تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال سیزدهم
خرداد - تیر
۱۳۹۰
شماره ۷۲

تشخیص آلودگی های تهاجمی ناشی از قارچ های رشته ای

صادق خداویسی
هیات علمی، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان
بیتا موسوی
دانشجوی دکتری قارچ شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

چکیده

امروزه آلودگی های قارچی تهاجمی در میان افراد با ضعف سیستم ایمنی، در حال افزایش است. این آلودگی ها برای بالا بودن میزان کشندگی آن ها از لحاظ تشخیصی و درمان بسیار مورد توجه است. تشخیص زود و مدیریت بهینه آن ها بسی ارزشمند می باشد. بدین روی بررسی های فراوانی بر روی روش های تشخیصی برای تشخیص این بیماری ها درآلودگان به این بیماری ها انجام شده است.

در بررسی پیش رو، نخست روش های تشخیصی روزمره مانند آزمایش های میکروسکوپی،کشت و یافته های رادیوگرافی و سپس روش های تشخیصی برپایه غیر کشت مانند تشخیص آنتی ژن وDNA قارچی که امکان تشخیص آغازین آلودگی ها و شروع درمان مناسب را فراهم می سازد، بحث می شود.

پیش گفتار

هدف از این بررسی، ارزیابی روش ها و تکنیک های گوناگون برای بررسی و تشخیص بیماری تهاجمی قارچی، IFD (invasive fungal disease)، به ویژه برای تشخیص بیماری های تهاجمی ناشی از قارچ های رشته ایIMD (invasive mould disease) ، در بیماران دارای نقص ایمنی می باشد.

امروزه بیشتر برای این واقعیت که تشخیص این آلودگی ها بیشتر دیر انجام می شود، و در نتیجه ی پاسخ های نامناسب به درمان ضدقارچی، این بیماری ها دارای باعث میزان مرگ و میر بالا می باشند[۱،۲]. روش های تشخیصی رایج مانند آزمایش میکروسکوپی، کشت و رادیولوژی دارای محدودیت های چشمگیر،از جمله حساسیت پایین می باشند.

این روش ها نمی توانند به عنوان تکنیک های تشخیصی قطعی در نظر گرفته شوند. و تشخیص قطعی به امکان نمونه گیری از بافت و بررسی های هیستوپاتولوژی بستگی دارد،که در بیشتر موارد به دلیل شرایط خاص بیمار نمونه گیری موفقیت آمیز نیست.

از یک سو هم از آنجایی که این آلودگی ها، بیماران با ضعف سیستم ایمنی را درگیر می کنند، تکنیک های تشخیصی که برپایه ی آنتی بادی استوار است،برای تشخیص آلودگی قابل اعتماد نیست [۴،۳]. این محدودیت ها پژوهشگران را وادار به ابداع روش های جایگزین بر اساس تشخیص ترکیبات قارچی ،همانند بررسی آنتی ژن های قارچی و تکثیر DNA می کند. هرچند که بسیاری از این روش ها برپایه ی تشخیص آلودگی های ناشی از قارچ آسپرژیلوس پرداخته شده اند.

روش های روزمره تشخیص میکروبیولوژی:

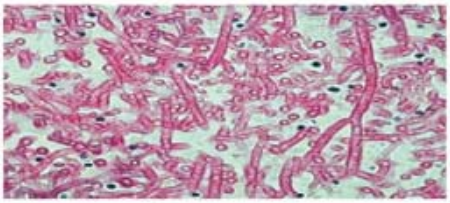
روش های کلاسیک تشخیص میکروب شناسی، بر پایه ی تشخیص میکروارگانیسم ها با استفاده از روش های های متداول مانند آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت می باشد. این روش ها کمک بزرگی در تشخیص بیماری های جلدی ناشی از درماتوفیت ها و دیگر آلودگی های قارچی سطحی هستند. اما سودمندی این تکنیک ها در مورد آلودگی های قارچی سیستماتیک محدود است [۷-۵].

آزمایش میکروسکوپی:

در این روش می توان هایف های دارای دیواره عرضی (مانند آسپرژیلوس، فوزاریوم، سدوسپوریوم) را از عوامل فاقد دیواره عرضی، مانند موکوراسه ها نیز که قادر به ایجاد آلودگی در بیماران با وضعیت سیستم ایمنی ضعیف است، و نسبت به داروهایی مانند وریکونازول غیرحساس می باشد، را تشخیص داد. دیدن ساختار قارچ برای تجزیه و تحلیل آن، تنها زمانی امکان پذیر است که قارچ در نمونه فراوان باشد این شرایط بیشتر در هنگامی که آلودگی در مراحل پیشرفته خود باشد، روی می دهد.

