الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الصيدلة

قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة

د. ريما الدنيا

2-1- الأدوية المضادة للفطور

إن الخيارات العلاجية المتاحة من الأدوية المضادة للفطور قليلة بالمقارنة بتلك الخاصة بالأدوية المضادة للجراثيم.

تؤثر الأدوية المضادة للفطور حسب حسب آلية عملها على ثلاث مواقع خلوية، وتشمل ثماني فئات من الأدوية المتاحة حالياً للاستخدام السريري، كما هو موضح أدناه.

2-1-1- الأدوية التي تستهدف غشاء الخلية

2-1-1-1- الأدوية التي تشكيل ثقوب في غشاء الخلية

2-1-1-1-1. مشتقات *Polyene*

منذ خمسينيات القرن الماضي تم استخدام polyenes المبيدة للفطور fungicidal مثل Nystatin و Amphotericin B كخط أخير قوي ولكن شديد السمية لعلاج العداوى الفطرية الغازية.

وهي أدوية مبيدة للفطور متقابلة الزمر amphipathic تتكون من سلسلة بوليين هيدروكربونية كارهة للماء وسلسلة متعددة الهيدروكسيل محبة للماء.

لعقود من الزمان كانت النظرية السائدة هي أن هذه الجزيئات ترتبط مباشرة بجزيء الإرغوستيرول الموجود في الطبقة ثنائية الفوسفوليبيد في غشاء الخلية الفطرية محدثة ثقوب في الغشاء البلازمي مما يؤدي إلى تسرب مكونات الخلية وموتها.

ومع ذلك أظهرت الدراسات البيوفيزيائية الحديثة أن polyenes تعمل مثل "إسفنجة-إرغوستيرول ergosterol-sponge"، حيث تشكل تكدسات خارج غشائية كبيرة تنتزع الإرغوستيرول (وهو الليبيد الأساسي في غشاء الخلية) من الغشاء البلازمي.

تتضمن مشتقات Polyenes:

❖ **Nystatin:** وهو شديد السمية ومتوفر فقط للاستخدام الموضعي على شكل كريمات جلدية و/أو كريمات للأغشية مخاطية.

نظراً إلى أنه لا يتم امتصاصه عبر السبيل الهضمي، يتوفر النيستاتين أيضاً على شكل معلق فموي لاستخدامه كعلاج موضعي لداء المبيضات الفموي.

❖ **Amphotericin B:** وعلى الرغم من سميته يتوفر **Amphotericin B** للاستخدام الجهازي، وهو حالياً الخط الأخير لعلاج العداوى الفطرية الجهازية.

تم تطوير مستحضرات ليبيدية وليبوزومية وغروانية من الأمفوتريسين B كمحاولة لتقليل سميته لكنها أغلى بكثير من مستحضر ديوكسيكولات.

2-1-1-2- الأدوية التي تثبيط اصطناع الإرغوستيرول

2-1-1-2-1. مشتقات الآزولات

تشمل مشتقات الآزولات مركبات تحوي في صيغتها حلقات الإيميدازول والتريازول.

وهي الصنف الأكثر استخداماً من مضادات الفطور في الممارسة السريرية بسبب مأمونيتها وتوافرها بشكل مستحضرات فموية ووريدية.

تتداخل هذه الأدوية مع تصنيع الإرغوستيرول عن طريق تثبيط أنزيم 14-α-demetilase الموجود في السيتوكروم P-450 للخلية الفطرية مما يكبح نزع ميثيل اللانوستيرول لتحويله إلى إرغوستيرول.

يؤدي هذا التداخل إلى نفاذ الإرغوستيرول وتراكم مركبات ستيرول الوسيطية السامة مما يوقف النمو والانقسام الخلوي ويحدث ضغط شديد على غشاء الخلية severe membrane stress.

يتم صياغة معظم **مضادات الفطور الإيميدازولية** بشكل مستحضرات موضعية بسبب سميتها وقلة توافرها الحيوي مما يحد من استخدامها الجهازي.

من ناحية أخرى ترخص **التريازولات** التي تشمل Fluconazole و Itraconazole و Voriconazole و Posaconazole و Ravuconazole و Isavuconazole لعلاج الأمراض الفطرية الغازية.

الآزولات هي في الغالب كابحات للفطور (مثبطات لنمو الفطور) fungistatic، باستثناء كون Itraconazole وFluconazole مبيدة لبعض أنواع الفطور الخيطية مثل الرشاشية الدخناء (الجدول 2.1).

2-2-1-1-2. الأليلأمينات Allylamines

الأليلأمينات مثل Naftifine وTerbinafine وbutenafine (وهو مشتق للبنزيل أمين benzylamine) تمنع الاصطناع الحيوي للإرغوستيرول عن طريق تثبيط السكوالين مونوكسجيناز squalene monoxygenase (السكوالين إيبوكسيداز squalene epoxidase)، وهو إنزيم في الفطور مسؤول عن تحويل السكوالين squalene إلى السكوالين إيبوكسيد squalene epoxide، وهو طليعة للالانوستيرول في سبيل تصنيع الإرغوستيرول.

يؤدي هذا التثبيط إلى تراكم السكوالين داخل الخلايا وهو سام للخلايا الفطرية مما يؤدي إلى موت الفطر.

ترتبط الأليلامينات بشكل فعال بالطبقة المتقرنة بسبب طبيعتها المحبة للدهون وتنفذ بعمق إلى داخل بصيلات الشعر أيضاً.

الدواء الوحيد من هذه الفئة المتوفر للاستخدام الجهازي هو Terbinafine، وبمجرد تناوله عن طريق الفم فإنه يتركز في الجلد وأسرة الأظفار، ويتواجد بتركيز منخفض نسبياً في مجرى الدم.

وبالتالي فإن استخدامه كدواء مضاد للفطور الجهازية يقتصر في الدرجة الأولى على علاج الفطارات الظفرية والعداوى الفطرية الجلدية، وخاصة ضد الفطور الجلدية dermatophytes.

2-2-1-1-3. مشتقات المورفولين Morpholinic derivatives

تُمثل المشتقات المورفولينية بـ Amorolfine والذي يمنع أيضاً اصطناع الإرغوستيرول.

تظهر الدراسات المخبرية أنه فعال ضد عدة أنواع من الفطور، بما في ذلك الفطور الجلدية dermatophytes والفطور ثنائية الشكل dimorphic fungi والخمائر yeasts والفطور المُرَيساوية dematiaceous fungi، ولكن تظهر الدراسات على الكائنات الحية أنه غير فعال عند

إعطائه بشكل جهازي لذلك يقتصر استخدامه على المستحضرات الموضوعية بما في ذلك طلاء الأظفار والكريمات ومحاليل الكحول.

وهو يستخدم بشكل أساسي لعلاج الفطارات الظفرية onychomycoses والفطارات الجلدية dermatomycoses (الجدول 2.1).

2-1-2- الأدوية التي تملك أهدافاً داخل خلوية

2-1-2-1. Griseofulvin

هو منتج استقلابي لـ Penicillium griseofulvum.

يمنع نمو الفطر عن طريق الارتباط ببروتينات الأُنَيبيبات مما يؤدي إلى تعطيل معزل الانقسام وبالتالي تثبيط الانقسام الفتيلي للخلية الفطرية.

كان أول دواء فموي متاح لعلاج الفطارات الجلدية ويستخدم فقط للعداوى بالفطارات الجلدية غير الغازية لأنه يتركز في الخلايا الكيراتينية (الجدول 2.1).

2-1-2-1. Pyrimidines

تم استخدام البيريميدينات كـ(5-fluorocytosine) flucytosine، لأول مرة لعلاج العداوى الفطرية في ستينيات القرن الماضي.

Flucytosine هو مركب صنعي مفلور مضاهئ للسيتوزين.

عندما يدخل إلى العصارة الخلوية cytosol للخلية الفطرية يتم إزالة أمين الفلوسيتوزين بسرعة بواسطةcytosine deaminases الخاص بالفطور فينتج 5_fluorouracil، والذي يعمل كمضاد مستقلب antimetabolite عن طريق تثبيط إنزيم thymydilate synthase مما يؤدي إلى خطأ في ترجمة RNA وتثبيط اصطناع DNA.

لا يستخدم لوحده في العلاج بسبب التطور السريع للمقاومة تجاه، وبالتالي يستخدم بالمشاركة مع مضادات الفطور الأخرى وخاصة amphotericin B.

لا تزال هذه المشاركة الدوائية "المعيار الذهبي" لعلاج العداوى بفطور المستخفيات، ومع ذلك فإن الفلوسيتوسين محدود التوافر في البلدان النامية (الجدول 2.1).

2-2-1-2. مشتقات Pyridine

يتمثل هذا الصنف من الأدوية بـ **ciclopirox** الذي يمارس فعاليته المضادة للفطور عن طريق استخلاب الكاتيونات ثلاثية التكافؤ بما في ذلك Fe^{3+} وAl^{3+}، مما يؤدي إلى تثبيط الإنزيمات المعتمدة على المعادن، وخاصة السيتوكرومات cytochromes والكاتالازات catalases والبيروكسيدازات peroxidases، مما يؤدي إلى تقليل نقل الأيونات عبر الأغشية السيتوبلازمية للخلايا الفطرية الممرضة وتقليل مدخولها من المواد المغذية.

يتم تسويقه بشكل مستحضرات موضعية عديدة، بما في ذلك طلاء الأظافر والكريمات والشامبوهات والمحاليل، ويستخدم لعلاج العداوى الفطرية في الجلد وفروة الرأس والفطارات الظفرية onychomycoses والنخالية المبرقشة pityriasis versicolor وداء المبيضات المهبلي الفرجي vulvovaginal candidiasis (الجدول 2.1).

2-1-3- الأدوية التي تستهدف الجدار الخلوي

2-1-3-1. Echinocandins

الإيشينوكاندين هي الصنف الدوائي الجديد والوحيد من الأدوية المضادة للفطور الذي يصل إلى الاستخدام السريري منذ عقود، ويتضمن ثلاثة أدوية متوفرة حالياً: Caspofungin و Micafungin و Anidulafungin.

هذه المركبات عبارة عن ببتيدات سداسية حلقية cyclic hexapeptides والتي تعمل كمثبطات غير تنافسية لأنزيم (1،3)-β-D-glucan synthase الذي يشارك في اصطناع عديد السكاريد الأساسي لجدار الخلية وهو (1،3)-β-D-glucan، ويوفر الأخير السلامة البنيوية للخلية، ويؤدي تثبيط اصطناعه إلى تخرب بنية جدار الخلية والضغط الشديد عليه severe cell wall stress.

هذه الأدوية آمنة جداً ربما لأن لها هدفاً خاصاً بالفطور، مع عدم وجود مضاهئات له في الخلايا الحيوانية.

على الرغم من فعاليتها القوية ضد أنواع المبيضات وأنواع الرشاشيات، فإن هذه المركبات غير فعالة كلياً ضد أنواع المستخفيات وشعرية الأبواغ .Trichosporon.

برزت Echinocandins كخيار علاجي مهم لداء المبيضات خاصة بسبب الانتشار المتزايد لمقاومة الآزولات (الجدول 2.1).

الجدول 2.1 الأدوية المضادة للفطور وآليات عملها وطريقة استخدامها وطيفها المضاد للفطور.

موقع التأثير	الصنف الدوائي	آلية العمل	الأدوية	الاستخدام	الطيف المضاد للفطور
غشاء الخلية	Polyenes	الارتباط بالإرغوستيرول/ انتزاعه مما يحدث ثقوب غشائية.	Nystatin	موضعي أو فموي	الخمائر Yeast، أنواع المبيضات Candida spp
			Amphotericin B	وريدي	الخمائر Yeasts والفطور الخيطية Filamentous fungi (عدا الرشاشيات الأرضية Aspergillus (terreus والفطور ثنائية الشكل Dimorphic fungi

مشتقات الآزولات	تثبيط اصطناع الإرغوستيرول عن طريق تثبيط أنزيم 14-α-demetilase، وتراكم مركبات سامة (الستيرول).	Imidazoles	موضعي	الخمائر Yeasts_أنواع المبيضات Candida spp وأنواع الملاسيزية Malassezia spp. والفطور الجلدية Dermatophytes
		Miconazole		
		Ketoconazole	موضعي أو فموي	
		Triazoles	فموي أو وريدي	الخمائر Yeasts (ما عدا المبيضة الكروزية C. krusei) والفطور ثنائية الشكل Dimorphic fungi (أقل تأثراً)
		Fluconazole		
		Itraconazole	فموي	الخمائر Yeasts والفطور الخيطية Filamentous fungi والفطور ثنائية الشكل Dimorphic fungi
		Voriconazole	فموي أو وريدي	
		Posaconazole	فموي	
مركبات الأليلأمين Allylamines	تثبيط اصطناع الإرغوستيرول، عن طريق تثبيط أنزيم	Naftifine	موضعي	الخمائر Yeasts_الفطار الظفري

			squalene monoxygenase، وتراكم مركبات سامة (السكوالين).	onychomycosis والفطور الجلدية Dermatophytes
		Terbinafine	موضعي أو فموي	الخمائر Yeast_الفطار الظفري onychomycosis والفطور الجلدية Dermatophytes وأنواع الشعرية المبوغة Sporothrix spp
	مشتقات Morpholin	تثبيط اصطناع الإرغوستيرول	Amorolfine	موضعي	الفطور الجلدية Dermatophytes
داخل الخلية	Griseofulvin	الارتباط ببروتينات الأُنَيبيبات، وتعطيل معزل الانقسام، وتثبيط الانقسام الفتيلي.	Griseofulvin	موضعي أو فموي	الفطور الجلدية Dermatophytes
	مشتقات Pyrimidines	تثبيط إنزيم thymydilate synthase، مما يؤدي إلى خطأ في ترجمة RNA وتثبيط اصطناع DNA.	Flucytosine	فموي	الخمائر Yeasts_أنواع المستخفيات Cryptococcus spp وأنواع المبيضات Candida spp

مشتقات Pyridine	استخلاب الكاتيونات ثلاثية التكافؤ، مما يؤدي إلى تثبيط الإنزيمات المعتمدة على المعادن.	Ciclopirox	موضعي	أنواع المبيضات Candida spp	
				والفطور الجلدية Dermatophytes	
جدار الخلية	Echinocandins	تثبيط اصطناع (1،3)-β-D-glucan مما يؤدي إلى فقدان سلامة جدار الخلية.	Caspofungin	وريدي	أنواع المبيضات Candida spp
			Micafungin		أنواع الرشاشيات Aspergillus spp
			Anidulafungin		

2-1- اختبار التحسس على مضادات الفطور

يتم إجراء اختبار التحسس على مضادات الميكروبات بشكل أساسي للتنبؤ بنتائج المعالجة بمضادات الميكروبات لكل مريض ولجمع بيانات محلية حول التحسس على مضادات الميكروبات من أجل دعم استخدام العلاج التجريبي empirical therapy.

أجريت اختبارات التحسس على مضادات الميكروبات أيضاً للكشف عن الكائنات الحية التي تملك آليات مقاومة خاصة، بحيث يمكن اتخاذ تدابير لمكافحة العدوى و/أو للحفاظ على الصحة العامة.

أخيراً ونظراً إلى أن العالم يتجه نحو "عصر ما بعد الصادات الحيوية" فقد ازداد الاهتمام بإجراء اختبار التحسس على مضادات الميكروبات بهدف معرفة ديناميكيات measuring the dynamics تطور المقاومة والتأثير المحتمل للتدابير المضادة لها والتي تهدف لإبطاء أو عكس ظهور السلالات المقاومة.

ومع ذلك فإن إحدى أكبر العقبات التي تعترض تطوير منهجيات لتقييم التحسس على مضادات الميكروبات هي وضع بروتوكولات موحدة للحصول على نتائج قابلة للتكرار يمكن مقارنتها بين

المؤسسات المختلفة، وهو أمر في غاية الأهمية لأن نتائج التحسس يجب أن تكون قابلة للمقارنة في جميع أنحاء العالم خاصة إذا كانت مجراة لأهداف وبائية وترصدية.

نشأت الحاجة لتطوير اختبارات موثوقة لتقييم قابلية تحسس العزلة الفطرية fungal isolates على الأدوية المضادة للفطور بالتزامن مع انتشار أوبئة الإيدز في بداية ثمانينيات القرن الماضي عندما لوحظ أن العديد من مرضى الإيدز الذين يعانون من داء المبيضات الفموي المريئي لم يستجيبوا للعلاج بمضادات الفطور.

في عام 1985 لاحظت لجنة علم الفطور التابعة لمعهد المعايير السريرية والمخبرية (CLSI)، المعروف سابقاً باسم اللجنة الوطنية لمعايير المختبرات الطبية (NCCLS)، أن 20٪ من المختبرات الأعضاء بدأت بإجراء اختبارات الحساسية على مضادات الفطور، خاصة لأنواع المبيضات، لكنهم كانوا يحصلون على نتائج متناقضة، وبالتالي قررت CLSI تطوير وتوحيد منهجية قابلة للتكرار ومناسبة لتقييم قابلية تحسس العزلة السريرية على مضادات الفطور في المختبرات الروتينية في الولايات المتحدة.

لوحظت نفس المشكلة في أوروبا، حيث توصي الوكالات الوطنية من ستة بلدان (فرنسا والمملكة المتحدة وهولندا وألمانيا والسويد والنرويج) بمنهجيات مختلفة، مما يؤدي إلى انخفاض قابلية التكرار والمقارنة، لذلك أنشأت الجمعية الأوروبية لعلم الأحياء الدقيقة السريرية والأمراض المعدية (ESCMID) في عام 1997 اللجنة الأوروبية المعنية باختبار التحسس على المضادات الميكروبية (EUCAST) من أجل تشكيل هذه اللجنة اتبعت ESCMID طرقاً مماثلة لتلك الخاصة ب CLSI، وذلك بإشراك ممثلي الوكالات الوطنية التي كانت تعمل بالفعل على تطوير اختبار تحسس على مضادات الميكروبات لتوحيد المنهجيات المستخدمة في جميع أنحاء أوروبا في هذه اللجنة.

أدت هذه المبادرات (CLSI وEUCAST) إلى تطوير بروتوكولات موحدة للتقليل من تباين النتائج بين المؤسسات وزيادة إمكانية المقارنة بين مختلف البلدان، وقد وضعت كلتا المنظمتين CLSI وEUCAST بروتوكولات تصف المنهجيات المختلفة التي توصي بها لاختبار التحسس على مضادات الميكروبات، تم إصدار أحدث وثائق CLSI وEUCAST في عام 2017 بما في ذلك وثيقة واحدة لاختبار تحسس الخمائر على مضادات الميكروبات وبشكل أكثر تحديداً لأنواع المبيضات وأنواع المستخفيات، وأخرى لاختبار تحسس الفطور الخيطية على مضادات الميكروبات (العفنات المشكلة للغُبيرات).

2-2-1. طرق إجراء اختبار التحسس على مضادات الفطور

تقسم طرق تقييم التحسس على مضادات الفطور إلى:

طرق نوعية: لا يتم فيها تحديد التركيز المطلوب من الدواء لتثبيط نمو الفطور.

طرق كمية: يمكنها تحديد التركيز الأدنى المثبط (MIC) للدواء المختبر.

أول طريقة وُضِعَت لاختبار التحسس على مضادات الفطور هي اختبار انتشار القرص disk-diffusion assay والذي تم استخدامه بشكل رئيسي للخمائر وهو مماثل لذلك المستخدم لتقييم التحسس على مضادات الجراثيم، يتمثل مبدأه الأساسي في قياس قطر منطقة تثبيط النمو (مم) حول قرص مشرب بكمية محددة مسبقاً من الدواء، وكلما كبرت منطقة التثبيط كلما كانت حساسية الغزلة للدواء المختبر أكبر، ولا يعكس قياس قطر هذه المنطقة تركيز الدواء اللازم لتثبيط نمو الميكروبات (أي لا نستطيع الحصول على قيمة MIC بهذه الطريقة) وبالتالي سنحصل على نتائج نوعية، وقد استخدمت هذه الطريقة بشكل أساسي لأنواع المبيضات وبعض الفطور الخيطية مثل أنواع الرشاشيات.

إضافة إلى ذلك تم تطوير اختبار مقياس إبسيلون Epsilometer والذي يتم باستخدام شرائط مشربة بتدرج متناقص من الدواء مما يسمح بتقدير قيم MIC للأدوية المضادة الفطور، ومع ذلك فإن هذه القيم تقديرية، وبالتالي يعتبر اختبار مقياس إبسيلون طريقة نصف كمية.

الطرق الكمية هي التي تُجرَى عن طريق سلسلة تمديدات للدواء لإيجاد التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطور من الدواء MIC، تعرف هذه الطرق بشكل عام باسم اختبارات تمديد الآجار أو المرق agar or broth dilution assays.

يمكن إجراء اختبارات تمديد الآغار في أطباق بتري تحتوي على آجار مغذي وتراكيز متزايدة من الدواء.

من ناحية أخرى، يتم إجراء اختبارات تمديد المرق في أنابيب زجاجية باستخدام حجوم كبيرة من وسط النمو والدواء، أو في صفائح المعايرة الدقيقة microtiter plates (التمديد المكروي للمرق broth microdilution)، مما يقلل من الإجراءات، جاعلاً هذه الطريقة أرخص وأكثر عملية (الشكل 2.1).

من بين الطرق المتاحة والمستخدمة لتقييم التحسس على مضادات الفطور، فإن التمديد المكروي للمرق هو المعيار الذهبي، تقوم هذه الطريقة على تعريض لقيحة فطرية موحدة لتراكيز متزايدة بمقدار الضعف

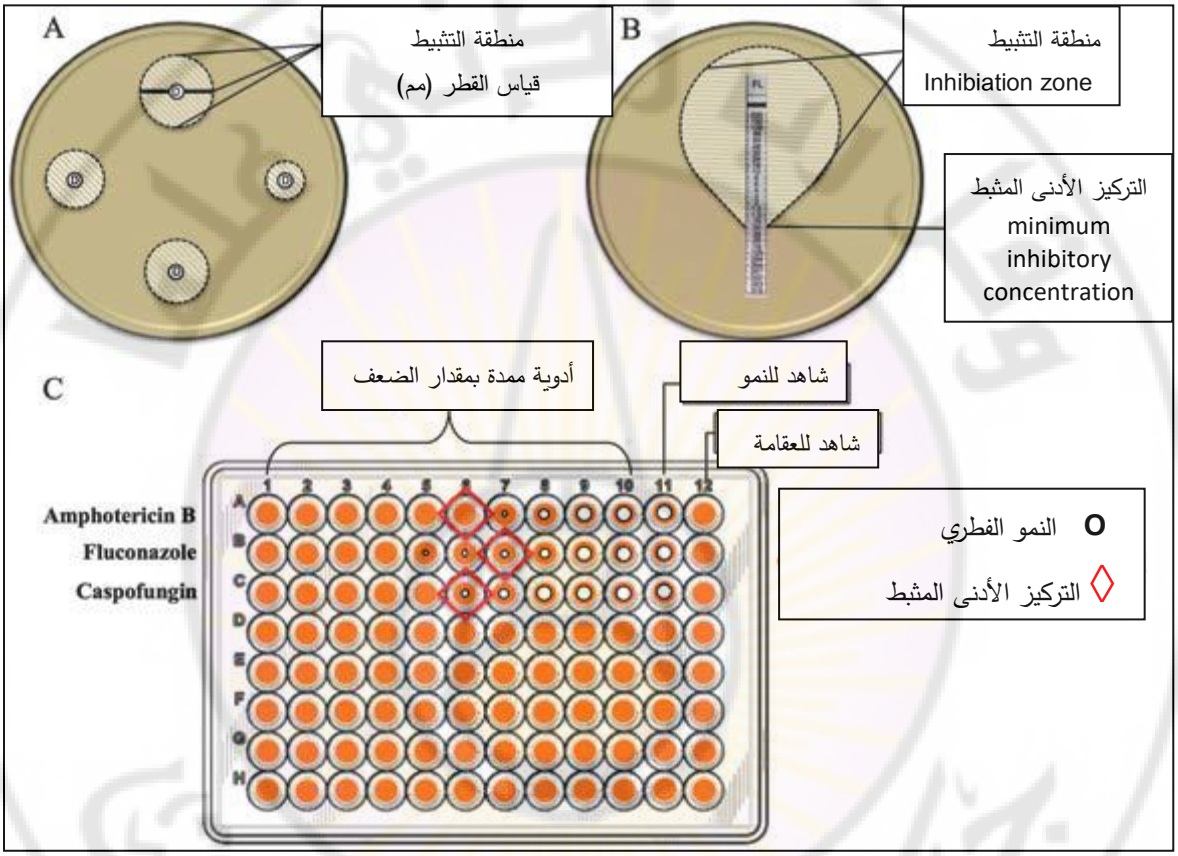
من الأدوية المضادة للفطور (10 تراكيز مختلفة)، باستخدام صفيحة معايرة دقيقة مصنوعة من polystyrene تحوي 96 بئراً قاعها بشكل حرف U أو مسطحة القاع (الشكل 2.1).

توصي كلاً من CLSI وEUCAST بشكل أساسي باستخدام مستنبت RPMI 1640 broth مع إضافة الجلوكوز أو بدونها، إضافة إلى أن تحضير بعض الشواهد أمر أساسي لضمان موثوقية الاختبار: (1) بئر شاهد للنمو خالي من الدواء لكل عزلة يتم اختبارها للتأكد من قابليتها للحياة؛ و(2) آبار شاهدة للعقامة خالية من الفطور للتأكد من عقامة الكواشف والإجراءات؛ و(3) ذراري فطرية لضبط الجودة تستخدم للتأكد من فعالية الأدوية المضادة للفطور المختبرة.

في النهاية تسمح هذه المنهجيات الموصى بها بتحديد التركيز الأدنى المثبط MIC لمضادات الفطور التي تم اختبارها اعتماداً على النقاط الفاصلة للقراءة breakpoints التي وضعتها كل مؤسسة.

وتعرف MIC على أنها أدنى تركيز من الدواء قادر على تثبيط نمو الفطور بنسبة 100 % للأدوية ذات التأثير القاتل للفطور fungicidal كـ Amphotericin B أو أدنى تركيز القادر على تثبيط نمو الفطور جزئياً بنسبة 50–80 % للأدوية ذات التاثير المثبط لنمو الفطور fungistatic كمشتقات الآزولات وEchinocandins. يمكن تحديد التراكيز المثبطة الدنيا عيانياً أو عن طريق مقياس الطيف الضوئي.

ومن المهم التأكيد على أن هناك بعض الاختلافات المنهجية بين البروتوكولات التي وضعتها CLSI وEUCAST، وخاصة فيما يتعلق بتركيز اللقيحة وفترة الحضانة ومكونات المرق، ومع ذلك بذلت جهود كبيرة من أجل التوافق بين harmonize النتائج التي تم الحصول عليها وتفسيرها (الجدول 2.2).



يوضح الشكل 2.1 الطرق الرئيسية المستخدمة لاختبار التحسس على مضادات الفطور.

(A) اختبار انتشار القرص: ينتشر الدواء المضاد للفطور من القرص المضاد للفطور (القرص D) إلى الآجار، مشكلاً منطقة تثبيط والتي يتم يقاس قطرها، ويعبر عنها بالمليمترات، ويسمح حجمها بتصنيف العزلة إلى حساسة أو متوسطة أو مقاومة، وهي طريقة نوعية.

(B) طريقة مقياس الإبسليون: يتم تشريب الشريط المضاد للفطور بتراكيز متناقصة من الدواء ويؤدي انتشار الدواء إلى الآجار إلى تكوين منطقة تثبيط على شكل قطرة تواجه الشريط المضاد للفطور، يمثل التركيز الذي تتلاقى فيه منطقة التثبيط مع الشريط التركيز المثبط الأدنى (MIC) التقديري للدواء، وبالتالي فهي طريقة نصف كمية.

(C) طريقة التمديد المكروي للمرق Broth microdilution method: تضاف الأدوية المضادة للفطور بتراكيز متناقصة بمقدار النصف من أجل إيجاد أدنى تركيز قادر على تثبيط نمو الفطور والذي يعرف باسم MIC، إن هذه الطريقة الكمية هي المعيار الذهبي لاختبار التحسس على مضادات الفطور.

شاهد النمو: يحتوي على المرق المغذي واللَقيحَة الفطرية.

شاهد العقامة: يحتوي فقط على المرق المغذي.

تمديد الدواء بمقدار الضعف: يتم إجراء التمديد من البئر 1 (أعلى تركيز) إلى البئر 10 (أدنى تركيز).

Amphotericin B: تم اختباره عند مجال تركيز يتراوح بين 16–0.03125 µg/mL؛ MIC (تثبيط النمو بنسبة 100%) يساوي 0.5 µg/mL (البئر 6).

Fluconazole: تم اختباره عند 64–0.125 µg/mL؛ MIC (تثبيط النمو بنسبة 50%) يساوي 1 µg/mL (البئر 7).

Caspofungin: تم اختباره عند 16–0.03125 µg/mL؛ MIC (تثبيط النمو بنسبة 50٪) يساوي 0.5 µg/mL (البئر6).

الجدول 2.2 مقارنة بين منهجيات البروتوكولات المقترحة من قبل CLSI وEUCAST لإجراء اختبارات التمديد الدقيق للمرق.

الخطوات	**CLSI**	**EUCAST**
صفيحة البوليستيرين	96 بئراً قاعها بشكل حرف U	96 بئراً قاعها مسطح
المرق	مستنبت RPMI 1640 (1×)	مستنبت RPMI 1640 + 2% غلوكوز (2×)
اللقيحة الفطرية	الخمائر: $0.5–2.5 \times 10^3$ cfu/ml	الخمائر: $0.5–2.5 \times 10^5$ cfu/ml
	العفنات:	العفنات: $1–2.5 \times 10^5$ cfu/ml
• الفطور	اللاجلدية: Non–	

	:dermatophytes: $0.4–5 \times 10^4$ cfu/ml • الفطور الجلدية: $1–3 \times 10^3$ cfu/ml	
الحضانة	▪ الخمائر: • أنواع المبيضات: 35–37° م، 24 سا • أنواع المستخفيات: 35° م، 48–72 سا ▪ العفنات: 35° م، 24–72 سا	▪ الخمائر: • أنواع المبيضات: 35–37° م، 24 سا • أنواع المستخفيات: 35° م، 48 سا (30° م إذا لم تنمو في الدرجة 35° م) ▪ العفنات: 35° م، 24–72 سا
طريقة قراءة النتائج	الخمائر والعفنات: عيانياً	الخمائر: بمقياس الطيف الضوئي العفنات: عيانياً
النقطة الفاصلة للقراءة Reading breakpoint (تحديد MIC أو MEC)	▪ الخمائر: ○ Amphotericin B: تثبيط بنسبة 100% ○ مشتقات الآزولات و Echinocandins و Flucytosine: تثبيط بنسبة 50%* ▪ العفنات: • الفطور اللاجلدية: ○ Amphotericin B ومشتقات الآزولات: تثبيط	▪ الخمائر: ○ Amphotericin B: تثبيط الامتصاصية بنسبة أكبر أو تساوي 90% * ○ مشتقات الآزولات و Echinocandins و Flucytosine: تثبيط الامتصاصية بنسبة 50% * ▪ العفنات: ○ Amphotericin B: ومشتقات الآزولات**: تثبيط بنسبة

	بنسبة 100%	%100
	○ Fluconazole و Flucytosine: تثبيط بنسبة 50%	○ Echinocandins: إحداث نمو شاذ abnormal growth (MEC)
	○ Echinocandins: إحداث نمو شاذ abnormal growth (MEC)	
	• الفطور الجلدية:	
	○ مشتقات الآزولات و Terbinafine و Griseofulvin و Ciclopirox: تثبيط بنسبة 80% *	
ذراري ضبط الجودة	المبيضة المرطية ATCC 22019	
	المبيضة الكروزية ATCC 6258	
شاهد العقامة	✓	
شاهد النمو	✓	

الاختصارات:

MIC: التركيز المثبط الأدنى، أدنى تركيز من الدواء قادر على تثبيط نمو الفطور.

