

مروری سریع بر اهمیت جداسازی و شناسائی قارچ ها در آزمایشگاه

جداسازی و شناسایی قارچ‌ها بخش مهمی از فعالیت های میکروبیولوژی پزشکی است که علی رغم تحولات قابل توجهی که امروزه در الگوی اپیدمیولوژیک این دسته از عوامل پاتوژن رخ داده است، اهمیت کار بر روی آنها در آزمایشگاهها اغلب نادیده گرفته می شود. در طی چند دهه گذشته بدنال تحولات شگرف پزشکی در روش های درمان و مراقبت از بیمار و بویژه بعد از رخداد پاندمی ایدز تغییرات و تحولاتی در حوزه قارچ شناسی پزشکی و قارچ شناسی کلینیکی نیز حاصل شد که شامل تغییر در طرح های اپیدمیولوژیک آنها، پیدایش جنس ها و گونه های جدید بیماریزا، مسئله مقاومت دارویی و پیدایش گونه های مقاوم به داروهای متعدد موجود، مشکلات تشخیص آزمایشگاهی گونه های جدید و چالش های بالینی مربوط به تشخیص عفونت در افراد دارای نقص ایمنی می باشد.

تا چند دهه قبل عفونت های سطحی و جلدی ناشی از تعداد محدودی از قارچ های درماتوفیت سلامت و بهداشت مردم را تحت تاثیر قرار می داد و اغلب عفونت های حاصله برای زمانی بیش از ۵۰ سال و حتی تا به امروز با یک داروی موثر بنام گریزوفولوین درمان می شدند، در آن زمان کلید واژه بیماری های قارچی را کلماتی مانند "کچلی، قارچ، و فاووس" تشکیل می داده است و واژه ها و مفاهیمی از قبیل "اندوکاردیت قارچی، آنوریسم قارچی، آبسه های قارچی، متاستاز قارچی، قارچ های تهاجمی و ... " واژه های نا آشنا و دور از ذهنی به نظر می آمدند. در قارچ شناسی پزشکی قارچ ها در سه دسته بنام های ساپروفیت های غیربیماریزا، ساپروفیت های فرصت طلب، و قارچ های بیماریزا های حقیقی طبقه بندی می شدند و معمولا قارچ های ساپروفیت تنها برای اهداف آموزش محض قارچ شناسی از نظر ریخت شناسی و آشنائی با ساختمانها و اسامی اجزای آنها مطالعه می شدند، از دهه ۱۹۸۰ به این طرف قارچها در دو طبقه تحت عناوین ساپروفیت های فرصت طلب و پاتوژن های اندمیک مطالعه می شوند. بیماری اندمیک پنی سیلیوز مارنفتی به لیست عفونت های اندمیک قبلی اضافه شده است. هیچ قارچ غیر بیماریزائی در جمعیت افراد مبتلا به نقص ایمنی وجود ندارد و تمامی قارچ ها پتانسیل ایجاد آسیب و عفونت در این گروه از بیماران را دارند. انواع مختلفی از داروهای ضد قارچی بر علیه عفونت های فرصت طلب طراحی و ساخته شده و با توجه به بروز مقاومت در برخی از ساپروفیت های فرصت طلب و نیز با ظهور قارچ های نوپدید نیاز به ساخت داروهای جدید ضد قارچی در حال حاضر نیازی بی پایان است، از طرف دیگر برخی از این داروها بر روی دستجات یا حتی جنس یا گونه های خاصی موثر هستند و این مسئله لزوم انجام آزمایش های تعیین حساسیت دارویی در قارچ های مقاوم را برمی انگیزد.

