

بررسی میزان ایمنی هومورال در مقابل اسپرژیلوس فومیگاتوس و عوامل موثر بر آن در بیماران مبتلا به سل ریوی و بیماری انسدادی مزمن ریوی، بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی ایران

دکتر علیرضا سالک مقدم*، دکتر سید کامران سلطانی عربشاهی*، دکتر سیامک یاسمی*، دکتر آذردخت طباطبائی*

* گروه ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی ایران
 ** گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی ایران

خلاصه

سابقه و هدف: تشخیص زودرس عفونت‌های سیستمیک قارچی و در میان آنها اسپرژیلوزیس، یک مشکل عمده در بیماران، بخصوص مبتلایان به بدخیمی‌ها، سل ریوی، آسم و بیماری انسدادی مزمن ریه می‌باشد. در این مطالعه از میان بیماری‌های زمینه‌ای برای عفونت اسپرژیلوزیس، سل ریوی و بیماری انسدادی مزمن ریه انتخاب و بررسی شده‌اند، زیرا در کشور ما شیوع داشته و در همراهی با اسپرژیلوزیس می‌توانند خطر آفرین باشند.

مواد و روشها: در این بررسی با استفاده از روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم، تیتراسیون آنتی بادی بر ضد اسپرژیلوس فومیگاتوس انجام شده است. برای تشکیل آگلوتیناسیون از گلبولهای قرمز گوسفند که از آنتی اسپرژیلوس فومیگاتوس پوشانده شده بود (موجود در کیت) استفاده شده و در رقت‌های ۱/۱۰ تا ۱/۱۲۸۰ آگلوتیناسیون در بیماران و افراد شاهد جستجو و ثبت گردید. بیماران شامل ۳۲ نفر مبتلا به سل ریوی تحت درمان و ۲۶ نفر مبتلا به بیماری انسدادی مزمن ریه بستری در بیمارستان بودند که برای هر بیمار یک مورد شاهد مناسب در نظر گرفته شد. سرم‌های جمع‌آوری شده در فریزر نگهداری و در روز آزمایش همگی یکجا مورد تیتراسیون قرار گرفتند.

یافته‌ها: در بیماران مبتلا به سل ریوی ۳۴٪ تیترا ۱/۱، ۱۵/۵٪ تیترا ۱/۱۰، ۲۲٪ تیترا ۱/۲۰، ۹٪ تیترا ۱/۴۰، ۹٪ تیترا ۱/۸۰ و ۹٪ تیترا ۱/۱۶۰ داشتند. از افراد شاهد مربوط به این گروه یک نفر تیترا ۱/۲۰ داشت. در گروه مبتلا به بیماری انسدادی مزمن ریه ۳۸/۵٪ تیترا ۱/۱، ۲۷٪ تیترا ۱/۱۰، ۴٪ تیترا ۱/۲۰، ۱۹٪ تیترا ۱/۴۰، ۷٪ تیترا ۱/۸۰ و ۴٪ تیترا ۱/۱۶۰ داشتند. در این گروه نیز یک نفر از افراد شاهد تیترا ۱/۲۰ داشت. تیتراهای ۱/۲۰ مربوط به دو نفر شاهد مذکور از جهت وجود اسپرژیلوزیس احتمالی قبلی پیگیری شد و این افراد تحت بررسی بیشتر قرار گرفتند. مطابق توصیه سازندگان کیت و با استفاده از بررسی Cut off point تیترا ۱/۲۰ به عنوان مثبت در نظر گرفته شد و بر این اساس ۵۰٪ از مبتلایان به سل ریوی و ۳۴٪ از مبتلایان به بیماری انسدادی مزمن ریه، مثبت ارزیابی شدند.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: با استفاده از نتایج بدست آمده، ضعف اکتسابی سیستم ایمنی در توجیه تیتراهای مثبت در سل ریوی مورد بحث قرار گرفته است و روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم نیز به علت سهولت و ارزانی نسبی برای انجام مطالعات اپیدمیولوژیک پیشنهاد شده است.

واژگان کلیدی: ایمنی هومورال، اسپرژیلوس فومیگاتوس، سل، COPD

مقدمه

بیماری فیروز کیستیک، میلوم مولتیپل، سل ریوی و بیماری انسدادی مزمن ریه اشاره کرد. در چنین مواردی عفونت‌های قارچی فرصت طلب مثل اسپرژیلوزیس با پیش‌آگهی بد، باعث پیامدهایی در حد مرگ برای بیمار خواهند شد (۱-۳).

