

#### 4- عزل الفطريات من الانسان Isolation from patients

تعزل الفطريات المرضية للانسان Pathogenic fungi من المرضى الذين تشخص اصابتهم سريريا بالفطريات، وان هذه الفطريات تتغذى على المواد الكراتينية ( شعر، جلد، اظافر) مسببة التهابات جلدية مثل داء السعفة Tinea او تسبب القوباء الجلدي Ring worm. بعد ان تعقم مناطق الاصابة بكحول ايثيلي بنسبة 70% لاجل التعقيم (التخلص من البكتريا) وازالة المواد العالقة والادوية التي من شانها عرقلة الفحص المجهرى المباشر Direct examination والنمو. تعزل الفطريات من الانسان من ثلاث مناطق من الجسم وهي:

##### • الجلد The skin

تصيب الفطريات الاماكن ذات الرطوبة العالية من الجلد خاصة بين الاصابع، تجمع القشور الجلدية من الحافة المتقشرة لمنطقة الاصابة Active border لكونها حاوية على الخيوط الفطرية Hyphae التي يكونها الفطر المسبب للاصابة ويتم ذلك بقشط المنطقة باستخدام شفرة جراحية Surgical blade معقمة، توضع القشور الجلدية بين شريحتين زجاجيتين ثم تغلف بورق ترشيح وتوضع داخل طبق زجاجي معقم لحين زراعتها في المختبر.



##### • الرأس (hair) The head

تجمع عينات الشعر والقشور من الحافة المتقشرة لمنطقة الاصابة في فروة الرأس باستخدام ملقط Forceps معقم، وتوضع العينات بين

شريحتين زجاجيتين ثم تغلف بورق ترشيح وتوضعا داخل طبق زجاجي معقم لحين زراعتها في المختبر.



### • الاظافر The nail

تجمع عينات الاظافر بقص الحافات العليا للاظافر المصابة، وتجمع ايضا البقايا المتقرنة المتجمعة تحت الاظفر المصاب، توضع العينات بين شريحتين زجاجيتين ثم تغلف بورق ترشيح وتوضعا داخل طبق زجاجي معقم لحين زراعتها في المختبر.



وهناك اصابات فطرية في الانسجة العميقة للجسم كاصابة الرئة Pulmonary fungi infection واصابة الدماغ Cerebral fungal infection وغيرها، وهناك اصابة فطرية للدم تسمى Fungemia. والجدير بالذكر ان الاصابات العميقة للانسجة يصعب عزل الفطريات منها، اذ تكون طرق العزل معقدة (زراعة الانسجة) وتحتاج الى ظروف خاصة.

## \*اوساط التحميل والصبغات Mounting and staining

هنالك العديد من اوساط التحميل والصبغات التي تستعمل عادة في مختبر الفطريات بغرض توضيح التراكيب الخلوية المختلفة للفطريات، ولمعرفة حجم الخلايا وشكلها. يستعمل احيانا الماء كوسط تحميل ولكن هذه التحضيرات سرعان ماتجف. ومن اكثر اوساط التحميل والصبغات المستعملة في مختبر الفطريات هي **صبغة اللاكتوفينول ازرق القطن Lactophenol cotton blue**. وهذه الصبغة جيدة لتوضيح سبورات الفطريات والحواجز العرضية خاصة في الفطريات الكيسية.

### \*تتكون صبغة اللاكتوفينول من :-

Cotton blue	1 g
Phenol crystals	20g
Glycerol	30ml
Lactic acid	15ml
Distal water	20ml

### \* طريقة التحضير:-

- يذاب ازرق القطن في الماء المقطر.
  - تضاف بلورات الفينول الى حامض اللاكتيك، وتسخن قليلا لاذابة البلورات، ثم يضاف الكليسيرول، واخيرا يخلط المحلولين ويرجان معا.
  - تحفظ الصبغة بدرجة حرارة الغرفة.
- تعمل هذه الصبغة كمحلول مركب وصبغة في ذات الوقت، فحامض اللاكتيك يعمل على حفظ التراكيب الفطرية، والفينول يعمل على قتل خلايا الفطريات ، والكليسيرول يمنع التخلل، واخيرا يعمل ازرق القطن على صبغ التراكيب الفطرية ليسهل تمييزها.