MEC: التركيز الأدنى الفعال، أدنى تركيز من الدواء قادر على إحداث نمو شاذ (خيوط قصيرة ومتفرعة)، يستخدم فقط Echinocandins مقابل الفطور الخيطية.

* تثبيط جزئي (50% أو 80% أو 90%) وهو ينسب دائماً لامتصاصية شاهد النمو الخالي من الدواء.

** لا توصي EUCAST باستخدام Fluconazole و Flucytosine لمعالجة العفنات.

2-2-2. تفسير التركيز الأدنى المثبط MIC: النقاط الفاصلة السريرية Clinical breakpoints مقابل القيم الحدية الوبائية Epidemiological cutoff values (ECV)

بعد الحصول على قيم التراكيز الدنيا المثبطة للأدوية المضادة للفطور والمقابلة للعزلات المختبرة يمكن تصنيف هذه العزلات إلى حساسة أو مقاومة أو وسط بينهما وذلك وفقاً للنقاط الفاصلة التفسيرية أو السريرية interpretive or clinical breakpoints التي وضعتها CLSI و EUCAST.

النقاط الفاصلة السريرية: هي التراكيز التي تصنف العزلات/السلالات على أساسها على أنها حساسة أو متوسطة أو مقامة للمضاد الميكروبي المستخدم.

وفي الآونة الأخيرة أعيد النظر في تعريف التصنيفات السابقة وأصبحت تُعرَف الآن كما يلي:

(1) حساسة (S) عندما يرتبط مستوى فعالية للدواء المضادة للميكروبات (الذي يحدده التركيز الأدنى المثبط للدواء المضاد للفطور) باحتمال كبير لنجاح العلاج.

(2) متوسطة (I) عندما يرتبط مستوى فعالية للدواء المضادة للميكروبات (الذي يحدده التركيز الأدنى المثبط للدواء المضاد للفطور) باحتمال كبير لنجاح العلاج، لكن فقط إذا كان من الممكن استخدام جرعة أعلى (جرعات أعلى، تكرار أكثر للجرعة) من المعتاد من الدواء أو إذا كان الدواء المضاد للفطور يتركز فيزيولوجياً في موقع العدوى.

(3) مقاومة (R) عندما يرتبط مستوى فعالية للدواء المضادة للميكروبات (الذي يحدده التركيز الأدنى المثبط للدواء المضاد للفطور) باحتمال كبير لفشل العلاج.

بناءً على هذه التعاريف أصبح من الواضح أن وضع نقاط فاصلة سريرية يعتمد على تأثر ثلاث عوامل trinomial interaction تتضمن (1) نوع الفطر و(2) الدواء المضاد للفطور المستخدم أو المختبر و(3) النتيجة السريرية.

وبالتالي فإن الهدف الرئيسي من إجراء اختبار التحسس على مضادات الفطور هو التنبؤ بالاستجابة للعلاج بالأدوية المضادة للفطور.

ومع ذلك وبشكل مشابه لما تم وصفه في اختبار التحسس على مضادات الجراثيم تنطبق قاعدة 90-60 أيضاً على اختبار التحسس على مضادات الفطور.

وتنص هذه القاعدة على أن 90% من العداوى التي تسببها الميكروبات الحساسة في المخبر و60% من العداوى التي تسببها الميكروبات المقاومة في المخبر تستجيب بشكل جيد للعلاج بمضادات الميكروبات في العضوية.

لذلك عندما يتم وضع نقاط فاصلة سريرية ملائمة _وعلى الرغم من عدم وجود علاقة مباشرة بين النتائج التي حُصِل عليها في المخبر والنتائج الظاهرة في العضوية_ فإن إجراء اختبار التحسس الفطري يمكن أن يوجه لاختيار العالج المناسب وبالتالي يحصل المريض على فرصة لنجاح العلاج بنسبة 90%.

ومع ذلك فإن وضع النقاط الفاصلة السريرية الموثوقة لا يزال إحدى أكبر عقبات في اختبار التحسس على مضادات الفطور، حيث يتطلب وضعها معرفة توزع MIC لكل الأدوية المضادة للفطور مقابل أنواع الفطور ومتثابتات الديناميكية الدوائية والحرائك الدوائية للدواء بالإضافة للنتيجة السريرية، أي يجب الأخذ بعين الاعتبار العلاقة بين هذه البيانات وقيم MIC للدواء المضاد للفطور.

بالإضافة إلى ذلك هناك العديد من العوامل التي تؤثر على الاستجابة السريرية، مثل الحالة المناعية للمضيف وموقع العدوى وبالتالي فإن وضع النقاط فاصلة سريرية يعتمد على ملاحظة ومتابعة العديد من حالات العداوى التي يسببها كل نوع فطري مما يجعلها مكلفة وصعبة خاصة بالنسبة للعداوى الفطرية قليلة الانتشار أو تلك التي تؤثر بشكل رئيسي على مثبطي المناعة، حيث من المرجح أن تعرضهم حالتهم المناعية الموهنة لنتيجة سريرية خطيرة.

بناء على ما تم شرحه أعلاه أصبح من المفهوم لماذا وُضِعت نقاط فاصلة سريرية لعدد قليل من الأدوية فقط (مشتقات الآزولات وEchinocandins) ضد بعض أنواع المبيضات والرشاشيات، كما أدت هذه العقبات إلى التشكيك في إمكانية الاستفادة من إجراء اختبار التحسس على مضادات الفطور باستخدام العزلات الفطرية، حيث لا يمكن ربط قيم MICs أو الحصول على مزيد من التفسير لهذه القيم، وعلى ما يبدو لا يمكن إعطاء أي معنى بيولوجي لقيم MICs لمضادات الفطور.

ولهذا السبب بدأت المؤسسات في استخدام نهج ذو حدين للحصول على مزيد من التفسير لبيانات MIC التي تم الحصول عليها، يعتمد هذا النهج فقط على (1) جمهرة population نوع فطري معين، و(2) الدواء المضاد للفطور المختبر.

يسمح هذا النهج بإجراء تحليل وبائي لـ MICs للأدوية المضادة للفطور المقابلة لهذه الجمهرة الفطريةfungal population وذلك اعتماداً على إحصائيات سابقة للجمهرة premises of population statistics، لأن توزع MIC للدواء المضاد الفطور والمقابل لنوع فطري معين يميل إلى اتباع توزع غاوس (التوزع الطبيعي) Gaussian distribution.

سمح تحليل التوزع التكراري لقيم MIC للدواء المضاد الفطور الذي تم اختباره والمقابل لنوع فطري معين بوضع قيمة القطع الوبائية (ECV أو ECOFF) لهذا الدواء، والتي تصنف عزلات نوع فطري معين إلى نوع شائعwild type وذلك عندما تكون العزلات حساسة لتراكيز أقل من ECV أو تساويها (MIC≤ECV)، أو نوع غير شائع non-wild type وذلك عندما تكون العزلات حساسة لتراكيز أعلى من ECV (MIC>ECV).

لذلك ونظراً إلى أن توزع MIC يتبع توزع غاوس، فإن التوزع النموذجي لـ MIC للنوع الشائع يغطي ثلاثة إلى خمسة تمديدات مضاعفة تحيط بمنوال modal الـ MIC.

يشمل WT عموماً ما لا يقل عن 95٪ من العزلات داخل جمهرة فطرية محددة، وتكون ECV أعلى قيمة MIC لجمهرة النوع الشائع (الشكل 2.2).

ولكن ما هو المعنى البيولوجي لتصنيف العزلة على أنها من النوع الشائع WT أو غير الشائع NWT لدواء مضاد فطري معين؟

عندما تكون العزلة من نوع شائع فهذا يعني أن خصائص حساسيتها للدواء المضاد للفطور تقع ضمن السلوك المتوقع لـ 95٪ من العزلات التي تنتمي إلى نفس النوع الفطري، من ناحية أخرى عندما يتم تصنيف العزلة على أنها من نوع غير شائع فهذا يعني أن خصائص حساسيتها ليست ضمن المتوقع لغالبية جمهرة، لذلك ربما تكون قد مرت بتغيرات وراثية/ظاهرية.

لذلك تتميز العزلة من النوع الشائع (WT) بعدم وجود آليات مقاومة مكتسبة وطفرية للدواء المضاد للفطور المختبر يمكن اكتشافها من خلال نمطها الظاهري، في حين تتميز العزلة من النوع غير الشائع

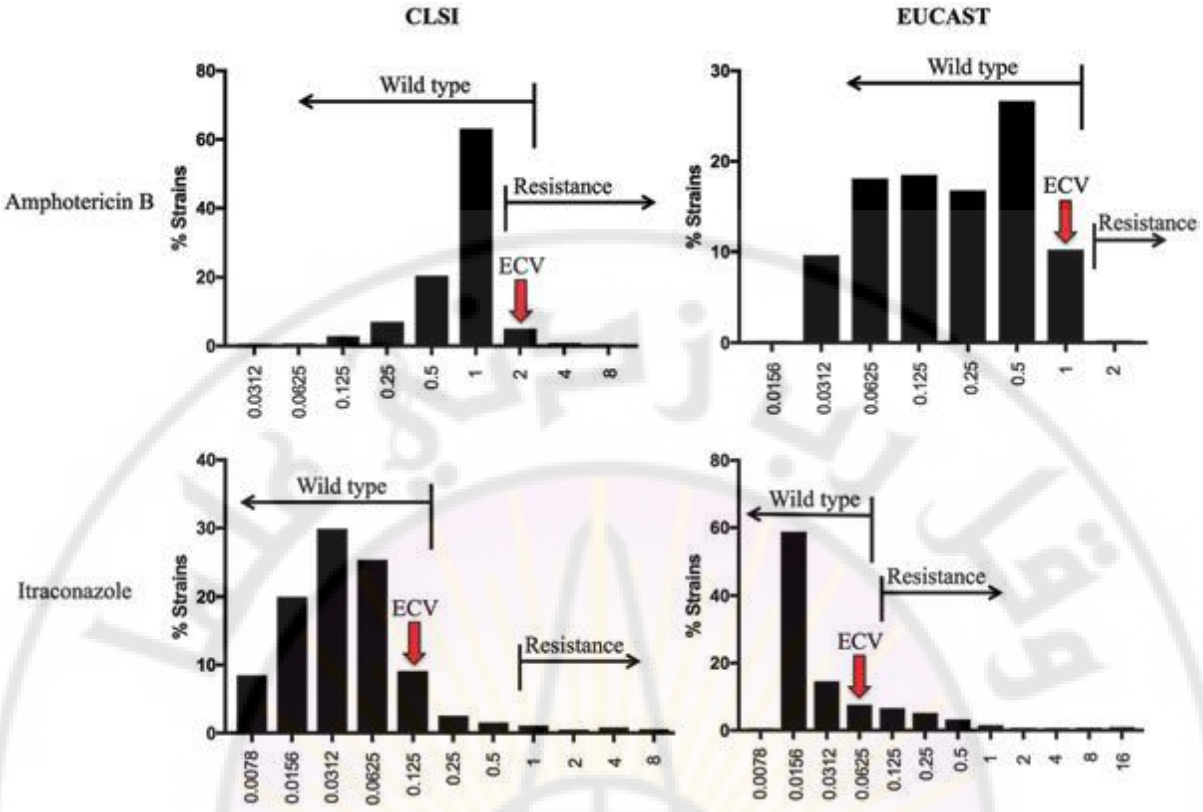
(NWT) بوجود آليات مقاومة مكتسبة أو طفرية للدواء المضاد للفطور المختبر يمكن اكتشافها من خلال نمطها الظاهري.

على الرغم من أن ECVs لا تتنبأ مباشرة بالاستجابة للعلاج بالدواء المضاد للفطور، فقد أثبتت أنها مفيدة لمراقبة التعبير عن آليات المقاومة وبالتالي ستكشف ظهور مقاومة للأدوية المضادة للفطور، وعلاوة على ذلك تسمح ECVs أيضاً بمراقبة حساسية نوع فطري معين لدواء معين مضاد للفطور عبر الزمن، مما يتيح فهماً أفضل للسلوك الوبائي للفطور خاصة في حال وجود ضغوط انتقائية بيئية.

تقنياً يمكن وضع ECVs لأي دواء مضاد للفطور مقابل أي نوع فطري طالما أن هناك بيانات لـ MIC من مؤسسات مختلفة شرط الحصول عليها باستخدام منهجية موحدة وذلك مقابل ما لا يقل عن 100 عزلة، ومن المهم التأكيد على أن زيادة كلاً من بيانات MIC والمؤسسات المشاركة يؤدي إلى زيادة موثوقية ECVs.

أنتجت كل من CLSI وEUCAST وثائق تحتوي على توصيات لوضع وتفسير ECVs للأدوية المضادة للفطور مقابل جمهرة فطرية معينة.

ولقد تم إنشاء ECVs للعديد من الأنواع الفطرية بما في ذلك تلك الموجودة في جنس المبيضات Candida والمستخفيات Cryptococcus والرشاشيات Aspergillus والملاسيزية Malassezia والمغزلاوية Fusarium والشعرية المبوغة Sporothrix والنوسجة Histoplasma.



الشكل 2.2 توزيع تكراري للتراكيز الدنيا المثبطة MICs (µg/ml) لـ Amphotericin B وItraconazole مقابل المبيضات البيض، تم الحصول على هذه القيم بطريقة التمديد المكروي للمرق، وفقاً للبروتوكولات التي وصفها CLSI وEUCAST.

ECV: قيمة القطع الوبائية وهي التركيز الأدنى المثبط للدواء المضاد للفطور الذي يقسم المجهرة الميكروبية microbial population المختبرة إلى نوع شائع wild-type (MIC≤ECV) ونوع غير شائع (MIC>ECV).

وكانت نقاط التوقف السريرية Clinical breakpoints المستخدمة لإنشاء هذه المخططات كما يلي:

Amphotericin B: يشير MIC>1µg/ml إلى المقاومة، وفقاً لكل من CLSI وEUCAST.

Itraconazole: تشير MICs >0.5µg/ml (وفقاً لـ CLSI) أو MICs >0.0625µg/ml (وفقاً لـ EUCAST) إلى المقاومة.

لاحظ أن ذراري النمط الشائع تصنف غالباً على أنها ذراري حساسة، في حين يمكن تصنيف ذراري النمط الغير شائع على أنها حساسة أو مقاومة وذلك اعتماداً على الدواء المختبر.

2-2-3. أتمتة اختبار التحسس على مضادات الفطور:

يمكن استخدام نفس الأجهزة المؤتمتة المستخدمة لتحديد هوية الأنواع الفطرية من خلال نمطها الظاهري أيضاً لتقييم تحسس العزلات على مضادات الفطور.

هذه الأجهزة قادرة على تحديد هوية وإجراء اختبار التحسس على مضادات الفطور وتفسير نتائج MIC الناتجة عن هذا الاختبار فقط لعزلات الخميرة التي تنتمي إلى الأنواع الموجودة في قاعدة بياناتها، وبالتالي يمكن إجراء اختبار التحسس على مضادات الفطور بشكل موثوق فيه لـ المبيضات البيضاء Candida albicans والمبيضات المدارية Candida tropicalis والمبيضات المَرَطيَّة Candida parapsilosis والمبيضات الجرداء Candida glabrata والمبيضات الكروزية Candida krusei وبعض الأنواع الأخرى.

إن المنهجية التي تعتمدها هذه الأجهزة هي التمديد الدقيق للمرق باستخدام ثلاثة إلى خمسة تراكيز دوائية فقط لكل دواء يتم اختباره، مما يسمح بتقييم تثبيط النمو الفطري وتقدير قيم MIC.

يتم إجراء هذه التحاليل في بطاقات أو لوحات مصنعة manufactured cards or panels والتي تحتوي على الأدوية المراد اختبارها، أي amphotericin B و flucytosine و fluconazole و voriconazole و caspofungin و micafungin، تصدر النتائج بشكل قيم لـ MIC، وتليها تصنيف العزلات حسب تحسسها على مضادات الفطور (S أو I أو R) وتصنيفها الوبائي (WT أو NWT).

هذه الطرق المؤتمتة عملية للغاية من أجل الخمائر الممرضة الأكثر انتشاراً، ولكن عيبها الرئيسي هو عدم وجود مرونة لإجراء الفحوصات، حيث يجب أن تكون الأنواع المختبرة في قاعدة بيانات الجهاز.

Candida

الجوانب العامة:

- الخمائر من جنس المبيضات هي جزء من الكائنات الحية الدقيقة للإنسان والحيوان، وتتواجد في مواقع التشريحية مثل تجويف الفم، والغشاء المخاطي المهبلي، والمسالك المعوية.
- تشير التقديرات إلى أن ما يقرب من 75٪ من سكان العالم توجد لديهم المبيضات نوع من الفلورة الطبيعية في تجويف الفم. في معظم الأفراد، تظل هذه الخمائر متكافئة طوال الحياة، دون أي خطر على الصحة.
- ومع ذلك، في حالات معينة، يمكن أن تسبب عدوى بمجموعة واسعة من المظاهر التقديمية، من الحالات الجلدية السطحية إلى الحالات الشديدة والمنتشرة التي يمكن أن تؤدي إلى الوفاة.
- هذا الجنس موجود أيضًا بشكل متعايش مع الأسطح المخاطية للعديد من أنواع الحيوانات، بما في ذلك الكلاب والقطط والماعز والأغنام والطيور. بالإضافة إلى ذلك، فإن هذه الأنواع من المحتمل أيضًا أن تكون مسببة للأمراض للحيوانات، اعتمادًا على العديد من الظروف المؤهبة.
- الأنواع من هذا الجنس هي مسببات الأمراض الفطرية الرئيسية، وتشكل السبب الرئيسي الرابع من التهابات مجرى الدم في المستشفيات.
- في بعض المستشفيات، يكون هذا الوضع أكثر إثارة للقلق، لأن هذه الخمائر هي من بين مسببات الأمراض الثلاثة الرئيسية للعدوى المرتبطة بالصحة في العديد من المواقع التشريحية.
- ازداد حدوث الالتهابات الفطرية في العقود الأخيرة. وتعزى هذه الزيادة إلى ظهور عدد كبير من الأفراد المعرضين لهذا النوع من العدوى، نتيجة لظهور فيروس نقص المناعة البشرية (HIV) في الثمانينيات.
- يمكن أن ترتبط العوامل المرتبطة بظهور العدوى في البشر والحيوانات الأخرى بالمضيف أو القدرة الممرضة لسلالات المبيضات.

- تشمل العوامل المتعلقة بالمريض مناعة الخلايا المكبوتة، وداء السكري، والعلاج بالمضادات الحيوية الشاملة والممتدة، والوهن المرتبط بالعمر، وتلف الغشاء المخاطي المعوي، واستخدام الكورتيكوستيروئيدات، والأورام الخبيثة، وعمليات زرع الأعضاء، و أمراض المناعة الذاتية.

- العوامل المهمة للإمراضية هي نشاط الجزيئات المرتبطة بالالتصاق والغزو، ووجود إنزيمات التحلل المائي التي تعزز الغزو، والقدرة على التحول بين الهياكل الأريمية والفلامية، والقدرة على تكوين الأغشية الحيوية.

- وتجدر الإشارة إلى أن مجرد حدوث هذه العوامل لا يضمن العملية المعدية إنما يعتمد على وجود خلل في العلاقة بين الفطري والمضيف، مما يوفر بيئة لغزو وتكاثر الكائنات الحية الدقيقة. باختصار، تعتبر العملية المعدية انتهازية.

- من بين أنواع جنس المبيضات، يُعرف أكثر من عشرة بأنها مسببة للأمراض للإنسان والحيوان. أهمها المبيضات البيض Candida albicans، المبيضات الاستوائية Candida tropicalis Candida parapsilosis complex، Candida glabrata، Candida guilliermondii، Candida krusei، و Candida dubliniensis.

- المبيضة البيضاء هي أكثر الأنواع المسببة للأمراض وهي العامل المسبب الرئيسي للعدوى الفطرية العميقة.

- أصبحت الأنواع غير المبيضات البيضاء مستعمرات ومسببات أمراض مهمة وعُزلت في كثير من الأحيان من العينات البيولوجية من البشر والحيوانات. والدراسات حول هذا الجنس الفطري ديناميكية للغاية والمعلومات الجديدة تظهر باستمرار.

- في عام 2016، نشرت مراكز السيطرة على الأمراض والوقاية منها (CDC) تنبيهًا جديدًا لظهور أنواع مثيرة للإعجاب لهذا النوع C.auris تم وصفه لأول مرة في عام 2009 في اليابان، حيث تم عزله عن قناة الأذن الخارجية للمريض.

- يمكن أن يلعب التشخيص المخبري السريع والصحيح لأنواع المبيضات دورًا مهمًا في السيطرة على العدوى، وتقليل معدلات الوفيات، نظرًا لأن بعض السلالات مقاومة جوهريًا لمضادات الفطريات، C. auris هي أنواع مقاومة للأدوية المتعددة.

التشخيص المختبري:

- جمع العينات للتشخيص المخبري لمبيضات يعتمد على موقع الإصابة.
- في آفات الغشاء المخاطي الجلدي، يتم جمع معظم العينات السريرية باستخدام مسحات معقمة يجب معالجتها على الفور ؛ خلاف ذلك، يجب تعبئتها في وسط نقل معقم أو محلول ملحي، لأن أنواع المبيضات عرضة للجفاف.
- في الآفات الجافة، كما هو الحال في فطار الأظافر، يمكن استخدام قشور الأظافر.
- في داء المبيضات الجهازي، يمكن أن تكون العينات السريرية مثل الدم، وشفط القصبات الهوائية، ومواد غسل الشعب الهوائية، والبول، وخزعة من عدة أعضاء.

الفحص المجهري:

- للتشخيص الفطري، يمكن إجراء المراقبة المجهريّة عن طريق تحضير شرائح مع عوامل التثبيت، مثل هيدروكسيد الصوديوم أو البوتاسيوم، بتراكيز 10٪ -40٪، في حالة المواد التي تحتاج إلى توضيح، مثل الجلد وكشط الأظافر، وعينات فروة الرأس.
- الفحص المباشر ممكن أيضًا يمكن استخدام العديد من تقنيات التلوين في علم الفطريات، مثل التشريب بالفضة في هذه الحالة، تكتسب الهياكل الفطرية لونًا بنيًا على خلفية خضراء.
- كل هذه التقنيات تتضمن الفحص المجهري البصري.
- من حين لآخر، يمكن استخدام تلوين غرام لبعض العينات السريرية، عندها تظهر الخمائر من جنس المبيضات على شكل هياكل مستديرة أو بيضاوية إيجابية الغرام.
- بالإضافة إلى ذلك، يمكن أيضًا استخدام الفحص المجهري الضوئي باستخدام صبغة كالكو، التي تسلط الضوء على الهياكل الفطرية مع توهج أبيض مزرق من خلال الارتباط بالكيتين في جدار الفطريات.

المستنبتات:

- النمو في وسائط الزرع هو المعيار الذهبي لتحديد أي كائن حي دقيق.
- أوساط الزرع المستخدمة بشكل كلاسيكي في علم الفطريات هي Sabouraud Agar و Sabouraud Agar مع الكلورامفينيكول و Sabouraud مع الكلورامفينيكول و cycloheximide (المعروف أيضًا باسم Mycosel agar).
- Sabouraud Agar هو الوسيط الكلاسيكي، الذي يتم استكماله بالببتون ودكستروز، مما يسمح بنمو جميع الفطريات القابلة للزراعة.
- الكلورامفينيكول مضاد حيوي يستخدم ليمنع نمو البكتيريا المنافسة التي قد تكون في العينة السريرية، ويمنع cycloheximide نمو الفطريات الملوثة.
- تنمو معظم أنواع الخميرة من جنس المبيضات في كل هذه الأوساط المزروعة، حيث تظهر قوامًا كريميًا، ومستعمرات بيضاء مائلة للصفرة، وحدود منتظمة، و الحضانة في درجة حرارة الغرفة أو 35 درجة مئوية لمدة 3 إلى 5 أيام.

طرق التعرف عليها:

❖ التقليدية:

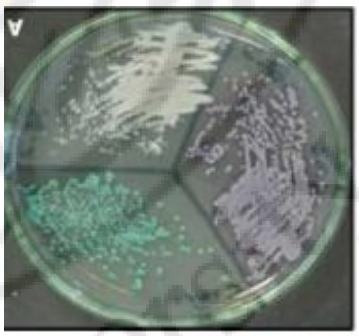
- يلخص الجدول مختلف الأساليب المظهرية التي قد تكون ذات قيمة في تحديد أنواع المبيضات المختلفة عند استخدامها معًا.

Table 3.1 Conventional Tests to Identify Major *Candida* spp. of Medical Importance

Yeast Species	CHROM	Fermentation										Assimilation											N	U	GT
		Glu	Suc	Gal	Tre	Mal	Raf	Lac	Inu	Rha	Ara	Glu	Suc	Lac	Gal	Raf	Ino	Xyl	Cel	Tre	Dul	Mal	Mel			
Candida albicans	Gr	+	v	v	v	+	−	−	−	−	v	+	v	−	+	−	−	+	−	v	−	+	−	−	−	+
C. glabrata	W, Pr, Pi	+	−	−	v	−	−	−	−	−	−	+	−	v	−	−	−	−	−	v	−	−	−	−	−	−
C. guilliermondii	Pi, Lil	+	+	v	+	−	+		+	v	+	+	+	−	+	+	−	+	+	+	v	+	+	−	−	−
C. krusei	Pi	+	−	−	−	−	−		−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
C. parapsilosis	W, Lil	+	v	v	v	v	−	−	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−
C. tropicalis	B	+	v	+	v	+	−	−	−	−	−	+	v	−	+	−	−	+	v	+	−	+	−	−	−	−

Abbreviations: v = variable; + = positive; − = negative; N = nitrate; U = urease; GT = germ tube; Gr = green; W = White; Pr = Purple; Pi = Pink, B = blue; Lil = lilac, Glu = Gal = galactose; Tre = trehalose; Mal = maltose; Raf = raffinose, Lac = lactose; Inu = inulin; Rha = rhamnose; Ara = arabinose; Ino = ino Cel = cellobiose; Dul = dulcitol; Mel = melibios.

المبيضات ChromAgar (الشكل A) هي الوسيلة الكروموجينية الأكثر استخدامًا في علم الفطريات. على هذا الأجار، تتحول مستعمرات C. albicans وC. dubliniensis إلى اللون الأخضر، C.tropicalis إلى اللون الأزرق و C.parapsilosis complex إلى لون وردي شاحب. يقدم C. kruseiأيضًا ظلًا ورديًا مع مستعمرة خشنة. يتطلب استخدام طرق أخرى لتكوين الأنواع.



- في جنس المبيضات، تعد القدرة على توليد خيوط حقيقية من blastoconidia ميزة خاصة لبعض الأنواع، مثل C. albicans و C. dubliniensis و C. africana.

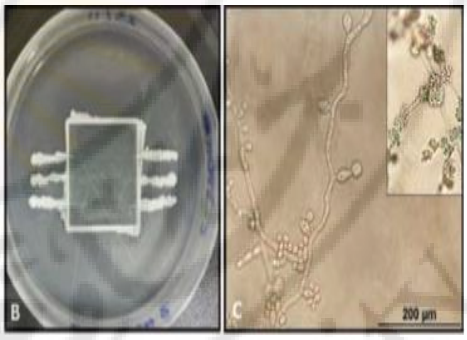
- يمكن التحقق من هذه الميزة عن طريق اختبار أنبوب إنتاشي. يتم تحضين جزء صغير من المستعمرة المراد اختبارها باستخدام 0.5 مل من مصل الإنسان أو الحصان عند 37 درجة مئوية لمدة تصل إلى 3 ساعات. على فترات 30 دقيقة، يتم فحص المعلق الفطري تحت تكبير 100 × و 400 ×.

- عندما يُلاحظ تكوين أنبوب جرثومي إيجابي، والذي يتميز بوجود هيكل أنبوبي متوازي الجدران يبرز من خلية الخميرة.

- تُمكِّن مستنبتات الشريحة Dalmau من الدراسة المجهريّة لظاهرة Candida spp. من خلال الزراعة في أطباق بتري التي تحتوي على أجار دقيق الذرة أو أجار الأرز المضاف إليه توين 80.

- لهذا الغرض، يتم رسم مستعمرة الخميرة من خلال أجار،على شكل ثلاثة خطوط متوازية، حيث يتم وضع غطاء زجاجي معقم،ثم يُترك ليبرد.

- تحت الغطاء، يتم إنشاء بيئة مكروية مع انخفاض تركيز الأكسجين، مما يؤدي إلى تكوين ترتيبات هيكلية نموذجية، بما في ذلك هياكل المقاومة، مثل الكلاميديا ، المبيضات البيض و C. dubliniensis. بعد الحضانة عند 28 درجة مئوية لمدة 3–5 أيام، لوحظت الصفائح تحت المجهر الضوئي بتكبير 100 × و 400 ×.



- يتم أيضًا تقييم القدرة على تخمير الكربوهيدرات المختلفة لتحديد أنواع المبيضات.

- يتم إجراء اختبارات التخمير عن طريق إضافة معلق خميرة في أنابيب اختبار تحتوي على وسط استزراع يحتوي على سكريات مختلفة مثل المالتوز والسكروز والغالاكتوز واللاكتوز والتريهالوز، ويضاف أنبوب Durhamالمقلوب إلى أنابيب الاختبار (الشكل F). يستخدم الدكستروز كعنصر تحكم إيجابي لتخمير السكر. لوحظ التخمير من خلال إنتاج ثاني أكسيد الكربون وتغير PH الهيدروجيني بعد الحضانة عند 25 درجة مئوية إلى 30 درجة مئوية لمدة تصل إلى 28 يومًا.

التعريف الجزيئي:

❖ التعريف الجزيئي:

- اكتسبت الاختبارات الجزيئية أهمية بسبب صعوبة أو عدم قدرة بعض الأجناس على النمو في الأوساط الصناعية أو عندما لا يتم التعرف على النمط الظاهري بشكل قطعي. يشمل تطبيق البيولوجيا الجزيئية استخدام البادئات الفطرية، والتي قد تؤدي إلى تحديد جنس مسببات الأمراض الفطرية.
- يتم تسلسل المنطقة المضخمة ومقارنتها بقواعد البيانات المتاحة، ويتم الحصول على التعريف الأكثر احتمالية.
- التمايز الجزيئي هو تسلسل مناطق معينة داخل كل جنس.
- يعد تطبيق تقنيات تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) المرتبطة بمقايسات إنزيم التقييد مفيدًا في التمايز بين الأنواع المشفرة من معقد أنواع C. parapsilosis
- مثال آخر هو تحديد الأنواع الخفية C. albicansو C. dubliniensis. منذ وصف C. dubliniensis، من المعروف أن هذه الأنواع تشترك في العديد من الخصائص المظهرية التي قد تؤدي إلى خطأ في التعريف. على الرغم من أن بعض معايير النمط الظاهري قد تختلف بين الأنواع، مثل النمو عند 42 درجة مئوية، ونمط المستعمرة العيانية على بعض وسائط الزرع، وبعض الملامح البيوكيميائية، فإن التمايز الدفاعي للأنواع يحدث عادةً من خلال أدوات البيولوجيا الجزيئية، مثل PCR أو PCRفي الوقت الحقيقي.

