

بررسی معیارهای تشخیص آسپرژیلوزیس برونکوپولمونری آلرژیک در بیماران مبتلا به آسم عودکننده

کامران ورشوکار* (Ph.D)

دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه قارچ شناسی

خلاصه

سابقه و هدف: آسپرژیلوزیس برونکوپولمونری آلرژیک (Allergic Bronchopulmonary, ABPA) یک بیماری ایمنی است که در اثر واکنش‌های آلرژیک نسبت به آنتی‌ژنهای قارچ ساپروفیت آسپرژیلوس (اغلب آسپرژیلوس فومیگاتوس) و همچنین واکنش التهابی تخریبی ناشی از عفونت این قارچ در نواحی تحتانی دستگاه تنفس افراد مستعد ایجاد می‌گردد. در این تحقیق طی مدت ۳ سال، ۱۴۷ بیمار مبتلا به آسم عودکننده مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی و مرکز قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت را از لحاظ امکان ابتلا به ABPA مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها: ابتدا بیماران توسط پزشک متخصص مورد معاینه قرار گرفته و رادیوگرافی ریه آنها بررسی شد. سپس حدود ۱۰ میلی لیتر از خون بیماران را برای تهیه فروتی نازک جهت رنگ آمیزی گیمسا، جهت شمارش گلبول‌های سفید و تهیه سرم گرفته می‌شد. سرم تهیه شده در دمای زیر ۷۰ درجه سانتیگراد جهت آزمایش‌های تکمیلی سرولوژی؛ یعنی، سنجش میزان IgE توتال و سنجش آنتی‌بادی رسوبی به روش کانترایمنوالکتروفورز مورد استفاده قرار داده شد. سپس تست جلدی به روش Prick test با استفاده از آنتی‌ژن تجارتي MRC انگلستان انجام شد. نمونه خلط بیماران نیز جهت آزمایش مستقیم و کشت، در شرایط استریل جمع آوری شد.

یافته‌ها: تشخیص ABPA در مورد ۶ نفر از بیماران قطعی گردید و ۳ بیمار دیگر نیز به عنوان آسم ناشی از آسپرژیلوس شناسایی گردیدند. با توجه به درصد قابل توجه (۴٪) مبتلایان به ABPA که با شرایط اقلیمی ایران نیز هماهنگی دارد، توصیه می‌گردد که تمامی مبتلایان به آسم مخصوصاً آنهایی که امکان تماس بیشتری با اسپور قارچ دارند از لحاظ امکان ابتلا به ABPA مورد بررسی قرار گیرند.

نتیجه‌گیری: با توجه به درصد قابل توجه (۴٪) مبتلایان به ABPA که با شرایط اقلیمی ایران نیز هماهنگی دارد، توصیه می‌گردد که تمامی مبتلایان به آسم مخصوصاً آنهایی که امکان تماس بیشتری با اسپور قارچ دارند از لحاظ امکان ابتلا به ABPA مورد بررسی قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: ABPA، آسپرژیلوزیس آلرژیک، آسم، آسپرژیلوس فومیگاتوس.

است که در اثر کلنیزاسیون قارچ ساپروفیت آسپرژیلوس (Aspergillus) در حفرات بدن به خصوص ریه، آلرژی

مقدمه

آسپرژیلوزیس گروه بزرگی از بیماری‌های قارچی

مرکز قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت در این زمینه بهره‌مند گردند.

به طور کلی آسپرژیلوزیس ریوی را می‌توان به گروه‌های ذیل طبقه‌بندی نمود:

۱ - آسپرژیلوزیس آلرژیک. این فرم بیماری برحسب علائم بالینی و مناطق درگیر به سه گروه طبقه‌بندی می‌شود:

الف) آلئولیت آلرژیک خارجی (Extrinsic allergic alveolitis)

ب) آسم با منشأ خارجی (Extrinsic asthma) و آسپرژیلوزیس برونکوپولمونری آلرژیک (ABPA)
ج) سینوزیت آلرژیک آسپرژیلوسی (Allergic aspergillus sinusitis)

۲ - آسپرژیلوزیس ساپروفیتی (آسپرژیلوما، فرم کلونیزه)

۳ - آسپرژیلوزیس مهاجم (Invasive aspergilosis)
ABPA یک بیماری سیستم ایمنی است که می‌تواند از یک آسم خفیف تا یک بیماری کشنده و تخریب‌کننده بافت ریه ظاهر شود. به عبارت دیگر، می‌توان گفت که ABPA یک بیماری ریوی است که نه تنها در اثر واکنش آلرژیک به آنتی‌ژن‌های آسپرژیلوس، بلکه در اثر واکنش التهابی تخریبی (Destructive inflammation) ناشی از عفونت قارچ ساپروفیت آسپرژیلوس در نواحی تحتانی دستگاه تنفس رخ دهد [۹، ۵]. این بیماری با استنشاق احتباس اسپورهای آسپرژیلوس در مخاط چسبناک ریه بیماران اتوپیک آغاز می‌گردد. وجود سلول‌های اپی‌تلیال تحریک شده و استرس اکسیژن می‌تواند مساعد کننده کلنیزاسیون قارچ آسپرژیلوس در ریه بیماران مبتلا به آسم باشد [۸، ۱۴].

