تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال دوازدهم
تیر - مرداد
۱۳۸۹
شماره ۶۷

شناسایی آنتی‌ژن‌های قارچی

دکتر رضا حبیبی‌پور
دکتر سمیه بیات

اعضای هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان

پیش‌گفتار

ازجمله راه‌های تشخیص عفونت‌های قارچی مهاجم، استفاده از معرف‌های ایمونولوژیک برای شناسایی و اندازه‌گیری آنتی‌ژن‌های بزرگ قارچی در مایعات بدن میزبان است. حضور نشانگرهای ایده‌آل در عفونت‌های قارچی مهاجم خیلی زودگذر نیست و نشانگرها بیشتر همراه با عفونت هستند.

تعداد زیادی از مطالعات اخیر به اجزای دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها به‌عنوان نشانگر آنتی‌ژنیک اشاره کرده‌اند. در بین این نشانگرها، مانان و گالاکتومانان برای تشخیص آسپرژیلوس و کاندیدیازیس مهاجم کاربرد داشته‌اند.

تلاش‌های اخیر برای شناسایی آنتی‌ژن‌ها در خون با استفاده از روش‌هایی که دارای حساسیت پایین و قدرت شناسایی محدود هستند موفق نبوده است. به‌علاوه مانان یا گالاکتومانان قارچی بسرعت با تشکیل کمپلکس‌های ایمنی و با واسطه‌ی اندوسیتوز سلول‌های کوپفر کبدی از جریان خون پاک می‌شوند، بنابراین محدودیتی برای این قبیل روش‌های تشخیصی ایجاد می‌شود. از طرفی تلاش‌هایی در جهت افزایش حساسیت و ویژگی روش‌های ایمونولوژیک برای شناسایی آسپرژیلوزیس و کاندیدیازیس انجام گرفته و کمتر در زمینه‌ی تشخیص عفونت‌های قارچی سیستمیک کار شده است.

مطالعات در زمینه‌ی نشانگرهای آنتی‌ژنیک به مانوپروتئین‌ها محدود نمی‌شود بلکه شامل آنتی‌ژن‌های پلی‌ساکاریدی کپسولی، گلیکوهیدرات‌ها، سایر مانوپروتئین‌ها و پروتئین‌های محلول نیز می‌شود. به‌هرحال برخی روش‌های شناسایی آنتی‌ژن‌ها که در گذشته به‌کار گرفته می‌شدند با معرف‌هایی با سطح استاندارد پایین یا متدولوژی غیرحساس طراحی شده بودند.

در مجموع، تست‌های آنتی‌ژنیک که بر مبنای استفاده از آنتی‌بادی طراحی شده‌اند به‌طور معنی‌داری با بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زا واکنش متقاطع دارند. برای مثال رادیو ایمونواسی (RIA) که براساس آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی، به‌عنوان گیرنده و شناساگر آنتی‌ژن پلی‌ساکاریدی هیستوپلاسما کپسولاتوم پایه‌گذاری شده است، درجاتی از واکنش متقاطع با سایر ارگانیسم‌ها را نشان داده است. به‌علاوه روش‌هایی که از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال استفاده می‌شود در بین دسته‌های مختلف آنتی‌سرم‌ها تغییر می‌کند. برای مثال ثابت شده است که شناسایی آنتی‌ژن پلی‌ساکاریدی کپسول کریپتوکوکوس به کمک لاتکس آگلوتیناسیون که با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال انجام می‌شود حساسیت بالایی دارد و تا سال‌های ۱۹۶۰ نیز استفاده می‌شده اما روش‌هایی که بر مبنای آنتی‌بادی پلی‌کلونال سرم‌ها بوده منجر به گزارش‌های مختلف شده است.

روش‌های تشخیصی بر مبنای آنتی‌بادی منوکلونال چندین مزیت نسبت به پلی‌کلونال دارد زیرا نتایج گوناگون در آن‌ها کمتر است و از سوی دیگر، به‌آسانی در دسترس است و محدودیت کمی ندارد.

در زیر با مروری بر موارد فوق، شناسایی آنتی‌ژن کاندیدیازیس مهاجم، آسپرژیلوس مهاجم، کریپتوکوکوزیس و بسیاری از بیماری‌های قارچی اندمیک تشریح خواهد شد.

تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال دوازدهم
تیر - مرداد
۱۳۸۹
شماره ۶۷

آسپرژیلوس مهاجم

آسپرژیلوزیس مهاجم به‌طور فزاینده در میزبانانی که سیستم ایمنی آن‌ها ضعیف است شناسایی می‌شود. مشکل اصلی در آسپرژیلوزیس مهاجم، تشخیص به‌موقع عفونت و درمان بیماران است. این امر بسیار بالارزش اما سخت است. کشت خون یا ترشحات تنفسی به‌ویژه در مراحل اولیه‌ی بیماری به‌ندرت مثبت است.

تشخیص سریع و قابل اعتماد آسپرژیلوزیس مهاجم نیاز به به‌دست آوردن بیوپسی برای انجام آزمایش‌های بافت‌شناسی و میکروبیولوژی دارد.

استفاده از تست‌های تشخیص سریع اغلب زودتر از شرایط بحرانی بیماران امکان‌پذیر است. تست‌های تشخیص آنتی‌بادی به‌عنوان روش‌های میکروبیولوژی اضافی برای تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم به‌کار می‌روند. اما این تست‌ها اغلب به‌دلیل طبیعت بیماری یا ضعف در سیستم ایمنی میزبان منفی می‌شوند.

