دستورالعمل اجرائی آزمایش مایع مغزی نخاعی برای جدا کردن و شناسائی عوامل قارچی با تأکید بر کریپتوکوکوس نئوفرمنس

دکتر محمد قهری – آزمایشگاه تشخیص طبی رسالت
www.resalatlab.com

مقدمه

علائم عمومی منتژیت‌های قارچی

مایع مغزی نخاعی (CSF) در این بیماران معمولاً دارای منظره‌ی شفاف است. سطح پروتئین عموماً افزایش یافته است و ممکن است بیشتر از یک گرم در لیتر باشد. قند آن معمولاً پائین است. تعداد سلول‌ها در هر میلی‌متر مکعب افزایش متوسطی دارد (از چندین عدد تا چند صد عدد).

آزمایش مستقیم میکروسکپی

حداقل 10 میلی‌لیتر از مایع CSF را سانتریفیوژ کرده و رسوب آن را مورد آزمایش مستقیم میکروسکپی و کشت قرار می‌دهند. گسترش مرطوب شامل آزمایش مستقیم یک قطره از رسوب، تهیه لام با مرکب چین و رنگ‌آمیزی‌ها شامل متیلن‌بلو، گرم، کالکوفلوروایت، گیمسا، گوموری متنامین سیلور و PAS می‌باشد.

منظره میکروسکپی از رسوب CSF در یک نگاه اجمالی

کریپتوکوکوس نئوفرمنس: مخمرهای کپسول‌دار (5 تا 10 میکرون و با کپسول20 تا30 میکرون قطر دارند). درمننژیت کریپتوکوکوسی عموماً منونوکلئرها غلبه دارند و منتژیت مزمن لنفوسیتیک ایجاد می‌کنند. مخمرهای جوانه‌دار کوچک (3 تا 5 میکرون) بویژه اگر همراه با هایفی یا سودوهایفی دیده شود دلالت بر **کاندیدا** می‌کند. منتژیت حاد یا نوتروفیلیک غالباً در منتژیت کاندیدائی دیده می‌شود. باید توجه داشت که کاندیدا گلابراتا فقط شامل بلاستوکونیدی (2.5 تا 4.5 میکرون) است. اندازه‌ی سلول‌های مخمری **هیستوپلاسما کپسولاتوم** کوچک‌تر (2 تا 4 میکرون) است. سلول‌های بلاستومایسس درماتیتیدیس بزرگتر (8 تا 15 الی 30 میکرون) می‌باشند. در منتژیت ناشی از **بلاستومایسس درماتیدیس** پلی مرفونوکلئرها غلبه دارند. هیستوپلاسما و بلاستومایسس در بافت معمولاً هایفی ندارند. در منتژیت **قارچ‌های رشته‌ای** نوتروفیل‌ها غلبه دارند. قارچ‌های رشته‌ای بیشتر

موجب گرانولوما یا آبسه‌ی مغزی می‌شوند تا مننژیت. در مننژیت ناشی از کوکسیدیوئیدس ایمیتیس ائوزینوفیل‌ها حضور دارند و مننژیت گرانولوماتوزی ایجاد می‌کند.

عوامل قارچی ایجادکننده مننژیت: کریپتوکوکوس نئوفرمنس، کریپتوکوکوس گتی، گونه‌های کاندیدا، گونه‌های آسپرجیلوس، کوکسیدیوئیدس ایمیتیس، بلاستومایسس درماتیتیدیس، هیستوپلاسما کپسولاتم، اسپوروتریکس شنکئی، پاراکوکسیدیوئیدس برازیلینسیس و پنی‌سیلیوم مارنفئی و علل قارچی نادر شامل کلادوفیالوفورا بانتیانا، موکور، رودوتورولا می‌باشند.

علل زمینه‌ای: پیوند ارگان، شیمی درمانی سرطان، بستری بودن در ICU، بیماران دارای اختلالات سیستم ایمنی، سرکوبی سیستم ایمنی، بدخیمی‌های خونی (لوسمی، لنفوم)، درمان‌های کورتیکوستروئیدی، بیماری‌های التهابی (سارکوئیدوز)، نوزادان نارس، بیماران HIV مثبت.

