فهرست

مقدمه مؤلفین ۹

بخش یکم: روش‌های تشخیص بیماری‌های قارچی

فصل ۱ مروری بر روش‌های تشخیصی ۱۳

آزمایش مستقیم نمونه‌های کلینیکی ۱۳

تشخیص بر مبنای کشت ۱٤

روش‌های تشخیص بعد از کشت ۱٦

روش تشخیص قارچ‌ها بر پایه‌ی آنتی‌بادی و آنتی‌ژن ۱۹

روش‌های موجود بر پایه‌ی زیست- مولکولی ۲۵

نمونه‌برداری ۳۰

آزمایش مستقیم ۳۹

مراحل کشت، روش‌های جدا کردن و بررسی خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ‌ها ۳۹

امتحان مستقیم لوله آزمایش و گواتر دو پطری ٤۱

آزمایش قطعات خردشده از کشت ٤۱

روش کشت روی لام ٤۲

محلول‌های شفاف کننده ٤۷

فرمول و روش‌های رنگ‌آمیزی ٤۸

محیط‌های کشت ٦۲

نیازهای پیش رو ۷۱

بخش دوم: انواع قارچ‌ها

فصل ۲ بیماری‌های قارچی سطحی ۷۵

کلادوسپوریوم ورنکئی ۷۵

مالاسزیا فورفور ۷۶
پیدرا هورتئی ۷۷
تریکوسپورون کوتانئوم ۷۸
فصل ۳ بیماری‌های قارچی جلدی ۸۱
میکروسپوروم آمازونیکوم ۸۱
میکروسپورم ادوئینی ۸۲
میکروسپوروم کنیس ۸۴
میکروسپوروم کوکی‌آی ۸۵
میکروسپوروم دیستورتوم ۸۶
میکروسپوروم فروژینئوم ۸۸
میکروسپوروم گالینه ۸۹
میکروسپوروم جیپسئوم ۹۱
میکروسپوروم نانوم ۹۲
میکروسپوروم رسموزوم ۹۳
میکروسپوروم وانبروزگمئی ۹۴
تریکوفیتون آیلوئی ۹۶
تریکوفیتون منتاگروفایتیس ۹۷
تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته اریناکئی ۹۹
تریکوفیتون منتاگروفایتیس واریته کوئینکئانوم ۱۰۱
تریکوفیتون روبروم ۱۰۲
تریکوفیتون شوئن‌لاینی ۱۰۶
تریکوفیتون سودانس ۱۰۷
تریکوفیتون تونسورانس ۱۰۹
تریکوفیتون وروکوزوم ۱۱۱

تریکوفیتون ویولاسئوم ۱۱۲
اپیدرموفایتون فلوکوزوم ۱۱۳
فصل ٤ بیماری‌های قارچی زیرجلدی ۱۱۵
لوبومایکوزیس ۱۱۵
کروموماپکوزیس ۱۱٦
فیالوفورا وروکوزا ۱۱٦
کلادوسپوریوم کاریونی ۱۱۸
اسپوروتریکس شنکئی ۱۱۸
مادورلا مایستوما ۱۲۱
مادورلا گریزهآ ۱۲۳
فیالوفورا جینسلمئی ۱۲۵
فصل ۵ بیماری‌های قارچی احشایی ۱۲۹
کوکسیدیوئیدس ایمیتیس ۱۲۹
هیستوپلاسما کپسولاتوم ۱۳۲
هیستوپلاسما دوبیوسی ۱۳٤
نوع بیماری: بلاستومایکوزیس ۱۳٦
پاراکوکسیدیوئیدس برزیلیانسیس ۱۳۸
فصل ٦ عفونت‌های قارچی ساپروفیت و فرصت‌طلب ۱٤۱
کاندیدا آلبیکنس ۱٤۲
کریپتوکوکوس نئوفرمنس ۱٤٤
موکور پوسیلوس ۱٤٦
آبسیدیا کوریم بیفرا ۱٤۸
باسیدیوبولوس هاپتوسپوروس ۱٤۹
کونیدیوبولوس کورونا توس ۱۵۱

آسپرژیلوس فلاووس ۱۵۵
استرپتومایسس سومالینسیس ۱۵۷
نوکاردیا برزیلیانسیس ۱۵۸
نوکاردیا کاویا ۱۶۰
پنی سیلیوم ۱۶۱
موکور ۱۶۲
رایزوپوس ۱۶۳
اسکوپولاریوپسیس ۱۶۴
کلادوسپوریوم ۱۶۵
آلترناریا ۱۶۶
هلمنتوسپوریوم ۱۶۶
فوزاریوم ۱۶۷
آکرمونیوم ۱۶۹
استرپتومایسس ۱۷۰
پسیلومایسس ۱۷۰
مونیلیاسیتوفیلا ۱۷۱
سنسفالستروم ۱۷۳
استمفیلیوم ۱۷۳
کرایزوسپوریوم ۱۷۴
اکتینومایسس اسرائیلی ۱۷۴
نوکاردیا استروئیدس ۱۷۷
فصل ۷ بیماری‌های قارچی نادر ۱۸۰
رینوسپوریدیوم سیبری ۱۸۰
رودوتورولا ۱۸۱