آسپرژیلوس فومیگاتوس به عنوان مهم‌ترین عامل بیماری ABPA شناخته شده است و پراکندگی عامل بیماری در محیط، تأثیر مستقیم بر میزان شیوع بیماری دارد، به طوری که طبق مطالعات انجام گرفته در عربستان سعودی موارد گزارش شده ABPA بسیار نادر است [۱۲].

نسبت به آنتی‌ژن‌های قارچ، مهاجم و یا عوارض ناشی از سموم تولید شده توسط این میکروارگانیسم ایجاد می‌گردد [۱۳]. تاکنون حدود ۹۰۰ گونه آسپرژیلوس شناسایی و توصیف شده‌اند که فقط ۱۲ گونه آن در ایجاد بیماری در انسان و حیوان دخالت دارند که از میان آنها آسپرژیلوس فومیگاتوس (*A.fumigatus*) مهمترین عامل بیماری‌زا محسوب می‌گردد [۴، ۱۳]. آسپرژیلوس‌ها از پراکندگی وسیعی در محیط برخوردار می‌باشند و تقریباً اغلب گونه‌های آن را می‌توان از خاک و هوای اکثر نقاط جهان به راحتی جدا نمود. در کشور ما نیز گزارش‌های متعددی در رابطه با جدا سازی این قارچ از محیط در دست است و تقریباً غیرممکن است تحقیقی در رابطه با قارچ‌های محیطی مشاهده نمود که در آن گونه‌ای از آسپرژیلوس به دست نیامده باشد.

امروزه با پیشرفت و گسترش تکنیک‌های تشخیص آزمایشگاهی، موارد گزارش شده آسپرژیلوزیس رو به افزایش است. در طی دهه اخیر، بررسی‌های متعددی روی عفونت‌های فرصت طلب قارچی در مبتلایان به نقص ایمنی و سل انجام گرفته است که در اغلب موارد قارچ آسپرژیلوس به عنوان یک عامل عفونت‌زا مطرح بوده است. گزارش ۲ مورد آسپرژیلوزیس مهاجم ریوی توسط توکل در سال ۱۳۷۱ [۱]، ۴ مورد آسپرژیلوزیس مهاجم ریوی ناشی از آسپرژیلوس فومیگاتوس توسط زینی و میکائیلی در سال ۱۳۷۲ [۲]، نمونه‌ای از این تحقیقات است.

تاکنون شیوع بیماری آسپرژیلوزیس برونکوپولمونری آلرژیک (ABPA) به صورت اختصاصی انجام پذیرفته است و آماری از میزان ابتلا به این بیماری در دست نیست. با توجه به برخی از عوارض غیر قابل برگشت این بیماری همانند فیروز، که تشخیص و درمان به موقع بیماری را از اهمیت خاصی برخوردار می‌سازد، این تحقیق انجام شد. در این بررسی سعی شده است که حتی الامکان روش‌های تشخیص پاراکلینیکی جهت شناسایی این بیماری به صورت استاندارد در آید تا در سال‌های آتی نیز پزشکان محترم بتوانند از مشاوره

حدود یک میلی لیتر خون بیمار، در لوله حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته و با استفاده از دستگاه اتوماتیک شمارش سلولی تعداد گلبول‌های سفید را بدست آمد.

ج) انجام تست جلدی با استفاده از آنتی ژن تجاری آسپرژیلوس فومیگاتوس مؤسسه MRC انگلستان به روش Prick test. در این روش از هیستامین ۱٪ به عنوان کنترل مثبت و از سرم فیزیولوژی به عنوان کنترل منفی استفاده شدند و آزمایش‌ها، همواره با حضور پزشک و امکانات کمک‌های اولیه جهت کنترل واکنش‌های حساسیتی احتمالی، صورت می‌گرفت. محل انجام تست (روی ساعد بیمار) تمیز شده و با خودکار محل مورد نظر علامت زده شد و سپس یک قطره از آنتی ژن مورد نظر را در آنجا چکانده شد. سپس یک لانتست استریل را از میان قطره عبور داده و وارد پوست شد و پوست کمی بالا کشیده شد به طوری که یک خراش کوچک در این محل ایجاد شود. پس از حدود ۲۰ دقیقه محل تلقیح را مورد بررسی قرار داده و برجستگی و التهاب حدود ۳ میلی متر بزرگتر از کنترل منفی، به عنوان نتیجه مثبت تلقی شد.