- إلى جانب الطرق الجزيئية القائمة على الحمض النووي، فإن دراسة البروتينات باستخدام تقنيات قياس الطيف الكتلي هي أداة تستخدم حاليًا لتحديد الكائنات الحية الدقيقة.
- إنها أيضًا طريقة جزيئية، لأنها تعتمد على الجزيئات المعبر عنها في بنية العامل الممرض.
- الميزة الكبرى لهذه الطريقة هي وقت التحديد، حيث يستغرق بضع دقائق فقط، في حين أن اختبارات النمط الظاهري التقليدية يمكن أن تستغرق أيام أو أسابيع.
- تعد تقنية MALDI-TOF Matrix assisted laser Desorption lionization Time of Flight هي المثال الرائد لهذه الأداة الجديدة. يُشتق الاختصار من زمن التأين لامتصاص الليزر المرتبط بالمصفوفة بمقدار ight. إنه نظام يتم فيه وضع جزء صغير من مستعمرة نقية ومعزولة أو مادة إكلينيكية مثل زرع الدم على صفيحة معدنية ومغطاة بمصفوفة بوليمرية.
- يشع شعاع الليزر هذه العينة ويؤينها، ويولد عدة جزيئات تهاجر في أنبوب مفرغ مشحون كهربائيًا. تحدث هذه الهجرة كدالة للكتلة وشحنة الجزيئات. وبالتالي، تصل الجسيمات الأخف بشكل أسرع إلى نهاية الأنبوب، حيث يوجد كاشف. إن تعبير "وقت ight ight"، والذي يسمح بالتمايز بين الجزيئات، مشتق من هذا.
- تتم مقارنة هذا الرسم البياني بقاعدة بيانات برامج الجهاز، مما يؤدي إلى تحديد الكائنات الحية الدقيقة. تستغرق العملية بأكملها حوالي 5-15 دقيقة. التكنولوجيا قيد الاستخدام بالفعل لتحديد أنواع الخميرة والفطريات بالاعتماد على قاعدة بيانات كبيرة تشمل مسببات الأمراض الفطرية الرئيسية.

الخيارات العلاجية:

- الخيارات العلاجية المتاحة لعلاج الالتهابات الفطرية محدودة للغاية، خاصة في حالات داء الفطريات الجهازية والشديدة. عامل آخر مفاقم هو أن الاشتباه في الإصابة بالفطريات غالبًا ما يكون متأخرًا، لذلك عادة ما يتأخر العلاج. مع احتمال المقاومة، تزداد فرص الفشل العلاجي.
- بالنسبة للعدوى الفطرية من جنس المبيضات، هناك خيارات علاجية ذات طرق مختلفة للإعطاء، مثل الاستخدام الموضعي، والفموي، والحقن. يعتمد الاختيار العلاجي على العرض السريري، والشدة، والتشوه

المسبب للمرض، والخصائص المتعلقة بالمريض. يمكن السيطرة على الالتهابات السطحية عن طريق الأدوية الموضعية أو الفموية. تتطلب الظروف العميقة نهجًا علاجيًا أكثر عدوانية، مما يتطلب استخدام الأدوية الوريدية.

- مشتقات الآزول هي المجموعة الأكثر استخدامًا من الأدوية المضادة للفطريات في جميع أنحاء العالم. المشتقات Ketoconazole و uconazole – Triazole، itraconazole، voriconazole، posaconazole، وآخرون – هم الممثلون السريريون لهذه الفئة من الأدوية. هذه الأدوية عبارة عن مركبات اصطناعية تعمل عن طريق تثبيط التخليق الحيوي لـ ergosterol، الستيرول الرئيسي للغشاء الفطري. يرجع هذا التثبيط إلى الحصار الأنزيمي للانوستيرول -14-ألفا-ديميثيلاز، والذي يحول اللانوستيرول إلى إرغوستيرول.
- تعتبر مشتقات البوليين أيضًا أداة مهمة لعلاج الالتهابات الفطرية. تعمل هذه الأدوية من خلال الارتباط بالإرغوستيرول للطبقة الدهنية المزدوجة لغشاء الخلية الفطرية، مما يؤدي إلى تعطيل بنية الخلية. تؤدي إلى تكوين المسام، والتي يتم من خلالها فقدان الأيونات والجزيئات المهمة لبقاء الكائنات الحية الدقيقة، مما يتسبب في موتها.
- تشمل المجموعة النيستاتين والأمفوتريسين B. يقتصر استخدام الأول على الجلد أو تطبيق الغشاء المخاطي.
- الفلوسيتوزين، أو 5-uoro-cytosine، هو دواء تمثيلي بيريميدين يمنع التكرار الفطري ويضعف نسخ الحمض النووي. بسبب معدلات المقاومة العالية بسبب تعديلات إنزيمات مهمة لعملية الاستقلاب، يتم إجراء استخدام ucytosineبشكل مثالي في التآزر مع الأمفوتريسين B، مما يسمح باستخدام جرعات أصغر من الأمفوتريسين B وتقليل إمكاناته سمية.
- أحدث فئة من الأدوية المضادة للفطريات التي تم وصفها هي echinocandins. تعمل هذه الأدوية بشكل غريب تمامًا عن طريق منع تخليق الغلوكان في جدار الخلية الفطرية عن طريق تثبيط اصطناع إنزيم 1،3 3 β-glucan. تشمل هذه الفئة أدوية الكاسبوفونجين والميكافونجين والأندولافونجين. إنها غالية الثمن، لكنها خيارات علاجية جيدة في حالات فطريات المبيضات.

– تعد فطور المستخفيات من الفطور الخمائرية الانتهازية، تسبب عدوى فطرية غازية في جميع أنحاء العالم وقادرة على أن تسبب التهاب السحايا عند الأشخاص المنقوصي المناعة وكذلك ممن هم كفء مناعياً.

– تكون العدوى بها عن طريق استنشاق الأبواغ أو الخلايا الخمائرية الجافة من البيئة المحيطة مسببة عدوى رئوية تكون انتكاسية وغير نوعية، وكذلك يمكن أن تتطور بعض التهابات الرئة وتنتشر عن طريق الدم إلى أعضاء أخرى في الجسم.

– مصادر العدوى الأشجار المتحللة، الغبار في البيئة المحيطة، وبراز الحمام.

– الخمائر ممحفظة ومشكلة للميلانين مما يجعلها تبقى على قيد الحياة وتتكيف تحت ظروف البيئة المختلفة.

– تنتشر الإصابة بداء المستخفيات في المناطق الاستوائية، ومؤخراً في المناطق المعتدلة.

– تفشى داء المستخفيات بشكل كبير في بريطانيا، كولومبيا، كندا، عند البشر والحيوانات، وكذلك على طول الساحل الشمالي الغربي، وصولاً للولايات المتحدة الأمريكية.

– تسببه المستخفية المورمة **Cryptococcus neoformans** والمستخفية الغاتية **Cryptococcus gatti**

– تعد العدوى بالمستخفية المورمة أحد أكثر أنواع العدوى الفطرية المهددة للحياة شيوعاً، خصوصاً عند مرضى الأيدز HIV.

– تشير أحدث التقديرات، أن التهاب السحايا بالمستخفيات عند المرضى المصابين بالأيدز HIV يسبب 150،000–200،000 حالة وفاة سنوياً، معظمها في أفريقيا جنوب الصحراء الكبرى.

عالمياً، التهاب السحايا بالمستخفيات مسؤول عن **15%** من أسباب الوفاة عند مرضى HIV.

– أظهرت البيانات الأخيرة أن المعدل السنوي لأصابة مرضى الأيدز بداء المستخفيات انخفض بشكل ملحوظ في أمريكا الشمالية، بينما في البلدان النامية سلطت العديد من الدراسات الضوء على العبء الكبير والمستمر لمرض داء المستخفيات المرتبط بفيروس نقص المناعة البشري HIV.

– عوامل الخطورة الأخرى لداء المستخفيات: أمراض الروماتيزم (التهاب المفاصل الروماتويدي، الذئبة الحمامية الجهازية)، الكورتيكوستيروئيدات ومثبطات المناعة، الداء السكري، زرع الأعضاء، أمراض الكبد المزمنة، الخباثات، الاضطرابات التكاثرية اللمفاوية، الفشل الكلوي و/أو الديال الصفاقي، الساركويد، متلازمة فرط الغلوبولين المناعي IgE، متلازمة فرط الغلوبولين المناعيIgM، العلاج بالأجسام المضادة وحيدة النسيلة (alemtuzumab،infliximab،etanercept).

– أن المستخفية المورمة تصيب مضعفي المناعة بشكل أساسي، لاسيما مرضى HIV، ولكن يجب أن نأخذ بعين الاعتبار أنها تصيب الأشخاص الكفؤ مناعياً في بعض المناطق كما في الصين.

– تم رصد أول حالة للأصابة بالمستخفية الغاتية وسط أفريقيا، تصيب الأشخاص الكفؤ مناعياً في المناطق الاستوائية، وفي المناطق المعتدلة منذ عام 1999.

– داء المستخفيات ب C.gatti مستوطن بشكل كبير في الأمازون (الشمال)، وشمال شرق البرازيل.

– قد تحدث العدوى بكل من المستخفية المورمة والغاتية في نفس المناطق، مثل شمال وشمال شرق البرازيل حيث بلغت نسبة الأصابة بداء المستخفيات بسبب C. gatti 60–88% عند أشخاص كفؤ مناعياً وتشمل الأطفال والمراهقين. وفي نفس المنطقة، انتشر داء المستخفيات بسبب C. neoformans عند أشخاص مضعفي المناعة.

– المستخفية المورمة والغاتية أنواع تنتمي إلى نفس السلف، وكانت في البداية تصنف كنوع واحد، لكنها تميزت بتنوع المستضد المحفظي (تمتلك C. neoformans النمط المصلي D،A، بينما C. gatti النمط المصلي C،B) وصفات أخرى.

– في الماضي، تم التعرف على الأنماط المصلية عن طريق الاختبارات المعتمدة على تراص الخلايا الفطرية مع الأضداد النوعية للمحفظة، لكن الاختبار لم يعد متاحاً تجارياً أو مستخدماً في دراسات علم الأوبئة.

– اكتشاف شكلين جنسيين مختلفين لكلا نوعي المستخفيات، أحداهم لل C. neoformans، والآخر لل C. gatt، وتم تأكيد ذلك لاحقاً من خلال إجراء تتالي جينومي كامل، والنوعين لديهم تنوع خفي بالأضافة إلى التهجين الحاصل داخل وبين الأنواع intra-and interspecies .

– أن التحليل الفيلوجيني phylogenetic analysis (التحليل الوراثي والسلالي) يعتمد على تقنية التعدد الشكلي لأطوال القطع المضخمة amplified fragment length polymorphism AFLP، وتقنية النسخ التسلسلي متعدد المواقع الصبغية multilocus sequence typing MLST والتي أظهرت أن كلا نوعي المستخفيات ذات سلف مشترك متنوع جينياً.

– دراسة حديثة معتمدة على 115 عزلة، قسمت المستخفية المورمة لنوعين، والمستخفية الغاتية لخمسة أنواع معتبرة أنه في حال كانت التسمية بشكل منفصل، سوف يؤدي ذلك إلى تغير جذري في تسمية هذه الخمائر المهمة من الناحية الطبية.

وفي النهاية أوصى مجموعة من الأطباء والباحثين باعتبار كل من المستخفية المورمة والغاتية معقد لأنواع، بدلاً من خلق أكثر من نوع، هذه الاستراتيجية تعترف بالتنوع الجيني دون خلق اشكالية فيما يخص التسمية.

– يتم التعرف حالياً على المستخفية المورمة كمعقد من الأنواع، يتضمن أنواع جزيئية رئيسية تتوافق مع الأنماط المصلية تدعى VN، على سبيل المثال الأنواع VNI،VNII تتوافق مع النمط المصلي A، وتسمى أيضاً C. neoformans Var.grubii، النوع VNIV يتوافق مع النمط المصلي D ويسمى أيضاً C. neoformans Var. neoformans.

– في نفس الطريقة، المستخفية الغاتية معقد أنواع، يتضمن أربع أنواع جزيئية رئيسية وتسمى VG تتوافق مع الأنماط C،B.

– تم التعرف على الأنواع الجزيئية الرئيسية VG،VN بواسطة تقنية AFLP، وكذلك تقنية URA5-RFLP (RFLP Restriction fragment length polymorphism).

التشخيص السريري:

- **التظاهرات الرئوية:** تكون لا عرضية أو تتظاهر بشكل متلازمة الضائقة التنفسية الحادة.

الأعراض غير نوعية حيث يشعر المريض بعدم الراحة في الصدر، وعند الأشخاص الكفؤ مناعياً تتظاهر بعقدة صغيرة محيطية تحت الجنبة عادةً مفردة، محددة الحواف، غير متكلسة، بدون انصباب جنبي واضح.

- يجب الأخذ بعين الاعتبار التشخيص التفريقي لهذه العقيدات في الصور الشعاعية للصدر، فهي غالباً تشبه سرطان الرئة.

- تتوضع الأصابة بنوعي المستخفيات في **الأسناخ الرئوية**، نادراً ما تستعمر الغشاء المخاطي المبطن للقصبة الهوائية.

- يجب تقصي الآفات الرئوية بشكل روتيني بواسطة تنظير القصبات، أو التصوير المقطعي للصدر، أو الرنين المغناطيسي.

- من المهم جداً التقصي عن مستضد المستخفيات في المصل، وفي حال كانت النتيجة إيجابية، يدل ذلك على احتمالية الإصابة بداء المستخفيات الغازي.

- بالنسبة للأشخاص مضعفي المناعة، خاصة مرضى الأيدز مع تعداد CD4 منخفض، تكون الإصابة موضعية أو ارتشاحات ثنائية الجانب وبشكل نادر تظهر عقد نقيرية متضخمة، وهذا غير نوعي للإصابة بالمستخفيات، فظهور عقد لمفاوية نقيرية يكون عند الأصابة بمرض السل أيضاً، والذي ينتشر عند مرضى الأيدز كما المستخفيات، ومنه فقط الفحص المخبري سوف يدعم التشخيص.

- **التظاهرات السحائية الدماغية:** أن إصابة الجهاز العصبي المركزي بالمستخفيات، هو التوضع السريري الأكثر شيوعاً، ويعتبر مميت، وقد يكون مترافق أو غير مترافق مع عقيدات دماغية.

- المرضى غير المصابين بالأيدز يعانون من صداع قذالي مؤلم، والذي لا يستجيب للمسكنات، في البداية يكون شبيه بالتهاب الجيوب، ولكن استمرار الصداع يكون جدير بالملاحظة.

– قد تحدث مشاكل بصرية مثل رؤية مزدوجة وغير واضحة، يمكن أن ترتفع درجة الحرارة ولكن بشكل خفيف. شلل في الأعصاب القحفية، اضطراب في الشخصية وفي الذاكرة وفي النوم، فرط الضغط داخل القحف العدوى لا تقتصر على السحايا، الوصول أيضاً إلى القشرة الدماغية، جذع الدماغ، المخيخ.

– التظاهرات السحائية الدماغية تكون حادة (استمرار لأيام) أو شكل تحت حاد 4–2 أسابيع (شائع أكثر) أو شكل مزمن في حال استمرت لأشهر.

– يمكن أن يحدث خطأ في التشخيص، على أنه التهاب سحايا فيروسي أو جرثومي (شكل مزمن من التهاب السحايا السلي)، أو ورم

– المضاعفات المهددة للحياة التي تؤدي إلى الموت: ارتفاع الضغط داخل الجمجمة، فتق اللوزتين المخيخيتين الغيبوبة، التشنج الظهري.

– هذه الأعراض تكون أكثر وضوحاً وتظهر باكراً عند الأشخاص الكفؤ مناعياً، بينما عند الأشخاص المضعفي المناعة تكون الأعراض السريرية غير واضحة، ونلجأ إلى التشخيص المخبري.

– قد يحدث التهاب السحايا بالمستخفيات بعد انتقالها من الجهاز التنفسي إلى الدماغ، وفي معظم الحالات يكون تيبس الرقبة غير ملحوظ، سواء في البداية أو في مراحل متأخرة من العدوى، كما أن فحص السائل الدماغي الشوكي يمكن أن يكون طبيعياً عند مرضى HIV.

– التهاب السحايا بالمستخفيات قد لا يترافق مع أعراض، أو تكون الشكوى عامة مثل انخفاض الوزن، تعب حمى، وهذه الأعراض غير نوعية، لذا البزل القطني كثيراً ما يتأخر.

– **التظاهرات الجلدية:** تنجم عن انتشار الفطر بالطريق الدموي، ويسبب آفات جلدية مثل حطاطات بثرية عديّة الشكل، التهاب الهلل، تقرحات، خراجات، حويصلات، ورم حُبيبي.

- هناك أشكال منتشرة للفطر، يستطيع أن يصيب أي عضو بالجسم: العظم والمفاصل، البروستات، نقي العظم والعيون.
- التهاب الصفاق نتيجة الإصابة بالمستخفيات يحدث عند الأشخاص الذين يخضعون لغسيل الكلى الصفاقي أو المصابين بتشمع الكبد.

- يمكن أن تكون العدوى في أماكن أخرى، لكنها أقل تكراراً، مثل الأنسجة تحت الجلد، العضلات القلب، الغدة الكظرية، الغدة الدرقية، المسلك المعدي المعوي والعقد اللمفاوية.
- عادة ما تكون العدوى في الجهاز البولي التناسلي بدون أعراض، ولكن قد يحدث التهاب الحويضة والكلية، خاصة عند مرضى السكري، والكشف عن ذلك عن طريق زرع البول.

التشخيص المخبري:

يعتمد تشخيص داء المستخفيات على عزل الفطر من العينات السريرية و رؤية الخلايا الفطرية بالفحص المباشر أو تلون المقاطع النسيجية بملونات محددة (استخدام ملون Muci-carmin لتحديد المحفظة، واستخدام ملون Fontana-Masson للميلانين)، أو التشخيص المناعي باستخدام تقنية lateral flow immunoassay LFA للكشف عن المستضد المحفظي في المصل والسائل الدماغي الشوكي ويقدم النتيجة خلال 10 دقائق.

1. الفحص المباشر:

- فحص السائل الدماغي الشوكي أهم فحص يطبق لتشخيص التهاب السحايا والدماغ بالمستخفيات والذي يجب أن يُثقل قبل الإجراءات المخبرية.

- الفحص المباشر لل CSF مع استخدام التلوين بالحبر الصيني، والتي تعتبر طريقة سريعة وفعالة لتشخيص التهاب السحايا والدماغ، وتكشف عن البولي السكاريد المحفظي الشكل (1)، هذا الاختبار إيجابي لأكثر من80% من مرضى HIV، لأن معظمهم لديهم حمل فطري كبير أثناء التشخيص.

الشكل(1) خلايا المستخفية المورمة

الفحص المجهري(x400) لعينة CSF باستخدام ملون الحبر الصيني

– يتم التمييز بين نوعي جنس المستخفيات من خلال صفات الأنماط المصلية مثل السكاكر المكونة للمحفظة تشكيل الميلانين، تحمل الحرارة.

2. كشف المستضد المحفظي:

تعد طريقة lateral flow immunoassay سريعة وغير مكلفة في التشخيص، نستخدم فيها أضداد وحيدة النسيلة (شريط الاختبار مشرب بها)، للكشف عن مستضد المحفظة عديد السكاريد (glucuroxylomannan)، تعد هذه الطريقة ذات حساسية عالية ونوعية أكثر مقارنة مع اختبار تراص حبيبات اللاتكس المغطاة بأضداد المستخفية، كما أن LFA اسهل في الأداء، وتعتمد بشكل أقل على مهارات الفني.

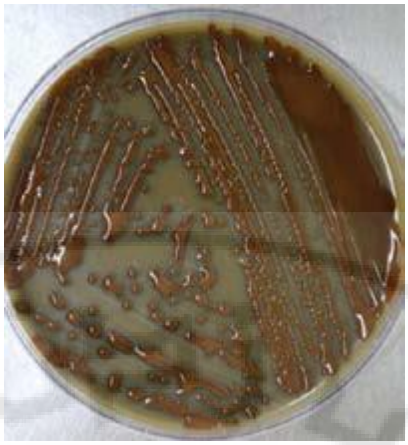
– التحري عن المستضد في (المصل، البلازما، أو عينة دم وخز الأصبع)، لدى المرضى الذين يقل عندهم تعداد CD عن 100 خلية /ملم3، هو فعال عندما تكون نسبة المسضدات في الدم فوق 3%.

– عند إجراء الفحص المباشر على CSF للمرضى الكفء مناعياً، في مرحلة مبكرة من التهاب السحايا، تكون النتيجة عادة سالبة، يتطلب ذلك الكشف عن مستضد المستخفيات، والذي سوف يؤكد التشخيص بالعدوى.

– الكشف عن المستضد المحفظي ليس له قيمة تشخيصية، في الحالات التي لها تاريخ مسبق للإصابة بالمستخفيات، حيث أن االمستضد يبقى في الدم لفترة طويلة تصل لسنوات، لذا الانتكاس يتم تشخيصه فقط عن طريق عزل العامل الممرض من العينات السريرية.

3. عزل وتحديد نوع الفطر C.neoformans أو C.gatti:

زرع العينات السريرية على وسط سابورو 2% غلوكوز في درجة حرارة الغرفة c 25 وحضانة لمدة لا تقل عن 4 أسابيع، ويجب ألا يحوي وسط الزرع على cycloheximide المثبط لنمو الفطر، يمكن أن تنمو أنواع أخرى من الكائنات الحية الدقيقة لا سيما إذا كانت العينات السريرية قشع، بول، جلد، لذا يجب أن يحوي الوسط على ركازات فينولية، لتحفيز جدران الفطر على تشكيل الميلانين، مثل وسط آغار نضيف له بذور حبة البركة أو بذور عباد الشمس،أو حمض الكافئيك، أو L–Dopa (جميعها تحرض على تشكيل الميلانين) وتتميز مستعمرات المستخفيات الغاتية والمورمة بلون بني داكن (الشكل2).



الشكل(2) نمو المستخفية المورمة على وسط يحوي بذور حبة البركة، المستعمرات بلون بني داكن.

– تظهر المستخفية المورمة والغاتية صفات شكلية وكيميائية حيوية مشتركة، فهي ليست خيوط فطرية أو خيوط فطرية كاذبة، متحملة لدرجة الحرارة 37c، مشكلة للميلانين على الأوساط الذي سبق ذكرها، غير مخمرة للسكاكر وأنما تستقلبها بالطريق التأكسدي (غالاكتوز، سكروز، مالتوز، كزيلوز، فركتوز....)، لا ترجع النترات إلى نتريت، وحساسة لل cycloheximide بتراكيز 0.5%–0.2%.

– هذه الاختبارات لا تميز بين نوعي المستخفيات، نحتاج لوسط انتقائي أكثر وهو CGB agar

l–canavanine glycine bromotymol agar، حيث تحول المستخفية الغاتية الوسط للون الأزرق، بينما المستخفية المورمة لا تغير اللون.

– بالنسبة للتحديد الجزيئي لا يستخدم كثيراً في تشخيص هذه الفطور، حيث يتطلب التسلسل الكامل لل ITS (Internal Tranccribed Spacer) و/ أو التسلسل الجزئي للوحيدة الكبيرة Large subunit لجين الحمض النووي الريبي الريبوزومي RNA (المجالات D1–D2 من 26/28S).

– مؤخراً تم استخدام matrix assisted ionization/desorption time –of– flight mass spectrometry laser تدعى تقنية MALDI–TOF–MS، في تحديد الفطور الخمائرية كبديل عن الطرق السابقة التي تعتمد على النمط الظاهري والجيني، تحدد هذه التقنية في غضون بضع دقائق أنماط محددة من الببتيدات وأطياف كتلة البروتين للخلايا الميكروبية أو المستخلصات الخلوية من المستنبتات النقية أو العينات الحيوية، مما يسمح بتحديد الأنواع وتحت الأنواع، من خلال مقارنة الطيف الذي تم الحصول عليه مع تلك المدرجة في المكتبة الطيفية المرجعية، وبالتالي فهو يعتمد على جودة قاعدة البيانات.

4. تحضير مقاطع نسيجية:

الحصول على العينة من خلال الخزعة، والتحديد يعتمد على الصفات المورفولوجية، حيث تظهر صبغة الهيماتوكسيلين–إيوزينHematoxylin–eosin بنية الفطر، وتكشف صبغة غومري – غروكوت الفضة Gomori–Grocott silver عن جدار الفطريات، ولكن لا تميز المحفظة، بينما صبغة فونتانا موسون Fontana–Masson ترسب الميلانين.

الصبغة الأكثر أهمية في تشخيص المستخفيات هي صبغة Muci–carmin، التي تلون المحفظة باللون الأحمر وكل هذه الملونات لا تميز بين نوعي المستخفيات.

العلاج:

– في أول أسبوعين مزيج من أمفوتريسين B ديوكسيكولات (0.7–1.0mg/Kg per day،D–AmB) و فلوسيتوزين 100mg/Kg perday مقسمة على أربع جرعات، يليها فلوكونازول 800mg per day لمدة ثمانية أسابيع و200mg per day بعد ذلك، وهو المعيار الذهبي لعلاج التهاب السحايا المسبب من قبل فطور المستخفيات عند مرضى HIV وغير المصابين به، بالإضافة لعلاج الأشكال المنتشرة.

– إضافة فلوسيتوزين يخفض معدل الوفيات بنسبة 40% مقارنة مع D–AmB لوحده.

– المضاعفات الأكثر شيوعاً لالتهاب السحايا بالمستخفيات، ارتفاع الضغط داخل القحف، الذي يزيد معدل الوفيات، ونستطيع سحب السائل المتراكم لتخفيف الضغط على الأنسجة، وذلك من خلال البزل القطني أو تحويلة بطينية.

– متلازمة الاسترداد المناعي IRIS لوحظت عند 15–20% من مرضى الإيدز عند علاج التهاب السحايا بالمستخفيات، عادة تشاهد في الشهر الأول بعد العلاج بمضاد فيروسي.

– إعطاء الكورتيكوستيروئيدات بكورس علاجي قصير يكون فعال، ولكن مع العلاج الأولي بمضادات الفطور يكون ضاراً.

– العلاج المضاد للفطور لداء المستخفيات الرئوي بدون دليل سريري أو تشخيصي على الانتشار يعتمد على فلوكونازول فموي أو إيتراكونازول 200–400mg/day خلال 6–12 شهراً.

الوقاية:

وقد تم إقرار استراتيجية العلاج الوقائي فلوكونازول لمنع تطور التهاب السحايا عند المرضى الذين يكون تعداد خلايا CD عندهم أقل من 100 خلية /ملم3، والستضد المحفظي إيجابي في المصل، من قبل منظمة الصحة العالمية، وقد تم ذلك في جنوب إفريقيا وأماكن أخرى.

5-1 مقدمة:

شعرية الأبواغ من الفطور الدعامية basidiomycetous تشبه الخميرة تنتشر بشكل واسع وتوجد غالباً في مناطق الجو الدافئ.

هذه الكائنات يمكن ان تتواجد في التربة والخشب المتفكك والهواء والماء والثديات والحشرات وفي المشافي.

بعض أنواع شعرية الأبواغ مثل asahii يمكن ان توجد كفلورا طبيعية في الجهاز الهضمي والجلد عند الانسان.

ومع ذلك تسبب شعرية الأبواغ أمراض عند الإنسان مثل: البيصرة البيضاء white piedra،ذات رئة بفرط الحساسية الصيفي summer-type hypersensitivity pneumonitis (SHP)،الإنتانات العميقة deep-stead infections مثل إنتان دم فطري عند المرضى مثبطي المناعة أو مرضى الإجراءات الباضعة invasive devices (القثاطر القلبية).

منذ 30عام مضى كانت تعتبر T.beigelii النوع الوحيد المعروف من هذا الجنس.

اعتماداً على التحليل الجزيئي الذي أظهر أن T. beigelii تملك تنوع جيني كبير وذلك قاد الى معرفة الأنواع الأخرى مثل T. asahii، T. asteroides ،T. inkin، T. mucoides ،T. Ovoides.

على مر السنين تم وصف العديد من الأنواع من شعرية الأبواغ ووصل عددها إلى 50صنف مختلف مقسم إلى أربع فروع clade هي:

Gracile /Brassica،Cutaneum ، Porosum، Ovoides.

من بين الأنواع الموصوفة يوجد 18 نوع اكتشفت في العينات السريرية بما فيها:

T.inkin،T.asteroids،T.asahii ،

T.dohaense ،T.lactis،T.japonicum ،T.coremiiforme،T.faecale،T.ovoides

من الفرع Porosum

T. Cutaneum ،T. mucoides ،T.jerovecii ،T.debeurmannianum

من الفرع Cutaneum

T.montevideanse، T.domesticum، T.loubieri، T.mycotoxinivorans

من الفرع Gracile/Brassica

ومع ذلك في 2015 صدر تصنيف جديد يعتمد على سلسلة جينات متعددة multiple-gene sequence analysis وهذا التحليل قسم جنس شعرية الأبواغ إلى ثلاث أجناس.

الأنواع التي كانت تنتمي لجنس Gracile/Brassica تنتمي حالياً لجنس Apiotrichum

بينما الأنواع التي كانت تنتمي لفرع Cutaneum أصبح اسمها الجديد Cutaneotrichosporon.

يتم التعرف على شعرية الأبواغ في العينات السريرية بكثرة.

كثيراً ما يتم التشخيص الخاطئ للبيصرة البيضاء على أنها قمل والتشخيص الصحيح يجنب المريض العلاج السام والغير ضروري

ترتبط الإصابة بشعرية الأبواغ بالإنتانات المنتقلة عن طريق المشافي والتعرف السريع على المرض يسرع إجراءات العلاج.

وأخيراً الإصابة بشعرية الأبواغ أحد مسببات الإنتانات العميقة والتشخيص السريع والدقيق يعطي بالنتيجة علاج دقيق.

2-5 اختيار العينة وجمعها وطريقة نقلها الى مكان التحليل:

لتشخيص البيصرة البيضاء يجب قطع الشعر مع البصلة.

تزرع العينات في وسط (SDA) مع كلورامفينيكول (50mg/l) أو وضعها بين شريحتين زجاجيتين نظيفتين وإرسالها إلى مخبر الفطور في حامل الشرائح.

يجب إجراء الفحص المجهري والزرع على وسط خاص لتشخيص البيصرة البيضاء.

في حال الإنتانات العميقة المسببة بواسطة شعرية الأبواغ يجب أن تؤخذ العينات حسب الإرشادات المتبعة في الإنتانات الفطرية والجرثومية.

شعرية الأبواغ تنمو في الأوساط الجرثومية الشائعة مثل آغار مدمى blood sheep agar

والاوساط الفطرية (SDA).

يجب جمع العينات بشكل عقيم قبل البدء بالعلاج بالمضادات الفطرية ووضعها في حاويات محكمة الإغلاق عقيمة وإيصالها للمخبر في غضون ساعتين في درجة حرارة الغرفة.

المرضى ذوي الإنتانات المنتشرة يمكن أن يتطور لديهم إنتان دم فطري أو رئوي أو آفات جلدية.

يجب زرع عينتين أو ثلاث عينات دم لتشخيص الإصابة بإنتان الدم الفطري عبر زرع 8–10 ml في كل طبق زرعي.

T. asahii: تنمو بشكل أفضل في عبوات الزرع الهوائية مقارنة مع اللاهوائية ونقول أنها إيجابية بعد الحضن لمدة 30 ساعة في الحاضنة الهوائية الآلية.

شعرية الأبواغ عادة تشكل مستعمرات في القثاطر الوريدية المركزية (CVC) التي ممكن أن تكون مصدر عدوى للدم.

لذلك زرع الدم الموجود في لمعة القثطرة أو زرع أنبوب القثطرة مفيد في التشخيص انتان الدم.