ترایکوسپورون ۱۸۲
ژئوتریکوم کاندیدوم ۱۸۳
فصل ۸ تکنیک‌های مولکولی و سرولوژی جهت تشخیص بیماری‌های قارچی ۱۸۶
روش‌های سریع برای استخراج و نگهداری DNA ژنوم قارچی ۱۸۶
تشخیص میکروسکوپی مخمرها با استفاده‌از تکنیک FISH ۱۹۳
تشخیص کمّی گونه‌های آسپرژیلوس به کمک Real- Time NASBA ۲۰۲
شناسایی گونه‌های در مقاطع بافتی FFPE توسط هیبریدیزاسیون درجا ۲۱۱
استفاده‌از Multiplex- Tandem PCR برای تشخیص‌های قارچی ۲۱۶
تشخیص اختصاصی پنوموسیستیس جیرووکی در نمونه‌های کلینیکی ۲۲۲
با استفاده از فلوسایتومتری ۲۲۲
سرولوژی در عفونت‌های قارچی ۲۲۹
ضمیمه ۲۳۴
منابع ۲۳۸
واژه‌نامه انگلیسی به فارسی ۲۴۴
نمایه ۲۴۸

مقدمه مؤلفین

درطی سال‌های اخیر الگوی عفونت‌های قارچی در انسان به‌طور بی‌سابقه‌ای تغییر یافته است و به دلیل افزایش بیماران با نقص سیستم‌ایمنی، بیماری‌های قارچی و بخصوص قارچ‌های فرصت‌طلب بیش از پیش اهمیت یافته‌اند. برای شناسایی قارچ‌ها علاوه بر روش‌های باکتریولوژی، ایمنولوژی و مولکولی، استفاده از روش‌های قارچ‌شناسی که ساده و عملی‌تر می‌باشد و در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی امکان‌پذیر باشد ضروری بوده، و جدا کردن قارچ از نمونه‌های آلوده و مطالعه‌ی شکلی آن‌ها بسیار مهم است که خود موجب تعیین هویت قارچ می‌شود. در این کتاب علاوه بر اینکه در بخش اول خصوصیات قارچ‌ها و روش‌های کشت به صورت خلاصه بیان شده، بخش‌های دیگر مزین به تعداد زیادی اشکال میکروسکوپی و ماکروسکوپی همراه با شرح آن‌ها می‌باشد که امید است مورد استفاده دانشجویان پزشکی، داروسازی، علوم آزمایشگاهی، قارچ‌شناسی، میکروبیولوژی، پرستاری و شعب مختلف علوم بیولوژی و همچنین متصدیان و کارشناسان آزمایشگاهی تشخیص طبی قرار گیرد.

در این مجموعه که ماحصل تلاش اینجانب و همکار گرامی آقای علی حاجی‌محمدی می‌باشد، یقین دارم که در تدوین آن نواقصی موجود است لذا امید است صاحب‌نظران و خوانندگان گرامی ما را از انتقادات سازنده‌ی خود محروم نسازند که اگر فرصتی دست داد در چاپ بعدی موردتوجه قرار گیرد.

از مدیریت و کارکنان محترم انتشارات ارجمند که درمدت کوتاهی به بهترین وجه ممکن چاپ این اثر را با حوصله و دقت به پایان رسانده‌اند صمیمانه تشکر می‌نمایم.

دکتر حسن یزدانفر
مهرماه ۱۳۹۵

مقدمه مؤلفین

چندی بود که سودای نوشتن اثری متفاوت را در سر داشتم. نهایتاً افتخار همکاری بـا اسـتاد بزرگـوارم جناب دکتر یزدانفر نصیبم شد. در طول مدت انجام کار تجربیات ارزشمندی بدست آوردم که امیدوارم توشه‌ای گران در ادامه‌ی مسیرم باشد. از این‌رو می‌باید فرصت را مغتـنم شـمرده و از خـواهر عزیـزم، انسیه حاجی‌محمدی که در بسیاری از مراحل ایجاد این اثر مهربانانه همراهم بـود تشـکر ویـژه داشـته باشم. امید است اثر حاضر در پیشگاه تمامی اساتید و هم‌قطارانم در عرصه‌ی علوم پزشکی مقبول افتد.

تقدیم به مادرم که مثل و مانندی ندارد

و

پدرم که معنای واقعی مهربانی را از او آموختم

علی حاجی‌محمدی

مهرماه ۱۳۹۵

بخش اول

روش‌های تشخیص بیماری‌های قارچی

فصل ۱

مروری بر روش‌های تشخیصی

قارچ‌ها و مخمرها از عوامل اصلی عفونت‌های حاد می‌باشند. از این جهت شناسایی این ارگانیسم‌ها برای تشخیص در جمعیت بیمار حائز اهمیت است. انواع بسیاری از تست‌های تشخیصی وجود دارد که روش‌های سنتی کشت و بیوشیمیایی تا تست‌های مولکولی چند پارامتری را شامل می‌شود.

تکنولوژی‌های اخیر منجر به ایجاد روش‌های سریع تشخیص شده که در بعضی موارد جایگزین روش‌های سنتی شده‌اند. تشخیص به هنگام عامل بیماری، منجر به درمان مناسب بیماران خواهد شد.

