

تشخیص آزمایشگاهی بیماری‌های قارچی

● دکتر محمد قهری

دکترای علوم آزمایشگاهی، Ph.D قارچ شناسی

استادیار دانشگاه امام حسین (ع)

ghahri14@gmail.com

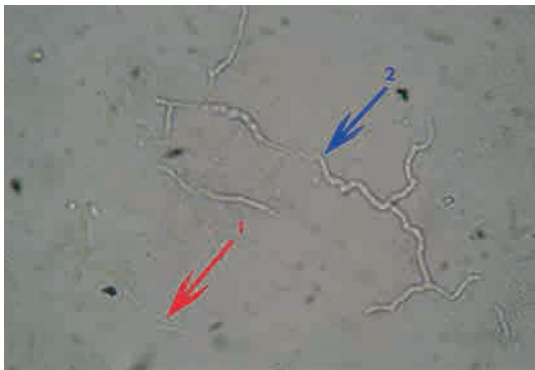


□ مقدمه

تشخیص بیماری‌های قارچی همانند سایر بیماری‌های میکروبی بر پایه مشاهدات بالینی و بررسی‌های آزمایشگاهی استوار است. شکل 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 عمقی، یافته‌های بالینی کمتر اختصاصی بوده و مشابه سایر بیماری‌های میکروبی است و این امر تشخیص علت بیماری و نیز درمان مناسب را با مشکل مواجه می‌کند. برای تشخیص و تمایز بیماری‌های قارچی از سایر عوامل بیماریز، 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 آزمایشگاهی 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 جایگاه عفونت و نیز علائم بالینی بیماری دارد و از عفونتی به عفونت دیگر متفاوت و متغیر است. نتایج آزمایشگاهی می‌تواند کاملاً واضح و قاطع باشد 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.

واژه‌های کلیدی: میکوز، قارچ شناسی، آزمایشگاه،

قارچ‌های پاتوژن، عفونت پوستی



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

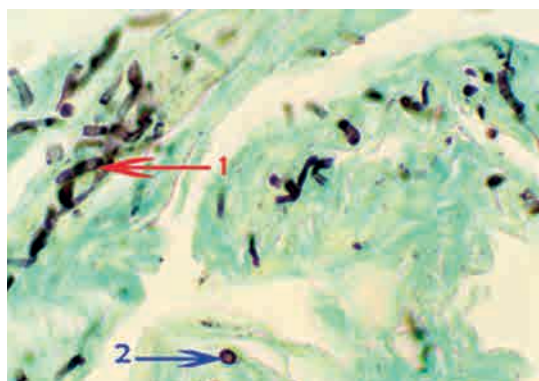
□ جمع آوری نمونه

جمع آوری، نگهداری و فرآوری نامناسب نمونه‌ها می‌تواند به تشخیص‌های نادرست منجر شود. بهتر است پزشک معالج نوع عفونت احتمالی را به آزمایشگاه گزارش کند و نیز اطلاعات زمینه‌ای کافی را در اختیار آزمایشگاه قرار دهد. علاوه بر مشخص کردن محل و زمان نمونه‌گیری، به دست 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 نوع عامل قارچی را تا حدودی پیش بینی و بر اساس آن

نمونه مورد آزمایش جمع آوری می‌کنند، موهای آلوده توسط پنس^۱ از ریشه چیده می‌شوند. برداشت سطحی موها ارزش چندانی ندارد زیرا عفونت معمولاً در نزدیکی سطح پوست و در مجاورت فولیکول‌های مو مستقر می‌گردد.

روش دیگر برای جمع آوری نمونه به خصوص در بیماری‌های نامحسوس و فاقد علائم بارز، برس زدن سطح پوست یا موها و انتقال آن به سطح محیط کشت آگار می‌باشد. برای استفاده مجدد، برس ابتدا باید با کلروهگزیدین^۲ ۱ درصد به مدت ۱ ساعت استریل شده و سپس با آب مقطر استریل آبکشی می‌شود.

برای جمع آوری نمونه ناخن از قسمت‌های تغییر رنگ یافته، تغییر شکل داده یا نواحی ترد و شکننده استفاده می‌شود. نمونه ناخن تا حد امکان از مرکز ضایعات و از نواحی عمقی‌تر جمع آوری می‌شود. 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 تراشیدن 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 سواب آغشته به آب مقطر استریل یا

مناسب‌ترین روش‌های آزمایشگاهی را به کار گیرد. به علاوه در صورتی که نمونه مورد آزمایش مربوط به فرد بیماری با شرایط خاص از قبیل هپاتیت و یا ایدز باشد، باید آگاهی قبلی به آزمایشگاه داده شود تا در کار با نمونه مراقبت لازم به عمل آید.

