تشخيص الاصابات الفطرية Diagnosis of Fungal Infections

تعتبر مرحلة تشخيص الاصابات الفطرية من التحديات الصعبة لدى العاملين بهذا المجال كون الفطريات تتشابه من الناحية التركيبية مع الانسان والحيوان (كون الفطريات حقيقية النواة تتشابه خلويا الى حد ما مع الكائنات حقيقية النواة الاخرى)

هناك العديد من الطرق الروتينية كالفحص المجهري المباشر والزرع على الاوساط الزرعية المعتمدة بشكل كبير في المؤسسات الصحية الخاصة والعامة لكنها تحتاج الى وقت اطول ولا يتم التوصل لتشخيص الفطر المسبب على مستوى النوع species ا فضلا عن ذلك هناك طرق متطورة حديثة اكثر دقة وتستغرق فترة اقل للتشخيص.

1. Microscopic and cultural methods (Classical Methods)

- من الطرق الاساسية والرئيسية في تشخيص الفطريات والتي لا يمكن الاستغناء عنها على الرغم من وجود طرق اكثر حداثة.
- تتضمن خطوة الفحص المجهري المباشر من خلال فحص العينات المرضية بشكل مباشر تحت المجهر الضوئي باستخدام بعض المواد الكيمائية البسيطة والصبغات مثل

(KOH 10%, N-acetyl L- cysteine, Gram stain, periodic acid shiff stain)

حيث تستخدم هذه المواد لإذابة خلايا المضيف واظهار التراكيب الفطرية التي يتم من خلالها تشخيص الحالة المرضية. وتعتبر خطوة مهمة لتأكيد وجود الاصابة .

- تليها خطوة الزرع على الاوساط الزرعية المناسبة حسب نوع العينة المرضية ومكان الاصابة حيث يتم الزرع عادة على وسط Sabouraud Dextrose Agar (SDA) بإضافة او عدم اضافة مادة السايكلوهيكسمايد التي تثبط من نمو الفطريات المترممة والتي تنمو اسرع من الفطريات المسببة للاصابة وبالتالي تعطي نتيجة خاطئة.
يستغرق نمو الفطريات على الاوساط الزرعية الروتينية عادة فترة زمنية تتراوح من 3-14 يوم وفي بعض الاصابات الفطرية يتطلب الحضن لفترة اطول من ذلك (شهر او شهرين) ويكون الزرع عادة على درجة حرارة 35-37˚C .
- بعد ظهور النمو الفطري على الاوساط الزرعية يتم فحص النمو من خلال عمل شرائح زجاجية مصبغة بصيغة lactophenol cotton blue للتأكد من تشابه التشخيص مع ما تم تشخيصه في الفحص المجهري المباشر. (لماذا)
- تحتاج الطرق الروتينية للتشخيص الى شخص خبير ومتمرس باختصاص الفطريات كونها تعتمد على العديد من الصفات المظهرية مثل حجم وشكل ولون ورائحة المستعمرة فضلا عن الصفات المجهرية الاخرى مثل شكل الخيوط الفطرية والحوامل والكونيديات وحجمها التي يوجد تشابه وتقارب كبير بين الانواع الفطرية في هذه الصفات ومن المحتمل ان يحدث خطا بالتشخيص اذا لم يكن للعاملين في المختبر خبرة بتشخيص الفطريات وبالتالي يحدث خطا باختيار العلاج المناسب للمريض.

