تشخیص آزمایشگاهی بیماری‌های قارچی

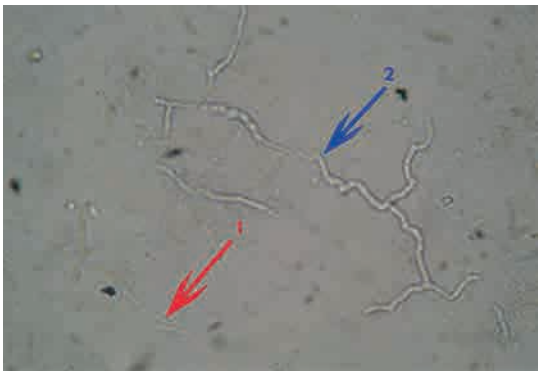
● دکتر محمد قهری
دکترای علوم آزمایشگاهی، Ph.D قارچ شناسی
استادیار دانشگاه امام حسین (ع)
ghahri14@gmail.com

❑ مقدمه

تشـــخیص بیماری‌های قارچی همانند سایر بیماری‌های میکروبی بر پایه مشاهدات بالینی و بررسی‌های آزمایشگاهی اســـتوار اســـت. شـــکل ظاهری ضایعات قارچی تا حدودی می‌تواند در تشخیص بیماری کمک کننده باشد ولی امکان دارد که در اثر درمان‌های ناقص چنین ضایعاتی تغییر یافته و شکل تیپیک خود را از دست داده باشند. در بیماری‌های قارچی عمقـــی، یافته‌های بالینی کمتـــر اختصاصی بوده و مشـــابه سایر بیماری‌های میکروبی است و این امر تشخیص علت بیماری و نیز درمان مناسب را با مشکل مواجه می‌کند.

برای تشـــخیص و تمایز بیماری‌های قارچی از سایر عوامل بیماریزا، تکنیک‌های رادیولوژی و پرتونگاری ابزار قابل اعتمادی می‌باشند. تست‌های آزمایشگاهی در تشخیص بیماری، ارزیابی تأثیر فرآیند درمانی و تعقیب روند بهبود بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند. تشخیص آزمایشـــگاهی موفق بیش از همه به جمع آوری با کفایت نمونه‌های بالینی و انتخاب روش تشخیصی مناسب وابسته است. نوع نمونه و روش آزمایشگاهی بستگی به جایـــگاه عفونت و نیز علائم بالینی بیماری دارد و از عفونتی به عفونت دیگر متفاوت و متغیر است. نتایج آزمایشگاهی می‌تواند کاملاً واضح و قاطع باشـــد ولی گاهی یافته‌ها بی نتیجه و حتی گمراه کننده هستند. در چنین مواقعی ارتباط نزدیک بین بخش بالینی و آزمایشگاه بسیار مهم و تعیین کننده است.

واژه‌هـــای کلیدی: میکوز، قارچ شناســـی، آزمایشـــگاه، قارچ‌های پاتوژن، عفونت پوستی



پیکان آبی هایفی قارچی و پیکان قرمز دیواره سلول اپیتلیال را نشان می‌دهد

❑ جمع آوری نمونه

جمع آوری، نگهداری و فرآوری نامناسب نمونه‌ها می‌تواند به تشـــخیص‌های نادرست منجر شـــود. بهتر است پزشک معالج نـــوع عفونت احتمالی را به آزمایشـــگاه گزارش کند و نیز اطلاعات زمینه‌ای کافی را در اختیار آزمایشـــگاه قرار دهد. علاوه بر مشخص کردن محل و زمان نمونه گیری، به دســـت آوردن اطلاعات دیگر نظیر وجود بیماری زمینه‌ای، سابقه مسافرت، سابقه تماس با حیوان و شغل بیمار ضروری به نظر می‌رسد. این اطلاعات به آزمایشگاه کمک می‌کند تا نـــوع عامل قارچی را تا حدودی پیش بینی و بر اســـاس آن

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

مناسب‌ترین روش‌های آزمایشگاهی را به کار گیرد.

به عــلاوه در صورتی که نمونه مــورد آزمایش مربوط به فرد بیماری با شرایط خاص از قبیل هپاتیت و یا ایدز باشد، باید آگاهی قبلی به آزمایشــگاه داده شود تا در کار با نمونه مراقبت لازم به عمل آید.

به استثنای نمونه‌های پوست، مو و ناخن سایر نمونه‌های قارچی در ظروف اســتریل جمع آوری شــده و در شرایط استریل به آزمایشــگاه منتقل می‌شود. ظروف نمونه گیری باید به طور واضح برچســب خورده و مشخصات بیمار را به همراه داشته باشند.