غُسالة الرئتين أو الرشافة من القصبات هامة في تشخيص ذات الرئة المسببة بشعرية الأبواغ.

اقترح العلماء عدة معايير لاحتمالية الإصابة بذات الرئة المسببة بشعرية الأبواغ عند المرضى المهددين للإصابة به مثلاً قلة العدلات والحمى المستمرة على الرغم من المعالجة بالصادات الحيوية والارتشاح

الرئوي والكشف عن شعرية الأبواغ في العينات الرئوية في غياب مسببات الإنتانات التي تسبب عداوى انتهازية.

أخيراً الخزعة الرئوية والجلدية ضرورية لتشخيص انتانات شعرية الأبواغ المنتشرة ومن ثم تخضع العينات لتحليل نسيجي وحيوي(ميكروبي).

3-5 معالجة العينة في مخبر الفطور:

تعالج عينات الشعر مع البصيلات بهيدروكسد البوتاسيوم 20% ثم يتم فحصها مجهرياً.

تزرع على وسط SAD مع كلورامفينيكول (50mg/l) وتحضن في الدرجة 30C لمدة 30يوم على الأقل.

تفحص الخزعات النسيجية مجهرياً بعد معالجتها بهيدروكسد البوتاسيوم 20%.

المنصّعات المفلورة Fluorescent brightners مثل أبيض الكالكوفلور يساعد على رؤية أوضح للفطور في العينات النسيجية ومكوناتها.

بالنسبة لزرع الفطور، العينات النسيجية يجب أن تكون مقطعة قطع صغيرة وتزرع على آغار انتقائي وغير انتقائي ومرق انتقائي مثل سائل دماغي مع كلورامفينيكول أو جنتامايسين وتحضن في درجة حرارة 30 مئوية لمدة أربعة أسابيع كما يشير بروتوكول العمل.

عند زرع النسيج على وسط صلب يجب خدش الآغار ووضع النسيج في الخدش للكشف بشكل أفضل عن الفطور بعد تأمين الشروط اللازمة للزرع.

عينات الجهاز التنفسي يجب أن تزرع في وسط SDA مع مضاد حيوي وتحضن في درجة حرارة 30 درجة مئوية لمدة أربعة أسابيع.

تزرع العينات أيضاً على الأوساط الجرثومية مثل ماكونكي وآغار مدمى وتشوكليت آغار وتزرع أيضاً على وسط Buekholderia cepacia (عبارة عن وسط يحتوي جراثيم سلبية غرام تنتج اللاكتوز غير مخمرة) ويجب أن تفحص بشكل دقيق لأن شعرية الأبواغ تشكل مستعمرات على الأوساط الجرثومية.

إذا أظهر تلوين غرام إيجابية وجود الخمائر في مستنبت دم يجب زرعها على وسط SDA والحضن لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 30درجة مئوية.

الزرع على آغار ملون يساعد في فصل المستعمرات في حال نمو عدة كائنات دقيقة.

أنبوب القثطرة الوريدية المركزية يزرع على آغار مدمى ويحضن في الدرجة 35 درجة مئوية لمدة 48 ساعة في جو من ثنائي أوكسيد الكربون 5%.

أي خميرة تنمو يجب استعرافها وكتابة تقرير عنها.

لا يوجد قيمة قطعية لنمو مستعمرات ناتجة عن زرع القثاطر مع إنتان الدم الفطري.

4-5 الاستعراف النوعي:

الفحص المجهري يزودنا بمعلومات هامة لتشخيص الإصابة بشعرية الأبواغ.

وجود غبيرات الانفجار Blastocoidia والغبيرات المفصلية Arthroconidium (الشكل 5.1A)

في وسط SDA تكون المستعمرات بلون كريمي جافة (عدا T. dermatis و T. mucoides)

دقيقة farinose وتصبح بشكل الدماغ بعد 7 أيام في درجة حرارة الغرفة (الشكل 5.2)

في الأوساط الملونة T. asahii تعطي مستعمرات بلون أزرق وتكون جافة (الشكل 5.3A)

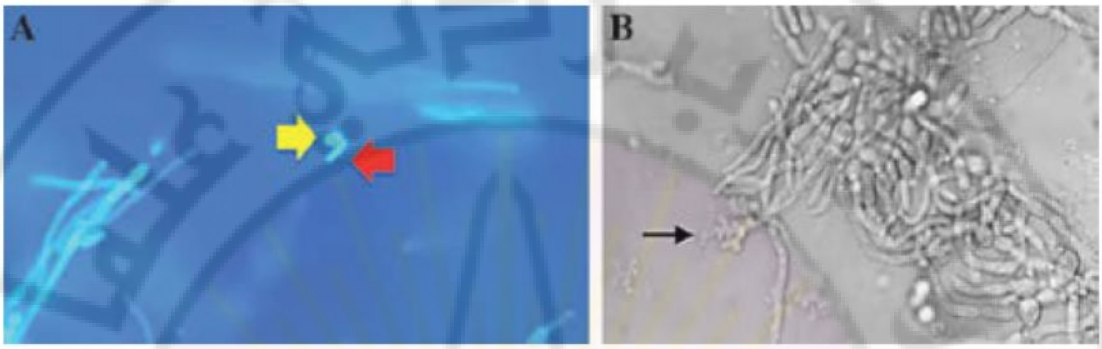
للتفريق بين شعرية الأبواغ والفطور التيربية Ascomycete Geotrichum (هي نوع من الفطور الزقية) نجري اختبار حلمهة اليوريا (الشكل 5.3B).

هذا الاختبار البسيط والفحص المجهري للكائن تمكننا من معرفة الجنس.

الزرع على آغار الذرة مع توين 20 بالترافق مع الاختبارات الجينية تساعد في معرفة الأنواع (الشكل 5.1B والجدول 5.1) لكن هناك بعض الأنواع تعطي أنماط جينية متشابهة وقد يحدث خطأ في التعرف عليها.

الكتيبات التجارية والاختبارات الآلية يتم من خلالها تحديد هوية T. asahii و T. mucoides و T. inkin ومع ذلك الخطأ في التعرف على T.inkin و T. asahii و T.dermatis على أنها T. mucoides هو أمر شائع.

هناك أنواع تفتقر لمعرفة الجنس.

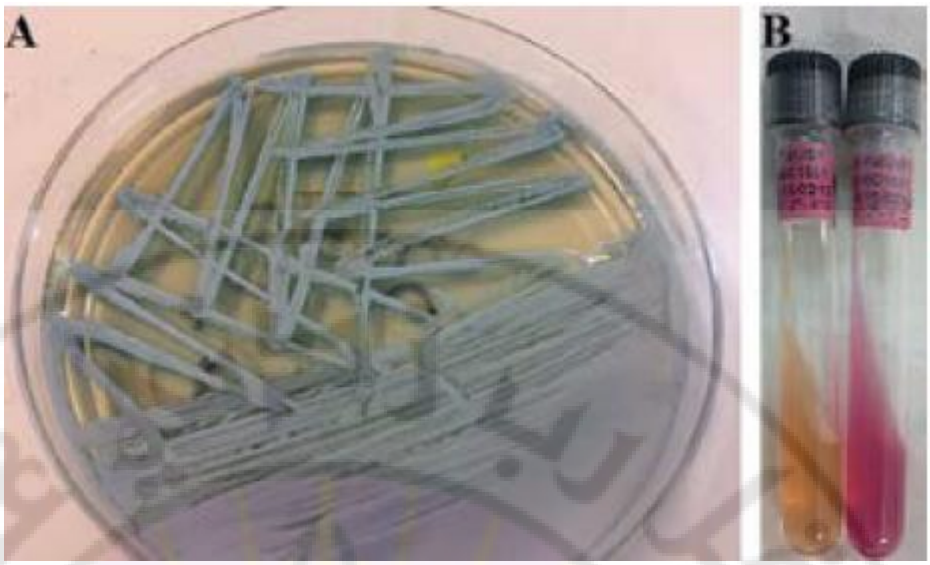


(الشكل 5.1): شعرية الأبواغ تحت المجهر

A: الخيط الفطري Hyphae، غبيرات الانفجار Blastocoidia (السهم الأصفر)، والغبيرات المفصلية Arthroconidium (السهم الأحمر) من خزعة جلدية من مريض يعاني من لوكيميا نقوية حادة acute myloid leukemia ملونة بأبيض كالكوفلور بتكبير 400.

B: Appressoria معزولة من T. inkin (السهم الأسود).

(الشكل 5.2): مستعمرات شعرية الأبواغ في وسط SDA و PDA (potato dextrose agar) بعد حضن لمدة 3 أيام في درجة حرارة 30 درجة مئوية.



(الشكل 5.3): التشخيص الافتراضي لشعرية الأبواغ

A: مستعمرات T. asahii في وسط Chromo candida بعد 48 ساعة حضن في الدرجة 37 درجة مئوية.

B: اختبار حلمهة اليوريا:

الفطور الدعامية Basidiomycetes تنتج اليورياز الذي يحلمه اليوريا لأمونيا وثنائي أوكسيد الكربون. إنتاج الأمونيا يقلون الوسط (الأنبوب الأيمن) يتم التحري عم انزياح درجة ال PH بتغير لون المشعر (أحمر الفينول) من اللون البرتقالي عند الدرجة 6.8 الى اللون الوردي عند الدرجة 8.1

سلسلة الحمض النووي DNA بين الجينات عند البادئة في الموقع

26S (5′–ATCCTTTGCAGACGACTTGA–3′ و

5SR (5′–AGCTTGACTTCGCAGATCGG–3′ هي الطريقة المعيارية الذهبية للتعرف على الأنواع.

يتم التفرق بين بعض الأنواع المتشابهة مثل T. asteroides و T. japanicum فقط من خلال SNP (single nucleotide polymorphism)

(MALDI-TOF) matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry هي طريقة ذهبية لاستعراف الأحياء في المختبر بما فيها الفطور.

هذه الطريقة تظهر نتائج قابلة للمقارنة بتحليل الحمض النووي لشعرية الأبواغ والأنواع التي تتشابه معها بهدف استعراف كل واحدة فيها وهي طريقة سريعة وبمجهود قليل وأرخص من الطرق الجزيئية.

في ظل تطور الأطياف المرجعية قد تكون في المستقبل القريب التقنية المرجعية في التعرف على شعرية الأبواغ في المخابر السريرية.

5-5 الاختبارات التشخيصية السريعة:

الأمصال من مرضى شعرية الأبواغ ذوي الإنتانات المنتشرة يظهر تفاعل تصالبي مع الطريقة التي صممت للكشف عن مستضد الكبسول للمستخفيات

glucuronoxylomannan (GXM) لأنه اكتشف حديثاً أن T. asahii تملك (GXM) ملتصق على الجدار الخلوي لها وهذا ما يفسر التفاعل التصالبي مع المستخفيات.

لكن المرضى الذين لديهم خطر الإصابة بشعرية الأبواغ قد يكون لديهم GXM إيجابي في وقت مبكر من حدوث المرض.

اختبار PCR صمم باستخدام بادئات ومسابير نوعية للكشف عن دنا T. asahii في العينات الدموية لمرضى مصابين بشعرية الأبواغ وهي طريقة أكثر حساسية من الكشف عن المستضد السكري للمستخفيات.

التعرف مباشرة على شعرية الأبواغ من مزارع دم إيجابية بواسطة مطياف الكتلة (MALDI-TOF) بعد عملية استخلاص المادة الوراثية بواسطة حل الخلايا بعملية التثفيل وهي طريقة سريعة وواعدة في تشخيص إنتان الدم بشعرية الأبواغ لكنها بحاجة إلى التحقق من عدة مراكز.

5-6 علم الأمصال Serology (التحري عن الأضداد):

مصل المرضى الحاوي على أضداد شعرية الأبواغ هام في تشخيص SHP.

أضداد شعرية الأبواغ النوعية تكشف عادةً بواسطة المقايسات المناعية الأنزيمية enzyme immunoassay لكن عتائد هذه التحاليل متوافرة فقط في اليابان.

مقدمة :

- هي أعضاء من جنس Malassezia spp. هي جزء من الكائنات الحية الدقيقة البشرية والحيوانية التي تنتمي إلى شعبة الخمائر الرمامية *Basidiomycota* ، صف *Malasseziomycetes*. في ظل ظروف معينة ، هذه الفطريات يحتمل أن تكون مسببة للأمراض للإنسان والحيوانات الأليفة.
- عادة ما تسبب آفات سطحية ، ولكن في حالات نادرة تسبب أيضًا أمراض جهازية.
- في الآونة الأخيرة ، أشارت العديد من التقارير إلى أن مستضدات الملاسيزية هي محفزات مهمة لتطوير و / أو تفاقم التهاب الجلد التأتبي والصدفية .

- منذ الوصف الأول لـ M. furfur ، كان تصنيف الجنس مسألة جدل. سمحت التطورات في علم البيولوجيا الجزيئية بوصف 16 نوع ،
- ✓ 6 منها موجودة حصريًا في الحيوانات (الجدول 6.1). مع ذلك بالنسبة لغالبية أنواع الملاسيزية ، لا تزال التفاصيل المتعلقة بفيزيولوجية المرض ومسببات المرض غير متوفرة .

- الملاسيزية هي أنواع محبة للدهون أو تعتمد على الدهون .
- تشكل الفحص المخبري المباشر والزرع تحديًا لأن هذه الفطريات لا تنمو بالطريقة التقليدية في الأوساط الفطرية. بالإضافة إلى ذلك ، لا يمكن التعرف عليها بسهولة من خلال الطرق التقليدية للتعرف على الأنماط الظاهرية ، لذا فإن استخدام التقنيات الجزيئية ضروري للتشخيص النهائي. ومع ذلك ، يجب أن تبذل المختبرات الروتينة جهودًا لتأسيس اختبارات للتعرف المناسب على أنواع الملاسيزية ، على الأقل تلك التي تم الحصول عليها من الالتهابات العميقة.

الجدول 6.1 أصل عزلات أنواع الملاسيزية

الانواع	العزلات من الانسان		الأنواع الحيوانية
	أصحاء	المرضى	
M.furfur	+	PV،FL،PS،SD،AD فطار أظافر، التهابات جهازية	الحيوانات الأليفة :بشرة صحية
M.pachydermatis	_	التهابات جهازية	الحيوانات الأليفة (قطط ، كلاب):بشرة صحية، SD
M.sympodialis	+	PV،FL،PS،SD،AD وفطار أظافر، التهابات جهازية، التهاب أذن خارجية	الأغنام والخيول : بشرة صحية ، القطط : التهاب أذن
M.obtuse	+	PV،PS،SD،AD	–
M.globosa	+	PV،FL،PS،SD،AD، فطار أظافر	البقرة :بشرة صحية، التهاب الاذن في القطط
M.slooffiae	+	PV،PS،SD،AD، التهابات جهازية	الخنازير :بشرة صحية ، الماعز :SD
M.resticta	+	PV،FL،PS،SD،AD ، فطار أظافر ، التهابات عميقة	–
M.dermatis	+	PV،FL،PS،SD،AD	–
M.nana	_	–	القطط والابقار : التهاب اذن ، أمراض الجلد

M.Yamatoensis	+	PV،PS،SD،AD	–
M.caprae	_	–	الماعز :بشرة صحية
M.cuniculi	_	–	الارانب : بشرة صحية
M.brasiliensis	_	–	الببغاء : الآفات على المنقار
M.psittaci	_	–	الببغاء: أفات على المنقار
M.japonica		**AD; SD; PS; FL; PV**	–
M.equina	–	–	**الخيول :التهاب الاذن**

- **الاختصارات: AD:atopic dermatitis التهاب الجلد التأتبي. SD : seborrhiec dermatitis التهاب الجلد الدهني، PS: psoriasis الصدفية. FL : folliculitis التهاب الجريبات. PV: pityriasis versicolor النخالية المبرقشة.**

الفيزيولوجيا المرضية للعدوى السطحية:

- أنواع الملاسيزية تشكل فلورا طبيعية في الجلد وتلعب دور في الحفاظ على الصحة.
- هذه الفطريات المتعايشة (الانتهازية) تستعمر المضيف منذ الأسابيع الأولى من الحياة (منذ الولادة) .
- في الجلد السليم ، تستخدم أنواع الملاسيزية عمومًا العناصر الغذائية الضرورية لنموها دون التسبب في المرض. ومع ذلك ، يمكن تغيير هذه العلاقة إذا قامت الخميرة بتعديل التعبير عن الليباز والفوسفوليباز المطلوب للحصول على الطاقة ، وفي الوقت نفسه تقوم بصنع الملاسين Malassezin ومشتقات الإندول النشطة بيولوجيًا.

- ترتبط هذه الجزيئات بمستقبلات أريل الهيدروكربونية المعبر عنها في خلايا البشرة ، وتعدل التعبير عن السيتوكينات والببتيدات المضادة للميكروبات وتتداخل مع موت الخلايا المبرمج ودورة الخلية .
- في المرضى الذين يعانون من اضطرابات الجلد الالتهابية ، مثل التهاب الجلد التأتبي ، يعتقد أن الزيادة في درجة حموضة الجلد تؤدي إلى إطلاق العديد من مستضدات الملاسيزية في البشرة. هذه الجزيئات ، وربما خلايا الخمائرية، تعبر حاجز الجلد الضعيف وتصل إلى الخلايا الكيراتينية والخلايا التغصنية ، حيث يتم التعرف عليها بواسطة مستقبلات Toll–like receptors (TLRs) التي تعبر عنها هذه الخلايا ، والتي تؤدي بعد ذلك إلى إنتاج السيتوكينات المحفزة للالتهابات. تحفز مستضدات الملاسيزية الأجسام المضادة IgE ، والتي بدورها تحفز إنتاج المزيد من الجزيئات الالتهابية بواسطة الخلايا البدينة.

الأعراض السريرية :

- المظاهر السريرية الأكثر شيوعًا للنخالية المبرقشة : ظهور لويحات مميزة أو مفرطة أو معتدلة التصبغ أو مع التهاب غائب أو معتدل (بسبب التغيرات في وظيفة الخلايا الصباغية).
- النخالية المبرقشة عادة تنتشر على الوجه والجذع (الطرفين العلويين والاكتاف) ، وعادة ما يقتصر التهاب الجلد المتقشر على الأطراف الخارجية بالطبقة المتقرنة. قد تصبح الآفات مزمنة ، وتكون أكثر قابلية للاكتشاف خلال فصل الصيف. وهي أكثر شيوعًا عند المراهقين والشباب.
- في بعض الحالات، النخالية المبرقشة يمكن أن تظهر مع فرط التقرن ، كما يتم التحقق من ذلك بالفحص النسيجي .
- تشمل اضطرابات الملاسيزية السطحية أيضًا : فطار الأظافر والتهاب الجريبات وقشرة الرأس، والتهاب الجلد الدهني ،والتهاب الجلد التأتبي. يمكن أن تحدث الآفات السطحية للجلد التي تسببها الملاسيزية في كافة الأعمار، ولكنها أكثر شيوعًا في العقدين الثالث والرابع من العمر.
- **يمكن أن تحدث هذه الآفات بسبب عدة عوامل** : بما في ذلك العوامل البيئية مثل ارتفاع درجات الحرارة والرطوبة ، مما يجعل حدوثها أكثر شيوعاً في المناخات الاستوائية وشبه الاستوائية.
- **ومن العوامل الأخرى** هي : تثبيط المناعة والاضطرابات العصبية ، الاستعداد الوراثي ، ارتفاع نسبة الدهون في الجلد ، مستويات عالية من الأحماض الدهنية في الدم ، الكورتيزول والأندروجين ، وقلة الاهتمام في النظافة الشخصية ، والإجهاد والتوتر .
- بالإضافة إلى ذلك ، قد تشارك الملاسيزية في فطريات الدم والأمراض المنتشرة .

- بعد استعمار الجلد من قبل الملاسيزية ، العديد من الظروف الكامنة :التغذية الوريدية بمستحلبات دهنية ،التنبيب الرغامي ، وصول الفطر إلى الأوعية الدموية المركزية ، التهاب الأمعاء والقولون النخري ، انثقاب الأمعاء ، جراحة البطن ، واستخدام المضادات الحيوية واسعة الطيف أو مثبطات حمض المعدة ، بالإضافة الى عوامل الفوعة المرتبطة بالشكل الخمائري مثل: القدرة على الالتصاق Adhesion وتكوين الأغشية الحيوية الرقيقة biofilm قد تؤهب للإصابة بالعدوى الغازية الالتهابية .
- بالإضافة إلى ذلك ، فإنهِ يمكن أن تكون احتمالية انتشار الملاسيزية مرتبطة بنقص المناعة والسحب المتأخر للقسطرة(الاطالة في استخدام القثطرة) أو إصابة الأنسجة أو الصمام ، وأيضًا نقص أو فشل العلاج بالمضادات الفطرية ، مما يؤدي إلى سوء التشخيص.
- تم الإبلاغ عن عدوى الملاسيزية المرتبطة بالقسطرة بوتيرة متزايدة ، مما يثبت أن العدوى الانتهازية يمكن أن تتطور إلى التهاب الصفاق ، والتهاب المفاصل الانتاني الفطري الجرثومي المختلط ، أو التهاب الضرع ، أو التهاب الجيوب الأنفية بعد الجراحة ، أو الأشكال السريرية المنتشرة التي تؤثر على العديد من الأعضاء .
- بعد أعراض استعمار القسطرة ، يمكن للمرضى الذين يعانون من تثبيط المناعة أن يصابون بتدهور مفاجئ في الجهاز التنفسي (انقطاع النفس Apnea) ، الالتهاب الرئوي ، الحمى ، قلة الكريات البيض ، زيادة عدد الكريات البيضاء ، قلة الصفيحات ، التهاب شغاف القلب ، وعلامات السريرية الأخرى.

التشخيص المختبري:

جمع العينات السريرية:

- تقنية ال بورتو porto technique أو طريقة الشريط اللاصق هي الأكثر استخدامًا للفحص المجهري المباشر للآفات الجلدية لأنها غير مؤلمة وغير جراحية ، تليها كشط الآفات مفرطة أو ناقصة اللون .
- في حالة الاشتباه في وجود فطريات في الدم ، يجب جمع عينات الدم وزراعتها في طبقين على وسط آغار Sabouraud المضاف إليه زيت زيتون المعقم (لانها تحب الوسط الدهني) ،
- يتم الحفاظ على الطبق الاول عند 25 درجة مئوية – 28 درجة مئوية،
- والطبق الثاني عند 37 درجة مئوية لمدة تصل إلى 7 أيام .

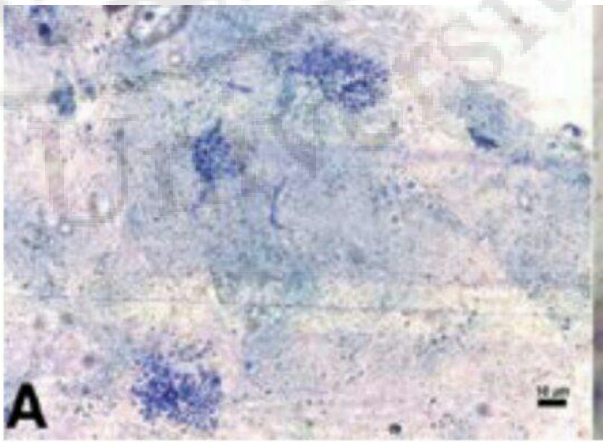
- بالرغم من زراعة الملاسيزية من الجلد ليست ضرورية للتشخيص الروتيني ، إلا أنه يمكن إجراؤها بسهولة وقد تكون مفيدة للتشخيص التفريقي فيما يتعلق بداء الفطريات السطحية أخرى .

التشخيص المختبري للعدوى الجهازية بالملاسيزية:

- تكون زراعة الدم دائمًا ضرورية. فيجب أن يتم جمع الدم عن طريق إبرة معقمة ، في ثلاث نسخ وأيام متعاقبة. ومع ذلك ، إذا لوحظ أن العدوى منتشرة على نطاق واسع ، يجب أن يتم فحص بقايا الأنسجة التي تم الحصول عليها بواسطة خزعة من الأعضاء المصابة وزراعتها مجهريًا .
- يوصى بستخدام الطرق المختبرية لتحديد تشخيص عدوى الملاسيزية المتعلقة بالقسطرة للمرضى الذين لديهم دليل إكلينيكي (سريري) على تعفن الدم والذين يتلقون مستحلبات دهنية من خلال قسطرة وريدية مركزية (CVC).
- في التهابات الملاسيزية المتعلقة بالقسطرة ، قد يكشف الفحص المجهري المباشر للدم المسحوب من خلال القسطرة على خلايا خميرة متبرعمة أحادية مميزة ، مما يشير إلى أن المزرعة إيجابية ، لكن مسحات الدم المحيطي عادة ما تكون سلبية .

الفحص المجهري Microscopy:

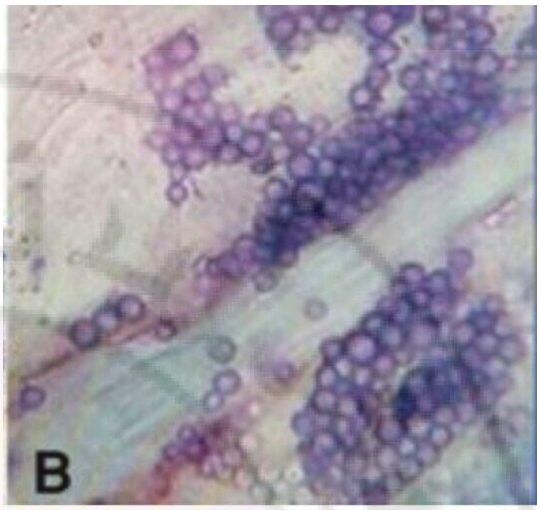
- يمكن أن يكشف الفحص المباشر للعينات السريرية عن طريق بصمة الشريط tape imprint أو الكشط عن وجود كل من الاشكال الخميرية والخيطية (pleomorphism تعدد الأشكال). غالبًا ما يشار إلى هذا المظهر مثل "السباغيتي وكرات اللحم spaghetti and meatballs" عندما رؤية العناصر الخمائرية والخطية معًا (الشكل 6.1 **a**).



الشكل 6.1: الفحص الفطري المباشر للنخالية المبرقشة

يظهر هذا الشكل مجموعة من الخلايا

- يكشف الفحص الفطري المباشر عادة عن وجود خلايا تشبه الخميرة ، مجمعة في شكل "عناقيد عنب grape bunch" (الشكل 6.1 **b**).



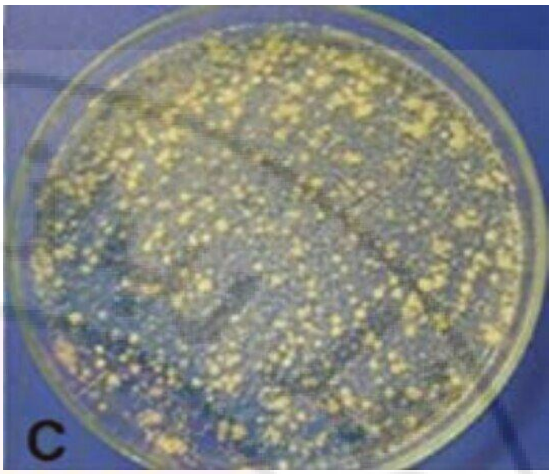
الشكل b6.1: تظهر خلايا شبيه بالخميرة متجمعة على شكل "عناقيد العنب" المأخوذة من عينة بصيلات

- الخلايا الشبيهة بالخميرة ، عادة ما يكون لها حجم في نطاق من 1.5– 4.5 ميكرومتر × 3–7 ميكرومتر ، قد تظهر على شكل طوق (ياقات)صغير small collarettes ، على الرغم من صعوبة تمييزها باستخدام مجهر ضوئي. يشار إلى الخلايا على أنها أحادية القطب ، حيث تتشكل الهياكل الشبيهة بالبراعم على شكل منفردًا على قاعدة عريضة .

المستعمرات Culture:

- يصعب نمو مستعمرات السلالات الملاسيزية السريرية في المختبر in vitro ، لذلك يمكن الإبلاغ عن مزارع الكشط على أنها سلبية .
- تنمو الخميرة بشكل أفضل إذا تمت إضافة مادة دهنية مثل زيت الزيتون إلى وسط سابرود أغار. يفضل الزراعة على أغار ديكسون المعدّل وليمينغ ونوتمان أغار.
- قد تنمو بعض مستعمرات الملاسيزية بسرعة وتنضج خلال 5–7 أيام عند 30 درجة مئوية إلى 35 درجة مئوية على وسط غني بالدهون.
- ومع ذلك ، تُظهر أنواع الملاسيزية معدلات نمو مختلفة على الأوساط الغنية بالدهون. لديهم مجال نمو ضيق نوعاً ما في درجة حرارة ،حيث أنها تنمو بشكل ضعيف (سيء) عند 25 درجة مئوية ، وبعض الأنواع لن تنمو فوق 37 درجة مئوية.

- تكون المستعمرات كريمية اللون أو لها لون بيج ل بني مصفر (الشكل C6.1).



الشكل C6.1: تظهر مستعمرة الملاسيزية ذات اللون البني المصفر بعد 7 ايام بعد النمو على وسط Sabouraud الغني بزيت الزيتون عند الدرجة 25.

- إنها تقدم مظهرًا فطريًا ، وغالبًا ما تصبح مجعدة كلما زاد عمر المستعمرة
- المكملات الدهنية مطلوبة لنمو 15 نوع من أصل 16 نوعًا من الجنس.
- عادة ما تكون الخيوط الفطرية غائبة في المستعمرة، ولكن يمكن أحيانًا رؤية الأشكال البدائية rudimentary عن طريق الفحص المجهري .

الهوية Identification:

- يعد التوصيف الظاهري للملاسيزية مهمة صعبة ، لأن العديد من الأنواع تشترك في المتطلبات التغذوية والصفات المورفولوجية (الجدول 6.2).
- يوجد حاليًا **16** نوعًا من الملاسيزية معروفة ، منها M. pachydermatis هي الوحيدة المحبة للدهون ولكنها لا تعتمد على الدهون.
- وهكذا ،فإن الاختبارات التقليدية مثل المستعمرة المستندة إلى توين tween أو تقييم نشاط بيتا غلوكوزيداز والنمو باستخدام Cremophor EL قد لا تكون مناسبة للتمييز بينهما ، إلى جانب كونه مضيعة للوقت.

الجدول 6:2: الملامح الفيزيولوجية لأنواع الملاسيزية وفقًا لـ(Cabañes et al. 2016) وكافارتشيا وآخرون.

Table 6.2 Physiological Profile of *Malassezia* Species according to Cabañes et al. (2016) and Cafarchia et al. (2011)

Species	Lipid Dependence	Diffusion Tests						Catalase	β-Glucosidase	Growth in Dixon Agar at	
		Tween 20[a]	Tween 40[a]	Tween 60[a]	Tween 80[a]	Cremophor EL[b]				32°C	40°C
M. furfur	+	+[c]	+[c]	+[c]	+[c]	+[c]		+[c]	− or ±	+	+
M. pachydermatis	−	+	+	+	+	+		+	+[c]	+	+
M. sympodialis	+	− or ±	+	+	+	− or ±		+	+	+	+
M. obtusa	+	−	−	−	−	−		+	+	+	−
M. globosa	+	−	−	−	−	−		+	−	+	−
M. slooffiae	+	+ or ±	+	+	−	−		+	−	+	+
M. restricta	+	−	−	−	−	−		−	−	+	−
M. dermatis	+	+	+	+	+	+ or ±		+	−	+	+
M. japonica	+	−	±	+	−	?		+	?	+	−
M. nana	+	v	+	+	±	−		+	−	+	+ or −
M. yamatoensis	+	+	+	+	+	?		+	?	+	−
M. equine	+	+	+	+	+	−		+	−[c]	+	−
M. caprae	+	−	+	+	+[c]	−		+	+[c]	+	−
M. cuniculi	+	−	−	−	−	−		+	+	− or ±	+
M. brasiliensis	+	+	+	+	+	+		+	−	+	+
M. psittaci	+	+	+	+	+	+		+	−	+	−

- **الاختصارات:** + ، موجبة ؛ − ، سلبي ؛ ± ، إيجابية ضعيف ؛ ؟ ، نتائج غير معروفة ؛ **v**، نتائج متغيرة.
- **A** اختبار انتشار توين على سابورو أغار اقترحه (Guillot et al. 1996).