بنابراین شناسایی نشانگرهای آنتی‌ژنیک مختلف در آسپرژیلوزیس مهاجم نکته‌ی قابل توجهی است.

محصولات سلولی در آسپرژیلوزیس مهاجم مطالعه شده و جزییات آن در جاهای دیگر آمده است.

اولین آنتی‌ژن شناسایی شده در مایعات بدن حیوانات آزمایشگاهی و بیماران آلوده به آسپرژیلوزیس تهاجمی، گالاکتومانان بود که به‌طور گسترده مطالعه شده و شواهد حاکی از آن است که با علایم بالینی وفق داشته و به درمان‌های ضدقارچی هم پاسخ داده است.

تعدادی از تکنیک‌ها از قبیل آزمیم ایمنواسی EIAS، RIA و تست‌های لاتکس آگلوتیناسیون برای شناسایی گالاکتومانان در مایعات بدن بیماران مبتلا به آسپرژیلوزیس ارزیابی شده‌اند.

البته کاربرد روتین آن‌ها به‌دلیل محدودیت در شناسایی از بین رفته است، چرا که شناسایی گالاکتومانان در سرم فقط در مراحل پیشرفته‌ی بیماری یعنی زمانی که درمان ضدقارچی ارزش محدودی دارد امکان‌پذیر است. بیشترین تلاش‌ها امروزه برای شناسایی گالاکتومانان روی موارد زیر تمرکز یافته است:

- حضور کمپلکس‌های ایمنی در مایعات بدن که باید پیش از این‌که آنتی‌ژن قابل تشخیص باشد از بین برود.
- استفاده از تست‌هایی که قادر به شناسایی مقدار کم گالاکتومانان هستند.
- استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال به‌جای آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال برای تشخیص ایمونولوژیک گالاکتومانان.

استین و کانگوس یک ساندویچ الایزا را که آنتی‌بادی منوکلونال موشی (EB-A2) را به‌کار می‌گرفت معرفی کردند که به‌عنوان آسپرژیلوس پلاتلیا شناخته می‌شود.

این تست یکی از حساس‌ترین روش‌های رایج و در دسترس برای شناسایی گالاکتومانان است.

محدودیت پایین‌تری در شناسایی گالاکتومانان در ساندویچ الایزا وجود دارد به‌طوری که ۰/۵ تا ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر از سرم را شناسایی می‌کند.

در حالی که تست لاتکس آگلوتیناسیون با همان آنتی‌بادی منوکلونال توان شناسایی سطح پایه‌ی ۱۵ نانوگرم در میلی‌لیتر را دارد. به اضافه‌ی این‌که ساندویچ الایزا زودتر از تست لاتکس آگلوتیناسیون مثبت می‌شود و بیشتر هم مثبت باقی می‌ماند در حالی که لاتکس آگلوتیناسیون این موارد را منفی نشان می‌داد.

روش آسپرژیلوس پلاتلیا در نمونه‌های سرم بیمارانی که آسپرژیلوزیس نداشتند ۱ تا ۱۸ درصد نتایج مثبت کاذب نشان داد. این اتفاق به‌ویژه ۱ روز پس از شیمی‌درمانی یا ۳ روز پس از پیوند مغز استخوان دیده شده است.

در نمونه‌های غیرمبتلا به آسپرژیلوس، زمانی که آنتی‌ژن‌ها در خون وجود دارند باید از سایر تست‌ها و روش‌ها که عفونت را تایید می‌کنند نیز استفاده کرد. ماهیت این واکنش‌های مثبت کاذب اغلب ناشناخته باقی می‌ماند.

گزارش‌های اخیر حاکی از آن است که سیکلوفسفامید بالقوه به‌وجود آورنده‌ی این حالت است، در حالی که عده‌ای فکر می‌کنند واکنش‌های متقاطع با آنتی‌ژن‌های خارجی از قبیل باکتری‌ها یا مخمرها رخ می‌دهد.

در مجموع در مطالعه‌ی اخیر مشخص شده که گالاکتومانان مقاوم به حرارت با فرایند استریلیزاسیون غذا محدود نمی‌شود و می‌تواند از راه مخاط صدمه دیده‌ی سیستم گوارش به چرخه‌ی خون راه یابد و منجر به نتایج مثبت کاذب در تست‌های تشخیصی آنتی‌ژن در خون باشد.

در حقیقت سرم‌های منفی کاذب ممکن است در نتیجه‌ی محدودیت تهاجم داخل عروقی یا بار کم قارچی، سطح بالای آنتی‌بادی یا سطح کم گالاکتومانان آزاد شده از قارچ‌ها به‌وجود بیاید که این موارد ثبت شده در حدود ۵ درصد (حداکثر) بوده است.

در مدل‌های حیوانی، کاربرد پروفیلاکتیک یا استفاده‌ی دارویی آمفوتریسین B ممکن است ظهور کالاکنوماتان را سرکوب کند؛ پدیده‌ای که بعضا می‌رسد منجر به کاهش رشد قارچ باشد. به‌هرحال سایر عوامل ضدقارچی نیز ممکن است اثر مشابهی را ایجاد کنند.