قارچ‌ها طیف وسیعی از بیماری‌های مختلف را ایجاد می‌کنند، از عفونت‌های پوستی سطحی با درماتوفیت‌ها در جمعیت عادی گرفته تا عفونت‌های مربوط به *کاندیدا* و *آسپرژیلوس* مهاجم در بیماران مبتلا به نقص ایمنی شدید که در محیط بیمارستان رخ می‌دهند. بسیاری از مهم‌ترین پاتوژن‌های قارچی، به ویژه گونه‌های *کاندیدا* و *آسپرژیلوس* در افراد دارای نقص ایمنی نیز می‌توانند بخشی از فلور طبیعی را تشکیل دهند که ممکن است منجر به مشکل در تفسیر نتایج کشت شود. علاوه بر این، طبقه بندی قارچ‌ها پیچیده است زیرا بر اساس بیولوژی مکانیسم‌های تولید مثل و مورفولوژی هیف‌ها است و با مسائل بالینی مرتبط نیست. گروه‌های سنی کودکان تفاوت‌های مهمی از نظر مسائل بیولوژیک میزبان، شرایط مستعد کننده، اپیدمیولوژی و تظاهرات عفونت‌های قارچی نسبت به جمعیت بزرگسال نشان می‌دهند. با وجود پیشرفت‌های مهم در قارچ‌شناسی پزشکی در دهه‌های اخیر و معرفی مجموعه‌ای از عوامل ضد قارچی جدید که وارد عرصه بالینی شده است، اما تایید نهایی آنها برای اطفال برای چندین مورد از این عوامل هنوز مشخص نشده است. عفونت‌های قارچی تهاجمی از علل مهم مرگ و میر در کودکان بیمار مبتلا به نقص ایمنی باقی مانده است و در دسترس قرار گرفتن گزینه‌های درمانی جایگزین یک پیشرفت مهم است. در عین حال، درمان ضد قارچی به طور فزاینده‌ای پیچیده شده است. علاوه بر اطلاعات در مورد درمان‌های ضد قارچی قبلی، داده‌های میکروبیولوژیک، بیماری‌های همزمان موجود و داروهای همراه، دانش دقیق از تجهیزات و امکانات ضد قارچی موجود و کارآزمایی‌های بالینی امروزی بیش از هر زمان دیگری در مدیریت هر بیمار مورد نیاز است.

عفونت‌های پوستی قارچی

اگر امروزه شیوع و بروز انواع خاصی از عفونت‌های درماتوفیتی در موی سر (مانند فاووس ناشی از *تریکوفیتون شوئن لاینی*) کاهش یافته باشد اما در شیوع و بروز سایر عفونت‌های درماتوفیتی پوست و ناخن نه تنها با روند کاهش مواجه نبوده بلکه شاهد بروز عفونت‌های جدید توسط درماتوفیت‌های غیر معمول نظیر *تریکوفیتون تونسورنس* می‌باشیم. هرچند که عفونت‌های درماتوفیتی در موی سر نیز بصورت اشکال غیر معمول، علاوه بر اشکال کلاسیک قبلی به فرم‌های مختلط اکتو-اندو و حتی گاهی همراه با اشکال فاووسی نیز مشاهده می‌شوند. انواع عفونت‌های قارچی ناخن بعلت گونه‌های مختلف قارچ‌های مخمری، ساپروفیتی و درماتوفیتی نیز در حال افزایش است و عامل قارچی مالاسزیا که در گذشته فقط بعنوان عامل بیماری سطحی پیتیریاژیس ورسیکالر مطرح بود، در بروز بیش از ۴ یا ۵ نوع مختلف از درماتیت‌های قارچی نقشی شناخته شده پیدا کرده است. تغییرات در سبک زندگی مردم (بعنوان مثال نگاه داشتن حیوانات خانگی، حضور در سالن‌های ورزشی، و دستکاری ناخن‌ها) در تغییر جنبه‌های اپیدمیولوژیک عفونت‌های قارچی پوستی دخالت دارند. مسئله ایجاد مقاومت دارویی در برخی از استرین‌های درماتوفیتی و یا مالاسزیائی مشکل درمانی جدیدی را در بیماران مبتلا پدید آورده است و از طرفی نیاز به تشخیص دقیق عامل قارچی در سطح گونه و تست‌های تعیین حساسیت دارویی برای آنها نیز از چالش‌های مهم برای درماتولوژیست‌ها و میکروبیولوژیست‌ها می‌باشد.