کریپتوکوکوس نئوفرمنس

مایع نخاع شفاف و به ندرت زرد رنگ یا کدر است. تعداد لکوسیت‌ها افزایش دارد ولی معمولاً از 800 سلول تجاوز نمی‌کند. تعداد لنفوسیت‌ها اغلب بالا است اما گاهی نوتروفیل‌ها هم زیاد می‌شوند. پروتئین بین 40 تا 600 میلی‌گرم درصد متغیر است. میزان قند پائین است (اغلب حدود 10 میلی‌گرم درصد).

آزمایش میکروسکپی با پتاس 10٪، رنگ‌آمیزی با گیمسا و استفاده از روش اختصاصی مرکب چین (مخمرهای گرد به قطر 5 تا 20 میکرون، اتصال نقطه‌ای جوانه به سلول مادر، کپسول ضخیم ژلاتینی) برای تشخیص ارگانیسم صورت می‌گیرد. بجز گونه‌های غیرعادی کلیه مخمرهای جنس کریپتوکوکوس مخمرهائی بدون رشته، کپسول‌دار و بدون رنگدانه کاروتنوئید هستند. انواع کریپتوکوکوس‌ها اوره‌آز مثبت هستند و در محیط حاوی اوره با ایجاد کربنات آمونیوم (قلیائی) رنگ محیط را بعد از چهار روز قرمز می‌کنند. کریپتوکوکوس‌ها عمدتاً هیچیک از قندها را تخمیر نمی‌کنند. حساسیت آنها در مقابل اکتیدیون متغیر است. (بطور کلی 0.1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از رشد کریپتوکوکوس در محیط کشت جلوگیری می‌کند). همچنین تولید آنزیم فنل اکسیداز می‌کنند.

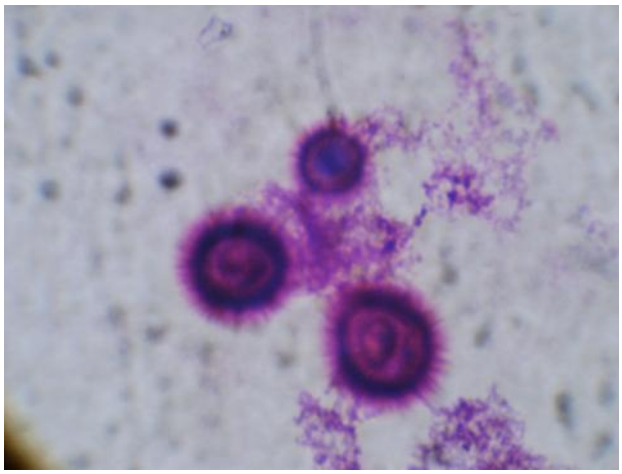
تشخیص آزمایشگاهی مننژیت کریپتوکوکوسی در بیماران ایدزی:

تعداد زیاد ارگانیسم در CSF این بیماران موجب مثبت شدن آزمایش مستقیم میکروسکپی با مرکب چین می‌شود (70 تا 90٪ موارد نتیجه مثبت است). توضیح اینکه درآزمایش مرکب چین هنگامی که تعداد سلول در هر میلی‌لیتر بین 1000 تا 10.000 باشد نتیجه مثبت خواهد بود. در بیماران ایدزی این میزان برابر 100.000 الی 10.000.000 سلول است. لکوسیت‌ها، قطرات چربی، سلول‌های بافتی و گلبول‌های میلین ممکن است با اشتباه گرفتن با عناصر مخمری موجب نتیجه مثبت کاذب در آزمایش مرکب چین گردند. سانتریفیوژ کردن نمونه با دور 500 در دقیقه بمدت 10 دقیقه حساسیت

این تست را افزایش می‌دهد. (casadevall, 1998). تعداد گلبول‌های سفید کاهش دارد و یا ممکن است نرمال باشد.

تشخیص آزمایشگاهی مننژیت کریپتوکوکوسی در بیماران غیرایدزی:

آزمایش مرکب چین تقریباً در 50٪ بیماران مثبت است. تعداد گلبول‌های سفید مایع نخاع افزایش نشان می‌دهد و اکثراً از نوع لنفوسیتی هستند.



