

Invasive Aspergillosis in COVID-19: A Review Study and Recommendations for Diagnostic Approaches

Vida Mortezaee¹,
Sabrieh Asadi Shahi Saraee²,
Mona Ghazanfari²,
Mahtab Ashrafi Khozani²,
Maedeh Maleki³,
Mohammad Taghi Hedayati^{4,5}

¹ PhD in Medical Mycology, Invasive Fungi Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² PhD Student in Medical Mycology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ MSc in Medical Mycology, Invasive Fungi Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Invasive Fungi Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Department of Medical Mycology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received January 30, 2019 ; Accepted March 1, 2020)

Abstract

Background and purpose: COVID-19 is an emerging viral disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Bacterial or fungal superinfections of the lung may cause complications in clinical manifestations, treatment, and increase the mortality rate. In this article, we reviewed previous studies on invasive aspergillosis (IA) in viral infections and in adjustment with COVID-19. Also, the necessity of IA diagnosis to increase the survival rate in involved patients is discussed.

Materials and methods: Electronic databases, including Pubmed, Google Scholar, and Web of Science were searched using the following keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, influenza, invasive aspergillosis, and invasive fungal infections.

Results: Reports from China showed 3.2% to 27.1% fungal co-infection in COVID-19 patients. Patients with COVID-19 who developed severe pneumonia were found with considerably higher rates of viral, bacterial, and fungal co-infections than those with mild pneumonia. Also, intestinal normal fungal flora was reported to be significantly different between COVID-19 patients and normal subjects.

Conclusion: While the main focus of physicians is on bacterial superinfection control in COVID-19, ignoring life threatening fungal infections may increase the mortality rate. Therefore, we profoundly recommend early diagnosis of invasive fungal infections in COVID-19 patients.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, influenza, invasive aspergillosis, invasive fungal infections

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (184): 169-178 (Persian).

* **Corresponding Author: Mohammad Taghi Hedayati** - Invasive Fungi Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: hedayatimt@gmail.com)

آسپرژیلوزیس مهاجم در COVID 19 : مروری بر مطالعات گذشته و ارائه راهکار های تشخیصی

ویدا مرتضائی^۱
صبریه اسدی شاهی ساره ایی^۲
مونا غضنفری^۲
مهتاب اشرفی خوزانی^۲
مائده ملکی^۳
محمدتقی هدایتی^{۴،۵}

چکیده

سابقه و هدف: COVID-19 بیماری نو پدیدي هست که به وسیله کروناویروس جدیدی به نام کروناویروس سندروم تنفسی حاد شدید ۲ (SARS-CoV-2) ایجاد می شود. سوپراینفکشن به وسیله باکتری ها و قارچ ها در ریه این بیماران می تواند باعث پیچیدگی تظاهرات بالینی و درمانی و همچنین افزایش مرگ و میر شوند. در مطالعه حاضر با مروری بر مطالعات انجام شده قبلی بر روی آسپرژیلوزیس مهاجم (IA) در زمینه بیماری های ویروسی و تطبیق آن با COVID-19 پرداخته و ضرورت تشخیص IA در افزایش میزان بقای بیماران مبتلا خاطر نشان می شود.

مواد و روش ها: در این مطالعه مروری، با جستجو در سایت های Pubmed، Google Scholar، Web of Science و با استفاده از کلمات کلیدی COVID-19، SARS-CoV-2، آنفلونزا، آسپرژیلوزیس مهاجم و بیماری های قارچی مهاجم مرتبط جمع آوری و مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته ها: عفونت همزمان با قارچ ها در بیماران مبتلا به COVID-19 بین ۳/۲ الی ۲۷/۱ درصد، از کشور چین گزارش شده است. نتایج نشان داد میزان ابتلا به عفونت های همزمان با سایر ویروس ها، باکتری ها و قارچ ها، در بیماران با پنومونی شدید مبتلا به COVID-19 نسبت به بیماران با پنومونی ملایم به طور قابل توجهی افزایش می یابد. در این دسته از بیماران، فلور قارچی روده هم به طور معنی داری با افراد سالم، متفاوت گزارش گردید.

استنتاج: تمرکز بالای کادر درمانی در مواجهه با بیماران COVID-19 بر کنترل سوپراینفکشن باکتریایی، می تواند با غفلت از بیماری های کشنده قارچی باعث افزایش میزان مرگ و میر در این دسته از بیماران شود. از این رو تشخیص زودرس بیماری های قارچی مهاجم در این بیماری نوپدید قویا پیشنهاد می گردد.