عفونت های سیستمیک قارچی

عفونت های قارچی سیستمیک معمولا دارای علائم و نشانه های اختصاصی نیستند. سلول ها و بافت های مبتلا در میزبان در اثر ترشح آنزیم ها یا سموم قارچ ها و نیز بدلیل رشد و تهاجم سلول های قارچی دچار آسیب می شوند. برخی از قارچ ها به عروق خونی (شریان ها) تهاجم می کنند و موجب ایجاد ترومبوز در عروق، و انفارکتوس و نکروز در بافت می شوند. تشخیص صحیح و به هنگام و درمان مناسب در زمان مناسب در کنترل عفونت های قارچی سیستمیک نقشی اساسی دارد، علاوه بر این هوشیاری و شک بالینی پزشکان و پرستاران در بیماران دارای زمینه های بالینی نیز از اهمیت بسیاری در مراقبت از سلامت بیماران در معرض خطر بالا برخوردار است. تشخیص دیرهنگام و یا تاخیر در درمان های مناسب موجب عوارض جدی از قبیل از دست دادن عضو و یا بدشکلی اندام ها و یا مرگ بیمار می شود.

جمعیت بیماران مبتلا به نقص ایمنی

بطور کلی افرادی که سیستم ایمنی آنها به دلایل مختلف ارثی یا اکتسابی دچار نقص یا آسیب شده است از جمله افراد مبتلا به دیابت، انواع سرطانها و لوسمی ها، بیماران دریافت کننده پیوند بافت و مغز استخوان، بیماران دچار سوختگی های وسیع، بیماران تحت درمان با کورتیکوستروئیدها و آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، بیماران تحت درمان با داروهای سیتوتوکسیک، و نوتروپنی طولانی مدت در گروه پر خطر برای عفونت های سیستمیک قارچی قرار می گیرند. بیماری های مزمن و ضعیف کننده ی اندامهای داخلی (بعنوان مثال سارکوئیدوز، توبرکلوز، نارسائی کلیوی و ...) نیز جزو گروههای در معرض خطر می باشند. همچنین عوامل یاتروژنیک در اثر مداخلات پزشکی و جراحی با هدفهای تشخیصی و درمانی، زمینه و راه ورود قارچ های فرصت طلب بیماریزا به بدن را فراهم می کنند. جراحی های حفره شکمی، جراحی قلب باز، سوء تغذیه و فقر بهداشت و موقعیت های اقتصادی-اجتماعی و استرس نیز زمینه های مستعد کننده برای اکتساب عفونت های قارچی محسوب می شوند. برخی حالات و بیماری ها بعنوان فاکتور خطر اختصاصی برای اکتساب عفونت های قارچی خاص عمل می کنند بعنوان مثال در وضعیت کتواسیدوز دیابتی امکان ابتلاء به موکورمایکوزیس رینوسربرال بسیار بالاست در حالی که در بدخیمی های خونی و در بیماران دریافت کننده ی پیوند امکان ابتلاء به موکورمایکوز ریوی بیشتر وجود دارد.