قارچ‌ها رفته‌رفته به‌عنوان یکی از عوامل تهدیدکننده‌ی حیات شناخته شده‌اند. افرادی که بیش‌تر در معرض خطر ابتلا می‌باشند شامل مبتلایان به بیماری‌های وخیم، مشکلات سیستم ایمنی (مثل ایدز)، نوتروپنی ارثی، دریافت‌کننده‌ی سلول‌های بنیادی خون‌ساز[1] و ... می‌باشند.

پیشرفت‌های شگرفی در ده سال اخیر در زمینه‌ی شناسایی و تشخیص قارچ‌ها روی داده است. تکنولوژی‌های جدید زمینه را برای ایجاد تست‌های متنوع محیا ساخته و بکار بردن آن‌ها نیز در زمینه‌های کلینیکی موفقیت‌آمیز بوده است. در ادامه مروری بر روش‌های تشخیصی موجود خواهیم داشت.

آزمایش مستقیم نمونه‌های کلینیکی

این نوع آزمایش با کمک چندین رنگ که باعث وضوح عناصر قارچی می‌شوند انجام می‌گیرد. رنگ‌های معروف که بر این تست‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل گوموری متانامین نقره[2]، Gridley Fungus (GF), PAS و هماتوکسیلین ائوزین[3] می‌باشد. همچنین از رنگ calcofluor white هم می‌توان به همراه میکروسکوپ فلوئورسنت استفاده کرد. این رنگ به زنجیره‌های بتا-گلیکوزیدی

1. hematopoietic stem cell transplant
2. Gomori Methenamine Silver (GMS)
3. Hematoxylin and Eosin (H&E)

جدول ۱-۱. برخی از رنگ‌های کاربردی

رنگ آمیزی	عناصر قارچی	پس زمینه
GMS	قهوه‌ای تا سیاه	سبز تا آبی
PAS	صورتی تا قرمز	صورتی کم رنگ تا بنفش کم رنگ
GF	صورتی تا قرمز تا بنفش	زرد
H&E	صورتی تا قرمز تا بنفش	صورتی

در پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی قارچ متصل می‌شود. همچنین می‌تواند به‌صورت غیراختصاصی به کراتین و عناصر بافت پیوندی انسان نیز متصل شود. برخی از رنگ‌های کاربردی را می‌توانید در جدول ۱-۱ مشاهده کنید.

تشخیص بر مبنای کشت

تشخیص غیراختصاصی

محیط‌های کشت قارچ دربردارنده‌ی انواع غیراختصاصی مثل سابورود دکستروز آگار[1]، آگار سیب‌زمینی دکستروز[2] و عصاره‌ی قلب-مغز[3] می‌باشد. به منظور جلوگیری از رشد باکتری‌ها یا قارچ‌های ساپروفیت از عوامل انتخابی مثل کلرامفنیکل، سیکلوهگزامید و جنتامایسین استفاده می‌شود. بعضاً از محیط‌های مایع به جای جامد (مثل سابورود دکستروز مایع) برای رشد و افزایش قارچ‌های نیز استفاده می‌شود. بیش‌تر قارچ‌ها غیراسید فست بوده و در بسیاری از محیط‌هایی که حاوی منابع نیتروژن و کربن باشد رشد می‌کنند. نقطه‌ضعف این‌گونه محیط‌ها در این است که بسیاری از قارچ‌ها شبیه یکدیگر بوده و برای تشخیص دقیق نیاز به روش‌های دیگر و انکوباسیون‌های بیش‌تر می‌باشد. این تأخیر در تشخیص انگیزه‌ای شد برای ایجاد روش‌های اختصاصی‌تر مثل محیط‌های کروموژنیک که در ادامه توضیح داده خواهد شد.

سیستم‌های خودکار کشت خون نیز وجود دارند که شامل:

Versa TREK®[4], Bact/Aler®3D[5], BACTEC ™[6] می‌باشند. این سیستم‌ها علاوه بر استفاده‌از عناصر مایع مختلف، حاوی روش‌هایی برای مانیتورینگ رشد و متابولیسم نیز می‌باشند. برای مثال

1. Sabouraud Dextrose Agar
2. Potato Dextrose Agar
3. Brain-Heart Infusion Agar
4. TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH, USA
5. bioMérieux ® , Marcy l'Etoile, France
6. BD™ Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA

میزان تولید CO_2 و متعاقب آن کاهش pH توسط حس‌گرهای فلورومتر BACTEC™ یا رنگ‌سنج Bact/Aler®3D و یا تشخیص میزان تغییر گاز توسط حس‌گرهای فشار Versa TREK® اندازه‌گیری می‌شوند.

تشخیص اختصاصی

تست Germ tube که در سال ۱۹۶۰ معرفی شد تا زمانی که تست‌های آنزیمی و محیط‌های کروموژن ابداع نشده بودند تشخیصی سریع برای کاندیدا آلبیکنس محسوب می‌شد. همواره نیز برخی آزمایشگاه‌ها از این تست برای تشخیص سریع و مقرون به‌صرفه‌ی کاندیدا آلبیکنس استفاده می‌کنند که نیازمند تجربه در مشاهده‌ی میکروسکوپی بوده؛ اما به‌طور گسترده تست‌های آنزیمی جای تست قدیمی را پرکرده‌اند.