کریپتوکوکوس نئوفرمنس – رنگ‌آمیزی گرم، بزرگنمائی 1000

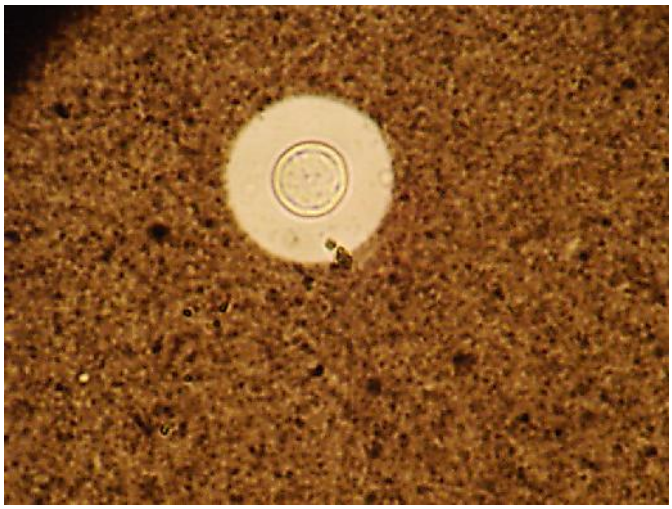
کشت:

معمولاً در مدت 48 تا 72 ساعت رشد می‌کند. دمای مطلوب برای رشد آن 30 تا 35 درجه است هرچند که در 37 درجه سانتی‌گراد نیز رشد می‌کند. (سابورو دکستروز آگار محتوی کلرامفنیکل، محیط خوندار و BHI). در مقابل حرارت بسیار حساس است و در دمای 40 تا 42 درجه رشد نمی‌کند. کلنی‌های سفید خامه‌ای با هاله‌ای صورتی ظاهر می‌شود که بعد از 5 تا 8 روز سطح کلنی‌ها صاف، مرطوب و موکوئیدی شده و به رنگ گل اخرا در می‌آیند. کشت از حجم زیاد CSF و تکرار نمونه‌گیری می‌تواند کمک‌کننده باشد. محیط کشت اختصاصی birdseed agar است که محتوی ترکیبات دی‌فنولیک بوده و Cryptococcal laccase موجب تشکیل ملانین و در نتیجه ظهور کلنی‌های قهوه‌ای رنگ می‌شود.

از محیط کشت اختصاصی Concanavine-glycin thymol blue agar برای تشخیص افتراقی کریپتوکوکوس نئوفرمنس از کریپتوکوکوس گتی استفاده می‌شود. (زمان انکوباسیون این محیط 5 روز در دمای 30 درجه می‌باشد). در این محیط کریپتوکوکوس گتی رنگ سبز محیط کشت را به رنگ آبی تبدیل می‌کند. باید توجه داشت که مخمرهای دیگری نظیر کریپتوکوکوس لورنتی (C. laurentii) و

تریکوسپورون موکوئیدس نیز می‌توانند موجب تغییر رنگ این محیـــــــــــــط کشت شوند (CGB- positive)، اما هردو این مخمرها از نظر تولید ملانین منفی هستند. بنابراین تست CGB فقط برای تشخیص افتراقی کریپتوکوکوس گتی از کریپتوکوکوس نئوفرمنس مفید است. در یک مطالعه از 149 بیمار HIV منفی مبتلا به مننژیت 89٪ آنها کشت مثبت داشته اند. (pappas, 2001) در بیماران ایدزی این میزان برابر 95 تا 100٪ بوده است. (zugen, 1986 & Kovacs, 1985). آزمایش مستقیم و کشت اختصاصی هستند ولی دارای میزان حساسیت برابر با 50 تا 80 درصد می‌باشند.

کریپتوکوکوس نئوفرمنس – مرکب چین، بزرگنمائی 100 برابر



کریپتوکوکوس نئوفرمنس – مرکب چین، بزرگنمائی 400 برابر

سرولوژی:

اندازه‌گیری آنتی‌بادی سودمند نیست. اندازه‌گیری آنتی‌ژن کریپتوکوکال تست سریع و ساده‌ای است. آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس و الایزا دارای حساسیت بیش از 90٪ (در بعضی گزارش‌ها حساسیت آگلوتیناسیون لاتکس 85٪ و حساسیت الایزا را حدود 805 ذکر کرده‌اند) و تیتر بیشتر از یک چهارم (1/4) بسیار اختصاصی است. تیتر مساوی یا بیشتر از 1/8 نشان‌دهنده‌ی عفونت فعال است. در بیماران HIV مثبت بدون علامت، با کمک این تست می‌توان تشخیص سریع و زودرس انجام داد.

چند نمونه از تحقیقاتی که در آنها حساسیت آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس مطالعه شده است:

در 16 مورد مننژیت کریپتوکوکی	(kovacs, 1985)	٪100
در 26 مورد مننژیت کریپتوکوکی	(zugen, 1980)	٪92
در 88 مورد مننژیت کریپتوکوکی	(chuck, 1989)	٪91
در 40 مورد مننژیت کریپتوکوکی	(clark, 1990)	٪92.5

در افراد HIV منفی: در سایر بیماران بویژه افراد دارای ایمنی شایسته، کشت و آزمایش آنتی‌ژن CSF گاهی اوقات منفی و در نتیجه تشخیص مشکل است.

علل بروز واکنش مثبت کاذب در تست آگلوتیناسیون لاتکس:

فاکتور روماتوئید

کانسر (بسیار ضعیف)

عفونت مربوط به تریکوسپورون (آنتی‌ژن پلی‌ساکاریدی کپسولی شبیه کریپتوکوک تولید می‌کند)

عفونت مربوط به Stomatococcus mucilaginosis (آنتی‌ژن کپسولی تولید می‌کند که واکنش متقاطع با کپسول کریپتوکوک می‌دهد)

عفونت با Capnocytophaga canimorsus

آلودگی با ابزارهای آزمایشگاهی (during pippeting)

آلودگی به هنگام استفاده از مواد ضدعفونی کننده و صابون برای تمیز کردن اسلایدها، آلودگی با آگار و آگارز

برای جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته:

نمونه‌ها باید با آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند پروناز آماده‌سازی شوند و با 2- بتا مرکاپتواتانول یا دی تیوتریتول احیاء شوند.

واکنش‌های منفی کاذب ممکن است بعلت اثر پروزون، عفونت با یک استرین با کپسول بسیار ضعیف، بار پائین ارگانیسم در نمونه و یا مشکلات مربوط به کیت دیده شوند.

منشأ آسپرجیلوسی

از طریق دستگاه تنفس و سینوس‌های اطراف بینی وارد بدن می‌شود. تهاجم به سیستم اعصاب مرکزی بوسیله‌ی تلقیح مستقیم به نواحی که به لحاظ آناتومیک نزدیک مغز هستند و یا بوسیله‌ی انتشار هماتوژنوس صورت می‌گیرد. علاوه بر عفونت اولیه در ریه‌ها، انتشار خونی بوسیله‌ی تلقیح مستقیم به داخل جریان خون از طریق گوش میانی، سینوس‌های اطراف بینی، چشم و ماستوئید و یا در نتیجه‌ی عمل جراحی قلب باز اتفاق می‌افتد. آسپرجیلوس فومیگاتوس و آسپرجیلوس فلاووس از عوامل شایع هستند. آسپرجیلوس ترئوس اگرچه یک عامل غیرمعمول تهاجم به سیستم اعصاب مرکزی است اما به لحاظ مقاومت به آمفوتریسین B دارای اهمیت است و مرگ و میر بالائی دارد.

اقدامات آزمایشگاهی:

آماده‌سازی نمونه: نمونه CSF به مدت 10 دقیقه با دور 10000 سانتریفیوژ شود.

رسوب: برای آزمایش میکروسکپی از روش رنگ‌آمیزی گرم و متیلن بلو و کالکوفلور وایت استفاده شود.

کشت: در محیط سابورو دکستروز آگار محتوی 10٪ کلرامفنیکل و آبگوشت سابورو تلقیح شده و محیط آبگوشتی را در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 هفته نگهداری می‌نمایند. کشت‌های مثبت هنگامی بدست می‌آیند که حجم زیادی از نمونه به محیط کشت تلقیح شود (ترجیحاً 5 میلی‌لیتر و بیشتر).

سرولوژی: اندازه‌گیری آنتی‌ژن اختصاصی آسپرجیلوس (گالاکتومانان) در سرم و مایع مغزی نخاعی توسط ساندویچ الایزا به تشخیص کمک می‌کند.