کاندیدیازیس مهاجم

بروز کاندیدیازیس مهاجم طی دهه‌های اخیر افزایش یافته است. تشخیص زودرس کاندیدیازیس مهاجم بسیار مشکل است چون علایم بالینی و نشانه‌های آن غیراختصاصی است به‌طوری که منجر به تاخیر در تشخیص می‌شود و در نتیجه شروع درمان ضدقارچی مناسب به‌تاخیر انداخته می‌شود.
مشاهده روش‌های میکروبیولوژیک سنتی برای تشخیص کاندیدیازیس مهاجم اغلب با شکست مواجه می‌شود. کشت خون به‌طور معمول منفی است یا بسیار دیر مثبت می‌شود.
به‌علاوه استفاده از روش‌های تشخیصی Invasive برای مطالعات هیستوپاتولوژیک در شرایط بحرانی مددجویان اجازه داده نمی‌شود.
از طرفی تلاش برای گسترش تست‌های تشخیص سریع از بین روش‌های سرولوژیکی متعدد برای تشخیص عفونت‌های کاندیدایی در حال انجام است. به‌هرحال شناسایی آنتی‌بادی در بیماران مبتلا به کاندیدیازیس به دو علت محدود است:
اول: کلونیزاسیون گونه‌های کاندیدایی در مجرای گوارش یا سایر جاها که عامل بیماری نیستند نیز پاسخ‌های آنتی‌بادی را در بر خواهد داشت.
دوم: بیمارانی که سیستم ایمنی ضعیف دارند، پاسخ‌های ایمنی قابل تشخیص ندارند، حتی در صورتی که عفونت کاندیدیاز عمیق داشته باشند.
به‌غیر از تست‌های معمول تشخیصی بر مبنای آنتی‌بادی، شناسایی مستقیم آنتی‌ژن‌های گونه‌های کاندیدا می‌تواند بالقوه یک تست تشخیصی سریع باشد.
پیشرفت در تست‌های شناسایی آنتی‌ژن بیش از سال ۱۹۹ توسط دیگران به‌صورت گسترده بیان شده است.
تست لاتکس آگلوتیناسیون (Cand-Tec) اولین تست تشخیصی تجاری در دسترس برای شناسایی آنتی‌ژن بود. به‌هرحال حساسیت و ویژگی روش Cand-Tec در میان گزارش‌های مختلف متنوع بوده است.

به‌علاوه نتایج مثبت کاذب ناشی از روماتوئید فاکتور مشاهده شده است.
بنابراین تایید تشخیص کاندیدیازیس به‌تنهایی با روش Cand-Tec مشکل است و ماهیت و عملکرد شناخته‌ی آنتی‌ژن هدف، جا و پیشرفت‌های بعدی را گرفته است.
سایر آنتی‌ژن‌های هدف شامل آنتی‌ژن پروتئینی سینوبلاستمی ۴۷ کیلودالتونی و آنتی‌ژن ۴۸ کیلودالتونی که بعدها به‌عنوان اولاز تشخیص داده شدند، یک نشانگر کوچک برای تشخیص کاندیدازیس مهاجم است.
آنتی‌ژن اولاز در جریان خون در بیمارانی که کاندیدا در خون‌شان وجود دارد دیده شده است، در حالی که این آنتی‌ژن در افرادی که کلونیزاسیون سطحی کاندیدا دارند یا ظهور کاندیدا در خون ندارند وجود ندارد.
مشاهده تست بررسی اولاز برای تشخیص کاندیدا در حد یک توهم است چرا که اولاز پیش از ظهور به‌وسیله‌ی تولید کننده‌ی خود پنهان می‌شود.
استراتژی پژوهشی دیگر، شناسایی Beta 1,3-D Glucan و اجزای دیواره سلولی کاندیداست که تست تجاری در دسترس است. در خرگوش‌هایی که با کاندیدا آلوده شده بودند و بیمارانی که کاندیدازیس مهاجم داشته‌اند.
مقدار بالای Beta 1,3-D Glucan قابل تشخیص بود. نتایج مثبت نشان‌دهنده‌ی نوع قارچ ایجاد کننده‌ی عفونت نیست.
این قضیه به‌ویژه وقتی محدود کننده است که از عوامل ضدقارچی وسیع‌الطیف استفاده شود.
به‌هرحال بعضی از عوامل ضدقارچی قوی علیه بعضی از قارچ‌ها موثرند ولی برای برخی دیگر نه (مثل فلوکونازول یا کاسپوفونجین). خیلی از روش‌هایی که می‌توانند پاتوژن‌های اختصاصی را شناسایی کنند در آینده مطلوب‌تر خواهند شد.
کاربرد شناسایی آنتی‌ژن ماتان در خون برای تشخیص ایمونولوژیک کاندیدیازیس احشایی به‌وسیله‌ی وینر و کوتسمان در دهه‌های گذشته پیشنهاد شده و در حال حاضر در زمره‌ی یکی از مهم‌ترین مطالعات در بیماران کاندیدایی است.
این مطالعات مجموعه‌ای از گزارش‌های آزمایشگاه‌های مختلف است که پیشنهاد می‌کند ماتان مثبت با کاندیدیازیس مهاجم هماهنگی دارد.
به‌علاوه مطالعات همچنین نشان داده است که بین ماتان

