های بالینی، 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 شود. 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 زن گالاکتومانان در نمونه های مختلف بالینی مثل سرم، مایع برونکوآلتوئولار، ادرار، مایع معزی نخاعی و بافت استفاده می شود. مطالعات نشان داده که تست آنتی زن 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 زن گالاکتومانان، تشخیص

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

### مقدمه:

محیط های مختلف مثل وسایل و تجهیزات بیمارستانی و خاک گلدان های موجود در بیمارستان های کشور ما را نشان داده اند<sup>(۱-۴)</sup>. این بیماری با میزان مرگ و میر بسیار بالا در بیماران با ضعف در سیستم ایمنی مثل؛ بیماران دچار نوتروپنی شدید، گرانولوماتوز مزمن، بدحیمی 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

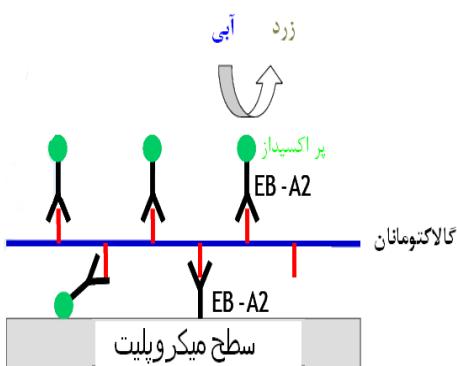
آسپرژیلوزیس تهاجمی (IA)<sup>(۱)</sup> بیماری شدید و کشنده ناشی از گونه های مختلف قارچ فرست طلب آسپرژیلوس می باشد<sup>(۱)</sup>. این عوامل بطور وسیع در محیط اطراف ما پراکنده می باشند. مطالعات صورت گرفته در این زمینه توزیع وسیعی از این قارچ بهخصوص گونه های آسپرژیلوس فومیگاتوس و فلاووس در

1-Invasive Aspergillosis

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 کشنده‌گی بسیار بالای بیماری، استفاده از روش های غیر کشتی بر پایه تعیین آنتی زن 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 زن 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 زنی بصورت هفتاهی ۲ بار مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که تشخیص به وسیله تعیین آنتی زن گالاکتوماتان 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 زن بصورت ۲ بار در هفته می تواند تشخیص اولیه IA را تسهیل کند (۱۳ و ۱۴). 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 (۶ و ۵). 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)<sup>۱</sup> می شوند نیز رخ می دهد (۸). بیماران در بخش های 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 ۵۰-۶۰٪ است که اکثراً بعلت عدم اثبات تشخیص بیماری در مراحل اولیه آلودگی و عدم شروع زود هنگام درمان های ضد قارچی برای بهبد وضعیت بیماران می باشد(۹). علایم 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 آتلاتکاتازی و همچنین تنفس مصنوعی در اکثر بیماران محدود بوده و علایم اختصاصی در سی تی اسکن مثل؛ halo sign و air creasent sign 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 سیتوپاتولوژیک، 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

۱۹۹۰ بصورت استاندارد و فراوان در دسترس قرار گرفت. امروزه کیت The platelia Aspergillos antigen Bio-Rad ساخت شرکت immunoassay FDA) قرار گرفته قابل دسترس در بازار سازمان کل غذا و دارو (FDA) می باشد. در این تست از منوکلونال آنتی بادئی 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 ابی توپ GM که شامل (۱-۵) پتا گالاکتوفرانوز می باشد و با چندین گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاوس، 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 گالاکتمانان 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 گالاکتمانان در نمونه های مختلف بالینی جهت تشخیص IA صورت گرفته است.

#### اساس تست:

آنتری ژن گالاکتمانان (GM)<sup>۱</sup> 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 الیزی قابل دسترس در بازار (Platelia Aspergillus; Bio Rad)<sup>۲</sup> به وسیله منوکلونال آنتی بادیهای رت (EB-A2)<sup>۳</sup> قابل آشکار سازی می باشد(۱۵). این آنتی ژن را به وسیله روش های دیگر مثل EIA<sup>۴</sup>، RIA<sup>۵</sup> و آگلوتیناسیون لاتکس نیز می توان تعیین کرد (۱۶ و ۱۳). ولی این روش ها نسبت به روش الیزا دارای محدودیت های (تشخیص ۱۵ng/ml آنتی ژن در مقابل ۱۰۰ng/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<sup>۶</sup>، ادرار، CSF<sup>۷</sup> و نمونه های بافتی نیز تعیین کرد. در مطالعات زیادی از نمونه های فوق، جهت تشخیص IA استفاده شده است (۱۹).

