

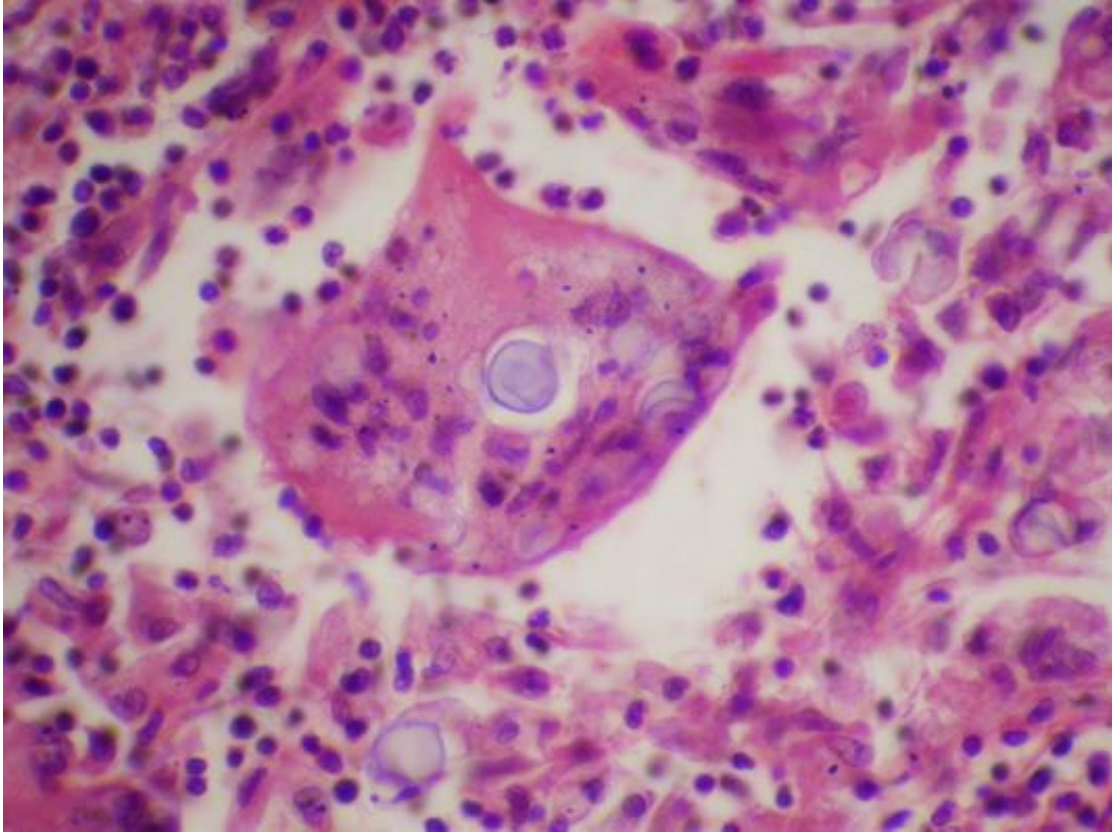
آسیب شناسی بافتی در عفونتهای قارچی (2)

(ویژگیهای مرفولوژیک کریپتوکوکوسی)

ترجمه و تنظیم: دکتر محمد قهری

دکترای علوم آزمایشگاهی بالینی - دکترای تخصصی قارچ شناسی پزشکی

هدف از این نوشتار بحث در مورد تکنیکهای رنگ آمیزی برای تشخیص عفونتهای قارچی، مطالعه ی پاسخ میزبان و اشکال مرفولوژیک مخمرها، کپکها، قارچهای دوشکلی، و قارچهای با طبقه بندی نامشخص در مقاطع بافتی و نمونه های سیتولوژیک می باشد. در بخش پیشین واکنشهای بافتی مربوط به جنس کاندیدا مورد بحث قرار گرفت و در این بخش جنس کریپتوکوکوس مورد بررسی قرار می گیرد.



کریپتوکوکوزیس ریوی (رنگ آمیزی H&E)

مقدمه

گسترش گروه‌های جمعیتی در معرض خطر و استفاده از روش‌های درمانی که موجب افزایش طول عمر چنین بیمارانی می‌شود باعث شده که عفونت‌های قارچی نسبت به گذشته از شیوع بیشتری برخوردار شوند. برخی از تغییر و تحولات در عفونت‌های مربوط به قارچ‌های اندمیک را می‌توان به تغییرات آب و هوایی، تغییرات بعمل آمده در عادات زیستی انسان، سهولت مسافرت‌ها، و جابجایی‌های جمعیتی نسبت داد. جمعیت‌های در معرض خطر برای عفونت‌های قارچی فرصت طلب یا عفونت‌های قارچی اندمیک منتشره شامل بیماران گیرنده‌ی پیوند و بیمارانی که از داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی و یا عوامل شیمی‌درمانی استفاده می‌کنند، می‌گردد. بیماران مبتلا به HIV، نوزادان نارس، افراد کهنسال، و بیمارانی که تحت اعمال جراحی مهم قرار می‌گیرند از دیگر گروه‌های جمعیتی در معرض خطر هستند.

بنابراین ملاحظه می گردد که در سیستم های مراقبت از بیماریها یک تغییر جهت در میکوزها واقع شده است: تا قبل از قرن 21 عفونتهای خونی در اغلب اوقات توسط گونه های کاندیدا بوجود می آمد و عوامل عفونتهای مهاجمی ریوی بدوا شامل میکوزهای اندمیک و گونه های مختلف آسپرژیلوس بوده است. امروزه قارچهای را که قبلا غیرپاتوژن محسوب می کردند از جمله جنس موکور (یا زیگومیستها) و طیفی از کپکهای شفاف (هیالن) و رنگی (دیماتیاستوس) عموما در بیماران با سیستم ایمنی مختل شده (immunocompromised) بعنوان پاتوژن محسوب می شوند. علاوه بر این تشخیص عفونت در مقابل کلونیزاسیون در این قبیل قارچها یک مشکل مهم است و از منظر درمان نیز پیچیدگیهای خاص خود را دارند.

پیشرفتهائی که در رادیولوژی تشخیصی و حمایت از بیمار (مانند ترانسفوزیون پلاکت و غیره) پدید آمده موجب شده که پزشکان توانائی بیشتری در جهت تشخیص اختصاصی بوسیله ی جمع آوری بیوپسی بافتی از نواحی بدن این بیماران کسب نمایند زیرا تا قبل از این برای آزمایش هیستوپاتولوژی غیرقابل دسترسی بودند. در مقابل فواید بدست آوردن این نمونه ها، یک سری چالشهای تشخیصی نیز ایجاد شده است: مقدار بافت بدست آمده محدود است و از طرف دیگر از ریخت افتادگی ساختمانی یا ساختاری (architectural distortion) در نتیجه ی بکارگیری از این روشهای جدید ایجاد می شود که تشخیص هیستوپاتولوژی را با مشکل مواجه می کند. علی رغم اینکه اکنون مجموعه ای از راهها و روشهای درمانی فراهم شده و در دسترس قرار گرفته اند، وجود مقاومت در این دسته از قارچها به داروهای مختلف موجب وخیم تر کردن چالشهای تشخیصی شده است. با اینحال، **هیستوپاتولوژی همچنان یک روش سریع و هزینه - اثربخش برای نیل به تشخیص فرضی یا قطعی عفونت قارچی مهاجم است.** هرچند که استفاده از رنگ آمیزیهای قارچی نقره (مانند گروکوت یا گوموری متنامین نقره) به تنهایی نمی توانند این مشکلات را حل نمایند و تکنیکهای تشخیصی جدیدتر مورد نیاز است، ضرورت دارد که میکروبیولوژیستها، پاتولوژیستها و کلینیسینها از محدودیتهای تشخیص بافتی و از نارسائیهای تشخیص مرفولوژیکال آگاهی داشته باشند.

شرائط اپیدمیولوژیک و کلینیکال هنگامیکه کریپتوکوکوزیس باید در تشخیص افتراقی در نظر قرار گیرد

کریپتوکوکوزیس در اثر چند گونه از جنس کریپتوکوکوس ایجاد می شود که شامل کریپتوکوکوس نئوفرمنس و کریپتوکوکوس گتی *(C. gattii)* می باشد. کریپتوکوکوس نئوفرمنس مسئول اکثر عفونتهائی است که در افراد ایمنوکامپرومایزد دیده می شود در حالیکه کریپتوکوکوس گتی *(C. gattii)* موجب عفونت در میزبانان با ایمنی شایسته (*immunocompetent*) و سایر بیماران (*compromised*) می گردد. *C. neoformans var. grubii* (سروتایپ A) و *C. neoformans var. neoformans* (سروتایپ D) دارای انتشار جهانی هستند و معمولاً در فضولات کبوتر یافت می شوند.

عفونت HIV غالب ترین فاکتور مستعد کننده برای بیماری کریپتوکوکال است هرچند که وضعیت های دیگر که با کریپتوکوکوزیس ارتباط دارد شامل بیماری زمینه ای ریه، کبد، و کلیه و استفاده از داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی، بدخیمی ها، و بیماریهای خودایمنی نیز می باشند. کریپتوکوکوس گتی *(C. gattii)* (سروتایپهای B & C) در درختان اکالیپتوس و درختان نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری با انتشار جغرافیائی بسیار محدودتری یافت میشوند. این نواحی شامل استرالیا، گینه جدید، پاپوآ، بخشهایی از آفریقا، مکزیک، و کالیفرنیا جنوبی است.

در سال 1999 کریپتوکوکوس گتی *(C. gattii)* اولین بار بعنوان پاتوژن انسان در جزیره ونکوورکانادا جدا شد و اکنون مشخص شده که در نواحی دیگر از قبیل استان بریتیش کلمبیا (در کانادا)، کانادا، و در ایالات شمال غربی آمریکا (واشنگتن و اورگون) سبب ایجاد بیماری می شود. صرف نظر از گونه ها، انسان مخمرهای کریپتوکوک یا بازیدیوسپورها را استنشاق می کند و لذا ریه محل اولیه ی عفونت است. تعداد کمی از افراد مواجهه شده بدون علامت باقی می مانند در حالیکه اکثراً پنومونی، کریپتوکوکوما، یا پلورال افیوژن نشان می دهند. کریپتوکوک از طریق ریه می تواند به سیستم اعصاب مرکزی (و

ایجاد مننژیت، یا کریپتوکوکوما)، پوست، استخوانها، و یا سایر بافتها انتشار یابد. کریپتوکوکوس گتی آی نسبت به کریپتوکوکوس نئوفرمنس با بروز بیشتر لزیونهای توپر در ریه و مغز مرتبط است. شیوع بیماری منتشره به وضعیت ایمنی بیمار بستگی دارد. در افراد دارای ایمنی شایسته غالب ترین نشانه، تظاهرات ریوی است در حالیکه در بیماران با ایمنی سرکوب شده عموماً گرفتاری سیستم اعصاب مرکزی دیده می شود.