- كما ذكرنا سابقًا ، يمكن الكشف الصحيح باستخدام الطرق الجزيئية لأنواع الملاسيزية .
- تم إنشاء العديد من الاختبارات الجزيئية لتحديد هوية الملاسيزية وكذلك للكشف عن التباين الجيني داخل النوع :

✓ التسلسل المباشر لمواقع rDNA (فواصل نسخ داخلية ITS-1 و ITS-2 ، فاصل بين الجينات IGS-1 ، وحدة فرعية كبيرة LSU) ، كيتين جين سينسيز و RNA polymerase subunit 1 gene ،

✓ pcr-based restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) لمواقع Rdna.

✓ التضخيم العشوائي للحمض النووي متعدد الأشكال random amplificationif polymorphic DNA(RAPD).

✓ تغيير طبيعة الرحلان الكهربائي للهلام المتدرج denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE).

✓ والرحلان الكهربائي للهلام النبضي pulsed field gel electrophoresis(PFGE) .

- تم وصف الطرق الجزيئية المناسبة لتحديد أنواع الملاسيزية في مختبرات الفطريات السريرية في (الجدول 6.3).

الجدول 6.3 الطرق الجزيئية سهلة الاستخدام لتحديد الملاسيزية في مختبرات الفطريات السريرية

الأدوات الجزيئية / المنطقة الجينومية	تحديد الأنواع	المصدر
Sequencing/ITS1 rDNA	*M. furfur; M. globosa; M. pachydermatis; M. restricta; M. sympodialis; M. slooffiae; M. nana; M. obtusa*	Makimura et al. (2000); Hirai et al. (2004); Gaitanis et al. (2006); Cafarchia et al. (2008)
Sequencing/LSU rDNA	*M. furfur; M. globosa; M. restricta; M. sympodialis; M. pachydermatis; M. slooffiae; M. obtusa; M. nana*	Guillot et al. (1997); Guillot et al. (2000); Cabañes et al. (2005); Cafarchia et al. (2007, 2008)
Sequencing/LSU rDNA D1 and D2 domain/ITS	*M. furfur* (D1, D2, and ITS); *M. sympodialis* (ITS); *M. pachydermatis* (D1, D2, and ITS); *M. globosa* (D1, D2, and ITS); *M. slooffiae* (D1, D2, and ITS)	Gupta et al. (2004)
PCR-REA/ITS-1 ITS-2 rDNA and LSU rDNA	*M. furfur; M. obtusa; M. globosa; M. slooffiae; M. sympodialis; M. restricta; M. pachydermatis; M. dermatis; M. japonica; M. nana; M. yamatoensis*	Gaitanis et al. (2008); Oh et al. (2009)

- **الاختصارات:** ITS : فاصل نسخ داخلي (ITS1-5.8) لمنطقة DNA الريبوسوم ؛ REA :تحليل إنزيم التقييد ؛ LSU :وحدة فرعية كبيرة من rDNA.

- تم استخدام جهاز Matrix –assisted laser desorption and ionization time–of –flight mass spectrometry (MALDI–TOF MS) لتحديد الكائنات الحية الدقيقة المختلفة ، ويقال انها أداة تشخيصية **سريعة وموثوقة** لتحديد الأشكال الخمائرية . ومع ذلك ، بالنسبة لأنواع الملاسيزية لايوجد سوى أربعة إسقاطات لأطياف رئيسية موجودة في مكتبة Biotyper ،أحدها Malassezia furfur و ثلاثة منها هي Malassezia pachydermatis ، والتي يتم تخزينها في مجموعة CBS–KNAW و DSMZ مجموعة (Bruker Daltonics).
- ومع ذلك ، فقد أشارت بعض الدراسات إلى أن قياس الطيف الكتلي هو طريقة واعدة في تحديد أنواع الملاسيزية من إنشاء قواعد البيانات الداخلية والتحقق من صحتها.
- يجب إضافة أطياف مرجعية MALDI–TOF MS التي تم الحصول عليها من سلالات النوع من خلال مستعمرة فرعية للمستعمرات الطازجة على CHROMagar أو وسط Leeming و Notman المعدلة إلى القائمة قاعدة البيانات.

- **بروتوكول التمييز بين جنس الملاسيزية والتعرف اللاحق للعزلات السريرية كما يلي:**

1. أضف 300 ميكرولتر من الماء إلى كل انبوب Eppendrof microfuge tube .
2. انقل مستعمرة ملاسيزية كبيرة وجديدة (48–72 ساعة) إلى الأنبوب (قد يلزم نقل أكثر من مستعمرة واحدة إذا كان نمو الخميرة صغيرًا ؛ اختر مستعمرات معزولة) .
3. أضف 900 ميكرولتر من الإيثانول وحرك جيداً.
4. جهاز طرد مركزي بسرعة قصوى (16000 غ) لمدة دقيقتين.
5. قم بإزالة كل الإيثانول باستخدام ممص (يمكن وضع الأنابيب في مخلية هواء أو تركها عند درجة حرارة الغرفة لإتمام عملية التبخر إذا لزم الأمر).
6. أعد تعليق حبيبات الخلية في 50 ميكرولتر من حمض الفورميك بنسبة 70٪ (إذا كانت كمية صغيرة من الخميرة متوفرة ، قلل حجم حمض الفورميك إلى 10 ميكرولتر) و حرك جيدًا.
7. . أضف 50 ميكرولتر من 100٪ أسيتونيتريل (إذا توفرت كمية صغيرة من الخميرة ، قلل من حجم الأسيتونتريل إلى 10 ميكرولتر) وحرك تمامًا.

ملاحظة: يجب أن تكون أحجام حمض الفورميك 70٪ والأسيتونتريل متساوية.

8. جهاز طرد مركزي بسرعة قصوى (16000 غ) لمدة دقيقتين.
9. اسحب 1 ميكرولتر من المادة الطافية على لوحة مستهدفة من الفولاذ المصقول واتركها تجف في الهواء.
10. امزج مع 1 ميكرولتر من محلول المصفوفة

– cyano–4–hydroxycinnamic acid &) لتغطية كل بقعة عينة ؛

(تأكد من أن الهدف جاف تمامًا قبل تحليله بواسطة MALDI–TOF–MS).

الخاتمة:

- لا تتطلب المعالجة السريرية لعدوى الملاسيزية السطحية تشخيصًا فطريًا طبيعيًا ، ولا يتم استخدام طرق الزرع للملاسيزية بشكل روتيني.
- ومع ذلك ، في السنوات الأخيرة ، قد وصفت العديد من التقارير الملاسيزية بأنها من عوامل العدوى الشديدة العميقة.

- لذلك ، يجب أن تكون مختبرات الفطريات جاهزة للاستجابة لهذا الطلب الخاص من الأطباء. لهذا الغرض ، يمكن استخدام الاختبارات الجزيئية أو مطياف الكتلة MALDI-TOF.

المحتوى:

- _مقدمة.
- _العوامل المؤهبة للعدوى والمظاهر السريرية.
- _التشخيص المخبري

يتضمن التشخيص المخبري كلا من:

١_تشخيص فطري.

٢_الموجودات المجهرية والمزرعية.

٣_طرق تحديد الهوية (الذاتية)

7-1 مقدمة:

تمثل الخمائر الرمامية جنس المتوردة والتي تنتمي الى شعبة Basidiomycota، يمكن ان تتواجد في العديد من المصادر البيئية مثل الهواء، التربة، ماء البحر والنباتات.

هذا الجنس مكون من خمائر صباغية مصنفة في عائلة المستخفية وتتضمن ٣٨ نوع.

تتشابه انواع المتوردة بالصفات الفيزيائية والشكلية مع المستخفية ولكن تختلف عنها بقدرتها على انتاج الاصبغة الكاروتينية (تعطي لون اصفر مائل للاحمر الارجواني للمستعمرة) وغير قادرة على تمثيل الاينوزيتول.

2-7 العوامل المؤهبة للعدوى والمظاهر السريرية:

_سابقاً، كانت انواع المتوردة عوامل غير ممرضة ولكن حديثاً، أصبحت خطرة وتحولت لفطور انتهازية مسببة للمرض ؛ كما انها يمكن ان تكون مسؤولة عن العدوى المجتاحة التي تركزت عند المرضى ضعيفي المناعة.

_من بين المظاهر الناتجة عن العدوى بالمتوردة كانت المظاهر الفطرية هي المظهر الأكثر شيوعا.

وفي مراجعة منهجية اجريت على ١٢٦ حالة عدوى بالمتوردة كانت ٧٩% فطرية و٧% بصرية و ٥% لمرضى البريتوان الذين يخضعون لتحال دموي بصورة مستمرة.

_كان هناك ارتباط بين تزايد الاصابة بالمتوردة والعديد من العوامل المؤهبة منها سوء استخدام الكورتيكوستروئيدات القشرية والادوية السامة للخلايا عند مرضى الاورام الصلبة و الدم ومرضى الجراحة الباطنية الذين يستخدمون المضادات الحيوية واسعة الطيف واجهزة طبية وكانت اكثر الحالات مرتبطة باستخدام القثاطر الوريدية المركزية.

_كما تجدر الاشارة الى انه ليس بالضرورة ان يترافق استخدام القثاطر او ضعف مناعة مع الاصابة بالمتوردة المترافقة مع مظاهر بصرية والتهاب بريتوان او التهاب مفاصل رثياني.

_ان انواع المتوردة موجودة بالطبيعة وممكن ان تستعمر في الظهارة البشروية كتجويف التنفسي والهضمي وهي غير ممرضة عند الاشخاص ذوي المناعة الصحيحة ولكن عزل المتوردة من مواقع غير عقيمة مثل الاغشية المخاطية يترك شكوك سريرية حولها ؛ لذلك نحن بحاجة للمعالم السريرية والمخبرية.

ومن جهته اكد مؤلفون ان العدوى غير الفطرية المترافقة بمظاهر بصرية وسحائية والتهاب مفاصل رثياني موجودة عند كل من الاشخاص ذوي المناعة الصحيحة والضعيفة.

_من اهم مظاهر العدوى البصرية المتسببة بالمتوردة هي التهاب القرنية (الاكثر شيوعا)، التهاب الصلبة، التهاب كيس الدمع، والتهاب باطن المقلة.

وفي أكثر الحالات المسجلة كان الاشخاص صحيحي المناعة ولا يعانون من اي امراض ولكن اكثرهم بقي مرتبط بأورام بصرية وجراحية.

_على الرغم من ان المتوردة ليست سبب شائع للاصابة بالفطار الظفري لكن بعض حالات عدوى الاظافر سجلت عند اشخاص يعملون بالنباتات والتربة لما كانت المتوردة يمكن ان تتواجد في التربة

_ان التهاب السحايا نادرا ما يكون بسبب العدوى بالمتوردة،ولكن كل الحالات التي سجلت حتى الآن كانت عند مرضى مصابين بعوز مناعي وأورام خبيثة دموية وجميعهم يعتبرون من الاشخاص الذين يحتاجون للرعاية الصحية.

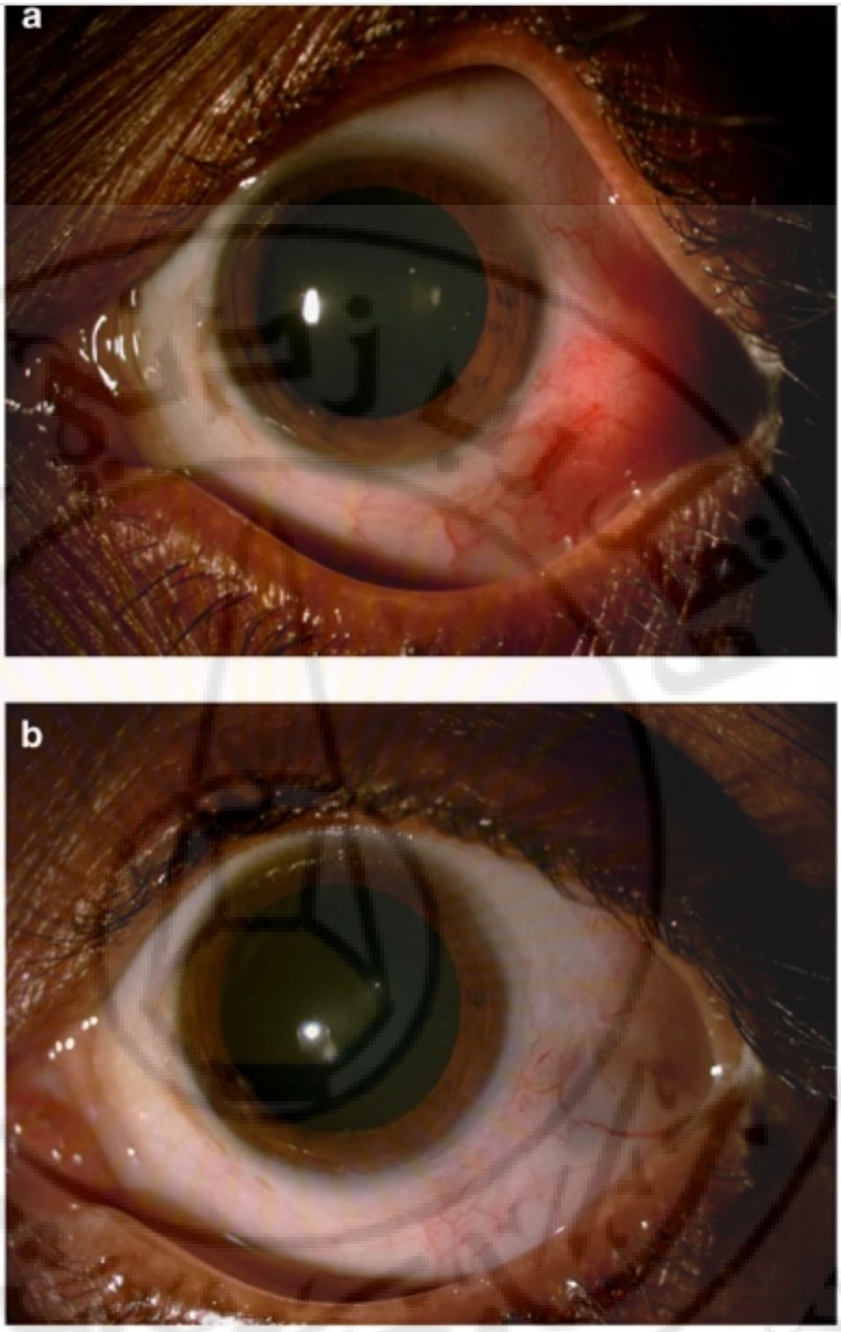
عادة المخاط المترافق للحمى يعطى نتائج متغيرة لذلك بعض الحالات لا يكشف عنها الا بالتشريح.

_بالمقابل تعد العدوى الفطرية الناتجة عن المتوردة من أكثر المظاهر شيوعاً وتترافق مع معدلات الامراضية والوفيات الاعلى (يصل ل٢٠%) وسجلت عند مرضى يستخدمون القثاطر الوريدية المركزية حيث احدثت ضرر على الحواجز التشريحية الطبيعية وعند الاشخاص ضعيفي المناعة.

_ان المتوردة قادرة على الالتصاق بسطح البلاستيك لذلك اجهزة توصيل الاوعية الدموية التي تزود الانظمة بالبيوفيلم مسؤولة عن معظم حالات العدوى الدموية عند البشر.

_وبالرغم من ان العدوى الفطرية بالمتوردة تحدث بصورة رئيسية عند الاشخاص ضعيفي المناعة

المؤلفون سجلوا حالات عدوى دموية محدثة بالمتوردة mucilaginosa عند اشخاص مؤهلين مناعيا ويستخدمون قثاطر وريدية مركزية.



الاعراض العينية للاصابة 1

7-3 التشخيص المخبري:

سابقاً، كانت انواع المتوردة غير ممرضة ولكن حديثا اصبحت ممرضة انتهازية وقادرة على تشكيل مستعمرات وعدوى سريعة التآثير عند المرضى.

معظم الحالات المسجلة بعدوى فطرية بالمتوردة كانت مرتبطة باستخدام القثاطر والتهاب شغاف القلب والتهاب السحايا والعدوى غير الجهازية مثل التهاب باطن العين او البريتوان سجلت عند مرضى مؤهلين مناعياً.

_ان انواع المتوردة المعزولة من اماكن غير عقيمة مثل الجلد والبلغم والادوات تكون اقل قدرة على تشكيل المستعمرات واحداث التلوث، كما ان العلاج يركز على الاعراض الموحية الموجودة بعد ءلك الحالات التي استبعدت.

اما الانواع المعزولة من اماكن عقيمة مثل الدم والبريتوان والسائل الدماغي الشوكي فهي تدل حتما على عدوى ويجب على الاخصائي ان يفحص بدرجة عالية من الدقة هذه الحالات وخاصة عند الاشخاص الذين لم تظهر لديهم اعراض موحية بالعدوى.وهنا يجب ان يترافق الفحص البيوكيميائي مع المجهري لانه عادة خلايا الخميرة ترى بالفحص المجهري.

_في حال التهاب السحايا،السوائل الدماغية الشوكية تظهر لمفاويات كثيرة خلايا وعند تلوينها بالحبر الهندي ممكن ان تكشف عت خلايا خميرة مغلفة.

ربما يصعب التفريق الشكلي بين التهاب السحايا بالمتوردة والتهاب السحايا الناتج عن الاصابة بالCryptococcal حيث انه هناك بعض الحالات اعطت نتيجة ايجابية خاطئة لمستضدات ال cryptococcal في اختبار LAT

_ان الاصبغة المميزة للمستعمرة مؤكدة مع نتائج اختبار بيوكيميائي (قدرة على تمثيل السكريات وانتاج اليورياز) مع غياب تشكيل ballistospore تكون مشعرات خاصة لتعرف عليها.

_مع ملاحظة ان المتوردة المعزولة بشكل متصالب مع المبيضات تعطي في اختبار FISH نتيجة ايجابية على المزارع الدموية.

_ان تفاعل البولميراز المتسلسل يحدد طيف واسع من العوامل الممرضة الفطرية بالعينات الدموية بما فيها المتوردة.

_وحتى الان من الصعب التبأ فيما اذا كانت هذه التقنيات مدرجة ضمن الممارسة السريرية.

_لما كانت القثاطر الوريدية متورطة بنقل عدوى المتوردة اخذت ابرة القثطرة وزرعت على المزارع الدموية فاعطت سلبية كاذبة.

_ان التعرف على المتوردة مخبريا يعد امراً سهلاً حيث يتم التعرف عليها وفقا للون البرتقالي المميز او شكليا او بتشكيل خيوط بدئية وحتى بانتاج اليورياز.

ان مستضد B1_3_D غليكان المكشوف عنه غير مدعم بالحالات السريرية للعدوى الجهازية بالمتوردة وع الرغم انه تم الكشف عنه في المتوردة الطافية المعزولة بتركيز ٢ الى ٣ من انواع المبيضات ويعتبر بذلك واصم جيد ولكن يبقى قيد التحقق

7-3-1 التشخيص الفطري:

يجب ان يكون تفسير نتائج في الحالات السريرية مدعماً وفقاً لموقع الأفة وخاصة في الاماكن غير العقيمة.

ان انواع المتوردة المعزولة من مصادر بيئية تكون خمائر خطيرة. حيث ان العينات السريرية تجمع بطريقة خاصة من اجل الزراعة لانها سوف تصنف تبعاً للصبغات.

_العينات تجمع بعد تنظيف المنطقة بكحول ايزوبروبيلي 70% لمنع التلوث. ومن احل الفطار الظفري قلح الاظافر يجب ان يجمع.

ومن اجل الفحص المجهري تحضر العينات مع ١٠_٢٠% من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم حيث انه يحل الكيراتين تاركاً خلايا الفطور.

المزارع يجب ان تنمو على وسط اغار سابورود مدعم بالديكستروز ويجب التحكم بدرجة الحرارة بين ٢٥_٢٨ وتحفظ ل٧ آيام،المجموعتان المنفصلتان يجب ان تنفذان في ايام مختلفة.

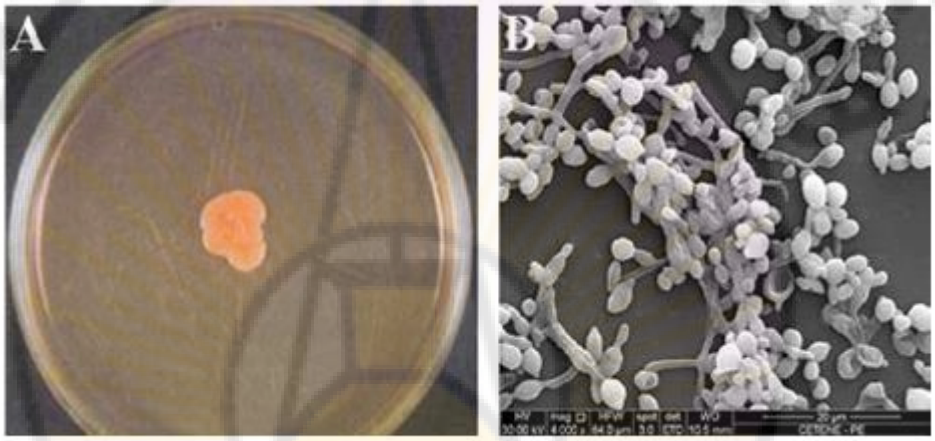
_في حال امكانية العدوى بالفطور، العينات الدموية تجمع بشكل خاص وتصنف حسب الأصبغة. وعلى درجة حرارة ٢٥_٢٨ وممكن ٣٧ لمدة ٧ ايام وان الحاجة لفحص المزارع في درجات حرارة مختلفة يكون مرتبط بفيزيائية الفطور.

بالنسبة للبوتاسيوم،الفطور تكيفت لتنمو بدرجة حرارة الجسم لذلك يجب ان تكون قادرة على التعدد في حرارة ٣٧.

7-3-1-1 الموجودات المزرعية والمجهرية:

_في حالة العدوى بالمتوردة خلايا الخميرة تفحص بالفحص المباشر والمستعمرات على وسط السابورود تكون رطبة لامعة ملساء لمخاطية ولونها بين الوردي السلموني والاحمر المرجاني A1_7

مجهرياً، خلايا الخميرة تكون قصيرة وبيضوية مع او بدون خيوط كاذبة.



A7_1 مستعمرة متوردة رطبة لامعة مخاطية ووردية وذللك بعد خمسة ايام من النمو على وسط السابورود بدرجة حرارة ٢٥%

B7_1 فحص مجهري الكتروني لمتوردة أظهرت تبرعم وخلايا الخميرة بيضوية معزولة مع خيوط كاذبة

_المتوردة اللاصقة:

الصفات العيانية للمزرعة: مستعمرة على اغار السبورد بدرجة ٢٥ وردية وملساء ومظهر رطب.

الصفات المجهرية للمزرعة: في دقيق الذرة لمدة ٧٢ساعة وحضن بدرجة حرارة ٢٥ الخميرة الكروية انتجت خلايا بقطر ٣_٥ ميكرومتر وخيوط كاذبة احيانا ترى

_المتوردة الدقيقة:

الصفات العيانية للمزرعة: وردية ملساء لماعة ولكن غير مخاطية

الصفات المجهرية للمزرعة: خلايا بقطر ٢,٥_٦,٥ميكرومتر

_المتوردة الزغبية:

الصفات العيانية للمزرعة: مستعمرات يتراوح لونها بين الوردية للمرجانية وملساء الى باهتة لماعة.

الصفات المجهرية للمزرعة: خلايا بقطر ٢,٥_١٠ميكرومتر

7-3-2 طرق تحديد الهوية:

_ان طرق التنميط الاعتيادية ذات امكانيات محدودة في ضبط وتنسيق هوية الانواع الممرضة الخطيرة مثل المتوردة لذلك الطرق الأكثر ضمانا وملائمة تكون ضرورية من اجل المعالجة الملائمة.

_إن التعرف على الفطور وتحديد هويتها بالمخبر يتم باستخدام أجهزة آلية مثل الvitek، ان الطرق الآلية حاليا هي الاعلى قدرة على على تمييز العوامل الممرضة البشرية المشتركة وتحديدها كالمبيضات البيض.

وبسبب عدم القدرة على التمييز بين الانواع المتشابهة بشكل عام جعل من تحديد العوامل الممرضة كالمتوردة أمراً صعبا.

حيث تأكد علماء من ان تسلسل المصباح المنتج داخلياً Its1

'TCCGTAGGTGAACCTGCGG_3'5)

و الIts4

'TCCGTAGGTGAACCTGCGG_3'5)

يمثل طريقة موثوقة لتحديد أنواع المتوردة أكثر من اختبارات التنميط الظاهرية الاعتيادية.

Table 7.2 Target Regions and Primers Used for Amplification and Sequencing of *Rhodotorula* Genes

Target Region	Primers	Reference
ITS	ITS 1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) ITS4 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)	Nunes et al. (2013)
D1/D2	NL-1 (5′-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3′) NL-4 (5′-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3′)	Jamali et al. (2016)

Abbreviations: ITS, Internal transcribed spacer region of ribosomal DNA (rDNA); D1/D2, variable domains of the large rDNA subunit (28S).

جدول 7_2 يعرض مناطق هدف والبوادئ التي يمكن ان تستخدم لتضخيم وتحديد تسلسل جينات المتوردة.

بالاضافة لذلك، مصفوفة بالليزر المساعد وزمن التآين لمقياس الطيف الضوئي المرتبط بمطياف الكتلة MALDI استخدم لتحديد احياء دقيقة مختلفة وبذلك يكون اقرب ليكون اداة تشخيص موثوقة والاسرع لتحديد هوية الخمائر الهامة سريريا وبيئيا مثل انواع المتوردة.

يوجد 17 اسقاط طيفي رئيسي موجود في المكتبة الحيوية MALDI بألمانيا ؛(نوع من archeniorum، نوع من bacarum، نوع من bogoriensis، نوعين من glutinis، ثلاث انواع من minuta، وثمانية انواع من mucilaginosa، ونوع من pustule) حددت هوية انواع متوردة معزولة تم الحصول عليها من عينات دم، تربة، ماء، هواء MALADI_TOF MS ينبغي ان نحصل عليه من تحليل ثلاث مستعمرات طازجة.

_الزراعة على وسط بيبتون آغار بخلاصة الدكستروز.

(هذا البروتوكول الاساسي المتبع لتحديد انواع متوردة)

_اضف ٣٠٠ ميكروليتر من الماء لكل انبوب فطري.

_انقل مستعمرات طازجة كبيرة بعد ٢٤ ل٢٨ ساعة من المتوردة للأنبوب، ربما تحتاج اكثر من مستعمرة واحدة لتكون منقولة اذا كانت المستعمرة صغيرة اختر المستعمرات المعزولة والمدورة تماما.

_أضف ٩٠٠ميكروليتر من الايتانول وحرك ببطىء

_ثفل على السرعة العظمى ١٦٠٠٠ دورة بدقيقتين

_ازل كل الايتانول بالانابيب (الانابيب ربما توضع في مثفلة او تترك بدرجة حرارة الغرفة اذا كانت عملية التخلية ضرورية)

_علق خلايا الحية في ٥٠ ميكروليتر من الفورميك اسيد وبتركيز ٧٠%(اذا كان متوافر كمية صفيرة من الخميرة نقص الفورميك اسيد لل١٠ميكرولتر وحرك مجددا)

_اضف ٥٠ ميكرولتر من الاسيتونيتريل ذو التركيز ١٠٠%(واذا كانت كمية صفيرة من الخميرة متوفرة قلل الحجم الى ١٠ ميكرولتر وحرك مجددا)

_ان حجم الفورميك اسيد ذو التركيز ٧٠%والاسيتونتريل يجب ان تكون متساوية.

_التثفيل يتم بالسرعة القصوى١٦٠٠٠ دورة خلال دقيقتين.

_وزع بالممص ١ميكرولتر من الطبقة الطافية على اطباق صلبة ودعها حتى تجف.

_ارفد ١ميكرولتر من محلول سيانو4هيدروكسي سيناميك اسيد)

ليغطي كل العينة ودعها تجف وتأكد من انها جفت تماما قبل ان تفرز بالMALDI.

جدول المحتوى للفصل الثامن الفطريات الجلدية:

8-1 الجوانب التاريخية

8-2 علم الأوبئة

8-3 المظاهر السريرية

8-4 التشخيص المخبري

8-4-1 النمو على وسائط الزرع الخاصة

8-4-2 الفحص المجهري للمستعمرات على الشرائح

8-4-3 إنتاج اليورياز Urease Production

8-4-4 اختبار انثقاب الشعر في المختبر In vitro hair perforation test

8-4-5 اختبارات الفيتامينات والتغذية Vitamin and nutrional tests

8-5 التعريف الجزيئي القائم على الحمض النووي DNA-based molecular identification

8-6 التحديد بناءً على تنميط البروتين (إزالة امتصاص الليزر بمساعدة المصفوفة / زمن التأين للرحلة) Identification based on protein profile *MALDI-TOF*

8-7 الأنواع الرئيسية من الفطريات الجلدية

8-7-1 جنس الفطور البويغية Microsporum

8-7-1-1 Microsporum canis

8-7-1-2 Microsporum ferrugineum

8-7-2 جنس الشعروية Trichophyton

8-7-2-1 الشعرويّة الحمراء Trichophyton rubrum

8-7-2-2 الشَّعْرَوِيَّةُ الجَازَّة Trichophyton tonsurans

8-7-2-3 Trichophyton interdigitale

8-7-2-4 Trichophyton verrucosum

8.8 اعتبارات نهائية

8-1 الجوانب التاريخية:

تنتمي الفطريات الجلدية إلى أقدم مجموعات الكائنات الحية الدقيقة التي تم التعرف عليها كعوامل مسببة للأمراض عند البشر. بدأ علم الفطور الطبية بدراسة هذه الفطور بواسطة روبرت ريماك في عام 1839، عندما أوضح أسباب مرض "السعفة القرعية Favus ". في عام 1842، اكتشف ديفيد جروبي David Gruby بشكل مستقل العامل المسبب للمرض لـ " السعفة القرعية Favus "، واكتشف جنس البويغية Microsporum، وأعاد التأكيد على المسببات الفطرية لجميع أنواع السعف tineas. على الرغم من النتائج التي توصل إليها هؤلاء الباحثون وغيرهم، فقد استغرق الأمر أكثر من نصف قرن حتى خرج علم الفطور الطبي من النبذ العام الذي تميز في السنوات التالية. في عام 1910، نشر ريموند جاك أندريان سابورو، طبيب الأمراض الجلدية البارز الذي تدرب في معهد باستور، أطروحة حول علم الفطور الطبية، "لي تيجن *Les Teignes*"، وهو علامة بارزة في المجال تهدف إلى توحيد المعرفة الموجودة في ذلك الوقت فيما يتعلق بالموضوع الأكثر مناقشة في علم الفطور، **الفطور الجلدية**.