اولین بار در اوخر دهه ۱۹۷۰ پیشنهاد شد که از منوکلونال 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 های تشخیصی
%۰	%۴	تصاویر رادیولوژی قفسه سینه
%۹۳	%۲۸	تصاویر سی تی اسکن: air crescent sign و Halo sign
%۲	%۰	کشت نمونه BAL
%۸۹	%۹۰	تعیین آنتی ژن گالاکتومانان در نمونه سرم
%۹	%۴	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 ده اخیر اکثر مطالعات از تعیین آنتی ژن GM در نمونه سرم، بعنوان یک روش معترض و مهم برای تشخیص اولیه IA استفاده می کنند. به کار گیری این تست در نمونه های سرم مورد تائید FDA بوده و قادر به شناسایی ۱۱ آنتی ژن می باشد و از آن می توان در پیگیری پاسخ به درمان های ضد قارچی نیز استفاده کرد(۲۵ و ۲۶). آنتی ژن GM در سرم بیماران در عرض ۵ روز (محدوده ۲۷-۱۱ روز) قبل از نشانه ها و علایم بالینی مشهود IA قابل تشخیص می باشد(۲۵). حساسیت و اختصاصیت این تست در سرم بیماران دچار سرطان خون به ترتیب ۰.۶۲/۶٪-۰.۵۰٪ و ۰.۶۹/۶٪-۰.۹۴٪ گزارش شده و همچنین ارزش اخباری مشتبه و منفی آن در موارد IA تایید شده بین ۰.۸۵٪-۰.۸۷٪ و ۰.۹۵٪-۰.۸۸٪ Pfeiffer در مطالعات مختلف متغیر بوده است(۲۷ و ۲۸). همکاران در یک مطالعه متآنانالیز 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 این تست در بیماران IA

آنی ژن GM آسپرژیلوس علاوه بر سرم در سایر مایعات بدن بیماران دچار IA مثل؛ ادرار، CSF، مایع پلور، مایع لاواز برونکوآلتوئلار و نمونه های بافتی نیز وجود دارد. اگر چه این نمونه ها مورد تأیید FDA نبوده ولی در بسیاری مواقع مثلا تعیین آنتی ژن در نمونه مایع لاواز برونکو آلتوئلار (BAL)<sup>۱</sup> بهتر از سرم گزارش شده است(۲۰) و مطالعات زیادی در سطح جهان برای تشخیص بیماری از این نمونه استفاده کرده اند(۲۱ و ۲۲ و ۲۳ و ۲۴ و ۱۹). در صورت درگیری سیستم عصبی مرکزی (CNS)<sup>۲</sup> نیز اغلب از مایع مغزی نخاعی (CSF)<sup>۳</sup> جهت تعیین آنتی ژن GM استفاده می شود(۱۸ و ۲۳). آنتی ژن در ادرار نیز یافت می شود اما نسبت به سرم دارای حساسیت کمتری می باشد(۲۴ و ۱۷ و ۲۶). 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 آسپرژیلوس آزاد می شود، تعیین آن در مایع BAL جهت تشخیص عفونت آسپرژیلوزیس نسبت به انجام کشت و روش های PCR که قادر به تشخیص مراحل هایفی و کونیدیایی از یکدیگر نبوده مناسب تر میباشد (۳۵و۳۶). کاتاف GM های مختلف از طیف ۰/۰ تا ۱ng/ml برای تعیین آنتی زن GM به وسیله platelia ELISA در مایع BAL توصیف شده است (۳۶). Li Yang Hsu و همکاران در مقاله متا آنالیز و مرور GM سیستماتیک، با بررسی دقت و درستی تست تعیین آنتی زن GM در نمونه های BAL جهت تشخیص بیماری IA نشان دادند که بررسی این آنتی زن در موارد probable و Proven IA و probable دارای حساسیت ۹۰% (۷۹-۹۶)، اختصاصیت ۹۶% (۹۰-۹۶)، ارزش اخباری مثبت ۹۰% (۸۹-۲۴/۹) و ارزش اخباری منفی ۹۰% (۹۶-۲۴) می باشد (۳۷). بنابراین تعیین آنتی زن GM در نمونه های BAL جهت تشخیص موارد بیماری IA و Proven IA probable دارای حساسیت و اختصاصیت مناسبی می باشد. در مطالعه ای آنتی زن گالاکتومانان در ۳۰ تا ۴۳٪ از نمونه های BAL بدست آمده از ۳۸ نفر مبتلا به IA ریوی مثبت گزارش گردید (۳۸). تعیین آنتی زن در این نمونه ها و خصوصا در مواردی که با مشاهدات سی تی اسکن همراه می باشد منجر به تشخیص و درمان سریع بیماری می شود. چنانچه در یک مطالعه آینده نگر تعیین GM 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 تعیین GM نمونه سرم و BAL بیماران IA نشان داده شده است.