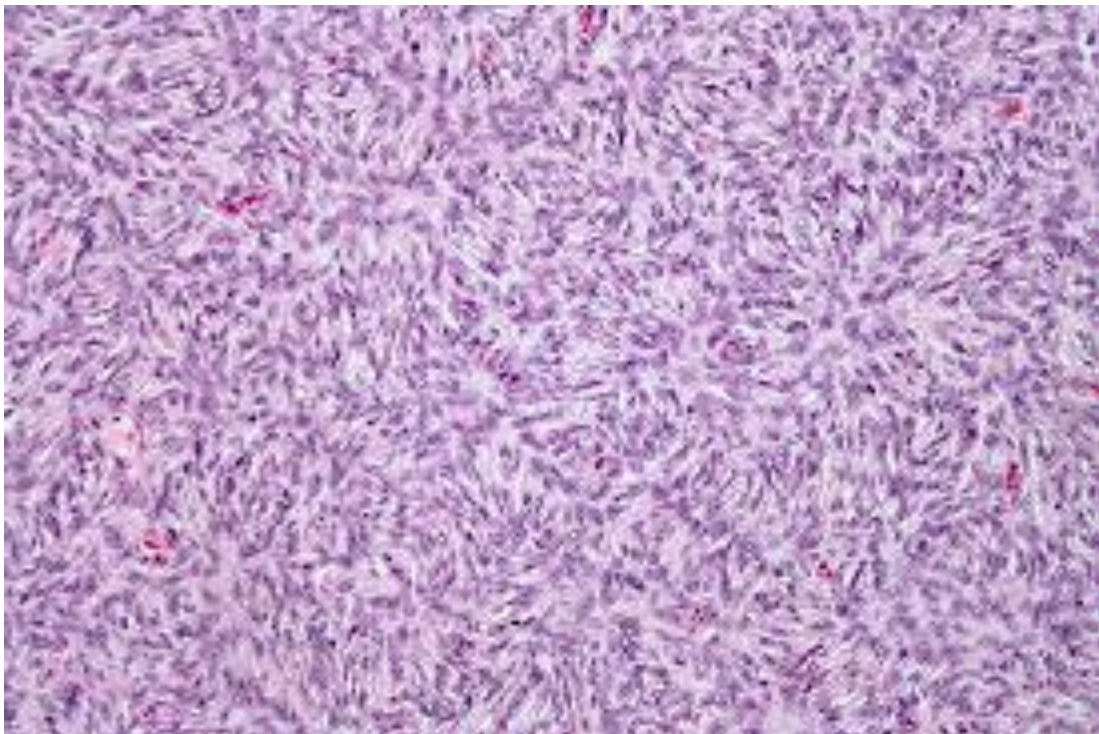
واکنش میزبان به عفونت با کریپتوکوکوس نئوفرمنس بسته به اینکه وضعیت ایمنی فرد چگونه است و نیز آیا با استرین کپسول دار یا فاقد کپسول دچار عفونت شده باشد متفاوت خواهد بود. در افرادی که سیستم ایمنی آنها بشدت آسیب دیده است پاسخ سلولی التهابی یا وجود ندارد و یا در حداقل میزان خود است و سلولهای مخمری به فراوانی تکثیر شده و جایگزین بافت نرمال شده اند. در مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلن - ائوزین سلولهای کریپتوکوکوس نئوفرمنس بصورت سلولهای مخمری ائوزینوفیلیک یا مختصری بازوفیلیک، تک هسته ای، با دیواره نازک، گرد یا بیضوی ظاهر میشوند که اندازه ی متغیری دارند یعنی به اندازه 2 تا 20 میکرون و البته اکثراً بین 4 تا 10 میکرون می باشند. سلولها معمولاً توسط یک منطقه یا حلقه ی پهن و کروی رنگ نشده "halos" احاطه شده اند که نشانگر وجود کپسول ضخیم و موسینی این مخمر است.

خصوصیات مرفولوژیکی که کریپتوکوکوزیس را مطرح می کند

کریپتوکوک مخمر کروی یا بیضوی کپسول دار به ابعاد 5 تا 10 میکرون است که دارای جوانه با اتصال باریک بوده و واجد کپسول ضخیم پلی ساکاریدی است. وجود کپسول این ویژگی را به ارگانسیم می دهد که در مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلن - ائوزین یک فضای شفاف در اطراف سلول مشاهده شود. در آزمایش مایع مغزی نخاعی نیز مرکب چین بعنوان یک رنگ آمیزی منفی وجود کپسول را نشان می دهد. کپسول پلی ساکاریدی با Alcian blue و Mayer's mucicarmine یا Southgate's

mucicarmine رنگ می گیرد. همانند سایر مخمرها دیواره سلول مخمری کریپتوکوک با رنگهای PAS و GMS رنگ می گیرد. بعلاوه کریپتوکوکسی بدلیل داشتن ملانین در دیواره سلولی خود با Fontana – Masson نیز واکنش مثبت نشان می دهد.

واکنش التهابی که در هیستوپاتولوژی بر علیه کریپتوکوکسی دیده می شود از گرانولومای تیپیک (که در آن ارگانیسرها در داخل ماکروفاژها و سلولهای غول دیده می شود) تا التهاب مینیمال با ارگانیسرهای فراوان خارج سلولی که بر روی ساختاربافتی (architecture) تاثیر می گذارد متغیر است. واکنشهای التهابی گرانولوماتوز همچنین یک طیف از نکروز فراوان تا گرانولومای فیبروز نشان می دهد. در برخی موارد فیبروز شدید است و با فیبروبلاستهای که در آن سلولهای دوکی در یک طرح storiform قرار گرفته اند و با زمینه ای از سلولهای لنفوسیت و پلازما سل همراه شده اند مشاهده می شوند، بطوریکه منظره ی یک تومورکاذب التهابی را نشان می دهند. برخی مولفین واکنش التهابی را به وضعیت ایمنی بیمار و حضور یا عدم حضور کیسول مرتبط می دانند.



یک شکل ساختمانی مهم از هیستوسایتومای فیبروز موسوم به طرح storiform

چالش‌های مربوط به تشخیص مرفولوژیکی

در مواردی که در آن رنگ آمیزی برای موسین منفی است و یا حالت بینابینی دارد یا مبهم است مانند آنچه در استرینهای فاقد کپسول کریپتوکوکوس نئوفرمنس دیده می شود یک تکنیک رنگ آمیزی برای ملانین مثل رنگ فونتانا - ماسون برای تشخیص مفید است. سلولهای کریپتوکوکوس نئوفرمنس با رنگهای ملانین واکنش مثبت می دهند در حالیکه تمام مخمرهای پاتوژن دیگر واکنش منفی دارند. موارد استثنا شامل *Cryptococcus laurentii* و *Trichosporon beigelii* می باشند که اینها نیز دارای واکنش ملانین مثبت می باشند. هرچند که این مسئله نیز موجب سردرگمی نخواهد شد زیرا *Cryptococcus laurentii* یک پاتوژن انسانی نادر است و از طرفی نمای مرفولوژیک تریکوسپورون بیژلی (سلولهای پلئومورفیک جوانه دار، سودوهایفی، آرتروکونیدی) نیز از سلولهای کریپتوکوکوس نئوفرمنس کاملاً متفاوت هستند.

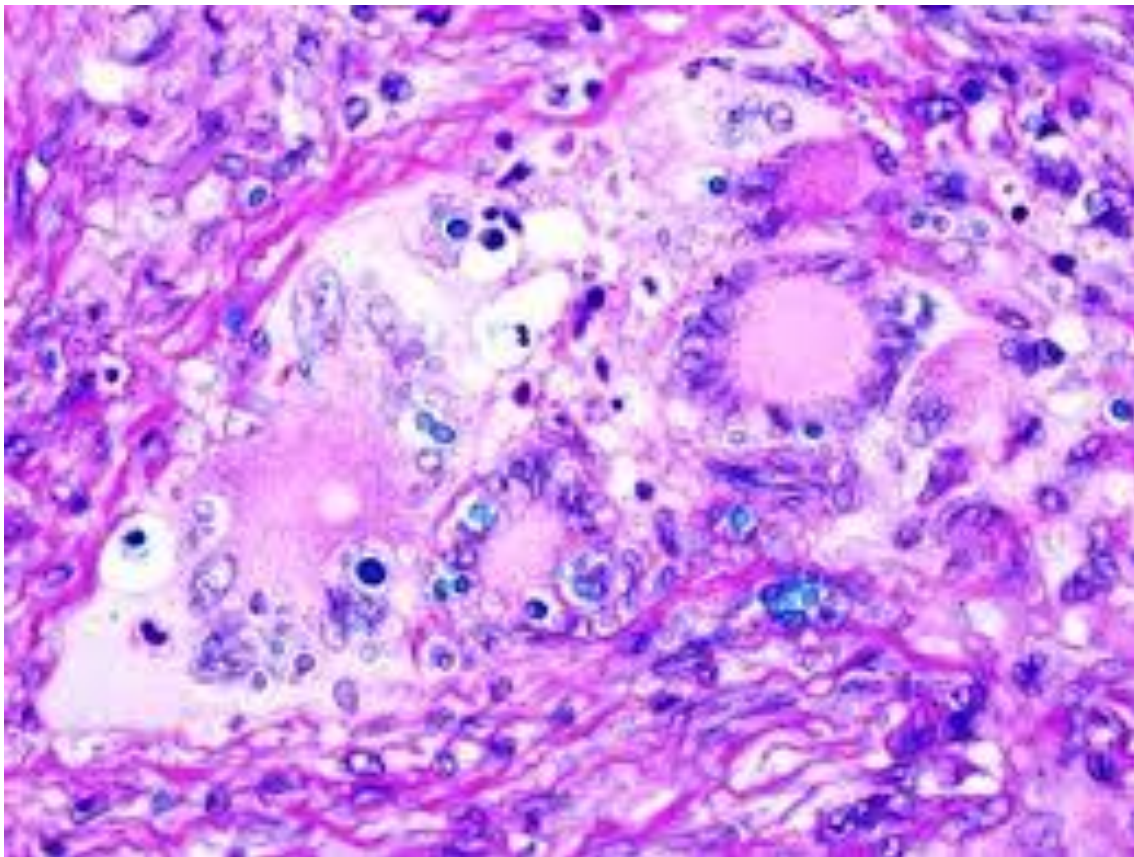
در برخی از بیماران مبتلا به کریپتوکوکوزیس، مخمر ممکن است کپسول پلی ساکاریدی کمی تولید کرده باشد بنابراین چنین ارگانیس‌م‌هایی مشابه سایر مخمرهای با اندازه ی مشابه مانند کاندیدا و هیستوپلاسما به نظر خواهند رسید. در اینصورت نیز رنگ آمیزی این نمونه ها با تکنیک فونتانا - ماسون می تواند ثابت کند که مخمر تولید کننده ی ملانین (وجه مشخصه ی کریپتوکوکوسی) است یا خیر. استفاده از تستهای مبتنی بر آنتی ژن کریپتوکوکال با سرم و مایع مغزی نخاعی ممکن است برای بیماران که کریپتوکوکوسی با کپسول ضعیف دارند کمک کننده نباشد زیرا اکثر تستهای سرولوژیک آنتی ژنهای موجود در کپسول را آشکارسازی می کنند.