د) نمونه خلط بیماران در پلیت جمع‌آوری و سپس سریعاً سانتریفوژ شده و از ته نشین حاصل، آزمایش مستقیم توسط هیدروکسید پتاسیم ۱۰٪ و کشت در محیط‌های سابورو (S)، سابورو به همراه کلرامفینیکل (SC) و عصاره قلب و مغزگاو (BHI) به عمل آمد.

ه) جهت سنجش میزان IgE توتال در سرم بیماران، از کیت ELISA ساخت کمپانی RANDOX انگلستان استفاده شد. اساس این تست به روش Sandwich ELISA است و آنتی هیومن IgE بر روی فاز جامد ثابت شده است و با اضافه نمودن سرم به داخل حفرات میکروپلیت، IgE موجود در سرم با آنتی بادی ثابت شده واکنش می‌دهد و بوسیله شستشو از محیط خارج نخواهد شد. در مرحله بعد آنتی هیومن IgE کنژوگه به محیط اضافه و در نهایت با ورود سوپسترا به محیط، میزان رنگ ایجاد شده در طول موج 450 nm به روش فتومتری ارزیابی گردید. سپس با استفاده از منحنی، غلظت IgE

Zhaoming و همکاران [۱۵] هشت ویژگی را برای تشخیص مبتلایان به این بیماری ذکر کرده‌اند. این علائم عبارتند از:

۱ - آسم، ۲ - مشاهده انفیلتراسیون ریوی در رادیوگرافی ریه، ۳ - تست جلدی مثبت، ۴ - آئوزینوفیلی خون محیطی، ۵ - وجود آنتی‌بادی‌های رسوبی بر علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس، ۶ - افزایش تیتراژ IgE سرم [۱۱]، ۷ - برونشکتازی مرکزی و ۸ - افزایش تیتراژ IgE و IgG اختصاصی علیه آنتی ژن آسپرژیلوس فومیگاتوس Rosenberg [۳، ۶] جداسازی قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس از خلط بیماران را نیز به هشت ویژگی فوق افزوده است.

مواد و روش‌ها

بیماران. در طی سه سال (از ابتدای ۱۳۷۷ لغایت اواخر ۱۳۷۹) ۱۴۷ بیمار مبتلا به آسم عودکننده، مراجع کننده یا بستری در بیمارستان دکتر شریعتی و واحد قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران از لحاظ امکان ابتلا به ABPA مورد بررسی قرار گرفتند.

روش کار. ابتدا بیماران از لحاظ اثبات عدم ابتلا به عفونت تنفسی توسط پزشک متخصص مورد معاینه قرار می‌گرفتند و پس از تکمیل پرسشنامه، آزمایشات ذیل جهت هریک از آنها به عمل آمد:

الف) بررسی رادیوگرافی ریه (در صورت امکان CTscan) از لحاظ وجود انفیلتراسیون و برونشکتازی مرکزی، که یکی از علائم غیراختصاصی ولی شاخص در مبتلایان ABPA است [۷، ۱۰].

ب) حدود ۱۰ میلی‌لیتر از خون بیمار جهت جداسازی سرم و تهیه فروتی نازک گرفته می‌شد. سرم بدست آمده در سه لوله استریل کوچک تقسیم شده و جهت انجام آزمایش‌های تکمیلی سرولوژی در دمای منهای ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. گستره خون محیطی، پس از رنگ آمیزی گیمسا جهت شمارش سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

۱ - از مجموع ۱۴۷ بیمار مورد آزمایش، تعداد ۸۵ نفر مذکر و ۶۲ نفر مؤنث بودند و بیشترین تعداد در گروه سنی ۴۰ - ۳۰ سال قرار داشتند. تست جلدی مثبت در مورد ۷ بیمار مثبت گردید که از این میان ۵ نفر مذکر و ۲ نفر مؤنث بودند.

۲ - میزان IgE توتال در ۱۱ بیمار بالاتر از حد طبیعی بود که ۵ نفر آنها در گروه بیماران با تست جلدی مثبت قرار داشتند.

