Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۸۵/هفته دوم تیر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۲۱

آرتیفکت‌ها و سایر اشکال مشابه عناصر قارچی در آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی

دکتر اصغر سپه‌وند[۱]، دکتر رسول محمدی[۲]، عاطفه میر دریکوند[۳]، سهیلا سلیمان‌نژاد[۴]، دکتر رضا روزبهانی[۵]

مقاله مروری

چکیده

هدف از این مطالعه‌ی مروری، شناسایی آرتیفکت‌ها (اجسام مصنوعی) و افتراق آن‌ها از عناصر قارچی با استفاده از روش‌های کاربردی و ساده در آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی و در نهایت تشخیص درست سلول‌های قارچی و به دنبال آن درمان و پیشگیری مناسب عفونت‌های قارچی (Mycoses) می‌باشد. آرتیفکت‌ها جزء جدایی ناپذیر فرایند تشخیص هستند و به طور پنهان و آشکار، از خطاهای رایج در آزمایشگاه می‌باشند. عمده‌ترین اشکال مشابه سلول‌های قارچی عبارت از موزاییک فونگوس، قطرات روغن و چربی‌ها، گلبول‌های قرمز و سفید، الیاف، باکتری‌ها، انگل‌ها و اجزای مختلف در مقاطع بافتی می‌باشند. این اشکال در بخش قارچ‌شناسی کمتر از سایر بخش‌های آزمایشگاه طبی مورد توجه قرار می‌گیرند و پیامد آن‌ها، گزارش نتایج مثبت کاذب، درمان‌های بیهوده و سردرگمی بیمار می‌باشد. شناسایی و معرفی مکرر این اشکال برای پرسنل آزمایشگاه‌ها، به ویژه افراد تازه‌کار، می‌تواند عامل مهمی در تشخیص درست عناصر قارچی، بیماری‌ها، کاهش هزینه‌ی درمان و ثبت معتبر شیوع مایکوزیس در جامعه باشد که هدف از مطالعه‌ی حاضر نیز، بیان نکات تشخیصی کلیدی در این زمینه و نیل به اهداف پیش‌گفته می‌باشد.

واژگان کلیدی: آرتیفکت، آزمایش مستقیم، هیستوپاتولوژی، قارچ‌شناسی پزشکی

ارجاع: سپه‌وند اصغر، محمدی رسول، میر دریکوند عاطفه، سلیمان‌نژاد سهیلا، روزبهانی رضا. **آرتیفکت‌ها و سایر اشکال مشابه عناصر قارچی در آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۵): ؟؟

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های سریع و گوناگون قارچ‌شناسی پزشکی در زمینه‌های تشخیصی از جمله آزمایش مستقیم، کشت و روش‌های مولکولی، هنوز هم هیدروکسید پتاسیم (KOH یا Potassium hydroxide) به عنوان اولین، رایج‌ترین و مهم‌ترین ماده‌ی شیمیایی در بررسی نمونه‌های بالینی در آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی پزشکی کشور مطرح می‌باشد.

استفاده از هیدروکسید پتاسیم، همانند رنگ‌آمیزی گرم در باکتری‌شناسی، به عنوان پایه‌ای ثابت و راهبردی در تشخیص عناصر قارچی کاربرد دارد.

هیدروکسید پتاسیم با هضم (حل کردن) نمونه‌های بالینی، باعث شفاف شدن آن‌ها می‌شود. اگر چه دیواره‌ی سلول‌های قارچی به علت داشتن کیتین مقاوم به این هضم می‌باشد، اما سرانجام آن‌ها نیز تخریب می‌شوند. این محلول بازی قوی،

۱- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی، بیمارستان شهدای عشایر، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
۵- استادیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رسول محمدی
Email: dr.rasoul_mohammadi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های اپی‌تلیال، گلبول‌های سفید و قرمز، موکوس و دیگر مواد پروتئینی را هضم یا لیز می‌کنند و بسیاری از پیگمان‌ها را سفید و سیمان اتصال دهنده‌ی سلول‌های کراتینیزه را حل می‌نماید. این فرایند، شرایط یافتن سلول‌های قارچی را در ترشحات و بافت‌های کراتین‌دار فراهم می‌نماید. غلظت زیاد کیتین در عناصر قارچی، عامل مقاومت به دناتوراسیون هیدروکسید پتاسیم می‌باشد. کیتین یک مولکول غول‌آسای پلی ساکاریدی، متشکل از مولکول‌های کوچک‌تر زنجیره‌های قندی است. در زبان یونانی به معنی پوشش (Tunic) است و دارای نقش‌های ساختاری و دفاعی در قارچ‌ها می‌باشد. ساختارهای قارچی مانند هایفی، مخمرهای بزرگ (بلاستومایسس)، اسفرول‌ها و اسپورانژیا (ساختمان کیسه‌مانند محتوی اسپورانژیواسپور) می‌توانند با استفاده از این روش (KOH) شناسایی شوند. آزمایش مستقیم میکروسکوپی نمونه‌ها با KOH، برای تصمیم‌گیری در زمینه‌ی درمان، تعیین این که ارگانیسم رشد کرده در محیط کشت، یک آلوده کننده یا یک پاتوژن است و کمک به آزمایشگاه در انتخاب مناسب‌ترین شرایط انجام کشت و بازیافت ارگانیسم‌های رؤیت شده در اسمیر مستقیم، بسیار کمک کننده است (۱).