تشخیص زودهنگام عفونت سیستمیک قارچی، به صورت بارز باعث موفق‌تر شدن اقدامات درمانی خواهد شد. این امر در کسانی که دچار بیماری‌های زمینه‌ای هستند از اهمیت بیشتری برخوردار است که از آن میان می‌توان به لنفوم،

آسپرژیلوس فومیگاتوس در دو گروه فوق، که باعث بروز آسپرژیلوما و آسپرژیلوزیس مهاجم می‌شوند، بیماران مبتلا به این دو بیماری یعنی سل ریوی و بیماری انسدادی مزمن ریه را با استفاده از روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم تحت مطالعه قرار داده و میزان پاسخ ایمنی هومورال را در آنها بررسی نمودیم تا میزان قابل استفاده بودن این روش (IHA) برای تشخیص بیماریهای قارچی و اهمیت موضوع ضعف سیستم ایمنی در تغییرات پاسخ آنتی بادی بررسی شود (۵، ۲).

مواد و روشها

الف - انتخاب بیمار

۳۲ بیمار مبتلا به سل ریوی و ۲۶ بیمار مبتلا به بیماری انسدادی مزمن ریه (COPD)، و به همان تعداد برای هر گروه، افراد سالم با میانگین سنی مشابه به عنوان گروه کنترل انتخاب نموده و ضمن بررسی سابقه و انجام معاینات کلینیکی از آنان نمونه گیری خون به عمل آمد. بیماران مبتلا به سل کسانی بودند که بعد از بررسی کلینیکی و رادیولوژی و بررسی میکروبیولوژیک از نظر BK، مبتلا به سل ریوی شناخته شدند. در این افراد، کشت حداقل در یکی از سه نمونه‌ای که از خلط یا ترشحات معده بدست آمده بود، مثبت گردید. برای این بیماران درمان با چهار داروی ایزونیاژید، ریفامپین، پیرازینامید و اتامبوتول برای اولین بار شروع شده بود و همگی اولین هفته درمان خود را سپری می‌کردند. از مجموع ۱۸ مرد و ۱۴ زن، ۱۳ نفر (۴۰٪) سیگاری بودند. در بین بیماران و گروه کنترل، ۵ درصد ۳۰-۴۰ ساله، ۱۵ درصد ۴۰-۵۰ ساله، ۳۰-۴۰ درصد ۵۰-۶۰ ساله، ۳۵ درصد ۶۰-۷۰ ساله و ۱۵ درصد بالاتر از ۶۰ سال بودند.

کسانی که به عنوان مبتلا به COPD مورد بررسی قرار گرفتند، از چند سال قبل به صورت مداوم سرفه‌های خلطدار داشتند که پس از بررسی بعنوان مبتلایان به COPD تشخیص داده شدند و هفته اول درمان خود را در بیمارستان طی می‌کردند. از میان ۱۷ مرد و ۹ زن در این گروه، ۱۷ نفر (۶۵٪) سیگاری بودند. در بین بیماران و گروه کنترل آنها، ۵ درصد ۳۰-۴۰ ساله، ۲۰ درصد ۴۰-۵۰ ساله، ۳۵ درصد ۵۰-۶۰ ساله و ۴۰ درصد بالاتر از ۶۰ سال بودند.

سه بیماری اصلی که در اثر آسپرژیلوس فومیگاتوس ایجاد می‌شوند عبارتند از:

۱- آسپرژیلوزیس برونشی ریوی آلرژیک

۲- آسپرژیلوما

۳- آسپرژیلوزیس مهاجم

مورد اول در مبتلایان به آسم، فیروکیستیک، لنفوم و میلوم مولتیپل ایجاد می‌شود. مورد دوم در زمینه بیماریهای ایجاد کننده حفره در ریه مثل سل ریوی بوجود می‌آید و می‌تواند در این بیماری باعث عوارضی عمده چون خونریزی های وسیع شود. بیماری سوم نیز بیشتر در بیمارانی که سیستم ایمنی سرکوب شده دارند، مشاهده می‌شود. هر چند که به صورت نادر برخی بیماران بدون ضعف ایمنی بارز نیز دچار این بیماری شده‌اند (۶، ۷، ۸، ۱۱).