روش های تشخیص آزمایشگاهی

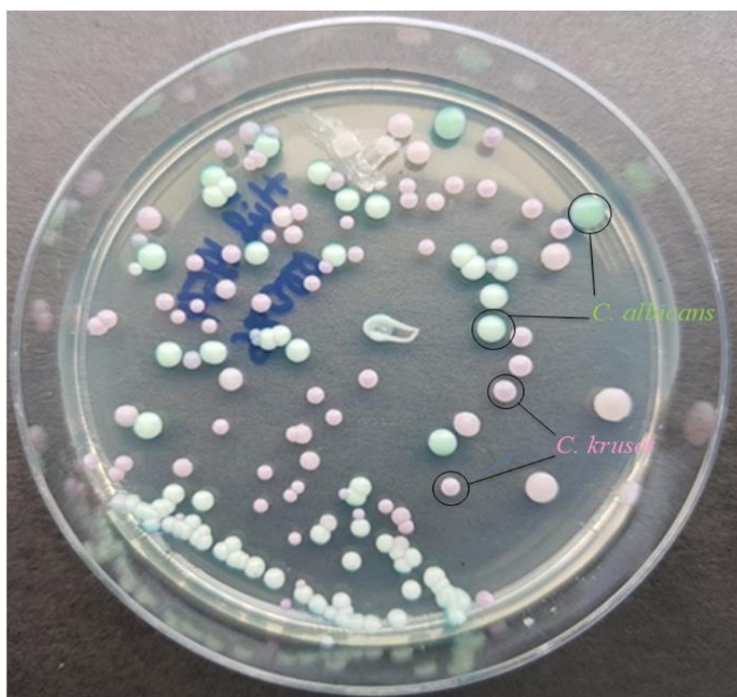
در میان روش های آزمایشگاهی آزمایش های مستقیم میکروسکوپی، کشت و هیستوپاتولوژی بسیار کمک کننده هستند، و در مواردی نیز از روش های ایمونولوژیک و بیوشیمیک و یا ملکولار بیولوژی کمک گرفته می شود. در واقع بدون کمک آزمایشگاه، تشخیص عفونت های قارچی جز بر پایه حدس و گمان صورت نمی گیرد و تشخیص قطعی عفونت ها تنها به کمک روش های آزمایشگاهی میسر است، از طرف دیگر با توجه به اینکه گونه های مختلف قارچ ها در برابر عوامل دارویی ضدقارچی الگوی رفتاری متفاوتی دارند بدون تعیین هویت قارچ در سطح گونه، اقدامات درمانی بصورت کامل و صحیح نمی تواند صورت گیرد و بنابر این روش های آزمایشگاهی بصورت راهنمای درمان کمک موثری به پزشک معالج می نمایند، همچنین برای تعیین حساسیت یا مقاومت عوامل قارچی نسبت به داروهای تجویز شده، اقدامات آزمایشگاهی کمک کننده است. تأیید بهبودی کامل بیمار و برطرف شدن عفونت نیز با کمک آزمایشگاه انجام می شود. بطور کلی آزمایشگاه در زمینه ی تشخیص قطعی عامل عفونت، کمک به انتخاب داروی مناسب و موثر، و تعیین حساسیت یا مقاومت عامل قارچی نسبت به داروی انتخابی، و نیز پایش بهبودی بیمار خدمات خود را ارائه می دهد.

قارچ های بیماریزای نوپدید

هر روز بر تعداد و تنوع گونه های قارچی فرصت طلب بیماریزا که گروههای جمعیتی در معرض خطر را تحت تاثیر قرار می دهند نیز اضافه می شود که این مسئله به تنهایی چالش های جدی و قابل توجهی را در زمینه تشخیص آزمایشگاهی و تعیین هویت قارچ در سطح جنس و گونه برای میکروبیولوژیست ها، مایکولوژیست ها و کلینیسین ها پدید آورده و چالش کلینیکی مهمی در انتخاب داروی مناسب برای درمان عفونت های حاصل از آن ها را برای پزشکان فراهم کرده است. تشخیص به هنگام و درمان مناسب این دسته از عفونت های سیستمیک از چالش های مهم طب آزمایشگاهی و بالینی است. برای تشخیص اینگونه عفونت ها آزمایشات مختلفی بر اساس تجسس مواد آنتی ژنی اختصاصی و یا نشانگرهای ملکولی که اختصاص به جنس ها یا گونه ها دارد طراحی و بکار گرفته شده است. بسیاری از این روش های جدید مورد تأیید مراجع مربوطه قرار گرفته و برخی از آنها همچنان مراحل تجربی خود را سپری می نمایند. هرچند که آزمایش هیستوپاتولوژی و کشت، همچنان بعنوان استاندارد طلایی مطرح هستند اما در موارد بسیاری با توجه به محدودیت های مربوط به نمونه گیری و بیوپسی از بیمار بدحال، لازم است از آزمایش های غیرمستقیم نظیر تستهای بیوشیمیائی، ایمونولوژیک، و یا ملکولی استفاده گردد که هر یک از این ها نیز محدودیت های خاص خود را داشته و در ارزیابی وضعیت بیمار دارای نقاط ضعف و قوت خاصی می باشند. از جمله این آزمایش ها و روشهای جدید، آزمایش گالاکتومانان و بتا دی گلوکان، تکثیر و تقویت اسیدهای نوکلئیک و تعیین توالی ژنهای خاص، سنجش جریان جانبی **Lateral Flow Assay (LFA)** و آزمایش های مشابه است.