تم إدخال ستة عشر نوعًا من الفطور الجلدية المرتبطة بالأمراض عند البشر بين عامي 1870 و 1920، وحدد سابورود Sabouraud نظام تصنيف جديدًا، يقسم هذه الأنواع إلى أربعة أجناس: جنس الفطور البشروية Epidermophyton، وجنس الفطور البويغية Microsporum.، وجنس الفطور الشعروية Trichophyton، وجنس الفطور عديم الغشاء Achorion.

خلال العقود التي تلت، بناءً على مفاهيم مربكة وتطبيق معايير منهجية جديدة، كان هناك تغير هام في الأنواع الجديدة التي تم تعيين الأسماء المعاد تجميعها، مما أدى إلى إدخال العديد من الأصناف التي تعتبر الآن مرادفات للأنواع الموصوفة سابقًا.

في عام 1934، اقترح CW Emmons، بمراجعة معايير تصنيف الفطريات في ذلك الوقت، تصنيفًا جديدًا للفطريات الجلدية بناءً على الجوانب المجهرية للغبيرات conidia وقدرة هذه الفطريات على النمو على وسائط خاصة، خاصة تلك التي تعتمد على الحبوب. ألغى إيمونز Emmons جنس الفطور عديم الغشاء Achorion الذي اقترحه سابورد ووضع الأنواع المقابلة ضمن جنس الفطور الشعروية Trichophyton، مما أدى إلى تصنيف الفطريات الجلدية إلى ثلاثة أجناس:

جنس الفطور البشروية Epidermophyton

جنس الفطور البويغية Microsporum.

جنس الفطور الشعروية Trichophyton.

كانت الستينيات بمثابة مرحلة جديدة في معرفة وفهم الفطريات الجلدية، مع إعادة اكتشاف التكاثر الجنسي لبعض الأنواع. وهكذا، أعاد دونالد جريفين اكتشاف الشكل المثالي للبويغاء الجبسية Microsporum gypseum، الذي وصفه Nannizi (وعرف بالبزيرة الدقيقة) سابقًا في عام 1926.

وبهذه الطريقة، فإن الفطور من مجموعة الفطريات الجلدية التي تنتمي إلى جنس الفطور الشعروية التي أظهرت التكاثر الجنسي كانت تسمى مفصليات الأدمة Arthroderma عندما تكون في شكلها المثالي. وقد لوحظ هذا أيضًا بين الفطريات من جنس الفطور البويغية Microsporum، والتي كانت تسمى البزيرة الدقيقة Nannizzia عندما تكون في مرحلة التكاثر الجنسي teleomorph أو شكل مثالي perfect form. ومع ذلك، في عام 1986، قرر Weitzman وزملاؤه، بناءً على ملاحظة أن جنس Nannizzia و Arthroderma لهما سمات شكلية متشابهة جدًا، ضمّهما في جنس واحد، *مفصليات الأدمة Arthroderma*، وفقًا لقانون التصنيف الذي يعطي الأفضلية للفئة الأقدم.

في العقود الأخيرة من القرن العشرين، أصبح من الواضح أن التصنيف القائم على الشكل له حدود ولا يمكن استخدامه باعتباره الخاصية الوحيدة للتصنيف أو التعريف. ردا على ذلك، قدم Weitzman تحليلا إضافيا في شكل المعالم الفيزيولوجية، وفقا للنمو في وسائط أجار الفطور الشعروية Trichophyton agar media (T1 إلى T7)، معتمدا على قدرة السلالات على استيعاب مجموعة من الفيتامينات الأساسية والأحماض الأمينية، ارتباطها بدرجة حرارة النمو، تسييل الجيلاتين، إلخ. وهكذا، فإن تصنيف الفطريات الجلدية يجمع بين المظهر السريري، وخصائص النمو في الوسط culture media، والسمات المجهرية، والفيزيوليجا.

على غرار أيام باستور، عندما أحدثت تقنية الزرع النقي Axenic culture ثورة في علم الأحياء الدقيقة، أحدث تطبيق الأساليب الجزيئية اليوم ثورة في تصنيف الفطريات الجلدية والفطريات المسببة للأمراض الأخرى (Ahmadi et al.:2015، Calderaro et al.، 2014؛ Gnat et al.، 2017 ؛ Mochizuki et al.، 2017). ومع ذلك، على الرغم من أن النهج الجزيئي يحل الخصائص الرئيسية لتطور الفطريات الجلدية، لا تزال هناك عيوب في هذا التوصيف. لا يمكن تمييز العديد من الفطريات

التي ثبتت سريريًا كأنواع مختلفة من جنس الفطور الشعروية (الحَمْراء/الشونلاينيَّة، القفد/الجَازَّة Trichophyton rubrum/T. violaceum, T. equinum/T. tonsurans) وجنس فطور البويغاء (الأودوينية/الكلبية/الصَّدِئَة *Microsporum audouinii/M. canis/M. ferrugineum*) لا يمكن تفريقها في تحليل متعدد الفجوات multilocus analysis، كغموض متفرق في تسلسل الجينات أو نقص البيانات يخفي الاختلافات الصغيرة بين الأنواع (De Hoog et al.، 2017).

خلال عقود كانت تعطى تسميات مزدوجة، يمكن أن يكون للأنواع نمطان، ولكن منذ عام 2013، بموجب قواعد التسمية الجديدة للفطريات، يشير الاسم مرحلة التكاثر اللا جنسي anamorph أو مرحلة التكاثر الجنسي teleomorph الآن إلى نفس العينة من النوع الأصلي، بدلاً من أن يكون لها أسماء متفرقة.

في الوقت الحاضر، يوجد منظور لتصنيف النشوء والتطور للفطريات الجلدية، ومنذ عام 2015، كرس العديد من المؤلفين جهودهم لتوضيح شجرة النشوء والتطور لهذه الفطريات بشكل أفضل، استنادًا إلى التحليل الشامل لمنطقة الموسّع النتسخ الداخلي ITS Internal Transcribed Spacers الخاصة بالحمض النووي الريباسي والتحليلات متعددة الفجوات، مما يتيح التمييز بين سبع مجموعات أحادية اللون ومتعددة الخلايا، تشمل أجناس مفصليات الأدمة Arthroderma والفطور البشروية Epidermophyton وقراع عرفي Lophophyton و البزيرة الدقيقة Nannizia وفطور نباتية Paraphyton والشعروية Trichophyton و Ctenomyces (De Hoog et al.، 2017 ؛ Bouchara et al.، 2017، Gräser et al.، 2018). ومع ذلك، فإن "التسمية الفطور الجلدية"، بالمعنى الدقيق للكلمة، لا يمكن استخدامها إلا للأنواع التي تنتمي إلى أجناس البويغية والشعروية والبشروية، وهي محصورة بالمناطق الكيراتينية وقادرة على التسبب في أمراض لدى البشر والحيوانات، مع تصنيف الأنواع الأخرى كمجموعة ذات صلة، لا تعتبر في الواقع فطريات جلدية.

أخيرًا، جدد الاهتمام بدراسات علم نشوء وتطور السلالة الاهتمام العالمي بالتحقيق في تصنيف الفطريات الجلدية. ما دفع المجتمع الدولي لعلم الفطريات البشرية والحيوانية International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) إلى إنشاء مجموعة عمل معنية بالفطريات الجلدية في عام 2017، لتحفيز وتنسيق شبكة دولية مخصصة لدراسة هذه الفطريات. لذلك، من الممكن في المستقبل القريب إضافة معلومات جديدة للدراسة المنهجية لهذه الفطريات.

8-2 علم الأوبئة:

في السنوات الأخيرة، كشفت الأدبيات عن زيادة حدوث الالتهابات الفطرية، حيث كانت الفطريات الجلدية هي السبب الرئيسي لهذه الزيادة. تم اقتراح عدة عوامل لارتفاع معدل الإصابة بالعدوى الجلدية الفطرية، من بينها التحسن والتطور في التشخيص المختبري والسريري، وزيادة أمد الحياة عند المرضى الذين يعانون من أمراض كبت المناعة، واستخدام الأدوية التي تمارس ضغطًا انتقائيًا وتسمح بظهور وتشكل الكائنات الحية الدقيقة الطبيعية الرمّامة. لذلك، فإن الفطور الجلدية، المسبب التقليدي للأمراض الجلدية، لديها احتمال أكبر للتسبب في نتاج العدوى. في الواقع، لقد أصبحت المجموعة الفطرية الأكثر عزلة في الأمراض التي تصيب الإنسان. بناءً على معدل الانتشار المقدر، يُعتقد أن 10٪ - 15٪ من البشر سيصابون بهذه الفطريات خلال حياتهم (Nenoff et al.، 2014a).

فيما يتعلق بالتوزيع الجغرافي، فإن الفطريات الجلدية عالمية، ولكن هناك اختلافات إقليمية ملحوظة فيما يتعلق بأنواع وتواتر الأنواع المعزولة. العديد من الأنواع لها توزيع عالمي، مثل الشعروية الحمراء T. rubrum و البَشْرَوِيَّةُ النُّدْفِيَّة Epidermophyton floccosum. البعض الآخر يقتصر على مناطق جغرافية محددة، على سبيل المثال،البويغاء الصدئة M. ferrugineum موجود في آسيا وأفريقيا، T. megninii في أوروبا، و T. centricum في أمريكا الجنوبية وجزر المحيط الهادئ (كوليبالي، 2018 ؛ بوشارا وآخرون، 2017)..

تشير الأدبيات الدولية إلى الشعروية الحمراء T rubrum باعتبارها أكثر أنواع الفطريات الجلدية المعزولة شيوعًا، تليها الشعروية الشونلاينيَّة T. violaceum و الشَّعْرَوِيَّةُ الذُّقانِيَّة T. mentagrophytes (Kupsch et al.، 2016؛ Nenoff et al.، 2014a) ومع ذلك، لا يمكن اعتبار هذه النتائج كحقيقة مطلقة، نظرًا لأن جزءًا كبيرًا من هذه الأدبيات يركز على المناطق الجغرافية التي تختلف فيها الظروف المناخية والاجتماعية اختلافًا كبيرًا عن المناطق الأخرى التي خضعت للدراسة بشكل أقل، مما يؤثر بشكل مباشر على طيف أنواع الفطريات الجلدية المعزولة.

عامل آخر يجب مراعاته في وبائيات الفطريات الجلدية، إلى جانب الجغرافيا، هو الفترة التي تغطيها الدراسة، حيث يمكن أن يتغير نمط وتواتر الفطور الجلدي على مر السنين. على سبيل المثال، وجدت دراسة أجريت في فرنسا تغطي الفترة من 1956 إلى 1980 أن الفطريات الجلدية المعزولة غالبًا من

عدوى فروة الرأس كانت البويغاء الكلبية M. canis بنسبة 66.8٪، تليها الشعروية الشونلاينيَّة T. violaceum بنسبة 12.1٪. في دراسة فرنسية أخرى، غطت الأعوام 1981–1989، كانت أكثر أنواع الفطريات الجلدية المعزولة عن عدوى فروة الرأس هي T. soudanense بنسبة 54.1٪، يليها M. langeronii بنسبة 26.5٪. التفسير المحتمل لهذا التغيير في نمط الفطريات الجلدية المعزولة هو تدفق السكان بين فرنسا ومستعمراتها الأفريقية السابقة (كوليبالي وآخرون، 2018).

ومن ثم، يمكن استنتاج أن العديد من العوامل، مثل الظروف المناخية، والممارسات الاجتماعية، وحركة السكان البشرية، تؤثر على وبائيات الفطار الجلدي؛ لذلك، ينبغي إجراء دراسات بأثر رجعي ومستقبلية لإعادة التحقق من صحة البيانات الوبائية الموجودة والمحفوظة.

كانت Epidermophyton floccosum و Microsporum audouinii و Trichophyton schoenleinii من المسببات الرئيسية لأمراض فطرية سطحية في المائة عام الماضية، لكن تواترها انخفض بشكل كبير منذ الخمسينيات، وهي تقتصر الآن على بعض البلدان النامية. من ناحية أخرى، أصبحت الأنواع الأخرى، مثل Trichophyton tonurans، العامل الرئيسي لسعفة الرأس في العديد من البلدان الأوروبية، وخاصة المملكة المتحدة وفرنسا، وكذلك في الولايات المتحدة واليابان وأفريقيا ومنطقة البحر الكاريبي، مما أدى إلى تصنيفها كممرض ناشئ (Bouchara et al., 2017).

في الوقت الحاضر، تعتبر الفطريات الجلدية الأخرى، مثل Trichophyton violaceum و Trichophyton verrucosum و Microsporum ferrugineum، مستوطنة في بعض أجزاء من إفريقيا وآسيا وأوروبا. ومع ذلك، فإن Trichophyton rubrum و Trichophyton interdigitale و Trichophyton tonurans و Microsporum canis هي الأنواع الأكثر عالمية، حيث تمثل أعلى معدل انتشار في غالبية البلدان.

لذلك، سيغطي هذا الفصل أكثر الفطريات الجلدية عالمية، جنبًا إلى جنب مع بعض الأنواع المتوطنة.

3-8 المظاهر السريرية:

تتنوع الجوانب السريرية للآفات الجلدية بشكل كبير وهي ناتجة عن الجمع بين تدمير الكيراتين والاستجابة الالتهابية، والتي تكون أكثر أو أقل حدّة اعتمادًا على العلاقة بين الطفيلي والمضيف. لذلك، الخصائص

السريرية للآفات ترتبط ارتباطًا وثيقًا بثلاثة عوامل: أنواع الفطريات الجلدية المتورطة في العدوى، والموقع المصاب، والحالة المناعية للمضيف (Nenoff et al., 2014b).

هناك طريقتان لتصنيف الفطار الجلدي سريريًا. أحدهما يتبع المدرسة الإنجليزية، والتي تسمي جميع الإصابات بـ سعفة Tinea (باللاتينية) مرتبطة بكلمة أخرى (باللاتينية أيضًا) تشير إلى موقع الآفة: سعفة الجسم Tinea corporis (الموجودة على الجسم)، سعفة الرأس tinea capitis (فروة الرأس)، سعفة الأظافر unguium (الأظافر)، سعفة القدم tines pedis(القدمين)، سعفة اليد tinea manuum(اليدين)، سعفة الساق tinea cruris(الفخذ)، سعفة باربيا tinea barbea(اللحية). في المقابل، يتبع نظام التصنيف السريري الآخر المدرسة الفرنسية، ويصنف الفطار الجلدي إلى سعفة Tinea (أي آفة جلدية على فروة الرأس و / أو منطقة اللحية والشارب)، وفطريات البشرة epidermophytoses (آفات جلدية على الجلد اللامع/الأجرد)، وفطريات الجلد التي تصيب الأظافر dermatophytic onychomycoses (آفات الأظافر)، و الفطار الجلدي تحت الجلد والعميق subcutaneous and deep dermatophytoses (آفات في الحيز تحت الجلد والأعضاء العميقة الأخرى، تؤثر بشكل عام على المرضى الذين يعانون من نقص المناعة).

الشعروية الحمراء T. rubrum هي العامل الممرض الرئيسي المتورط في التهابات الجلد والأظافر، في حين أن M. canis و T. tonurans و T. violaceum هي الأنواع الرئيسية المشاركة في سعفة الرأس. ومع ذلك، فإن هذا النمط ليس ثابتًا، وحركة السكان وتغيير نمط الحياة وظهور أدوية جديدة مضادة للفطريات تؤدي إلى التطور المستمر للفطريات الجلدية، مما يؤكد أهمية إجراء دراسات وبائية واسعة لفهم ديناميكيات توزيع هذه الفطريات بشكل أفضل.

8-4 التشخيص المخبري:

يتضمن التشخيص المخبري للفطريات الجلدية، كما هو الحال بالنسبة للعدوات الفطرية الأخرى، ثلاث مراحل متميزة: 1-مرحلة ما قبل التحليل، وتتألف من تحديد وجمع العينات السريرية ؛ 2-المرحلة التحليلية، عندما يتم إجراء تحاليل الفطريات، في حد ذاتها، في المختبر وإصدار التقرير النهائي ؛ 3- ومرحلة ما بعد التحليل، عندما يتم تخزين مسببات الأمراض المستعادة recovered pathogens are stored لمزيد من الدراسة (De Hoog et al.، 2000 ؛ Nenoff et al.، 2014b).

إن التحديد الصحيح لأنواع الفطريات الجلدية يجب أن يجمع بين الأساليب التقليدية القائمة على نمو الزرع، بما في ذلك مورفولوجيا المستعمرات، وخصائص التثبيط (macroconidia و microconidia)، والبنيات الزخرفية ornamentation structures والسمات الفسيولوجية و / أو التغذوية، مع التحليلات الجزيئية من خلال العديد من التقنيات الجزيئية، بما في ذلك الطرق التي تعتمد الحمض النووي أو الطرق المستندة إلى تحليل ملامح البروتين باستخدام matrix-assisted laser desorption/ionization- time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (L'Ollivier and Ranque.، 2017 ؛ De Hoog et al.، 2017) .

بعد جمع العينات السريرية خلال الاشتباه السريري في الإصابة بالفطريات الجلدية، يجب أن تبدأ عملية معالجة العينات على الفور. لهذا الغرض، يتم تحضير شريحة واحدة أو اثنتين من المحضّرات الرطبة باستخدام مركبات لتوضيح الرؤية clarifying agents: KOH (10٪ - 40٪) أو صبغة K. بعد تحضير الشرائح، من الضروري الانتظار 3-5 دقائق لتوضيح وتنقية العينة السريرية من أجل تسهيل إظهار البنيات الفطرية ورؤيتها بالعين. يجب وصف هذه الهياكل، عند ملاحظتها، مع الأخذ في الاعتبار نتائج الخصائص المذكورة في الأدبيات، لدعم التشخيص السريري. يجب ملاحظة خصائص الخُوطِيّ (خيوط فطرية hyphal) فيما يتعلق بالتصبغ، والانفصال، ووجود الغبيرات المفصلية arthroconidia. عندما تكون العينة السريرية عبارة عن شعرة، يجب وصف نوع التطفل الذي تم ملاحظته، مع تحديد ما إذا كان فطور شعرية خارجية ectothrix أم داخل الشعرة endothrix والبوغ الدقيق microporic أم الضخم megasporic. ستدعم كل هذه البيانات معًا الاشتباه السريري في الإصابة، مما قد يساعد لاحقًا أخصائي الفطريات في تشخيص المرض.

يجب توزيع وزرع المواد المتبقية في ثلاثة أنابيب تحتوي على أجار سابورو Sabouraud agar (بمفرده،ثم مدعم بالكلورامفينيكول، ومكمل بالكلورامفينيكول وسيكلوهكسيميد) ويتم حضنها لمدة 8-15 يومًا لاكتشاف نمو الفطريات وتقيّحها maturation. ومع ذلك، يمكن تمديد فترة الحضانة هذه إذا كان هناك اشتباه في بعض الأنواع، مثل T. concentricum and T. schoenleinii، التي تأخذ وقت أطول حتى تنمو. بعد النمو المناسب وظهور المستعمرات المتقيّحة mature colonies (على سبيل المثال، بأنماط محددة جيدًا)، يجب تحضير شريحة بأخذ جزء من المستعمرة، بشكل عام من الجزء

المركزي للمستعمرة، حيث تكون البنية الفطرية موضّحة بشكل جيد، وبالتالي تسهيل تحديد هوية الإثمار/الإيناع fructification و/أو البنية الزخرفية ornamentation structures.

تتضمن الملاحظة المجهرية الضوئية optical microscopic observation إعداد محضّر رطب يحتوي على جزء من المستعمرة وقطرة أو قطرتين من ملوّن قطن اللاكتوفينول الأزرق lactophenol cotton blue LCB لإظهار بنية الإثمار/الإيناع (macroconidia و microconidia) والبنيات الزخرفية (خيوط على شكل مضرب racket-shaped hyphae، خيوط مشطية pectinate hyphae، خيوط لولبية أو محنية spiral or tenril hyphae، ثريات قراعية favic chandeliers، إلخ).

في الغالب، في هذه المرحلة، لدى أخصائي الفطريات معلومات كافية لإصدار تقرير تشخيصي نهائي للطبيب، الذي يشعر بالقلق عادةً بسبب التأخير في المختبر، على الرغم من أن التقرير النهائي سيكون له تأثير ضئيل على السلوك السريري. للتغلب على هذا السيناريو، يجب إقامة حوار جيد بين أخصائي الفطريات والطبيب، من أجل "تسوية الحواف الخشنة Smooth out the rough edges".

ومع ذلك، مما يبعث اليأس في الطبيب وأخصائي الفطور، أنه ليس من الممكن دائمًا تحديد العوامل المسببة من خلال الفحص المجهري. في مثل هذه الحالات، يجب على أخصائي الفطور الاتصال بالطبيب لشرح الصعوبات التشخيصية، ويجب أن يستمر في عملية تحديد الهوية، والانتقال إلى زرع الشرائح لمزيد من التقييم المجهري والاختبارات البيوكيميائية للتحليل الفسيولوجي. خلاصة القول هي أن الأمر قد يستغرق ما يصل إلى 25 يومًا بين استلام العينة وتحديد الهوية النهائية.

8-4-1 النمو على وسائط الزرع الخاصة:

في أي وقت، يؤدي النمو الفطري في أوساط الزرع الأولية، مثل Sabouraud agar أو آجار البطاطا potato agar، إلى ملاحظة خيوط فطرية معقمة، وأوساط الزرع الخاصة تحتوي على مواد ومكونات تساعد على نمو الإيناعات والبنيات الزخرفية، النموذجية لكل نوع، يجب استخدامها. الأوساط الأكثر استخدامًا لهذا الغرض هي أرز أجار rice agar وأجار لاكتريميل lactrimel agar.

إجراء الزرع هو نفسه المستخدم للوسائط الأولية. ومع ذلك، بدلاً من استخدام العينة السريرية لإجراء الزرع، يجب استخدام جزء صغير من المستعمرة التي تم الحصول عليها في النمو الأولي للفطور

primary recovery. ثم يتم حضن الأوساط عند 25 درجة مئوية – 30 درجة مئوية لمدة 5–10 أيام. بعد نمو المستعمرة، يتم تجميع محضّر رطب مع ملون قطن اللاكتوفينول الأزرق LCB لفحصها تحت المجهر الضوئي للتعرف على الفطريات المسترجعة recovered fungi.

يعد استخدام أجار الأرز مفيدًا بشكل خاص في تشخيص الفطريات من جنس الفطور البويغية Microsporum، لأن هذه الوسيلة تفضل تطوير الغبيرات الكبيرة macroconidia نموذجي لكل نوع. في المقابل، يعتبر أجار لاكتريميل وسطًا زرعيًّا غنيًا للغاية، مما يؤدي إلى ظهور العديد من الإيناعات والبنيات الزخرفية، مما يسهل التعرف على أنواع الفطور بشكل عام.

8-4-2 الفحص المجهري للمستعمرات على الشرائح:

تتيح هذه التقنية دراسة مفصلة للتركيبات والبنيات الفطرية المختلفة، بما في ذلك ترتيبها على الخيطان hyphae. يتم تجميع شريحة الزرع باستخدام مشرط لقطع مربعات أجار البطاط بقياس 5 × 5 مم وبسمك 0.4 مم تقريبًا. توضع هذه المربعات على شريحة مجهرية ويتم تلقيحها inoculated بجزء صغير من المستعمرات الفطرية في الزوايا الأربع للمربع. بعد ذلك، يتم تغطية كتلة أجار دكستروز البطاطس بغطاء معقم ويتم حضنها في غرفة رطبة معقمة لمدة 15–20 يومًا في درجة حرارة الغرفة. عندما يكون النمو كافيًا، تتم إزالة الغطاء الذي يحتوي على الغزل الفطري mycelium الملتصقة من أعلى كتلة الأغار، ويتم تحضير عينة على شريحة زجاجية أخرى تحتوي على ملون قطن اللاكتوفينول الأزرق LCB، ويتم فحصها تحت المجهر الضوئي. من الممكن أيضًا إجراء هذه الملاحظة/الرصد على الشريحة الزجاجية الأصلية عن طريق إزالة كتلة الأغار منها، ووضع قطرة من ملون قطن اللاكتوفينول الأزرق LCB، وتغطية المحضر بغطاء آخر.

8-4-3 إنتاج اليورياز Urease Production:

يستخدم اختبار إنتاج اليورياز على نطاق واسع لتحديد الفطريات الجلدية، وهو مفيد بشكل خاص للتمييز بين Trichophyton interdigitale والأنواع الأخرى من Trichophyton. يعتمد هذا الاختبار على قدرة أنواع معينة من الفطريات الجلدية على إنتاج إنزيم اليوريا urea enzyme، وإطلاق الأمونيا وزيادة الرقم الهيدروجني pH في الوسط ليصبح قلوي، مما يتسبب في تغير لونه من الأصفر إلى الوردي الداكن.

يتضمن الاختبار زرع جزء صغير من مستعمرة الفطر الجلدي على أجار اليوريا لكريستنسن Christensen's urea agar. يتم تحضين الأنبوب في درجة حرارة الغرفة ويتم تأويله interpreted بعد 96 ساعة. تعتبر النتيجة إيجابية عندما يتغير الوسط من الأصفر إلى الوردي الداكن. إذا ظل الوسط أصفر، يعتبر الاختبار سلبيًا.

يجب قراءة وتأويل الاختبار في فترة لا تتجاوز ال 7 أو 30 يومًا، أما في بعض الاستثناءات النادرة، عندما يستغرق نمو الفطريات وقتًا أطول، حيث قد تموت الفطريات الجلدية بسبب الاستنفاذ الغذائي للوسط، مما يؤدي إلى إطلاق مستقلبات قلوية تتسبب في تغير لون الأجار، مما يؤدي إلى **نتائج إيجابية خاطئة**.

8-4-4 اختبار انثقاب الشعر في المختبر In vitro hair perforation test:

يسمح هذا الاختبار بتمييز Trichophyton interdigitale (الذي يحتوي على أعضاء ثاقبة نموذجية) عن الأنواع الأخرى من Trichophyton، مثل Trichophyton tonurans و Trichophyton rubrum، التي لا تحتوي على هذه الأعضاء.

هناك عدة طرق يمكن استخدامها لاختبار قدرة الفطور الجلدية على تثقيب الشعر. في مختبرنا، يتم استخدام الطريقة التالية:

- يتم زرع أجزاء صغيرة من المستعمرة المراد تحليلها على مسافة متساوية على أجار جرثومي في طبق بتري قطره 70 مم. بعد ذلك، نضع قطعًا قصيرة من شعر ما قبل البلوغ الأشقر المعقّم فوق قطعة الزرع، داخل الأجار، لأن هذا النوع من الشعر يسهل جعل الانثقاب الفطري مرئيًا. نقوم بحضن لوحة الأجار في درجة حرارة الغرفة (25 درجة مئوية - 30 درجة مئوية)، لمدة 7-40 يومًا، مع الملاحظات الأسبوعية للتحقق من وجود ثقوب في قطع الشعر. لهذا، يجب إزالة بعض قطع الشعر من وسط الزرع ووضعها على شريحة مع قطرة أو قطرتين من ملون قطن اللاكتوفينول الأزرق LCB وتغطيتها بساترة. يجب فحص قطع الشعر تحت المجهر الضوئي عن وجود للثقوب.

8-4-5 اختبارات الفيتامينات والتغذية Vitamin and nutrional tests:

تعتبر هذه الاختبارات ذات قيمة كبيرة في تحديد النمط الظاهري النهائي لأنواع Trichophyton، حيث إنها تتمتع بسمات شكلية ضخمة وسمات شكلية دقيقة يصعب تمييزها، وغالبًا ما تتطلب تحديد الاختلافات بالاستناد الى الاحتياجات الغذائية. على سبيل المثال، لا ينمو T. verrucosum على وسط يحتوي على الكازين casein فقط، مما يتطلب الثيامينن Thiamine أو الثيامين بالإضافة إلى الإينوزيتول thiamine plus inositol للنمو. على النقيض من ذلك، فإن T. schoenleinii ينمو بشكل غير واضح على الوسائط المدعمة أم غير مدعمة بالفيتامينات، بينما يحتاج T. equinum إلى النياسين niacin ويحتاج T. tonurans إلى الثيامين thiamine.

بناءً على الاختلافات الفسيولوجية بين أنواع الفطريات الجلدية، يجب زراعة جميع العزلات التي تنتمي إلى جنس Trichophyton والتي لا يمكن تحديدها من خلال السمات الشكلية الكبيرة أو السمات الشكلية الدقيقة على وسط زرع غني بالثيامين، الهيستيدين، النياسين و/ أو الإينوزيتول. تم تحديد هذه الوسائط بـ T1 و T2 و T3 و T4 و T5 و T6 و T7، اعتمادًا على مكوناتها.

للقيام بالزرع على الوسط، يتم تحضير معلق suspension فطري فيزيولوجي، مع تعكر يتوافق مع المعيار 2 على مقياس McFarland، ويتم تلقيحها على الأجار. يتم حضن الزرع على الأجار المائل agar slants في درجة حرارة الغرفة (25 درجة مئوية – 30 درجة مئوية) لمدة 15 يومًا تقريبًا ويتم تقييمها من خلال التقدير بالمشاهدة والمقارنة للكمية للنمو الفطري في كل أنبوب [مقياس (0) لعدم النمو وصولًا إلى (++) مشيرًا إلى أقصى قدر من النمو].

8-5 التعريف الجزيئي القائم على الحمض النووي DNA-based molecular identification:

زادت مجموعة أدوات التشخيص المطبقة لتحديد أنواع الفطريات الجلدية في العقود الأخيرة، خاصة بسبب استخدام الطرق الجزيئية، والتي تعتبر حاليًا المعيار الذهبي. على الرغم من أن هذه الأساليب دقيقة وسريعة للغاية، إلا أنها مكلفة أيضًا ويمكن أن تكون معقدة في روتين الفحص المخبري السريري.

يعتمد التحديد الجزيئي للفطريات الجلدية بشكل أساسي على تسلسل الحمض النووي. على الرغم من أن هذه التقنيات قد تطورت بشكل كبير، إلا أنه لا يزال هناك نقص في الإجماع على تفسير النتائج، نظرًا لأن تحديد النمط الظاهري للأنواع لا يؤدي دائمًا إلى كيانات تصنيف جزيئية متميزة، مما يعيق تعميم الأساليب الجزيئية بين مختبرات علم الفطور الطبية.

تنقسم الطرق الجزيئية الرئيسية بين تفاعل حافز البلمرة المتسلسل التقليدي conventional PCR وتفاعل حافز البلمرة المتسلسل الوقت الفعلي real-time PCR، كما تختلف أيضًا وفقًا لإجراءات استخراج الحمض النووي والبادئات وطريقة تحليل منتجات PCR. تتميز طريقة conventional PCR بميزة البساطة وانخفاض التكلفة، بينما يسمح real-time PCR بالكشف المتزامن عن طيف أوسع من الأنواع وله مخاطر تلوث أقل لأنه يتم إجراؤه في نظام مغلق.

استخدمت الدراسات الجزيئية الأولى لتحديد الفطريات وحدات فرعية صغيرة من الريباسة ribosome وعلامات كبيرة غير محددة، مما جعل التشخيص الدقيق للأنواع شبه مستحيل. للتغلب على هذه الصعوبات، سلسلة مناطق محددة من الحمض النووي الريباسي rDNA، مثل المنطقة D1-D2، بيتا توبيولين beta-tubulin،والبروتين الريباسي L10 شائعان بشكل متزايد ويحققان نتائج أكثر دقة (De Hoog et al.، 2017).