تستهای جایگزین

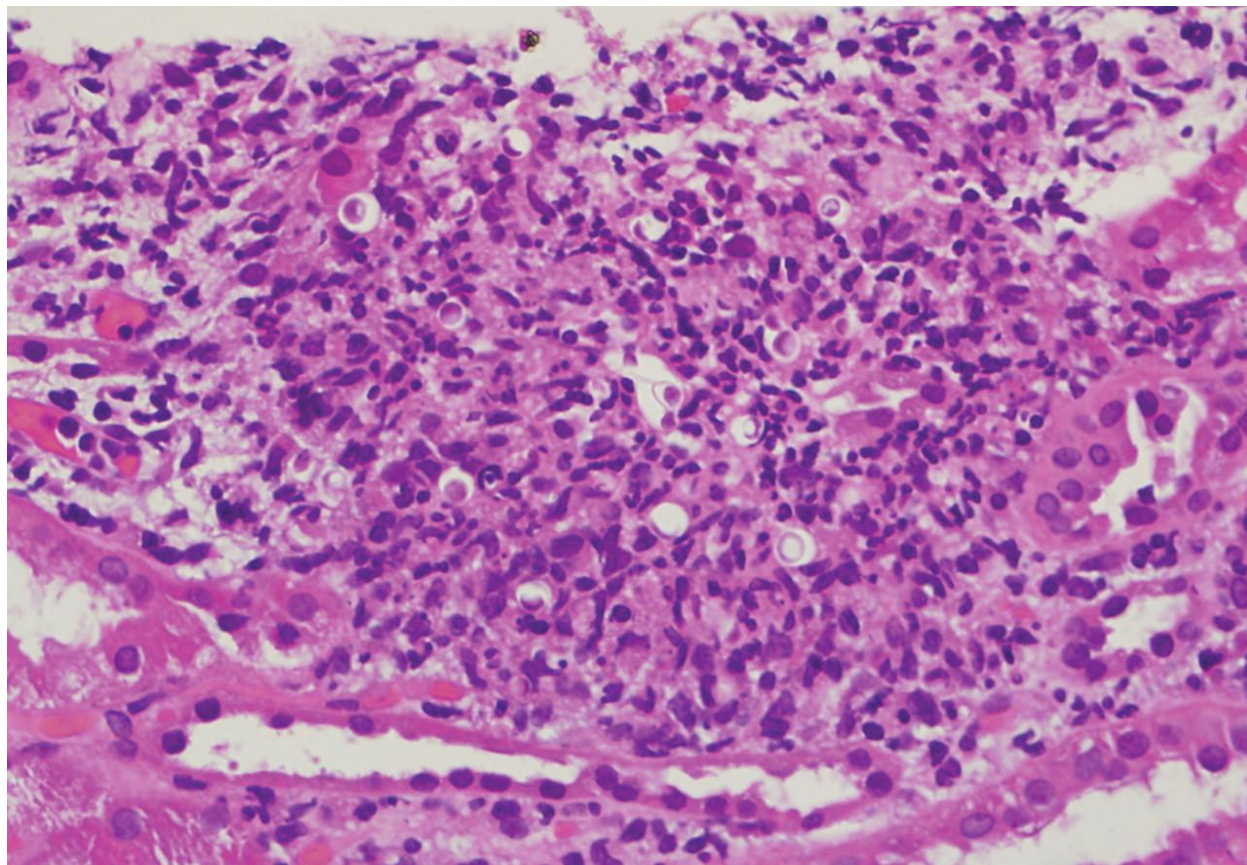
تستهای آنتی ژن کریپتوکوکال با استفاده از لاتکس آگلوتیناسیون یا EIA می توانند با سرم و مایع مغزی نخاعی انجام شوند. این تکنیکها دارای حساسیت و ویژگی بیش از 90%

هستند اگرچه نتایج منفی کاذب می تواند بعلت بار قارچی پائین و یا در ارتباط با پدیده پروزون مشاهده شود. نتایج مثبت کاذب در بیمارانی دیده می شود که با تریکوسپورون، یا پنمونی کلبسیلایی درگیر شده باشند و نیز در افرادی که فاکتور روماتوئید مثبت دارند واکنش مثبت کاذبی دیده می شود. همچنین در صورتی که معرف با نمونه بیشتر از زمان توصیه شده در مجاور هم انکوبه شده باشد واکنش مثبت کاذب رخ می دهد.

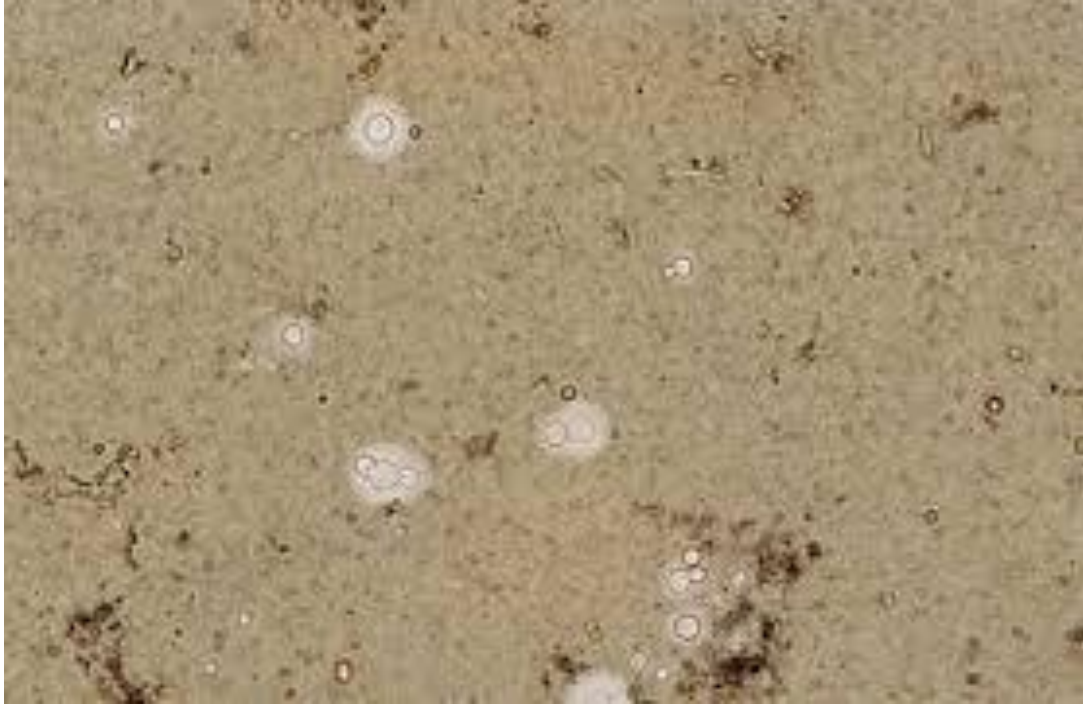
حضور آنتی ژنها یا اشکال مخمری در مایعات مختلف و بافتها برای تشخیص مهم است اما عفونت را تنها بوسیله ی کشت میتوان تعیین کرد. کشت بویژه با استفاده از محیط **Canavanine** **glycine- bromthymol blue** - که در حضور کریپتوکوکوس گتی آی به رنگ آبی تبدیل می شود برای تعیین گونه ی کریپتوکوکوسی مفید است.