میزان بزرگنمایی و تعداد میدان های مورد بررسی در میکروسکوپ، درحساسیت روش میکروسکوپی موثر است [۸-۴] . آزمایش مستقیم میکروسکوپی نیز در صورت مثبت بودن کشت نمونه های بیماران مشکوک به IFD با ارزش است.

دیدن هایف با تیغه های میـــانی احتمال بیماری تهاجمی را نیـــزافزایش می دهد. این فرایندهای تشخیصی بیشتر وابسته به اطلاعات غیر مستقیمی است، که نشان دهنده احتمال بالای بیماری تهاجمی می باشد. این روش های تشخیصی دارای محدودیت های مهمی (مانند حساسیت پایین) هستند.



هایف های دو شاخه با زاویه حاده قارچ آسپرژیلوس در بافت

کشت میکروبی:

در بسیاری از موردها، نمونه ها به جای بررسی میکروب شناسی ، تنها برای ارزیابی سلولی و هیستوپاتولوژی به آزمایشگاه فرستاده می شوند.

از آنجا که اگر نمونه ها کشت داده نشود، تشخیص گونه و انجام پژوهش ها تعیین حساسیت ،امکان پذیر نخواهد بود، میکروب شناس مسوولیت آگاهی دادن مناسب به واحدهای بالینی برای درخواست هر دو نوع بررسی های قارچ شناسی و هیستوپاتولوژی را به عهده دارد.

اگر چه بیشتر قارچ ها در محیط کشت استاندارد مانند بلاد آگار، شکلات آگار رشد می کنند، اما باید برای رشد قارچ در محیط های کشت اختصاصی همانند محیط های آگار عصاره مالت، آگارآرد ذرت، سابورو گلوکز آگار با سیکلوهگزامید، آگار سیب زمینی و BHI استفاده شود [۹،۵].

کشت ها باید در درجه حرارت های ۳۰ و۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری شود. در نمونه هایی که آلودگی همراه با باکتری نیز باشد، ازمحیط های کشت انتخابی از جمله سابورد آگار که دارای آنتی بیوتیک هایی مانند کلرامفنیکل وجنتامایسین است، توصیه می شوند.

برخی از قارچ های رشته ای نادر مانند گونه های فوزاریوم و سدوسپوریوم، می تواند از کشت های خونی جدا شود، که نباید آن ها را آلوده کننده به شمار آورد. قارچ های رشته ای از آلاینده های روزمره آزمایشگاه وساپروفیت هستند، که این پدیده اختصاصیت کشت را کاهش می دهد.

به هر روی پیش ازاین که قارچ را به نام آلوده کننده یا فلور ساپروفیت رد کنیم، باید فاکتور های خطر بیماری های تهاجمی را در بیمار بررسی شود و درخواست کشت دوباره انجام شود.

جدا کردن قارچ های رشته ای از نمونه های به دست آمده از سیستم تنفسی بیماران، به غیر از آلودگی های احتمالی در هنگام نمونه گیری می تواند به سه گونه اشاره کرد: نشان دهنده بیماری واقعی ،وجود یک کلونیزاسیون و یا این که نشانه ای از وجود یک بیماری تهاجمی باشد. باید آگاه بود که این روش، توان تفریق میان فرم های تهاجمی و کلونیزاسیون را ندارد، و ارزش گزارشی مثبت آن نیز متفاوت و بیشتر وابسته به وضعیت سیستم ایمنی بیمار است.

جداسازی این قارچ ها از بیماران با وضعیت سیستم ایمنی سالم ،بیشتر به مفهوم کلونیزاسیون و عدم آلودگی می باشد.

رادیولوژی:

الگوهای رادیوگرافی برای تشخیص IMD می توانند مفید باشد. CT اسکن و تصویر برداری رزونانس مغناطیسی(MRI)، امکان تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم ریوی و IMD های دیگر با درجه ای از یقین را فراهم می سازند.

استفاده ی روزمره از آن در زمان شروع بیماری برای تشخیص آغازین و همچنین پی گیری فرآیند بهبودی در بیماران لازم است. شناخت محل عارضه برای انجام برونکوسکوپی و بیوپسی از ریه مفید می‌باشد. مهم ترین نشانگان که در CT دیده می شود؛ ندول های گوناگون با رشد سریع و یا کاویتاسیون، air-crescent sign و halo sign که آسیب های کوچک پلوری با ناحیه مشخص و هاله وار در پیرامون یک گره یا انفیلتراسیون ناشی از تهاجم ارگانیسم به رگ می باشد، و بیشتر در بیماران نوتروپنی در مراحل آغازین آلودگی (بویژه در هفته نخست) دیده می شود.