اگر چه این روش سریع، ساده و ارزان است، اما دارای حساسیت مطلوب نیست؛ به ویژه هنگامی که میزان هایفی در نمونه‌ها کم باشد. حساسیت این روش در محدوده‌ی ۹۲-۳۲ درصد گزارش شده است (۹-۲). نمونه‌های مورد بررسی با پتاس شامل تمام اشکال بالینی مانند نمونه‌های مو، ناخن، تراشه‌های پوست، مایعات (ادرار، مایع نخاع، پلور، پریتوان، مایع مفصل)، اگزوداها، بیوپسی، خلط، دیگر نمونه‌های دستگاه تنفسی تحتانی، نمونه‌های بافتی خرد شده و تراشه‌های زخم می‌باشند و در موارد مشکوک به تینه‌آ ورسیکالر، درماتوفیتوزیس، کاندیدیازیس و تمامی بیماری‌های قارچی احشایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰).

آرتیفکت‌ها

آرتیفکت‌ها در مطالعات میکروسکوپی، جزئیات ساختاری پدید آمده‌ی ناشی از پردازش نمونه هستند و بنابراین تصویر واقعی و درست نمونه نمی‌باشند (۱۱). تعداد زیادی آرتیفکت وجود دارد که مشابه قارچ‌ها هستند و در زیر میکروسکوپ ممکن است با عوامل قارچی اشتباه شوند. بنابراین باید مواظبت نمود که عناصر رؤیت شده، در حقیقت عناصر قارچی باشند. آرتیفکت‌ها به طور معمول، دارای دیواره‌های سلولی یا دیواره‌های عرضی مشخصی نیستند.

همچنین هیچ گونه آثاری از جوانه زدن یا ساختمان‌های داخل سلولی از جمله هسته یا گنجیدگی‌های سیتوپلاسمی در آن‌ها وجود ندارد (۱۳-۱۲).

استفاده از میکروسکوپ نوری در انجام آزمون‌های میکروسکوپی، نیاز به دقت، تجربه و حوصله دارد؛ زیرا نور خیلی زیاد میکروسکوپ با محو نمودن تصویر قارچ‌ها، منجر به نتایج کاذب می‌شود. بنابراین می‌توان با کم کردن نور میکروسکوپ، از این پدیده جلوگیری نمود. به کار بردن نور کافی، تنظیم مرتب عدسی‌ها، دیافراگم‌ها و کندانسور که منجر به ایجاد کنتراست مناسب (در شدت و یا رنگ) می‌شود، دارای اهمیت کاربردی است.

www.SID.ir

Archive of SID

اشکال مشابه عناصر قارچی

۱- موزاییک فونگوس (Mosaic fungus)

هنگامی که پوسته‌های ناشی از کچلی‌ها به ویژه پا (بین انگشتان و کف پا) و یا دست با استفاده از محلول هیدروکسید پتاسیم (پتاس) شفاف گردند، اشکالی کاذب، شبیه میسیلیوم‌های قارچی دیده می‌شود. این اشکال رشته مانند منشعب، مجزا و نامنظم که از الگوی دیواره‌های سلولی اپی‌تلیال‌ها پیروی می‌کنند، اولین بار توسط Weidman در سال ۱۹۲۷ توصیف و به نام موزاییک فونگوس نام‌گذاری شدند. وی پیشنهاد کرد که اگر این اشکال قارچ باشند، در یک وضعیت دژنره شده‌اند. دیگر محققین آن‌ها را به عنوان قارچ‌های بیماری‌زا در نظر گرفتند که توسط واکنش‌های ایمنی بدن به شکل ناقص تخریب شده‌اند. برخی دیگر آن‌ها را به عنوان ترکیب هوا و پتاس در بین سلول‌ها و یا به عنوان تجمع بقایای ساختمانی بین سلولی در نظر گرفتند (۱۴).

یافته‌های Getz و همکاران، موزاییک فونگوس را به عنوان محصولی از اکسیداسیون چربی‌ها در اپیدرمیس معرفی کردند و آن را مرتبط با عفونت‌های درماتوفیتوزیس نمی‌دانستند. موزاییک فونگوس، در آزمایش‌های معمول تراشه‌های پوست به ویژه قسمت قدامی پاشنه‌ی پا، برای یافتن قارچ‌های پاتوژن سطحی، به کرات یافت می‌شود. این عناصر ممکن است به تنهایی، یا همراه با میسلیوم‌های منظم، آرتروواسپورها یا با هردو، دیده شوند. اشکال ذکر شده در محلول پتاس ۱۰ درصد گرم شده، بلافاصله بعد از مونته کردن، از بین می‌روند. در نمونه‌های گرم نشده، تغییرات ساختمانی موزاییک مشاهده نمی‌شود؛ در حالی که میسلیوم‌های منظم، در نمونه‌های گرم شده یا نشده تغییر نمی‌یابند (۱۵).

بهترین نمونه‌ها، با پتاس سرد حاصل می‌شوند؛ اما بعد از حرارت دادن، ساختارهای کریستالی به وجود می‌آیند. اگر پوسته‌های خشک، برای حل کردن کلسترول، در گزیلول خیسانده شوند، سپس اجازه دهیم تا گزیلول تبخیر شود، فضاهایی که از قبل با کریستال‌ها پر شده‌اند، با هوا پر می‌شوند. بنابراین، در فضای بین سلول‌های پوششی خشک، قالب (جای خالی) کریستال‌ها دیده می‌شود. اشکال موزاییک شامل کریستال‌های کلسترولی لوزی شکل پهن و گاهی اوقات با یک زوایه‌ی فرو رفته می‌باشند. این اشکال در آب نامحلولند، به آرامی در تماس طولانی با پتاس غلیظ ناپدید می‌شوند؛ اما در گزیلول و دیگر حلال‌های چربی محلولند. چربی‌ها در حلال‌های آلی مثل استون، الکل (اتانول ۹۵ درصد)، کلروفرم و بنزن محلولند. در مجموع، موزاییک فونگوس، شبکه‌ای متشکل از رسوب کریستال‌های کلسترول هستند و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ دارای مشخصات افتراقی زیر، با هایف‌های واقعی قارچی به ویژه درماتوفیت‌ها می‌باشد:

۱. قرار گرفتن در فضای بین سلول‌های اپی‌تلیال و نه در داخل سلول‌ها (هایف واقعی قارچ‌ها، دیواره‌ی سلول‌ها را قطع می‌کند).