2. Physiological methods (Fermentation and assimilation tests)

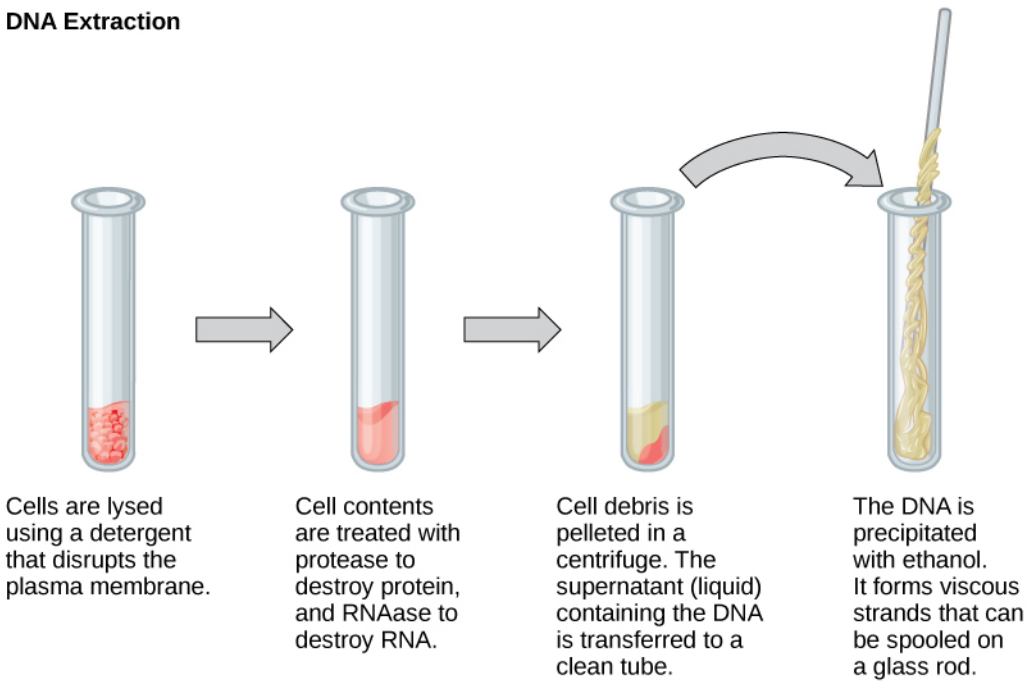
بعض الانواع الفطرية وبالاخص الخمائر لا يمكن ان تشخص بالاعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية فقط كونها تعتبر فطريات احادية الخلية unicellular fungi ويقتصر شكلها على خلايا خميرية بيضوية او كروية بأحجام مختلفة وذات الوان مستعمرات متفاوتة قليلا او كثيرا ، لذلك لا بد من اللجوء للاختبارات الفسلجية التي تعتمد على تخمر وتمثيل السكريات. وتتم هذه الاختبارات اما بشكل يدوي Manual او من خلال استخدام عدد تشخيصية خاصة (مثل API 20 Candida) او باستخدام اجهزة خاصة لهذا الغرض مثل جهاز الفايتك Vitek.

3. Molecular Diagnosis methods

من الطرق التي تعطي دقة بالنتائج اكثر من الطرق الروتينية وتتطلب الطرق الجزيئية استخلاص المادة الوراثية للفطريات DNA وبعد ذلك يتم تضخيم المادة الوراثية من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) والتي تتم بالخطوات الموضحة في الشكل الاتي.

وتتم عملية استخلاص الـ DNA من خلال خطوات اساسية تتضمن

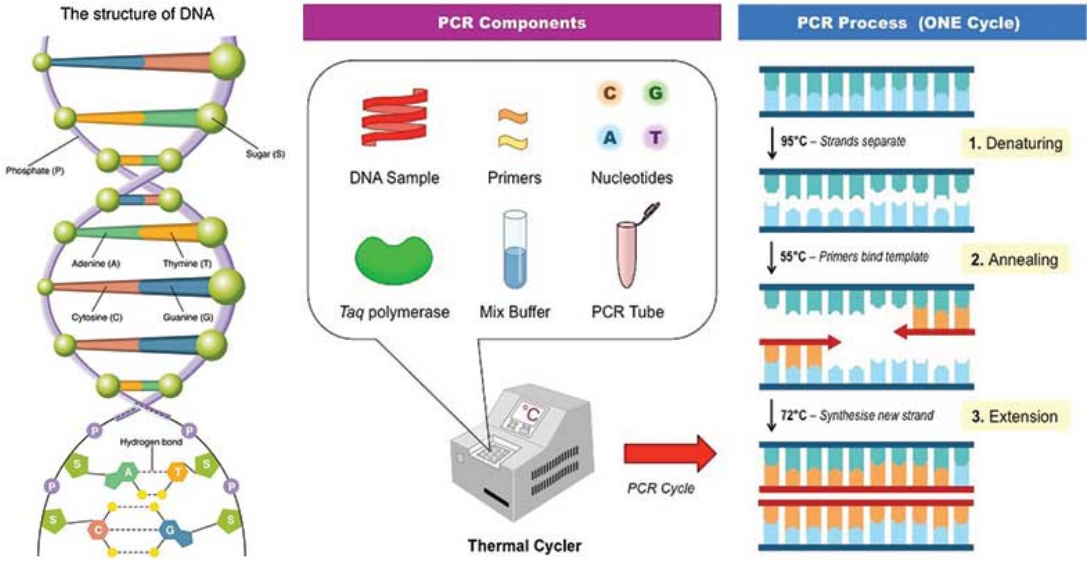
Step 1. Cell Wall and Cell Membrane lysis.
Step 2. Protein precipitation by proteinase K and RNA lysis by RNase.
Step 3. DNA precipitation by isopropanol or ethanol