به استثنای نمونه‌های پوست، مو و ناخن سایر نمونه‌های قارچی در ظروف استریل جمع آوری شده و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل می‌شود. ظروف نمونه‌گیری باید به طور واضح برچسب خورده و مشخصات بیمار را به همراه داشته باشند.

□ نمونه‌های پوست، مو و ناخن

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

قبل از نمونه‌گیری از زخم‌های سطحی، ابتدا محل موضع با الکل ۷۰ درصد تمیز می‌شود. با این کار هم شانس تشخیص ارگانیزم قارچی در نمونه مستقیم میکروسکوپی افزایش می‌یابد و هم احتمال آلودگی محیط کشت توسط اجرام میکروبی آلوده کننده کم می‌شود.

در صورت استفاده از پودر، کرم و دارو در محل ضایعات لازم است قبل از نمونه‌گیری 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 نمونه‌گیری مناسب استفاده شود.

در عفونت موی سر استفاده از چراغ وود در انتخاب محل دقیق نمونه برداری و جمع آوری نمونه سودمند است. ایجاد فلورسانس یکی از خصوصیات بیماری‌های درماتوفیتی می‌باشد که توسط برخی گونه‌ها تولید می‌شود. در صورتی که فلورسانس دیده نشود موهای کدر و شکسته را به عنوان

- 1- Forceps
- 2- Chlorhexidine



روش لیز - سانتریفوژ^۴ می باشد که البته نسبت به روش های دیگر پرهزینه و پرحمت تر است.

امروزه با به کارگیری سیستم های کشت خون اتوماتیک و اصلاح ترکیبات محیط کشت خون، حساسیت کشت خون تا حدی با روش لیز-سانتریفوژ برابری می کند. با این وجود، روش لیز-سانتریفوژ در جداسازی کریپتوکوکوس نیوفورمنس، قارچ های دوشکلی و کپک ها نسبت به سایر روش ها ارجح تر است.

□ مایع مغزی نخاعی

حدود یک میلی لیتر مایع مغزی نخاعی در لوله استریل جمع آوری می شود. نمونه اخذ شده ابتدا سانتریفوژ و سپس مایع رویی آن جهت انجام تست های سرولوژی به کار می رود و قسمت رسوبی آن به محیط کشت انتقال می یابد. همچنین می توان 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 بررسی های قارچ شناسی مناسب است. آسپیراسیون بالای پوبیس^۵ در نوزادان بهترین روش جمع آوری نمونه ادرار می باشد. نمونه ادرار بلافاصله مورد بررسی میکروسکوپی و کشت قرار می گیرد. همچنین می توان در آن به جستجوی آنتی ژن های 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 می شود، ولی ارزش کلینیکی آن ها بستگی به شرایط و علائم بالینی دارد. هر تعداد کلنی در ادراری که به وسیله پونکسیون بالای پوبیس

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

□ گوش

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

□ چشم

نمونه برداری زخم قرنیه به روش تراشیدن و با استفاده از اسپاچولای^۶ پلاتینی استریل صورت می گیرد. 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 می گیرد. مشخصات مربوط به نمونه گیری بر روی پلیت ثبت شده و به آزمایشگاه انتقال می یابد. سواب برای نمونه برداری از زخم های قرنیه مناسب نیست.

در مبتلایان به آندوفتالمیت قارچی مایع زجاجیه جمع آوری می شود. نمونه اخذ شده که توسط مایع شستشوی چشم رقیق شده است قبل از بررسی های آزمایشگاهی سانتریفوژ می گردد.

□ خون

در موارد مشکوک به بیماری های قارچی عمقی، کشت خون انجام می گیرد. جداسازی موفق عوامل قارچی از کشت خون به فاکتورهایی از قبیل حجم نمونه اخذ شده، تعداد دفعات نمونه گیری و روش فرآوری نمونه ها وابسته است. مخمرهای کاندیدا آسانتر از قارچ های دو شکلی و کپک ها از کشت خون جدا سازی می شوند.

با استفاده از محیط های کشت دی فازیک و تهویه هوایی مناسب، احتمال جداسازی ارگانیس م های قارچی افزایش می یابد. حساس ترین و سریع ترین روش تشخیص فانگمی

3- Spatula

4- Lysis-centrifugation

5- Suprabubic

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

□ سایر مایعات بدن

مایعات استریل در ظروفی که حاوی مقدار کمی هپارین می‌باشند (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 نباشد از روش شستشوی برونشی به منظور تهیه نمونه استفاده می‌کنند. توصیه می‌شود حداقل ۳ نمونه خلط برای آزمایش‌های میکروسکوپی و کشت گرفته شود. شستشوی برونشی و نمونه برونکوالونولار لاواژ (BAL) روش‌های مناسبی برای نمونه‌گیری از دستگاه تنفس تحتانی هستند. بیوپسی به روش برونکوسکوپی برای تهیه نمونه مناسب انجام می‌گیرد. نمونه ابتدا سانتریفوژ شده و سپس رسوب آن مورد آزمایش قرار می‌گیرد. خلط موکوییدی را می‌توان پیش از بررسی به وسیله تریپسین، پانکراتین ۰/۵ درصد و یا N-استیل L-سیستین همگن نمود.

□ چرک

تا حد امکان نباید از سواب برای جمع آوری ترشحات زخم و درناژ آن استفاده کرد. نمونه‌گیری از عمق ضایعه

صورت پذیرفته و محتویات آبسه‌های زیر جلدی و محتویات سینوسی با استفاده از سرنگ استریل آسپیره می‌شود. در صورت مشاهده دانه (گرانول) در بیماری مایستوما، جمع‌آوری دانه‌ها ضروری است.

□ مغز استخوان

در بیماری‌های قارچی از قبیل هیستوپلاسموزیس، کریپتوکوکوزیس و پاراکوکسیدیوئیدومیکوزیس، نمونه مغز استخوان راهنمای تشخیصی موثری است. حدود ۳ تا ۵ میلی لیتر مواد آسپیره در داخل ظروف استریل هپارینه (با رقت ۱/۱۰۰۰) جمع آوری می‌شود.

□ نمونه بافتی

نمونه بافتی در سالیین 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.

□ نمونه‌گیری برای تست‌های سرولوژی

تست‌های سرولوژی در تشخیص قارچ‌های دو شکلی مفید واقع می‌شوند، به خصوص اگر چندین نمونه از بیمار اخذ شود. نمونه‌های خون، مایع مغزی نخاعی، ادرار و سایر مایعات بیولوژیک در ظروف شیشه‌ای و یا پلاستیکی بدون مواد ضد انعقاد جمع آوری می‌شوند. معمولاً ۵ الی ۱۰ میلی لیتر نمونه برای انجام تست‌های سرولوژی کفایت می‌کند.

□ نمونه برداری برای ارزیابی سطوح دارویی ضد

قارچی

غلظت داروهای ضد قارچی به دو منظور اندازه‌گیری می‌شود:

غلظت دارو در مایعات بدن به حد مطلوب رسیده باشد. غلظت بالای دارو عوارض جانبی داشته و برای جلوگیری از آسیب‌های احتمالی و غلظت دارویی مایعات بدن باید تحت کنترل قرار گیرد.

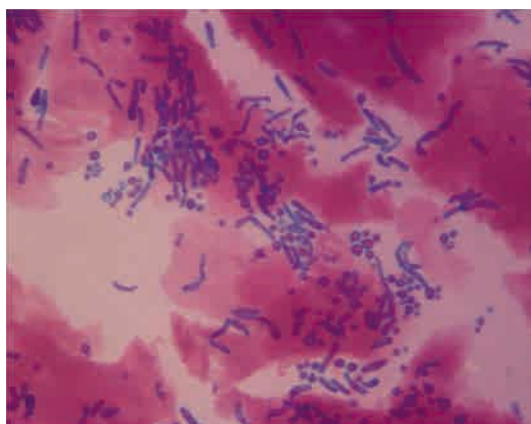


مایعات بدن و سایر نمونه‌های بافتی، تحت شرایط خاصی می‌تواند حضور عفونت‌های قارچی عمقی را به اثبات برساند. برای مثال حضور مخمرهای کپسول‌دار کریپتوکوکوس نئوفورمنس در مایع مغزی نخاعی و یا سلول‌های هیستوپلازما کپسولاتوم در خون محیطی عفونت قارچی را تأیید می‌نماید.

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 پیتربازیس وریسکالر

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 فاز کنتراست 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

□ 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 ارگانیزم موجود در بافت، بلکه به روش شناسایی این عناصر در مقاطع بافتی بستگی دارد. اکثر قارچ‌ها با رنگ آمیزی هماتوکسلین و ائوزین^۶ به خوبی رنگ نمی‌گیرند. تعدادی از رنگ‌های اختصاصی از جمله رنگ گوموری متنامین نقره و پرئودیک اسید شیف^۷ 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 میسلیموم‌های شفاف و منشعب با دیواره‌های عرضی از مشخصه‌های عفونت اسپریژیلوسی می‌باشد، اما تعدادی از ارگانیزم‌های 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 هیستوپلازما کپسولاتوم و بلاستومیس درماتیتیدیس ممکن است با سلول‌های بدون کپسول کریپتوکوکوس نئوفورمنس مشابه بوده و همراه 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 پروب‌های اختصاصی قارچی یکی دیگر از روش‌های جدید تشخیص در آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی است.