بررسی ها نشان داده است که بیماران با نشانه های هاله ای (halo sign) بیشتر پاسخ بهتری به درمان از خود بروز می دهند[۱۰،۱۱]. البته باید آگاه بود که این نشانگان تنها ویژه ی IMD نیست، و در بیمارهای دیگر ریوی نیز پیدا می شود. همچنان که Halo sign می تواند ناشی از یک متاستاز، کارسینومای برونکوآلوئولار، ائوزنیوفیلیک پنومونی و یا سایر آلودگی‌های قارچی باشد و دیگر این که حساسیت آنها در بیماران با ضعف سیستم ایمنی کم می باشد.

روش های تشخیصی بر پایه غیر کشت:

در دهه های گذشته، به علت محدودیت و پایین بودن ارزشمندی روش های تشخیصی کشتی در بیماران در معرض خطر آلودگی، و میزان کشندگی بسیار بالای این بیماری ها، از روش های تشخیصی غیر کشتی، سرولوژی و مولکولی برای تعیین آنتی بادی و مارکرهای تشخیصی گونه های آسپرژیلوس مانند آنتی ژن گالاکتومنن(GM) ، بتا۱و۳ دی گلوکان(β-1-3 D-Glucan) و تعیین DNA به وسیله روش PCR برای تشخیص بیماری استفاده می شود.

این روش ها: غیر تهاجمی، سریع و با حساسیت بالایی می باشد ، که پزشکان را در تشخیص بیماری در گام های آغازین و شروع هرچه زودتر درمان های موثر، اصلاح نوع درمان، پیگیری پیشرفت بیماری و اثر داروهای تجویزی و سایر اقدامات کلینیکی توانمند می سازند.

۱-تشخیص آنتی‌ژن گالاکتومنن، (Galactomannan) ،GM :

آنتی ژن GM، پلی‌ساکارید دیواره سلولی قارچ آسپرژیلوس است ،که در دیواره سلولی بسیاری از قارچ های رشته ای دیگر مانند پسیلومیسس و پنی سیلیوم به میزان کم تر از آسپرژیلوس نیز وجود دارد[۱۲].

این آنتی ژن یک کربوهیدرات محلول در آب است و از نمونه های گوناگون بالینی مانند؛ سرم،BAL، ادرار، مایع مغزی نخاعی و بافت با روش ساندویچ الایزا، شناسایی می‌شود.

بنابراین بررسی این آنتی ژن قارچی به عنوان روش اختصاصی برای تشخیص آسپرژیلوس پذیرفته شده است.

این روش در مقایسه با روش های تشخیصی دیگر از حساسیت و ویژگی بالاتری (به ترتیب معادل ۹۴٪ و ۸۵ ٪) برخوردار می باشد و حتی در بسیاری از موارد زود تراز نشانگان کلینیکی و یافته‌های رادیولوژی مثبت می‌شود. چون آنتی‌ژن GM را می‌توان چندین روز پیش از پیدایش نشانگان بالینی و رادیولوژی و حتی مثبت شدن کشت شناسایی کرد، بدین روی در تشخیص آغازین بیماری بسیار کمک‌کننده می‌باشد. همچنین با تعیین آنتی‌ژن به صورت سریالی می‌توان از وضعیت آلودگی در مدت درمان آگاهی پیدا کرد.

۲-تشخیص بتا دی گلوکان

بتا دی گلوکان یک ترکیب موجود در دیواره سلولی قارچ ها است، که چون در بیشتر گونه های قارچی هست، برای آسپرژیلوزیس اختصاصی نیست.

دی گلوکان به اندازه بسیار کم در کریپتوکوکوس و دیگر بازیدیومیست ها و زیگومیست ها وجود دارد. پژوهش های تازه نشان می دهد که این آزمون می تواند برای بررسی موارد زیگومیکوزیس و کریپتوکوکوزیس مفید باشد[۱۳،۱۴].

آزمایش بتا دی گلوکان روش تشخیصی برای همه قارچ ها در نظر گرفته شده است ، و شامل معیار تشخیص در EORTC/MSG برای IMD درسال ۲۰۰۸ می باشد[۱۲].

در حالی که بررسی GM روشی مفیدی در تشخیص آغازین آسپرژیلوزیس در دچار شدگان به بیماری های خونی است، بررسی بتا دی گلوکان در تشخیص آسپرژیلوزیس و دیگر بیماری های قارچی از کاندیدیازیس و دچار شدگان به بدخیمی ها و در مواردی از پنوموسیستیس پنومونی استفاده می شود[۱۷-۱۵].