نحوه انجام آزمایش بر روی نمونه CSF از نظر عوامل قارچی (با تأکید بر کریپتوکوکوس نئوفرمنس)

توجه: تا قبل از انجام کشت نمونه نباید در یخچال قرار گیرد زیرا استرین‌های کریپتوکوکوس نسبت به دمای پائین حساس بوده و از بین می‌روند.

- ابتدا نام و مشخصات بیمار بدقت ثبت شود.
- حجم نمونه اندازه‌گیری و ثبت شود.
- رنگ و میزان شفافیت یا کدورت نمونه بدقت ثبت شود.
- تمام نمونه بمدت 15 دقیقه با دور 1000 سانتریفوژ شود.
- مایع روئی به لوله استریل دیگری برای انجام تست‌های سرولوژیک منتقل شود.

از رسوب نمونه (pellet) آزمایش مستقیم میکروسکپی و کشت انجام می‌شود. ابتدا رسوب را خوب به هم زده تا مخلوط همسانی بدست آید، سپس:

الف- آزمایش‌های میکروسکپی از رسوب:

1- **آزمایش مستقیم میکروسکپی**:

هدف: بررسی وجود یا فقدان عناصر قارچی (هایفی کاذب و مخمرهای جوانه‌دار) و آمیب‌های آزادزی (Amphizoic Amoeba) مانند نگلریا و آکانتاموبا.

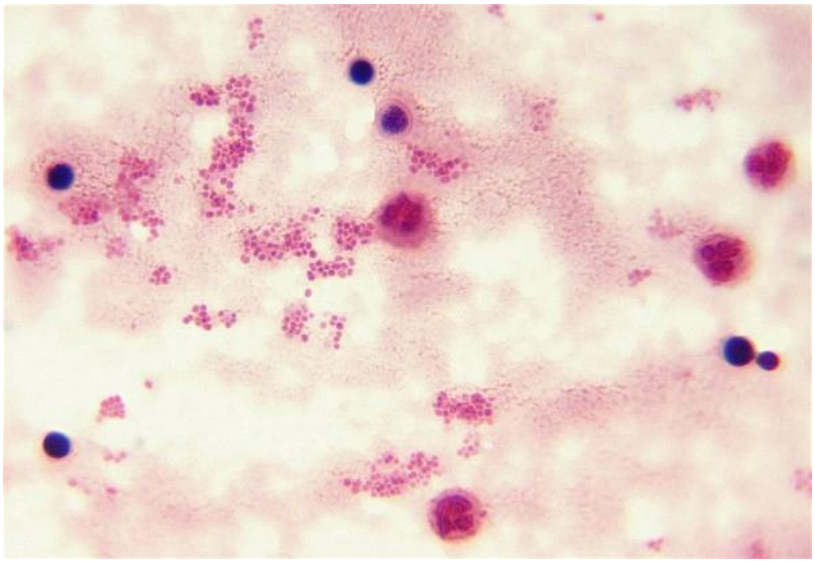
روش کار: تهیه لام مرطوب بصورت مستقیم با برداشت یک قطره از رسوبی که خوب مخلوط شده‌است و قرار دادن آن روی لام و مشاهده میکروسکپی با عدسی 10 و 40. وضعیت گلبول‌های قرمز و سفید نیز در این آزمایش از نظر فراوانی در نظر گرفته می‌شود.

2- **تهیه لام با مرکب چین**: یک قطره از رسوب CSF را روی لام قرار داده و به آن یک قطره مرکب چین (که حجم آن یک سوم حجم قطره‌ی برداشت شده از مایع CSF باشد) افزوده و بعد از مخلوط کردن با عدسی 10 و 40 بررسی می‌کنیم. در صورت وجود سلول‌های مخمری کپسول‌دار اطراف این سلول‌ها هاله‌ی ضخیم و شفافی دیده می‌شود و با عدسی 10 منظره شبیه آسمان سیاه پرستاره مشاهده می‌گردد. برخی از استرین‌های کریپتوکوک فاقد کپسول و یا برخی ممکن است دارای کپسول ظریفی باشند. مخمرهای کپسول‌دار در CSF حدود 60درصد بیماران مبتلا دیده می‌شود. حساسیت این آزمایش را از 60٪ تا 72٪ گزارش کرده‌اند.