قابل اندازه‌گیری در خون و بافت تهاجم یافته به‌وسیله‌ی گویه‌های کاندیدا هماهنگی وجود دارد.
در گذشته برای جدا کردن مایان از خون، از روش‌های تهاجمی که حساسیت یا ویژگی ضعیفی داشتند استفاده می‌کردند که از بین رفته است.
تلاش‌ها برای بهبود شناسایی ایمونولوژیک مایان مستازم حل کردن کمپلکس‌های ایمنی به‌وسیله‌ی گرم کردن سرم‌ها پیش از عملکرد تست است و نیز استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال که با Epitopها واکنش نشان می‌دهند.
بسیاری از آنتی‌بادی‌های منوکلونال وجود دارند که در بررسی‌های تشخیصی ایمونولوژیک به‌کار می‌روند.
AF1 یکی از آنتی‌بادی‌های منوکلونال است که اولیگوساکاریدها و تعدادی از مانوپروتئین‌ها را که در گویه‌های کاندیدا به‌جز کاندیدا کروزی وجود دارد تشخیص می‌دهد.
آنتی‌بادی منوکلونال دیگر 3H8 است که مثل IgG1، فقط مانوپروتئین‌ها را که در توده‌های ملکولی دیواره‌ی سلولی کاندیدا آلبیکنس وجود دارد شناسایی می‌کند که این مورد در سایر کاندیداها وجود ندارد.
آنتی‌بادی منوکلونال دیگر شامل EBCA1 است.
دو روش که از آنتی‌بادی منوکلونال بهره می‌برند شامل تست لاتکس آگلوتیناسیون کاندیدا بلاستورکس (Bio Rad) و تست آنتی‌ژنی کاندیدا بلاتلیا است که یک روش آزیمی دابل ساندویچ است. اگرچه اختصاصی بودن این دو روش شبیه یکدیگر است، EIA حساس تر از لاتکس آگلوتیناسیون است.
به‌علاوه مطالعات اخیر نشان داده که با توجه به آزمایش‌های مکرری که روی سرم‌های بیماران در معرض خطر انجام شده، استفاده‌ی توام تست آنتی‌ژن کاندیدا بلاتلیا و دو تستی که از آنتی‌بادی‌ها کمک می‌گیرند می‌تواند در بیماران عمومی شده، مایان کاندیدا آلبیکنس را بهتر از زمانی که تست کردن آنتی‌ژن به‌تنهایی انجام می‌شود نشان دهد.
علی‌رغم تلاش برای شناسایی ایمونولوژیک مایان، بیشتر روش‌ها، شبیه تست لاتکس آگلوتیناسیون بلاستورکس، هنوز به‌واسطه‌ی پاک شدن سریع آنتی‌ژن در سرم‌های بیماران حساسیت کمی دارند، به‌ویژه وقتی که فقط یک نمونه‌ی سرمی در زمان مشکوک بودن به عفونت تست می‌شود.
به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط سندید و همکاران انجام شد، وجود مایان در خون ۴ درصد بیمارانی که چندین نمونه‌ی سرمی از آن‌ها در دسترس بود یافت شد و در ۱۱ درصد بیمارانی که فقط یک نمونه‌ی سرمی از آن‌ها در دسترس بود، مایان در خون گزارش شد.
بنابراین تکرار نمونه‌های سرمی برای شناسایی آنتی‌ژن مایان کاندیدا ضرورت دارد.
به‌طور معمول تست‌های شناسایی آنتی‌ژن برای تشخیص کاندیدیازیس تهاجمی مفیدند ولی به‌هرحال همه‌ی روش‌ها برخی محدودیت‌ها دارند که روی حساسیت و ویژگی آن‌ها تاثیر می‌گذارد. شاید ترکیبی از دو روش، درستی تشخیص کاندیدیازیس تهاجمی را افزایش دهد.
به‌علاوه تکرار نمونه‌ی سرمی اعتبار تست‌های شناسایی آنتی‌ژن را برای تشخیص کاندیدیازیس بالا می‌برد.

کریپتوکوکوزیس

کشت کریپتوکوکوس نئوفورمنس از مایعات بدن به‌معنی تشخیص کریپتوکوریس قطعی است اما این روش نیاز به چندین روز وقت دارد.
روش مشاهده‌ی مستقیم کریپتوکوکوس نئوفورمنس با استفاده از جوهر هندی، روش سریعی است اما از حساسیت بالایی برخوردار نیست.
تشخیص کپسول‌پلی‌ساکاریدی کریپتوکوکوس یکی از تست‌های سرولوژیک قابل دسترس سریع است.
تشخیص آنتی‌ژن کریپتوکوکوسی با لاتکس آگلوتیناسیون انجام می‌گیرد که بر پایه‌ی ذرات لاتکس است که با آنتی‌بادی ضدکریپتوکوکوس پوشیده شده است.
شناسایی آنتی‌ژن کپسولی کریپتوکوکوس به‌وسیله‌ی تست لاتکس آگلوتیناسیون بر مبنای پلی‌کلونال Ig G در دسترس است.
به‌علاوه چه بسیار تست‌ها و روش‌ها که بر مبنای معرف کنترل لاتکس هستند و در دستور خود بالقوه واکنش مثبت کاذب را که در نتیجه‌ی تداخل موادی همچون روماتوئید فاکتور است گوشزد کرده‌اند.
همچنین واکنش‌های مثبت کاذب در بیماران مبتلا به تریکوسپوروزیس منتشره سپتی‌سمی باشی‌از کاندیدوفاکالیموروسوس و سرطان‌ها دیده شده است.
واکنش منفی به‌طور معمول به‌واسطه‌ی اثرات شبه پروزون اتفاق می‌افتد که می‌تواند در نتیجه‌ی رقیق شدن نمونه رفع شود.

تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال دوازدهم
تیر - مرداد
۱۳۸۹
شماره ۶۷

روش لاتکس آگلوتیناسیون پایه‌ی IgM منوکلونال موش که به تست مورکس کریپتوکوکوس (تشخیص دهنده‌ی مورکس) معروف است، به‌طور موثری واکنش‌های مثبت کاذب را که با فاکتور روماتوئید رخ می‌دهد محدود می‌کند.
به‌هرحال تست مورکس کریپتوکوکوس دارای حساسیت پایین‌تر از سیستم لاتکس آگلوتیناسیونی است که بر مبنای IgG پلی‌کلونال خرگوشی ساخته می‌شود.
دیگر تست‌هایی که تعریف شده‌اند، EIA، Premier cryptococcel antigen assay و استفاده از سیستم گیرنده‌ی پلی‌کلونال و سیستم شناسایی منوکلونال است.
Premier EIA به‌مانند سیستم لاتکس آگلوتیناسیون دارای حساسیت و ویژگی بالایی برای شناسایی پلی‌ساکاریدهای کپسولی در سرم یا مایع مغزی نخاعی بود.
مزیت اصلی Premier EIA نسبت به لاتکس آگلوتیناسیون، نداشتن واکنش با فاکتور روماتوئید، واکنش با تعداد به‌نسبت زیادی از نمونه‌ها و واکنش‌های مثبت کاذب کمتر است.

هیستوپلاسموزیس

HPA می‌تواند در خون و ادرار شناسایی شود و به‌ویژه در بیماران با هیستوپلاسموزیس منتشره و در بیماران با تظاهرات ریوی پیشرفته و سخت دیده می‌شود و به‌هرحال در CSF و مایعات برونکوالوئولار بیماران با تظاهرات بالینی وجود دارد.
در یک آزمایشگاه رفرانس شناسایی HPA به‌وسیله‌ی RIA یک روش تثبت شده برای تشخیص هیستوپلاسموزیس است و نیز از این طریق می‌توان پاسخ به درمان را نیز بررسی کرد.
به‌هرحال محدودیت استفاده از RIA شامل استفاده از رادیواکتیویته که در یک کیت نمی‌توان به‌آسانی داشته باشیم و استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌سرم‌ها و نیز واکنش‌های متقاطع با قارچ‌های دوشکلی دیگر از قبیل بلاستومایسیس درماتیدیس، پاراکوکسیدیوئیدیس برازیلینسیس و پنی‌سیلیوم مارنفئی است.
در سال‌های اخیر گومز و همکاران یک مهار الایزا را برای شناسایی آنتی‌ژن‌های منتشره ابداع کرده‌اند که در واقع به‌کاربری آنتی‌بادی منوکلونال P1B بوده که به‌طور مستقیم علیه شاخص ۸۷ کیلودالتونی پاراکوکسیدیوئیدیس برازیلینسیس است.
علی‌رغم حساسیت بالا (۴/ ۸ ٪) و مفید بودن برای پیگیری افرادی که به پاراکوکسیدیوئیدو مایکوزیس دچار بودند، واکنش‌های متقاطعی با سرم‌های بیماران مبتلا به بیماری‌های قارچی دیگر به‌ویژه آسپرژیلوزیس و هیستوپلاسموزیس مشاهده می‌شد.
در مجموع، الایزای مهارشده کمک موثری برای جستجوی آنتی‌ژن ۸۷ کیلودالتونی در ادرار نمی‌کند.
از دیگر روش‌ها، شناسایی اجزای پروتئین از قبیل گلیکوپروتئین ۴۳ کیلودالتونی و پروتئین آنتی‌ژنیک ۷ کیلودالتونی است.
آنتی‌ژن‌های ۷ و ۴۳ کیلودالتونی به‌طور جداگانه یا با هم در نمونه‌های ادراری شناسایی می‌شوند که به‌کمک ایمونوبلاتینگ و با استفاده از آنتی‌سرم خرگوش که علیه کشت فیلتر شده است انجام می‌گیرد.
روش ایمونوبلات دو آنتی‌ژن را به‌طور جداگانه یا با هم در ۹۱/۷٪ از نمونه‌های ۱۲ بیمار شناسایی کرد و در نمونه‌ی افراد مبتلا به دیگر بیماری‌ها یا افراد سالم یا دیگر کنترل‌ها شناسایی نشد.
آنتی‌ژن ۴۳ کیلودالتونی طی دوره‌ی درمان در نمونه‌های ادرار باقی می‌ماند، طی بهبودی فعالیت و واکنش‌پذیری آن کاهش می‌یابد و واکنش‌پذیری و فعالیت آن در عود افزایش می‌یابد.
شناسایی این آنتی‌ژن‌ها در ادرار، یک روش تضمین شده برای تشخیص پاراکوکسیدیوئیدو مایکوزیس، بررسی اثر درمان وکاهش بروز و عود عفونت خواهد بود.به‌هرحال این آزمایش برای استفاده در آزمایشگاه روتین خیلی مرسوم نیست و پرزحمت است.

پنی‌سیلیوزیس

مطالعات در زمینه‌ی شناسایی آنتی‌ژن برای تشخیص پنی‌سیلیوزیس هنوز در ابتدای راه است چرا که عفونت با پنی‌سیلیوم مارنفئی در ۱۵ سال اخیر شناسایی شده است.
با وجود این، کوفمن و کوورکر به‌تازگی تست‌های ایمونو دیفوزیون و لاتکس آگلوتیناسیون را معرفی کرده‌اند که با استفاده از آنتی‌سرم خرگوش از کشت فیلتر شده‌ی پنی سیلیوم مارنفئی تهیه شده است.
تست‌های ایمونو دیفوزیون و لاتکس آگلوتیناسیون آنتی‌ژن منتشره‌ی پنی‌سیلیوم مارنفئی را در سرم بیماران مبتلا به پنی‌سیلیوزیس با حساسیت ۵۸/۸ و ۷۶/۸ درصد شناسایی می‌کند.