واژه های کلیدی: COVID-19، SARS-CoV-2، آنفلونزا، آسپرژیلوزیس مهاجم، بیماری های قارچی مهاجم

مقدمه

کروناویروس ها گروهی از ویروس های دارای پوشش
و RNA مثبت می باشند که توانایی ایجاد بیماری های
تنفسی، گوارشی و سیستم اعصاب مرکزی در انسان و
حیوان را دارا می باشند (۱). تا دسامبر ۲۰۱۹، شش گونه

مؤلف مسئول: محمدتقی هدایتی: ساری: جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی Email: hedayatimt@gmail.com

۱. دکتری تخصصی قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشجوی دکتری تخصصی قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استاد، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. استاد، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۹/۱/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۱/۲۷

از کروناویروس‌ها که قادر به ایجاد عفونت در انسان بودند شناسایی گردید که از بین این گونه‌ها، کروناویروس سندروم تنفسی حاد شدید^۱ و کروناویروس سندروم تنفسی خاورمیانه^۲ به ترتیب سبب پاندمی بیماری ناشی از این ویروس‌ها در سال‌های ۲۰۰۲ و ۲۰۱۲ در جهان شدند و با مرگ و میر بالایی همراه بودند (۱-۳). چهارگونه دیگر فاقد بیماری‌زایی شدید بوده و تنها ایجاد بیماری‌های تنفسی ملایم در انسان می‌نمایند. اپیدمی‌های ناشی از SARS-CoV و MERS-CoV نشان داد که این ویروس‌ها وقتی از حیوان به انسان منتقل می‌شوند به شدت بیماری‌زا می‌گردند. در دسامبر ۲۰۱۹ در ووهان چین، کروناویروس جدیدی بنام کروناویروس سندروم تنفسی حاد شدید^۳ مسبب شروع یک پاندمی دیگری گردید که به وسیله سازمان جهانی بهداشت به عنوان بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ نامگذاری شد (۴). تب، سرفه خشک، تنگی نفس، درد عضلانی، خستگی، تعداد لکوسیت‌های طبیعی یا کاهش یافته و شواهد رادیوگرافیک ناشی از ذات‌الریه تظاهرات بالینی شایع در بیماران مبتلا به COVID-19 می‌باشند، که با علائم عفونت‌های ناشی از دو گونه دیگر کروناویروس SARS-CoV و MERS-CoV مشابهت دارد (۵،۶). از این رو، اگرچه پاتوژن COVID-19 به خوبی شناسایی نشده است، اما مکانیزم‌های مشابه SARS-CoV و MERS-CoV می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد پاتوژن عفونت SARS-CoV-2 به ما ارائه دهند تا شناخت COVID-19 تسهیل گردد. گزارشی از مجله لنست نشان می‌دهد که سندرم دیسترس تنفسی شدید^۵ عامل اصلی مرگ ناشی از COVID-19 می‌باشد (۵). ARDS یک پدیده ایمونوپاتولوژیک شایع برای عفونت‌های SARS-CoV، SARS-CoV-2 و MERS-CoV می‌باشد (۶). اصلی‌ترین مکانیزم ARDS

طوفان سایتوکاینی^۶ می‌باشد، که در واقع پاسخ التهابی سیستمیک کنترل نشده و کشنده ناشی از آزادسازی و انتشار مقادیر زیادی از سایتوکاین‌های ضد التهابی (IL-1 α ، IFN- γ ، IL-1 β ، IL-6، IL-12، IL-18، IL-33، TNF- α ، TGF β ، و غیره) و کموکاین‌های (CCL2، CCL3، CXCL8، CXCL9، CXCL10 و غیره) توسط سلول‌های مؤثر سیستم ایمنی در برابر عفونت SARS-CoV می‌باشد (۷،۵). این پدیده و به همراه آن در صورت استفاده از کوریکواستروئیدها زمینه برای ایجاد سوپرااینفکشن به وسیله برخی از انواع میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها و قارچ‌ها در ریه فراهم می‌گردد. این امر می‌تواند سبب پیچیده‌تر شدن تظاهرات بالینی و مشکلاتی در درمان و حتی افزایش مرگ و میر ناشی از آن شود. عفونت‌های شدید ناشی از قارچ‌ها در افراد مبتلا به بیمارهای ویروسی نظیر آنفلونزا به کرات در مطالعات متعددی گزارش شده است به طوری که در حال حاضر آسپرژیلوزیس ریوی مهاجم مرتبط با آنفلونزا (IAPA) به طور شایع از بیماران بد حال بستری در بخش‌های مراقبت ویژه با پنومونی آنفلوآنزا گزارش می‌شود (۸-۱۳). به دنبال تعدادی گزارش‌های تک مرکزی، گروه مطالعاتی هلندی بلژیکی در بزرگترین مطالعه کوهورت میزان شیوع IAPA را در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه، ۱۹ درصد از ۴۳۲ بیمار بستری در بخش مراقبت‌های ویژه در طی ۷ دوره متوالی آنفلوآنزا، مبتلا به IAPA را نشان دادند. این مطالعه همچنین نشان داد که نیمی از بیماران مبتلا به IAPA در بخش مراقبت‌های ویژه^۷ (ICU) در گذشتند (۸). به طور کلی میزان شیوع IAPA بین ۷ الی ۲۸ درصد در اروپا، آسیا و آمریکا گزارش شده است. میزان مرگ و میر در این دسته بیماران نیز بالای ۵۰ درصد گزارش گردید (۸). نکته قابل تامل این که در جدیدترین مطالعه در سال ۲۰۲۰،

1. Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)
2. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)
3. SARS-CoV-2
4. COVID-19
5. Acute respiratory distress syndrome (ARDS)

6. Cytokine storm
7. Intensive Unit Care (ICU)

۶۳ درصد پزشکانی که در واحدهای مراقبت ویژه کار می کردند در طول پنج سال گذشته یا بیماری را مشاهده نکردند یا چیزی راجع به آن نشنیده بودند (۱۳).

این مطالعه با جستجو در سایت‌های Pubmed، Web of Science، Google Scholar و با استفاده از کلمات کلیدی COVID-19، SARS-CoV-2، آنفلونزا، آسپرژیلوزیس مهاجم و بیماری‌های قارچی مهاجم، با هدف مرور بر مطالعات انجام شده قبلی به جنبه‌های اپیدمیولوژیکی آسپرژیلوزیس مهاجم در زمینه بیماری‌های ویروسی و تطبیق آن با COVID-19 و با تفسیر آن، اهمیت توجه به بیماری‌های قارچی در زمینه COVID-19 در افزایش میزان بقاء بیماران مبتلا، انجام پذیرفت.

اپیدمیولوژی آسپرژیلوزیس در بیماران COVID-19

علی‌رغم این که چند ماهی از پیدایش و گزارش COVID-19 نمی‌گذرد، براساس مطالعات صورت گرفته در دنیا آمار گوناگونی از جداسازی قارچ‌ها در این بیماران به چشم می‌خورد که می‌تواند موجب طرح این پرسش گردد که آیا قارچ‌ها می‌توانند زمینه‌ای برای تشدید بیماری COVID-19 باشد و یا بر عکس آیا ابتلا به COVID-19 می‌تواند بر روی میزان استعداد ابتلا به عفونت‌های قارچی (به آن شکلی که در آنفلوآنزای فصلی نشان داده شده است) موثر باشد یا خیر؟ برای پاسخ به این پرسش نتایج مطالعات محققان در سراسر دنیا مورد بررسی قرار داده شد تا شاید کمکی در جهت درک بهتر ارتباط عفونت‌های حاصل از میکروارگانیسم‌های مختلف در انسان گردد. علاوه بر آن با توجه به نوپدید بودن COVID-19 و عدم وجود اطلاعات کافی در زمینه پاتوژن و عفونت‌های همراه آن، نتایج به‌دست آمده در ارتباط با MERS و یا SARS می‌تواند کمک مهمی در جهت درک عوامل تشدیدکننده ابتلا به COVID-19 را فراهم کند. به عنوان مثال مطالعات نشان داده است یکی از عوامل خطر مرتبط با فرم شدید و یا کشنده بیماری MERS، وجود سایر عفونت‌های همراه

می‌باشد (۱۵،۱۴). از این‌رو می‌توان استنباط کرد که عفونت‌های همراه دیگر ممکن است سبب تشدید COVID-19 شود.

در مطالعه Chen و همکاران بر روی ۴۸ بیمار مبتلا به ویروس CoV-SARS-۲، عفونت همزمان با قارچ‌ها در ۲۷/۱ درصد از مبتلایان مشاهده گردید (۱۶).