□ کشت

جداسازی ارگانیزم 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 پیتون آگار (سابورود دکستروز آگار) و مالت آگار از متداول‌ترین محیط‌های کشت قارچی به شمار می‌روند. البته ارگانیزم‌های سخت رشد نظیر فاز مخمری هیستوپلازما 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 خالص‌سازی عوامل قارچی، آنتی بیوتیک‌های 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^۸ و سایر آنتی بیوتیک‌ها به طور روز افزون استفاده می‌شود. اگر جداسازی درماتوفیت‌ها 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 درماتوفیت‌ها 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 هیستوپلازما کپسولاتوم، بلاستومیس

6- Hematoxylin & Eosin

7 - Periodic acid- schiff

8- Gentamicin



درماتیتیدیس و اسپوروتریکس شنکی دو شکلی حرارتی هستند و از این موضوع در تشخیص افتراقی این قارچ‌ها استفاده می‌شود. این ارگانیس‌ها در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در محیط کشت گلوکز پپتن آگار به شکل کپکی رشد می‌کنند و در دماهای بالاتر و در محیط‌های کشت غنی از قبیل محیط عصاره مغز و قلب به فرم مخمری دیده می‌شوند.

برخی از قارچ‌های بیماریزا کند رشد هستند و باید به مدت ۲ تا ۴ هفته نگهداری و از نظر رشد میکروبی بررسی شوند. البته بسیاری از قارچ‌های شایع از قبیل اسپریلوس فومیگاتوس و کاندیدا آلیکنس در مدت ۱ تا ۳ روز رشد 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 کشت محرک اسپورزایی ضروری است.

باید توجه داشت که رشد یک ارگانیس‌م در محیط کشت الزاماً دلیل بر بیماریزا بودن آن نیست. البته این موضوع در مورد پاتوژن‌های حقیقی از قبیل تریکوفیتون روبروم و یا هیستوپلاسماکپسولانوم صدق نمی‌کند. اگر یک قارچ فرصت طلب از قبیل اسپریلوس فومیگاتوس و یا کاندیدا آلیکنس از کشت جداسازی شود دلیل قطعی بر ارتباط بالینی آن نیست مگر آن که دلایل مضاعفی بر بیماری زایی این قارچ‌ها صحت‌گذارند، در چنین مواقعی نتیجه کشت با نتایج بررسی میکروسکوپی مقایسه می‌شود.

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

بسیاری از قارچ‌های کپکی می‌توانند موجب بیماری‌های احشایی‌کننده در افرادی شوند که سیستم ایمنی سرکوب شده‌ای داشته‌اند. هیچ ایزوله قارچی قبل از این که از نظر

شرایط بالینی بیمار، محل جداسازی، روش جمع‌آوری نمونه و تعداد ارگانیس‌م جداسازی شده مورد ارزیابی قرار گیرند، نباید به عنوان آلودگی تلقی شود.

اگرچه کشت قارچ امکان تشخیص قطعی عفونت را فراهم می‌سازد، ولی محدودیت‌هایی بر آن وارد است. مهم‌ترین محدودیت عدم جداسازی ارگانیس‌م است که به دلیل نمونه‌گیری نامناسب و یا تأخیر در انتقال آن به آزمایشگاه رخ می‌دهد. همچنین پروسه‌های نادرست جداسازی و ناکافی بودن دوره انکوباسیون از جمله عوامل عدم موفقیت در کشت به شمار می‌روند.

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

□ سرولوژی

تست‌های سرولوژی تشخیص سریع بیماری‌های قارچی را امکان‌پذیر می‌سازند. اساس این تست‌ها شناسایی آنتی‌بادی اختصاصی ضد قارچ و یا آنتی‌ژن‌های قارچی در مایعات بدن می‌باشد.