تقدم التطورات الحديثة في التقنيات الجزيئية طرقًا جديدة لتحديد الفطريات الجلدية، بما في ذلك الاختلافات ضمن النوع intraspecific variations. بسبب التصنيف الفرعي ضمن النوع والتمايز بين السلالات صار من الممكن تتبع العدوى، وتحديد المصادر الشائعة وتكرار العدوى بعد العلاج، وتحليل ضراوة السلالة ومقاومة الأدوية. يعد تحليل الحمض النووي للحبيبات الخيطية/المصورات الحيوية mitochondrial DNA وجينات الرَّنا الريباسِيّ غير المنسوخة، والحمض النووي المضخم العشوائي متعدد الأشكال random amplified polymorphic DNA (RAPD)، ومسمة الساتل الدقيق microsatellite markers من بين الطرق الجزيئية الرئيسية للتصنيف الفرعي والتمايز بين سلالات الفطور الجلدية (Mochizuki et al.، 2015).

بالإضافة إلى ذلك، فإن بعض التقنيات الجزيئية مفيدة لفهم العلاقات النشوء والتطور بين أصناف الفطريات الجلدية، من بينها restriction fragment length polymorphism (RFLP) of

mitochondrial (mt) DNA، RAPD، وتحليل تسلسل الجينات ذات الوظائف المحددة، مثل جينات الحمض النووي الريباسي (rDNA) والجينات التي تشفر مركب الكيتين genes encoding chitin) I synthase I)، DNA topoisomerase II، وبيتا توبيولين beta-tubulin. أدت هذه التقنيات إلى التصنيف الجديد للفطريات الجلدية، بما في ذلك إعادة بناء النشوء والتطور بناءً على تسلسل النيوكليوتيدات للمباعد الداخلي المنتسخ internal transcribed spacers (ITS). لقد ثبت أن هذه التصنيفات تدعم بشكل عام الخصائص السريرية والبيئية لهذه السلالات.

لذلك، أدى التقدم في الأساليب الجزيئية إلى تقنيات لتحديد أكثر دقة للفطريات الجلدية. ومع ذلك، يجب موازنة الفوائد التي تم الحصول عليها باستخدام هذه الأساليب الجزيئية في مختبرات علم الفطور مقابل الأهمية النسبية للحصول على نتائج سريعة وارتفاع سعر الكواشف والمعدات.

8-6 التحديد بناءً على تنميط البروتين (إزالة امتصاص الليزر بمساعدة المصفوفة / زمن التأين للرحلة) Identification based on protein profile (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) MALDI-TOF

إن مقياس matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight MALDI-TOF ذو الكتلة الطيفية يطبق بشكل متزايد. تم تكييفه في الأصل لتحديد الكائنات بدائية النواة prokaryotic ، لكن البروتوكولات الجديدة وسعت استخدامه لتحليل بعض الكائنات حقيقية النواة eukaryotic، من بينها الفطريات والخمائر الخيطية.

تحلل هذه الطريقة تنميط البروتين protein profile للكائنات الدقيقة وتقارن كل طيف كتلة mass spectrum تم الحصول عليه مع أطياف الكتلة المرجعية الموجودة في قواعد البيانات من خلال البحث عن تطابق الأنماط، بما في ذلك القمم والشدة، عن طريق التحليل الإحصائي متعدد المتغيرات multivariate statistical analysis (Calderaro et al.، 2014 ؛ L'Ollivier and Ranque، 2017).

يتم إجراء القياسات الطيفية ضمن تباين شامل يتراوح بين 3000-8000 دالتون ويتم تسجيلها في الأسلوب المستقيم الإيجابي positive linear mode. يتم استخدام الأطياف الأولية ومكونات

الارتباطات المتقاطعة والارتباطات الذاتية لجميع المتوسطات البينية، من حيث الوسائل الهندسية، كمؤشرات للمسافة بين الأطياف. بشكل عام، يتم قبول مؤشر تحديد identification index ≤2.0 كتحديد موثوق به على مستوى الأنواع، بينما القيم ≤1.7 و <2.0 مناسبة لمستوى الجنس. تعتبر النتائج <1.7 غير موثوقة.

على الرغم من أن مقياس الطيف الكتلي MALDI-TOF أصبح أداة قوية بشكل متزايد في علم الأحياء الدقيقة السريرية، مما يسمح بالتعرف السريع على البكتيريا والخمائر، إلا أن استخدامه لتحديد الفطريات الجلدية لا يزال في بدايته بسبب عدم وجود تعريف واضح للأنواع داخل بعض الأصناف ونقص خصائص البروتين لهذه الفطريات المودعة في بنوك البيانات المرجعية.

لذلك، من الواضح أن الخوارزمية المستخدمة للتمييز بين أنواع الفطريات الجلدية ذات الصلة الوثيقة تحتاج إلى الجمع بين طرق النمط الظاهري وطرق النمط الجيني combine phenotypic and genotypic methods.

8-7 الأنواع الرئيسية من الفطريات الجلدية:

تميز تطور المعرفة بالفطريات الجلدية بعدد كبير من التنوعات التصنيفية للفطريات الجلدية، ولكن تم وصف ما يقرب من 10 أنواع باعتبارها العوامل المسببة للأمراض الأكثر انتشارا من الفطريات الجلدية. من المسلم به أن الدراسات التصنيفية في الماضي، والتي تستند فقط إلى السمات المظهرية، قد أدت إلى الإفراط في تصنيف الأنواع الفطرية. في الوقت الحالي، وبدعم من البيولوجيا الجزيئية، يتم عكس ذلك، ويتم ضم العديد من الأنواع معًا، مما يقلل من عدد الأنواع التي تعتبر مسببة للأمراض للإنسان.

أدناه، نصف الخصائص المظهرية الرئيسية للأنواع المعزولة في أغلب الأحيان من العينات السريرية البشرية.

8-7-1 جنس الفطور البويغية Microsporum:

العديد من أنواع Microsporum متورطة في العدوى البشرية والحيوانية، اعتمادًا على الجغرافيا وخصائص المضيف. تعد M. audouinii و M. ferrugineum و M. nanum و M. canis و M. gypseum هي الأنواع المعزولة أكثر من غيرها most isolated species، و M. canis و

M. audouinii و M. ferrigineum و M. gypseum (Figure 8.1A) الأنواع الأكثر تسبّبًا للعدوى البشرية.

Microsporum canis 1-1-7-8:

هو فطر جلدي حيواني ينتقل إلى الإنسان عن طريق العديد من الحيوانات الأليفة، مع وجود القطط الصغيرة كمستودع رئيسي له. من الناحية السريرية، فهو مسؤول عن آفات فروة الرأس التي تتألق تحت مصباح وود Wood's lamp، والتي تتميز ببقع ثعلبة كبيرة، خاصة عند الأطفال. ومع ذلك، يمكن أن يسبب داء البشرويّات epidermophytosis، ونادرًا ما يسبب فطار الأظافر.

ينمو بشكل معتدل السرعة في وسط سابورو Sabouraud، وينتج مستعمرات نامية خلال 6-10 أيام. سطح المستعمرة أبيض إلى كريمي وله نسيج قطني مع أخاديد نصف قطرية منفصلة وارتفاع مركزي. ظهْر المستعمرة أخضر مصفر، ويمكن أن تنتشر هذه الصبغة قليلاً في الوسط مع مرور الوقت، مما يعطيها لونًا بنيًا. غالبًا ما يحدث تعدد الأشكال بسرعة، حيث تصبح المستعمرات أكثر سمكًا

تكشف المراقبة المجهرية المباشرة للمستعمرة عن عدد كبير من الغبيرات الكبيرة macroconidia على شكل مغزل مع جدران ذو فواصل سميكة، تتراوح من 5 إلى 7 فواصل، على الرغم من أن هذا يمكن أن يصل في بعض الأحيان إلى 15 (Figure 8.1B). macroconidia، عند وجودها، لاطئة/لا ساق أو عنق وتختلف في العدد، لكن ليس لها قيمة تشخيصية. يمكن أيضًا ملاحظة الغبيرات المتدثرة Chlamydoconidia والأعضاء العقيدية nodular organs وخيطان المشطية pectinate hyphae في بعض الأحيان.

غالبًا ما يُشتبه في جنس Microsporum عند مراقبة مستعمرات الفطر الجلدي الإيحائية suggestive حيث توجد فقط خيطان معقمة sterile hyphae. في هذه الحالة، يجب نقل الفطر المعني على الفور إلى أجار الأرز ومراقبته لظهور إيناعات fructification، والتي تستغرق عمومًا من 6 إلى 10 أيام.

Microsporum ferrugineum 2-1-7-8:

إنه نوع محب للبشر مستوطن في آسيا (خاصة الصين واليابان) وروسيا وأوروبا الشرقية وأفريقيا. سريريا، يشارك بشكل رئيسي في آفات فروة الرأس عند الأطفال.

يكشف الفحص المباشر عن عدوى ectothrix، مماثلة للإصابة ب M. canis. ينمو ببطء على أجار سابورو، وينتج نوعين من المستعمرات: أحدهما يتميز بمظهر خشن ومخدد بشكل مميز وارتفاع في الوسط، بلون برتقالي إلى لون صدأ، والذي يتلاشى بسرعة عندما يُحافظ عليه في المختبر. نوع المستعمرة الآخر مسطح وأبيض، مع نسيج جلدي.

إن الشكل المجهري للأنواع فقير ولا ينتج عادة غبيرات كبيرة أو دقيقة macroconidia أو microconidia في وسط الزرع الروتيني. يمكن أن تشكل خيوط الخيزران كميزة خاصة.

8-7-2 جنس الشعروية Trichophyton:

هذا هو الجنس الأكثر عزلًا من العينات السريرية. يمكن أن يؤثر على الجلد الخالي من الشعر وفروة الرأس والأظافر. يُنسب إلى العديد من الأنواع أنها من مسببات الأمراض البشرية والحيوانية، مثل: T. rubrum، T. tonurans، T. mentagrophytes، T. verrucosum، T. shoenleinii، *T. concentricum*, *T. equinum, T. violaceum,* etc. مع قابلية حدوث أثر متغير والاعتماد على الظروف الجغرافية، هذه الفطريات الجلدية مسؤولة عن جميع حالات العدوى تقريبًا، مع انتشار أكبر أو أقل لنوع أو آخر في منطقة معينة.

ملامح مستعمرات Trichophyton spp. تختلف باختلاف الأنواع، ولكن بشكل عام، يكشف الفحص المجهري عن عدد كبير من الغبيرات الدقيقة microconidia الكمثرية الشكل pyriform أو بيضاوية أو مستديرة، مرتبة في زوايا قائمة مع الخيطان، أو عناقيد، أو تشكّل بنيات أخرى. إن الغبيرات الكبيرة macroconidia، عند وجودها، لها شكل دبوسي ممدود claviform مع عدد كبير من الحواجز. تكون الإيناعات البنيوية هذه أحيانًا أو دائمًا غائبة في بعض الأنواع، مثل.T. schöenleinii

تتنوع إيناعات الزخرفة ornamentation structures بشكل كبير، مع وجود خيطان مشطية، خيطان لولبية أو محلاقة، خيطان على شكل مضرب، ثريات قراعية، وما إلى ذلك. إن الجمع بين هذه البنيات الكبيرة والصغيرة الشكل لا يكفي دائمًا لتحديد هذه المجموعة من الفطريات الجلدية، وهو الوضع الذي يشكل عقبة أمام غالبية أولئك الذين يدرسون علم الفطريات. لذلك، من الشائع مواجهة سلالات يتطلب تحديدها اختبارات تكميلية، مثل انثقاب الشعر، واليورياز urease، والاختبارات الغذائية. هذه الاختبارات موصوفة في قسم التشخيص المخبري.

بالنظر إلى العدد الكبير من الأنواع، فإننا هنا نصف فقط الأنواع المعزولة الأكثر شيوعًا (T. rubrum, T. tonsurans, T. mentagrophytes, and T. verrucosum) ونوعين آخرين يسببان إظهار سمات سريرية خاصّة للغاية (T. rubrum و T. T. shöenleinii).

8-7-2-1 الشعرويّة الحمراء Trichophyton rubrum:

إنه نوع عالمي ولوعٌ بالبشر **وهو السبب الرئيسي للإصابة بالفطريات الجلدية البشرية**، وفقًا للأدبيات الدولية. ينتقل بشكل حصري بين الناس أو عن طريق أدوات ملوثة. من الناحية السريرية، يرتبط تقريبًا بجميع أنواع العدوى الجلدية التي تصيب الإنسان. يرتبط هذا بحقيقة أنه غالبًا ما يكون مقاومًا للعلاج الموصوف بشكل شائع، نظرًا لتكيفه القوي مع المضيف البشري وسهولة أكبر في التغلب على الدفاعات الفطرية/الخلقية innate للمضيف والبقاء في عدوى ناتج متبقٍّ residual infection، مع تكرار سريري عرضي.

وتيرة نمو هذا النوع متوسطة، حيث تستغرق من 12 إلى 16 يومًا لتنمو في أجار سابورو.

تحتوي المستعمرات على نسيج قطني أو مخملي، مع أخاديد نصف قطرية، تشكل نتوءات صغيرة في المركز، وهو ذو قوام وشكل يتسبب في ارتباكات متكررة مع T. tonurans. تكون المستعمرات بيضاء بشكل عام، ولكنها تتحول إلى اللون الأحمر بمرور الوقت، وهو لون موجود أيضًا على الحواف. يتحول ظهر المستعمرة أيضًا إلى اللون الأحمر بمرور الوقت، أو درجات مختلفة من اللون البني في بعض السلالات. يمكن أن ينتشر هذا الصباغ بشكل عام في الوسط. يصعب تمييز هذا الصباغ في بعض السلالات. وبالتالي، يجب نقل المستعمرة المشتبه بها إلى أجار دقيق الذرة مع ديكستروز من أجل مراقبة اللون بشكل أفضل.

يكشف الفحص المجهري البصري عن عدد كبير من الغبيرات الدقيقة الكمثرية الشكل، والتي غالبًا ما يتم ترتيبها بزاوية قائمة مع الخيوط الفطرية (Figure 8.1C). الغبيرات الكبيرة، عند وجودها، طويلة مع شكل الترقوة الأسطواني تقريبًا، مع 2 إلى 9 فواصل (Figure 8.1D). إن وجود هذه الغبيرات الكبيرة ليس تشخيصًا نهائيًا للأنواع.

في معظم المختبرات الروتينية، يتم فحص عدد قليل من البنيات للتشخيص النهائي من قبل أخصائيي الفطور ذوي الخبرة. ومع ذلك، في بعض الأحيان يكون التحديد على أساس السمات المظهرية أمرًا صعبًا، حتى بالنسبة للمهنيين ذوي الخبرة، مما يتطلب اختبارات تكميلية لتحديد دقيق.

يمكن أن يعتمد التشخيص التفريقي على قدرة T. rubrum على إنتاج صبغة على أجار دقيق الذرة مكملًا بنسبة 1 ٪ ديكستروز، وغياب أعضاء الانثقاب، وتنوع مستويات اليورياز. علاوة على ذلك، يحدث النمو على وسط Trichophyton أجار المغذى بترتيب الشدة التالي: T1 و T2 و T3 و T4 و T5 (++) و T6 (+/−) و T7. هذه البيانات وتلك المتعلقة بأنواع الفطريات الجلدية الأخرى موصوفة في الجدول. Table 8.1.

8-7-2-2 الشَّعْرَوِيَّةُ الجَازَّة Trichophyton tonsurans:

هو فطر ولوع بالبشر بامتياز، على الرغم من الإبلاغ عن حالات قليلة في الخيول والكلاب، مع انتشار مرتفع في شمال إفريقيا وأمريكا الجنوبية. من الناحية السريرية، فهو مسؤول عن آفات فروة الرأس مع تساقط الشعر، ولكنه قد يتسبب أيضًا في حدوث آفات للجلد اللامع/الأجرد وداء الفطريات في الأظافر.

هذا النوع لديه وتيرة نمو متوسطة، حيث تصل إلى مرحلة النضج بعد 12 إلى 16 يومًا من النمو. عندما تنموا المستعمرات بشكل جيد في أجار سابورو Sabouraud، يكون لها مظهر متغير للغاية. يمكن أن يتراوح الملمس من القطن إلى المخملي، وربما يصبح قشريًا مع تقدم العمر. يمكن أن تكون التضاريس أو البروز قميًا/سفيئي، أو أقنوي الشكل كالفوهة البركانية، أو حتى شكلًا دماغيًا، مع بعض الأخاديد الشعاعية. لون المقدمة متغير للغاية، مع الميل إلى اللون الأبيض أو درجات مختلفة من البيج، في حين أن ظهر المستعمرة الخلفي له ظلال مختلفة من البني المائل الى الحمار، والتي يمكن أن تنتشر في أجار سابورو Sabouraud، ولكن ليس في أجار البطاط. غالبًا ما تخلط خاصية انتشار الصباغ في التحديد العيني (بالعين المجردة) لهذا النوع مع T. rubrum.

يكشف الفحص المجهري البصري عن عدة غبيرات دقيقة مرتبة في زاوية مستقيمة مع الخيوط الفطرية. هذه الغبيرات الدقيقة لها جانب قاسٍ، حيث ليس لها تجانس في الأبعاد والشكل، وتقدم نفسها على أنها بنيات صغيرة أو كبيرة دبوسية الشكل claviform، أو متوسعة وعلى شكل بالون(Figure 8.1 E

through G). يمكن أيضًا ملاحظة الغبيرة المتدثرة المقحمة intercalary chlamydoconidia، والخيوط الفطرية على شكل مضرب، والغبيرات المفصلية في المستعمرات القديمة. إن الغبيرات الضخمة، عند وجودها، تتراصف بشكل غير منتظم ولا تساهم إلا بشكل ضئيل أو لا تساهم بتاتًا في تحديد الأنواع النهائية.

ومن المفارقات أن T. tonsurans عُثر عليه يتطفل على شعر الإنسان في الجسم الحي، لكنه لا يثقب الشعر في المختبر *in vitro* but can't perforate hair *in vivo* paraziting human hair. الجوانب الفسيولوجية الأخرى لـ T. tonsurans هي قلة إنتاج اليورياز أو نقصه، من خلال ما تبين بتبيانه احتضان أنابيب اختبار اليورياز لمدة تصل إلى 30 يومًا ؛ قلة النمو على أجار دقيق الذرة. ونمو ضئيل أو معدوم على T1 و T2 و T3 و T4 و T6 (+/−)، ولكن نمو جيد على T5 (+) Table 8.1

3-2-7-8 Trichophyton interdigitale:

حتى وقت قريب، اعتبر غالبية المؤلفين أن T. mentagrophytes تتألف من نوعين إلى أربعة أنواع، مع الإجماع على وجود T. mentagrophytes var. mentagrophytes و T. mentagrophytes var. interdigitale. في الأساس، ميزتان مرتبطتان بالبيئة ساعدتا على تمييزهما: T. mentagrophytes var. mentagrophytes على أنها من الأنواع المحبة للحيوان في الغالب، بينما T. mentagrophytes var. interdigitale. من الأنواع المحبة والولوعة بالبشر بامتياز.

تم اقتراح بعض التغييرات التصنيفية الهامة مؤخرًا لهذا النوع، ولم يعد T. interdigitale يعتبر صنفًا. بدلاً من ذلك، تم رفعه إلى مستوى الأنواع المحبة للبشر بشكل خاص، بينما السلالات الحيوانية، التي كانت تسمى سابقًا T. mentagrophytes var. mentagrophytes. تشكل الآن النوع الشَّعْرَوِيَّةُ الذُّقانِيَّة T. mentagrophytes.

إلى جانب هذا الاختلاف البيولوجي، يمكن أن يظهر هذان النوعان اختلافات في النمط الظاهري، وإن لم تكن واضحة دائمًا، والتي يمكن أن تساعد في التمييز بينهما. في هذا السياق، عندما تزرع T. mentagrophytes في أغار سابورو Sabouraud، تظهر المستعمرة قوامًا مقشورًا أو مسحوقي، بدون

ارتفاعات ملحوظة، وتشكل أحيانًا حلقات متحدة المركز، بلون يتغير من الأصفر الفاتح إلى البني المحمر. يحتوي الجزء الخلفي من المستعمرة بشكل عام على صبغة بنية، والتي يمكن أن تميل إلى لون النبيذ. في المقابل، عندما يُزرع T. interdigitale على أجار سابورو Sabouraud، فإنه يشكل عمومًا مستعمرات ذات ملمس مخملي أو قطني ولون أصفر فاتح، والجزء الخلفي أو ظهر المستعمرة به تصبغ بني فاتح أو أحمر.

سريريًا، يعتبر T. interdigitale السبب **الرئيسي الثاني أو الثالث للإصابة بالفطريات الجلدية البشرية**، مما يتسبب في داء البشرة، وفطار الأظافر، وآفات فروة الرأس، والآفات الأخمصية بين الأصابع. تظهر هذه الآفات، عندما تسببها الشَّعْرَوِيَّةُ الذُّقانِيَّة T. mentagrophytes، في كثير من الأحيان استجابة التهابية شديدة. لا تتألق آفات فروة الرأس تحت مصباح وود Wood's lamp.

تنمو فطور الشَّعْرَوِيَّةُ الذُّقانِيَّة T. mentagrophytes بسرعة، في غضون 6–11 يومًا بعد الزرع الأولي. بالمجهر، تمتلك المستعمرات وفرة من الإيناعات. يمكن ملاحظة عدد كبير من الغبيرات الدقيقة المستديرة مشكلة عناقيد(Figure 8.1H). تكون الغبيرات الضخمة، عند وجودها، عادةً على شكل سيجار، مع واحد إلى ستة مفاصل septa عرضية مرتبطة بفاصل خيوط فطرية شفافة septate hyaline hyphae. من الشائع أيضًا ملاحظة عدد كبير من بنيات الزخرفة ornamentation structures، مثل خيوط فطرية حلزونية، وأعضاء عقيدية(Figure 8.1I)، وخيطان على شكل مضرب، وغبيرة متدثرة مقحمة intercalary chlamydoconidia .

تعد القدرة الفسيولوجية لل T. mentagrophytes ملحوظة، بما في ذلك إنتاج اليورياز المكثف، والذي يتم ملاحظته خلال 3 أيام من النمو على أجار اليوريا، بينما تختلف نتائج اختبار انثقاب الشعر في المختبر في غضون 40 يومًا. لم يتم ملاحظة أي صبغة عند نموها على أجار دقيق الذرة، وتنمو بشكل سيئ على T7 (+)، ولكن بشكل جيد جدًا في T1 و T2 و T3 و T4 و T5 و T6 (+ + + +) Table 8.1

Trichophyton verrucosum 4–2–7–8:

هو نوع من الفطريات العالمية التي تؤثر بشكل رئيسي على الماشية، على الرغم من أنها يمكن أن تصيب البشر بشكل متقطع. التشخيص السريري صعب بشكل خاص، أو حتى مستحيل، بسبب عدم

وجود بيانات وبائية. يتميز سريريًا بأنه يتسبب في حدوث آفات شديدة الالتهاب في فروة الرأس والجلد اللامع/الأجرد glabrous skin واللحية والشارب. يكشف الفحص المجهري لعينات فروة الرأس عن وجود تطفل فطوري على ساق الشعرة ذو أبواغ كبرية megaspore endothrix parasitism، دون توهج تحت مصباح وود. ينمو ببطء شديد، ويستغرق ما بين 13 إلى 25 يومًا حتى ينمو على أجار سابورو.

ظاهريًّ بالعين المجردة، تحتوي المستعمرة على نسيج يختلف من مجعد إلى مخملي، مع سطح مجعد أو دماغي الشكل. يتنوع تصبغ الجزء العلوي من البيضاء إلى الصفراء المغرة ocher yellow، والتي نشأت منها تسميتها القديمة T. ochraceum. والجزء الخلفي للمستعمرة أصفر، بدون انتشار الصباغ في الوسط. تحت المجهر الضوئي، غالبًا ما تكون المستعمرات المزروعة في أجار سابورو Sabouraud ضعيفة النمو، بدون غبيرات دقيقة macroconidia أو غبيرات ضخمة microconidia. الميزة الأكثر جدارة بالملاحظة لهذا النوع هي وجود سلاسل طويلة من المتدثرة الغبيرية chlamydoconicia.

من الناحية الفسيولوجية، لا ينتج هذا النوع اليورياز، ولا يمكنه أن يثقب الشعر في المختبر أو ينتج صبغة عندما ينمو على أجار دقيق الذرة. تتطلب غالبية السلالات الثيامين لتنمو، وبعضها يحتاج إلى الإينوزيتول. كثافة النمو على وسائط زراع Trichophyton هي كما يلي: لا يوجد نمو في T1 و T5 و T6 و T7 ؛ قليل (+/−) أو لا يوجد نمو على T2 ؛ نمو طفيف على T3 (+) ؛ ونمو ممتاز على T4 (++). Table 8.1

Trichophyton violaceum 5-2-7-8:

هو نوع محب للبشر يشارك في الأوبئة في المدارس ودور الأيتام. يتم توزيعها بشكل أساسي في الشرق الأوسط وأوروبا وأفريقيا والمكسيك. يسبب آفات فروة الرأس والجلد والأظافر.

ينمو هذا النوع ببطء على أجار سابورو، مكونًا مستعمرات ذات لون بنفسجي ونسيج لامع مع أخاديد نصف قطرية. والجزء الخلفي أيضًا بنفسجي، بدون انتشار الصباغ. بعد عدة عمليات نقل، تفقد المستعمرة لونها البنفسجي وتكتسب أفطورة بيضاء ملساء downy white mycelium.

ينتج خيوط فطرية عريضة ومتعرجة، ولا يقدم بشكل عام أي غبيرات دقيقة أو غبيرات ضخمة. في المستعمرات المزروعة على وسط غني بالثيامين، يمكن أحيانًا ملاحظة غبيرات دقيقة كمثرية الشكل pyriform وغبيرات ضخمة. Table 8.1

8-8 اعتبارات نهائية:

في الختام، بالنظر إلى ميزات الفطريات الجلدية، فإن القيام بدراسات متعددة الأطوار للحصول على المعلومات الجزيئية والبيئية والظاهرية ودورة الحياة ضرورية لتحديد أنواع هذه الفطريات بأمان، وحتى ذلك الحين، سيكون تحديد هويتها أمرًا صعبًا.

Additional information of used materials:

1- **Lactophenol cotton blue (LCB)** is a mixture of methyl blue, a histological stain, and lactophenol (a solution of phenol, lactic acid, and glycerol in water

2- **Lactrimel agar** It's a special culture medium with ingredients:

Skimmed milk powder (use only Dutch Jug skimmed milk powder) 7 g

Honey 10 g

Cornmeal agar (Oxoid CM0103) 17 g

Chloramphenicol 0.05 g

Distilled water 1000 ml

3- **Rice Agar** Formula* Per Liter Purified Water

White Rice, Extract from (solids) 15g

5.0 g Polysorbate 80

10.0 ml Agar 20.0 g

pH 6.6 +/- 0.2

4- Sabouraud agar Typical composition is commercially available and typically contains:

40 g/L dextrose.

10 g/L peptone (gives N & CHO source)

20 g/L agar.

5- Potato Agar Typical composition ;

4 g (from 200 g infused potato), potatoes (sliced washed unpeeled)

20 g, dextrose

20 g, agar powder

5.6±0.2 is the final pH

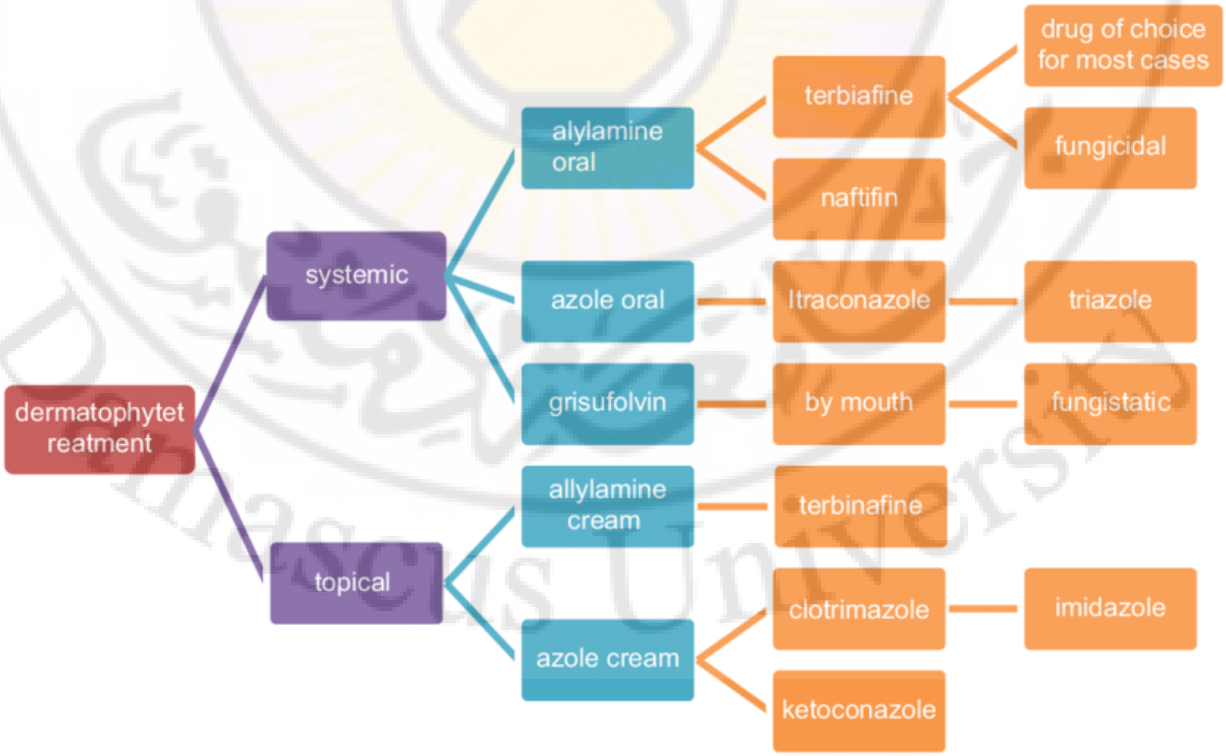
6- Christensen's urea agar Urea Agar is a lightly buffered medium containing urea and phenol red, a pH indicator. When organisms utilize urea, ammonia is formed which turns the medium alkaline. The indicator, phenol red, changes the medium color from pale-yellow to pink-red in an alkaline environment.