به‌تازگی با استفاده از پلی‌کلونال آنتی‌بادی بر مبنای الایزا حساسیت افزایش یافته و در ادرار ۱ درصد از ۲۲ بیمار که به بنی‌سیلیوزیس دچار بودند آنتی‌ژن یافت شد.

به‌هرحال نتایج مثبت کاذب نیز در نمونه‌های رقیق شده‌ی ادرار داوطلبان سالم و بیماران مبتلا به کریپتوکوکوزیس، مایوسدوزیس و دیگر عفونت‌های باکتریایی دیده شده است.

اگرچه رقت‌های زیاد نمونه‌های ادراری ویژگی تست الایزا را تا ۱٪ افزایش می‌دهد اما حساسیت تست کاهش می‌یابد.

شاید تشکیل منوکلونال آنتی‌بادی اختصاصی، هر دو خصوصیت حساسیت و ویژگی را برای شناسایی آنتی‌ژن بنی‌سیلیوزیس ثابت نگه دارد.

دیگر روش‌هایی که بر مبنای هدف قرار دادن آنتی‌ژن طراحی می‌شوند در دست بررسی هستند.

به‌تازگی یک مانوپروتئین اختصاصی برای تشخیص بنی‌سیلیوزیس شناسایی شده است.

کالو و همکاران ژن MP1 را کلون کردند تا دیواره‌ی مانوپروتئین (MP1p) بنی‌سیلیوم مارنفی را بسازند و بر مبنای آن تست الایزا را براساس MP1p آنتی‌ژن طراحی کردند.

این روش برای بنی‌سیلیوم مارنفی اختصاصی بود، به‌طوری که ارگانیزم را در ۱۷ نفر (۶۵٪) از ۲۶ نفر بیمار مبتلا به ایدز که به بنی‌سیلیوزیس دچار شده بودند، شناسایی کرد.

۶ نفر از ۹ بیمار که از لحاظ تست آنتی‌ژنیک منفی بودند از جمله مبتلایان به بنی‌سیلیوزیس بودند که سیستم ایمنی خوبی داشتند و از لحاظ آنتی‌بادی مثبت بودند، بنابراین به‌نظر می‌رسد آنتی‌ژن MP1p به‌طور موثر در میزبان‌هایی که سیستم ایمنی دست‌خورده دارند، حذف می‌شود.

در نتیجه این تست آنتی‌ژنیک بیشتر برای بیمارانی مفید بود که ضعف بیشتری در سیستم ایمنی داشتند، در حالی که تست‌های آنتی‌بادیک بیشتر برای بیمارانی به‌کار می‌رود که دارای سیستم ایمنی خوبی هستند یا سیستم ایمنی هومورال بهتری دارند.

به‌هرحال تست الایزا بر مبنای آنتی‌ژن MP1p مزایای زیر را دارد:

- کمی است به‌طوری که می‌تواند نمایانگر ارزش درمان ضدقارچ باشد و همین‌طور می‌تواند پیشگویی کننده و آگاهی دهنده‌ی خوبی باشد چرا که می‌تواند هم بار قارچی را نشان دهد و هم توانایی میزبان در پاکسازی آنتی‌ژن را نشان دهد.
- از آن‌جایی که وابسته به خالص‌سازی پروتئین ریکامبینت (نوترکیب) اختصاصی است، آنتی‌ژن را می‌توان با دوباره درست کردن و نوسازی تهیه کرد.

References :

1_ M. H., and M. Coats-Stephen. 1979. Immunodiagnosis of systemic Weiner candidiasis: mannanemia detected by radioimmunoassay in experimental and human infections. J. Infect. Dis. 140:989-993.[Medline]

2_Weiner, M. H., and M. Coats-Stephen. 1979. Immunodiagnosis of systemic aspergillosis. I. Antigenemia detected by radioimmunoassay in experimental infection. J. Lab. Clin. Med. 93:111-119.[Medline]

3_Reiss, E., and P. F. Lehmann. 1979. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. Infect. Immun. 25:357-365.[Medline]

4_Lehmann, P. F., and E. Reiss. 1987. Invasive aspergillosis: antiserum for circulating antigen produced after immunization with serum from infected rabbits. Infect. Immun. 20:570-572.

5_Dupont, B., M. Huber, S. J. Kim, and J. E. Bennett. 1987. Galactomannan antigenemia and antigenuria in aspergillosis: studies in patients and experimentally infected rabbits. J. Infect. Dis. 155:1-11.[Medline]