قطعی بهترتب ۷۱٪ و ۸۹٪ بوده و دارای ارزشی اخباری مثبت ۶۲-۶۲٪ و ارزشی اخباری منفی ۹۲-۹۸٪ می باشد و مشخص گردید که استفاده از تعیین آنتی زن GM در بیماران مبتلا به فاکتورهای خطر IA مثل بدخیمی های خونی، دریافت کنندگان 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 تعریف 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 تشخیص نامطمئن موارد باشد (۳۰-۳۲) و در بیماران اطفال و نوزاد این نتایج بیشتر و ممکن است تا ۸۳٪ هم برسد (۳۳و۱۱). دلایل واکنش های کاذب در نمونه های سرم، تقریباً "ناشناخته باقی مانده ولی مصرف داروهای پاپراسیلین - تازاباکتام<sup>۱</sup> در بزرگسالان، واکنش متقاطع اپی 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 (۳۲و۳۱).

#### تعیین گالاکتومانان در نمونه BAL:

ریه ها معمولا محل اولیه ورود کونیدی های آسپرژیلوس می باشند و اکثر موارد IA در ریه رخ می دهد. با توجه به اینکه آنتی زن 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 غالباً 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)	مثبت	منفی
۱۴	۳	۱۱	مثبت	سرم
۵۸	۴۳	۱۵	منفی	
۷۲	۴۶	۲۶	کل	
۲۹	۶	۲۳	مثبت	BAL
۴۳	۴۰	۳	منفی	
۷۲	۴۶	۲۶	کل	

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

\*\* بیماران با عدم مبتلا به IA = نبود تهاجم هایی قارچ آسپرژیلوس به بافت.

ترزیق داخل وریدی آنتی ژن GM به خرگوش های دارای سیستم ایمنی کامل، ۳۵٪ به داخل ادرار ترشح گردید. آستانه تعیین GM در نمونه های ادرار مثل سرم ۱ng/ml می باشد (۱۹).

Ansorg و همکاران در بررسی موارد IA تایید شده و دارای عالیم کلینیکی، با استفاده از تغليظ 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٪ و ۷۶٪ گزارش کردن (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 آمفوتیریسین B آنتی ژن GM فقط در نمونه ادرار ۲ تا ۵ بیمار مبتلا به IA آشکار گردید و تغليظ ۱۰ برابری ادرار تنها در یک نمونه ادرار اضافی نتیجه مثبت را ایجاد کرد (۱۹). اختصاصیت تست در نمونه ادرار

### تعیین گالاکتومنان در نمونه ادرار:

با توجه به اینکه جمع آوری و تهیه نمونه ادرار نیاز به روش های تهاجمی نداشته و حجم زیادی از آن را می توان مورد آزمایش قرار داد، می تواند نمونه مناسب جهت تعیین آنتی ژن باشد. در بررسی نمونه های ادرار بیماران دچار IA ریوی نشان داده شد که حداقل مقداری از آنتی ژن GM گردشی در خون از طریق کلیه ها دفع می شود (۱۷). با تغليظ ادرار می توان نتایج مثبت را در نمونه ادرار

بیماران با سطوح کم GM افزایش داد. هنوز اطلاعات کمی در مورد فارماکوکیتیک آنتی ژن GM و کلیرانس کلیوی آن در دست می باشد. با بررسی بلات های ادرار بیماران دچار نوتروپنی به وسیله آنتی بادیهای ضد (EB-A1)GM، گالاکتومنان 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

حتی بیوپسی مغز هم همیشه منجر به تشخیص واضحی نمی شود(۴۴). کشت نمونه CSF هم بندرت نتایج مثبت می دهد (۴۵). نتایج سی تی اسکن و یافه های بیوشیمیایی هم GM در نمونه غالب اختصاصی نمی باشد(۴۶،۴۷). آنتی ژن در نمونه CNS به دست آمده از بیماران دچار آسپرژیلوزیس 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 ۱۰/۵۲ ng/ml و در موارد کنترل ۰/۲۸۷ ng/ml می باشد (۱۸). خلاصه ای از مطالعات تعیین گالاکتومانان در نمونه GM 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 ، ۱۰۰٪ و ۱۰٪ 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 منتظریت ناشی از آسپرژیلوس، ۹ ماه قبل از کشت مثبت CSF نتایج آنتی ژن نیز مثبت می شود(۵۰). هرچند که در نمونه GM بیماران IA ریوی فاقد آسپرژیلوزیس سیستم اعصاب مرکزی نیز آنتی ژن های قارچی یافت شده است(۱۸).