در مطالعه تک مرکزی گذشته نگر دیگری که بر روی بیماران با علائم پنومونی شدید و ملایم در ووهان چین با میانگین سنی ۵۵ سال صورت گرفت، از ۲۲۱ بیمار مورد بررسی، ۳/۲ درصد از بیماران مبتلا به پنومونی، عفونت همزمان با قارچ‌ها را نشان دادند (۱۷). همچنین تجزیه و تحلیل یافته‌های پاتولوژیک بیماران نشان داد که بیماران مبتلا به فرم شدید پنومونی COVID-19 در مقایسه با بیماران با پنومونی ملایم میزان بالاتری از عفونت‌های همزمان با قارچ‌ها را نشان داده‌اند ($P = ۰/۰۰۱$) و احتمال بروز عوارض بیش‌تر در آن‌ها نیز بالاتر می‌باشد. آن‌ها این گونه استنتاج نمودند که میزان ابتلا به عفونت‌های همزمان با عوامل دیگر از جمله سایر ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها، در بیماران با پنومونی شدید مبتلا به COVID-19 نسبت به بیماران با پنومونی ملایم به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. با توجه به آمار گزارش شده در این مطالعه از ۲۳ بیمار بستری در ICU، ۱۳/۳ درصد موارد که بهبودی نسبی تا کامل را پیدا کرده بودند، و از ۹ بیمار فوت شده در ICU در اثر COVID-19، ۴ (۴۴/۴ درصد) مورد دارای عفونت همزمان با قارچ‌ها بودند (۱۷).

در مطالعه Yu و همکاران بر روی ۳ بیمار مرد با رنج سنی ۶۵ الی ۸۰ سال مبتلا به COVID-19 در ووهان چین، نتایج نشان داد که هیچ نوع پاتوژن معمول، در دو بیمار شماره ۱ و ۳ در مقایسه با گروه کنترل سالم شناسایی نشده است (۱۸). ساختار میکروبی روده هم از نظر باکتریایی و هم از نظر قارچی نسبت به گروه کنترل سالم دارای نوسانات بسیار زیادی بود، به گونه‌ایی که در آزمایش سوآپ از ناحیه مقعد در دو روز متوالی از

HIV) به عنوان عوامل زمینه‌ساز مناسب برای عفونت‌های قارچی تهاجمی به ویژه آسپرژیلوزیس ریوی مهاجم توصیف شده‌اند (۲۱).

بر اساس نتایج مطالعات قبلی، جدا از فاکتورهای ژنتیکی، عوامل محیطی نیز به احتمال زیاد در ابتلا به IAPA نقش ایفا می‌کنند (۸-۱۲). IAPA اغلب در روزهای اول و یا حتی در همان روز بستری در بخش مراقبت‌های ویژه تشخیص داده می‌شود. این موضوع نشان می‌دهد که احتمالاً عفونت به وسیله اسپورهای آسپرژیلوس که توسط بیمار قبل از بستری در بیمارستان استنشاق شده است، ایجاد می‌شود. جدا از عوامل تشخیصی و ژنتیکی مولد IAPA، نحوه سازماندهی خدمات بهداشتی و درمانی منطقه ای/ناحیه‌ای نیز ممکن است بر میزان بروز IAPA در کشورها و قاره‌ها تأثیر بگذارد (۲۲). تحقیقات بنیادی نشان می‌دهد که نورامینیداز در ایمنی میزبان در برابر گونه‌های آسپرژیلوس نقش داشته و مهار کردن نورامینیداز می‌تواند خطر ابتلا به سوپرااینفکشن ناشی از آسپرژیلوس را افزایش دهد (۲۳). لذا این طور استنباط شده است که ممکن است شیوع بالای IAPA در سال‌های اخیر به دلیل استفاده گسترده از مهارکننده‌های نورامینیداز در بیماران مبتلا به آنفلوانزا باشد. شواهد نشان می‌دهد که ابتلا به IPA در بیماران مبتلا به آنفلوانزا باعث افزایش چشمگیر مرگ و میر در آنها می‌گردد، به گونه‌ای که در مطالعه Ku و همکاران که بر روی ۴۳۲ بیمار مبتلا به آنفلوانزا صورت گرفت میزان مرگ و میر ناشی از IAPA در یک دوره ۹۰ روزه (۵۳ درصد) در مقایسه با بیماران مبتلا به آنفلوانزا بدون ابتلا به آسپرژیلوزیس ریوی تهاجمی (۲۸ درصد) افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد ($P < 0.01$) (۱۰).