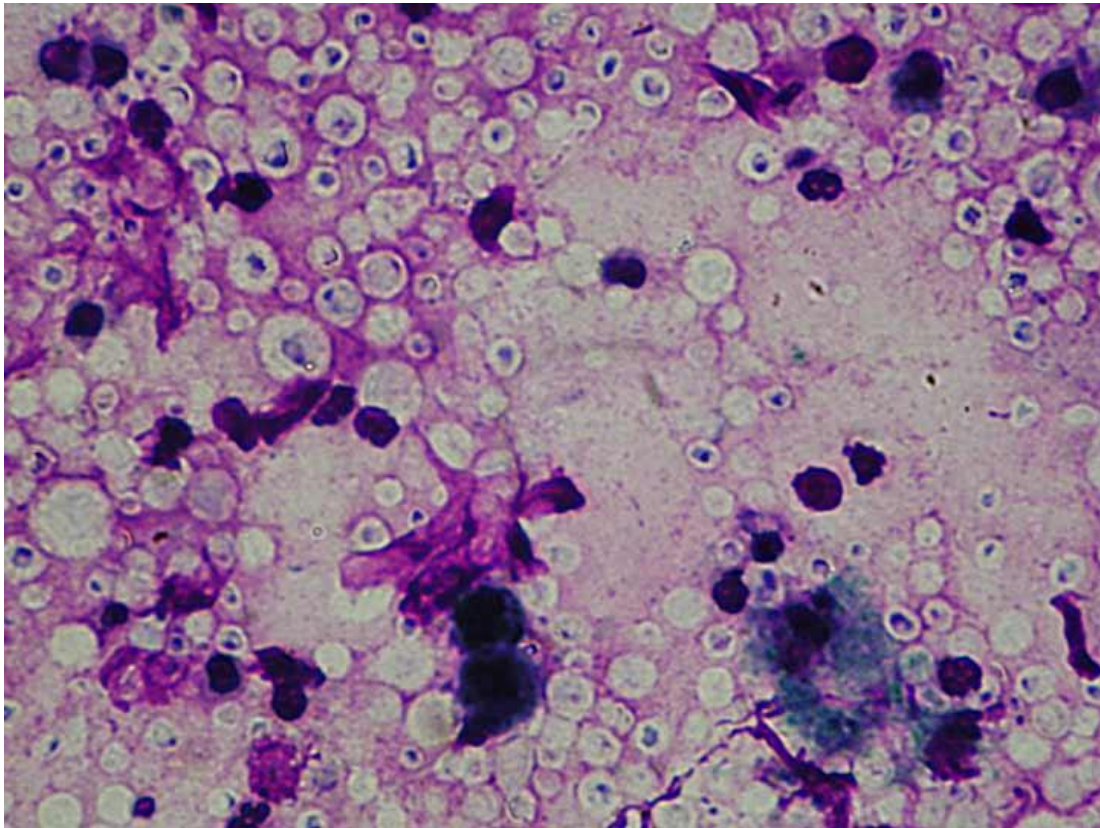
گرانولومای کریپتوکوکال که در آن سلولهای کریپتوکوک با هاله ی شفاف مشاهده می شوند



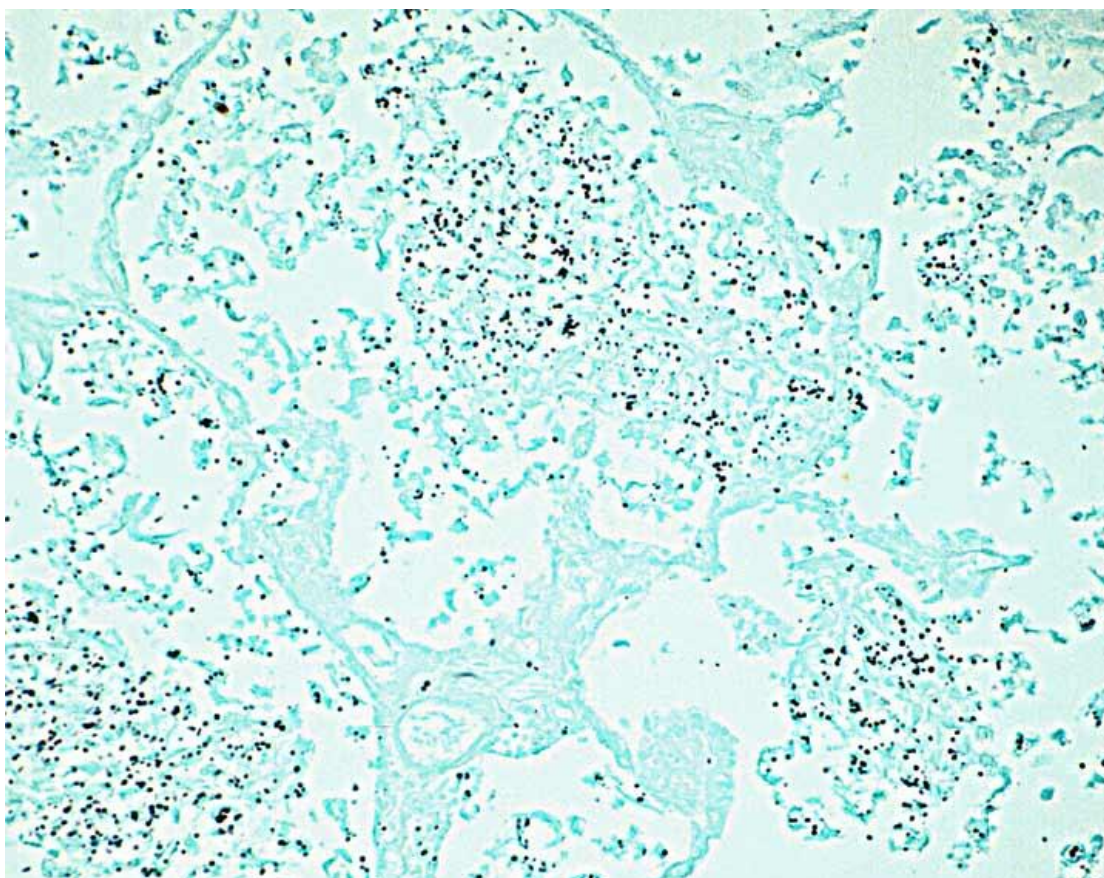
گرانولومای کریپتوکوکال در نفریت بینابینی (بیمار نفریت لوپوسی داشته است)



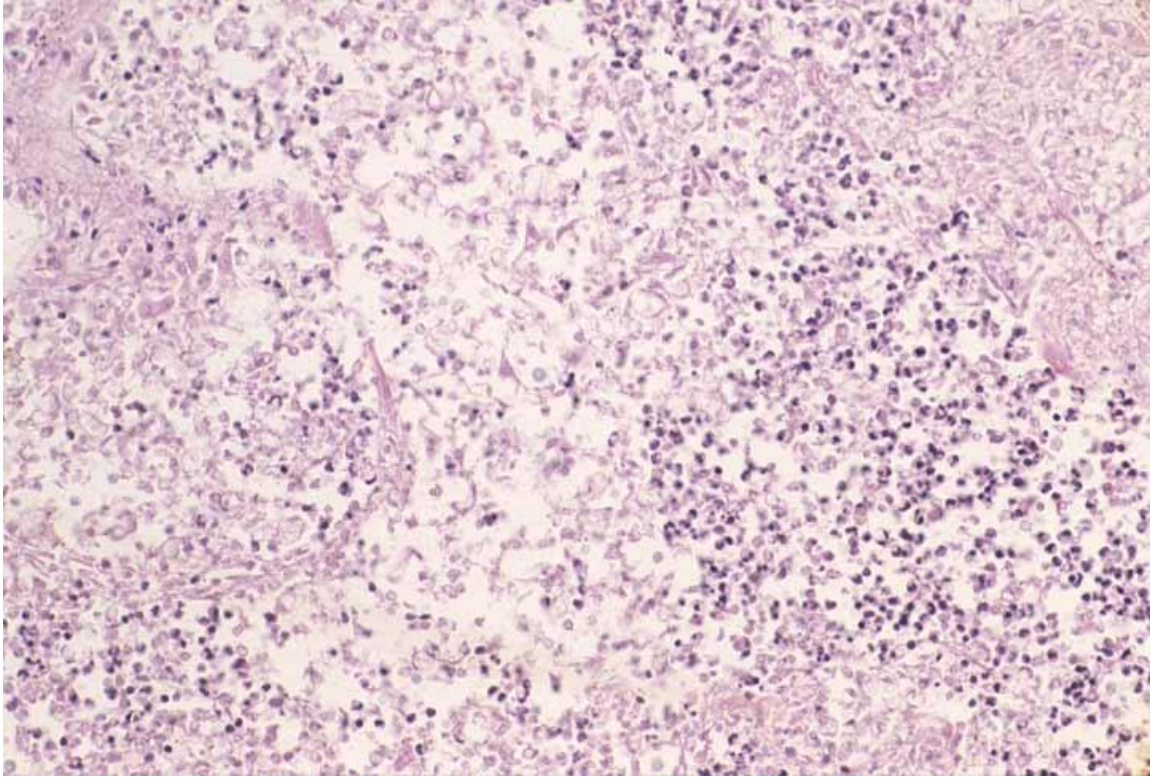
منظره ی ستاره ای کریپتوکوکوس در مرکب چین



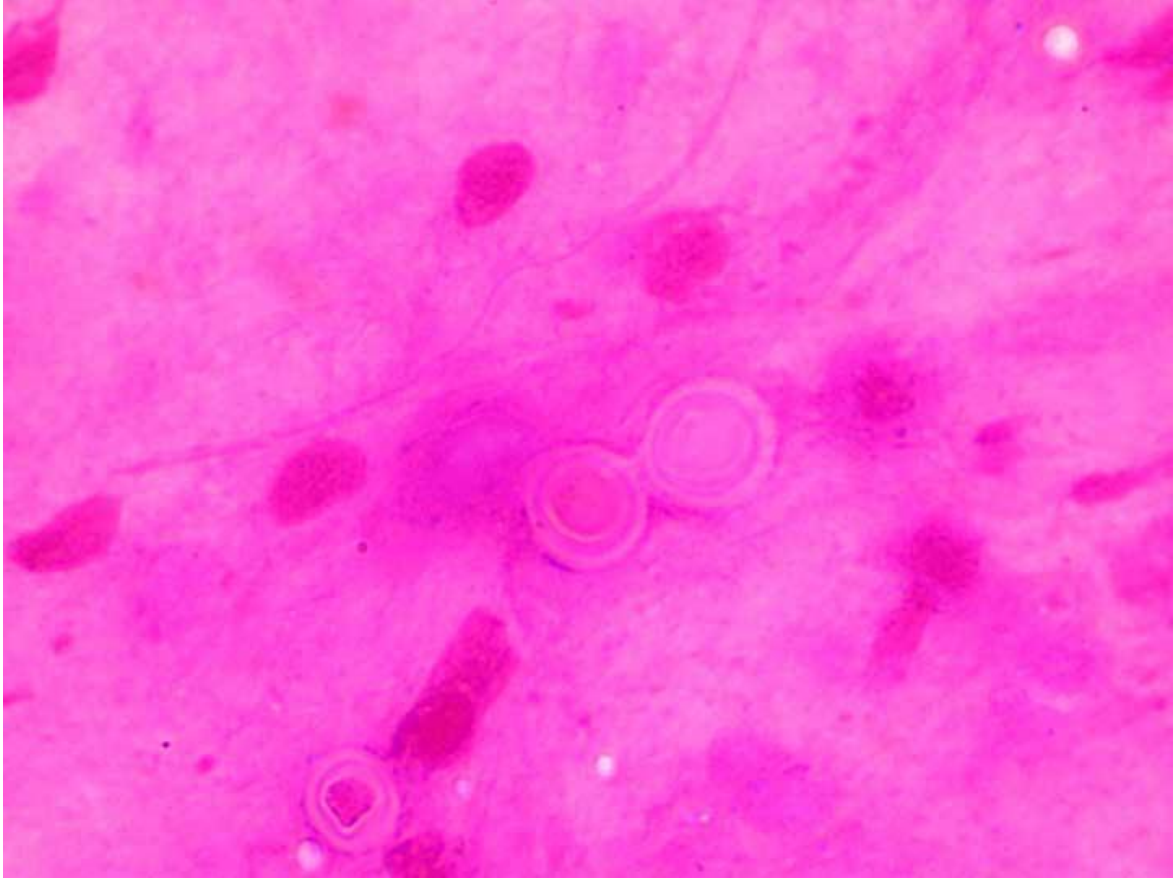
کریپتوکوکوس نئوفرمنس در لاواژ برونکوالوئالار - رنگ آمیزی رایت