بهره مندی از آزمایش بتا دی گلوکان نسبت به آزمایش GM محدود تر است. امروزه این روش، در حال بررسی و گسترش است، و بدین روی به انجام تحقیقات گسترده تری بر روی جمعیت هایی از بیماران خاص نیاز می باشد. هم اکنون مواد این آزمایش به صورت تجاری در دسترس است. روند کنونی با به کار گیری آمیزه ای از چندین روش تشخیصی برای رد آلودگی قارچی در بیماران در معرض خطر می باشد، بنابراین ترکیب بتا دی گلوکان و GM می تواند یک استراتژی مرجع باشد. هر چند که توصیه شده است که از بتا دی گلوکان برای غربال گری IMD در بیماران همراه با نوتروپنی طولانی مدت (بعد از شیمی درمانی)، بیماران گرفتار به لوسمی حاد و دریافت کنندگان HSCT استفاده شود.

۳-تشخیص اسیدنوکلییک

امروزه بیشتر روش های PCR ،برای تشخیص آغازین آسپرژیلوزیس تهاجمی گسترش یافته است. گوناگونی روش های استخراج و شرایط متفاوت به کار گرفته در واکنش PCR که در گزارش ها آمده است، رسیدن به نتیجه ی قطعی را دشوار می سازد[۱۸،۱۹].

یکی از چالش ها، حساسیت پایین این روش ها به هنگام استفاده از نمونه های خونی می باشد. این خود شاید و ابسته به اندازه ی کم DNA آسپرژیلوس یا وجود ترکیب های خونی مهار کننده واکنش PCR باشد.

به هر روی، برتری چشمگیر روش های PCR، در توان شناخت اندازه ی کم مادهٔ ژنتیکی قارچ است، که می تواند بود یا نبود IMD را نشان دهد[۲۱،۲۰].

امروزه روش های PCR را برای شناسایی یک گونه ویژه ، و یا به طور کلی برای تشخیص قارچ های رشته ای، طراحی شده است. پژوهش های گوناگون در ارزیابیIA به وسیله روش RT- PCR در نمونه BAL نشان داده است که این روش نیز در تشخیص بیماری دارای ویژگی بسیار بالا می باشد.

در پژوهش ها نشان داده شده است که روش PCR در نمونه خون، برای تشخیص IA دارای حساسیت ۱۰۰-۶۷٪ و ویژگی ۹۵-۵۵٪ می‌باشد. یادآوری می شود که این آزمایش توان افتراق بین کلونیزاسیون با آلودگی نیست و دارای نتایج مثبت کاذب می‌باشد.

روی کرد دیگر برای انجام آزمایش های PCR استفاده از انواعی از نمونه ها مانند بیوپسی ریه و یا سایر بافت های عمقی باشد. در برخی پژوهش ها گزارش شده است که PCR می تواند برای تشخیص آسپرژیلوس در بافت ها و BALبسیار مفید باشد. اگر چه این روی کرد به دلیل محدودیت این نمونه ها دچار چالش است [۲۲،۲۳].

کوتاه این که ، روش PCRمی تواند در تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم به کار رود، اگر چه در آخرین گردهمایی EORTC/MSG و ECTL3 آن را به عنوان ملاک تشخیص آلودگی، در نظر گرفته نشده است[۲۵،۲۴].

نتیجه گیری:

IMD سرکش است و به مرگ و میر بسیاری می انجامد. تشخیص زود هنگام آن نیازمند تکنیک های اختصاصی است.

به علت محدودیت و پایین بودن حساسیت روش های کشت در بیماران (که در معرض خطر آلودگی اند) استفاده از روش های تشخیصی غیر کشتی، سرولوژی و مولکولی برای سنجش مارکرهای تشخیصی گونه های آسپرژیلوس، مانند آنتی ژن گالاکتومنن(GM) ، بتا۱و۳ دی گلوکان و تعیین DNA به وسیله روش PCRبرای تشخیص بیماری استفاده می شود.

این روش ها غیر تهاجمی، سریع و با حساسیت و ویژگی بالایی می باشند. البته برای به دست آوردن نتیجه دقیق، این آزمایش ها نیاز به فرایند تخصصی دارد. بی گمان پزشکان نیز باید از محدودیت ها و نتایج کاذب آن ها آگاه باشند، تا از آن در مدیریت درست بیمار استفاده کنند.

نکته مهمی که باید بازگو شود، این است که یک آزمایش منفی نمی تواند تشخیصی IMD را رد کند. همچنین یک آزمایش مثبت نیز دلیل بر تشخیص قطعی آلودگی نیست.