این نتایج قویا نشان می‌دهد که IAPA به طور مستقل با مرگ و میر در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه با آنفلوانزا همراه است. هر چند داده‌های مشاهده‌ای هرگز نمی‌توانند رابطه علت و معلولی را با اطمینان ۱۰۰ درصد اثبات نمایند، اما ارتباط بین IAPA

بیمار شماره ۱، جنس غالب قارچی *Kluyveromyces* بوده است. در حالی که آسپرژیلوس (۵۹/۴ درصد) به عنوان جنس غالب فلور قارچی در روده بیمار شماره ۳ گزارش گردید. به طور کلی، تمام داده‌ها با میکروبیوتای روده انسان سالم تفاوت معناداری را نشان داد ($P > 0.01$). علاوه بر این، به طور قابل توجهی قارچ‌های شناسایی شده در میکروبیای روده‌ی دو بیمار مبتلا به COVID-19 از فلور قارچی معمول روده افراد سالم که معمولاً مخمرهایی نظیر کاندیدا و یا ساکارومایسس سرویسیه می‌باشند تبعیت ننموده، و برخی از عوامل قارچی غیر معمول مانند آسپرژیلوس و *Kluyveromyces* فلور غالب قارچی روده بودند. در مطالعه موردی دیگر در چین که وجود سایر میکروارگانیسم‌های همراه در COVID-19 مورد ارزیابی قرار گرفت، مشخص شد هیچ ویروس مشترک تنفسی همراه با COVID-19 وجود نداشت، در حالی که *Klebsiella pneumoniae* و *Aspergillus flavus* و *Acinetobacter baumannii* در یک بیمار و ابتلا به عفونت قارچی ناشی از کاندیدا آلبيکنس و کاندیدا گلابراتا در ۴ مورد دیگر از افراد مبتلا به COVID-19 تشخیص داده شد (۱۹). هر چند در مطالعه دیگری نیز تعداد کمی از ایزوله‌های قارچی با نیاز بالینی به درمان‌های ضد قارچی در افراد مبتلا به COVID-19 گزارش شده است، ولی می‌توان گفت، توانایی شناسایی سریع پاتوژن اصلی و سایر عفونت‌هایی که ممکن است در اوایل بیماری وجود داشته باشند، فرصت‌هایی را برای مداخله هدفمند در بیمارانی که مشکوک و یا تأیید شده نسبت به ابتلا به COVID-19 می‌باشند را فراهم می‌نماید (۲۰). هر چند با توجه به نوپدید بودن COVID-19، ارزیابی دقیق از اهمیت عفونت‌های قارچی همراه با این بیماری نیاز به زمان بیش‌تری می‌باشد، اما باید این واقعیت را مد نظر قرار داد که عفونت‌های ویروسی نظیر آنفلوانزا همراه با عوامل خطر کلاسیک (از جمله بیماران دچار بدخیمی‌های خونی، پیوند اعضا، پیوند سلول‌های بنیادی خونساز، و

و میزان مرگ و میر، مستقل از عواملی از قبیل شدت بیماری و نقص های سیستم ایمنی بیماران بستری در ICU بوده است (۱۰).

نتایج مطالعات اخیر نشان می دهد، استفاده قبلی از کورتیکواستروئید ها قبل از بستری شدن بیماران مبتلا به فرم شدید آنفلوآنزا در ICU، نیز به میزان قابل توجهی بر میزان مرگ و میر تأثیر می گذارد (۲۵،۲۴). از این رو قویا توصیه شده است که احتیاط های لازم در مورد استفاده و تجویز کورتیکواستروئید برای درمان بیماران مبتلا به پنومونی شدید در طول آنفلوآنزا به شدت مدنظر قرار گیرد.

روش های پیشنهادی تشخیصی قارچ شناسی برای آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران با COVID 19

به طور کلی برای تشخیص بیماری های قارچی به ویژه در انواع مهاجم و فرصت طلب دو روش وابسته به کشت و غیر وابسته به کشت وجود دارد. در هر کدام از این دو روش مهم ترین موضوع تهیه نمونه مناسب می باشد که مطمئنا با توجه به اهمیت قابلیت انتقال ویروس از طریق ترشحات تنفسی، جمع آوری نمونه از بیماران مبتلا و آماده سازی نمونه و انجام آزمایشات قارچ شناسی می بایستی تحت شرایط ویژه و زیر هود استاندارد میکروبیولوژی انجام شود. نمونه های مناسب برای روش وابسته به کشت، خلط، ترشحات به دست آمده از شستشوی برونشی، برونکوآلوئولار لایوژ^۱ و بیوپسی از نواحی استریل بدن از جمله بافت ریه می باشد. با در نظر گرفتن این موضوع که به جز نمونه های بیوپسی بقیه موارد از ترشحات و مایعات غیر استریل در شرایط معمول بدن محسوب می شوند، قبل از کشت باید با انجام آزمایشات میکروسکوپی مستقیم از حضور هایف یا مسیلیوم قارچی در این نمونه ها مطمئن شد. زیرا حضور کونیدی قارچ به تنهایی در این نمونه ها نیز

می تواند باعث مثبت شدن کشت شود. با توجه به این که کونیدی قارچ های موجود در محیط اطراف به راحتی از طریق تنفس وارد این ترشحات شده و تا زمانی که شرایط میزبان به آن ها اجازه ژرمیناسیون ندهند در ایجاد بیماری های قارچی مهاجم نقشی ندارند، در مواردی که تنها از نتایج کشت این نمونه ها برای تشخیص بیماری استفاده می شود، می تواند باعث تفسیر نامناسبی از حضور بیماری قارچی در افراد مشکوک شوند. آزمایش میکروسکوپی مستقیم با همگن سازی نمونه ای خلط و BAL با پانکراتین و سانتریفیوژ نمودن آن ها و سپس استفاده از رسوب نمونه و آماده سازی آن با هیدروکسید پتاسیم ۲۰ درصد و استفاده از میکروسکوپ های معمولی قابل انجام می باشد. در مواردی که میکروسکوپ فلئورسانس موجود باشد می توان از رنگ کالکوفلوئور سفید استفاده نمود که حساسیت بالاتری در مقایسه با روش قبلی دارد. نمونه های بیوپسی از نواحی استریل بدن نظیر بافت ریه به عنوان استاندارد طلایی تشخیصی برای عفونت های قارچی مهاجم از جمله آسپرژیلوزیس می باشد. هر چند در بسیاری از بیماران بستری در ICU به دلیل وضعیت وخیم بیماری امکان انجام بیوپسی وجود ندارد، با این حال روش های سنتی نظیر آزمایش میکروسکوپی مستقیم و یا هیستوپاتولوژی، علی رغم داشتن مزایای انجام آسان، در دسترس بودن و ارزانی، دارای حساسیت به نسبت پایین (در بیماران ICU کم تر از ۵۰ درصد) و نیاز به افراد متخصص برای انجام و گزارش آزمایش می باشد.

در روش غیر وابسته به کشت، جستجوی آنتی ژن گالاکتومانان^۲ و اسید نوکلئیک قارچ^۳ در نمونه های سرم و BAL از روش های مورد تایید می باشند. این روش ها دارای حساسیت بالاتر در شناسایی افراد مشکوک به آسپرژیلوزیس مهاجم در مقایسه با روش های وابسته به کشت می باشند. این آزمایشات به تشخیص بیماری در

2. Galactomannan antigen (GM)
3. Deoxyribonucleic acid (DNA)

1. Bronchoalveolar lavage (BAL)

سطح احتمالی^۱ کمک می نمایند. آزمایش GM بر روی سرم به دست آمده از بیماران ICU یا بیمارانی که نوتروپنیک نمی باشند از حساسیت پائینی برخوردار می باشد (۲۶، ۲۷). هر چند اخیراً GM سرمی با شاخص بالای ۱/۲۴ به عنوان یک شناساگر مناسب برای تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران ICU مورد توجه قرار گرفته است (۲۸). در همین بیماران در صورت دسترس بودن نمونه BAL با حساسیت قابل توجهی می توان از آزمایش GM برای تشخیص بیماری استفاده نمود (۲۹، ۳۰). نتایج مطالعات هدایتی و همکاران (۳۱، ۳۰) در بیماران ایرانی نیز یافته های مطالعات قبلی را تایید می نماید. براساس جدیدترین توافق از تعریف بیماری های قارچی مهاجم به وسیله EORTC-MSG در صورت به دست آمدن شاخص بالاتر یا مساوی ۱ از GM بر روی هر یک از نمونه های سرم، پلاسما یا BAL و یا بدست آمدن شاخص GM مساوی یا بالاتر از ۰/۷ از نمونه های سرم یا پلاسما به اضافه شاخص مساوی یا بالاتر از ۰/۸ از نمونه های BAL می تواند یک معیار تشخیصی قارچ شناسی در کنار عوامل مربوط به میزان و معیارهای کلینیکی برای تشخیص بیماری استفاده نمود (۲۱).

روش مولکولی در تعریف جدید EORTC-MSG به عنوان یکی از معیارهای قارچ شناسی در تشخیص مورد توجه قرار گرفته است. این روش از جنبه هایی از دیگر روش های غیر وابسته به کشت از موقعیت مناسب تری برای تشخیص برخوردار می باشد. اولاً از حساسیت بالاتری برخوردار می باشد ثانیاً در این روش می توان به تشخیص به جنس و گونه قارچی ایجاد کننده بیماری نیز دست یافت (۳۲، ۳۳). علاوه بر این با کیت های تجاری که در حال حاضر در دسترس می باشند می توان از وضعیت گونه های آسپرژیلوس ایجاد کننده بیماری از نظر مقاومت به داروهای ضد قارچی تری آزول ها نیز

اطلاع یافت (۳۴). این مزایا به ویژه برای تجویز داروی ارجح و در نتیجه درمان مناسب بیماری قارچی مهاجم بسیار کمک کننده می باشد. نکته حائز اهمیت در مدیریت بیماری های قارچی مهاجم، تشخیص زودرس بیماری می باشد، که روش های غیر وابسته به کشت در مقایسه با روش های وابسته به کشت از موقعیت ممتازی برخوردار می باشد (۳۳-۲۶) براساس مطالعات انجام شده و تجربیات مولفین، در این روش ها تا چند روز قبل از بروز علائم کلینیکی امکان دستیابی به تشخیص بیماری وجود دارد (۳۵). از این رو استفاده از این روش برای تشخیص بیماری های قارچی مهاجم برای افزایش میزان بقا در افراد با شرایط زمینه ایی و نقص سیستم ایمنی تاکید می شود.

از آنجایی که COVID-19 از نظر علامت های بالینی و ویژگی های پاسخ ایمنی میزان نسبت به عامل ویروسی ایجاد بسیار شبیه به آنفلونزا می باشد، تصور این که این بیماری هم بتواند زمینه مناسبی برای ایجاد بیماری های مهاجم به وسیله قارچ های فرصت طلب به ویژه آسپرژیلوس باشد دور از انتظار نمی باشد. یافته های محدود در این زمینه می تواند گواه مناسبی از اهمیت بیماری های قارچی در این بیماران باشد. از طرف دیگر با توجه به تمرکز بالای کادر درمانی در مواجهه با بیماران COVID-19 بر درمان این بیماری و همین طور کنترل سوپراینفکشن باکتریایی، می تواند با غفلت از بیماری های کشنده قارچی همراه شود. این موضوع می تواند باعث افزایش میزان مرگ و میر در بیماران COVID-19 در اثر بیماری های قارچی شود. از این رو قویاً پیشنهاد می شود تشخیص زودرس بیماری های قارچی مهاجم به ویژه آسپرژیلوزیس با روش های غیر وابسته به کشت در این بیماری نوظهور در بیماران با علائم شدید در دستور کار پزشکان قرار گیرد.

1. Probable invasive aspergillosis

2. European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium (EORTC-MSG)

References

1. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019; 17(3): 181-192.
2. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348(20): 1953-1966.
3. de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J Virol* 2013; 87(14): 7790-7792.
4. Wu JT, Leung K, Leung GM. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet* 2020; 395(10225): 689-697.
5. 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.
6. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* 2020; 8(4):420-422.
7. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol* 2017; 39(5): 529-539.
8. Peiris JS, Guan Y, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med* 2004; 10(12 Suppl): S88-97.
9. Schauwvlieghe AFAD, Rijnders BJA, Philips N, Verwijs R, Vanderbeke L, Van Tienen C, et al. Dutch-Belgian Mycosis Study Group. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir Med* 2018; 6(10): 782-792.
10. Ku YH, Chan KS, Yang CC, Tan CK, Chuang YC, Yu WL. Higher mortality of severe influenza patients with probable aspergillosis than those with and without other coinfections. *J Formos Med Assoc* 2017; 116(9):660 - 670.
11. Huang L, Zhang N, Huang X, Xiong S, Feng Y, Zhang Y et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with influenza infection: a retrospective study and review of the literature. *Clin Respir J* 2019; 13(4): 202-211.
12. Zou P, Wang C, Zheng S, Guo F, Yang L, Zhang Y, et al. Invasive Pulmonary Aspergillosis in Adults With Avian Influenza A (H7N9) Pneumonia in China: A Retrospective Study. *J Infect Dis* 2020; 221(Supplement_2): S193-S197.
13. Thevissen K, Jacobs C, Holtappels M, Toda M, Verweij P, Wauters J. International survey on influenza-associated pulmonary aspergillosis (IAPA) in intensive care units: responses suggest low awareness and potential underdiagnosis outside Europe. *Crit Care* 2020; 24: 84.
14. Arabi YM, Al-Omari A, Mandourah Y, Al-Hameed F, Sindi AA, Alraddadi B, et al. Critically ill Patients With the Middle East Respiratory Syndrome: A Multicenter Retrospective Cohort Study. *Crit Care Med* 2017; 45(10): 1683-1695.
15. Al-Hameed F, Wahla AS, Siddiqui S, Ghabashi A, Al-Shomrani M, Al-Thaqafi A,

- et al. Characteristics and Outcomes of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Patients Admitted to an Intensive Care Unit in Jeddah, Saudi Arabia. *J Intensive Care Med* 2016; 31(5): 344-348.
16. Chen X, Zhao B, Qu Y, Chen Y, Xiong J, Feng Y, et al. Detectable serum SARS-CoV-2 viral load (RNAemia) is closely associated with drastically elevated interleukin 6 (IL-6) level in critically ill COVID-19 patients. *Clin Infect Dis* 2020 Apr 17. Preprints.
 17. Zhang G, Hu C, Luo L, Fang F, Chen Y, Li J, et al. Clinical features and outcomes of 221 patients with COVID-19 in Wuhan, China. *MedRxiv*. 2020 Jan 1. Preprint.
 18. Yu L, Tong Y, Shen G, Fu A, Lai Y, Zhou X, et al. Immunodepletion with Hypoxemia: A Potential High Risk Subtype of Coronavirus Disease 2019. *MedRxiv*. 2020 March 6. Preprint.
 19. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Yet al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 2020; 395(10223): 507-513.
 20. Moore SC, Penrice-Randal R, Alruwaili M, Dong X, Pullan ST, Carter D, et al. Amplicon based MinION sequencing of SARS-CoV-2 and metagenomic characterisation of nasopharyngeal swabs from patients with COVID-19. *MedRxiv* 2020 March 8. Preprint.
 21. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis* 2019 Dec 5. pii: ciz1008.
 22. Rijnders BJ, Schauwvlieghe AF, Wauters J. Influenza-associated pulmonary aspergillosis: a local or global lethal combination? *Clin Infect Dis* 2020 Jan 6. pii: ciaa010.
 23. Van De Veerdonk F Jr, Dewi I, Cunha C, vanderBeeke L, Jaeger M, Gresnigt M, et al. 960. Inhibition of host neuraminidase increases susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis. *Open Forum Infect Dis* 2018; 5(Suppl 1): S36.
 24. Vanderbeke L, Spriet I, Breyneart C, Rijnders BJA, Verweij PE, Wauters J. Invasive pulmonary aspergillosis complicating severe influenza: epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis* 2018; 31(6): 471-480.
 25. Moreno G, Rodríguez A, Reyes LF, Gomez J, Sole-Violan J, Díaz E, et al. Corticosteroid treatment in critically ill patients with severe influenza pneumonia: a propensity score matching study. *Intensive Care Med* 2018; 44(9): 1470-1482.
 26. Cai X, Ni W, Wei C, Cui J. Diagnostic value of the serum galactomannan and (1, 3)- β -D-glucan assays for invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients. *Intern Med* 2014; 53(21): 2433-2437.
 27. Teering S, Verreth A, Peeters A, Van Regenmortel N, De Laet I, Schoonheydt K, et al. Prognostic value of serum galactomannan in mixed ICU patients: a retrospective observational study. *Anaesthesiol Intensive Ther* 2014; 46(3): 145-154.
 28. Dabas Y, Mohan A, Xess I. Serum galactomannan antigen as a prognostic and diagnostic marker for invasive aspergillosis in heterogeneous medicine ICU patient population. *PLoS One* 2018; 13(4): e0196196.
 29. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S.

- Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(1): 27-34.
30. Khodavaisy S, Hedayati MT, Alialy M, Habibi MR, Badali H. Detection of galactomannan in bronchoalveolar lavage of the intensive care unit patients at risk for invasive aspergillosis. *Curr Med Mycol* 2015; 1(1): 12-17.
 31. Taghizadeh-Armaki M, Hedayati MT, Moqarabzadeh V, Ansari S, Mahdavi Omran S, Zarrinfar H, et al. Effect of involved *Aspergillus* species on galactomannan in bronchoalveolar lavage of patients with invasive aspergillosis. *J Med Microbiol* 2017; 66(7): 898-904.
 32. Hardak E, Fuchs E, Leskes H, Geffen Y, Zuckerman T, Oren I. Diagnostic role of polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid for invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients-A retrospective cohort study. *Int J Infect* 2019; 83: 20-25.
 33. Cruciani M, Mengoli C, Barnes R, Donnelly JP, Loeffler J, Jones BL, et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 9: CD009551.
 34. Chong GM, van der Beek MT, von dem Borne PA, Boelens J, Steel E, Kampinga GA, et al. PCR-based detection of *Aspergillus fumigatus* Cyp51A mutations on bronchoalveolar lavage: a multicentre validation of the AsperGenius assay® in 201 patients with haematological disease suspected for invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71(12): 3528-3535.
 35. Hedayati MT, Khodavaisy S, Alialy M, Omran SM, Habibi MR. Invasive aspergillosis in intensive care unit patients in Iran. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2013; 56(2): 52-56.