کاندیدا

کاندیداها پاتوژن ها و ساپروفیت های حیوانات و انسان هستند. آنها به عنوان بخشی از فلور طبیعی دهان، دستگاه گوارش و دستگاه تناسلی ادراری و پوست یافت می شوند. آنها همچنین به طور گسترده در محیط پخش می شوند و در بسیاری از گیاهان یافت می شوند. بیشتر عفونت های انسانی توسط *کاندیدا آلبیکنس* ایجاد می شود، اما گونه های دیگر، از جمله *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا گلابراتا*، و *کاندیدا کروزی* می توانند در نمونه های بالینی وجود داشته باشند و باعث بیماری شوند. از بین اینها *کاندیدا کروزی* و *کاندیدا گلابراتا* اولی بصورت ذاتی و دومی بصورت اکتسابی نسبت به تری آزول ها مقاومت نشان می دهند هرچند که گونه هایی از *کاندیدا آلبیکنس* نیز چنین رفتاری را نشان داده اند. گونه ی نوپدیدی بنام *کاندیدا اوریس* نسبت به اکثر داروهای ضد قارچی موجود مقاومت نشان می دهد و گسترش عفونت های ناشی از آن یک مشکل بهداشت جهانی است. عفونت های ناشی از این گونه از طریق تماس با افراد بیمار و نیز سطوح و تجهیزات آلوده بیمارستانی صورت می گیرد.



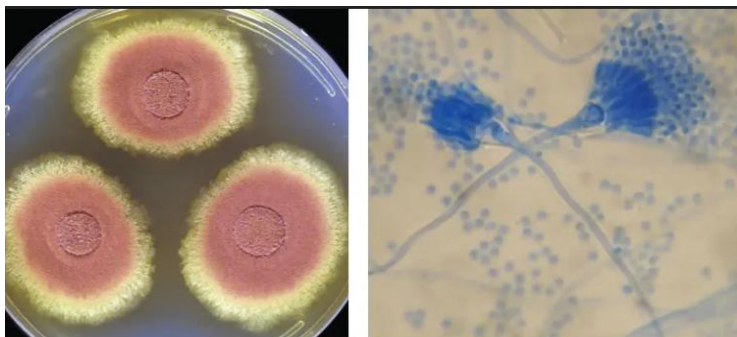
Candida albicans and Candida krusei on CHROMagar Candida



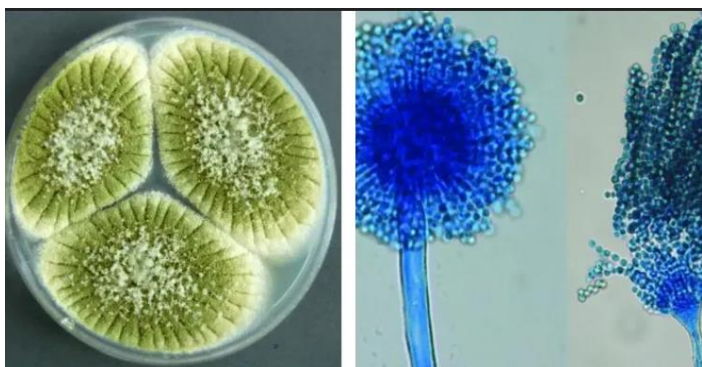
Candida albicans (green), *Candida krusei* (dull pink and flat colonies), *Candida glabrata* (pink and shiny) , *Candida tropicalis* (blue) and *Candida parapsilosis* (creamy) on CHROMagar Candida