۳ - نتیجه آزمایش پرسی پیتاسیون (کانترا ایمنوالکتروفورز) در ۶ بیمار مثبت بود که ۴ نفر از آنها در گروه بیماران با تست جلدی مثبت قرار داشتند.

خلاصه‌ای از نتایج بدست آمده این ۷ بیمار که تست جلدی آنها مثبت بود در جدول ۲ نشان داده شده است.

۴ - در آزمایش مستقیم خلط این بیماران، یک مورد نتیجه مثبت جهت آسپرژیلوس بدست آمد و همچنین در ۲ مورد آسپرژیلوس فومیگاتوس از کشت خلط جدا گردید.

۵ - در مجموع ۶ نفر از این بیماران دارای ویژگی‌های تشخیصی جهت این بیماری بودند و ابتلا به ABPA در مورد آنها قطعی گردید. میانگین سنی این مبتلایان حدود ۳۹ سال بود، که ۲ نفر از آنها مؤنث و ۴ نفر مذکر بودند. ۳ بیمار دیگر که یکی از آنها تست جلدی مثبت داشت و ۲ نفر دیگر هم وجود آنتی‌بادی رسوبی برعلیه

بر اساس میزان جذب محاسبه شد و مقادیر بالاتر از محدوده طبیعی ذکر شده در جدول ۱ به عنوان افزایش تیتراژ IgE تلقی گردید:

جدول ۱. مقادیر نرمال غلظت IgE در سنین مختلف

Infants	64	IU / mL
> 5 Yrs	100	IU / mL
Adults	120	IU / mL

(و جهت اثبات وجود آنتی‌بادی‌های رسوبی علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس به روش پرسی پیتاسیون، از آزمایش کانترا ایمنوالکتروفورز استفاده شد. در این روش واکنش رسوبی مابین آنتی‌ژن - آنتی‌بادی با کمک میدان الکتریکی تسریع می‌گردد. جهت این تست مجموعاً ۱۶ حفره در دو ردیف مقابل هم بر روی هر ژل ایجاد شده و در یک ردیف آنتی‌ژن آسپرژیلوس فومیگاتوس MRC (سوماتیک و متابولیک) رقیق شده به نسبت ۱:۱۰ و در حضرات مقابل، سرم بیماران به علاوه یک آنتی سرم مثبت (کنترل مثبت) ریخته می‌شد. سپس به مدت ۲ ساعت جریان ۵ میلی آمپر برقرار نموده و پس از انجام مراحل شستشو و رنگ آمیزی، باندهای رسوبی ایجاد شده را مورد بررسی و تفسیر قرار می‌گرفت.

نتایج

جدول ۲. نتایج بدست آمده در مورد ۷ بیمار دارای تست جلدی مثبت

سن و جنس	سابقه آسم (سال)	اُتوزینوفیلی خون محیطی	تست جلدی	IgE توتال (IU/ml) (N=0-120)	پرسی پیتاسیون	انفیلتراسیون روی
۳۵/F	۱۴	۹۸۶ (%.۱۷)	+	۵۶۰	-	+
۲۸/M	۹	۱۴۷۴ (%.۲۲)	+	۶۸۰	+	+
۴۲/M	۲۸	۷۹۲ (%.۱۱)	+	۴۰۰	+	+
۵۴/M	۶	۲۳۷ (%.۳)	+	۸۰	-	+
۳۸/F	۱۱	۸۶۸ (%.۱۴)	+	۸۳۰	+	+
۳۶/M	۷	۱۳۴۱ (%.۱۸)	+	۵۴۰	+	+
۴۷/M	۳	۱۵۰ (%.۱-۲)	+	۴۰	-	+

دکتر ساسان صابر و همکاران محترم ایشان در بخش ریه بیمارستان دکتر شریعتی که در تمام مراحل این تحقیق بنده را یاری نمودند، سپاسگزارم.

آسپرژیلوس فومیگاتوس در سرم آنها بوسیله آزمایش‌های پرسی پیتاسیون اثبات شده بود، به عنوان موارد مثبت جهت آسم اسپرژیلوسی در نظر گرفته شدند.

منابع

[۱] توکل، پ. بررسی عفونت‌های قارچی ریه در بخش ریه بیمارستان دکتر شریعتی، پایان نامه، سال تحصیلی ۷۱-۱۳۷۰، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره ۱۹۷۴.

[۲] زینى، ف.، میکائیلی، ع. بیماری‌های قارچی سیستمیک در بیماران مشکوک به بیماری سل، ۱۳۷۲، کنگره سراسری علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

[3] Aubry, M.C. and Fraser, R., The role of bronchial biopsy and washing in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mod. Pathol.*, 11 (1988) 607-611.