توجه : برای تهیه لام جهت رنگ‌آمیزی‌های زیر ابتدا لام را به صورت زیر تهیه کنید:
یک قطره درشت از رسوب را روی لام قرار داده و بدون اینکه آن را پهن کرده یا بگسترانید اجازه دهید در مجاورت هوا خشک شود. بعد از خشک شدن یک قطره‌ی دیگر به همین شکل روی قطره‌ی خشک شده ریخته و مجدداً اجازه دهید تا در مجاورت هوا خشک شود. سپس لام را با کمک حرارت مختصر و یا بکمک متانول فیکس نموده و رنگ‌آمیزی‌های زیر را انجام دهید. (به اینصورت یک گسترش نسبتاً ضخیم و پرسلول حاصل خواهد شد که مشاهده و بررسی میکروسکپی آن سریع‌تر و دقیق‌تر خواهد گردید).

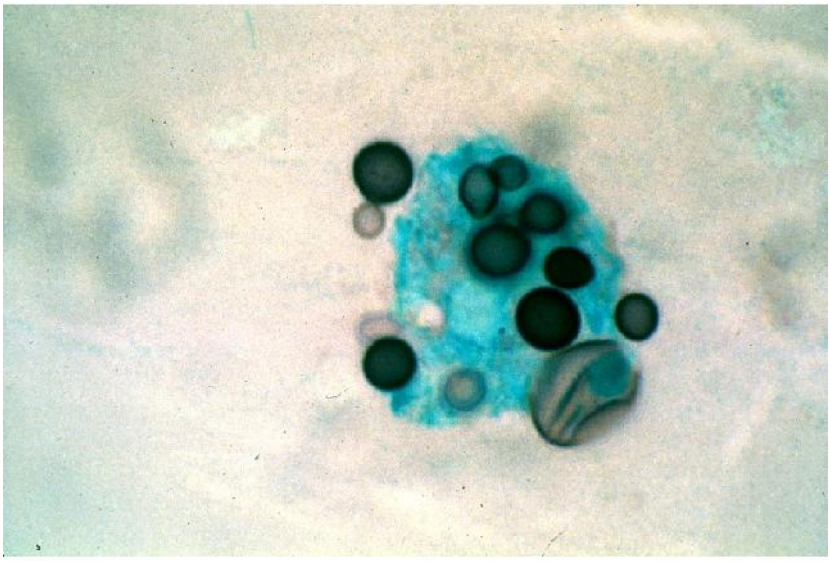
3- **رنگ‌آمیزی گیمسا** یا رایت گیمسا: از همان دستورالعمل رنگ‌آمیزی برای هماتولوژی استفاده می‌شود. هدف بررسی وضعیت گلبول‌های سفید از نظر برتری حضور منونوکلئرها یا پلی‌نوکلئرها و نیز مشاهده احتمالی سلول‌های مخمری می‌باشد.

4- **رنگ‌آمیزی گرم**: هدف بررسی وجود احتمالی عناصر باکتریال و نیز سلول‌های مخمری می‌باشد.



گسترش از خلط بیمار مبتلا به لنفوم، رنگ‌آمیزی گرم: سلول‌های مخمری کریپتوکوکوس نئوفرمنس و کوکسی‌های گرم منفی موراکسلا کاتارالیس می‌باشند

5- رنگ‌آمیزی کانیون: برای بررسی وجود احتمالی باکتری‌های رشته‌ای نظیر نوکاردیا می‌باشد.



کریپتوکوکوس نئوفرمنس – رنگ‌آمیزی گوموری متنامین سیلور (GMS)

ب- کشت از رسوب در محیط‌های زیر انجام گیرد:

سابورودکستروز آگار، سابورو کلرآمفنیکل‌دار، BHI و انکوباسیون در دمای آزمایشگاه یا 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 تا 5 روز

محیط ژلوز خوندار و انکوباسیون در 37 درجه سانتی‌گراد و **محیط ژلوز شکلاتی** و انکوباسیون در شرایط 5 تا 10 درصد گاز کربونیک و 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 تا 5 روز

محیط کشت Lowenstein-Jensen: کشت از نظر AFB در هر نمونه باید صورت گیرد. این کشت‌ها تا یکماه باید در شرایط 37 درجه سانتی‌گراد. نگهداری شوند.

توضیحات:

میزان حساسیت کشت را حدود 56٪ گزارش می‌کنند. کشت حجم زیادی از نمونه و در بعضی موارد کشت نمونه‌های متعدد حساسیت کشت را افزایش می‌دهد.