کریپتوکوکوس نئوفرمنس در ریه در بزرگنمایی ضعیف میکروسکپی - رنگ
آمیزی GMS



کریپتوکوکوس نئوفرمنس در ریه - رنگ آمیزی هماتوکسیلن - ائوزین

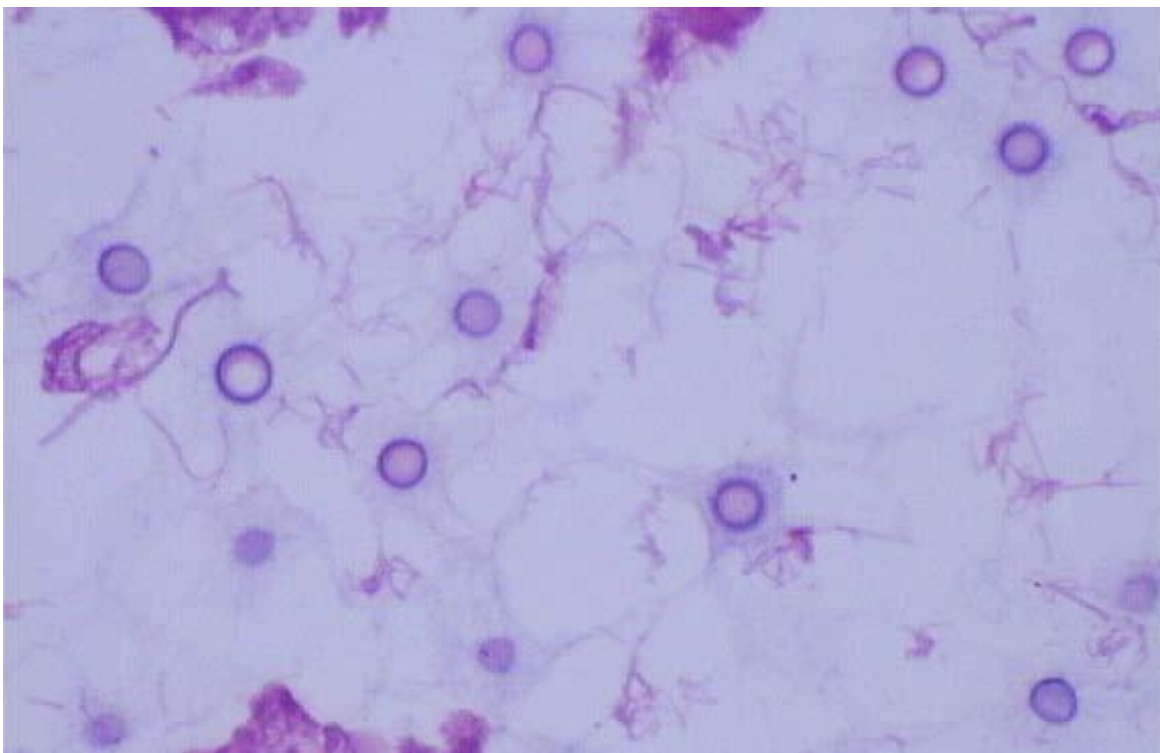


کریپتوکوکوس نئوفرمنس در نمونه ی خلط - رنگ آمیزی رایت

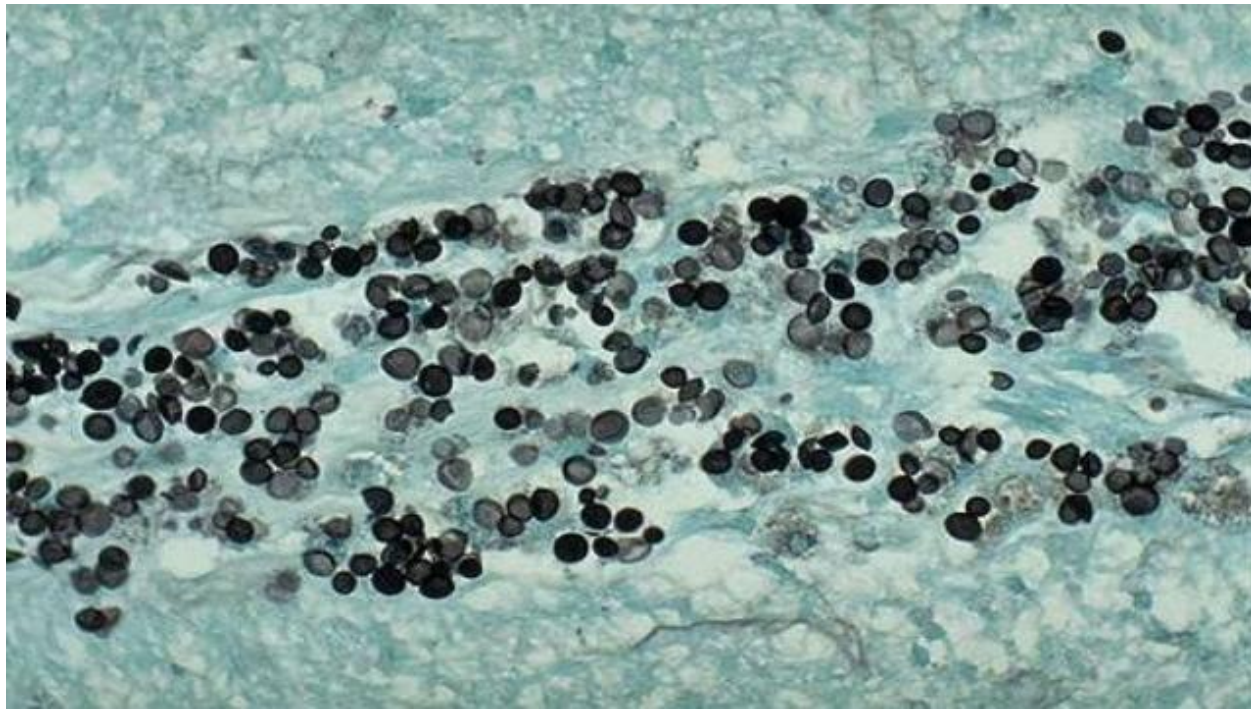
جوانه زدن در بین مخمرها به فراوانی دیده می شود و اغلب سلولها دارای یک جوانه هستند که با پایه ی باریکی به سلول مادر وصل شده اند. در بیمارانی که سیستم ایمنی بشدت آسیب دیده ای دارند یک پرولیفراسیون حجیم و وسیع مخمرها وجود دارد و در این حالت سودوهایفی ممکن است در بافت یا در نمونه های سیتولوژیک دیده شود. در میزبانی که سیستم ایمنی سالمی داشته و با این قارچ عفونی شده است پاسخ ابتدائی یک واکنش التهابی حاد و مشخص است که یا برطرف می شود و یا به فرم گرانولوماتوز درمی آید و در نهایت به فیبروکازئوز تغییر می نماید.



کریپتوکوکوما: یک توده ی سفید و هموژن گرد با منظره ی خاکستری - سفید در لوب فوقانی ریه راست



کریپتوکوکوما در ریه با بزرگنمایی قوی میکروسکوپ: رنگ آمیزی
هماتوکسیلن - ائوزین



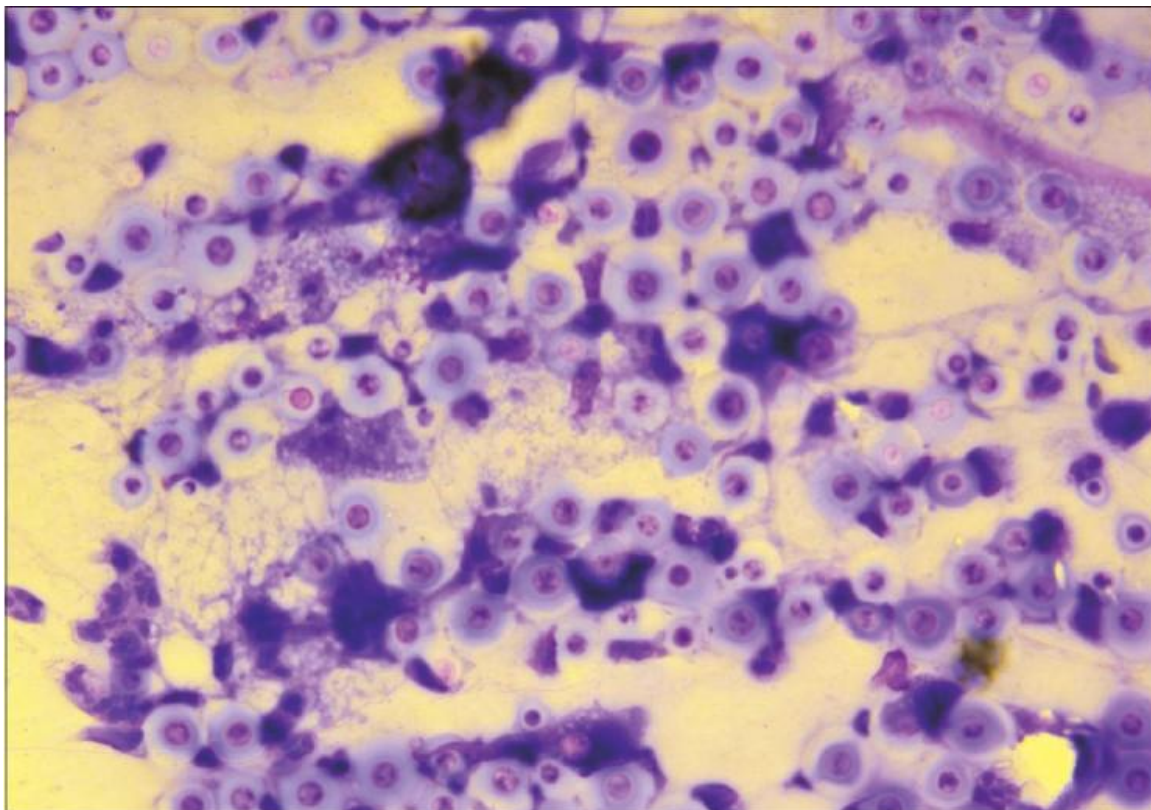
کریپتوکوک: رنگ آمیزی GMS

در لزیونهای فیبروکازئوز موسوم به کریپتوکوکوما سلولهای مخمری شکل به تعداد کم وجود دارند و معمولاً در حاشیه‌ی ندول اغلب داخل ماکروفاژها و سلولهای غول آسا یافت می‌شوند. عفونت تهاجمی که توسط کریپتوکوکوس نئوفرمنس فاقد کپسول و تقریباً بدون استثنا فقط در بیماران دارای ایمنی شایسته ایجاد می‌شود تنها ریه‌ها را درگیر می‌کند. پاسخ ایمنی یک واکنش گرانولوماتوز و اغلب همراه با فیبروز و نکروز کازئوز است.

