مقاله پژوهشی

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 می‌شود 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 ۷٤۱۹ فوزاریوم سولانی جهت استخراج آنتی ژن استفاده شد، عصاره آنتی ژنیک مورد استفاده از طریق کشت متحرک و خردکردن میسلیوم سویه UAMH ۷٤۱۹ فوزاریوم سولانی بدست آمد و پاسخ آنتی بادی بدنبال تزریق آنتی ژن عصاره سوماتیک به خرگوش از طریق تستهای CIE (Counter Immunoelectrophoresis) و الایزا بررسی گردید و همچنین آنتی ژن سوماتیک فراکشنه شد.

نتایج : بدنبال اجرای کشت متحرک و خردکردن میسلیوم و فراکشنه کردن عصاره سماتیک سویه UAMH ۷٤۱۹ فوزاریوم سولانی دو جزءآنتی 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 ایمونولوژیک مؤثرتری ایجاد نمود که از طریق تست الیزا مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه نهائی : 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 :

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 درشرایط مستعد نوتروپنی وایدز، پیوند مغزاستخوان، سرطان، سوختگی، تروما، دیابت، می‌تواند بیماری‌هایی نظیر اندوکاردیت ، اندوفتالمیت ، عفونت منتشره ، پریتونیت و کراتیت ایجاد نماید (۱) . عفونت منتشره ناشی ازاین قارچ به بسیاری از داروهای معمول مقاوم است(۲). راه ورود گونه های فوزاریوم دستگاه تنفس وپوست می باشد، جایگاه اصلی عفونت به ترتیب پوست وخون وریه است، قارچ پس از ورود و استقرار از طریق خون دربدن منتشر شده، اعضایی چون ریه، قلب،کبد، طحال،کلیه رادرگیر می کند(۳) گونه های شایعی که ازعفونتهای انسانی گزارش شده اند شامل فوزاریوم سولانی(Fusarium solani) و فوزاریوم اکسی سپوروم (F.oxysporum) و فوزاریوم مونیلیفورم (F.moniliform) می باشند(۲). فوزاریوم سولانی معمولترین

* 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

عامل فوزاریوزیس بوده و همچنین قادر به ایجاد آسم و آلرژی در انسان است (۴). می‌توان برای تشخیص عفونتهای ناشی از فوزاریوم از تستهای سرولوژیک استفاده کرد که این تستها احتیاج به آنتی‌ژن 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 فیلترهٔ کشت فوزاریوم سولانی آلرژن های متعددی بدست آورد(۵).

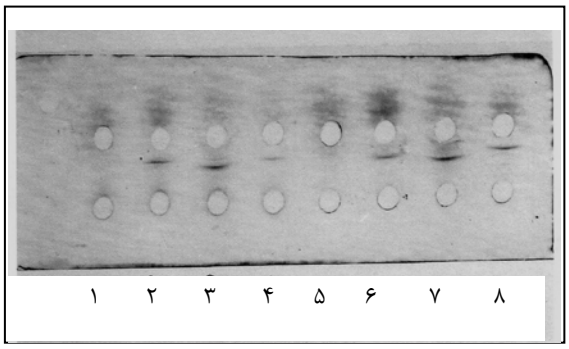
روش کار:

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. سویهٔ فوزاریوم سولانی ۷۴۱۹ UAMH (University of Alberta Microfungs collecion & Herbarium) از کانادا تهیه گردید این سویه از بیمار جدا شده بود، سویه مزبور برروی محیط جامد سابورو دکستروز آگار محتوی کلرامفنیکل تجدید کشت گردید و سپس از این محیط به محیط سابوروی مایع منتقل شد. ارلن مایرهای محتوی کشت مایع به مدت ۱۴ روز در حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هرروز چندبار تکان داده شدند تا از رشد ارگانیسم بصورت ورقه میسلیال (sheet) در سطح محیط مایع جلوگیری شود، پس از گذشت ۱۴ روز جهت حصول از اطمینان خالص‌بودن ، نمونه‌ها به صورت میکروسکوپی بررسی و نمونه‌های آلوده حذف گردید و میسلیوم‌های قارچی به روش فیلتراسیون با فیلتر ۴۵/. میکرون از مایع جدا گردید. توده‌های میسلیومی را دوبار با آب مقطر استریل شستشو داده و سپس در ظرفی استریل جمع آوری شدند و پس از تزریق کردن در دمای C ۴۰° - نگهداری گردیدند. ۴گرم از تودهٔ میسلیومی در ۱۰ میلی لیتر از فسفات بافر نمکی باpH= ۷/۴ حاوی مهار کننده‌های پروتئازی مخلوط شده با دستگاه هموژنیزور (Edmund Buhler) با دور rpm ۲۰۰۰ برای ۱۰ بار و هر بار برای ۳۰ ثانیه خرد شد، میسلیومهای خرد شده در هموژنیزور نوبت اول با هموژنیزور (B.Broun) به کمک گلوله های شیشه ای با دور rpm ۴۰۰۰ برای ۱۴ بار و هر بار برای ۳۰ ثانیه خرد شدند(۶)محلول شیری بدست آمده طی دو مرحله در g × ۲۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و در g × ۲۵۰۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد و مایع رویی از رسوب جدا گردید (Beckan Avanti j-25)(۶)، آنگاه مایع حاصل (عصارهٔ سوماتیک) به مدت ۲۴ ساعت در برابر آب مقطر درC ° ۴ دیالیز شد (sigma, cut off 12000) (۷)، سپس مایع دیالیز شده لیوفیلیزه گردید (Freeze-Dryer FD-1 EYELA) و در C ۴۰° - نگهداری شد(۳) عمل سنجش پروتئین در محلول حاوی یک میلی گرم پودر عصارهٔ سوماتیک در یک میلی لیتر آب مقطر به روش برادفورد انجام گرفت (۸) و عصارهٔ 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 عصارهٔ 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 عصارهٔ سوماتیک سویه های فوزاریوم سولانی آزمایش بعمل آمد، ۲ هفته بعد از آخرین تزریق از سرم خرگوشها با روش (CIE (Counter Immunoelectrophoresis و عصارهٔ پروتئینهای سوماتیک آزمایش بعمل آمد، آنچه که تهیه شد آنتی ژن خام بود سپس عصارهٔ سوماتیک سویه فوزاریوم جهت تهیه فراکشن آنتی ژنیک از سفادکس G -۱۰۰ و ستون Pharmacia ۱×۴۰cm با بافر M ۰/۱۵ و pH = ۷/۲ عبور داده شد و پیک ۱ و پیک ۲ ($Peak_1$ ، $Peak_2$) (حاوی فراکشن ۱۲ و ۲۸) بدست آمدند و ضمناً هر دو فراکشن با روش الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید در حضورSDS (SDS-PAGE) ژل ده درصد تعیین وزن مولکولی شدند. و سپس برروی 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 nm ۴۰۵ با هم مقایسه شدند، همچنین در موش به کمک سیکلوفسفامید با فوزاریوم سولانی سویه UAMH ۷۴۱۹ 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 عصاره‌های سوماتیک سویهٔ فوزاریوم کنترل شدند تمامی منفی و فاقد

آنتی‌بادی بود. و بعد از ایمن سازی به کمک عصـــــارهٔ پروتئینهای سوماتیک همراه با ادجوانت، سرم خرگوشها بـا CIE تا تیتر ۱/۶۴ مثبت بود(شکل ۱).