آسپرژیلوزیس به علت شیوع بالای شکل مهاجمی آن، اکنون به عنوان سومین بیماری قارچی که در بیمارستان تشخیص داده می‌شود، شناخته شده است (۴، ۵، ۹). آنتی بادی بر ضد آنتی ژن‌های مختلف آسپرژیلوس توسط روش‌های مختلف قابل اندازه گیری است. از میان این روشها، ایمونودیفوزن و کانترایمونوالکتروفورزیس توسط فریدانک در سال ۱۹۹۴ بر روی سرم ده بیمار بررسی شده‌اند و مشخص گردید که در روش کانترایمونوالکتروفورزیس (CIE) غیر از این که حساسیت بیشتری در مقایسه با ایمونودیفوزن وجود دارد نتایج بدست آمده، با روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم نیز همخوانی و ارتباط بیشتری دارد (۲، ۷، ۹).

موروزو (Morozov) که روی تشخیص پاراکلینیکی آسپرژیلوزیس در بیماران مبتلا به سل ریوی کار می‌کرد، ۹۴ مبتلا به سل حفره‌ای و ۱۸ بیمار مبتلا به آسپرژیلوزیس همراه با سل ریوی را بررسی کرد. در این مطالعه نشان داده شد که روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم، تشخیص آسپرژیلوزیس را در بیماران مبتلا به سل ریوی فراهم و تسهیل می‌کند (۱، ۴، ۱۰).

روشهای دیگر که جهت بررسی این بیماری بکار رفته‌اند، الیزا (ELISA)، رادیوایمونواسی (RIA) و دابل دیفیوژن (D.D) بوده است. در این بررسی به علت شیوع بالایی که سل ریوی و بیماری انسدادی مزمن ریه (COPD) در کشور ما دارند و نیز بخاطر شیوع بالای عفونت‌های ناشی از

افراد تحت بررسی، چه در گروه بیمار و چه در گروه شاهد، شکایت از بیماری نداشتند و از نظر بررسی کلینیکی نیز مشکل دیگری در آنها موجود نبود. در مورد افراد شاهد که از نظر سن و جنس مطابق با افراد بیمار بودند، سعی گردید تا در بررسی دقیق از نظر سمع ریه، خس خس (Wheezing) شنیده نشود تا احتمال بیماری آسپرژیلوزیس برونشی ریوی آلرژیک (ABPA) از میان برود و از این نظر مثبت کاذب بوجود نیاید.

ب- روش کار

در روش حاضر، آنتی ژن به کار رفته در آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم برای تشخیص آنتی بادی بر علیه گونه‌های آسپرژیلوس، با روش اختصاصی از آسپرژیلوس فومیگاتوس به دست آمده است. این آنتی ژنها دارای پلی ساکاریدهایی هستند که اجزای فعال سرولوژیکی متعددی دارند. این اجزا، آنتی بادی ساخته شده بر علیه آنتی ژنهای دیواره سلولی را تشخیص می دهند که عمدتاً IgM است هر چند که آنتی بادی های IgG نیز بطور نسبی در این آزمایش قابل تشخیص است. بدلیل حساسیت بالای تست، این روش برای کنترل بیمارانی که در معرض خطر تماس یا ابتلا به آسپرژیلوزیس هستند، مفید است.

این تست قبل از بروز واکنش های پرسیتان که در حضور آنتی ژنهای متابولیک انجام می شوند، مثبت می گردد. بنابراین برای آشکارسازی زود هنگام و به موقع آسپرژیلوزیس و نیز پیگیری و تحت نظر گرفتن بیماران مستعد به بیماریهای قارچی مناسب است. کیت مورد استفاده، در محدوده تاریخ مصرف ذکر شده بهره برداری گردید که به علت انجام آزمایش روی همه سرمها در یک روز، مشکلی از نظر نگهداری محلولها و سوسپانسیونها برای روزهای بعدی مطرح نشد. این کیت از شرکت ویریون تهیه گردیده بود (Virion International Distribution Ltd). نمونه سرمهای بدست آمده از افراد گروههای شاهد و بیمار تا زمان بدست آمدن تعداد کافی، در دمای ۲۰- درجه نگهداری گردید تا بررسی تیتراسیون آنتی بادی برای آنها همزمان صورت پذیرد. بعد از تکمیل تعداد لازم برای آزمایش، سرمهای در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت قرارداده شد تا برای شروع آزمایش آماده شود.