Stiab اول‌بار محیط آگار birdseed را به‌عنوان محیطی مناسب برای تشخیص سریع کریپتوکوکوس نئوفرمنس معرفی کرد. اغلب گونه‌های کریپتوکوکوس نئوفرمنس ظرف مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون در این محیط که فعالیت فنولوکسیداز، رنگی قهوه‌ای تیره به کلنی آن می‌دهد، قابل‌تشخیص خواهند بود. مقایسه‌ای بین محیط birdseed و محیط‌های مرسوم (مثلاً SDA) بر روی ۳۵ نمونه‌ی کلینیکی بیماران ایدزی در دمای ۳۰° انجام شد که نتیجه‌ی آن حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ برای birdseed بود. پیشنهاد شده که این دما (۳۰°) و دماهای بالاتر (۳۷°) باعث دقیق‌تر شدن پاسخ شده و از گزارشات مثبت کاذب برای کریپتوکوکوس‌های غیر نئوفرمنس جلوگیری می‌کنند. علیرغم عدم گزارش موردی مبنی بر مشکلات رشد باکتری‌ها، برای نمونه‌های حاوی مقادیر زیاد باکتری، استفاده‌از آنتی‌بیوتیک‌ها توصیه می‌شود.

دیگر محیط کشت تشخیصی کریپتوکوکوس نئوفرمنس و ک. آلبیکنس که در عرض ۲۴ ساعت از نمونه‌های جدا شده از کلنی مورد استفاده قرار می‌گیرد، آگار TOC[1] می‌باشد. اگر برای اولین جداسازی از این محیط استفاده کنیم، نیاز به آنکوباسیون ۳ الی ۵ روز دارد.

از urease هم برای تشخیص سریع ک. نئوفرمنس استفاده می‌کنند که فاقد اختصاصیت بوده و نیاز به روش‌های قابل اعتماد دیگر نیز دارد. از urease می‌توان برای بررسی ایزوله‌های ریوی وقتی هدف بررسی محدود به گونه‌های کریپتوکوکوس نئوفرمنس و کریپتوکوکوس گاتی است، استفاده کرد. تست rapid trehalose assimilation و مشتقات آن را برای تشخیص سریع کریپتوکوکوس گلابراتا بکار می‌روند. ارزش تشخیص سریع این گونه به دلیل مقاومت یا کاهش حساسیت آن نسبت به تریازول‌های ضد قارچی مثل فلوکونازول می‌باشد.

1. tween 80-oxgall-caffeic acid

محیط‌های کروموژنیک

این محیط‌ها امکان تشخیص مستقیم بیش‌تر گونه‌های معمول کاندیدا در نمونه‌های کلینیکی را فراهم می کند. همچنین امکان تشخیص نمونه‌های مخمری مخلوط را می‌دهد که این امر در محیط‌های کشت معمول (مثلاً SDA) بسیار سخت و یا غیرممکن می‌باشد. این محیط‌ها باعث به هم پیوستن لایه‌هایی که آنزیم‌ها روی آن اثر می‌کند شده؛ مثلاً مشتقات ایندوکسیلینی هالوژنه برای شناسایی آنزیم‌های مشخصی استفاده می‌شوند.

جدا بودن لایه‌های تحت اثر آنزیم نیز منجر به تشکیل رنگ‌های نیلی روشن شده که در سلول‌های مخمری باقی خواهند ماند و باعث ایجاد رنگ مشخص در کلنی‌های گونه‌ی هدف می‌شوند.

این محیط همچنین شامل یک یا چند آنتی‌بیوتیک به منظور جلوگیری از رشد فلورهای باکتریایی آلوده‌کننده می‌باشند. ک. آلبیکنس با فعالیت بتا-هگزوسامینیداز قابل تشخیص می‌باشد. بعضی از انواع این محیط‌ها مثل CHROMagar™ Candida[1] امکان احتمالی تشخیص دیگر مخمرها مثل کاندیدا تروپیکالیس را با استفاده از آنزیم‌های اضافی مثل فسفاتاز می‌دهد. در این حالت ک. تروپیکالیس تشکیل کلنی‌های آبی‌رنگ با هیدرولیز هر دولایه کروموژنیک را می‌دهد. تشخیص‌های احتمالی برای گونه‌های دیگر مثل کاندیدا کروسئی و یا ک.گلابراتا نیز ممکن است قابل انجام باشد اما میزان درستی نتایج مبتنی بر مقدار تجربه در شناسایی حالات ریخت‌شناسی و تمیز دادن تفاوت رنگ از دیگر گونه‌های مشابه می‌باشد. محیط‌های موجود کروموژن برای تشخیص گونه‌های کاندیدا شامل:

CHROMagar™, [2]Candi *select™*4, [3]Brilliance™ Candida و chromID™ Candida [4]

می‌باشد.