❑ نمونه‌های پوست، مو و ناخن

نمونه پوســت، مو و ناخن در پاکت‌های چهار گوش سیاه در ابعاد ۱۰×۱۰ ســانتی متر جمع آوری می‌شوند. استفاده از کاغذ موجب خشک شدن نمونه می‌گردد، که این امر در مرتبــه اول آلودگی ثانویه باکتریایی را کاهش می‌دهد، ثانیاً شرایط مطمئنی را برای نگهداری طولانی مدت نمونه (۱۲ ماه یا بیشتر) فراهم می‌سازد.

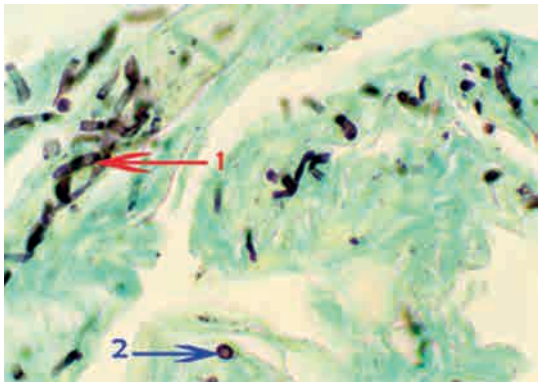
قبــل از نمونه گیــری از زخم‌های ســطحی، ابتدا محل موضع با الکل ۷۰ درصد تمیز می‌شود. با این کار هم شانس تشخیص ارگانیسم قارچی در نمونه مستقیم میکروسکوپی افزایش می‌یابد و هم احتمال آلودگی محیط کشــت توسط اجرام میکروبی آلوده کننده کم می‌شود.

درصورت اســتفاده از پودر، کرم و دارو در محل ضایعات لازم اســت قبل از نمونه گیری محل مورد نظر کاملاً تمیز شود. نمونه برداری از حاشیه زخم با اسکالپل انجام می‌گیرد. اگر در محل زخم پوسته وجود داشته باشد بهتر است از نوار چسب اسکاچ جهت نمونه گیری مناسب استفاده شود.

در عفونت موی سر استفاده از چراغ وود در انتخاب محل دقیق نمونه برداری و جمع آوری نمونه سودمند است. ایجاد فلورســانس یکی از خصوصیات بیماری‌هــای درماتوفیتی می‌باشد که توسط برخی گونه‌ها تولید می‌شود. در صورتی که فلورسانس دیده نشود موهای کدر و شکسته را به عنوان نمونه مــورد آزمایش جمع آوری می‌کننــد، موهای آلوده توسط پنس[1] از ریشه چیده می‌شوند. برداشت سطحی موها ارزش چندانی ندارد زیرا عفونت معمولاً در نزدیکی ســطح پوست و در مجاورت فولیکول‌های مو مستقر می‌گردد.

روش دیگــر بــرای جمــع آوری نمونه بــه خصوص در بیماری‌هــای نامحســوس و فاقــد علایم بــارز، برس زدن ســطح پوســت یا موها و انتقال آن به سطح محیط کشت آگار می‌باشــد. بــرای اســتفاده مجدد، برس ابتــدا باید با کلروهگزیدین[2] ۱ درصد به مدت ۱ ســاعت استریل شده و سپس با آب مقطر استریل آبکشی می‌شود.

برای جمع آوری نمونه ناخن از قســمت‌های تغییر رنگ یافته، تغییر شــکل داده یا نواحی ترد و شــکننده استفاده می‌شــود. نمونه ناخــن تا حد امکان از مرکــز ضایعات و از نواحی عمقی‌تر جمع آوری می‌شــود. اگر ناخن ضخیم شده باشد تراشیدن نمونه از زیر صفحه ناخن انجام می‌گیرد.



پیکان آبی سلول مخمری و پیکان قرمز سلول‌های هایفی در ضایعه تینا ورسیکالر را نشان می‌دهد

❑ غشاهای مخاطی

نمونه برداری از ضایعات دهانی به روش تراشــیدن نتایج بهتری دارد، با این حال استفاده از سواب روش متداول‌تری است که احتمالاً به علت سهولت انجام کار می‌باشد. در این روش معمولاً توسط ســواب آغشته به آب مقطر استریل یا

1- Forceps
2- Chlorhexidine

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

نرمال سالین از نواحی آلوده برداشت شده و درون محیط کشت انتقالی و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه انتقال می‌یابد.

❑ گوش

تراشیدن مجرای گوش بهترین روش نمونه برداری است، هر چند که می‌توان از سواب نیز استفاده نمود.

❑ چشم

نمونه برداری زخم قرنیه به روش تراشیدن و با استفاده از اسپاچولای[3] پلاتینی استریل صورت می‌گیرد. از آنجایی که حجم نمونه اخذ شده از چشم معمولاً کم است ترجیحاً انتقال به محیط کشت و تهیه اسمیر میکروسکوپی بلافاصله در کنار بستر بیمار انجام می‌گیرد. مشخصات مربوط به نمونه گیری بر روی پلیت ثبت شده و به آزمایشگاه انتقال می‌یابد. سواب برای نمونه برداری از زخم‌های قرنیه مناسب نیست.