برای انجام این آزمایش ظریف از پلیت های میکروتست دارای ۹۶ خانه در هر پلیت بهره گرفته شد. ابتدا محلول شامل ۸ میلی لیتر گلبولهای قرمز گوسفند که با آنتی ژن آسپرژیلوس فومیگاتوس پوشانده شده بود (موجود در کیت) با ۸ میلی لیتر آب مقطر آماده سازی شد و سوسپانسیون آنتی ژن یک درصد آماده کار گردید. آنگاه ۲۰ میکرولیتر از سرم بیمار به ۸۰ میکرولیتر از سالین نرمال اضافه و سپس با استفاده از این محلول که غلظت یک دهم داشت، غلظتهای سرمی از ۱/۱۰ تا ۱/۱۲۸۰ در خانه های مربوط به ردیف هر بیمار تهیه شد. برای این منظور از قبل به خانه های دوم تا هشتم، ۵۰ میکرولیتر نرمال سالین اضافه کرده بودیم و به خانه اول و دوم ۵۰ میکرولیتر سرم بیمار با غلظت یک دهم اضافه کردیم تا خانه اول دارای ۵۰ میکرولیتر از سرم بیمار ۱/۱۰ و خانه دوم دارای ۱۰۰ میکرولیتر محلول سرم بیمار با غلظت یک بیستم ۱/۲۰ باشد. از خانه دوم ۵۰ میکرولیتر به خانه سوم و از خانه سوم ۵۰ میکرولیتر به خانه چهارم و همینطور تا آخر اضافه و مخلوط کردیم تا رقتهای سرم بیمار از ۱/۱۰ تا ۱/۱۲۸۰ تهیه شود که حجم همه آنها ۵۰ میکرولیتر بود. به هر کدام از این غلظتها، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آنتی ژن یک درصد اضافه گردید. در مورد سرم افراد شاهد هم عیناً این مراحل به طور جداگانه انجام گردید. محلولهای بدست آمده در میکروپلیتها را با حرکت چرخشی ملایم، به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری کردیم. ارزیابی اولیه بعد از این ۲ ساعت انجام شد و نتایج ۲۴ ساعت بعد، پس از نگهداری نمونهها در یخچال با دمای ۴-۸ درجه سانتی گراد ثبت گردید. جوابهای مثبت شامل مواردی بود که آگلوتیناسیون به شکل حلقه ای یا دیسک عریض دیده شد. جوابهای منفی در مواردی بود که گلبولهای قرمز در ته لوله رسوب می کرد. آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم درباره آسپرژیلوس می تواند وجود آنتی بادی بر ضد آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نیدولانس را اثبات نماید.

یافته ها

از ۳۲ بیمار مبتلا به سل ریوی یازده نفر تیترا ۱/۱ (۳۴٪)، پنج نفر تیترا ۱/۱۰ (۱۵/۵٪)، هفت نفر تیترا ۱/۲۰ (۲۲٪)، سه نفر

موارد تیترا مثبت در COPD با عیار $1/40$ و بیشترین موارد تیترا مثبت در TB در عیار $1/20$ بود. این امر می‌تواند ناشی از دست نخورده‌تر بودن سیستم ایمنی در COPD باشد که در نتیجه باعث ایجاد آنتی‌بادی بیشتر و ایجاد تیتراسیون بالاتر شده باشد.

از سوی دیگر تیتراهای بالاتر و در حد $1/80$ و $1/60$ در مبتلایان به سل ریوی در مقایسه با COPD بیشتر می‌باشد (حدوداً "دوبرابر") که شاید بتوان اینطور فرض نمود که در COPD بدلیل آنکه سیستم ایمنی نسبتاً فعال است عفونت را در زمان مناسب کنترل می‌کند، لذا تیترا آنتی‌بادی علیه آسپرژیلوس که رابطه مستقیم با شدت و دوام تحریک آنتی‌ژنی دارد از حدی که ذکر شد، معمولاً بالاتر نمی‌رود. پس تیتراهای بالای آنتی‌بادی در حد $1/80$ و $1/60$ کمتر مشاهده می‌شود. ولی در مبتلایان به سل ریوی بدلیل ضعف سیستم ایمنی سلولی که برای مهار و سرکوب فعالیت‌های قارچ لازم است، روند مداوم تحریک می‌تواند باعث فعال شدن لنفوسیت‌های B بدون نیاز به تحریک توسط لنفوسیت‌های T شود و ادامه این واکنشها باعث تولید تیتراهای بالایی از آنتی‌بادی در حد $1/80$ و $1/60$ گردد.

