پاتولوژی
Clinical&Anatomical
نشریه علمی | خبری | انجمن آسیب شناسی ایران

کاربرد رنگ آمیزی‌های اختصاصی در عفونت‌های قارچی

ترجمه و تنظیم: دکتر محمد قهری | دکترای علوم آزمایشگاهی بالینی ، دکترای تخصصی قارچ شناسی پزشکی

ارزیابی هیستولوژیک التهاب گرانولوماتوزی و گرانولوم‌ها باید با کمک رنگ‌های خاصی که قادر به آشکار سازی قارچ‌ها هستند انجام پذیرد. GMS و PAS رنگ‌های بسیار شایعی هستند که بطور روزمره در آزمایشگاه‌های پاتولوژی بر روی نمونه‌های سیتولوژی و بافتی برای جستجوی حضور قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. حضور قارچ در مقاطع بافتی شواهد و مدارک انکارناپذیری از عفونت تهاجمی را نشان می‌دهد. سلول‌های قارچی در داخل بافت‌ها بصورت هایفی، مخمرهای جوانه دار، اسفرول‌های محتوی اندوسپور یا ترکیبی از این فرم‌ها دیده می‌شوند. در مورد برخی از قارچ‌ها تنها یک گونه ی خاص از آنها موجب میکوز می‌شود و بنابراین زمانی که فرم‌های کلاسیک آن مشاهده می‌شود تشخیص عامل اتیولوژیک میسر شده است. این گروه از قارچ‌ها شامل آدیاسپیرومایکوزیس، بلاستومایکوزیس، کوکسیدیوئیدومایکوزیس، کریپتوکوکوزیس، هیستوپلاسموزیس کپسولاتی (Histoplasmosis capsulati)، هیستوپلاسموزیس دوبوآزی (Histoplasmosis duboisii)، پاراکوکسیدیوئیدومایکوزیس، پنیسیلیوزیس مارنفئی، پروتوتکوزیس، رینوسپوریدیوزیس، و اسپوروتریکوزیس هستند. میکوزهای دیگر بوسیله هر یک از گونه‌های متعدد هر جنس که به لحاظ مرفولوژی در مقاطع بافتی مشابه یکدیگر هستند پدید می آیند، هر چند که این گونه از قارچ‌ها را نمی‌توان به کمک تکنیک‌های متداول هیستولوژی در سطح گونه شناسایی کرد اما بیماری‌های حاصله – بعنوان مثال: آسپرژیلوزیس، کاندیدیازیس، و تریکوسپورونوزیس - را عموما می‌توان شناخت. دسته سوم شامل میکوزهایی است که بعلت جنس‌های مختلف ایجاد می‌شوند و در مقاطع بافتی بسیار شبیه به یکدیگر مشاهده می‌شوند. در این دسته امکان شناسایی عوامل اتیولوژیک وجود ندارد اگرچه نوع میکوز را می‌توان مشخص کرد. بعنوان مثال می‌توان از فئوهایفومایکوزیس و زایگومایکوزیس نام برد.

هماتوکسیلن –ائوزین یک رنگ آمیزی چند منظوره است که پاتولوژیست را قادر می‌سازد که پاسخ بافتی میزبان را ارزیابی نماید از جمله پدیده اسپلندور – هوپلی و نیز حضور سایر میکروارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد، همچنین یک رنگ انتخابی برای تایید حضور قارچ‌های پیگمانته و نشان دادن هسته سلول‌های شبه مخمری است و با اینحال اگر بتنهایی از این رنگ برای تشخیص عفونت‌های قارچی استفاده شود دارای نقاط ضعف قابل توجهی است از جمله اینکه اغلب اوقات تشخیص قارچهایی که بطور ضعیف رنگ می‌گیرند از اجزاء بافتی – حتی در بزرگنمایی‌های بالاتر – مشکل است. در مواقعی که تعداد عناصر قارچی کم و یا پراکنده است براحتی ممکن است از قلم انداخته شوند. اشکال مرفولوژیک قارچها ممکن است بخوبی آشکار نشوند و یا بصورت غلط‌اندازی (misleading) ظاهر شده باشند. بعنوان مثال در مورد هیستوپلاسما، بلاستومایسس و پاراکوکسیدیوئیدس ممکن است آرتیفکت مربوط به جمع شدگی (retraction) سیتوپلاسمیک در سلول‌های آنها در مقاطع بافتی دیده شود و ارزیابی مورفولوژیک را دشوار کند. برخی از واریانت‌های قارچی مانند واریانت بزرگ (آفریقایی) هیستوپلاسما و یا فرم کوچک مربوط به بلاستومایسس دارای اندازه‌های متفاوتی هستند. برخی از قارچ‌های دیمورفیک درون بافت‌ها سودوهایفی تشکیل می‌دهند و گاهی اوقات مرفولوژی قارچ تحت تاثیر درمان تغییر پیدا می‌کند. با توجه به جمیع موارد فوق، کاربرد رنگ‌های اختصاصی برای ارزیابی هیستولوژیک پروسه‌های التهابی نامعلوم و مبهم الزامی و اساسی است.

رنگ‌های اختصاصی مرسوم که به کمک آنها می‌توان اکثر قارچها را در مقاطع بافتی براحتی نشان داد شامل رنگ‌های (GF (GMS، Gridley,s Fungus و PAS هستند که بعنوان رنگ‌های قارچی با طیف وسیع (broad spectrum) مطرح هستند.

با توجه به اینکه رنگ GMS کنتراست بهتری میدهد ترجیح داده می‌شود که برای غربالگری از آن استفاده شود زیرا این رنگ آمیزی حتی قارچهای غیرزنده و دژنره شده را رنگ میکند در حالیکه دو رنگ ذکر شده دیگر چنین نیستند (تصویر ۱ و ۲). GMS همچنین جلبک‌ها (پروتوتکا و گونه‌های کلورلا)، دیواره‌های کیست پنموسیستیس جیرووسی (تصویر ۳ و ۴) آمیب‌های آزاد خاکزیِ پاتوژن، و پوشش اسپور اغلب پارازیت‌های میکروسپوریدیال، انکلوزیون‌های گرانولار درون سیتوپلاسمی سایتومگالوویروس، اکتینومایسس اسراییلی و گونه‌های مرتبط با آن، گونه‌های نوکاردیا، اکثر گونه‌های مایکوباکتریوم و باکتری‌های غیررشته‌ای با کپسول پلی ساکاریدی مانند کلبسیلا پنومونیه و استرپتوکوکوس پنومونیه را رنگ می‌کند.

عناصر قارچی دژنره شده مانند سلول‌های شبه مخمری هیستوپلاسما کپسولاتوم واریته کپسولاتوم درون گرانولوم در رنگ آمیزی طولانی مدت با محلول نیترات نقره قابل

WWW.IRANPATH.ORG

نشان دادن است. ایراد (disadvantage) رنگ‌های قارچی GMS و GF این اســت که آنها رنــگ طبیعی قارچ‌های پیگمانته را ماســک می‌کنند و این مسئله که آیا قارچ مورد بررسی شفاف (بیرنگ) و یا دیماتیاسئوس (پیگمانته) است را غیرممکن می‌ســازد. مشــخص کردن این دو از یکدیگر در تشخیص هیســتولوژیک میکوزهای حاصله از قارچ‌های دیماتیاسئوس مثل فئوهایفومایکوزیس حیاتی و سرنوشت ساز است. بغیر از راکسیون مربوط به PAS، رنگ‌های قارچی GMS و GF پاسخ التهابی به تهاجم قارچی را به اندازه کافی نشــان نمی‌دهند، برای مقابله با این امر می‌توان یک مقطع بافتی رنگ شده با GMS را به منظور مطالعه همزمان عنصر قارچی و پاســخ التهابی میزبان با H&E رنگ زمینه نمود. رنگ PAS تقریبا همانند GMS در غربالگری برای قارچها بکار می‌رود. این رنگ مرفولوژی قارچ را بهتر از رنگ‌های نقره نشــان می‌دهد. PAS قادر به رنگ کردن عناصر دژنره شده قارچی است در حالیکه ممکن است در رنگ آمیزی H&E اینگونه عناصر قابل روئیت نباشند. اجسام کلسیفیه شده که گاهی اوقات در گرانولوم‌های پنیری شــده یافت می‌شوند با PAS رنگ می‌شوند و ممکن است با قارچ‌های شبه مخمری اشتباه شوند بویژه هنگامی که این اجسام طوری قرار گرفته باشــند که نقش کاذب مخمرهای جوانه زن را نشان دهند و یا هنگامیکه این اجســام بشکل طبقه طبقه روی هم چیده شده باشند و منظره دیواره سلولی ضخیم یا کپسول را نشان دهند. بهترین رنگی که از این سوء تفسیر جلوگیری می‌نماید رنگ‌های GMS و GF هســتند زیرا اســید کرومیک که بعنوان یک اکسیدایزر (oxidizer) در این رنگ‌ها بکار میرود کلســیم را حل می‌کند و در نتیجه اجسام کلسیفیک بدون رنگ باقی می‌مانند. برعکس آرتیفکت‌هایی وجود دارند که در رنگ‌های GMS و GF رنگ پذیری قارچ‌ها را تقلید می‌کنند و این مســئله در رنگ‌آمیزی PAS دیده نمی‌شود بنابراین استفاده از هردورنگ نقره و PAS می‌تواند انسیدانس نتایج مثبت کاذب را کاهش دهد.

رنگ‌های قارچی با طیف باریک (narrow-spectrum)

برای تشــخیص افتراقــی قارچها ممکن اســت به رنگ آمیزی‌های اختصاصی اضافی تری نیاز داشــته باشــیم که قادر هســتند برخی از قارچها را رنگ کــرده و بعضی دیگر را رنــگ نکنند. این دســته از رنگ‌ها را تحــت عنوان رنگ آمیزی‌هــای قارچی "طیــف باریک" می‌نامنــد. برخی از رنگ‌های موجود در این دسته شامل رنگ‌های موسین نظیر Alcian blue و موســیکارمین مایــر (Mayer's or Southgate's mucicarmine) هســتند کــه بخوبــی کپســول موکوئیدی کریپتوکوکوس نئوفرمنس را نشــان می‌دهنــد (تصویــر ۵ و۶). این راکســیون رنــگ آمیزی سلول‌های کریپتوکوکوس را از سایر قارچهای با مورفولوژی مشابه از قبیل کوکســیدیوئیدس، کاندیدا و هیستوپلاسما افتراق می‌دهد. از طرف دیگر این رنگ‌های موســینی برای کریپتوکوکوس نئوفرمنس اختصاصی نیســتند و دیواره ی ســلولی بلاستومایســس درماتیتیدیس و رینوسپوریدیوم ســیبری اغلب با درجات متغیری با رنگ‌های موسینی رنگ آمیزی می‌شوند هر چند که این دو قارچ اخیر فاقد کپسول بوده و به لحاظ مرفولوژیک نیز کاملا متمایز از یکدیگر هستند و بنابراین معمولا با کریپتوکوکوس اشــتباه نمی‌شــوند. در برخی موارد ممکن اســت با استرین‌هایی از کریپتوکوکوس برخورد کنیم که دارای کپســول ضعیفی بوده و در مقاطع بافتی با رنگ‌های موسیکارمین واکنش مثبت نشان ندهند. در اینگونــه موارد از آنجا که دیواره ســلولی کریپتوکوکوس نئوفرمنس دارای مواد احیاء کننده نقره هستند (احتمالا پیش ســازهای ملانین) می‌توان آن را با روش فونتانا ماسون نقره (Fontana – massom's silver) برای ملانین رنگ کرد این رنگ بویژه برای آن موارد از کریپتوکوکوزیس با فرمهای مخمریِ مهاجم مفید است که کپسول‌های آشکار و واضحی ندارند و به فرمهای خشک موسوم هستند. چنین فرمهایی احتمالا با مخمرهای فاقد کپسول با مرفولوژی مشابه اشتباه می‌شــوند. همچنین از رنگ‌های فونتانا ماسون و Lillie's ferrous iron می‌تــوان برای تایید کردن و یا مورد تاکید قراردادن حضور ملانین یا پیگمان‌های شبه ملانین در دیواره ســلولی در آن دسته از عوامل فئوهایفومایکوزیس که دارای غلظت کمتری از این رنگدانه‌ها در دیواره سلولی خود هستند در مقاطع بافتی استفاده کرد.

از رنگ آمیــزی PAS نیز می‌توان بعنوان رنگ قارچی با طیف باریک استفاده کرد، بعنوان مثال در تشخیص افتراقی فرمهای مخمری کوچک جوانه زنِ هیستوپلاسما کپسولاتم، یک رنــگ (واکنش) PAS ضعیف و یک رنگ قوی GMS به تشــخیص هیستوپلاســما کمک می‌کند، این در حالی اســت که دیواره ســلولی کاندیدا، فرمهای مخمری کوچک بلاستومایســس و فرمهای مخمری مالاسزیا با رنگ PAS بصورت قوی رنگ می‌گیرند (تصویر ۷ و ۸).

رنگ آمیــزی دیگری که در قارچ شناســی بعنوان رنگ با طیف باریک نام برده می‌شــود زیل نلســون است. در یک مطالعه ۶۰ درصد ارگانیسم‌های شبه مخمری بلاستومایسس و ۴۷درصــد ســلول‌های هیستوپلاســما رنــگ آمیــزی سیتوپلاسمیک مثبت با زیل نلسون نشان دادند (تصویر ۹ و ۱۰). کاندیدا و کریپتوکوک رنگ آمیزی نشده و رنگ آمیزی اسید فست در اندوسپورهای کوکسیدیوئیدومایکوز بصورت کم و ضعیف دیده می‌شود. بطور کلی این نوع رنگ آمیزی بی ثبات بوده و برای تشخیص اولیه نباید بکار برده شوند. بعبارت کلی دیواره سلولی قارچها اسید فست نیستند.

قارچ‌های اتوفلورسنت

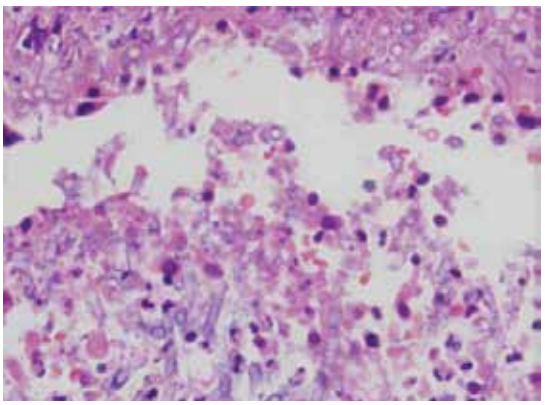
برخی از قارچها و یا اجزاء آنها در مقاطع بافتی رنگ شده با هماتوکســیلن – ائوزین هنگامیکه با میکروسکوپ مجهز بــه منبع نوری ماوراء بنفش مورد بررســی قــرار می‌گیرند خاصیت اتوفلورســنت از خود نشــان می‌دهنــد. گونه‌های کاندیدا، کوکسیدیوئیدس ایمیتیس و گونه‌های آسپرجیلوس

WWW.IRANPATH.ORG

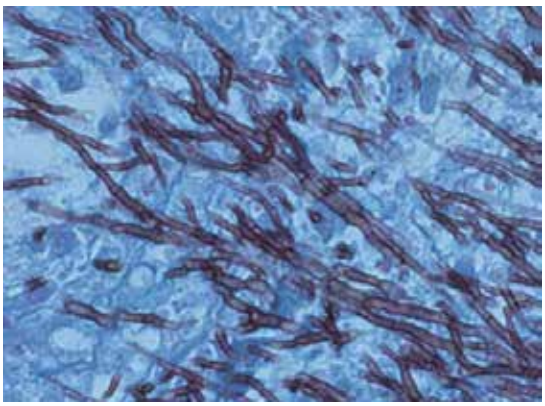
اتوفلورسانس سبز روشن تا زرد مایل به سبز نشان می‌دهند. هنگامیکه مقاطع بافتی مربوط به این قارچها را با PAS رنگ آمیزی می‌کنیم اتوفلورسانس قارچی زرد روشن در مقابل یک زمینه قرمز – نارنجی تیره آشکار می‌گردد. این خاصیت کمک می‌کند که سلول‌های قارچهایی را که در رنگ آمیزی هماتوکسیلن –ائوزین بصورت اندک و یا پراکنده وجود داشته و یا اینکه ضعیف و کمرنگ هستند بخوبی آشکار شوند، با این حال متاسفانه این ویژگی ثبات خوبی نداشته و نباید برای تشخیص قطعی مورد استفاده قرار گیرد. بسیاری از قارچها در مقاطع بافتی منجمد شده یا تهیه شده در بلوک‌های پارافینی بصورت غیراختصاصی با کالکوفلور سفید رنگ می‌گیرند و در مطالعه با میکروسکوپ UV فلورسانس نشان می‌دهند. این روش ساده و سریع فلورسانسی میتواند بصورت روتین در آزمایش حین عمل جراحی بر روی مقاطع بافتی تازه منجمد شده (fresh-frozen) برای قارچها مورد استفاده قرار گیرد. رنگ‌های ایمونوپراکسیداز برای شناسایی قارچهای خاصی در اسمیرها و در مقاطع بافتی که با فرمالین فیکس شده و در بلوک‌های پارافینی تهیه شده‌اند استفاده می‌شود. اگرچه این تکنیک موارد استفاده تشخیصی محدودی دارد.

ایمونوفلورسانس مستقیم (IF)

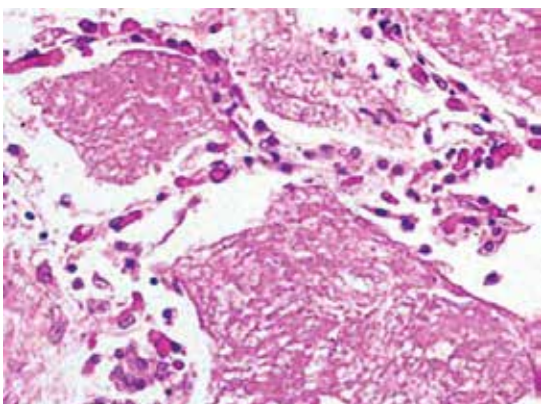
روش ایمونوفلورسانس مستقیم قابلیت تشخیصی تکنیک‌های هیستوپاتولوژی (اعم از اسمیرها و بافت‌های فیکس شده و پارافینه) در شناسایی بیماری‌های قارچی را بهبود می‌بخشد. این روش بویژه برای مواردی که بافت‌های تازه برای کشت در دسترس نیستند و یا در مواقعی که فرم‌های آتیپیکال قارچی دیده می‌شوند در تایید کردن تشخیص احتمالیِ هیستولوژیک کمک کننده هستند. تکنیک ایمونوفلورسانس دارای چند مزیت است: شناسایی نهایی یک عامل قارچی ناشناخته که بدوا توسط رنگ آمیزی با H&E و GMS مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، در طول چند ساعت انجام می‌گیرد. نیاز برای انجام کشت‌هایی که هزینه بر و زمان بر هستند بوسیله این تکنیک برطرف می‌شود و مخاطرات کار کردن با مواد بالقوه عفونی کاهش می‌یابد زیرا میکروارگانیسم‌ها قبل از رنگ آمیزی با IF بوسیله فرمالین غیرفعال می‌شوند و بالاخره، نگهداری طولانی مدت بافت‌های فیکس شده در فرمالین، اعم از بافت‌های مرطوب یا بافت‌های موجود در قالب‌های پارافینی، آنتی ژنیسیته قارچها را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد. این پایداری آنتی ژنیک امکان انجام مطالعات گذشته نگر بر روی بافت‌های نگهداری شده در پارافین را میسر می‌سازد و همچنین امکان ارسال آنها را به آزمایشگاه‌های رفرانس و مراکز دور از دسترس برای تایید شناسایی فراهم می‌نماید.



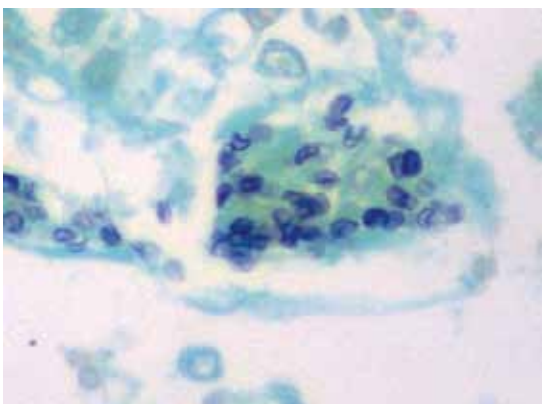
تصویر ۱- آسپرجیلوس: رنگ آمیزی هماتوکسیلن ائوزین



تصویر ۲- آسپرجیلوس: رنگ آمیزی GMS

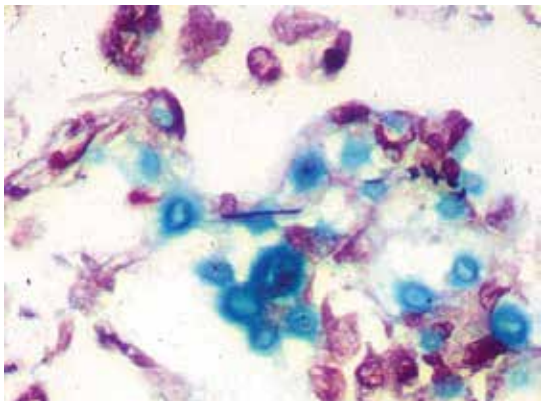


تصویر ۳- پنموسیستیس جیرووسی: رنگ آمیزی H&E

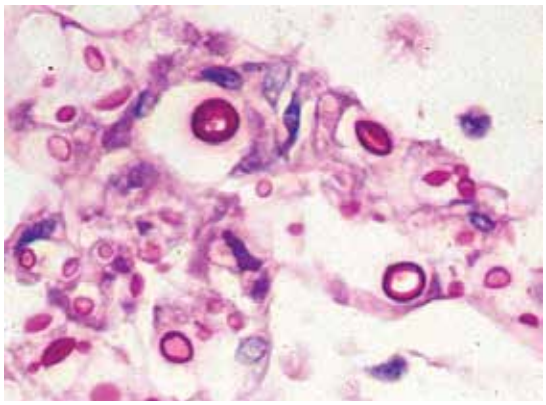


تصویر ۴- پنموسیستیس جیرووسی: رنگ آمیزی GMS

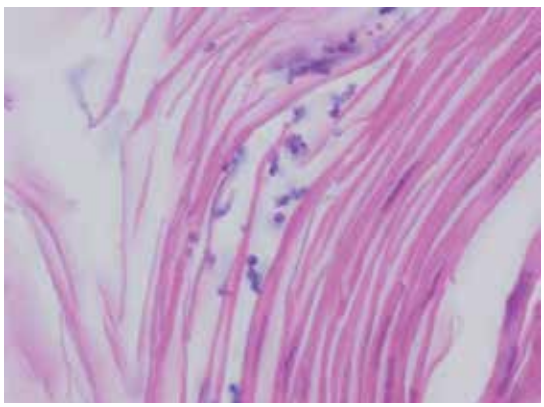
WWW.IRANPATH.ORG



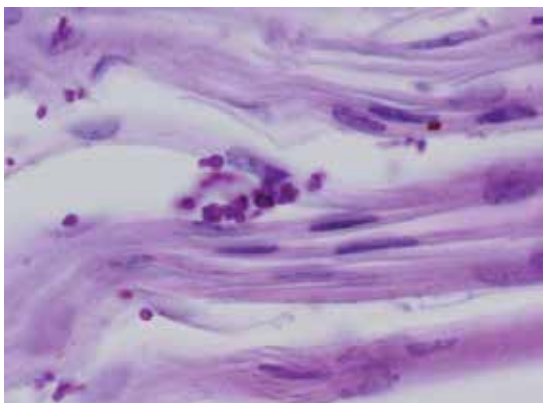
تصویر۵- کریپتوکوکوس: رنگ آمیزی آلسین بلو



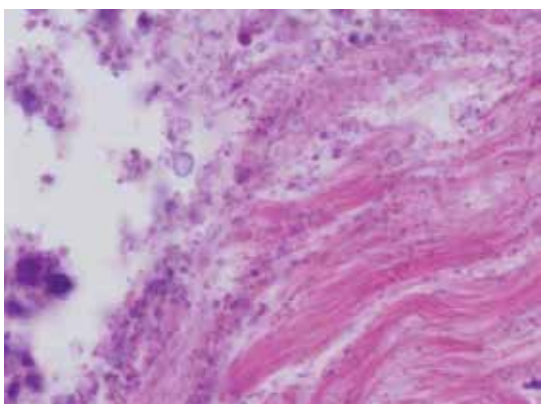
تصویر۶- کریپتوکوکوس: رنگ آمیزی PAS



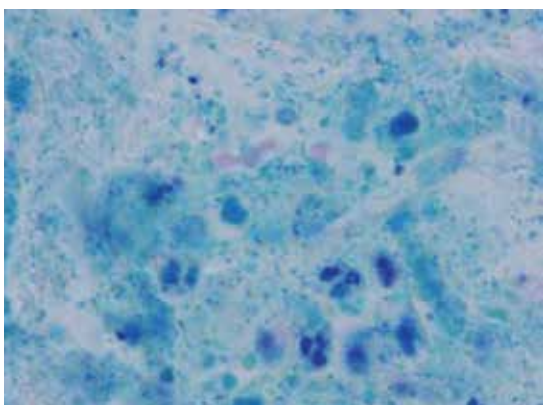
تصویر۷- مالاسزیا: رنگ آمیزی H&E



تصویر۸- مالاسزیا: رنگ آمیزی PAS



تصویر ۹- هیستوپلاسما : رنگ آمیزی H&E



تصویر ۱۰- هیستوپلاسما : رنگ آمیزی اسید فست

REF

Abida Haque, Special Stains use in Fungal Infections. (Weill Medical School of Cornell University, New York. Department of Pathology Methodist Hospital. Huston, TX,USA), connection 2010

WWW.IRANPATH.ORG