۲. تغییرات ناگهانی و شدید در قطر رشته‌ها

۳. زوایای مقعر و فرو رفته در عرض

۴. باریک شدن و نامعین بودن انتهاها

هایف‌های حقیقی، فاقد تغییرات ناگهانی در قطر و زوایای مقعر در عرض هستند و در طول خود دارای پهنای یکنواخت می‌باشند.

۵. شفاف، فاقد ارگانل‌های داخلی و دیواره‌های عرضی هستند. هایف واقعی درماتوفیت‌ها، دارای

www.SID.ir

Archive of SID

ارگانل‌ها، هسته‌ها، قطرات چربی و دیواره‌های عرضی می‌باشند. از آن جایی که موزاییک فونگوس، در اصل از کریستال‌های کلسترول تشکیل شده‌اند، پیشنهاد می‌گردد این ساختار با نام جدید کلسترول موزاییک نام‌گذاری شوند (۱۶، ۱۴).

۲- قطرات روغن و چربی‌ها

اگر قطرات روغن به علت استفاده از کرم‌ها و نرم کننده‌ها حضور داشته باشند، تفسیر نمونه‌ی مرطوب مستقیم، به ویژه به علت شباهت گلبول‌های روغن و وزیکول‌های چربی با سلول‌های مخمری و کونیدی‌ها مشکل است. در این موارد، رنگ‌آمیزی گرم می‌تواند کمک کننده باشد. عناصر قارچی، به ویژه اشکال مخمری، گرم مثبت هستند (کامل یا نسبی) و هایفی کپک‌ها، به رنگ‌های گرم مثبت، متغیر یا منفی، رنگ می‌گیرند. قطرات روغن با رنگ پیش‌گفته، رنگ نمی‌پذیرند. قطرات روغن حاصل از نرم کننده‌های کاتترها و یا مواد چربی کرم‌های واژینال (کرم‌های واژینال با پایه‌ی پارافین در درمان عفونت کاندیدایی)، در نمونه‌های ادراری، در مقایسه با مخمرها، تغییرات بیشتری در اندازه دارند و به شدت رفراکتیل (دارای انعکاس) می‌باشند (۱۷).

در هنگام نمونه‌برداری از موها، گلبول‌های چربی آزاد شده از غدد چربی کناری فولیکول‌ها، با قرار گرفتن بر روی ساقه‌ی موهای سالم، تصویری شبیه کونیدی‌ها، ایجاد می‌نماید. این پدیده می‌تواند منجر به گزارش کاذب عفونت‌های اکتوتریکس و یا اندوتریکس در موهای سالم گردد.

۳- گلبول‌های قرمز (اریتروسیت‌ها)

گاهی در تهیه‌ی نمونه‌های پوست و ناخن و تراشه‌های پوستی از گوش، تیز بودن اسکالپل و بی‌تجربگی فرد نمونه‌گیر، منجر به خونریزی سطحی در این نواحی می‌شود و در لام تهیه شده، گلبول‌های قرمز از نظر اندازه، شکل و انعکاس دیواره، شبیه سلول‌های مخمری دیده می‌شوند. در این موارد، وجود جوانه‌ها (Budding cells) گاهی سودوهایف و به ندرت ژرم تیوب (لوله‌ی زایا) در اشکال مخمری و نیز استفاده از رنگ‌آمیزی گرم (مخمرها، گرم مثبت) و رنگ‌های هماتولوژی مانند گیمسا و رایت کمک کننده می‌باشند (۱۷).

در بررسی میکروسکوپی ته‌نشین (رسوب) ادرار نیز، سلول‌های مخمری صاف، بی‌رنگ و اغلب بیضی شکل با دیواره‌ی انعکاسی دوگانه و اغلب جوانه‌دار بوده‌اند. ممکن است با اریتروسیت‌ها که به شکل دیسک‌های مقعرالطرفین، با مورفولوژی متنوع دارای برآمدگی‌ها یا تکه‌های سلولی (Dismorphic)، با اندازه‌های متنوع (به طور معمول ۷ میکرون)، اشتباه شوند؛ اما سلول‌های مخمری، بر خلاف اریتروسیت‌ها، در اسید و قلیا غیر محلولند و با ائوزین رنگ نمی‌گیرند. نوارهای ادراری (Dipstick/reagent strip) نیز در تأیید حضور اریتروسیت‌ها در ادرار کمک کننده هستند (۱۸-۱۷).

در این موارد نیز حضور جوانه‌ها در سلول‌های مخمری و گاهی سودوهایف در گونه‌های کاندیدا، در تشخیص افتراقی کمک کننده خواهد بود. به علاوه، می‌توان دو نمونه از رسوب ادرار، تهیه کرد. با افزودن چند قطره از محلول اسیدی شمارش گلبول سفید (اسید استیک ۲ درصد یا اسید هیدروکلریک ۱ درصد) به رسوب ادرار یکی از نمونه‌ها، بعد از ۵-۳ دقیقه، اریتروسیت‌ها را لیز کرد و سلول‌های مخمری باقی‌مانده را مشاهده نمود. گاهی اوقات، افتراق بین

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های مخمری کریپتوکوکوس نئوفورمنس از لکوسیت‌ها در لام تهیه شده از مرکب چین، مشکل است (۱۹).

در این موارد، مخمرهای کریپتوکوکال می‌توانند به وسیله‌ی حضور دیواره‌ی سلولی شفاف با انکسار نوری و نیز مشخصه‌ی جوانه‌ها از لنفوسیت‌ها و آرتیفاکت‌ها افتراق داده شوند. به علاوه، هاله‌ی اطراف لنفوسیت‌ها که قابل اشتباه با کپسول مخمر ذکر شده می‌باشد، به طور مرتب کاهش می‌یابد و در مدت زمان ۱۰-۵ دقیقه محو می‌گردد (۲۰).

۴- الیاف

در تهیه‌ی اسلایدها، از سواب‌های پنبه‌ای (Cotton swab) به علت شباهت به هایف‌ها، نباید استفاده نمود. الیاف سواب‌های مورد استفاده در هنگام جمع‌آوری و انتقال نمونه‌های بالینی، به ویژه در ضایعات دهانی، واژینال و گوش، در آزمایش مستقیم، با عناصر هایفال قارچی، قابل اشتباه می‌باشند (۱۷).

نخ‌های بخیه (Suture thread/Suture material) از مواد مختلفی مانند رشته‌های کلاژن طبیعی از روده‌ی گاو (مونوفیلامنت)، رشته‌های کرومیک مونوفیلامنت، پلی‌استر و پلی‌دی‌اکسانون (Polydioxanone) مونوفیلامنت تشکیل شده‌اند. نخ‌های بخیه به ویژه آن‌هایی که از فیبرهای گیاهی (Plant fiber) ساخته می‌شوند، از جمله نخ‌هایی که از جنس رشته‌های کتان می‌باشند، شباهت‌های زیادی به رشته‌های هایفی دارند.

این رشته‌های کتانی پهن (Flat) و در حالت تاخوردگی شبیه نوار (Ribbon like) هستند و قابلیت پولاریزه شدن دارند (۲۱). رشته‌های کتان متعلق به البسه‌ی بیمار در هنگام نمونه‌گیری، به ویژه الیاف شفاف و بی‌رنگ نیز این آرتیفکت‌ها را ایجاد می‌نماید. الیاف ذکر شده به صورت رشته‌های پهن، دراز یا کوتاه با حاشیه‌ی تیره دیده می‌شوند (۲۲). در مجموع، الیاف کتان نخ‌های بخیه یا البسه، عریض و نواری شکل، فاقد دیواره‌های سلولی و ارگانل‌های داخل سیتوپلاسمی (توخالی) و دارای تاخوردگی‌های زیاد می‌باشند. خصوصیات بیان شده برای افتراق از هایفی قارچ‌ها کفایت می‌کند.

۵- باکتری‌ها

در سطح محیط‌های کشت باکتریولوژی از جمله بلاد آگار (Blood agar) کلنی اغلب مخمرها، مورفولوژی ماکروسکوپی همانند استافیلوکوک‌ها به ویژه استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی را نشان می‌دهند (سفید، کرم، خمیر مانند، برآمده و کدر). مخمرها، همانند استافیلوکوک‌ها، دارای آنزیم کاتالاز می‌باشند. بنابراین عدم تهیه‌ی رنگ گرم یا نمونه‌ی مرطوب از جانب میکروبیولوژیست بی‌احتیاط، منجر به گزارش اشتباه کلنی مخمری به عنوان کلنی باکتریایی می‌گردد (۲۴-۲۳، ۱۷).

در اسمیرهای تهیه شده از کلنی‌های پیش‌گفته و نیز نمونه‌های بالینی و با روش رنگ‌آمیزی گرم، تصویر میکروسکوپی سلول‌های مخمری، گرم مثبت (آبی- سیاه تیره یا بنفش، ارغوانی تا سیاه) و شبیه کوکسی‌های گرم مثبت (به ویژه استافیلوکوک‌ها)، دارای آرایش خوشه انگوری یا کندویی می‌باشند (۲۳). همچنین مخمرها در رنگ‌آمیزی گرم، شبیه گونه‌های میکروکوکاسه نیز می‌باشند. این گونه‌ها کوکسی‌هایی گرم مثبت، کاتالاز مثبت و کواگولاز منفی هستند و در محیط و به صورت فلور طبیعی در روی پوست، مخاط و اوروفارنکس یافت می‌شوند.

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

میکروکوکاسه از استافیلوکوک‌ها بزرگ‌ترند و اغلب به فرم چهارتایی (تتراد) می‌باشند (۲۲).

احتمال می‌رود این شباهت‌ها علت میزان بیشتر «ان- استیل گلوکز آمین» در پپتید و گلیکان دیواره‌ی سلولی باکتری‌های گرم مثبت (تا حدود ۴۰ لایه) باشد که مانع نفوذ محلول بی‌رنگ کننده (الکل- استون) به داخل باکتری و عدم حل شدن مولکول ویوله و ید می‌شود و در نتیجه، رنگ سافرانین (صورتی) وارد باکتری نمی‌شود و باکتری‌ها همان رنگ اول یعنی کریستال ویوله‌ی بنفش (گرم مثبت) را به خود می‌گیرند (۲۷-۲۵). ترکیب اصلی دیواره‌ی سلولی اغلب قارچ‌ها، پلی ساکارید کیتین است که آن نیز پلیمر خطی «ان- استیل گلوکز آمین» با پیوندهای وسیع هیدروژنی است (۲۸). نکته‌ی قابل توجه آن که قارچ‌ها، بر خلاف باکتری‌ها فاقد پپتید و گلیکان در دیواره‌ی سلولی می‌باشند. مخمرها، ۳-۲ برابر کوکسی‌های گرم مثبت هستند و به طور معمول، اگر عامل یک عفونت باشند، دارای جوانه و سودوهایف (میسیلیوم کاذب) هستند. رنگ گرم برای یافتن قارچ‌ها مناسب نیست. بر خلاف این که اغلب قارچ‌ها با این رنگ قابل تشخیص هستند، برخی مانند گونه‌های کریپتوکوکوس به شکل ضعیفی رنگ می‌گیرند. به علاوه، قطعات هایفی ممکن است رنگ نگرفته باشند و دیدن آن‌ها مشکل باشد (۱۹). هایفی قارچ‌ها، ۳-۲ برابر پهن‌تر از باسیل‌های گرم مثبت است، اغلب به خوبی داخل آن‌ها رنگ نگرفته (احتباس ناجور رنگ کریستال ویوله) و این امر، موجب ظاهر گرانولی در آن‌ها می‌گردد. به علاوه از نظر ماکروسکوپی، سودوهایفی مخمرها به صورت بیرون آمدگی یا زایده‌های رشته‌ای پر مانند (Feathery filamentous) در اطراف کلنی، به ویژه کلنی‌های کهنه، دیده شده است که در اصطلاح به عنوان «پاها» (Feet) شناخته می‌شوند (۲۹، ۲۳، ۱۷). در تهیه‌ی لام با مرکب هندی، که برای مشاهده‌ی کپسول، به ویژه برای مخمر کریپتوکوکوس نئوفورمنس در رسوب مایع مغزی- نخاعی به کار می‌رود، باکتری‌های واجد کپسول مانند کلبسیلا پنومونیه، ممکن است با مخمرها اشتباه گرفته شوند. اما باکتری‌ها یک چهارم اندازه‌ی مخمرها را دارند و جوانه‌ای نیز ندارند (۳۰-۲۹).

۶- انگل‌ها

میکروسپوریدیا (Microsporidia)، از گروه پروتوزوآ، انگل‌های داخل سلولی اجباری (انتروسیت‌های روده)، با تصویر منحصر به فرد تولید اسپورهایی واجد یک مجموعه‌ی بیرون زده‌ی لوله‌ای شکل (Tubular extrusion) یا لوله‌ی قطبی (Polar tube) با دیواره‌ی سلولی کیتینی و با بیش از ۷۰۰ گونه می‌باشند. از روش‌های یافتن اسپورهای آن‌ها در مدفوع و اثبات میکروسپوریدیوزیس، استفاده از میکروسکوپ نوری و رنگ‌های اصلاح شده‌ی تری‌کروم (Weber-Green ,Ryan-Blue) است که به عنوان آزمون اختصاصی مورد قبول می‌باشند. اسپورهای میکروسپوریدیا، در نمونه‌ی مدفوع تهیه شده با رنگ Weber دارای مشخصات زیر می‌باشند:

۱. اندازه‌ی ۱/۵-۲/۵ × ۲/۵-۴/۰ µm
۲. شکل بیضی تا لوله‌ای (میله‌ای)
۳. رنگ صورتی- قرمز/ نارنجی تا صورتی- زرد
۴. دیواره‌ی عرضی متقاطع صورتی رنگ نازک.

وسط سلول اسپور برخی سلول‌های مخمری موجود در مدفوع نیز به رنگ صورتی و قرمز کم رنگ دیده

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

می‌شود و با اسپورهای پیش‌گفته قابل اشتباه است. کوچک بودن اندازه‌ی اسپور میکروسپوریدیا (۴-۱ µm، رؤیت با لنز ۱۰۰ ×) و مختصات قبلی بیان شده برای مخمرها (داشتن جوانه و گاهی سودوهایف)، در این افتراق کمک کننده می‌باشند (۳۰).

احتمال می‌رود اسپورهای میکروسپوریدیا، با اشکال مخمری استوانه‌ای و کشیده از جمله مخمرهای شیزوساکارومایسس (Schizosaccharomyces) به علت اندازه‌ی به نسبت کوچک این مخمرها (۱۷-۷ µm × ۳-۲)، داشتن دیواره‌ی عرضی و تبدیل سلول به دو بخش و نیز فقدان جوانه، قابل اشتباه باشند (۳۱، ۲۴، ۱۱).

به علت وجود کیتین در دیواره‌ی اسپور میکروسپوریدیا، با به کار بردن رنگ‌های دارای قدرت اتصال به پلی ساکارید کیتین از جمله 2MR Calcoflour white، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت در طول موج‌های ۴۱۵-۳۹۵ نانومتر، اسپورها دارای هاله‌ی بیضی، آبی- سفید یا فیروزه‌ای (Bluish-white, Turquoise) می‌باشند. این روش برای غربالگری سریع و حساس اسپورها در نمونه‌ی مدفوع و دیگر نمونه‌های بالینی به کار می‌رود. از طرفی، به علت حضور غنی کیتین در دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها، اشکال مختلف قارچی موجود در مدفوع، به ویژه سلول‌های مخمری، هایفی و سودوهایفی نیز ایجاد فلورسنت‌های سبز سیبی درخشان (Brilliant apple green)، سبز- زرد درخشان (Brilliant yellow-green) و آبی- سفید (Ghostly blue-white) می‌نمایند. بسیاری از آزمایشگاه‌ها، برای نمونه‌های بالینی، از رنگ‌های اصلاح شده‌ی تری کروم و نیز روش کالکوفلوروایت استفاده می‌کنند. حساسیت هر دو روش به نسبت خوب است. علاوه بر شناسایی اسپورهای میکروسپوریدیا در مقاطع بافتی (در داخل انتروسیت‌های روده) با رنگ‌های PAS (Periodic acid-schiff)، (Hematoxylin & Eosin) H&E، GMS (Gomori methenamin silver)، اسید فاست و گیمسا، میکروسکوپ الکترونی هم به عنوان استاندارد طلایی (Gold standard) در تشخیص آزمایشگاهی به کار می‌رود.

شناسایی اسپورها با یک لوله‌ی قطبی، مشخصه‌ی تمام جنس‌های میکروسپوریدیا می‌باشد (۳۲). به طور معمول، سلول‌های مخمری و دیگر عناصر قارچی موجود در مدفوع، بر حسب اندازه و شکل می‌توانند با تخم انواع کرم‌ها و کیست پروتوزوآ (به ویژه اندوکیماکس نانا)، اشتباه شوند. در نمونه‌های مرطوب تغلیظ یافته و رنگ شده با یدین (ید)، به علت شباهت سلول‌های مخمری با کیست ژیاردیا، امکان تشخیص اشتباه وجود دارد (۳۳، ۳۰، ۱۷).

کونیدی قارچ‌ها و اسپور قارچ‌های خوراکی مورل (Morel mushroom)، قابل اشتباه با تخم کرم‌ها به ویژه تخم کرم‌های قلاب‌دار می‌باشند. در نمونه‌های مرطوب تغلیظ یافته، اسپورهای قارچی به ویژه انواع آسکواسپور در آسکومیست‌ها جنس‌های چاتومیوم (Chaetomium)، آچاتومیوم (Achaetomium)، آرنیوم (Arnium) و لازیودیپلودیا (Lasiodiplodia) به علت شباهت‌های مورفولوژیکی و اولیه با کیست پروتوزوآهایی مانند ژیاردیا، کیلوماستیس و انواع انتامبا قابل اشتباه می‌باشند. مشخصات کلیدی کیست‌های ژیاردیا (اندازه، داشتن ۴ هسته، فلاژل‌های طولی، سیتوپلاسم با خاصیت انکسار در محل

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

دیواره‌ی عرضی)، کیلوماستیکس (اندازه، شکل لیمویی با زایده‌ی پستانی)، اندولیماکس نانا (اندازه و داشتن ۴ هسته)، برای تمیز دادن از عناصر قارچی کاربردی خواهند بود.

همچنین آسکواسپورهای نئوکاسموسپورا وازاینفکتا (Neocosmospora vasinfecta) به طرز اعجاب‌آوری از نظر شکل (دندانه‌دار بودن، برجستگی‌های پستانی شکل و ضخیم بودن دیواره‌ی خارجی) و رنگ (قهوه‌ای بودن) با تخم آسکاریس شباهت دارند و تشخیص را مشکل می‌سازند. کوچک‌تر بودن اندازه‌ی آسکواسپور قارچ ذکر شده (حدود ۱/۴ تخم آسکاریس)، شاخص مناسبی برای افتراق می‌باشد.

اسپور قارچ‌های خوراکی، در مدفوع گیاهخواران بسیار شایع است. اگر چه اندازه و شکل آن‌ها مشخص است، اما محتویات آن‌ها یکنواخت و غیر قابل شناسایی می‌باشد. در این موارد، بقایای هایفی متصل به یک انتهای هر اسپور، وجود دارد و اگر هایفی به طور کامل بشکند و جدا شود، یک تورفتگی خمیده در محل اتصال آشکار می‌شود. ظاهر این اشکال، شاید شبیه تخم کرم تریکوریس تریکیورا (Trichuris trichiura) باشد (۳۴، ۱۷).

آرتیفکت‌ها در هیستوپاتولوژی قارچ‌ها

مقاطع بافتی شامل اجزای مختلفی است که پس از رنگ‌آمیزی به قارچ‌ها شباهت پیدا می‌کنند. این اشکال شامل اجسام راسل (Russel bodies)، خرده‌ها و بقایای گسیخته شده‌ی هسته‌ی سلول، اجسام نشاسته‌ای، اجسام گچی (کلسیفیه)، رتیکولین و الیاف کش‌دار و ارتجاعی، عروق خونی کوچک، بقایای سرم، سلول‌های پاراکراتوتیک و غیره می‌باشند (۳۸-۳۵). با به کار بردن طیفی از رنگ‌های اختصاصی قارچ‌ها مانند GMS، PAS و به ویژه ترکیب رنگ‌های GMS (بهترین رنگ اختصاصی قارچ‌ها در بافت) و H&E، می‌توان علاوه بر شناسایی این آرتیفکت‌ها، همزمان عناصر قارچی و پاسخ بافتی به تهاجم آن‌ها را مشاهده نمود.

اجسام کلسیفیه، که ظاهر آن‌ها شبیه سلول‌های مخمری است، به وسیله‌ی اسید کرومیک به کار رفته در رنگ GMS حل می‌شوند و رنگ نمی‌شوند (۴۲-۳۹).

عروق خونی به ویژه عروق منشعب، با اندازه‌های همسان، تهی و توخالی و نیز الیاف کتان، تصویر هایفی زایگومایست‌ها را که دارای هایف‌های نوار مانند با انشعابات نامنظم، بدون دیواره‌ی عرضی و با دیواره‌های نازک، اغلب توخالی (خالی از سیتوپلاسم) و گاهی پیچ خورده و فشرده می‌باشند، تقلید می‌نمایند. با به کار بردن رنگ H&E، هایفی زایگومایست‌ها بازوفیلیک و به آسانی شناسایی می‌شوند.

رنگ مفید دیگر، کرسیل فست ویوله (Cresyl fast violet) است. هایف‌های زایگومایست، با این روش به رنگ قرمز آجری در می‌آید. شکل مخمری قارچ دو شکلی هیستوپلاسما کپسولاتوم، ممکن است با لیشمانیا دونووانی و توکسوپلاسما (Toxoplasma gondii) اشتباه شود، اما هر دو مورد با رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی قارچ‌ها رنگ نمی‌گیرند (۴۳، ۱۲).

