

دکتر مهرانوش ماهرالنقش، استادیار رشته قارچ شناسی پزشکی در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان  
 دکتر سیمین دخت سلیمانی فرد، استادیار رشته انگل شناسی پزشکی در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان  
 دکتر پروین دهقان، دانشیار رشته قارچ شناسی پزشکی در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

## عفونت های قارچی همراه با پاندمیک ۱۹-COVID و تشخیص آزمایشگاهی آنها

### Fungal Co-infections laboratory diagnosis associated with COVID-19 pandemic

علاوه بر این، تشخیص قارچ به وسیله کشت خلط به تنهایی، دشوار است و با تشدید بیماری، به راحتی می توان علائم تنفسی شدید را به COVID-19 نسبت داد، در اکثر موارد عفونت همزمان قارچی با باکتری یا حتی مایکوپلاسما معمولاً منجر به استفاده از آنتی بیوتیک می شود، بنابراین تشخیص عفونت قارچی همیشه به تاخیر افتاده یا نادیده گرفته می شود. براساس تجربه SARS در سال ۲۰۰۳ و موارد اسپرژیلوزیس تهاجمی همراه با آنفلوآنزای شدید، توجه به احتمال ابتلا به COVID-19 همراه با عفونت های قارچی بسیار مهم است [۸،۹].

#### تشخیص بالینی COVID-19 همراه با عفونت های قارچی

با وجود پاندمیک COVID-19، بیشتر متخصصان این بیماری از عفونت های مشترک قارچی با این بیماری آگاه هستند. شورای عالی بهداشت عمومی فرانسه توصیه می کند که به طور سیستماتیک پاتوژن های قارچی در بیماران COVID-19 باید بررسی شود [۷]. Lanjuan Li و همکارانش در چین که تجربه زیادی در درمان COVID-19 داشته اند، یادآوری کردند که پزشکان باید بر روی عفونت های قارچی بیماران، به ویژه بیماران نقص ایمنی شدید تمرکز کنند. در مرحله اولیه بیماری یا در اثر وجود عفونت های قارچی خارج ریوی، ممکن است تصویربرداری قفسه سینه به صورت غیرمعمول دیده شود. از این رو، لازم است بیماران به صورت جدی از نظر پاتوژن های قارچی مورد بررسی قرار گیرند [۱۰].

#### روش های تشخیص قارچی عبارتند از:

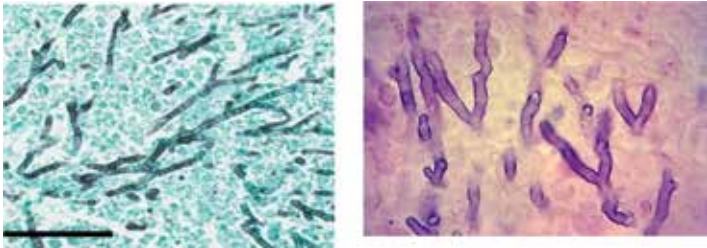
مشاهده لام مستقیم و کشت، آزمایشات هیستوپاتولوژی، آزمایشات سرولوژی شامل بررسی آنتی ژن و آنتی بادی،

عفونت ناشی از ویروس کرونای جدید (COVID-19) یک بیماری قابل انتقال از انسان به انسان می باشد، که به صورت مشکل بزرگی در سطح بهداشت عمومی در جهان مطرح شده است [۱، ۲].

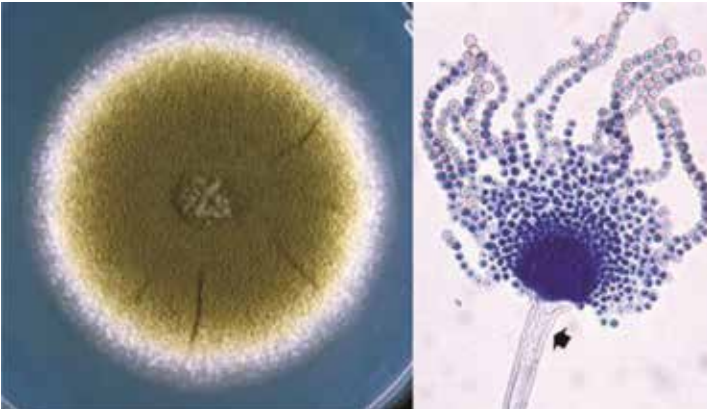
تا به امروز هفت کرونا ویروس منتقل شونده به انسان، کشف شده است که آخرین نوع آن ها، کرونا ویروس سندرم حاد تنفسی ۲ (SARS-CoV-2) می باشد که در دسامبر ۲۰۱۹ در شهر ووهان چین با همه گیری در انسان شیوع پیدا کرد. این کرونا ویروس پس از مدت کوتاهی تمام جهان را درگیر کرد [۳]. این ویروس تا May سال ۲۰۲۰، به سرعت در ۲۱۲ کشور در جهان گسترش یافت و منجر به ایجاد نزدیک به ۵ میلیون نمونه آزمایشگاهی مثبت و همچنین باعث بیش از ۳۱۰،۰۰۰ مورد مرگ و میر در جهان شد.

COVID-19 مانند SARS-CoV-2 و MERS-CoV مسئول عفونت تنفسی تحتانی است و می تواند باعث سندرم های حاد تنفسی (ARDS (Acute Respiratory Distress Syndromes) شود. [۴].

علاوه بر این، آسیب منتشره آلوئول ها همراه با تراوش و التهاب شدید در بیماران COVID-19 همیشه با کاهش سلول های CD4 و CD8، سبب سرکوب سیستم ایمنی می شود [۵]. این بیماران، به ویژه بیمارانی که در بخش مراقبت ویژه (ICU) بستری شده و یا مدت طولانی تری در بیمارستان بستری بوده اند، حتی تا ۵۰ روز، بیشتر در معرض عفونت های مشترک قارچی قرار می گیرند از این رو، توجه به این نکته مهم است که بیماران COVID-19 می توانند در مراحل میانی و آخر بیماری، به ویژه در موارد شدید بیماری با احتمال بالاتری به عفونت های قارچی مبتلا شوند [۶، ۷]. از نظر بالینی، بسیاری از بیماران COVID-19 در ابتدا مورد ارزیابی خلط از نظر قارچ قرار نمی گیرند،



شکل (۱): هیستوپاتولوژی Aspergillus spp با رنگ آمیزی PASAspergillus | Mycology Online و GMS



شکل (۲): اشکال میکروسکوپی و ماکروسکوپی Aspergillus flavus

### کاندیدایازیس مهاجم (IC) Invasive Candidiasis

بیماران مبتلا به COVID-19 در صورت داشتن بیماری زمینه‌ای یا هر نوع نقص ایمنی، استفاده طولانی مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها و یا بیماران مبتلا به نوتروپنی به طور قابل توجهی در معرض خطر عفونت با گونه‌های کاندیدا هستند. [۱۶].

روش‌های تشخیص کاندیدایازیس مهاجم عبارتند از کشت خون و کشت دیگر نمونه‌هایی که به طور استریل جمع‌آوری شده‌اند، روش کشت یک روش گلد استاندارد است که برای تشخیص کاندیدایازیس مهاجم در نظر گرفته شده است. تهیه لام مستقیم و رنگ آمیزی نمونه با رنگ‌های گرم، گیمسا، GMS، PAS یا H&E و مشاهده سلول‌های مخمری به همراه سودوهایف در کنار کشت نمونه الزامی است. شکل (۳) روش‌های تشخیصی دیگر شامل اندازه‌گیری مانان (Mn) و آنتی‌مانان (A-Mn) است که این آزمایش در اروپا در بسیاری از آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش دیگر، اندازه‌گیری آنتی‌بادی بر علیه لوله زایا در کاندیدا آلبیکنس است C.albicans germ tube antibody

(۱،۳) (BDG-b-D-glucan)، تشخیص گلاکتومانان (GM) سرم، برای بیماران مشکوک لازم است انجام شود، از طرفی بررسی مایع لاواژ برونکوآلوئولار (BALF) و نمونه برداری از لوله تراشه اسپیرال (TA) برای کشت و آزمایش مستقیم الزامی است [۱۱،۱۲]. روش‌های مبتنی بر PCR برای شناسایی مولکولی عوامل بیماری‌زا در صورت لزوم می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد [۱۳].

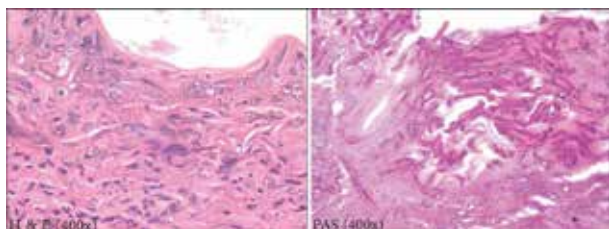
پس از شناسایی پاتوژن، می‌توان آزمایش حساسیت ضد قارچ از انتخاب داروهای ضد قارچی نیز می‌توان انجام داد. اگر AST Antifungal susceptibility testing را برای انتخاب داروهای ضد قارچی نمی‌توان انجام داد. اگر AST قابل اجرا نباشد، باید دارو به صورت تجربی تجویز شود. اصلی‌ترین عوامل بیماری‌زا قارچی در عفونت‌های مشترک قارچی در بیماران شدید COVID-19، Aspergillus و Candida هستند. سایر قارچ‌های بیماری‌زا فرصت طلب نادر نیز باعث عفونت‌های ریوی می‌شوند، مانند Mucor و Cryptococcus که باید مورد توجه قرار گیرند.

### آسپرژیلوزیس مهاجم (IA) Invasive Aspergillosis

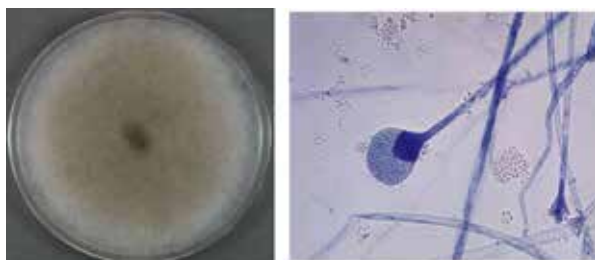
گونه‌های آسپرژیلوس می‌توانند عامل مهمی در ایجاد عفونت تهدیدکننده زندگی در بیماران مبتلا به COVID-19 نوتروپنیک، بیماری‌های مزمن ریوی (COPD)، دارای پیوند سلول‌های بنیادی و پیوند عضو، دارای نقص ایمنی ارثی، بدخیمی‌های خونی (HM)، سیستمیک فیروزیز (CF) و غیره باشند. [۱۴]. شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس به روش میکروسکوپی پس از رنگ آمیزی نمونه‌های بافت ریه یا مایعات حاصل از آن بوسیله انواع رنگ آمیزی‌ها مانند: (GMS) گومری متانامین سیلور، (PAS) پرئودیک اسید شیفت، گرم، گیمسا و تشخیص‌هایف‌های بازایه حاده به طور معمول امکان‌پذیر است. شکل (۱)

در مرحله دوم جهت تایید تشخیص میکروسکوپی، کشت نمونه مورد نظر بر روی محیط سابرو دکستروز آگار و کلرامینیکل (SC) و انکوبه کردن این محیط در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲-۵ روز است.

به عنوان مثال در شکل (۲) ظاهر کلنی یک گونه از آسپرژیلوس Asp.spp و شکل میکروسکوپی آن در روی محیط کشت مشخص شده است. روش‌های مولکولی نیز جهت شناسایی انواع گونه‌های آسپرژیلوس نیز استفاده می‌شود [۱۵]. آزمایش سرمی و ارزیابی گلاکتومانان (GM) نیز به عنوان یک روش کمتر تهاجمی برای بیماران نوتروپنیک مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۳].



شکل (۴): هیستوپاتولوژی *Mucor spp* با رنگ آمیزی PAS و H&G



شکل (۵): اشکال میکروسکوپی و ماکروسکوپی *Mucor spp*

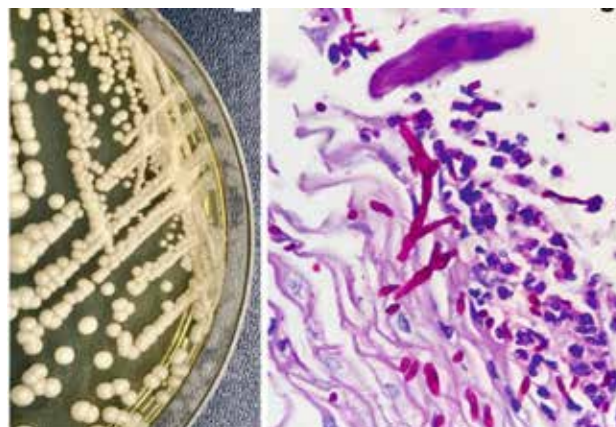
### کریبتوکوکوزیس مهاجم Invasive Cryptococcosis

مبتلایان به COVID-19، چنانچه مبتلا ویروس HIV باشند و شمار لنفوسیت های CD4 آنها کمتر از ۲۰۰ سلول در میکرولیتر باشد و یا بیماران پیوندی و نیز سایر افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند، چون به کریبتوکوکوزیس حساس هستند. در آنها تظاهرات بیماری به صورت مننگوآنسفالیت آشکار می شود. [۲۱].

با توجه به پیچیدگی علائم کریبتوکوکوزیس و همچنین شناسایی گونه های نئوفورمنس *c. neoformans* و گتی *c. gattii*، تشخیص کریبتوکوکوزیس برپایه ی تایید آزمایشگاهی همراه نشانگان بالینی انجام می شود. روش های مورد استفاده برای تایید بیماری: کشت، تهیه لام مستقیم و بررسی میکروسکوپی آن، روش های هیستوپاتولوژی، سرولوژی و تشخیص مولکولی است. برای تشخیص کریبتوکوکوزیس، نمونه ای از مایع مغزی نخاعی CSF را با جوهر هند *India ink* مخلوط کرده و در زیر میکروسکوپ بررسی می شود. ساختار *Cryptococcus spp* به شکل مخمرهای کپسول دار و معمولا جوانه دار که با اتصالی باریک به سلول مادر پیوست شده، دیده می شوند، شکل (۶).

(CAGTA)، انجام آزمایشات مکمل، مانند اندازه گیری BDG سرم که یک ماده اصلی تشکیل دهنده دیواره سلولی کاندیدا است و انجام multiplex PCR علاوه بر کشت نمونه بالینی جهت شناسایی مخمر کاندیدا انجام می شود. [۱۷، ۱۸].

Histopathology | SpringerLink



شکل (۳): اشکال میکروسکوپی و ماکروسکوپی *Candida spp*

### موکورمایکوزیس مهاجم Invasive Mucormycosis

بیماران مبتلا به COVID-19 چنانچه دچار تروما، دیابت ملیتوس، بدخیمی های خونی HM، ابتلا به نوتروپنی به مدت طولانی و پیوند عضو باشند، ریسک بالایی برای ابتلا به موکورمایکوزیس دارند [۱۹]. نمونه های آزمایشگاهی مورد مطالعه برای این بیماری عبارتند از: خلط، نمونه بال یا مایع لاواژ برونکوالوئولار BALF، نمونه ضایعات پوستی و در صورت حمله به بافت نمونه بیوپسی بافت است.

نمونه ها پس از رنگ آمیزی هایی مثل گرم، گیمسا، GMS، PAS، H&E بسته به نوع نمونه رنگ آمیزی می شود و با میکروسکوپ نوری یا فلورسنت مورد مطالعه قرار می گیرند. در صورت وجود هایفای غیر سپتیک و عریض در زیر میکروسکوپ شکل (۴) علاوه بر لام مستقیم حتما کشت نیز برای اثبات وجود موکورمایکوزیس توصیه می شود. نیاز به یادآوری است که کشت نمونه به طور جداگانه در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد باید انجام شود. با مشاهده کلنی هایی که ابتدا سفید پنبه ای و سپس خاکستری رنگ می شوند شکل (۵) وجود بیماری تایید می شود، شناسایی قارچ به روش مولکولی نیز انجام پذیر است [۲۰].

3.Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506.

4.Wang Y, Wang Y, Chen Y, Qin Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J Med Virol*. 20 <https://doi.org/10.1002/jmv.25748>.

5.Yang W, Cao Q, Qin L, Wang X, Cheng Z, Pan A, et al. Clinical characteristics and imaging manifestations of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19): a multi-center study in Wenzhou city, Zhejiang, China. *J Infect*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.016>

6.Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med*. 2020 [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30079-5).

7.Gangneux JP, Bougnoux ME, Dannaoui E, Cornet M, Zahar JR. Invasive fungal diseases during COVID-19: we should be prepared. *J Mycol Med*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.100971>.

8.Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>.

9.Chaturvedi V, Bouchara JP, Hagen F, Alastruey-Izquierdo A, Badali H, Bocca AL, et al. Eighty years of mycopathologia: a retrospective analysis of progress made in understanding human and animal fungal pathogens. *Mycopathologia*. 2018;183(6):859–77.

10.Xu K, Cai H, Shen Y, Ni Q, Chen Y, Hu S, et al. Management of corona virus disease-19 (COVID-19): the Zhejiang experience. *Zhejiang da xue xue bao Yi xue ban*. 2020; 49(1):0.

11.Lahmer T, da Costa CP, Held J, Rasch S, Ehmer U, Schmid RM, et al. Usefulness of 1,3 beta-D-glucan detection in non-HIV immunocompromised mechanically ventilated critically ill patients with ARDS and suspected *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Mycopathologia*. 2017;182(7–8):701–8.

12.Prattes J, Valentin T, Hoenigl M, Talakic E, Reisinger AC, Eller P. Invasive pulmonary aspergillosis complicating COVID-19 in the ICU—a case report. *Med Mycol Case Rep*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2020.05.001>

13.Hage Chadi A, Carmona Eva M, Epelbaum Oleg, Evans Scott E, Gabe Luke M, Haydour Qusay, Knox Kenneth S, Kolls Jay K, Hassan Murad M, Wengenack Nancy L, Limper Andrew H. Erratum: Microbiological laboratory testing in the diagnosis of fungal infections in pulmonary and critical care practice. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(10):1326.

14.Poli P, Timpano S, Goffredo M, Padoan R, Badolato R. Asymptomatic case of Covid-19 in an infant with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.03.017>.

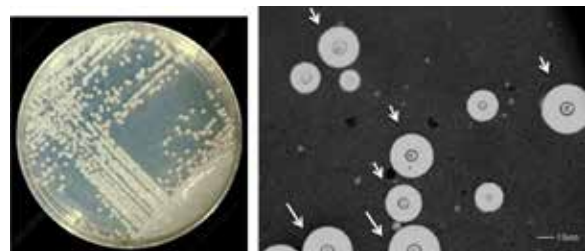
15.Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;63(4):e1–60.

16.Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing invasive candidiasis. *J Clin Microbiol*. 2018;56(5):e01909–17.

کشت نمونه بر روی محیط Sabouraud dextrose agar

انجام می شود، و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز، در شرایط هوازی قرار داده شده و روزانه از نظر رشد مورد بررسی قرار می گیرد، کلنی کریپتوکوکوس به رنگ کرم و حالت موکوئیدی و لزج دارد. این حالت به خاطر وجود کپسول پلی ساکاریدی در اطراف سلول مخمری است. کپسول پلی ساکاریدی را می توان در مایعات بدن مانند سرم، CSF، مایع BAL و همینطور نمونه های بافت مشاهده کرد. آنتی ژن کریپتوکوکوس از طریق سه روش: لاتکس آگلوتیناسیون (LAT)، الایزا (EIA) و روش Lateral Flow Assay (LFA) قابل شناسایی هستند که این روش ها سریع، حساس و اختصاصی هستند، اما برای نمونه های تنفسی مانند BAL، مایع پلور یا خلط استاندارد نشده اند [۱۷].

اگر با روش های ذکر شده تشخیص این عفونت امکان پذیر نباشد، می توان از تست های مولکولی در تشخیص عامل بیماری استفاده نمود. در تشخیص این بیماری بررسی نمونه CSF جهت مشاهده مخمر کپسول برای همه بیماران توصیه می شود [۲۲].



شکل (۶): اشکال میکروسکوپی و ماکروسکوپی

#### Cryptococcus spp

در پایان، اشاره ای شده است به نشانه های بالینی که به عنوان ریسک فاکتور موثر در بروز هر کدام از بیماری های قارچی مهاجم همراه با COVID-19 هستند، و راه های تشخیص اسپرژیلوزیس، کاندیدبازیس، موکومیکوزیس و کریپتوکوکوزیس برای کمک به پزشکان و متخصصان آزمایشگاه در مدیریت این بیماری ها.

#### منابع:

12.Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798): 270–3.

2.Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020;5(4):536–44.