6_Andrews، C. P.، and M. H. Weiner. 1981. Immunodiagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in rabbits. Fungal antigens detected by radioimmunoassay in bronchoalveolar lavage fluid. Am. Rev. Respir. Dis. 124:60-64.[Medline]
7_de Repentigny، L. 1992. Serodiagnosis of candidiasis، aspergillosis، and cryptococcosis. Clin. Infect. Dis. 14:S11-S22.[Medline]
8_Hamilton، A. J. 1998. Serodiagnosis of histoplasmosis، paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffei; current status and future trends. Med. Mycol. 36:351-364.[CrossRef][Medline]
9_de Repentigny، L.، and E. Reiss. 1984. Current trends in immunodiagnosis of candidiasis and aspergillosis. Rev. Infect. Dis. 6:301-312.[Medline]
10_Burnie، J. P. 1991. Developments in the serological diagnosis of opportunistic fungal infections. J. Antimicrob. Chemother. 28:23-33.[Medline]
11_Wheat، L. J. 1996. Histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. Curr. Top. Med. Mycol. 7:7-18.[Medline]
12_Garner، J. A.، and D. Kerdnodel. 1995. False-positive Histoplasma antigen test in a patient with pulmonary blastomycosis. Clin. Infect. Dis. 21:1054.[Medline]
13_Bloomfield، N.، M.A. Gordon، and D. F. Elmenford. 1963. Detection of Cryptococcus neoformans antigen in body fluids by latex agglutination. Proc. Soc. for Exp. Biol. Med. 114:64-67.
14Wu، T. C.، and S. Y. Koo. 1983. Comparison of three commercial cryptococcal latex kits for detection of cryptococcal antigen. J. Clin. Microbiol. 18:1127.[Medline]
15_Walsh، T. J.، S. J. Chanock. 1998. Diagnosis of invasive fungal infections: advances in nonculture systems. Curr. Clin. Top. Infect. Dis. 18:101-153.[Medline]
16_Latge، J.-P. 1999. Aspergillus fumigatus and aspergillosis. Clin. Microbiol. Rev. 12:310-350.[Abstract/Free Full Text]
17_Latge، J. P. 1995. Tools and trends in the detection of Aspergillus fumigatus. Curr. Top. Med. Mycol. 6:245-281.[Medline]
18_Kwon-Chung، K. J.، and J. E. Bennett. 1992. In J. E. Kwon-Chung and J. E. Bennett (ed.)، Medical mycology. Lea and Febiger، Philadelphia، Pa.
19_Verweij، P. E.، J. P. Donnelly، B. E. De Pauw، and J. F. G. M. Meis. 1996. Prospects for the early diagnosis of invasive aspergillosis in the immunocompromised patients. Rev. Med. Microbiol. 7:105-113.
20_Verweij، P. E.، K. Brinkman، H. P. H. Kremer، B. J. Kullberg، and J. F. G. M. Meis. 1999. Aspergillus meningitis: diagnosis by non-culture-based microbiological methods and management. J. Clin. Microbiol. 37:1186-1189.[Abstract/Free Full Text]
21_Talbot، G. H.، M. H. Weiner، S. L. Gerson، M. Provencher، and S. Hurwitz. 1987. Serodiagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancy: validation of the Aspergillus fumigatus antigen radioimmunoassay. J. Infect. Dis. 155:12-27.[Medline]
22_Rohrlich، P.، J. Sarfati، P. Mariani، M. Duval، A. Carol، C. Saint-Martin، E. Bingen، J. P. Latge، and E. Vilmer. 1996. Prospective sandwich enzyme linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. Pediatr. Infect. Dis. J. 15:232-237.[CrossRef][Medline]
23_Stynen، D.، A. Goris، J. Sarfati، and J. P. Latge. 1995. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. J. Clin. Microbiol. 33:497-500.[Abstract]
24_de Repentigny، L.، L. Kaufman، G. T. Cole، D. Kruse، J. P. Latge، and R. C. Matthews. 1994. Immunodiagnosis of invasive fungal infections. J. Med. Vet. Mycol. 32:239-252.[Medline]
25_Bretagne، S.، A. Marmorat-Khuong، M. Kuentz، J. P. Latge، E. Bart-Delabesse، and C. Cordonnier. 1997. Serum Aspergillus galactomannan antigen testing by sandwich ELISA: practical use in neutropenic patients. J. Infect. 35:7-15.[Medline]
26_Verweij، P. E.، D. Stynen، A. J. M.M. Rijs، B. E. De Pauw، J. A. A. Hoogkamp-Korstanje، and J. F. G. M. Meis. 1995. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. J. Clin. Microbiol. 33:1912-1914.[Abstract]
27_Swanink، C. M.A.، J. F. G. M. Meis، A. J. M. M. Rijs، J. P. Donnelly، and P. E. Verweij. 1997. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting Aspergillus galactomannan. J. Clin. Microbiol. 35:257-260.[Abstract]
28_Sulahian، A.، M. Talbot، P. Ribaud، J. Sarfati، E. Gluckman، J. P. Latge، and F. Derouin. 1996. Comparison of an enzyme linked immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15:139-145.[Medline]
29_Machetti، M.، M. Feasi، N. Mordini، M. T.، Van Lint، A. Bacigalupo، J. P. Latge، J. Sarfati، and C. Viscoli. 1998. Comparison of an enzyme immunoassay and a latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. Bone Marrow Transplant. 21:917-921.[CrossRef][Medline]
30_Hashiguchi، K.، Y. Niki، and R. Soejima. 1994. Cyclophosphamide induces false-positive results in detection of Aspergillus antigen in urine. Chest 105:975-976.[Medline]