به علاوه، توکسوپلاسما (اشکال تاکی‌زوئیت) با اندازه‌ی تقریبی ۶ µm × ۳ شکل کمان مانند (Bow-shaped /Pyriform) و هسته‌ی مرکزی تیره رنگ، از هیستوپلاسما با قطر ۴-۲ µm بزرگ‌تر است.

www.SID.ir

Archive of SID

اشکال آماستیگوت لیشمانیا، ارگانیسم‌هایی بیضی، بسیار کوچک (۴-۲ µm) و مخمر مانند، درون سیتوپلاسم هیستوسیت‌ها و ماکروفاژها می‌باشند که این تصویر افتراق آن‌ها را از سلول‌های مخمری درون ماکروفاژهای با قطر ۴-۲ µm، هیستوپلاسما کپسولاتوم مشکل می‌سازد. وجود یک کینتوپلاست میله‌ای شکل کوچک متصل به هسته در اشکال آماستیگوت، کلید افتراقی آن‌ها است. اگر چه با رنگ GMS اشکال مخمری هیستوپلاسما کپسولاتوم، به صورت خوشه‌های مخمری سیاه رنگ، احاطه شده با یک فضای روشن با ظاهر کپسول مانند (کپسول کاذب یا Pseudoencapsulated) نمایان می‌شوند (۱). وجود کینتوپلاست‌ها که با H&E به طور مشخص رنگ می‌گیرند، علاوه بر افتراق هیستوپلاسموزیس از لیشمانیازیس و بیماری شاگاس (Chagas)، برای تشخیص پنوموسیستیس (Pneumocystis jirovecii) از لیشمانیا نیز کاربردی می‌باشند. یافتن دیواره‌ی عرضی (Tranverse septum) در پنی سیلیوم مارنفئی (Penicillium marneffei) عامل کلیدی افتراق از پروتوزوآهای داخل سلولی لیشمانیا و توکسوپلاسما گوندی است (۴۴).

گونه‌های کلورلا (Chlorella spp) که نوعی جلبک سبزند، ممکن است به علت تخریب کلروفیل آن‌ها در طی فرایندهای فیکساسیون و جایگزینی در مقاطع بافتی رنگ شده با H&E، با کوکسیدیوئیدس و گونه‌های پروتوتکا اشتباه شوند (۴۵). در نمونه‌های پاتولوژی و سیتوپاتولوژی، آرایش تصادفی، فقدان ساختارهای داخلی، فقدان جوانه یا سودوهایف، عدم وجود انشعابات و دیواره‌های عرضی، فقدان واکنش التهابی بافت و قابلیت پولاریزه از کلیدهای افتراقی اشکال قارچی با دیگر ساختارها و آرتیفکت‌ها می‌باشند (۵۰-۴۶).

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر در راستای شناسایی و آشکار نمودن اهمیت بخشی پنهان در آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی، تحت عنوان «آرتیفکت‌های قارچی» ارایه شد. عدم آموزش کافی و متمرکز در این زمینه در واحدهای آموزشی دانشگاهی و عدم تجربه‌ی کافی دانش‌آموختگان رشته‌های مربوط به هنگام ورود به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، موجب تشخیص‌های نادرست عفونت‌های قارچی و به دنبال آن تجویز داروهایی ناکارآمد،گران قیمت و پر عوارض توسط پزشک می‌شود. از این رو، آموزش جامع و مطالعه‌ی عمیق این گونه مباحث و نیز برگزاری کارگاه‌های آموزشی برای دانشجویان به ویژه دانشجویان رشته‌ی علوم آزمایشگاهی پیشنهاد می‌گردد.

References

1. Brandt ME, Lockhart S, Warnock DW. Laboratory aspects of medical mycology. In: Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE, editors. Essentials of clinical mycology. 2nd ed. New York, NY: Springer; 2011. p. 6.
2. Yadav S, Saxena AK, Capoor MR, Ramesh V. Comparison of direct microscopic methods using potassium hydroxide, periodic acid Schiff, and calcofluor white with culture in the diagnosis of onychomycosis. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2013; 79(2): 242-3.
3. Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of

www.SID.ir

Archive of SID

onychomycosis. J Am Acad Dermatol 2003; 49(2): 193-7.
4. Panasiti V, Borroni RG, Devirgiliis V, Rossi M, Fabbrizio L, Masciangelo R, et al. Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. Mycoses 2006; 49(1): 26-9.
5. Haghani I, Fathi M, Abedian S, Shokouhi T, Yazdani J. Comparison of diagnostic methods in the evalution of onychomycosis. Cell J Yakhteh 2011; 12(Suppl 1): 29-30.
6. Lawry MA, Haneke E, Strobeck K, Martin S, Zimmer B, Romano PS. Methods for diagnosing onychomycosis: a comparative study and review of the literature. Arch Dermatol 2000; 136(9): 1112-6.
7. Baran R, Hay R, Haneke E, Tosti E. Onychomycosis: the current approach to diagnosis and therapy. 2nd ed. London, UK: Informa Healthcare; 2006. p. 23.
8. Shenoy MM, Teerthanath S, Karnaker VK, Girisha BS, Krishna Prasad MS, Pinto J. Comparison of potassium hydroxide mount and mycological culture with histopathologic examination using periodic acid-Schiff staining of the nail clippings in the diagnosis of onychomycosis. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2008; 74(3): 226-9.
9. Kurade SM, Amladi SA, Miskeen AK. Skin scraping and a potassium hydroxide mount. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2006; 72(3): 238-41.
10. Rippon JW. Medical mycology: the pathogenic Fungi and the pathogenic Actinomycetes. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders; 1988. p. 10.
11. Truscott W. Impact of microscopic foreign debris on post-surgical complications. Surg Technol Int 2004; 12: 34-46.
12. Evans EG, Richardson MD. Medical mycology: a practical approach. Oxford, UK: Oxford University Press; 1989.
13. Yazdanparast SA. Medical mycology: introduction to medical mycology superficial mycoses and saprophytic fungi. 1st ed. Tehran, Iran: Jahad Daneshgahi Publication; 2007. p. 65. [In Persian].
14. Davidson AM, Gregory PH. The so-called mosaic fungus as an intercellular deposit of cholesterol crystals. Can Med Assoc J 1936; 34(3): 277-8.
15. Getz K, Skillern SD, Ulrich JA. Studies on "mosaic fungus". J Invest Dermatol 1955; 25(1): 29-32.
16. Sepahvand A, Soleiman NeJhad S, Kiani AA. Mosaic funguses are errors of usual and hidden in the laboratory medical mycology. In: Abstract book: the 2th Seminar on Medical Error Prevention. Khorramabad, Iran: Negarestan; 2007. p. 61. [In Persian].
17. Pherson RA, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 22th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2011. p. 447-8, 464-73, 1163, 1173.
18. Hashemi-Rad M. Urinalysis in nephrology. Tehran, Iran: Tehran University Publication; 1993. P. 238-40. [In Persian].
19. Verweij PE, van der Lee HAL, Rijs AJMM. The role of conventional diagnostic tools. In: Maertens JA, Marr KA, editors. Diagnosis of fungal infections. 1st ed. London, UK: Informa Healthcare; 2007. p. 23.
20. Viviani MA, Tortorano AM. Cryptococcus. In: Anaissie EJ, Mc Ginnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. 2nd ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2009. p.240.
21. Janoff K, Wayne R, Huntwork B, Kelley H, Alberty R. Foreign body reactions secondary to cellulose lint fibers. Am J Surg 1984; 147(5): 598-600.
22. Qahri M, Mobasherizadeh S. A color atlas of clinical laboratory. 1st ed. Amol, Iran: Tankit; 2010. p. 12. [In Persian].
23. Fisher F, Cook NB. Fundamentals of diagnostic mycology. Philadelphia, PA: Saunders; 1998. p. 200.
24. Walker GM. Yeast physiology and biotechnology. New York, NY: John Wiley and Sons; 1998.
25. Larsen HS, Mahon CR. Laboratory identification of significant isolates, staphylococci. In: Mahon CR, Manuselis G, editors. Text book of diagnostic microbiology. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2000. p. 336-7.
26. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Meitzner TA. Jawetz, Melnick, and Adelberg's medical microbiology. 26th ed. New York, NY: Mc Graw Hill; 2013. p. 23-4.
27. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 12th ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier; 2007. p. 256-7.
28. Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. The fungi. 2nd ed. London, UK: Academic Press; 2001. p. 99-100.
29. Kern ME, Blevins KS. Medical mycology a self- instructional text. 2nd ed. Philadelphia , PA: F.A. Davis Company; 1997.
30. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams of Wilkins; 2006. p. 1201, 1299, 1309, 1311, 1272.