[4] Broderick, L.S., Conces, D.J, Tarver, R.D., Bergmann, C.A. and Bisesi, M.A., Pulmonary aspergillosis: a spectrum of diseases. *Crit. Rev. Diagn. Imaging.*, 37 (1996) 491-531.

[5] Cramer, R., Recombinant aspergillus fumigatus allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 115 (1998) 99-114.

[6] Fujimori, Y. Tada, S., Kataoka, M., Ikubo, S., Horiba, M., Okahara, M., Takehara, H., Harada, M. and Tanabe, K., [Allergic bronchopulmonary aspergillosis effectively treated with itraconazole. *Nihon Kokyuki. Gakkai. Zasshi.*, 36 (1998) 781-786.

[7] Kiely, J.L., Spence, L., Henry, M., Hurley, M.F., Kelleher, N. and Bredin, C.P., Chest radiographic staging in allergic bronchopulmonary aspergillosis: relationship

نتایج

نتایج بدست آمده از این بررسی مؤید این است که میزان ابتلا به ABPA در ایران از میزان نسبتاً بالایی (۴٪) برخوردار است که این نتایج با در نظر گرفتن شرایط اقلیمی ایران و وجود اسپوره‌های آسپرژیلوس در هوا و تماس اجتناب‌ناپذیر دستگاه تنفس با آنها، هماهنگی دارد. بنابراین، پیشنهاد می‌گردد که برای تمامی بیمارانی که تشخیص آسم در مورد آنها قطعی گردیده است، مخصوصاً اگر در مناطق مرطوب کشور زندگی می‌کنند و یا از نظر شغلی امکان تماس آنها با گیاهان و همچنین گرد و غبار بیشتر است و یا به عبارت دیگر امکان تماس آنان با اسپور قارچ‌ها نسبت به دیگران بالاتر است، آزمایش‌های تکمیلی جهت تشخیص ABPA به عمل آید.

لازم به توضیح است که امروزه در برخی آزمایشگاه‌های تشخیصی پیشرفته از آنتی‌ژن‌های نو ترکیب (Recombinant) جهت تشخیص و تفکیک آسم اسپرژیلوسی و ABPA از سایر موارد آسم استفاده می‌شود [۵]، که امید است امکان بهره‌گیری از این روش در ایران نیز امکان پذیر گردد. البته باید به این نکته توجه کرد که در برخی موارد علائم کافی جهت اثبات ABPA در بیماران وجود دارد ولی نتیجه آزمایش‌های سرولوژی با آنتی ژن آسپرژیلوس منفی است. در این بیماران باید امکان آلرژیک برونکوپولمونری با سایر قارچ‌ها مانند: *Fusarium vasinfectum*, *Candida species*, *Schizyphylum* و *Pseudallescheria boydii* commune را در نظر داشت [۱۰].

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات استاد ارجمند جناب آقای

- serum IgE levels in a child with cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 100 (1997) 431-432.
- [12] Mobeireek, A., Gad-El-Rab, M.O., Joharjy, I., Al-Sohaibiani, M. and Ashour, M., Allergic bronchopulmonary aspergillosis: diseases pattern in central Arabia. *Trop. Med. Int. Health.*, 3 (1998) 34-40.
- [13] Rippon, J. W., "Medical Mycology: The pathogenic fungi and actinomycetes, W.B. Saunders Company, Third Edition, Philadelphia, 1998.
- [14] Sharma, O.P. and Chwogule. R., Many faces of pulmonary aspergillosis, *Eur. Resp. J.*, 12 (1998) 705-715.
- [15] Zhaoming, W. and Lockey, R.F., A review of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Investing. Allergol. Clin. Immunol.*, 6(1996) 144-151.
- with immunological findings. *Eur. Resp. J.*, 12 (1988) 453-456.
- [8] Kubo, M., Kudo, K., Koshino, T., Toh, Y., Kawana, A. and Kabe, J., Allergic bronchopulmonary aspergillosis in a patient without bronchial asthma who had chronic airway infection with *Pseudomonas aeruginosa*, *Nippon. Kyobu. Shikkan. Gakkai. Zasshi.*, 35 (1997) 698-704.
- [9] Kudo, K. and Kabe. J., Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Kekkaku*, 72 (1997) 91-98.
- [10] Lynch, D.A., Imaging of obstructive pulmonary diseases ; Imaging of asthma and allergic bronchopulmonary mycosis. *Radiol. Clin. N. Amer.*, 36 (1998) 129-142.
- [11] Maiz, L., Cuevas, M., Quirce, S., Pacheco, A. and Escobar, H., Allergic bronchopulmonary aspergillosis with low