از این رو آزمایش ها را باید به گونه ی وابسته به هم همراه با دیگر روش های تشخیص و نه جداگانه تفسیر کرد.
به هر روی نیاز به پژوهش های آینده نگر بیشتری است، تا به نتیجه ی بهینه ،اثر بخش و مقرون به صرفه ای برای تشخیص دست یافت.

Reference: .....

1. Leventakos K, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Fungal infections in leukemiapatients: how do we prevent and treat them? Clin Infect Dis 2010; 50:405–15.
2. Marr KA. Fungal infections in oncology patients: update on epidemiology, prevention, and treatment. Curr Opin Oncol 2010; 22: 138–42.
3 .Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections.Lancet Infect Dis 2003; 3: 230–40.
4 .Einsele H, Loeffler J. Contribution of new diagnostic approaches to antifungal treatment plans in high-risk haematology patients. Clin Microbiol Infect 2008; 14 Suppl 4: 37–45.
5. Gadea I, Cuenca-Estrella M, Martin E et al. Microbiological procedures for diagnosing mycoses and for antifungal susceptibility testing. Enferm Infecc Microbiol Clin 2007; 25: 336–40.
6. Lass-Florl C. Zygomycosis: conventional laboratory diagnosis. Clin Microbiol Infect 2009; 15 Suppl 5: 60–5.
7. Richardson M, Ellis M. Clinical and laboratory diagnosis. Hosp Med 2000; 61: 610–4.
8. Rickerts V, Mousset S, Lambrecht E et al. Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. Clin Infect Dis 2007; 44: 1078–83.
9. de Hoog GS, Guarro J, Gene J et al. Atlas of Clinical Fungi. Utrecht/Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 2000.
10. Gotway MB, Dawn SK, Caoili EM et al. The radiologic spectrum of pulmonary Aspergillus infections. J Comput Assist Tomogr 2002; 26:159–73.
11. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW et al. Imaging findings in acute invasive pulmona aspergillosis: clinical significance of the halo sign. Clin Infect Dis 2007; 44: 373–9.
12. de Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 2008; 46: 1813–21.
13. Koo S, Bryar JM, Page JH et al. Diagnostic performance of the (1_3)-b-D-glucan assay for invasive fungal disease. Clin Infect Dis 2009; 49: 1650–9.
14. Obayashi T, Negishi K, Suzuki T et al. Reappraisal of the serum (1_3)-b-D-glucan assay for th diagnosis of invasive fungal infections—a study based on autopsy cases from 6 years. Clin Infect Dis 2008; 46: 1864–70.
15.Desmet S, Van Wijngaerden E, Maertens J et al. Serum (1_3)-b-D-glucan as a tool for diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection or
hematological malignancy. J Clin Microbiol 2009; 47: 3871–4.
16. Marty FM, Koo S, Bryar J et al. (1_3)-b-D-Glucan assay positivity in patients with Pneumocystis (carinii) jiroveci pneumonia. Ann Intern Med 2007; 147: 70–2.
17. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E et al. b-D-Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. Clin Infect Dis 2004; 39: 199–205.
18. Donnelly JP. Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a ways to go. Clin Infect Dis 2006;42: 487–9.
19. Khot PD, Ko DL, Hackman RC et al. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. BMC Infect Dis 2008; 8: 73.
20. White PL, Bretagne S, Klingspor L et al. Aspergillus PCR: one step closer to standardization. J Clin Microbiol 2010; 48: 1231–40.
21. Suarez F, Lortholary O, Buland S et al. Detection of circulating Aspergillus fumigatus DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk
adult patients under hematologic surveillance. J Clin Microbiol 2008; 46: 3772–7.
22. Frealle E, Decrucq K, Botterel F et al. Diagnosis of invasive aspergillosis using bronchoalveolar lavage in haematology patients: influence of bronchoalveolar lavage human DNA content on real-time PCRperformance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28: 223–32.
23. Hummel M, Spiess B, Roder J et al. Detection of Aspergillus DNA by a nested PCR assay is able to improve the diagnosis of invasive aspergillosis in paediatric patients. J Med Microbiol 2009; 58: 1291–7.
24. Armenian SH, Nash KA, Kapoor N et al. Prospective monitoring for invasive aspergillosis using galactomannan and polymerase chain reaction in high risk pediatric patients. J Pediatr Hematol Oncol 2009;31: 920–6.
25. Blennow O, Remberger M, Klingspor L et al. Randomized PCR-based therapy and risk factors for invasive fungal infection following
reduced-intensity conditioning and hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant 2010; doi:10.1038/bmt.2010.38.