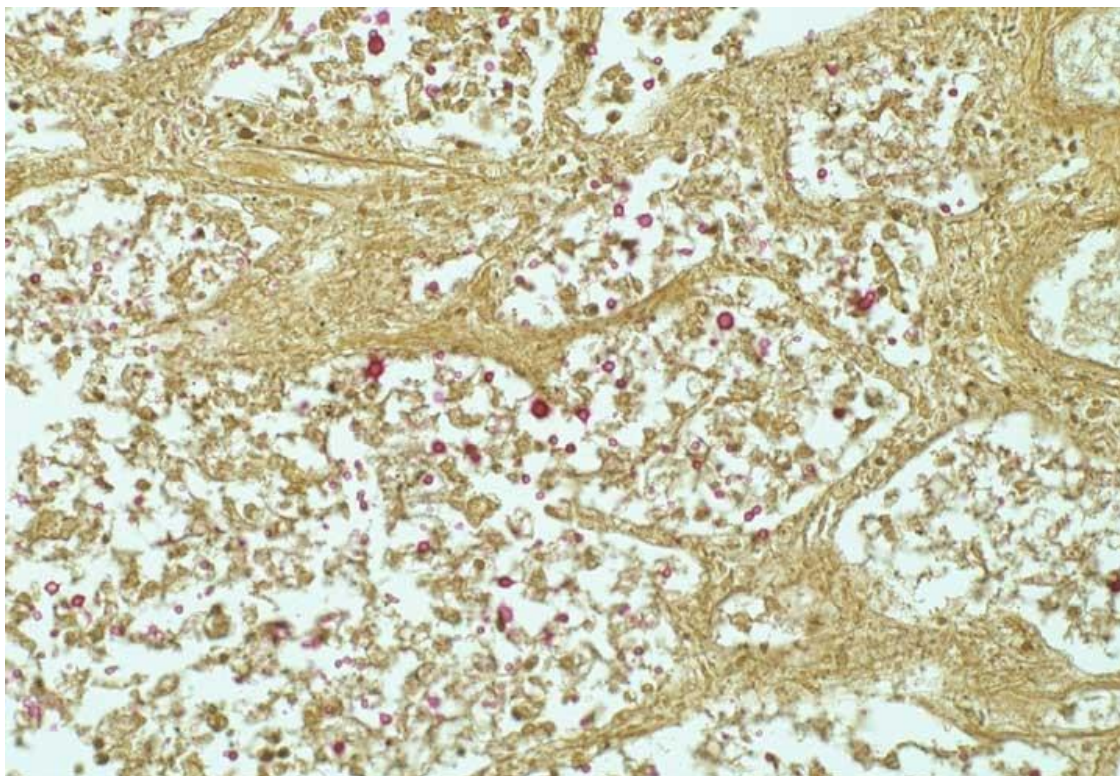
سلولهای مخمری بصورت قطعه قطعه شده و کوچک درون ماکروفاژها و سلولهای غول مشاهده میشوند. ویژگیهای سلولهای کریپتوکوکوس نئوفرمنس که برای تشخیص مفید هستند شامل اختلاف و تنوع در اندازه و شکل، اتصال جوانه به سلول

مادر با یک پایه ی باریک و کپسول ضخیم (در صورت وجود داشتن) که با رنگهای موسین بخوبی رنگ می گیرند، می باشد.

از آنجا که کریپتوکوکوس نئوفرمنس تنها قارچ پاتوژنی است که دارای کپسول موسینی است بنابر این با توجه به این خصوصیت تشخیص درون بافتی آن آسانتر می باشد. دیواره های سلولی بلاستومایسس درماتیتیدیس و رینوسپوریوم سیبری اغلب واکنش مثبت ضعیفی با رنگهای موسینی می دهند اما بلحاظ اینکه از نظر مرفولوژیک بسیار متفاوت از کریپتوکوکوس هستند، این مسئله نباید مشکل تشخیصی ایجاد نماید.



پرولیفراسیون قابل توجه سلولهای کپسول دار کریپتوکوک در بافت



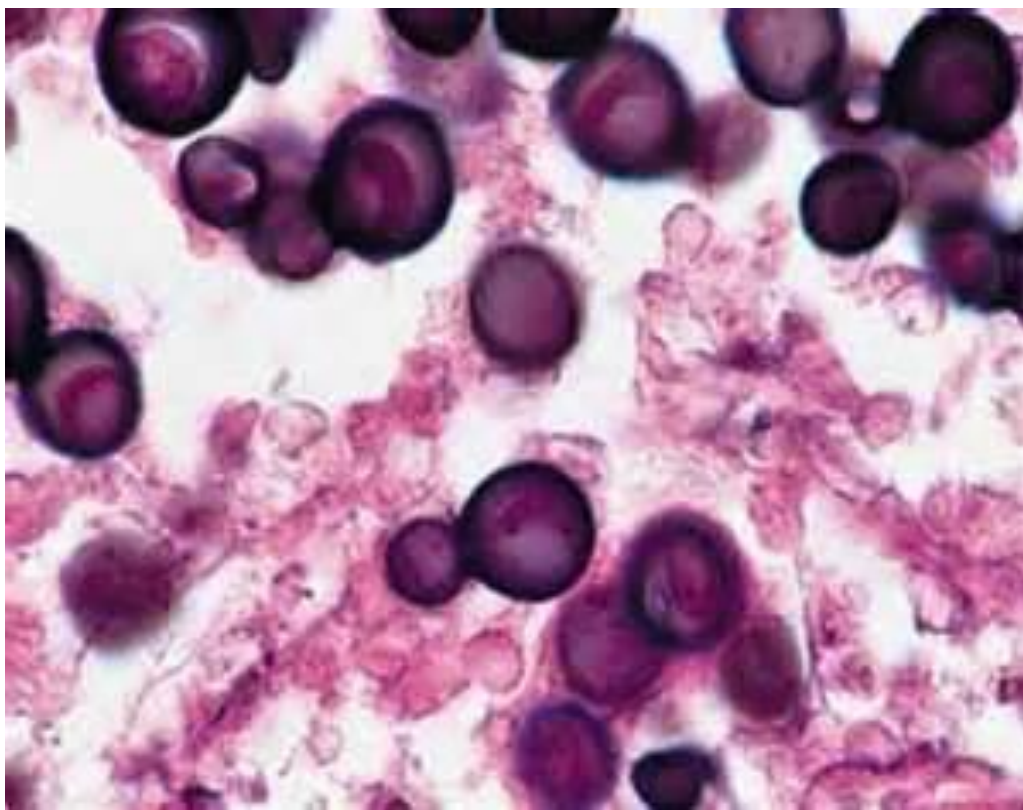
کریپتوکوکوس نئوفرمنس در ریه - رنگ آمیزی موسیکارمین



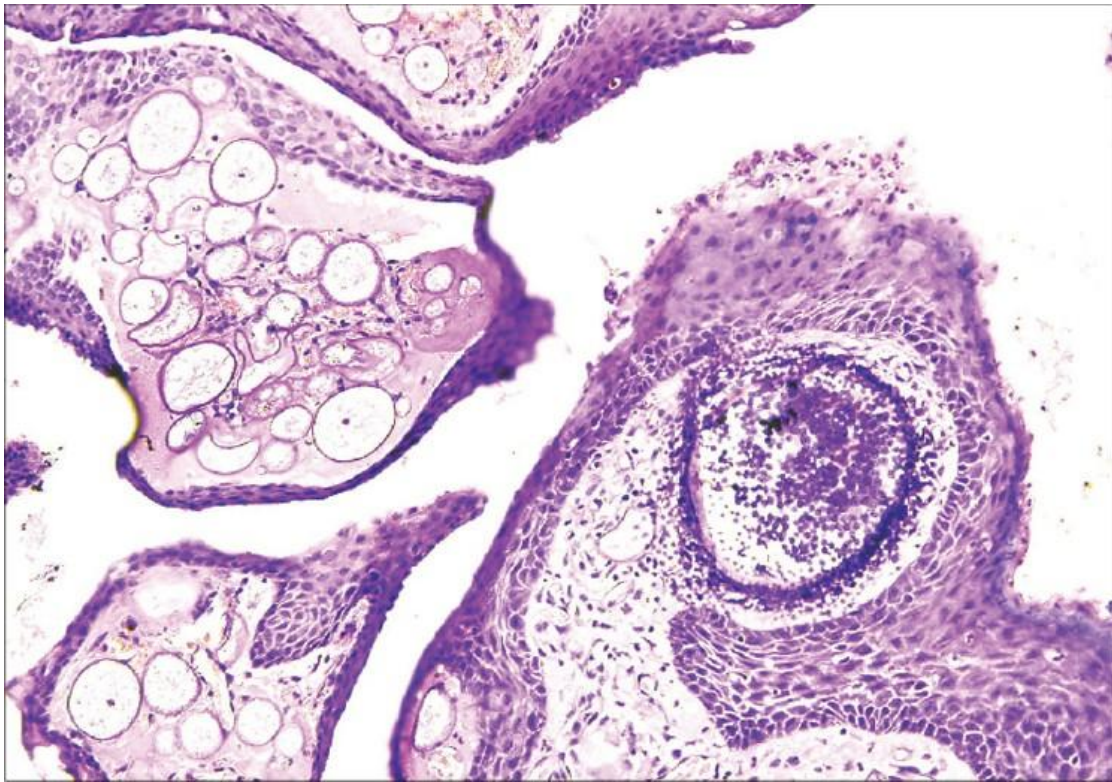
بلاستومايسس درماتيتيديس - لام مرطوب با پتاس ده درصد (اتصال خطي
جوانه به سلول مادر)