آسپرژیلوس

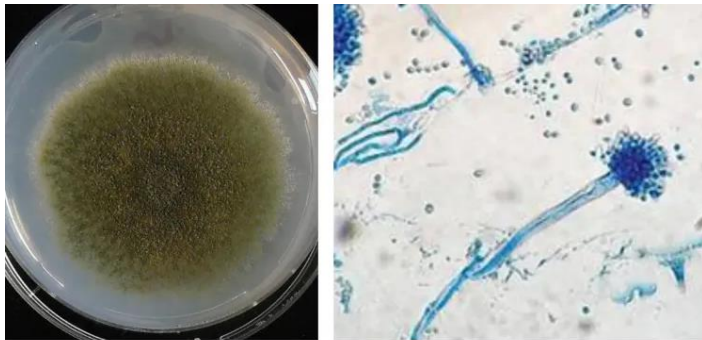
از بین انواع قارچهای کپکی، آسپرژیلوس شایع ترین ارگانیسم ایجاد کننده عفونتهای قارچی مهاجم است. چند صد گونه آسپرژیلوس وجود دارد. اما تنها چهار مورد به طور منظم با عفونت های انسان مرتبط هستند که شامل آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نیجر، و آسپرژیلوس ترئوس می باشند. آسپرژیلوزیس مهاجم ترین بیماری ناشی از آسپرژیلوس از جنبه های ابتلا و مرگ و میر می باشد. میزان شیوع این بیماری بدلیل افزایش افراد در معرض خطر نظیر بیماران دریافت کننده کورتیکواستروئید به مدت طولانی، افزایش جمعیت دریافت کنندگان پیوند و اخیرا بیماران مبتلا به COVID 19 و آنفلونزا در حال ازدیاد می باشد. تشخیص فوری و قابل اعتماد بیماری فاکتور مهمی برای شروع سریع درمان مناسب ضد قارچی می باشد. یکی از چالشهای اصلی در آسپرژیلوزیس مهاجم نحوه دست یابی به تشخیص فوری می باشد. روش های تشخیص مرسوم نظیر هیستوپاتولوژی و کشت بر روی نمونه های به دست آمده از نواحی استریل معمولا برای تشخیص قطعی آسپرژیلوزیس مهاجم کافی است؛ ولی در بسیاری از موارد بدلیل نیاز به انجام روش های تهاجمی برای جمع آوری نمونه ها امکان پذیر نمی باشد. بنابراین اتکا به روش های سنتی، تشخیص زودهنگام عفونت را با مشکل مواجه می کند. علاوه بر این، دست یابی به نتیجه کشت زمانی طولانی را نیاز دارد و اغلب فقط در مراحل انتهایی بیماری مثبت می شوند. روش های غیر وابسته به کشت شامل تشخیص سرمی و رویکرد مولکولی امیدوار کننده به نظر می رسد و البته منابع زیادی برای خطا وجود دارد که بر حساسیت، ویژگی و کیفیت روش های غیر وابسته به کشت تأثیر می گذارد.