در هر یک از دو گروه شاهد مورد بررسی، یک نفر دارای تیترا مثبت و در حد $1/20$ بود. در معاینه خس‌خس انتهایی بازدمی بصورت متناوب و گذرا شنیده شد. این بیماران جهت بررسی آسپرژیلوزیس برونشی ریوی آلرژیک معرفی شدند تا مطالعه بیشتری در مورد آنان صورت پذیرد. از تیتراهای مثبت در مبتلایان به سل ریوی، ۵۸ درصد مربوط به مردان و ۴۲ درصد مربوط به زنان بود و در گروه COPD ۵۲٪ تیتراهای مثبت مربوط به مردان و ۴۸٪ آنها مربوط به زنان بود. در این بررسی، هر سه بیماری که در معرض ابتلا به آسپرژیلوما قرار داشتند، مرد بودند. این امر همخوانی بین این مطالعه را با مطالعه انجام شده توسط گری و همکاران نشان می‌دهد، که در آن تحقیق گذشته‌نگر ۹۰٪ بیماران مبتلا به آسپرژیلوما را مردان تشکیل داده بودند (۴). این مطلب نشان‌دهنده این نکته است که آسپرژیلوس در هر دو جنس رشد و تکثیر خود را انجام می‌دهد ولی مردان مبتلا به سل، استعداد بیشتری برای ابتلا به آسپرژیلوما دارند. تعیین علت این امر نیاز به بررسی‌های جداگانه دارد.

تیترا $1/40$ (۹٪)، سه نفر تیترا $1/80$ (۹٪) و سه نفر تیترا $1/160$ (۹٪) داشتند. از افراد شاهد مربوط به این گروه، ۲۶ نفر (۸۱٪) تیترا $1/1$ ، پنج نفر تیترا $1/10$ (۱۵٪) و یک نفر تیترا $1/20$ (۴٪) داشتند.

از ۲۶ بیمار مبتلا به بیماری انسدادی مزمن ریه (COPD)، ده نفر تیترا $1/1$ (۳۸/۵٪)، هفت نفر تیترا $1/10$ (۲۷٪)، یک نفر تیترا $1/20$ (۴٪)، پنج نفر تیترا $1/40$ (۱۹٪)، دو نفر تیترا $1/80$ (۷٪) و یک نفر تیترا $1/160$ (۴٪) داشتند. از افراد شاهد برای گروه COPD ۲۱ نفر (۸۱٪) تیترا $1/1$ ، چهار نفر تیترا $1/10$ (۱۵٪) و یک نفر تیترا $1/20$ (۴٪) داشتند.

بحث

هدف از این بررسی که به روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (Indirect Hemagglutination Assay = IHA) انجام گردید، تشخیص و تعیین تیترا آنتی‌بادی علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس بوده است. براساس استانداردهای ذکر شده، تیترا مساوی یا بالاتر از $1/20$ را به عنوان مثبت تلقی نمودیم. در آن دسته از بیماران مبتلا به سل ریوی که احتمال زیادی برای ابتلا به آسپرژیلوما داشتند (با توجه به رادیوگرافی قفسه سینه و علائم بالینی) تیتراهای آنتی‌بادی $1/20$ به بالادست آمد. با توجه به منحنی ROC (Receiver Operator Characteristic) و با در نظر گرفتن تیترا $1/20$ به عنوان cut off point حساسیت تست برای این گروه بیماران به ۱۰۰٪ می‌رسد و باعث اختصاصی بودن (Specificity) روش حاضر می‌شود، که برابر تیترا توصیه شده، در دستور کار کیت می‌باشد. در گروه COPD نیز همان عیار $1/20$ که در دستور کار روش مذکور مثبت اعلام شده بعنوان تیترا مثبت و Cut off point در نظر گرفته شد.

از ۳۲ مبتلا به سل ریوی، ۵۰ درصد تیترا مثبت داشتند (مساوی یا بالاتر از $1/20$) که این مسئله شاید مبین این باشد که ضعف سیستم ایمنی ناشی از سل ریوی، زمینه را برای رشد قارچ مساعد کرده است در این بین، بیشتر افراد دارای تیترا $1/20$ بودند که حداقل تیترا مثبت قابل قبول می‌باشد. شاید این امر، خود تاییدکننده ضعف سیستم ایمنی در مبتلایان به بیماری سل باشد. از گروه مبتلایان به COPD که ۲۶ نفر بودند، ۹ نفر (۳۴٪) تیترا مثبت نشان دادند که اکثراً برابر با $1/40$ بود. همانطور که مشاهده می‌شود، بیشترین

زود هنگام و پیشگیری از آسپرژیلوما بکار میرود، (ب):
بررسی دقیق تر اثرات نقص سیستم ایمنی از طریق بررسی
نقص اکتسابی سیستم ایمنی در افراد دارای تیترا مثبت .