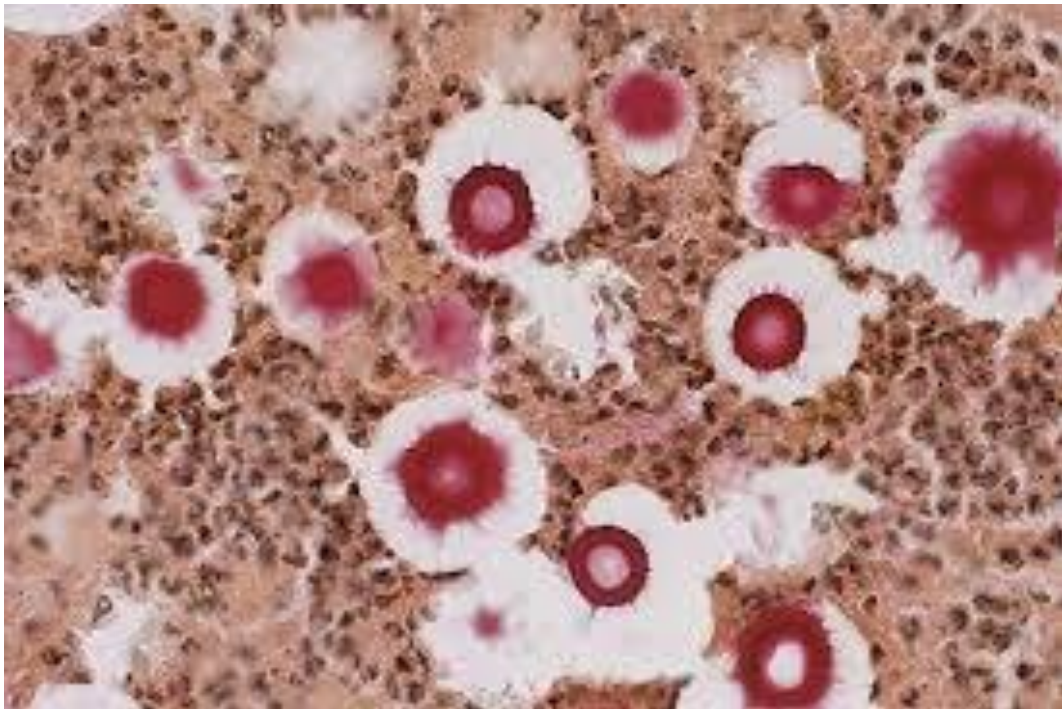
بلاستومايسس درماتيتيديس - رنگ آميزی PAS



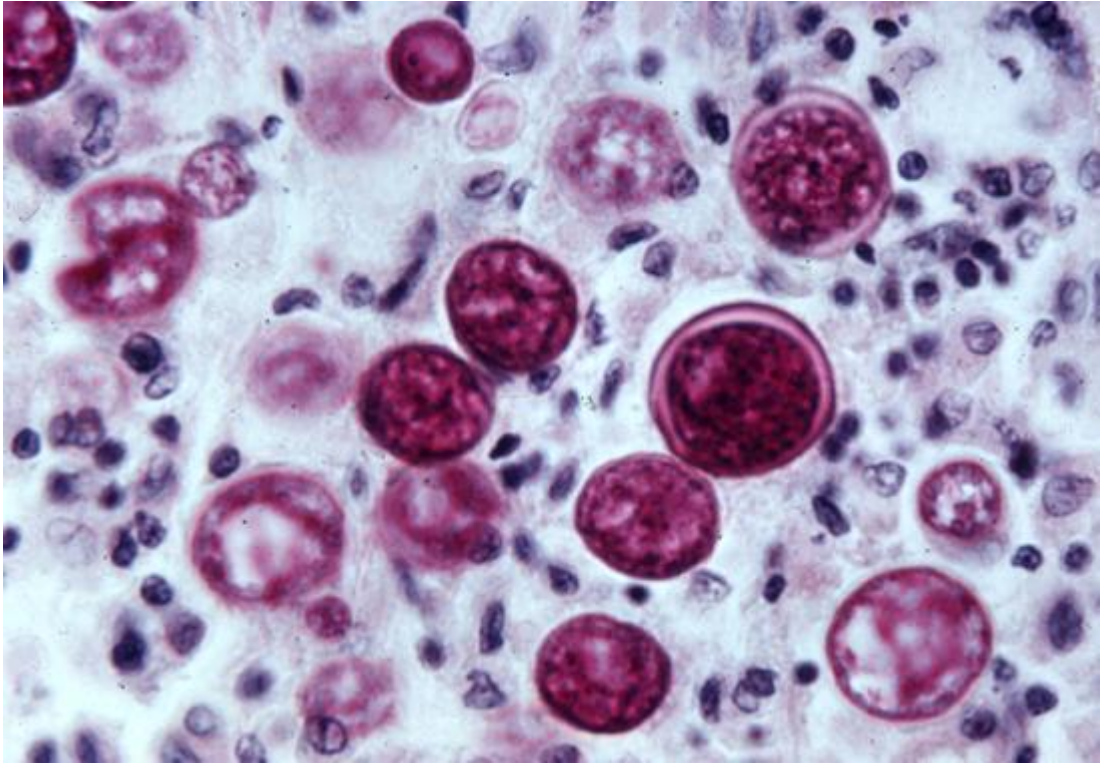
بلاستومايسس درماتیتیدیس (اتصال پهن سلول جوانه) - رنگ آمیزی GMS



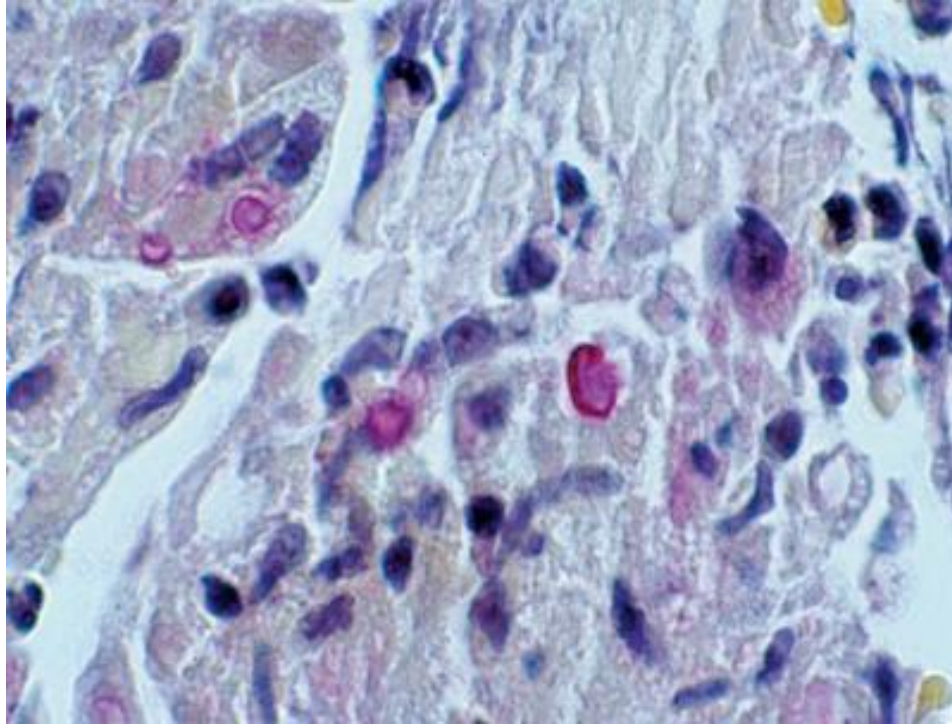
سلولهای رینوسپوریادیوم سیبری در بافت (جهت مقایسه با کریپتوکوک)



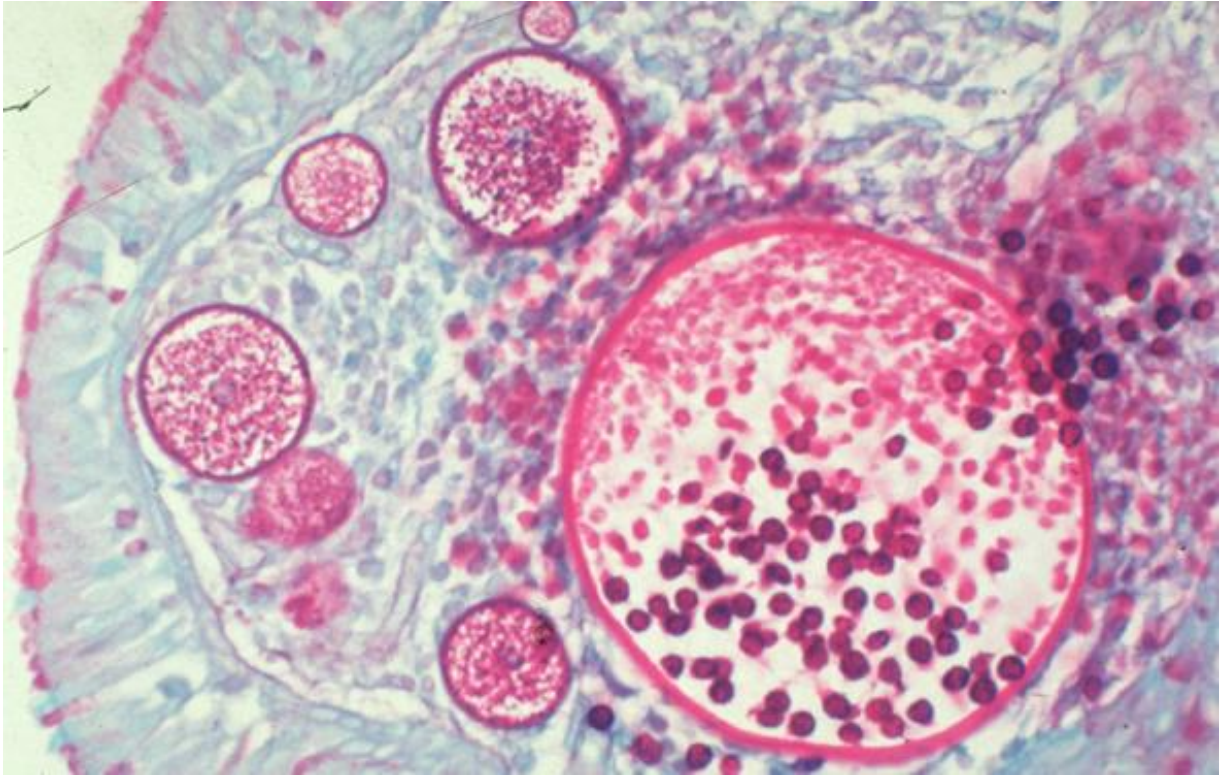
سلولهای کریپتوکوک- رنگ آمیزی موسیکارمین



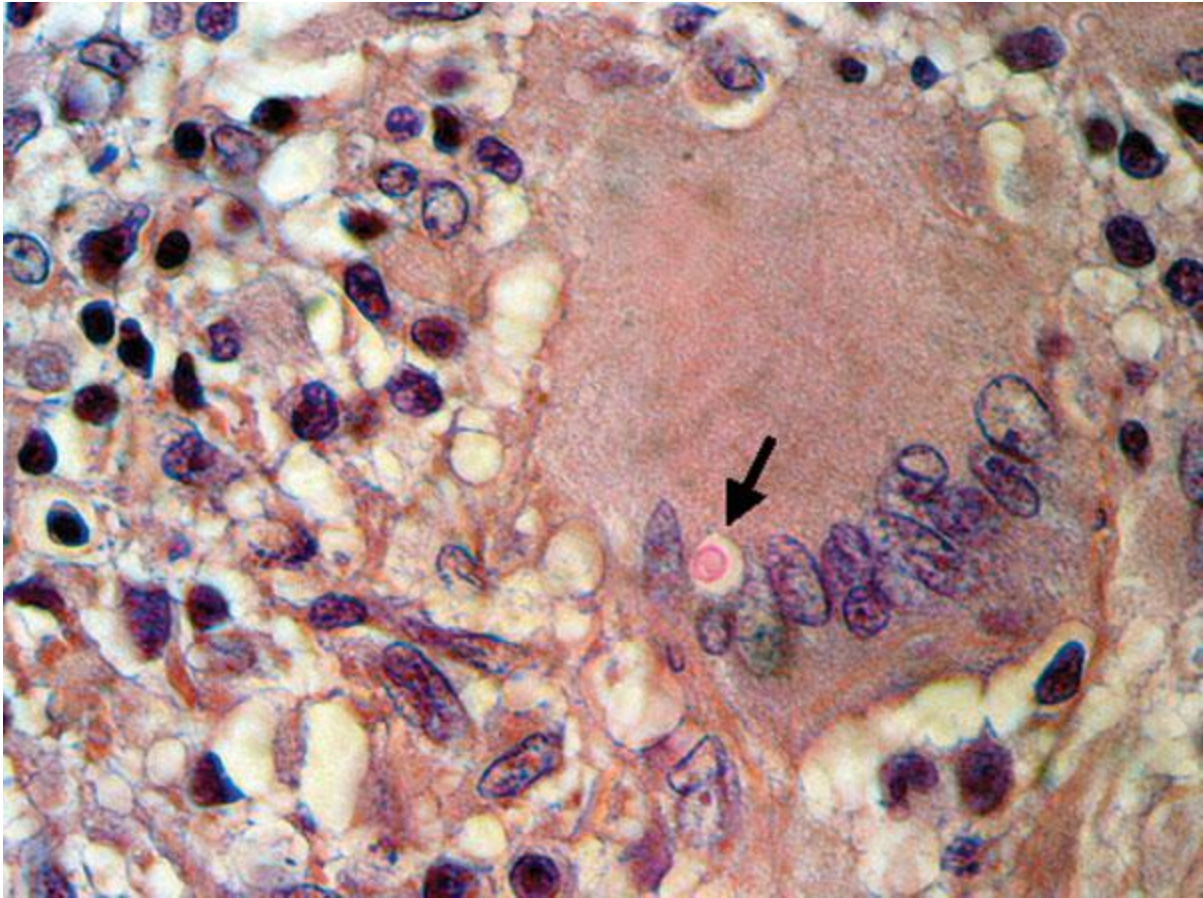
بلاستومايسس درماتیتیدیس - رنگ آمیزی موسیکارمین



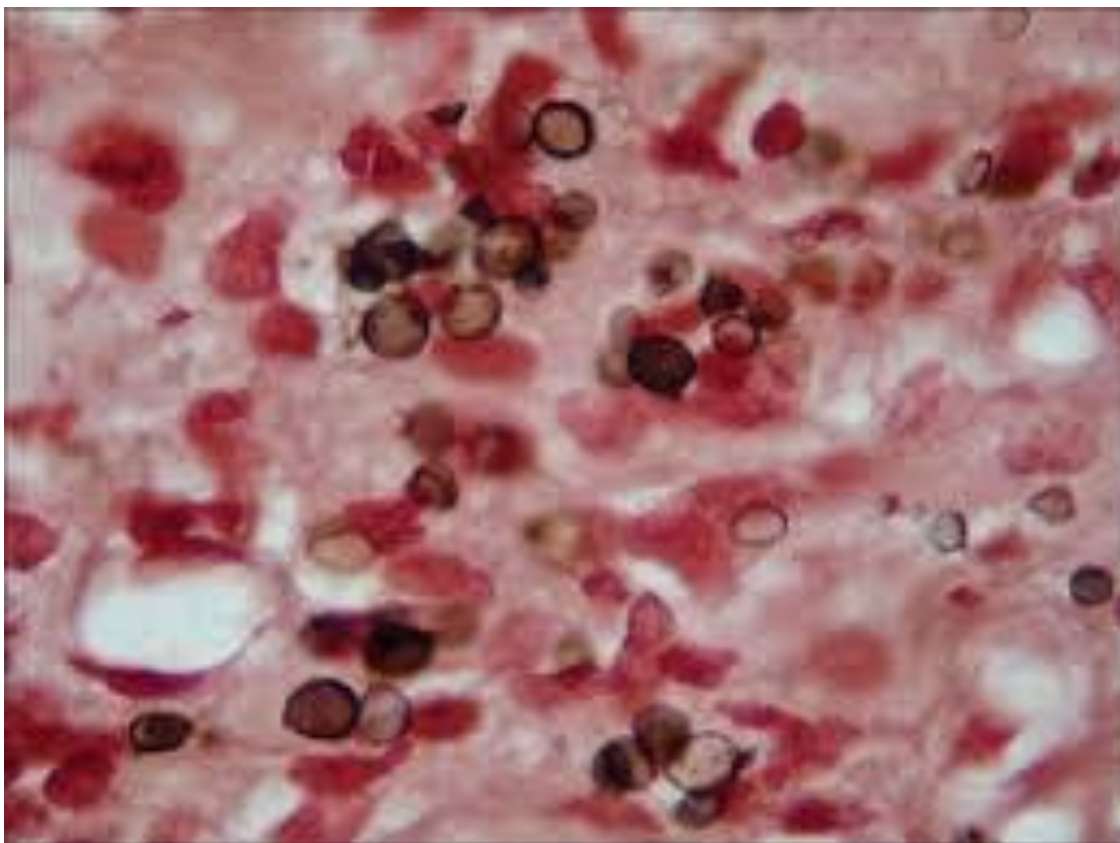
کریپتوکوکومای فیبروکازئوز - رنگ آمیزی موسیکارمین



رینوسپوریدیوم سیبری - رنگ آمیزی موسیکارمین



گرانولوم هیستوسایتیک با لنفوسیتها و سلولهای غول آسای چند هسته ای : یک ساختمان داخل سیتوپلاسمی کپسول دار با واکنش مثبت موسیکارمین (کریبتوکوکوس) با علامت پیکان مشخص شده است. رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین و مایر موسیکارمین.



مخمرهای قهوه ای تا سیاه‌رنگ کریپتوکوک در رنگ آمیزی فونتانا - ماسون

بطور خلاصه می‌توان گفت که هنگامیکه با استرینهای کپسول دار کریپتوکوک مواجه هستیم استفاده از هر یک از رنگ آمیزیهای بافتی کمک کننده است اما در مواقعیکه با استرینهای فاقد کپسول و یا استرینهایی که کپسول نازکی دارند مواجه می‌شویم تنها رنگ آمیزیهای ملانین سودمند خواهند بود. در استرینهای فاقد کپسول رنگ آمیزی موسین (موسیکارمین- مایر) منفی است و رنگ آمیزی فونتانا- ماسون (ملانین) سودمند می‌باشد، هرچند که در این رنگ آمیزی *Cryptococcus laurentii* و تریکوسپورون نیز واکنش مثبت می‌دهند اما تریکوسپورون بلحاظ مرفولوژیک کاملاً قابل افتراق است و کریپتوکوکوس لورنتی هم از پاتوژنهای شایع نیست. کاندیدا و هیستوپلاسما هم که از نظر شکل و اندازه قابل مقایسه با استرینهای فاقد کپسول کریپتوکوک هستند واکنش فونتانا- ماسون منفی نشان می‌دهند.

از طرف دیگر کریپتوکوکسی واجد کپسول موسینی در رنگ آمیزی موسیکارمین- مایر واکنش مثبتی دارد و بلاستومایسس درماتیتیدیس و رینوسپوریوم سیبری نیز در رنگ آمیزیهای موسینی واکنش مثبت ضعیفی نشان می دهند اما خوشبختانه بلحاظ مرفولوژیک هردو براحتی از کریپتوکوکسی قابل افتراق می باشند.

منابع مورد استفاده:

- Jeannette Guerner, Mary E. Brandt. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. Clin Microbiol Rev. 2011 24(2): 247-280
- Histopathology of Fungal Infections in : CLINICAL MYCOLOGY.(Anaissie E J, McGinnis M R, Pfaller M A.) 2003, CHURCHILL LIVINGSTONE.