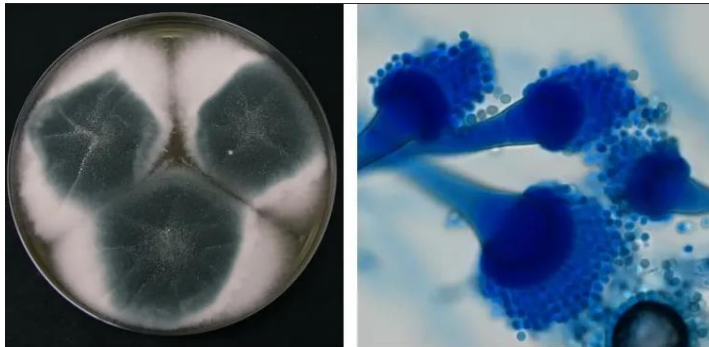
Aspergillus terreus



Aspergillus flavus



Aspergillus nidulans

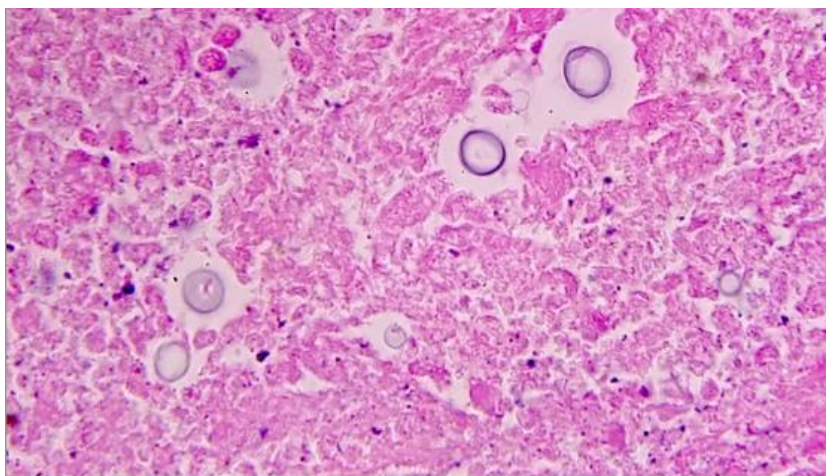


Aspergillus fumigatus

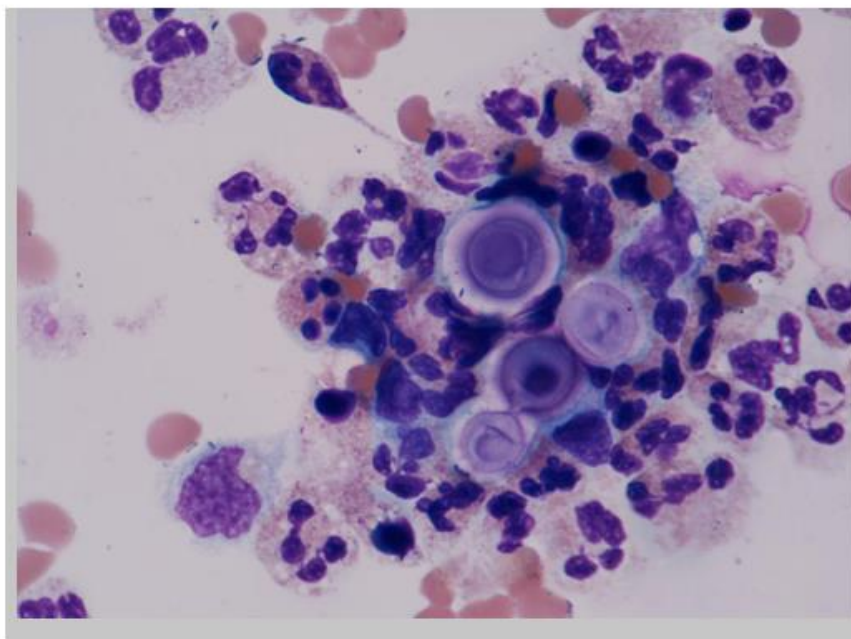
کریپتوکوکوس

انتشار مننژیت کریپتوکوکوسی به عنوان یک بیماری معرف ایدز، در کشورهای کمتر توسعه یافته همچنان بالا است. تخمین جهانی بروز سالانه مننژیت کریپتوکوکی را بیش از ۲۰۰ هزار مورد نشان می دهد که عمدتاً بیماران مبتلا به HIV/AIDS را گرفتار می کند. با رنگ آمیزی مرکب چین می توان مخمر کپسول دار را مشاهده کرد، اما حساسیت این روش کمتر از ۸۶ درصد است. کشت ، استاندارد طلایی برای تشخیص مننژیت کریپتوکوکی است اما دارای چندین اشکال، از جمله نیاز به امکانات آزمایشگاهی و بروز نتایج منفی کاذب به دلیل بار قارچی کم در نمونه است. آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس (LA) برای تشخیص آنتی ژن های کریپتوکوک (CrAg) در سرم و مایع نخاعی، برخی از موارد مثبت کاذب را نشان داده است. آنتی بادی فلورسنت غیرمستقیم نسبت به LA حساس است. آنزیم ایمونواسی (EIA) حساس ترین و اختصاصی ترین روش برای تشخیص آنتی ژن کریپتوکوک در نظر گرفته شده است، اما به تجهیزات و پرسنل آموزش دیده نیاز دارد. سنجش جریان جانبی (LFA) آنتی ژن کریپتوکوک یک روش ایمونوکروماتوگرافیک