به طور کلی نتایج تست‌های سرولوژی به ندرت در اثبات بیماری‌های قارچی کارایی دارد. تفسیر این تست‌ها باید به دقت و در کنار سایر یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی انجام گیرد. تست‌های شناسایی آنتی‌بادی در تشخیص بیماری‌های قارچی آندمیک از قبیل هیستوپلاسمازموزیس و کوکسیدیوئیدومیکوزیس در افراد با سیستم ایمنی طبیعی کارآمد است. در این بیماری‌ها از زمان تماس اولیه با قارچ تا زمان بروز علائم بالینی ۲ تا ۶ هفته طول می‌کشد و این مدت جهت القای پاسخ ایمنی هومورال کفایت می‌کند. زمانی که این تست با دو نمونه سرمی به فاصله دو هفته انجام گیرد از نظر ارزیابی تیتراژ آنتی‌بادی و افزایش یا کاهش آن ارزشمند است.

تست‌های ردیابی آنتی‌بادی در افراد سرکوب شده ایمنی چندان کارساز نیست. بسیاری از این بیماران قادر به القای پاسخ ایمنی هومورال در حد مطلوب نیستند، در چنین شرایطی ردیابی آنتی‌ژن‌های قارچی می‌تواند مثرتر

باشد. چنین تست‌هایی برای تشخیص کریپتوکوکوزیس و هیستوپلاسمازموزیس طراحی شده است.

شناسایی آنتی ژن در مایعات بدن با محدودیت‌هایی همراه است: نخست این که مقدار آنتی ژن‌های آزاد در سرم اندک است و برای شناسایی عامل بیماری به تست‌های حساسی نیاز داریم. دوم این که آنتی ژن‌ها به سرعت از مایعات بدن پاکسازی می‌شوند و لازم است که نمونه گیری‌های متعدد صورت پذیرد. مسئله سوم این است 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 مراحل این کمپلکس‌ها تجزیه شوند.

روش‌های سرولوژی متعددی در این راستا طراحی شده است. تست ایمونودیفیوژن (ID) روش اختصاصی و کم هزینه‌ای می‌باشد، اما این تست غیرحساس بوده و همین امر از ارزش غربالگری آن می‌کاهد. تست ثبوت مکمل (CF) حساسیت بیشتری دارد ولی انجام آن و تفسیر نتایج آزمایش مشکل‌تر است، با این حال تست ثبوت مکمل به عنوان یکی از آزمایش‌های مهم تشخیصی برای تعدادی از بیماری‌های قارچی از جمله هیستوپلاسمازموزیس و کوکسیدیوئیدومایکوزیس به شمار می‌رود.

تست آگلوتیناسیون ذرات لاتکس روشی ساده اما غیرحساس برای شناسایی آنتی بادی و یا آنتی ژن است. این تست در شناسایی آنتی ژن کپسولی کریپتوکوکوس نئوفورمنس که در بعضی بیماران به فراوانی آزاد می‌شود کاربرد وسیعی 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 تست‌های مولکولی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) طراحی شده‌اند و از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار هستند. نواحی ژنومی متعددی از جمله DNA ریپوزومی (rDNA) در این آزمایش‌ها مورد هدف قرار می‌گیرد.

این قطعه ژنومی دارای نواحی نسبتاً محافظت شده‌ای شامل نواحی $28S$ ، $5.8S$ و $18S$ و نواحی متغیر بینابینی ITS می‌باشد.

بسیاری از روش‌های مولکولی براساس فرآیند روتین PCR طراحی شده‌اند. در روش multiplex PCR با استفاده از چندین پرایمر، بیش از یک توالی هدف در محلول واکنش تکثیر می‌یابد. در روش nested PCR ابتدا با استفاده از پرایمرهای عمومی قارچی آمپلیفیکاسیون صورت می‌گیرد و سپس با پرایمرهای اختصاصی گونه بر روی محصول PCR اول، واکنش دوم اجرا می‌شود. در روش Panfungal PCR تکثیر ژنوم با پرایمرهای عمومی قارچی انجام می‌شود، سپس محصول PCR با پروب‌های اختصاصی گونه هیبریده شده تا واکنش مثبت به دست آید. از آخرین تحولات تشخیص مولکولی استفاده 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 موجود 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 آزمایشگاه می‌تواند قابل اعتماد و مفید باشد، ولی در پاره‌ای از موارد بی تأثیر و یا حتی گمراه کننده است. تشخیص آزمایشگاهی به روش بررسی میکروسکوپی، کشت و تست‌های سرولوژی انجام می‌گیرد. انتخاب روش آزمایشگاهی مناسب به نوع بیماری و همچنین به فاکتورهایی از قبیل محل سکونت و علایم بالینی بستگی دارد. همیشه باید توجه داشت که هر تست آزمایشگاهی محدودیت‌های مخصوص به خود را دارد و نتیجه نادرست در یک آزمایش ممکن است ما را از تشخیص مناسب قارچی باز دارد.

References

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