۲- بررسی داروهای مختلف بکار رفته در COPD از
جهت اینکه کدامیک از آنها در تغییرات تیترا آنتی بادی
یعنی کاهش یا افزایش شدت آسپرژیلوزیس نقش دارند،
مثل کورتیکواستروئیدهای سیستمیک یا استنشاقی .

با توجه به نتایج حاصله و وجود همخوانی با سایر مطالعات
و در مقایسه با روشهای دیگر آزمایشگاهی برای تشخیص
آسپرژیلوزیس، روش هم‌گلوتیناسیون غیر مستقیم به علت
مقرون به صرفه بودن و نیز سهولت انجام و سرعت عمل به
عنوان روشی مناسب جهت بررسی افراد در معرض خطر از
نظر احتمال آلودگی با آسپرژیلوس فومیگاتوس توصیه
می گردد.

در بین مبتلایان به سل که دارای تیترا مثبت بودند، ۵۹٪
سیگاری بودند در حالیکه در بیماران مبتلا به COPD که
تیترا مثبت داشتند، ۷۰٪ سیگاری بودند. به نظر می رسد
همانطور که سیگار مهمترین زمینه برای بروز بیماری
COPD است، نقش زیادی در رشد این قارچ در مبتلایان
به COPD ایفا کرده است.

در بررسیهای رادیولوژیک ۳۲ بیمار مبتلا به TB : یازده
نفر (۳۰٪) دارای ضایعات حفره‌ای بودند، سه نفر از این
افراد (۹٪ از کل مبتلایان به سل) تظاهرات رادیولوژیکی
آسپرژیلوما را داشتند. این سه نفر به عنوان مبتلایان به
آسپرژیلوما در نظر گرفته شدند. این گروه دارای تیتراهای
مثبت سرمی و برابر با ۱/۲۰، ۱/۴۰، و ۱/۸۰ بودند.

اقداماتی که در آینده قابل انجام خواهد بود عبارتند از:

۱- بررسی علت بالابودن تیترا مثبت در مبتلایان به سل
ریوی (۵۰٪) به عنوان (الف): عاملی که برای تشخیص

REFERENCES:

- 1- Adeyemo AO, Odelowo EO, Makajuola DI. Management of pulmonary aspergilloma in the presence of active tuberculosis. *J Thorax* 1984 ;39(11):862-7.
- 2- Evans EGV, Richard MD. *Aspergillus , antibody detection*. 1st edi, 1989. oxford university perss. p: 212-223.
- 3- Fauci, Braunwald, Isselbacher. Aspergillus fomigatus, In: *Harison's Principle of Internal Medicine* 1989; Oxford university press. p: 212-223.
- 4- Garay GJ, Ruiz GE, Vara QF. Pulmonary aspergilloma, Analysis of 31 patients. *J Arch Bronconeumol* 1994;30 (9): 424-32.
- 5- Iwata H, Miwa I, Takagi K. Pulmonary tuberculosis and mycotic infection, clinical and serological diagnosis. *J Kekkaku* 1989;64 (1): 7-13
- 6- Lawrence MT, Stephen J, Mc Phee MA. *Aspergilosis, current medical diagnosis and treatment*, 37th edi, 1998; Appleton & Lange. P: 1395-1396.
- 7- Rich RR. *Aspergillus, Clinical Immunology*, 1st edi, 1996; Mosby.p: 913-932.
- 8- Rodrigues J, Niderman Ms, Fein AM, et al. Non-resolving pneumonia in steroid treated patients with obstructive lung disease. *Am J Med* 1992 ;93(1): 29-34.
- 9- Shwartz HJ, Green Berger PA. The prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma, determined by serologic and radiologic criteria in patients at risk. *J Lab Clin Med* 1991; 117(2): 138-42.
- 10- Tomlinson JR, Sahn SA. Aspergilloma in sarcoidosis and tuberculosis. *Chest* 1989;92(3):505-8.
- 11- West PM, Flanigan T, Salata. RA, et al. Serious infections complications of Corticosteroid therapy for COPD. *Chest* 1989;95 (6): 1180-84.