در مبتلایان به آندوفتالمیت قارچی مایع زجاجیه جمع‌آوری می‌شود. نمونه اخذ شده که توسط مایع شستشوی چشم رقیق شده است قبل از بررسی‌های آزمایشگاهی سانتریفوژ می‌گردد.

❑ خون

در موارد مشکوک به بیماری‌های قارچی عمقی، کشت خون انجام می‌گیرد. جداسازی موفق عوامل قارچی از کشت خون به فاکتورهایی از قبیل حجم نمونه اخذ شده، تعداد دفعات نمونه گیری و روش فرآوری نمونه‌ها وابسته است.

مخمرهای کاندیدا آسانتر از قارچ‌های دو شکلی و کپک‌ها از کشت خون جدا سازی می‌شوند.

با استفاده از محیط‌های کشت دی فازیک و تهویه هوایی مناسب، احتمال جداسازی ارگانیسم‌های قارچی افزایش می‌یابد. حساس‌ترین و سریع‌ترین روش تشخیص فانگمی روش لیز - سانتریفوژ[4] می‌باشد که البته نسبت به روش‌های دیگر پرهزینه و پرزحمت‌تر است.

امروزه با به کارگیری سیستم‌های کشت خون اتوماتیک و اصلاح ترکیبات محیط کشت خون، حساسیت کشت خون تا حدی با روش لیز-سانتریفوژ برابری می‌کند. با این وجود، روش لیز -سانتریفوژ در جداسازی کریپتوکوکوس نئوفورمنس، قارچ‌های دوشکلی و کپک‌ها نسبت به سایر روش‌ها ارجح تراست.

❑ مایع مغزی نخاعی

حدود یک میلی لیتر مایع مغزی نخاعی در لوله استریل جمع آوری می‌شود. نمونه اخذ شده ابتدا سانتریفوژ و سپس مایع رویی آن جهت انجام تست‌های سرولوژی به کار می‌رود و قسمت رسوبی آن به محیط کشت انتقال می‌یابد. همچنین می‌توان از رسوب آن برای بررسی مستقیم میکروسکوپی استفاده نمود.

❑ ادرار

نمونه ادرار میانی به شرط این که توسط ترشحات واژن و یا نواحی پری آنال آلوده نشده باشد برای بررسی‌های قارچ شناسی مناسب است. آسپیراسیون بالای پوبیس[5] در نوزادان بهترین روش جمع آوری نمونه ادرار می‌باشد. نمونه ادرار بلافاصله مورد بررسی میکروسکوپی و کشت قرار می‌گیرد. همچنین می‌توان در آن به جستجوی آنتی ژن‌های قارچی پرداخت.

امکان عفونت پروستات در بیماران مبتلا به بلاستومیکوزیس و یا کریپتوکوکوزیس وجود دارد، بنابراین جمع آوری نمونه ادرار همراه با ماساژ پروستات ارزشمند است.

مخمرهای کاندیدا معمولاً از ادرار جدا می‌شود، ولی ارزش کلینیکی آن‌ها بستگی به شرایط و علایم بالینی دارد. هر تعداد کلنی در ادراری که به وسیله پونکسیون بالای پوبیس

3- Spatula
4- Lysis-centrifugation
5- Suprabubic

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

تهیه شـــده باشد، دارای ارزش تشـــخیصی بوده و باید گونه آن تعیین گردد. نمونه جمع آوری شده سانتریفوژ و سپس رسوب آن کشـــت داده می‌شود. ســـایر عفونت‌های منتشر قارچی که با کشـــت ادرار تشـــخیص داده می‌شوند عبارت از کوکسیدیوئیدومیکوزیس و هیستوپلاسموزیس می‌باشند. نمونه ادرار ۲۴ ســـاعته فاقد ارزش تشخیصی می‌باشد، زیرا عناصر آلوده کننده و باکتری‌ها بـــه تعداد فراوان درون آن رشد می‌کنند.

❑ سایر مایعات بدن

مایعات استریل در ظروفی که حاوی مقدار کمی هپارین می‌باشـــند (با رقت ۱/۱۰۰۰) جمع آوری می‌شوند. هپارین از لخته شدن این مایعات جلوگیری می‌کند. نمونه به دست آمده سانتریفوژ و رسوب آن کشت داده می‌شود. درناژ مایع پریتوان در ظروف بدون هپارین انجام می‌گیرد.

❑ دستگاه تنفس تحتانی

نمونه خلط صبحگاهی در ظرف استریل جمع آوری و در فاصله ۲ ساعت از زمان جمع آوری نمونه مورد آزمایش قرار می‌گیرد. خلط جمع آوری شده ۲۴ ساعته برای بررسی‌های قارچ شناسی مناسب نمی‌باشد. اگر بیمار قادر به دفع خلط نباشـــد از روش شستشوی برونشـــی به منظور تهیه نمونه استفاده می‌کنند. توصیه می‌شود حداقل ۳ نمونه خلط برای آزمایش‌های میکروسکوپی و کشت گرفته شود.