من السلبيات التي تحدد من استخدام هذه الطريقة في تشخيص العينات المرضية للفطريات

١. ليس من السهل الحصول على DNA الفطريات من العينات المرضية
٢. ليس من السهل ايضا اخذ خزعات نسيجية Biopsy من المرضى الذين يعمون من الاصابات الفطرية.
٣. من المحتمل جدا حدوث تلوث بالعينة وبالتالي حدوث خطا بالنتيجة.

والشكل ادناه يوضح الطريقة التي يتم من خلالها استنساخ وتضخيم قطعة الـ DNA المستخلصة من الفطريات من اجل تشخيصها لاحقا



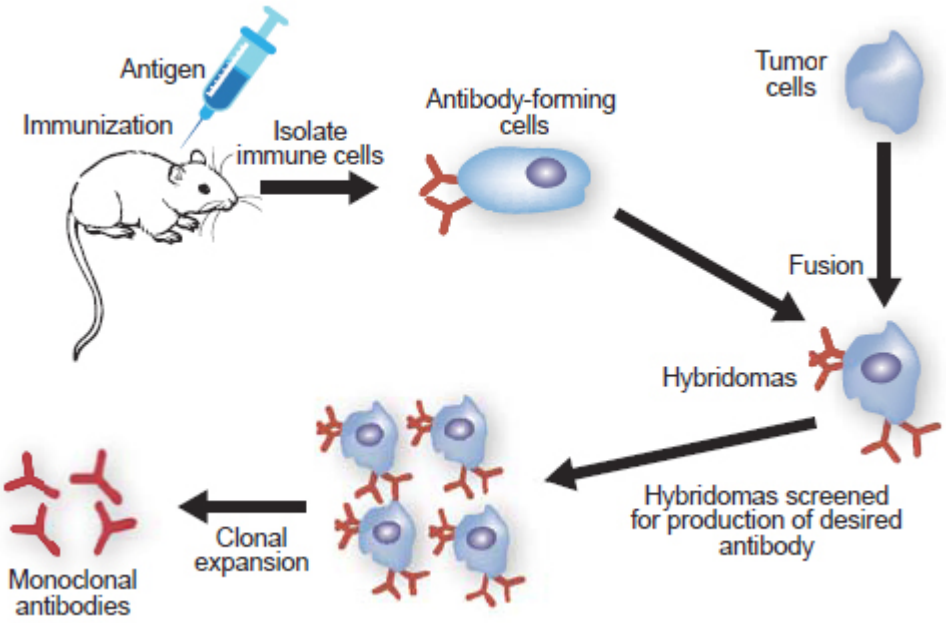
4. Radiology Methods

من الطرق المبدئية غير المتخصصة التي يعتمدها الطبيب المعالج من اجل التأكد من وجود شيء غير طبيعي في الرئة او اي عضو اخر مثل استخدام الاشعة السينية X-ray والاشعة المقطعية CT-scan في تشخيص حالات الاصابة الفطرية الجهازية والمنتشرة systemic and disseminated mycoses .

5. Immuno-diagnosis methods

تعتبر الطرق المناعية من الطرق الحديثة والدقيقة والسريعة في تشخيص الاصابات الفطرية والتي تعتمد على مبدأ التفاعل بين الجسم المضاد والمستضد الفطري الخاص (Antigen-Antibody) حيث يكون الجسم جسم مضاد خاص Antibody لكل مستضد فطري معين يعود لنوع حاص.

ويتم الحصول على ما يسمى Monoclonal antibody (MAb) من خلال تقنية الـ Hybridoma وحسب ما موضح في الشكل ادناه:



يتم تشخيص الطرق المناعية بطريقة الـELIZA وهي مختصر لجملة Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay وفكرة الطريقة يوضحها الشكل التالي: