

تهیه آنتی ژن سوماتیک از فوزاریوم سولانی جهت تشخیص سرولوژیک فوزاریوزیس

دکتر محمدرضا آقامیریان*، دکتر فریده زینی**

دریافت: ۸۳/۱۲/۲۶، پذیرش: ۸۴/۵/۳۰

چکیده:

مقدمه و هدف: فوزاریوزیس بیماری قارچی سیستمیک با اهمیتی می باشد که اغلب توسط فوزاریوم سولانی ایجاد می شود و نسبت به درمان مقاوم است. تهیه آنتی ژن مناسب از فوزاریوم سولانی در تشخیص فوزاریوزیس توسط تستهای سرولوژیک میتواند مفید باشد. این مطالعه به منظور تهیه آنتی ژن سوماتیک از فوزاریوم سولانی انجام شد. آنتی ژن تهیه شده به دنبال تزریق به خرگوش منجر به پیدایش آنتی بادی گردید.

روش کار: در این مطالعه تجربی از سویه UAMH ۷۴۱۹ فوزاریوم سولانی جهت استخراج آنتی ژن استفاده شد. عصاره آنتی ژنیک مورد استفاده از طریق کشت متحرک و خرد کردن میسلیم سویه UAMH ۷۴۱۹ فوزاریوم سولانی بدست آمد و پاسخ آنتی بادی بدنبال تزریق آنتی ژن عصاره سوماتیک به خرگوش از طریق تستهای (Counter Immunoelectrophoresis) CIE و الیزا بررسی گردید و همچنین آنتی ژن سوماتیک فراکشنه شد.

نتایج: بدنبال اجرای کشت متحرک و خرد کردن میسلیم و فراکشنه کردن عصاره سوماتیک سویه UAMH ۷۴۱۹ فوزاریوم سولانی دو جزء آنتی ژنیک متفاوت تحت عنوان آنتی ژن خام و فراکشن های آنتی ژنیک بدست آمد. فراکشن های آنتی ژنیک در مقایسه با آنتی ژن خام پاسخ های ایمنولوژیک مؤثرتری ایجاد نمود که از طریق تست الیزا مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه نهایی: دسترسی به منابع آنتی ژنیک مناسب در جهت شناسایی سرولوژیک بیماریهای قارچی فرصت طلب نقش بسزایی را ایفا می نماید.

کلید واژه ها: آنتی ژن سوماتیک / فوزاریوزیس / فوزاریوم سولانی

مقدمه:

داروهای معمول مقاوم است (۲). راه ورود گونه های فوزاریوم دستگاه تنفس و پوست می باشد، جایگاه اصلی عفونت به ترتیب پوست و خون وریه است، قارچ پس از ورود و استقرار از طریق خون در بدن منتشر شده، اعضای چون ریه، قلب، کبد، طحال، کلیه رادگیر می کنند (۳) گونه های شایعی که از عفونت های انسانی گزارش شده اند شامل فوزاریوم سولانی (*Fusarium solani*) و فوزاریوم اکسی سپوروم (*F. oxysporum*) و فوزاریوم مونیلیفورم (*F. moniliforme*) می باشند (۲). فوزاریوم سولانی معمولترین

فوزاریوزیس یک بیماری قارچی مهم است که نسبت به درمان مقاوم بوده و اغلب با فوزاریوم سولانی ایجاد می شود، این قارچ رشته ای ساپروفیت واجد دیواره عرضی (Septate) و بارشته شفاف (hyaline) است که در شرایط مستعد نوتروپنی و ایدز، پیوند مغزاستخوان، سرطان، سوختگی، تروما، دیابت، می تواند بیماری هایی نظیر اندوکاردیت، اندوفتالمیت، عفونت منتشره، پریتونیت و کراتیت ایجاد نماید (۱). عفونت منتشره ناشی از این قارچ به بسیاری از

* استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین (aghamirian2001@yahoo.com)

** استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲۴ ساعت در برابر آب مقطر در 4°C دیالیز شد (sigma, cut off 12000) (۷)، سپس مایع دیالیز شده لیوفیلیزه گردید (Freeze-Dryer FD-1 EYELA) و در 40°C - نگهداری شد (۳) عمل سنجش پروتئین در محلول حاوی یک میلی گرم پودر عصاره سوماتیک در یک میلی لیتر آب مقطر به روش برادفورد انجام گرفت (۸) و عصاره سوماتیک بدست آمده در حضور SDS-PAGE ژل ۱۰٪ تعیین وزن مولکولی شد، برای آنکه دانسته شود آنچه که تهیه شده قدرت تولید آنتی بادی را دارد از چهار خرگوش سفید آزمایشگاهی استفاده شد برای ایمن سازی خرگوش هربار مقدار ۲۵۰ میکروگرم پروتئین عصاره سوماتیک مخلوط با ادجوانت در حجمی مساوی در چهار نوبت اول با ادجوانت کامل (FCA (Freund's complete adjuvant) و در نوبتهای بعدی با ادجوانت ناقص (FIA (Freund's incomplete adjuvant)، تزریقها به فاصله سه هفته با هم صورت گرفت (۸) قبل از ایمن سازی خرگوش از سرم آنها با روش (CIE) در مقابل عصاره سوماتیک سویه های فوزاریوم سولانی آزمایش بعمل آمد، ۲ هفته بعد از آخرین تزریق از سرم خرگوشها با روش (CIE (Counter Immunoelectrophoresis) و عصاره پروتئینهای سوماتیک آزمایش بعمل آمد، آنچه که تهیه شد آنتی ژن خام بود سپس عصاره سوماتیک سویه فوزاریوم جهت تهیه فراکشن آنتی ژنیک از سفادکس ۱۰۰-G و ستون Pharmacia $1 \times 40\text{ cm}$ با بافر ۰/۱۵ M و $\text{pH} = 7/2$ عبور داده شد و پیک ۱ و پیک ۲ (Peak₁)، (Peak₂) (حاوی فراکشن ۱۲ و ۲۸) بدست آمدند و ضمناً هر دو فراکشن با روش الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE) ژل ده درصد تعیین وزن مولکولی شدند. و سپس بر روی فراکشن های ۱۲ و ۲۸ و آنتی ژن خام با سرم خرگوشها بصورت پولد (pooled) آزمایش الیزا انجام شد و بعد نتیجه کار با الیزاریدر خوانده شد و ODهای خوانده شده در طول موج ۴۰۵ nm با هم مقایسه شدند، همچنین در موش به کمک سیکلوفسفامید با فوزاریوم سولانی سویه ۷۴۱۹ UAMH ایجاد فوزاریوزیس تجربی شد و سپس از موشها خون گرفته و بر سرم آنها تست الیزا انجام شد.

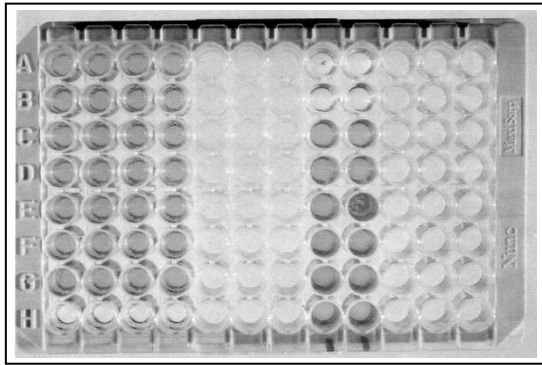
نتایج:

سرم خرگوشهای شاهد که با CIE برضد عصاره های سوماتیک سویه فوزاریوم کنترل شدند تمامی منفی و فاقد

عامل فوزاریوزیس بوده و همچنین قادر به ایجاد آسم و آلرژی در انسان است (۴). می توان برای تشخیص عفونتهای ناشی از فوزاریوم از تستهای سرولوژیک استفاده کرد که این تستها احتیاج به آنتی ژن اختصاصی دارد و از آنجا که آنتی ژن قارچ مزبور در کشور ما تهیه نشده بود. با این هدف مبادرت به تهیه آنتی ژن از عصاره سوماتیک فوزاریوم سولانی گردید، ورما نیز با استفاده از فیلتره کشت فوزاریوم سولانی آرژن های متعددی بدست آورد (۵).

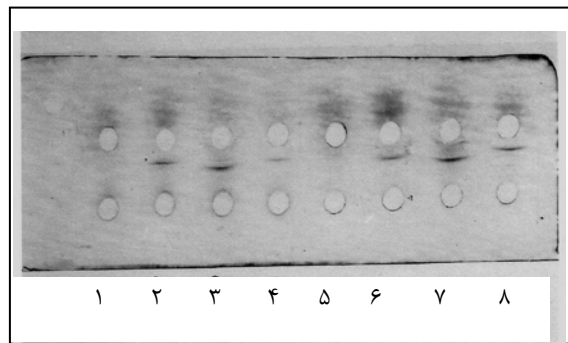
روش کار:

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. سویه فوزاریوم سولانی (University of Alberta UAMH ۷۴۱۹) (Microfungus collection & Herbarium) از کانادا تهیه گردید این سویه از بیمار جدا شده بود، سویه مزبور بر روی محیط جامد سابورو دکستروز آگار محتوی کلرامفنیکل تجدید کشت گردید و سپس از این محیط به محیط سابورو مایع منتقل شد. ارلن مایرهای محتوی کشت مایع به مدت ۱۴ روز در حرارت 30°C درجه سانتی گراد نگهداری و هرروز چندبار تکان داده شدند تا از رشد ارگانسیم بصورت ورقه میسلیال (sheet) در سطح محیط مایع جلوگیری شود، پس از گذشت ۱۴ روز جهت حصول از اطمینان خالص بودن، نمونه ها به صورت میکروسکوپی بررسی و نمونه های آلوده حذف گردید و میسلیموم های قارچی به روش فیلتراسیون با فیلتر ۰/۴۵ میکرون از مایع جدا گردید. توده های میسلیمومی را دوبار با آب مقطر استریل شستشو داده و سپس در ظرفی استریل جمع آوری شدند و پس از تزریق کردن در دمای 40°C - نگهداری گردیدند. ۴ گرم از توده میسلیمومی در ۱۰ میلی لیتر از فسفات بافر نمکی با $\text{pH} = 7/4$ حاوی مهار کننده های پروتئازی مخلوط شده با دستگاه هموژنیزور (Edmund Buhler) با دور ۲۰۰۰ rpm برای ۱۰ بار و هر بار برای ۳۰ ثانیه خرد شد، میسلیمومهای خرد شده در هموژنیزور نوبت اول با هموژنیزور (B.Broun) به کمک گلوله های شیشه ای با دور ۴۰۰۰ rpm برای ۱۴ بار و هر بار برای ۳۰ ثانیه خرد شدند (۶) محلول شیری بدست آمده طی دو مرحله در $g \times 2200$ به مدت ۱۵ دقیقه و در $g \times 25000$ به مدت ۴۵ دقیقه در 4°C سانتریفوز سانتریفوز شد و مایع رویی از رسوب جدا گردید (Beckan Avanti j-25) (۶)، آنگاه مایع حاصل (عصاره سوماتیک) به مدت



شکل ۲: آزمایش الیزا سرم موش با آنتی ژن خام و فراکشنهای ۱۲ و ۲۸ (Peak_۱, Peak_۲) آنتی ژنیک فورازیوم سولانی سویه UAMH 7419

آنتی بادی بود. و بعد از ایمن سازی به کمک عصارة پروتئینهای سوماتیک همراه با ادجوانت، سرم خرگوشها با CIE تا تیتراژ ۱/۶۴ مثبت بود (شکل ۱).



شکل ۱: آزمایش CIE سرم هیپرایمیون خرگوش با آنتی ژن خام فورازیوم سولانی UAMH 7419 پروتئینهای سوماتیک فورازیم سولانی سویه UAMH 7419 شماره ۱ شاهد منفی و شماره های بعدی مربوط به سرم خرگوش های تزریق شده می باشند

بحث:

فورازیومیس یک بیماری خطرناک قارچی است که با استفاده از آنتی ژن مناسب و تستهای سرولوژیک می توان به تشخیص آن رسید. آنتی ژنها مسئول ایمونوپاتوژن بیماریهای قارچی بوده به همین دلیل شناخت بهتر رابطه قارچ با میزبان و بررسی و شناسایی آنتی ژنها لازم است. گونه فورازیوم سولانی متعلق به کلاس دوترومایست است و یکی از مهم ترین آئروآلرژنها و عامل مهم ایجاد کننده فورازیومیس می باشد (۹). در این مطالعه برای تهیه عصارة سوماتیک فورازیوم سولانی از کشت متحرک در محیط سابوری مایع و برای خرد کردن از روش مکانیکی، با دستگاه هموژنیزور و گلوله های شیشه ای استفاده شد، زیرا عدم کارایی روشهایی چون شوک اسمزی یا سیکل های مکرر انجماد و ذوب در تهیه عصارة سوماتیک قارچها به علت سختی زیاد و آسیب ناپذیر بودن دیواره آنها ثابت شده است، پس از خرد کردن سلول، بقایای دیواره سلول و ارگانل های داخل سلولی به کمک سانتریفوژ در دمای C ۴۰ جداسازی شد تا پروتئینهای درون سلولی آزاد شده تحت تأثیر گرمای محیط دناتوره نشوند (۸). خرد شدن سلولها برای جداسازی پروتئین سبب رهاسازی پروتئینهای سلولی می شود، بنابراین بایستی از اثر آنها بر روی پروتئینهای ارگانسیم جلوگیری نمود به همین دلیل در بررسی اخیر برای تهیه عصارة سوماتیک از مهار کننده های پروتئازهای همانطور که بولاگ پیشنهاد کرده بود استفاده شد (۶). جهت تغلیظ و خشک کردن نمونه ها از روش لیوفیلیزاسیون استفاده شد تا نگهداری طولانی مدت آنتی ژن ها امکان پذیر شود،

و با الیزا سرم خرگوشها تا تیتراژ ۱/۶۴ که آزمایش ادامه یافت واکنش مثبت بود و همچنین مشخص شد که فراکشن های عصارة سوماتیک نسبت به آنتی ژن خام با سرم خرگوشها که به صورت پولد بکار رفت جواب های بهتری ارائه نمودند، با روش (SDS-PAGE) مشخص شد که آنتی ژن خام دارای ۲۱ باند پروتئینی از ۱۴ تا ۱۰۰ کیلو دالتون و فراکشن ۱۲ دارای وزن مولکولی ۸۶ و ۹۵ کیلو دالتون و فراکشن ۲۸ دارای وزن مولکولی ۳۶ و ۴۳ کیلو دالتون است، همچنین در تست الیزا سرم موشهای دارای فورازیومیس تجربی با آنتی ژن سوماتیک (پیک ۱ و پیک ۲) فورازیوم سولانی سویه UAMH 7419 تا تیتراژ ۱/۶۴ مثبت بود (شکل ۲) و OD فراکشن ۱۲ و ۲۸ به ترتیب ۱۱ و ۸ برابر و برای آنتی ژن خام ۷ برابر OD بلانک بود (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه نتایج بدست آمده از سرم موش pooled با

فراکشن ۱۲ (Peak_۱) و فراکشن ۲۸ (Peak_۲) آنتی ژن خام

فورازیوم سولانی سویه UAMH 7419 با روش الیزا

تیتراژ معکوس	OD فراکشن ۱۲	OD فراکشن ۲۸	OD آنتی ژن خام
۱/۲۰	۱/۷۶۹	۱/۷۷۸	۱/۵۱۵
۱/۴۰	۱/۶۸۴	۱/۶۸۴	۱/۴۱۲
۱/۸۰	۱/۶۹۲	۱/۶۳۹	۱/۳۲۶
۱/۱۶۰	۱/۶۶۵	۱/۶۵۱	۱/۲۶۱
۱/۳۲۰	۱/۶۴۴	۱/۵۹۶	۱/۰۹۳
۱/۶۴۰	۱/۵۸۹	۱/۵۲۰	۱/۰۴۴
بلانک (۱)	۰/۱۴۷	۰/۱۹۰	۱/۱۴۰
بلانک (۲)	۰/۱۲۲	۰/۱۷۰	۰/۱۳۹

خالص شده استاندارد شوند تا بتوان از آنها با اطمینان بیشتر استفاده کرد، البته در این ارتباط ثابت نگهداشتن شرایط کشت برای یکنواخت ماندن آنتی ژنهای مربوطه نیز لازم است فاکتورهای رشد مثل دما، مدت انکوباسیون وجود اکسیژن و ترکیب محیط کشت در ایجاد آنتی ژنهای قارچی حائز اهمیت هستند (۱۰).

نتیجه نهائی :

دسترسی به منابع آنتی ژنیک مناسب در جهت شناسایی سرولوژیک بیماریهای قارچی فرصت طلب نقش بسزایی را ایفا می نماید.

منابع :

1. Torres BL, Mederios BS, Neto. JZ. Dis-seminated Fusarium SP. Infection affecting the drain of a child a after bone marrow trasplantation. Bone Marrow Transplant 1996; 18(5): 1013-5
2. Minor R, Pfaller MA, Glingrich RD. Dis-seminated Fusarium infection in pa-tients Following bone marrow trans-plantation. Bone Marrow Transplant 1989; 4(6): 653-8
3. Murphy WJ, Friedman H. Fungal infec-tions and Immune responses. Plaenum Tress 1993: 418-19.
4. Rabodonirina M, Piens MA, Monier MF. Fusarium infection in immunocompro-mised patients: case reports and Litera-ture review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994 Feb; 13(2): 152-61.
5. Verma.J. Purification and characteriza-tion of Fus S13596 a 65 KD allergen of Fusarioum solani, Molecular and cellu-lar, Biochemistry, 131; 157-166.
6. Kibbler GC, Mackenze DWR, ODDS FC. Principles and practice of clinical my-cology. John Wiley & Sons, 1996:98-99.
7. Bollag DM, Edelstein SJ. Protein Meth-ods. 3rd ed. London: Wiley Liss , 1992: 30-42.
8. Longbottom JL, Austwick. PKC. Hand-book of Experimental immunology. Vol 1. Weir DM (ed), 1992:121-33.
9. Bennett EJ, Chung KJK. Medical My-cology. Philadelphia; Lea & Febiger, 1992: 745-7.
10. Verma J. Fusarium Solani; im-munchemical characterization of Al-lergens. Int Arch Allergy Immunol 1994; 104: 175-183.

البته می توان برای تغلیظ پروتئین از روشهای دیگری هم استفاده کرد که بعضی از این روشهای تغلیظ سبب دناتورده شدن غیر قابل بازگشت پروتئین می شوند(۶). در ایسن بررسی جهت ایجاد آنتی بادی در خرگوش از چهار تزریق عضلانی عصاره سوماتیک سویه ۷۴۱۹ UAMH فوزاریوم سولانی و ادجوانت کامل و ناقص استفاده شد ادجوانتها موادی هستند که پاسخ ایمنی را تشدید می کنند و باعث بقای بیشتر آنتی ژنها در بدن موجود زنده شده و بطور انتخابی تعداد لنفوسیتهای B و T را افزایش می دهند، سپس برای جستجوی پاسخ آنتی بادی در بدن خرگوشها از روش CIE و الیزا با استفاده از سرم پولد خرگوشها استفاده شد زیرا سرم پولد آنتی ژنهای بیشتری را شناسایی می نماید(۱۰). وجود واکنش متقاطع بین فوزاریوم، آلترناریا، پنی سلیموم، اسپرژیلوس، کلادوسپوریوم، استمفیلوم نشان داده شده است(۱۱). پس در آزمایشات سرولوژیک شایسته است از فراکشن آنتی ژنیک مناسب استفاده شود، و با استفاده از روش ژل فیلتراسیون که خود نوعی کروماتوگرافی می باشد می توان از مجموعه ای از آنتی ژنها فراکشن بدست آورد. ورما نیز آنتی ژنهای فیلتره کشت فوزاریوم سولانی سویه ۱۳۵۹۶ FUSS را با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی و ژل فیلتراسیون و FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) فراکشن نمود و ثابت نمود که همه فراکشنها فعالیت آلرژیک دارند اما یکی از آنها بیشترین قدرت را دارا می باشد(۵). در این مطالعه نیز با استفاده از ژل فیلتراسیون و سفادکس ۱۰۰-G برای سویه فوزاریوم سولانی مورد نظر تعدادی فراکشن بدست آمد که فراکشن ۱۲ (وزن مولکولی ۸۶ و ۹۵ کیلو دالتون) و فراکشن ۲۸ (وزن مولکولی ۳۶ و ۴۳ کیلو دالتون) با آنتی ژن خام سوماتیک با روش الیزا، OD بهتری را نشان دادند. با انتخاب فراکشن آنتی ژنیک مناسب برای تشخیص فوزاریوزیس از ایجاد جوابهای مثبت کاذب بخاطر تشابه آنتی ژنیک با قارچهای دیگر جلوگیری شده ویژگی تست در مقایسه با آنتی ژن خام افزایش می یابد، اسپرژیلوس فومیگاتوس و اسپرژیلوس گلوکوس و اسپرژیلوس فلاووس دارای تشابه آنتی ژنیک زیاد هستند اما هرکدام از این سه گونه هم برای خود آنتی ژنهای منحصر به فردی دارند(۱۱). و مهم دستیابی به این ژنهای اختصاصی گونه جهت انجام تستهای سرولوژیک است ، بنابراین لازم است در موارد لازم آنتی ژنهای قارچها بیشتر

11. Verma J, Gangel SV. Studies on *Fusarium solani*, cross reactivity among

Fusarium species. Allerg 1994; 49: 330-6.