برای تشخیص کیفی و نیمه کمی CrAg در نمونه مایع مغزی نخاعی، سرم یا پلاسما است که با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال کونژوگه ضد کریپتوکوک، کمپلکس های کریپتوکوکوس نتوفرمنس و کریپتوکوکوس گتی آی را به سرعت تشخیص می دهد. CrAg LFA حساسیت برابر یا بالاتری نسبت به آزمایش های ایمونواسی آنزیمی (EIA) و آگلوتیناسیون لاتکس (LA) را نشان داده است. بحث و نتیجه گیری موارد مننژیت کریپتوکوکی بدون علامت، سنجش CrAg LFA به غربالگری سرم یک یا دو ماه قبل از پیشرفت به سیستم عصبی مرکزی کمک می کند. امیدوارکننده ترین نقطه مراقبت برای غربالگری سرم بیماران HIV با $CD4 < 100$ با حساسیت 100% و ویژگی 99.8% است. CrAg LFA مقاوم در برابر حرارت، مقرون به صرفه است و برای استفاده بهینه، به ویژه در شرایط بودجه محدود، به آموزش بسیار کمی نیاز دارد.



Encapsulated variably sized yeasts (*Cryptococcus neoformans*) with thin walls noted on H&E stain.



Identifying variably sized encapsulated yeasts with narrow based budding morphologically consistent with *Cryptococcus* species.

موکورال ها

موکورمایکوزیس عفونت قارچی فوق حاد و تشخیص آن بسیار چالش برانگیز است. تشخیص سریع و اقدام به درمان زود هنگام قبل از درگیری نسوج نه تنها موجب نجات جان بیمار می شود بلکه نیاز به برداشتن توسط جراحی را نیز برطرف می کند. قارچ های موکورال عوامل ایجاد کننده این بیماری بوده و جنس *راینروپوس* به عنوان شایع ترین عامل بیماری در مکان های مختلف از جمله بیمارستان به فراوانی وجود دارند. بنابر این علت ابتلا به بیماری ورود قارچ از طریق مجاری بدن نیست بلکه زمینه های مساعد کننده ابتلا به بیماری را ممکن می سازند. به نظر می رسد با توجه به شیوع عوامل و بیماری های زمینه ساز، بروز این بیماری در حال افزایش باشد. بدخیمی های خونی شایع ترین بیماری زمینه ای در کشورهای توسعه یافته و دیابت کنترل نشده شایع ترین عامل زمینه ای در کشورهای در حال توسعه است.

علیرغم تلاش برای تشخیص زودهنگام و درمان موکورمایکوزیس تهاجمی، میزان مرگ و میر این بیماری همچنان بالا است. تشخیص بالینی از حساسیت و ویژگی کافی برخوردار نیست. هرچند تصاویر ندول های متعدد و پلورال افیوژن در تصاویر رادیوگرافی با موکورمایکوز ریوی همراه است و یا علامت هاله معکوس در سی تی اسکن می تواند نشان دهنده وجود موکورمایکوزیس باشد، ولی هیچکدام از این روش های تشخیصی قطعی نیستند. روش های آزمایش مستقیم و کشت، به عنوان روش های قابل اجرا با امکانات محدود از ویژگی های خاصی برخوردار هستند هرچند که از آزمایش های هیستوپاتولوژی نیز بعنوان تأیید نهائی می توان بهره مند شد. سنجش مولکولی نیز می تواند برای تشخیص یا شناسایی دقیق گونه قارچ های زیگومیست مورد استفاده قرار گیرد و آنها را می توان به عنوان ابزار کمکی ارزشمندی که مکمل روش های تشخیصی مرسوم هستند توصیه کرد.

دکتر محمد قهری