روش‌های تشخیص بعد از کشت

تمامی روش‌های تشخیص غیر مولکولی که در سه قسمت بعد توضیح داده خواهند شد نیازمند تلقیح با ایزوله‌های خالص کشت‌هستند درصورتی‌که روش مولکولی که در قسمت چهارم توضیح داده شده، پس از کشت خون مثبت، به‌طور مستقیم شروع می‌شود. تکنیک‌های وابسته به‌ایزوله‌های خالص، طیف وسیعی از نیازهای مختلف را شامل می‌شوند. مثل: محیط ایزوله، سن کشت و چگالی سوسپانسیون تلقیح شده.

1. CHROMagar™, Paris, France
2. Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France
3. Oxoid, Basingstoke, UK
4. bio-Mérieux ® , Marcy l'Etoile, France

سیستم‌های تشخیص دستی

سیستم‌های اولیه تشخیص دستی محدود به حوزه‌های تشخیص گونه‌ها بر مبنای بانک داده‌های ضعیف آن زمان بود که تشخیص طیف محدودی را امکان‌پذیر می‌ساخت. بعضی از روش‌های در دسترس به قرار زیر است:

- api® Candida (bio Mérieux®)
- api 20C AUX (bio Mérieux®)
- Auxacolor™ (Bio-Rad)
- Candifast® (ELITech Group)
- Fungichrom® (ELITech Group)
- Fungifast® (ELITech Group)
- ID 32 C (bio Mérieux®)
- RapID™ Yeast Plus (Remel)
- Uni-Yeast-Tek® (Remel)

سیستم‌های تشخیصی اتوماتیک

با معرفی سیستم‌های اتوماتیک روند انجام کارها راحت‌تر شد و نتایج واقعی‌تر و قابل تکرار مجدد شدند. به‌این‌ترتیب افتراق دقیق‌تر ارگانیسم‌های مشابه در ابعاد گسترده‌تری فراهم شده که برخی از سیستم‌های موجود به شرح زیر می‌باشند:

- Biolog TY Microplate ™(Biolog)
- MicroScan® Rapid YS (Siemens)
- Sherlock® MIS (MDI, Inc.)
- Vitek® YBC (bio Mérieux®)
- Vitek®2 YST(bio Mérieux®)

تکنیک MALDI-TOF MS[1]

یکی از جدیدترین روش‌های تشخیص برای قارچ‌ها می‌باشد که بسیار دقیق و سریع بوده و نیاز به تجربه‌ی کار بالایی هم ندارد. این روش عمدتاً مبتنی بر پروتئین‌های ریبوزوم می‌باشد. آماده‌سازی یا خارج کردن سلول در ماتریکس شیمیایی انجام‌شده و توسط لیزر یونیزه می‌شود و مولکول‌های بدست آمده توسط لوله‌ای دارای بار الکتریکی به سمت آشکارساز حرکت می‌کنند. اختلاف زمانی حرکت یون‌ها به پیک‌های مختلف در بازه‌ی ۲-۲۰KDa تبدیل می‌شود. در ادامه نتایج بدست آمده با بانک اطلاعات مقایسه شده و ظرف مدت چند دقیقه بعد از مرحله‌ی یونیزاسیون نتایج نهایی تشخیص بدست می‌آیند. اطلاعات بدست آمده نشان می‌دهد که این روش نسبت به بسیاری از دیگر روش‌ها

1. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight massspectrometry

وابستگی کم‌تری به شرایط کشت داشته و طیف وسیعی از انواع شرایط رشد مثل محیط جداسازی، زمان انکوباسیون و دما را می‌توان بدون اینکه در شرایط خاصی باشند، در آزمایش استفاده کرد.

دو سیستم با این روش موجود می‌باشد. Vitek® MS™[1], BioTyper MALDI-TOF[2]

BioTyper MALDI-TOF: تا پایان سال ۲۰۱۱ این سیستم نشان انطباق در اروپا[3] را گرفت و در آزمایشگاه‌های کشورهای تحت نظر اتحادیه اروپا برای تشخیص مورد استفاده قرار گرفت. در دیگر کشورها مثل ایالات‌متحده قبل از تائید شدن توسط FDA، فقط برای کارهای پژوهشی مورد استفاده قرار می‌گرفت.

Vitek® MS™: شبیه سیستم Bruker می‌باشد و در اوایل سال ۲۰۱۱ نشان تأیید اتحادیه اروپا برای استفاده در آزمایشگاه‌ها (In Vitro Diagnostic) را گرفت. قبل از ابداع نرم‌افزارهای آزمایشگاهی و گرفتن تائید، به‌صورت RUO (فقط مصرف تحقیقاتی)[4] استفاده می‌شد.

استفاده‌از نوکلئیک اسیدها برای تشخیص قارچ‌ها

چندی است که روش FISH برای تشخیص قارچی مرسوم شده است. یکی از سیستم‌های موجود:

Yeast Traffic Light ® PNA-FISH ® (AdvanDx, Woburn, MA, USA) می‌باشد.