شستشوی برونشی و نمونه برونکوآلوئولار لاواژ (BAL) روش‌های مناســـبی بـــرای نمونه گیری از دســـتگاه تنفس تحتانی هســـتند. بیوپســـی به روش برونکوســـکوپی برای تهیه نمونه مناســـب انجام می‌گیرد. نمونه ابتدا ســـانتریفوژ شده و ســـپس رسوب آن مورد آزمایش قرار می‌گیرد. خلط موکوئیدی را می‌توان پیش از بررســـی به وسیله تریپسین، پانکراتین ۰/۵ درصد و یا N- استیل L- سیستئین همگن نمود.

❑ چرک

تا حد امکان نباید از ســـواب برای جمع آوری ترشـــحات زخم و درناژ آن اســـتفاده کرد. نمونه گیری از عمق ضایعه صورت پذیرفته و محتویات آبسه‌های زیر جلدی و محتویات سینوسی با اســـتفاده از سرنگ استریل آســـپیره می‌شود. در صورت مشـــاهده دانه (گرانول) در بیماری مایســـتوما، جمع‌آوری دانه‌ها ضروری است.

❑ مغز استخوان

در بیماری‌هـــای قارچـــی از قبیل هیستوپلاســـموزیس، کریپتوکوکوزیس و پاراکوکسیدیوئیدومیکوزیس، نمونه مغز اســـتخوان راهنمای تشـــخیصی موثری است. حدود ۳ تا ۵ میلی لیتر مواد آسپیره در داخل ظروف استریل هپارینه (با رقت ۱۰۰۰/ ۱) جمع آوری می‌شود.

❑ نمونه بافتی

نمونه بافتی در سالین استریل جمع آوری می‌شود و نباید آن را در فرمالین قرار داد. تا حد امکان هم از مرکز ضایعات و هم از حاشیه آن نمونه برداری صورت می‌پذیرد، برداشت کامل ضایعات کوچک جلدی، زیر جلدی و یا مخاطی اغلب امکان پذیر است.

❑ نمونه گیری برای تست‌های سرولوژی

تست‌های ســـرولوژی در تشـــخیص قارچ‌های دو شکلی مفید واقع می‌شـــوند، به خصوص اگر چندین نمونه از بیمار اخذ شـــود. نمونه‌های خـــون، مایع مغزی نخاعـــی، ادرار و ســـایر مایعات بیولوژیک در ظروف شیشه‌ای و یا پلاستیکی بـــدون مواد ضد انعقاد جمع آوری می‌شـــوند. معمولاً ۵ الی ۱۰ میلی‌لیتر نمونه برای انجام تســـت‌های سرولوژی کفایت می‌کند.

❑ نمونه برداری برای ارزیابی سطوح دارویی ضد قارچی

غلظـــت داروهای ضد قارچی به دو منظـــور اندازه گیری می‌شود:

غلظت دارو در مایعات بدن به حد مطلوب رسیده باشد.

غلظت بالای دارو عوارض جانبی داشته و برای جلوگیری از آســـیب‌های احتمالی و غلظت دارویـــی مایعات بدن باید تحت کنترل قرار گیرد.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

برای این منظور نمونه خون و سایر مایعات بدن در ظروف شیشه‌ای و یا پلاستیکی بدون مواد ضد انعقاد و به حجم ۵ تا ۱۰ میلی لیتر جمع آوری می‌شود. نمونه گیری باید در زمان مناسب یعنی زمانی که حداکثر غلظت دارو انتظار می‌رود، انجام گیرد.

❑ انتقال نمونه

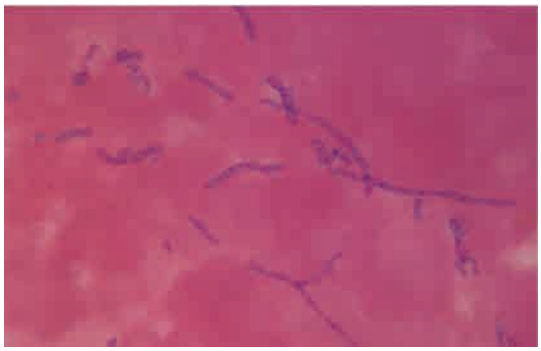
برخلاف نمونه‌های درماتوفیتی که اغلب برای چند هفته یا حتی چندین ماه قابل نگهداری هستند، سایر نمونه‌های قارچی باید هرچه سریع‌تر مورد بررسی قرار گیرند. تأخیر در انجام آزمایش می‌تواند منجر به از بین رفتن ارگانیسم‌های سخت رشد، تکثیر ارگانیسم‌های آلوده کننده و یا تکثیر ارگانیسم مورد آزمایش و تداخل در تخمین جمعیت اولیه ارگانیسم در نمونه شود.