را با افزایش زمان واکنش، تغليظ ادرار و آزمایش حداقل ۲ نمونه متوالی ادرار و استفاده از کاتاف های بالاتر می توان بهبود داد. 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 عدمه آن وجود آلدگی های ادرار ناشی از قارچ های موجود در هوای محیط است که با منوکلونال آنتی بادیهای EB-A2 واکنش متقطع می دهند و در مواردی هم آنتی ژن GM ادراری ناشی از آلدگی 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 پس از ریه دومین مکان از لحاظ آلدگی و ۲۰-۵۰٪ از همه موارد IA را شامل می شود(۱۸). پیش آگهی CNS در بیماران با وضعیت سیستم ایمنی سالم بسیار ضعیف بوده و تشخیص آن خیلی دشوار می باشد و

جدول ۳- تعیین آنتی ژن GM در نمونه های CSF بیماران دچار آسپرژیلوزیس 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 آسپرژیلوس 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 آلدگی مرسموم نمی باشد. همچنین از منوکلونال آنتی بادی Mab -Wf -AF1 برای بررسی برش های بافتی در پارا فین به دست آمده از بیماران دچار IA استفاده می شود (۵۲). این آنتی بادی ها با دیواره سلولی، تیغه میانی و سیتوپلاسم گونه های آسپرژیلوس واکنش می دهند و برای گونه های فومیگاتوس، فلاووس، نایجر اختصاصی می باشند . در نمونه های بافت نکروزی استفاده از تکنیک های ایمونوهیستوشیمیابی بسیار مفید تر است. از آنجا که تغییر در نوکلئیک اسید ها بر عملکرد روش های مولکولی اثر می گذارد در حالیکه بر آنالیز های ایمونوهیستوشیمیابی کمتر متحمل است. زیرا حتی باقیمانده های آسپرژیلوس در سیتوپلاسم سلول های فاگوسیت را هم می توان

#### تعیین گالاکتومنان در نمونه های بافتی:

هرچند که اثبات آسپرژیلوس 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 مورفوولوژی میکروسکوپی تعداد زیادی از قارچ های با دیواره شفاف دیگر مثل سدوسپوریوم و فوزاریوم در بافت، اغلب غیرقابل تشخیص از گونه های آسپرژیلوس هستند و بیشتر از ۶۰٪ از بافت های دارای هایف از لحاظ نتایج کشت منفی هستند (۵۱). در موضع نتایج منفی کشت از تکنیک های دیگری مثل PCR و ایمونوهیستوشیمیابی بعنوان یک ابزار موفق برای تشخیص سریع در سطوح گونه استفاده می شوند (۵۲). بررسی بافتی ایمونوهیستوشیمیابی به وسیله ۲ منوکلونال آنتی بادی تجاری جدید برای گالاکتومنان (۱- Mab-WF-AF و EB-A1) انجام می شود (۵۳). منوکلونال آنتی بادی EB-A1 عملکرد خوبی در

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 زن 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 علایم 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 زن GM در نمونه های سرم، ادرار، مایع BAL و CSF یک ابزار مطمئن برای تشخیص اولیه و پیگیری مراحل درمانی IA می باشد. با تعیین آنتی زن 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 دقیق 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 زن GM در این نمونه های بالینی با هم و ارزش تشخیصی آنها مورد نیاز هست تا بتوانیم عملکرد تعیین آنتی زن 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.

بوسیله این روش آشکار کرد(۵۱،۵۴). در یک گزارش موردن جهت تعیین GM در نمونه بیوپسی مغز با استفاده از تست آگلوتیناسیون لاتکس، ابتدا بافت را در نرمال سالین قرارداده و سپس سانتریفیوژ کرده و در نهایت از روش آگلوتیناسیون لاتکس برای تعیین آنتی زن GM استفاده شد. در این بررسی نتیجه تست مثبت شد، اما آلدگی قارچی با ارزیابی میکروسکوپی و کشت بافت تایید نشد. مشخص گردید که سواب پنه ای مورد استفاده در تهیه نمونه مغزی منجر به ایجاد واکنش کاذب شده است. احتمال می رود سلوزل عامل واکنش کاذب باشد (۵۳).

### تعیین گالاکتومانان در سایر نمونه ها:

به وسیله روش الیزا سطح ۵۰ ng/ml آنتی زن 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 سلیوم و پسلیومایسنس 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 زن GM در آبسه subphrenic وی تعیین شد(۱۹). در یک گزارش دیگر هم سطوح بالایی از آنتی زن subphrenic (۴۰ ng/ml) در دو آسپریاسیون آبسه GM 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 زن GM گردشی منفی شد؛ که احتمالاً "به دلیل کپسوله شدن قارچ و ممانعت از تراویش آنتی زن ها به سرم باشد. همچنین GM در نمونه های

**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, Khodavaisy 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. Khodavaisy S, Aliali 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, Leblanc 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- Styfen 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- Leeftlang 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, Leisinring 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, Huaringa 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, Krah 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.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.