این روش یک هیبریدیزاسیون درجا با یک پپتید نوکلئیک‌اسید فلوئورسنت می‌باشد (PNA FISH) که با به خدمت گرفتن پروب‌های نشان‌دار شده با فلوئورسنت، با rRNA 26s گونه‌ی هدف هیبرید می‌شود. برای مثال در مورد ک. آلبیکنس که می‌توان به‌طور مستقیم از نمونه خون مثبت برای تشخیص آن استفاده کرد.

دیگر سیستم‌های نوکلئیک اسیدی که از نمونه‌های کشت شده استفاده می‌کنند شامل Prove-it™ Fungi[5] و کیت BlacLight® Fungal ID[6] می‌باشند.

Prove-itTM Fundi یک تست سریع بر پایه‌ی DNA بوده که توانایی تشخیص ۱۳ گونه‌ی مخمری را دارد:

ک.آلبیکنس، ک.تروپیکالیس، ک.گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوسیس، ک. کروزئی، کاندیدا لوسیتانیائی، کاندیدا گوئیلیرموندی، کاندیدا دوبلینیئنسیس، کاندیدا پلی کولوزا، کاندیدا کیفر، کاندیدا نوروگنسیس، کاندیدا هائمولونی و ساکارومایسیس سروزیه که در مجموع به Pan- Yeast Panel (لیست کامل

1. bio Mérieux®
2. micro flex™ LT instrument; Bruker Daltonics, Bremen, Germany
3. CE; Conformité Européene
4. Research Use Only (RUO)
5. Mobidiag, Helsinki, Finland
6. 2B BlackBio S.L., Madrid,Spain

مخمری) معروف هستند. در این روش با استخراج DNA از نمونه کشت مثبت خون یا نمونه‌های خالص کشت و استفاده از PCR و Microarray که در انتهای تیوب انجام می‌شود، سیگنال‌های فلورسانس ساطع شده در اثر هیبرید شدن توالی‌های اختصاصی مخمرها، قابل شناسایی می‌باشد.

یک سیکل کامل به مدت ۳ ساعت پس از استخراج و خالص‌سازی DNA خواهد بود.

کیت BlackLight ® Fungal ID از تکنیک pyrosequencing استفاده می‌کند که مبتنی بر تشخیص پیروفسفات آزاد شده در هر پیوند نوکلئوتیدی در حین واکنش توالی‌یابی می‌باشد. تست مذکور با ۱۵ میکرولیتر قطره خون خشک (Dried Blood Spot) (به قطر یک میلی‌متر) شروع شده بدون واسطه و مستقیم برای PCR مورد استفاده می‌گیرد. توالی‌یابی نواحی کوچک ژن rRNA 18s این امکان را فراهم می‌کند که بیش‌تر گونه‌های نزدیک کاندیدا مثل آسپرژیلوس فومیگاتوس و آ. نایجر تشخیص داده شوند.

این تست برای تشخیص‌های آزمایشگاهی در اروپا تائید شده و نتایج اخیر حاکی از استاندارد ۱۰۰٪ آن به‌عنوان روش میکروب‌شناسی در زمانی که از برداشت ایزوله‌های کشت خون استفاده شود، است.

روش تشخیص قارچ‌ها بر پایه‌ی آنتی‌بادی و آنتی‌ژن

تشخیص عوامل آنتی‌ژنیک در دیواره‌ی قارچ (مثل کیتین، بتا-گلوکان و مانوپروتئین) یا آنتی‌بادی‌های اختصاصی که توسط سیستم ایمنی میزبان تولید می‌شوند، به همراه دیگر روش‌های تشخیص (مثل کشت‌های میکروبی، معاینات بافت‌شناسی از نمونه بیوپسی شده و رادیوگرافی) به منظور تشخیص هر چه دقیق‌تر عفونت‌های قارچی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

سنجش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی برای تشخیص کاندیدا

پلی‌ساکارید مانان که به‌صورت غیرکووالانسی به دیواره‌ی مخمرها متصل شده می‌تواند به عنوان یک آنتی‌ژن عمل کند و منجر به ایجاد پاسخ ایمنی و متعاقب آن تولید آنتی‌بادی از سوی میزبان شود. تشخیص مانان یا آنتی‌بادی‌های خاص، منجر به ایجاد یکی از پرطرفدارترین تست‌ها برای تشخیص کاندیدا به نام: Platelia ™ Candida Ag and Platelia ™ Candida Ab (Bio-Rad) شد. نوعی تست الایزای ساندویچی که برای تشخیص کمّی مانان کاندیدا یا آنتی‌مانان-آنتی‌بادی در سرم افراد در معرض خطر یا مشکوک استفاده می‌شود.

هر دو نوع تست به مدت ۱۰ سال است که در اروپا استفاده می‌شود اما تائید FDA برای USA IVD[1] را نگرفته است. اختصاصیت و حساسیت تشخیص کلی مانان در حدود ۹۰٪ و ۶۰٪ می‌باشد که بر مبنای نتایج ۱۲ مطالعه بر روی جمعیت بزرگسال بدست آمده‌است. بر مبنای نتایج قابل قبول این تست در بخش ICU نوزادان نارس، پیشنهاد شده است که نظارت منظم مانان در گردش در سرم می‌تواند مکمل خوبی برای کشت‌های خون جهت تشخیص زودهنگام کاندیدا در این جمعیت باشد.