www.SID.ir

Archive of SID

31. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2000. p: 676-7.

32. Garcia LS. Laboratory identification of the microsporidia. J Clin Microbiol 2002; 40(6): 1892-901.

33. Gourguechon S, Holt LJ, Cande WZ. The Giardia cell cycle progresses independently of the anaphase-promoting complex. J Cell Sci 2013; 126(Pt 10): 2246-55.

34. de Hoog GS, Cuarro GJ, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2001. P. 248, 257, 266-69, 277, 289, 325, 335, 438, 1013.

35. Pierard GE, Quatresooz P, Arrese JE. Spotlight on nail histomycology. Dermatol Clin 2006; 24(3): 371-4.

36. Stratton ChW, Laposata M. Clinical microbiology: quality in laboratory diagnosis. New York, NY: Demos Medical Publishing; 2011. p. 70-1.

37. Sobonya RE. Fungal diseases, including. pneumocystis. In: Churg AM, Myers JL, Tazelaar HD, Wright JL, editors. Thurlbeck's pathology of lung. 3rd ed. New York, NY: Thieme; 2005. p. 305-8.

38. Sellon DC, Long MT. Equine infectious diseases. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2014. p. 396-7.

39. Alkhayat H, AL-Sulaili N, O'Brien E, McCuaig C, Watters K. The pas stain for routine diagnosis of onychomycosis. Bahrain Med Bull 2009; 31(2): 1-8.

40. Weinberg JM, Koestenblatt EK, Jennings MB. Utility of histopathologic analysis in the evaluation of onychomycosis. J Am Podiatr Med Assoc 2005; 95(3): 258-63.

41. Wulff S. Staning methods: microoganisms. In: Wulff S, Hafer L, Cheles M, Couture R, Holliday JM, Smith S et al. Guide to special stains. Carpinteria, CA: Dako Cytomation; 2004. p. 64-9.

42. Chandler FW, Watts JC. Pathologic diagnosis of fungal infections. Chicago, IL: Amer Society of Clinical; 1987.

43. Hashemi SJ, Nasrollahi A, Bayat M. Illustrated histopathology of fungal disease and actinomycosis. 1st ed. Tonekabon, Iran: Tonekabon Islamic Azad University Publication; 2008. p. 56, 64. [In Persian].

44. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. Clin Microbiol Rev 2011; 24(2): 2 47-80.

45. Smith MB, McGinnis MR. Diagnostic histopathology. In: Hospenthal DR, Rinaldi MG, editors. Diagnosis and treatment of human mycoses. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2008. p. 44.

46. Powers CN. Diagnosis of infectious diseases: a cytopathologist's perspective. Clin Microbiol Rev 1998; 11(2): 341-65.

47. Almarzooqi S, Leber A, Kahwash S. Artifacts and organism mimickers in pathology: case examples and review of literature. Adv Anat Pathol 2010; 17(4): 277-81.

48. Haensch R, Seeliger H. Problems of differential diagnosis of blastomyces and Russell bodies. Arch Dermatol Res 1981; 270(4): 381-5.

49. Patterson JW. An extracellular body of plasma cell origin in inflammatory infiltrates within the dermis. Am J Dermatopathol 1986; 8(2): 117-23.

50. Sangoi AR, Rogers WM, Longacre TA, Montoya JG, Baron EJ, Banaei N. Challenges and pitfalls of morphologic identification of fungal infections in histologic and cytologic specimens: a ten-year retrospective review at a single institution. Am J Clin Pathol 2009; 131(3): 364-75.

www.SID.ir