در صورت ارسال پستی نمونه، آن را بسته بندی و مشخصات لازم بر اساس قوانین مربوط به انتقال نمونه‌های بیولوژیک اداره پست ثبت می‌شود و به آزمایشگاه ارسال می‌گردد. برای حمل نمونه‌های بالینی خطرناک بهتر است از جعبه‌های فلزی استفاده شود. پلیت پلاستیکی برای ارسال پستی نمونه مناسب نمی‌باشد. ظرف نمونه گیری و یا محیط کشت قبل از بسته بندی درون کیسه‌های پلاستیکی مهر و موم می‌شود تا از آلودگی احتمالی حین انتقال پیشگیری شود.

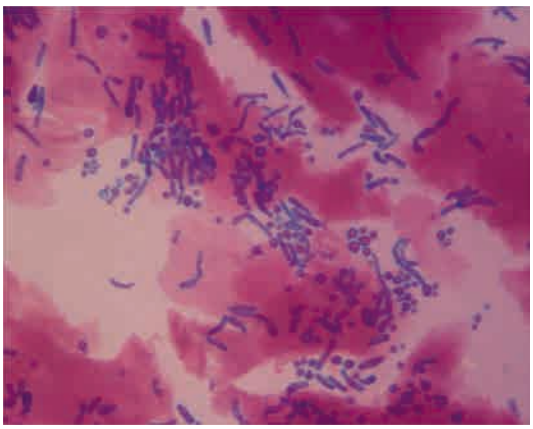
❑ آزمایش مستقیم میکروسکوپی

یکی از ساده‌ترین و مفیدترین روش‌های اولیه در تشخیص بیماری‌های قارچی است، بررسی میکروسکوپی با روش‌های مختلف رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ زمینه تاریک و میکروسکوپ فازکنتراست انجام می‌گیرد. ترکیباتی نظیر کالکوفلور سفید ابزار مناسبی برای شناسایی عناصر قارچی در نمونه‌های خلط، پوست و غیره با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس می‌باشند. بررسی میکروسکوپی در تشخیص بیماری‌های قارچی سطحی و زیرجلدی کاربرد وسیعی دارد. شناسایی عوامل قارچی در تراشه‌های پوست، مو و ناخن روش قابل اعتمادی در تأیید عفونت قارچی می‌باشد. بررسی مستقیم میکروسکوپی مایعات بدن و سایر نمونه‌های بافتی، تحت شرایط خاصی می‌تواند حضور عفونت‌های قارچی عمقی را به اثبات برساند. برای مثال حضور مخمرهای کپسول‌دار کریپتوکوکوس نئوفورمنس در مایع مغزی نخاعی و یا سلول‌های هیستوپلاسما کپسولاتوم درخون محیطی عفونت قارچی را تأیید می‌نماید.

بررسی مستقیم میکروسکوپی قادر است در تعیین پاتوژن بودن و یا آلودگی یک کشت مثبت قارچی کمک کننده باشد. همچنین می‌تواند آزمایشگاه را در انتخاب شرایط کشت مناسب و روش آزمایش کارآمد راهنمایی کند.



سلول‌های هایفی در درماتوفیتوز ناشی از تریکوفیتون روبروم (به سلول‌های اپیتلیال که کاملاً هضم شده‌اند توجه کنید)



مخمرهای خوشه‌ای و سودو هایفی های کوتاه و خمیده در بیماری پیتریازیس ورسیکالر

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

❑ هیستوپاتولوژی

آزمایش هیستوپاتولوژی مقاطع بافتی یکی از قابل اعتمادترین روش‌های تشخیص بیماری‌های زیرجلدی و عمقی موضعی محسوب می‌شود. تشخیص عفونت قارچی در مقاطع بافتی نه تنها به تعداد ارگانیسم موجود در بافت، بلکه به روش شناسایی این عناصر در مقاطع بافتی بستگی دارد. اکثر قارچ‌ها با رنگ آمیزی هماتوکسلین و ائوزین[6] به خوبی رنگ نمی‌گیرند. تعدادی از رنگ‌های اختصاصی از جمله رنگ گوموری متنامین نقره و پریودیک اسید شیف[7] برای شناسایی عناصر قارچی توصیه می‌شود. باید یادآوری کرد که روش‌های رنگ آمیزی اخیر در شناسایی غیراختصاصی عناصر قارچی در بافت به کار می‌روند، ولی به ندرت می‌توان جنس قارچ بیماریزا را با اتکاء به این روش‌ها تعیین نمود. برای مثال میسلیوم های شفاف و منشعب با دیواره‌های عرضی از مشخصه‌های عفونت آسپرژیلوسی می‌باشد، اما تعدادی از ارگانیسم‌های غیر متداول نظیر فوزاریوم و سدوسپوریوم نیز چنین ویژگی در بافت ایجاد می‌کنند.

مشاهده سلول‌های مخمری کوچک و جوانه دار در بافت به ندرت امکان تشخیص اختصاصی را فراهم می‌سازد. به عنوان مثال سلول‌های بافتی هیستوپلاسما کپسولاتوم و بلاستومیس درماتیتیدیس ممکن است با سلول‌های بدون کپسول کریپتوکوکوس نئوفورمنس مشابه بوده و گمراه کننده باشند. برای حل این مشکل از معرف‌های رنگی ایمونوفلورسنت و ایمونوپراکسیداز که به صورت منوکلونال و پلی کلونال برای تعدادی از قارچ‌ها طراحی شده‌اند، استفاده می‌شود. این روش‌ها می‌توانند در تشخیص همزمان چند بیماری کمک کننده باشند. هیبریداسیون DNA با استفاده از پروب های اختصاصی قارچی یکی دیگر از روش‌های جدید تشخیص در آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی است.

❑ کشت

جداسازی ارگانیسم در محیط کشت امکان شناسایی دقیق قارچ را مهیا می‌سازد. معمولاً قارچ‌ها از نظر نیازمندی‌های تغذیه‌ای سخت رشد نیستند و قادرند در محیط‌های مورد استفاده برای باکتری‌ها رشد کنند. البته سرعت رشد در این محیط‌ها آهسته بوده و اسپورزایی و تولید ساختارهای افتراقی قارچ به کندی صورت می‌گیرد، به همین دلیل اکثر آزمایشگاه‌ها از چندین نوع محیط کشت و شرایط انکوباسیون متنوع برای جداسازی عوامل قارچی استفاده می‌کنند. گلوکز پپتون آگار (سابورود دکستروز آگار) و مالت‌آگار از متداول‌ترین محیط‌های کشت قارچی به شمار می‌روند. البته ارگانیسم‌های سخت رشد نظیر فاز مخمری هیستوپلاسما کپسولاتوم در این محیط‌ها رشد نکرده و نیاز به محیط‌های غنی از قبیل محیط عصاره مغز و قلب دارد. با توجه به نوع نمونه و عناصر قارچی مورد انتظار، از محیط کشت مناسب استفاده می‌شود.

بسیاری از نمونه‌های بالینی آلودگی باکتریایی دارند و برای خالص سازی عوامل قارچی، آنتی بیوتیک های ضد باکتری به محیط کشت افزوده می‌شود. محیط‌های کشت حاوی کلرامفنیکل به طور تجاری در بازار موجود است. همچنین برای جلوگیری از رشد باکتری‌های مقاوم از جنتامایسین[8] و سایر آنتی بیوتیک ها به طور روز افزون استفاده می‌شود. اگر جداسازی درماتوفیت ها و یا قارچ‌های دو شکلی مد نظر باشد از سیکلوهگزامید (اکتیدیون) برای جلوگیری از رشد قارچ‌های کپکی سریع رشد استفاده می‌شود.

دمای مناسب برای رشد اکثر قارچ‌های پاتوژن حدود ۳۰ درجه سانتی گراد است. نمونه‌های مشکوک به عفونت سطحی در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری می‌شوند، زیرا اکثر درماتوفیت ها در دمای بالا قادر به رشد نیستند. نمونه‌های زیرجلدی در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می‌شوند. تعدادی از قارچ‌های مهم بیماریزا شامل هیستوپلاسما کپسولاتوم، بلاستومیس

6- Hematoxylin & Eosin
7 - Periodic acid- schiff
8- Gentamicin

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

درماتیتیدیس و اسپوروتریکس شـــنکی دو شکلی حرارتی هســـتند و از این موضوع در تشـــخیص افتراقی این قارچها استفاده می‌شود. این ارگانیسم‌ها در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه ســـانتی گراد و در محیط کشـــت گلوکز پپتن آگار به شکل کپکی رشـــد می‌کنند و در دماهـــای بالاتر و در محیط‌های کشت غنی از قبیل محیط عصاره مغز و قلب به فرم مخمری دیده می‌شوند.

برخی از قارچهای بیماریزا کند رشـــد هســـتند و باید به مدت ۲ تا ۴ هفته نگهداری و از نظر رشـــد میکروبی بررسی شـــوند. البته بسیاری از قارچهای شایع از قبیل آسپرژیلوس فومیگاتوس و کاندیدا آلبیکنس در مدت ۱ تا ۳ روز رشـــد می‌کنند. محیط‌های کشت در فواصل منظم (حداقل هفته‌ای ۳ مرتبه) از نظر رشد میکروبی بررسی می‌شوند و در صورت نیاز به محیط دیگری انتقال می‌یابند. به خصوص اگر کشت در محیط‌های خونی باشد که به دلیل عدم اسپورزایی برخی قارچها، انتقال آن به محیط‌های کشـــت محرک اسپورزایی ضروری است.