به علت پاک‌سازی سریع مانان در زمان عفونت، پاسخ منفی تست Platelia ™ Candida Ag نمی‌تواند دلیلی محکم بر غیرمحتمل بودن کاندیدیازیس باشد. پیشنهاد می‌شود که همراه آن از بررسی آنتی‌بادی ضدمانان توسط تست Platelia ™ Candida Ab استفاده شود که تستی دو مرحله‌ای ایمونوآنزیماتیک غیرمستقیم می‌باشد و امکان تشخیص مقدار کمّی آنتی‌بادی در سرم را فراهم می‌کند.

انواع دیگری از تست‌ها و کیت‌ها به وجود آمده و توسط کمپانی‌های مختلف معرفی شده‌اند. Serion Immunodiagnostica GmbH (wurzburg,Germany) که دو تست: Serion ELISA antigen Candida و Serion ELISA classic *Candida albicans* IgG/IgM/IgA را معرفی کرده که برای مصرف کمّی یا کیفی استفاده می‌شوند. اولین نوع تست بر پایه‌ی مخلوطی از ساختارهای آنتی‌ژن سیتوپلاسمی مثل اینولاز و دیگر عناصر خاص دیواره سلولی می‌باشد که باعث تشخیص عفونت کاندیدایی در سرم یا پلاسما می‌گردد. نوع دیگر بر مبنای تشخیص مستقیم آنتی‌بادی‌های انسانی علیه ک. آلبیکنس می‌باشد. تا به امروز مطالعات کمی درباره‌ی مقایسه‌ی این دو تست انجام‌شده است. Wulf و همکارانش نشان دادند که تشخیص بر پایه‌ی آنتی‌بادی می‌تواند نتایج دقیق را در مدت‌زمان کمتری بدست آورد (در حدود ۲۲ روز زودتر).

تست غیرمستقیم تشخیص کاندیدا بر مبنای آگلوتیناسیون لاتکس (LA) نیز در دسترس می‌باشد. Candida ™ Pastorex (Bio-Rad) با استفاده‌از ذرات لاتکس که با آنتی‌بادی‌های خاصی پوشیده شده‌اند و با آنتی‌ژن‌های پلی‌ساکاریدی کاندیدا واکنش داده و ایجاد آگلوتیناسیون می‌کنند، امکان تشخیص با چشم غیرمسلح را فراهم کرده است. اگرچه اختصاصیت این تست نسبتاً بالا می‌باشد اما حساسیت پایینی دارد (حدود ۲۵٪).

تست Cand- Tec ™[2] یکی دیگر از تست‌های آگلوتیناسیون برای تشخیص کاندیدا در نمونه‌های انسانی می‌باشد. یک مطالعه‌ی گذشته‌نگر مقایسه‌ای بین اختصاصیت و حساسیت این تست و Candida ™ Pastorex انجام داده که علیرغم بالا بودن حساسیت Cand- Tec ™ (۶۸/۸٪ به ۱۶/۷٪)، اختصاصیت آن بسیار پایین‌تر بوده‌است (۵۷/۱٪ به ۱۰۰٪). استفاده‌ی این تست همراه با

1. In Vitro Diagnostic
2. Ramco Laboratories Inc. Stafford, TX, USA

هماگلوتیناسیون غیرمستقیم باعث بهبود عملکرد آن در بیماران بخش ICU شده است (حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۸۳/۳٪).

بر پایه‌ی ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و هدف‌گیری مانوپروتئین سطح جرم تیوب دیواره‌ی سلولی، vircell Microbiologists، تستی را برای شناسایی آنتی‌بادی‌های IgG علیه آنتی‌ژن‌های جرم تیوب ک. آلبیکنس معرفی کرده است. حساسیت این تست ۸۳–۸۵٪ بوده و اختصاصیت ۸۶–۹۵٪ را در مطالعات مختلف از خود نشان داده است. به نظر نمی‌رسد که میزان عملکرد تست در زمان‌هایی که تیتر پایین است مثل عفونت با دیگر گونه‌ها به‌جز آلبیکنس یا حتی در موارد ضعف سیستم ایمنی، تغییر آن‌چنانی داشته باشد. جالب توجه است که اخیراً مطالعه‌ای از ظرفیت آن (CAGTA) [1] برای استفاده به عنوان مارکر پیش‌آگهی خبر داده که هرچند مطالعات بیش‌تری در این زمینه مورد نیاز است اما نشان داده شده آمار مرگ‌ومیر در بیمارانی که تیتر CAGTA آن‌ها افزایش یافته و پیوسته درمان‌های ضد قارچی دریافت کرده‌اند، پایین‌تر بوده است.

تست‌های تشخیص بر پایه‌ی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی برای کریپتوکوکوس

تشخیص آنتی‌ژن‌های کریپتوکوکوسی از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردارند که این امر موجب مفید و قابل اعتماد بودن برای تشخیص عفونت ریوی کریپتوکوکوسی و مننژیت شده است.