## \*تشخيص الفطريات

يتم تشخيص الفطريات بعدة طرق منها:-

### 1- الفحص المظهري للمستعمرات Morphology Examination of the colony

يعد الفحص المظهري احد الوسائل المهمة التي يجب الاخذ بها للتفريق بين الفطريات ويشمل عدة امور ويجب ان تؤخذ بنظر الاعتبار منها عدد الايام التي يستغرقها الفطر لبدأ النمو وبعد ظهور النمو على سطح الزرع يتم فحص شكل **المستعمرة الظاهري ولونها ونسجتها (مسحوقيه ، قطنية ، زغبية )**. ويتم فحص لون المستعمرة من الجهة المعاكسة *reverses cid* مما يتم قياس قطر مستعمرة بعد توقف النمو .

### 2- الفحص المجهري للمستعمرات Direct Microscope test

يتم إجراء هذا الفحص لدراسة الصفات المجهرية للفطريات وأشكالها وتفرعاتها وكذلك الكونديات بأنواعها وإشكالها وأحجامها وعددها وتخن جدارها وكذلك سبورات الكلاميديا *chlamydospores* والسبورات المفصلية *Arthospores*.

ويتم هذا الفحص بوضع قطرة من صبغة اللاكتوفينول ازرق القطن على شريحة زجاجية نظيفة وبواسطة ابره التلقيح المعقمة *needle*، وينقل جزء من الخيوط الفطرية من المنطقة الواقعة بين المركز والحافة الى الشريحة الزجاجية وتمزج مع الصبغة، ثم يوضع عليها غطاء الشريحة ونضغط عليها بلطف بواسطة قاعدة *Loob* ، لغرض فرش العينة على هذه القطرة، ثم تجفف الشريحة اما بوضعها بفرن دافئ، وذلك يستغرق وقت طويلا؛ ولذلك تسخن على مصباح بنزن لفترة قصيرة حتى تجف العينة، تفحص الشريحة المحضرة تحت القوة الصغرى *10x* أولا ثم تحت القوة الكبرى *40x* ، لملاحظة الخيوط الفطرية واشكالها وتفرعاتها، والكونيديات بإشكالها وإحجامها المختلفة *Micro and Macroconidia* ، وطريقة ترتيبها على خيوط فطرية، وأيضا يعتمد على المفاتيح التصنيفية والتشخيصية.

**ملاحظة :-**

إذا أردنا حفظ الشريحة المحضرة لفترات طويلة يجب تنظيف حواف غطاء الشريحة بحذر باستعمال مناديل ورقية أو أوراق ترشيح، ثم نصبغ الحواف بطبقة سميكة من طلاء الأظافر ثم نضع الشريحة في مكان جيد التهوية لتجف تماماً.

**3- تحليل زراعة الفطريات Fungal Culture test**

يستخدم تحليل زراعة الفطريات للكشف عن العدوى الفطرية السطحية التي قد تصيب الجلد أو الأظافر مثلاً أو للكشف عن العدوى الفطرية الجهازية كالتالي قد تؤثر على الرئتين.

يتم إجراء تحليل الزراعة للفطريات في المنطقة التي يريد مقدم الرعاية الطبية تحديد ما إذا كانت مصابة بعدوى فطرية أم لا، ويتم استخدام هذا النوع من التشخيص حسب موقع الإصابة وتشمل ما يأتي:-

- كشط جزء بسيط من الجلد أو الأظافر وزراعتها على طبق بتري حاوي على اكار معين لتنمية الفطر ومعرفة نوع الفطر.
- اخذ مسحة من سائل الفم أو المهبل وزرعها وتنميتها للكشف عن العدوى المسببة للفم أو المهبل.
- فحص الدم للكشف عن العدوى الفطرية الأكثر خطورة مثل عدوى الدم الفطرية.
- زراعة البلغم للكشف عن العدوى الفطرية في الرئتين.

**4- التشخيص الجزيئي Molecular Diagnostic**

يمكن الكشف عن العدوى الفطرية وتحديد نوع الفطر المسبب للإصابة، وذلك من خلال القيام بالتشخيص الجزيئي (المادة الوراثية للفطر) الذي يتميز بعدم الحاجة لعينة خلايا فطرية حية، إذ أن مبدأ عمل هذا الاختبار يقوم على تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)

(Polymerases Chain Reaction) الذي يعمل حتى في غياب الخلايا الحية مادام الحامض النووي موجود في العينة.