پلیت‌های حاوی محیط‌های کشت فوق را باید روزانه از نظر رشد بررسی و تا 3 هفته نگهداری کرده و در صورت عدم رشد بعد از 3 هفته منفی تلقی نمود. رشد هرگونه کلنی با رنگ‌آمیزی گرم مورد بررسی قرار گیرد و در صورت مشاهده سلول‌های مخمری رنگ‌آمیزی کپسول (مرکب چین و یا رنگ نیگروزین10٪) انجام شود.

کریپتوکوکوس نئوفرمنس معمولاً ظرف 2 تا 3 روز بصورت کلنی‌های کرم رنگ سفید تا زرد مایل به قهوه‌ای ظاهر می‌شوند. استرین‌های کپسول‌دار کلنی‌های براق و درخشانی را ایجاد می‌کنند و استرین‌هائی که فاقد کپسول بوده یا کپسول ضعیفی دارند خشک به نظر می‌رسند.

ممکن است بعد از 24 الی 48 ساعت کلنی‌های سفید خامه‌ای با هاله‌ی صورتی ظاهر شوند که بعد از 5 تا 8 روز بصورت کلنی‌های صاف، مرطوب و موکوئیدی به نظر برسند. در محیط سابورو مالتوز آگار کلنی‌ها رنگ گل اخرا به خود می‌گیرند.

در محیط EMB بعد از یک هفته بصورت مرطوب و سیال در می‌آیند.

در صورت رشد کلنی‌های مخمری مشکوک به کریپتوکوکوس نئوفرمنس به منظور تأئید حداقل می‌توان از تست‌های زیر کمک گرفت:

تست هیدرولیز اوره در محیط chrisensen’s urea agar (نتیجه مثبت است)

تست احیاء نیترات (نتیجه منفی است)

تست فنل اکسیداز (نتیجه مثبت است)

با توجه به اینکه رنگ‌آمیزی‌های گرم و گیمسا بیشتر متداول می‌باشند در اینجا فقط به شرح جزئیات روش رنگ‌آمیزی کانیون بسنده می‌شود:

روش رنگ‌آمیزی کانیون (زیل‌نلسون اصلاح شده)

هدف: برای رنگ‌آمیزی باکتری‌های اسیدفست مانند مایکوباکتریوم‌ها و نیز باکتری‌های اسیدفست نسبی یا اسیدفست ضعیف مانند نوکاردیاها می‌باشد.
نکته: استفاده از رنگ کربول فوشین (carbolfuchsin) در این رنگ‌آمیزی به دلیل اینکه دارای غلظت بیشتری از فنل و فوشین بازیک است نیازی به حرارت دادن (مانند زیل نلسون کلاسیک) ندارد.

روش رنگ‌آمیزی:

1- رنگ کانیون کربول فوشین را روی لام بریزید و 5 دقیقه صبر نمائید.
2- شستشوی کامل با آب
3- اسید الکل (اسیدکلریدریک 3٪ در اتانول) به مدت 3 دقیقه روی لام قرار دهید.
4- شستشوی کامل با آب
5- رنگ متیلن بلو به مدت 3 دقیقه روی لام بماند.
6- شستشوی کامل با آب
7- لام را خشک کرده و با عدسی روغنی میکروسکوپ مشاهده کنید.

نکته 1- اسیدکلریدریک 3٪ که در محلول اسید الکل وجود دارد برای مایکوباکتریوم‌ها مناسب است. اگر هدف بررسی و مشاهده نوکاردیاها باشد بهتر است در ترکیب اسید الکل به عوض اسیدکلریدریک از اسید سولفوریک 1٪ استفاده شود.

نکته 2- در این رنگ‌آمیزی باکتری‌های اسیدفست قرمز و باکتری‌های غیراسیدفست آبی رنگ می‌گیرند.

منابع مورد استفاده:

1- Diagnostic Bacteriology: A study guide, Margaret A, Bartelt 2000, F. A. Davis Company

2- Saha, D.C , Xess I. , Jain N. Evaluation of conventional and serological methods for rapid diagnosis of cryptococcosis. Indian J Med Res 127, 2008, pp:483-88.

3- www.doctorfungus.org/mycoses/human/crypto/crypto_index.php