Damascus University

Table 8.1 Nutritional Tests to Distinguish the Most Commonly Isolated Dermatophyte Species from Humans and Animals

Species	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	Urease	Hair Perforation
• *Epidermophyton floccosum*	+	+	+	+	+	+	+	F	–
• *Microsporum amazonicum*	+	+	+	+	+	+	+	+	–
• *Microsporum audouini*	+	+	+	+	+	+	+	V	–
• *Microsporum canis*	++	++	++	++	++	++	++	+R	+
• *Microsporum gypseum*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• *Microsporum nanum*	+	+	+	+	++	+	+	+	+
• *Microsporum persicolor*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• *Trichophyton concentricum*	0	+	++	+	+	0	F	–	–
• *Trichophyton*									
• *mentagrophytes*	++	++	++	++	++	++	++	+	V
• *Trichophyton rubrum*	++	++	++	++	++	+/–	++	V	–
• *Trichophyton schoenleinii*	+	+	+	++	+	+	+	V	–
• *Trichophyton terrestre*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• *Trichophyton tonsurans*	+/–	+/–	+/–	+/–	+	+/–	–F	V	–
• *Trichophyton verrucosum*	0	F	++	+	0	0	0	–	–
• *Trichophyton violaceum*	+/–	+	+	+	+	+	+	V	–

Table showing treatment options of Dermatophytes



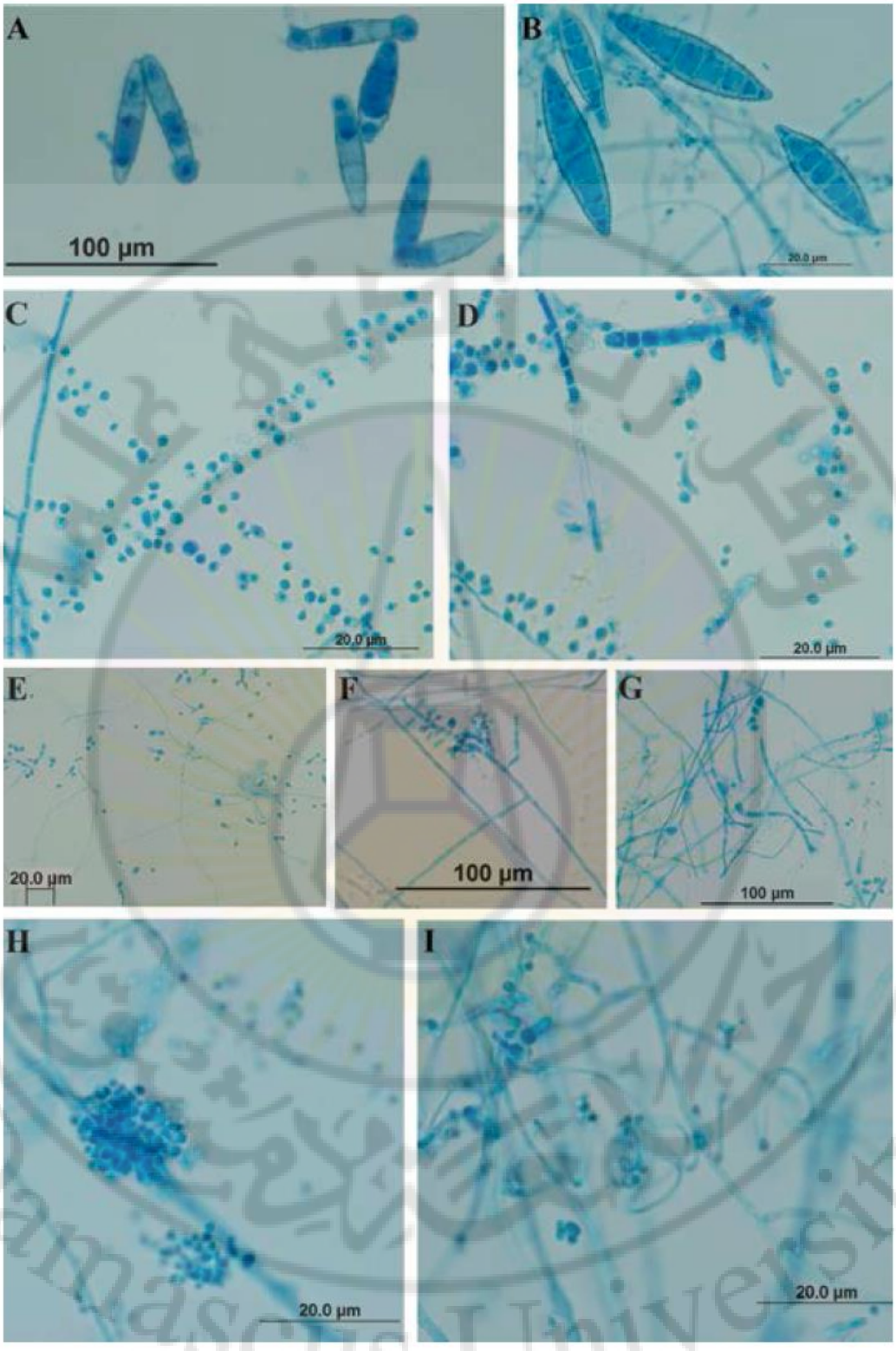


Figure 8.1 Micromorphological aspects of dermatophytes species commonly found in clinical laboratory. (A) *M. gypseum*; spiny macroconidia with thin walls and rounded ends; (B) *M. canis*; spiny macroconidia with rough thick walls and knob ends; (C) *T. rubrum*; regular pyriform microconidia arranged in acladium formation; (D) *T. rubrum*; cylindrical clavate shape macroconidia; (E–G) *T. tonsurans*; microconidia with heterogeneous aspect (small or large claviform and balloon-shaped cells); (H) *T. mentagrophytes*; round microconidia arranged in bunches; (I) *T. mentagrophytes*; spiral hyphae (ornamentation structure).

9-1 مقدمة:

يشير مرض "داء الرشاشيات" إلى الحساسية، وغزو الجهاز التنفسي، والعدوى الجلدية، أو الانتشار خارج الرئة extrapulmonary dissemination الذي تسببه أنواع الرشاشيات، وبشكل رئيسي الرشاشية الدخناء (A. fumigatus)، و الرشاشية الصفراء (A. flavus)، و الرشاشية السوداء (A. niger)، و الرشاشية الأرضية (A. terreus).

تعتبر أنواع الرشاشيات عالمية cosmopolitan (غير محلية)، كما أن استنشاق الأبواغ شائع.

ومع ذلك، فإن غزو الأنسجة ليس متكررًا، ولكنه قد يحدث في حالة المضيفين الذين يعانون من كبت المناعة بسبب علاج الأورام الخبيثة الدموية، أو تلقي الخلايا المكونة للدم receipt of hematopoietic cells، أو زرع الأعضاء الصلبة.

تعتبر الفطريات الخيطية الرشاشية شائعة جدًا في جميع البيئات، لذلك من المستحيل تجنب التنفس تمامًا لبعض الغُبيرات conidia.

عند الأشخاص الذين يتمتعون بجهاز مناعي سليم، لا يؤدي هذا إلى الإصابة بالعدوى. ومع ذلك، عند الأشخاص الذين يعانون من ضعف في جهاز المناعة، يمكن أن يتسبب استنشاق أبواغ الرشاشيات في حدوث عدوى في الرئة أو الجيوب الأنفية، والتي يمكن أن تنتشر إلى أجزاء أخرى من الجسم.

يوجد ما يقارب 180 نوعًا من الرشاشيات، ولكن أقل من 40 نوعًا منها معروف بأنها تسبب العدوى للإنسان.

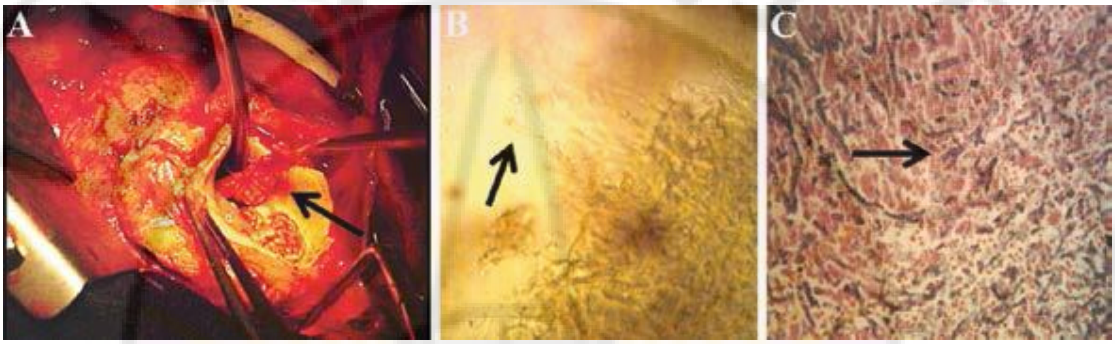
في الواقع لا مفر من عفن الرشاشيات. في الهواء الطلق (في الخارج)، يوجد في الأوراق المتحللة والنباتات والأشجار ومحاصيل الحبوب.

في الداخل، تنمو الغُبيرات في مكيفات الهواء وقنوات (مجرى) التدفئة وبعض الأطعمة. نادرًا ما يمثل التعرض اليومي للرشاشيات مشكلة للأشخاص الذين لديهم جهاز مناعي سليم لأن الخلايا الدفاعية تحيط بالأبواغ وتدمرها.

لكن ضعف الجهاز المناعي يسمح للرشاشيات بالسيطرة، وغزو الرئتين، وفي الحالات الأكثر خطورة أجزاء أخرى من الجسم. لحسن الحظ، داء الرشاشيات ليس معديًا من شخص لآخر.

تنتج عدوى الرشاشيات مستعمرة (استعمار colonization) أو حساسية أو مرضًا غازيًا. تتباين مظاهره بشكل كبير ويجب أخذها في الاعتبار بناءً على التاريخ السريري.

هنا نقوم بمراجعة تشخيص داء الرشاشيات الغازي وكذلك تشخيص المتلازمات الأخرى التي تسببها عزلات الرشاشيات السريرية، إلى جانب عوامل الخطر والمظاهر السريرية وآليات المقاومة الحالية.



الشكل 9.1 داء الرشاشيات الغازية عند مريض استبدال الصمام الأبهري.

(أ) الرشاشيات الفطرية نابتة في الشريان الأبهري (السهم).

(ب) خيوط شفافة (زجاجية) ومحوجزة مع تشعب حاد الزاوية (السهم).

(ج) القسم النسيجي يظهر خيوط محوجزة مع الانقسام الثنائي بواسطة ملون Grocott–Gomori methenamine silver.

9-2 أنواع وأعراض داء الرشاشيات:

9-2-1 داء الرشاشيات الغازية Invasive aspergillosis:

هذه عدوى فطرية خطيرة تحدث عادةً لدى الأشخاص الذين يعانون بالفعل من حالات طبية أخرى، مثل المرضى الذين يعانون من ضعف في جهاز المناعة بسبب العلاج الكيميائي أو زرع الأعضاء أو زرع الخلايا الجذعية.

يؤثر داء الرشاشيات الغازي بشكل شائع على الرئتين، ولكنه قد ينتشر أيضًا إلى أجزاء أخرى من الجسم. يمكن أن تشمل أعراض داء الرشاشيات الغازية في الرئتين الحمى والقشعريرة وآلام الصدر والمفاصل

والسعال ونفث الدم hemoptysis وضيق التنفس والصداع أو أعراض العين ونزيف الأنف وتورم الوجه على جانب واحد والآفات الجلدية.

تحدث أخطر المضاعفات عندما تنتشر العدوى بسرعة من الرئتين إلى الدماغ أو القلب (الشكل 9.1) أو الكلى. عادة ما يكون هذا الشكل من مرض الرشاشيات مميتًا إذا لم يتم علاجه.

9-2-2 ورم الرشاشيات Aspergilloma:

نمو ألياف فطرية متشابكة تسمى أيضًا "كرة فطريات fungus ball " يمكن أن يتطور في التجاويف، خاصة عند المرضى الذين يعانون من أمراض الرئة الموجودة مسبقًا، مثل النُفاخ (انتفاخ الرئة) emphysema أو السل أو الساركويد المتقدم.

كما يوحي الاسم، هي كرة تتكون من خيوط الرشاشيات، والفيبرين، والمخاط (مادة مخاطية)، والحطام الخلوي الموجودة داخل تجويف رئوي والذي ينمو في الرئتين كجزء من داء الرشاشيات الرئوي المزمن أو في الجيوب الأنفية، ولكنها عادة لا تنتشر إلى أجزاء أخرى من الجسم. في الواقع، يتطور ورم الرشاشيات عمومًا في التجاويف الرئوية الموجودة مسبقًا.

عادة ما يكون الورم الرشاشى حالة حميدة عندما يكون موجودًا منفرداً. يمكن أن يظل مستقرًا على مدى أشهر، وقد لا ينتج عنه أعراض أو ينتج عنه سعال خفيف فقط. ولكن بمرور الوقت يمكن أن تتفاقم الحالة الأساسية وربما تتسبب في نفث الدم hemoptysis والصفير وضيق التنفس وفقدان وزن غير مقصود (متعمّد). بالإضافة إلى ذلك يمكن أن يسبب ورم الرشاشيات نزيفًا حادًا، ومميتًا في بعض الأحيان، في الرئتين. ومع ذلك لا ينتج الورم الرشاشى العديد من الشذوذات المختبرية التي تتيح الكشف السهل.

9-2-3 داء الرشاشيات الرئوي المُلَيِّف المزمن Chronic fibrosing pulmonary aspergillosis:

هذه حالة طويلة الأمد (3 أشهر أو أكثر) يمكن أن تسبب الرشاشيات فيها تجاويف في الرئتين والعقيدات nodules. قد توجد أيضًا واحدة أو أكثر من الكرات الفطرية (الورم الرشاشيات) في الرئتين.

داء الرشاشيات الرئوي تحت الحاد الغازي (المعروف سابقًا باسم داء الرشاشيات الناخر المزمن) موجود في الطيف بين الأشكال المزمنة والحادة من داء الرشاشيات الرئوي. مدة المرض التي تزيد عن 3 أشهر تميز داء الرشاشيات الرئوي المزمن عن داء الرشاشيات الرئوي الحاد وتحت الحاد. تشمل أعراض داء الرشاشيات الرئوي المزمن فقدان الوزن والسعال ونفث الدم وضيق التنفس والإرهاق.

9-2-4 داء الرشاشيات التحسسي Allergic aspergillosis:

داء الرشاشيات القصبي الرئوي التحسسي (ABPA) يتميز من الناحية المرضية بانحشار الغشاء المخاطي (المخاط من ال) للقصبات mucoid impaction of the bronchi والاعتلال الرئوي اليوزيني eosinophilic pneumonia ، bronchocentric granulomatosis، بالإضافة إلى السمات النسيجية histologic للربو. توجد أحيانًا مناطق ذات اعتلال الرئة اليوزيني، على الرغم من أن هذه ليست سمة رئيسية للمرض. يمكن رؤية خيوط محوجزة ثنائية التفرع الحاد في تجويف الشعب الهوائية المليء بالمخاط، لكن الفطريات لا تغزو الغشاء المخاطي.

تُزرع الرشاشيات من البلغم عند ما يصل إلى ثلثي المرضى الذين يعانون من ABPA، ولكن قد لا يتم رؤية الخيوط عن طريق الفحص المجهري المباشر. في هذه الحالات تسبب الرشاشيات التهابًا في الرئتين وأعراض حساسية مثل ضيق التنفس والسعال والصفير، ولكنها لا تسبب العدوى. المعدلات المبلغ عنها أعلى عند المرضى الذين تم فحصهم في عيادات الربو وأولئك الذين يدخلون المستشفى بسبب تفاقم حالة الربو.

مشكلة الحساسية الأخرى التي تسببها الرشاشيات هي التهاب الجيوب الأنفية، مما يسبب أعراض التهاب الجيوب الأنفية مثل انسداد الأنف، والنَزح drainage الذي قد يكون دمويًا (مدمّى)، وآلام الوجه، والصداع، وانخفاض القدرة على الشم. لكنها لا تسبب العدوى.

9-2-5 داء الرشاشيات الجلدي Cutaneous aspergillosis:

تدخل الرشاشيات إلى الجسم من خلال شق في الجلد (على سبيل المثال، بعد الجراحة أو جرح الحرق) ويسبب العدوى، عادة في الأشخاص الذين يعانون من ضعف في جهاز المناعة. يمكن أن يحدث داء

الرشاشيات الجلدي أيضًا إذا انتشر داء الرشاشيات الغازي إلى الجلد من مكان آخر في الجسم، مثل الرئتين.

أصبح الفطار الظفري Onychomycosis الناجم عن أنواع الرشاشيات شائعًا في المناطق الاستوائية (المدارية)، خاصة بين المزارعين والعاملين الميدانيين (في الحقول) الآخرين. بشكل عام تكون العدوى مزمنة، مع وجود مرض متقدم يشمل عدة أظافر، مما يتسبب في تشوه بنية أظافر اليدين أو القدمين.

3-9 عوامل الخطر لداء الرشاشيات والوقاية منها:

يعتمد خطر الإصابة بداء الرشاشيات على الصحة العامة ومدى التعرض للغبيرات. بشكل عام العوامل التي تجعل المرضى أكثر استعدادًا للعدوى هي ضعف جهاز المناعة، وانخفاض مستوى خلايا الدم البيضاء، وتجاويف الرئة lung cavities، والربو أو التليف الكيسي، والعلاج بالكورتيكوستيرويد طويل الأمد.

يؤثر داء الرشاشيات الغازي على المرضى الذين يتناولون الأدوية المثبطة للمناعة بعد خضوعهم لجراحة الزرع، وخاصة زرع نخاع العظام أو زرع الخلايا الجذعية، أو المرضى الذين يعانون من سرطان الدم وأمراض الدم الخبيثة الأخرى. قد يكون المرضى في المراحل المتأخرة من الإيدز أيضًا في خطر متزايد.

عادةً ما يصيب ورم الرشاشيات المرضى الذين استَنشَقُوا الفراغات الهوائية (التجاويف) في رئتيهم ويكونون أكثر عرضة لخطر تطوير كتلة من ألياف الفطريات المتشابكة. قد تؤدي الأمراض الالتهابية مثل السل أو الساركويد، وكذلك الإشعاع، إلى إتلاف الرئتين مما ينتج عنه هذه التجاويف.

يحدث داء الرشاشيات الرئوي المزمن عادةً في الأشخاص الذين يعانون من أمراض رئوية أخرى، بما في ذلك مرض الانسداد الرئوي المزمن (الداء الرئوي المُسِدّ المزمن)، إلى جانب الأمراض غير السرطانية والالتهابات مثل السل أو الساركويد.

تكون الاستجابة التحسسية للرشاشيات أكثر شيوعًا لدى الأشخاص المصابين بالربو والتليف الكيسي، وخاصة أولئك الذين يعانون من مشاكل رئوية طويلة الأمد أو يصعب السيطرة عليها.

يكاد يكون من المستحيل التحكم في التعرض لأبواغ الرشاشيات، ولكن يجب على مرضى الزرع وأولئك الذين يخضعون للعلاج الكيميائي الابتعاد عن المصادر الواضحة للعفن، مثل مواقع البناء وأكوام السماد والحبوب المخزنة. بالإضافة إلى ذلك يوصى بارتداء قناع للوجه لتقليل التعرض للعوامل المعدية المحمولة جواً.

9-4 نهج التشخيص:

يعتمد التشخيص النهائي لداء الرشاشيات الغازي أو التهاب الرشاشيات الرئوي الناخر على تحديد الكائن الحي في عينات الأنسجة. توفر مستنبتات أنواع الرشاشيات مترافقة مع الوجود المكتشف عن طريق الفحص المجهري المباشر من غسل القصبات والأسناخ bronchoalveolar lavage (BAL) أو البلغم من الخيوط المنفصلة والمزدوجة التفرع دليلًا قاطعًا على الإصابة بهذا الفُطار (الشكل 9.2).

وتجدر الإشارة إلى أن التصور الوحيد للخيوط المنفصلة والمزدوجة التفرع في الفحص المجهري المباشر بدون مستنبت إيجابي لـ Aspergillus، يمكن أن يوافق داء الخَوطاء (hyphomycosis) فقط. فحص الأنسجة الذي يُظهر تلف الأنسجة عن طريق الخيط باستخدام ملون Gomori methenamine silver أو calcofluor قيّم للتشخيص أيضًا، ولكن الخزعة غالبًا ما تكون غير مجدية بسبب مخاطر حدوث مضاعفات.

يجب توخي الحذر مع المرضى الذين لديهم نتائج سريرية وشعاعية توحي بالإصابة بداء الرشاشيات الغازي. ومع ذلك عندما يكون كل من مقايسة galactomannan المصل والملون الفطري ومستنبت البلغم سلبية، يجب إجراء تنظير القصبات باستخدام BAL. بالإضافة إلى ذلك يجب الحصول على الشدف الرئوية إذا كان ذلك ممكنًا. في الواقع اللطخة الفطرية الإيجابية من BAL أو خزعة البلغم أو الرئة والمستنبت يجب أن تحفز العلاج للمضيفين الذين يعانون من قلة العدلات أو الذين يعالجون من السرطان. هذا مهم بشكل خاص بعد زرع نخاع العظم في حالة المستعمرة الرشاشيات الإيجابية من البلغم، حيث أن هذا له قيمة تنبؤية إيجابية بنسبة 95 ٪ لداء الرشاشيات الغازية. ومع ذلك فإن المستنبت السلبي من BAL أو البلغم لا يستبعد داء الرشاشيات الرئوي. حوالي 45٪-60٪ من المرضى

يظهرون الرشاشيات المستنبتة من BAL والتي تم العثور عليها في النهاية عن طريق الخزعة أو تشريح الجثة، و 8٪ -30٪ فقط من المرضى يُظهرون الرشاشيات المستزرعة من البلغم.

استخدام المؤشرات الحيوية المصلية غير المحددة مثل beta-D-glucan، أو اختبار شامل للفطريات (pan-fungal هو PCR)، أو المؤشرات biomarkers الحيوية الخاصة بالرشاشيات مثل galactomannan تعد خطوات عقلانية أخرى لتحديد تشخيص داء الرشاشيات الغازية التي تتضمن اختيار العينات غير الغازية. عندما يتم الحصول على BAL، يجب إرسال عينة للكشف عن galactomannan، وهو مكون رئيسي لجدار خلية الرشاشيات. المرضى المعرضين لخطر كبير لعدوى الرشاشيات الغازية يجب مراقبتهم عن كثب من خلال تقييم مستويات الجالاكتومانان في المصل أسبوعيًا. بالإضافة إلى ذلك فإن بتقييم الـgalactomannan في المصل وجد أن تخطيط الاتجاهات المبكرة charting early trends خلال الأيام الخمسة عشر الأولى من العلاج المضاد للفطريات قد يكون مفيدًا لتوقع استجابة سريرية جيدة. انخفاض في مستويات galactomannan بين خط الأساس والنتائج السريرية المتوقعة في الأيام السبعة الأولى. حدد التحليل التلوي (meta-analysis) والمراجعة المنتظمة (systematic review) أن قياس مستويات BAL-galactomannan قد يساعد في تشخيص داء الرشاشيات الغازي مبكرًا، حيث يتم إجراء اختبار سائل BAL في المنطقة المشبوهة.

مقايسة أخرى مفيدة لتشخيص داء الرشاشيات الغازي عند المرضى المعرضين لخطورة عالية هو real-time polymerase chain reaction (PCR). لونج وآخرون استنتجوا أن pan-Aspergillus PCR المرتبط بعينات BAL galactomannan من متلقي زراعة الرئة كان محددًا بنسبة 97 ٪ و 93 ٪ حساسًا لداء الرشاشيات الرئوي الغازي. علاوة على ذلك يمكن استخدام اختبار species-specific real-time PCR الخاص بالأنواع لفطر A. fumigatus و A. terreus لتشخيص A. fumigatus الشائعة و A. terreus المقاوم للأمفوتريسين B.

موريو وآخرون. أظهروا أن الإستراتيجية القائمة على تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) ذات أهمية كبيرة، حيث توفر حساسية متزايدة مقارنة بالمزارع الفطرية، وتحديد 78.9 ٪ من Aspergillus fumigattus من العينات السريرية مقارنة بـ 32 ٪ فقط عند استخدام الأطباق الزرعية كمعيار ذهبي في مجموعة من 137 فرنسي المرضى الذين يعانون من التهاب الجيوب الفطري (التهاب الأنف والجيوب rhinosinusitis). في هذه الدراسة تعرضت كل عينة لتحلل خارجي باستخدام 300 ميكرولتر من

محلول محلل للأنسجة لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة، ثم تم إجراء استخراج الحمض النووي DNA الآلي باستخدام 10 ميكرولتر من اختبار the commercial four-plex PCR من Qiagen. يوضح الجدول 9.1 المناطق المستهدفة الشائعة والبادئات المستخدمة لتضخيم وتسلسل (سلسلة) سلالات الرشاشيات.

يمكن تحقيق التشخيص المختبري السريع للأنواع السريرية الرئيسية للرشاشيات باستخدام التقنيات البروتينية عن طريق matrix-assisted laser desorption وقياس الطيف الكتلي لوقت التأين (MALDI-TOF-MS). يوجد 19 إسقاطًا طيفيًا رئيسيًا في مكتبة (MALDI Biotyper 3.1, Bruker Daltonics, Bremen, Germany)، أحدها Aspergillus brasiliensis، A. flavus، 2 A. fumigatus، 6 A. niger، 6 A. terreus، 2 A. versicolor 1 المبرقشة، و 1 A. thermomutatus [anamorph] (Neosartorya pseudofischeri [teleomorph]) ((Bruker Daltonics, 2017).

تم وصف إجراءات زراعة الفطريات الخيطية filamentous fungi، مثل الرشاشيات، وبروتوكول استخراج حمض الفورميك أدناه:

1. أضف كمية صغيرة من المواد البيولوجية إلى أنابيب تحتوي على 5 مل على الأقل من مرق Sabouraud السائل وأغلق الأنبوب.

2. قم بتدوير الدوار ليهز overhead حتى يتم ملاحظة ما يكفي من المواد البيولوجية (عادة 24 ساعة لأنواع الرشاشيات).

3. قم بإزالة أنابيب الزراعة من الدوار، وضعها واقفة وانتظر لبضع دقائق (السماح للفطريات الخيطية بالاستقرار في قاع الأنابيب).

4. احصد ما يصل إلى 1.5 مل من الرواسب ونقلها إلى أنبوب جهاز الطرد المركزي (المنبّذ – المثقل) الصغير.

5. نبّذ بأقصى سرعة (13000 دورة في الدقيقة) لمدة دقيقتين.

6. قم بإزالة المادة الطافية بعناية بحذر.

7. أضف 1 مل من الماء إلى الحبيبات ودوّر (vortex) لمدة 1 دقيقة.

8. نبّذ بأقصى سرعة (13000 دورة في الدقيقة) لمدة دقيقتين.

9. قم بإزالة المادة الطافية بعناية مرة أخرى وكرر الغسيل ودوّر مرة واحدة.

10. علق الحبيبات في 300 ميكرولتر من الماء، أضف 900 ميكرولتر من الإيثانول، وقم بتدويره.

11. نبّذ بأقصى سرعة (13000 دورة في الدقيقة) لمدة دقيقتين.

12. قم بإزالة المادة الطافية بعناية عن طريق الممص (تجنب الصب)، ونبّذ لفترة وجيزة، وقم بإزالة الإيثانول المتبقي تمامًا.

13. جفف الحبيبات تمامًا باستخدام Speedvac أو التجفيف عند 37 درجة مئوية.

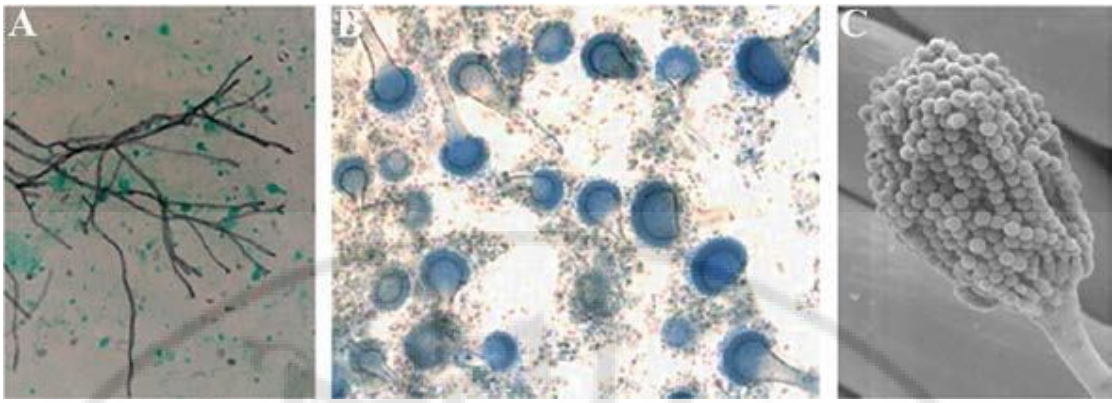
14. إعادة تعليق الحبيبات بكمية معينة من حمض الفورميك 70٪ (تتطلب الحبيبة الصغيرة جدًا 10-20 ميكرولتر والحبيبة الكبيرة يمكن أن تتطلب ما يصل إلى 100 ميكرولتر من حمض الفورميك).

15. أضف نفس الحجم من الأسيتونيتريل إلى الأنبوب واخلطه بعناية.

16. نبّذ بأقصى سرعة (13000 upm) لمدة دقيقتين.

17. أضف 1 ميكرولتر من المادة الطافية على لوحة الهدف MALDI واتركها لتجف في الهواء.

18. رفّد (غطّي) بـ1 ميكرولتر من محلول المطرس (&-cyano-4-hydroxycinnamic acid) لتغطية كل بقعة من العينة؛ جفف بالهواء (تأكد من أن الهدف جاف تمامًا قبل إدخاله في جهاز MALDI).



الشكل 9.2

النتائج المخبرية لداء الرشاشيات عن طريق الفحص المجهري المباشر والزرع.

(أ) كشف التلوين بـ Grocott silver stain عن خيوط متفرعة مقسمة من A. fumigatu

(ب) رؤوس الرشاشيات الدخناء التي تم الكشف عنها بواسطة lactophenol cotton blue staining.

(ج) تمت رؤية رأس الرشاشيات الدخناء عن طريق المسح المجهري الإلكتروني.

جدول 9-1 المناطق المستهدفة والمواد الأولية المستخدمة في تضخيم وتسلسل (سلسلة) أنواع الرشاشيات وفقًا لـ سامسون وآخرون (2014)

Target Region	Primers
Beta-tubulin	Bt2a (5′-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3′) Bt2b (5′-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3′)
Calmodulin	Cmd5 (5′-CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC-3′) Cmd6 (5′-CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG-3′)

9.5 المقاومة في أنواع الرشاشيات:

تم الإبلاغ عن ظهور مقاومة التريازول بشكل متزايد في جميع أنحاء العالم في العقد الماضي، لتصبح مشكلة صحية عامة مثيرة للقلق. تُكتسب هذه المقاومة لدى المريض من خلال طريقتين وبائيتين

متميزتين. تم وصف حالات المقاومة الأولى بعد علاج طويل الأمد بالأزولات الطبية. في الآونة الأخيرة تم الإبلاغ عن تلوث مرضى azole-naive بواسطة عزلات مقاومة بالفعل من البيئة، مرتبطة باستخدام مبيدات الفطريات الآزولية في الزراعة والبستنة وحفظ الأخشاب. تم اقتراح هذا المسار الثاني لاكتساب المقاومة في البداية في هولندا ثم تم الإبلاغ عنه في الولايات المتحدة وأستراليا والعديد من البلدان الأخرى في أوروبا وآسيا وأفريقيا وأمريكا اللاتينية. في أوروبا تم العثور على علاقة بين استخدام الآزول البيئي وتطوير المقاومة المتصالبة للتريازولات الطبية من خلال طفرات L98H / TR34 و / TR46 Y121F / T289A في الجين CYP51A ومنطقة الpromoter الخاصة به ومؤخراً من خلال TR53 في أمريكا اللاتينية.

تم وصف البيئة المنزلية مؤخرًا كمصدر مهدِّد للحياة من A. fumigatus المقاوم للآزول عند المرضى الذين يعانون من نقص المناعة أو المرضى الذين يعانون من مرض الانسداد الرئوي المزمن.

المرضى الذين يعانون من كبت المناعة المصابين بعزلة مقاومة للأزول في المختبر يُظهرون معدل وفيات أعلى، مما يشرح الحاجة إلى اختبار الحساسية لمضادات الفطريات من أجل وصف العلاج المناسب. لتحديد العزلات السريرية كمقاومة للآزول، يوصى بحساب التركيزات المثبطة الدنيا للأدوية المضادة للفطريات عن طريق الاختبارات التجارية مثل Etest أو عن طريق الطرق المرجعية للتخفيف الدقيق microdilution في المرق من معهد معايير المختبرات السريرية أو اللجنة الأوروبية لاختبار حساسية مضادات الميكروبات. تم اقتراح نقاط التوقف breakpoints السريرية فقط بواسطة EUCAST لتحديد مقاومة عقاقير الآزول والأمفوتريسين ب.