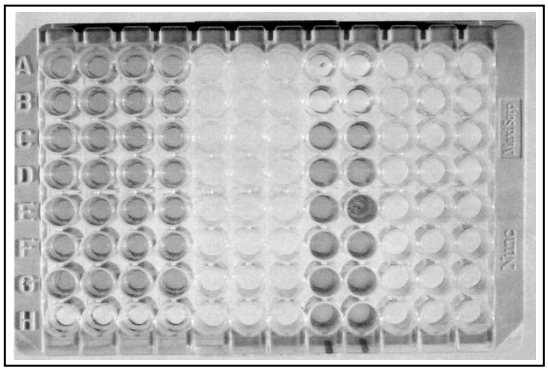


شکل ۱: آزمایشCIE سرم هیپرایمیون خرگوش با آنتی ژن خام فوزاریوم سولانی UAMH 7419 پروتئینهای سوماتیک فوزاریم سولانی سویه UAMH 7419 شماره ۱ شاهد منفی و شماره‌های بعدی مربوط به سرم خرگوش‌های تزریق شده می باشند

و با الیزا سرم خرگوشها تا تیتـر ۱/۶۴۰ کـه آزمـایش ادامـه یافت واکـنش مثبـت بـود و همچنـین مشـخص شـد کـه فراکشن‌های عصارهٔ سوماتیک نسبت بـه آنتـی‌ژن خـام بـا سرم خرگوشها که به صورت پولد بکـار رفـت جـواب‌هـای بهتری ارائه نمودند، با روش (SDS-PAGE) مشخص شـد که آنتی ژن خام دارای ۲۱ بانـد پروتئینـی از ۱۴ تـا ۱۰۰ کیلو دالتون و فراکشـن ۱۲ دارای وزن مولکـولی ۸۶ و ۹۵ کیلو دالتون و فراکشـن ۲۸ دارای وزن مولکـولی ۳۶ و ۴۳ کیلو دالتون است، همچنین در تست الایزا سـرم موشـهای دارای فوزاریوزیس تجربی با آنتی ژن سوماتیک(پیـک ۱ و پیک ۲) فوزاریوم سولانی سـویه UAMH ۷۴۱۹ تـا تیتـر ۱/۶۴۰ مثبت بـود (شـکل ۲) و OD فراکشـن ۱۲ و ۲۸ بـه ترتیب ۱۱ و ۸ برابـر و بـرای آنتـی ژن خـام ۷ برابـر OD بلانک بود (جدول ۱).

جدول ۱ : مقایسه نتایج بدست آمده از سرم موش pooled با فراکشن ۱۲ ($Peak_1$) و فراکشن ۲۸ ($Peak_2$) آنتی ژن خام فورازیوم سولانی سویه UAMH 7419 با روش الیزا

تیتر 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



شکل ۲ : آزمایش الیزا سرم موش با آنتی ژن خام و فراکشنهای ۱۲و۲۸ ($Peak_2$, $Peak_1$) آنتی ژنیک فورازیوم سولانی سویه UAMH 7419

بحث:

فوزاریوزیس یک بیماری خطرناک قارچی است که بـا استفاده از آنتی ژن مناسب و تستهای سرولوژیک می توان به تشـخیص آن رسـید. آنتـی ژنهـا مسـئول ایمنوپـاتوژنز بیماریهای قارچی بوده به همین دلیل شناخت بهتر رابطـه قارچ با میزبان و بررسی و شناسایی آنتی ژنهـا لازم اسـت. گونه فوزاریوم سولانی متعلق به کلاس دوترومایست اسـت و یکی از مهم‌ترین آئروآلرژنها و عامل مهـم ایجـاد کننـده فوزاریوزیس می باشد(۹). در این مطالعه برای تهیه عصارهٔ سوماتیک فوزاریوم سـولانی از کشـت متحـرک در محـیط سـابوروی مـایع و بـرای خردکـردن از روش مکـانیکی، بـا دستگاه هموژنیزور و گلوله های شیشـه ای اسـتفاده شـد، زیـرا عـدم کـارائی روشـهایی چـون شـوک اسـمزی یـا سیکل‌های مکرر انجماد و ذوب در تهیه عصـارهٔ سـوماتیک قارچها به علت سختی زیاد و آسیب ناپـذیر بـودن دیـوارهٔ آنها ثابت شده است، پـس از خـرد کـردن سـلول، بقایـای دیـوارهٔ سـلول و ارگانـل‌هـای داخـل سـلولی بـه کمـک سانتریفوژ در دمای C ° ۴ جداسازی شـد تـا پروتئینهـای درون سلولی آزاد شده تحت تأثیر گرمـای محـیط دنـاتوره نشوند(۸). خرد شدن سلول‌هـا بـرای جداسـازی پـروتئین سبب رهاسازی پروتئازهـای سـلولی مـی شـود ، بنـابراین بایستی از اثر آنها برروی پروتئینهای ارگانیسـم جلـوگیری نمود به همین دلیل در بررسـی اخیـر بـرای تهیـه عصـارهٔ سوماتیک از مهار کننده های پروتئازی همانطور که بولاگ پیشنهاد کرده بود استفاده شد(۶). جهت تغلیظ و خشـک کردن نمونه هـا از روش لیوفیلیزاسـیون اسـتفاده شـد تـا نگهداری طولانی مدت آنتی ژن ها امکان پذیر شـــــود ،

البته می‌توان برای تغلیظ پروتئین از روشهای دیگری هم استفاده کرد که بعضی از این روشهای تغلیظ سبب دناتوره شدن غیر قابل بازگشت پروتئین می شوند(۶). در این بررسی جهت ایجاد آنتی بادی در خرگوش از چهار تزریق عضلانی عصارهٔ سوماتیک سویهٔ UAMH ۷۴۱۹ 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 آنتی‌ژن‌های بیشتری را شناسایی می نماید(۱۰). وجود واکنش متقاطع بین فوزاریوم، آلترناریا، پنی سلیوم، آسپرژیلوس، 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 انتی ژنهای فیلترهٔ کشت فوزاریوم سولانی سویه FUSS ۱۳۵۹۶ را با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی و ژل فیلتراسیون و FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) فراکشنه 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 G-۱۰۰ برای سویه فوزاریوم سولانی مورد نظر تعدادی فراکشن بدست آمد که فراکشن۱۲ (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، آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس گلوکوس و آسپرژیلوس 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 درموارد لازم آنتی ژنهای قارچها بیشتر خالص شده استاندارد شوند تا بتوان از آنها با اطمینان بیشتر استفاده کرد، البته دراین 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. Disseminted Fusarium SP. Infection affectiog 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. Disseminated Fusarium infection in patients Following bone marrow transplantion. Bone Marrow Transplant 1989; 4(6): 653-8
3. Murphy WJ, Friedman H. Fungal infections and Immune responses. Plaenum Tress 1993: 418-19.
4. Rabodonirina M, Piens MA, Monier MF. Fusarium infection in immunocompromised patients: case reports and Literature review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994 Feb; 13(2): 152-61.
5. Verma.J. Purification and characterization of Fus S13596 a 65 KD allergen of Fusarioum solani, Molecular and cellular, Biochemistry, 131; 157-166.
6. Kibbler GC, Mackenze DWR, ODDS FC. Principles and practice of clinical mycology. John Wiley & Sons, 1996:98-99.
7. Bollag DM, Edelstein SJ. Protein Methods. 3rd ed. London: Wiley Liss , 1992: 30-42.
8. Longbottom JL, Austwick. PKC. Handbook of Experimental immunology. Vol 1. Weir DM (ed), 1992:121-33.
9. Bennett EJ, Chung KJK. Medical Mycology. Philadelphia; Lea & Febiger, 1992: 745-7.
10. Verma J. Fusarium Solani; immunchemical charactarization of Allergens. Int Arch Allergy Immunol 1994; 104: 175-183.

11. Verma J, Gangel SV. Studies on Fusarium solani, cross reactivity among Fusarium species. Allerg 1994; 49: 330-6.