چنین روش وجود دارد. اختصاصیت بیش‌تر تست‌های آنتی‌ژن کریپتوکوکوسی به علت وجود فاکتورهای مداخله‌گر روماتوئیدی در داخل نمونه، کاهش پیدا می‌کند که می‌تواند منجر به نتایج مثبت کاذب شوند. این اتفاق بیش‌تر برای نمونه‌های سرم افتاده و کم‌ترین احتمال وقوع آن در نمونه‌های مایع مغزی– نخاعی می‌باشد که به‌ندرت دارای آنتی‌گلوبولین‌های مسئول این واکنش‌های متقاطع می‌باشند. به همین علت بیش‌تر توصیه به استفاده از پروناز می‌شود.

استفاده‌از پروناز در نمونه‌های زیستی باعث کاهش مداخله‌گرهای غیراختصاصی و متعاقباً کاهش نتایج مثبت کاذب می‌شود. دیگر عواملی که می‌تواند منجر به مثبت کاذب شود می‌تواند عفونت با گونه‌های تریکوسپورون، استفاده از نشاسته، بعضی ضدعفونی‌کننده‌ها، صابون و ویال‌های بی‌هوازی BBL ™ Port- A- Cul ™ برای انتقال نمونه‌ها باشد.

علاوه بر این‌ها، توصیه می‌شود قبل از کشت، تست CSF [2] انجام گیرد زیرا ایمرسیون موجود در پلاتین آنس که حاوی مقداری از آگار است به‌عنوان منشأ تداخل محسوب می‌شود. نگه‌داری نمونه مهم است چون افزایش pH و بالا بودن سطح دما، باعث تخریب آنتی‌ژن کریپتوکوکوسی شده که کاهش واکنش‌های سرولوژی را در پی دارد.

تست‌های موجود برای گونه‌های کریپتوکوکوس در جدول (۲–۱) آورده شده است.

1. C. albicans germ tube antigens
2. Cerebro-Spinal Fluid

جدول ۲-۱. تست‌های موجود برای گونه‌های کریپتوکوکوس

نوع سنجش	نام سنجش	تولیدکننده
آگلوتیناسیون لاتکس	Cryptococcal Antigen Latex Agglutination System (CALAS ®)	Meridian Bioscience, Inc. Cincinnati, OH, USA
	Latex-Cryptococcus Antigen Test	IMMY
	Pastorex™ Crypto Plus	Bio-Rad
	Cryptococcus Antigen Test	Remel
	Crypto-LA ®	Wampole Laboratories Inc.,Cranbury, NJ, USA
	Eiken Latex test	Eiken, Tokyo, Japan
سنجش ایمونوآنزیماتیک	Premier™ Cryptococcal Antigen	Meridian Bioscience Inc.

تست‌های تشخیص بر مبنای آنتی‌ژن و آنتی‌بادی برای آسپرژیلوس

شناسایی گالاکتومانان (GM) در گردش در بدن به‌طورکلی برای تشخیص آسپرژیلوس استفاده می‌شود. GM یک هتروپلی‌ساکارید است که در دیواره‌های سلولی گونه‌های آسپرژیلوس و پنیسیلیوم وجود داشته و اولین آنتی‌ژن پیدا شده در مدل جانوری مبتلا به آسپرژیلوس می‌باشد.

Platelia ™ Aspergillus EIA[1] سنجش میکروپلیت ساندویچ ایمونوآنزیمی تک‌مرحله‌ای است که‌از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال EBA-2 موش برای تشخیص آنتی‌ژن GM آسپرژیلوس در سرم استفاده می‌کنند. تا اواخر دهه‌ی ۹۰ میلادی مجوز استفاده در آزمایشگاه‌های اروپا را گرفت و در سال ۲۰۰۳ هم توسط FDA ایالات‌متحده تائید شد. فاکتورهای مختلفی بر عملکرد آن تاثیر می‌گذارند که از آن دسته می‌توان به شرایط میزبان، درمان‌های هم‌زمان، وجود دیگر گونه‌های قارچی، چگونگی مدیریت و انجام آزمایش روی نمونه‌ها و ... اشاره کرد. در جدول (۳-۱) و (٤-۱) به ترتیب شرایطی که منجر به نتایج مثبت و منفی کاذب می‌شود را می‌بینید. در حال حاضر برای تشخیص آسپرژیلوس از اندازه‌گیری GM استفاده می‌کنند. اگرچه سازندگان Platelia ™ Aspergillus EIA به‌جز سرم نمونه‌ی دیگری را برای بررسی تائید نکردند، بعضی از گزارشات از سال ۲۰۰٤ به آندازه‌گیری GM در دیگر نمونه‌ها مثل ادرار، مایع مغزی، نخاعی و مایع لاواژ برونکو الوئولار[2] خبر می‌دهد که دارای حساسیت بیش‌تر و همچنین پتانسیل برای تشخیص زودهنگام عفونت در بیماران با نقص سیستم ایمنی می‌باشد. با این‌حال استفاده از BAL در بیماران با سیستم ایمنی نرمال فاقد ارزش اضافی می‌باشد. میزان عملکرد آن در کودکان بیمار به‌خوبی مشخص نیست و نتایج مغایر در مطالعات مختلف گزارش شده‌اند.

1. enzyme immunoassay; Bio-Rad
2. Broncho-Alveolar Lavage (BAL)