31_Maertens، J.، J. Verhaegen، H. Demuynck، P. Brock، G. Verhoef، P. Vandenberghe، J. Van Eldere، L. Verbist، and M. Boogaerts. 1999. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. J. Clin. Microbiol. 37:3223-3228.[Abstract/Free Full Text]
32_Francis، P.، J. W. Lee، A. Hoffman، J. Peter، A. Francesconi، J. Bacher، J. Shelhamer، P. A. Pizzo، and T. J. Walsh. 1994. Efficacy of unilamellar liposomal amphotericin B in treatment of pulmonary aspergillosis in persistently granulocytopenic rabbits: the potential role of bronchoalevolar D-mannitol and serum galactomannan as markers on infection. J. Infect. Dis. 169:356-368.[Medline]
33_Vanden Bergh، M. F.، P. E. Verweij، and A. Voss. 1999. Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 34:221-227.[CrossRef][Medline]
34_Lemieux، C.، G. St-Germain، J. Vincelette، L. Kaufman، and L. de Repentigny. 1990. Collaborative evaluation of antigen detection by a commercial latex agglutination test and enzyme immunoassay in the diagnosis of invasive candidiasis. J. Clin. Microbiol. 28:249-253.[Medline]
35_Bailey، J. W.، E. Sada، C. Brass، and J. E. Bennett. 1985. Diagnosis of systemic candidiasis by latex agglutination for serum antigen. J. Clin. Microbiol. 21:749-752.[Medline]
36_Phillips، P.، A. Dowd، P. Jewesson، G. Radigan، M. G. Tweeddale، A. Clarke، I. Greere، and M. Kelly. 1990. Nonvalue of antigen detection immunoassays for diagnosis of candidemia. J. Clin. Microbiol. 28:2320-2326.[Medline]
37_DeLozier، J. B.، C. W. Stratton، and J. R. Potts. 1987. Rapid diagnosis of Candida species in surgical patients. Am. Surg. 53:600-602.[Medline]
38_Battafarano، D. F.، B. Jefferies، C. K. McAllister، and J. W. Kelly. 1991. The lack of utility of the latex agglutination test for detection of Candida antigen in the diagnosis of systemic candidiasis. Military Med. 156:283-285.
39_Burnie، J. P.، and J. D. Williams. 1985. Evaluation of the Rameo latex agglutination test in the early diagnosis of systemic candidiasis. Eur. J. Clin. Microbiol. 4:98-101.[Medline]
40_Matthews، R. C.، and J. P. Burnie. 1988. Diagnosis of systemic candidiaisis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-kilodalton antigen. J. Clin. Microbiol. 26:459-463.[Medline]
41_Franklyn، K. M.، J. R. Warmington، A. K. Ott، and R. B. Ashman. 1990. An immunodominant antigen of Candida albicans shows homology to the enzyme enolase. Immunol. Cell Biol. 68:173-178.[Medline]
42_Mason، A. B.، M. E. Brandt، and H. R. Buckley. 1989. Enolase activity associated with a C. albicans cytoplasmic antigen. Yeast 5:S231-S240.[Medline]
43_Mitsutake، K.، T. Miyazaki، T. Tashiro، Y. Yamamot، H. Kakeya، T. Otsubo، S. Kawamura، M. A. Hossain، T. Noda، Y. Hirakata، and S. Kohno. 1996. Enolase antigen، mannan antigen، Cand-Tec antigen، and ß-glucan in patients with candidemia. J. Clin. Microbiol. 34:1918-1921.[Abstract]
44_Walsh، T. J.، J. W. Hathorn، J. D. Sobel، W. G. Merz، V. Sanchez، S. M. Maret، H. R. Buckley، M. A. Pfaller، R. Schaufele، C. Sliva، E. Navarro، J. Lecciones، P. Chandrasekar، J. Lee، and P. A. Pizzo. 1991. Detection of circulating Candida enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. N. Engl. J. Med. 324:1026-1031.[Abstract]
45_Miyazaki، T.، S. Kohno، H. Koga، M. Kaku، K. Mitsutake، S. Maesaki، A. Yasuoka، K. Hara، S. Tanaka، and H. Tamura. 1992. G test، a new direct method for diagnosis of Candida infection: comparison with assays for beta-glucan and mannan antigen in a rabbit model of systemic candidiasis. J. Clin. Lab. Anal. 6:315-318.[Medline]
46_Miyazaki، T.، S. Kohno، K. Mitsutake، S. Maesaki، K. I. Tanaka، N. Ishikawa، and K. Hara. 1995. Plasma (1-3)-ß-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia، aspergillosis، and cryptococcosis. J. Clin. Microbiol. 33:3115-3118.[Abstract]
Weiner، M. H.، and M. Coats-Stephen. 1979. Immunodiagnosis of systemic candidiasis: mannanemia detected by radioimmunoassay in experimental and human infections. J. Infect. Dis. 140:989-993.[Medline]
48_Martins، T. B.، T. D. Jaskowski، C. L. Mouritsen، and H. R. Hill. 1995. Comparison of commercially available enzyme immunoassay with traditional serological tests for detection of antibodies to Coccidioides immitis. J. Clin. Microbiol. 33:940-943.[Abstract]
49_Herent، P.، D. Stynen، F. Hernando، J. Fruit، and D. Poulain. 1992. Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigens during invasive candidiasis. J. Clin. Microbiol. 30:2158-2164.[Abstract]
50_Jacquinot، P. M.، Y. Plancke، B. Sendid، G. Strecker، and D. Poulain. 1998. Nature of Candida albicans-derived carbohydrate antigen recognized by a monoclonal antibody in patients sera and distribution over Candida species. FEMS Microbiol. Lett. 166:131-138.
51_Reiss، E.، L. Stockman، R. J. Kuykendall، and S. J. Smith. 1982. Dissociation of mannan-serum complexes and detection of Candida albicans mannan by enzyme immunoassay variations. Clin. Chem. 28:306-310.[Abstract/Free Full Text]