باید توجه داشت که رشد یک ارگانیسم در محیط کشت الزامـــاً دلیل بر بیماریزا بودن آن نیســـت. البته این موضوع در مورد پاتوژن های حقیقـــی از قبیل تریکوفیتون روبروم و یا هیستوپلاسماکپســـولاتوم صدق نمی‌کند. اگر یک قارچ فرصت طلب از قبیل آســـپرژیلوس فومیگاتوس و یا کاندیدا آلبیکنس از کشـــت جداسازی شـــود دلیل قطعی بر ارتباط بالینی آن نیست مگر آن که دلایل مضاعفی بر بیماری زایی این قارچها صحه گذارند، در چنین مواقعی نتیجه کشـــت با نتایج بررسی میکروسکوپی مقایسه می‌شود.

جدا سازی قارچهای فرصت طلب از نقاط استریل بدن از جملـــه خون و یا مایع مغزی نخاعی می‌تواند دلیل محکمی بر وجود عفونت باشد. ولی جدا سازی این قارچها از چرک، خلط، ادرار و نظایر آن به تنهایی دلیل بر عفونت نیســـت و باید مورد تفسیر قرار گیرد. همچنین باید بر تعداد قارچهای جداســـازی شـــده و مطالعات تکمیلی بر روی نمونه اهتمام ورزید.

بسیاری از قارچهای کپکی می‌توانند موجب بیماری‌های احشایی کشنده در افرادی شوند که سیستم ایمنی سرکوب شـــده‌ای داشته‌اند. هیچ ایزوله قارچی قبل از این که از نظر شـــرایط بالینی بیمار، محل جداســـازی، روش جمع آوری نمونه و تعداد ارگانیسم جداســـازی شده مورد ارزیابی قرار گیرند، نباید به عنوان آلودگی تلقی شود.

اگرچه کشت قارچ امکان تشخیص قطعی عفونت را فراهم می‌ســـازد، ولی محدودیت‌هایی بر آن وارد است. مهم‌ترین محدودیت عدم جداســـازی ارگانیســـم اســـت که به دلیل نمونه‌گیری نامناســـب و یا تأخیر در انتقال آن به آزمایشگاه رخ می‌دهد. همچنین پروســـه‌های نادرســـت جداسازی و ناکافی بودن دوره انکوباسیون از جمله عوامل عدم موفقیت در کشت به شمار می‌روند.

جداســـازی و شناسایی قارچهای کپکی و مخمری ممکن اســـت هفته‌ها به طول انجامد و تشخیص قطعی بیماری و درمان آن را به تأخیر اندازد. با این وجود، کشـــت قارچ برای تشخیص قطعی بیماری ضروری به نظر می‌رسد.

❑ سرولوژی

تســـت‌های سرولوژی تشخیص سریع بیماری‌های قارچی را امکان پذیر می‌ســـازند. اســـاس این تســـت‌ها شناسایی آنتی‌بـــادی اختصاصی ضد قارچ و یا آنتی ژن‌های قارچی در مایعات بدن می‌باشد.

به طورکلی نتایج تســـت‌های سرولوژی به ندرت در اثبات بیماری‌های قارچی کارآیی دارد. تفســـیر این تســـت‌ها باید به دقت و در کنار ســـایر یافته‌های آزمایشـــگاهی و بالینی انجام گیرد. تســـت‌های شناســـایی آنتی بادی در تشخیص بیماری‌های قارچی آندمیک از قبیل هیستوپلاســـموزیس و کوکسیدیوئیدومیکوزیس در افراد با سیستم ایمنی طبیعی کارآمد اســـت. در این بیماری‌ها از زمان تماس اولیه با قارچ تـــا زمان بـــروز علایم بالینی ۲ تا ۶ هفته طول می‌کشـــد و این مدت جهت القای پاسخ ایمنی هومورال کفایت می‌کند. زمانی که این تســـت با دو نمونه ســـرمی به فاصله دو هفته انجـــام گیرد از نظـــر ارزیابی تیتر آنتی بـــادی و افزایش یا کاهش آن ارزشمند است.

تست‌های ردیابی آنتی بادی در افراد سرکوب شده ایمنی چندان کارساز نیست. بسیاری از این بیماران قادر به القای پاســـخ ایمنی هومورال در حد مطلوب نیســـتند، در چنین شـــرایطی ردیابی آنتی ژن‌های قارچـــی می‌تواند مثمرثمر

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

باشـــد. چنین تست‌هایی برای تشخیص کریپتوکوکوزیس و هیستوپلاسموزیس طراحی شده است.

شناسایی آنتی ژن در مایعات بدن با محدودیت‌هایی همراه است: نخست این که مقدار آنتی ژن‌های آزاد در سرم اندک اســـت و برای شناسایی عامل بیماری به تست‌های حساسی نیاز داریم. دوم این که آنتی ژن‌ها به سرعت از مایعات بدن پاکســـازی می‌شوند و لازم است که نمونه گیری‌های متعدد صورت پذیرد. مســـئله سوم این اســـت که این آنتی ژن‌ها حتی در افراد سرکوب شده ایمنی اغلب به IgG در گردش متصل می‌شوند. بنابراین قبل از شناسایی آنتی ژن باید طی انجام مراحلی این کمپلکس‌ها تجزیه شوند.

روش‌های ســـرولوژی متعددی در این راستا طراحی شده اســـت. تســـت ایمونودیفیوژن (ID) روش اختصاصی و کم هزینه‌ای می‌باشـــد، اما این تست غیرحساس بوده و همین امـــر از ارزش غربالگـــری آن می‌کاهد. تســـت ثبوت مکمل (CF) حساسیت بیشتری دارد ولی انجام آن و تفسیر نتایج آزمایش مشکل‌تر اســـت، با این حال تست ثبوت مکمل به عنـــوان یکی از آزمایش‌های مهم تشـــخیصی برای تعدادی از بیماری‌هـــای قارچـــی از جملـــه هیستوپلاســـموزیس و کوکسیدیوئیدومایکوزیس به شمار می‌رود.

تســـت آگلوتیناســـیون ذرات لاتکس روشـــی ســـاده اما غیرحســـاس برای شناســـایی آنتی بادی و یا آنتی ژن است. این تســـت در شناسایی آنتی ژن کپســـولی کریپتوکوکوس نئوفورمنـــس که در بعضی بیماران به فراوانی آزاد می‌شـــود کاربرد وســـیعی دارد. امروزه تعدادی از روش‌های حساس از جمله رادیوایمونواسی و تست الیزا (ELISA) برای تشخیص تعدادی از بیماری‌های قارچی راه اندازی شده است.

❑ تشخیص مولکولی

اکثر تســـت‌های مولکولی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) طراحی شـــده‌اند و از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار هســـتند. نواحی ژنومی متعـــددی از جمله DNA ریبوزومی (rDNA) در این آزمایش‌ها مورد هدف قرار می‌گیرد. این قطعه ژنومی دارای نواحی نســـبتاً محافظت شده‌ای شامل نواحی 28_S، $8/5_S$، 18_S و نواحی متغیر بینابینی ITS می‌باشد.

بســـیاری از روش‌های مولکولی براســـاس فرآیند روتین PCR طراحـــی شـــده‌اند. در روش multiplex PCR با اســـتفاده از چندین پرایمر، بیـــش از یک توالی هدف در محلـــول واکنش تکثیر می‌یابـــد. در روش nested PCR ابتدا با استفاده از پرایمرهای عمومی قارچی آمپلیفیکاسیون صورت می‌گیرد و ســـپس با پرایمرهای اختصاصی گونه بر روی محصـــول PCR اول، واکنش دوم اجرا می‌شـــود. در روش Panfungal PCR تکثیر ژنوم با پرایمرهای عمومی قارچی انجام می‌شـــود، سپس محصول PCR با پروب های اختصاصی گونه هیبریده شده تا واکنش مثبت به دست آید.

از آخرین تحولات تشـــخیص مولکولی اســـتفاده از روش real-time PCR می‌باشد. در این روش، چرخه حرارتی PCR همراه با ردیابی فلورسانس محصولات PCR صورت می‌گیرد. این تکنیک امکان اندازه گیری کمی ژنوم قارچی موجـــود در نمونه‌های بالینی و در نتیجه امکان اندازه گیری تعداد میکروب موجود در نمونه را فراهم می‌سازد.

علیرغم پیشرفت‌های اخیر، به کارگیری یک روش سریع و کم هزینه برای شناسایی بیماری‌های قارچی حاد و پرخطر هنوز با مشکلاتی مواجه است. در حال حاضر استفاده روتین از این آزمایش‌ها استقبال چندانی ندارد.

❑ تفسیر نتایج آزمایشگاهی

نتایج آزمایشـــگاه می‌تواند قابل اعتماد و مفید باشد، ولی در پـــاره‌ای از موارد بی تأثیر و یا حتی گمراه کننده اســـت. تشـــخیص آزمایشـــگاهی به روش بررســـی میکروسکوپی، کشت و تست‌های ســـرولوژی انجام می‌گیرد. انتخاب روش آزمایشگاهی مناسب به نوع بیماری و همچنین به فاکتورهایی از قبیل محل ســـکونت و علایم بالینی بستگی دارد. همیشه باید توجه داشـــت که هر تست آزمایشگاهی محدودیت‌های مخصوص به خود را دارد و نتیجه نادرســـت در یک آزمایش ممکن است ما را از تشخیص مناسب قارچی باز دارد.

References

1-Clinical Mycology. E. J. Anaissie. 2009 CHURCHILL LIVINGSTONE

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]