مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۵، شماره۲
خرداد-تیر ۱۴۰۱، صفحه ۵۱۳-۵۰۵

***www.mums.ac.ir***
***Medical Journal of Mashhad***
***University of Medical Sciences***
***Vol. 65, No.2, P: 505-513***
***May-Jul 2022***

**مقاله اصلی**

# شناسایی عفونت‌های قارچی مهاجم در مبتلایان به بدخیمی‌های خونی با روش Real-time PCR

**تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۲- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۹**

محمد جواد نجف زاده [۱*]
محسن دشتی [۲]
محمد حسن اعلمی [۳]
منور افضل اقایی [۴]
زهرا بدیعی [۵]
پریسا بدیعی [۶]
علی قاسمی [۳]
حمید فرهنگی [۳]

[۱] *دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران*
[۲] *دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران*
[۳] *دانشیار گروه اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران*
[۴] *دانشیار گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران*
[۵] *گروه اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران*
[۶] *استاد مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران*

Email: najafzadehmj@mums.ac.ir

## خلاصه

### مقدمه

عفونت‌های قارچی تهاجمی ناشی از دو جنس *آسپرژیلوس* و *کاندیدا* اغلب در بیماران لوسمی و پیوند بدلیل کاهش شدید سیستم دفاعی بدن بروز می‌کند. تشخیص سریع و شروع درمان در مراحل اولیه بیماری باعث کاهش مرگ و میر ناشی از عفونت‌های قارچی می‌شود. هدف از این مطالعه تشخیص عفونت قارچی مهاجم بوسیله Real-time PCR در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی و پیوند مغز استخوان بود.

### روش کار

بیماران با نقص سیستم ایمنی بستری در بیمارستانهای مشهد بین فروردین تا آبان ماه ۱۳۹۷، جهت وجود عفونت قارچی مهاجم به روش TaqMan Real-time PCR با پروب فلورسنس و پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی DNA قارچ در نمونه خون محیطی ارزیابی شدند.

### نتایج

۷۵ نفر بیمار در این مطالعه شرکت کردند. نسبت زن به مرد (۴۵/۳٪) ۳۴ به (۵۴/۷ ٪) ۴۱ نفر بود. بیشترین بیماری زمینه‌ای لوسمی‌لمفوبلاستیک حاد (۴۵/۳٪) و لوسمی‌میلوئیدی حاد (۳۲ ٪) و کمترین مربوط به بیماران هموفاگوسیتیک لمفوهیستوسیتوزیز (۱/۳٪) بود. نتایج کشت خون جداسازی *کاندیدای* غیر*آلبیکنس* (۱۳/۳ ٪) و *کاندیدا آلبیکنس* (۱/۳ ٪) را نشان داد. *آسپرژیلوس* از کشت خون جدا نشد. آزمایش مولکولی در(۶/۷ ٪) ۵ بیمار از نظر *کاندیدا آلبیکنس* و(۱۲ ٪) ۹ بیمار از نظر *آسپرژیلوس* مثبت شد و (۸۱/۳ ٪) ۶۱ بیمار از نظر عفونت قارچی مهاجم منفی بودند.

### نتیجه گیری

قارچ‌ها یکی از بزرگترین عوامل عفونت در بیماران مبتلا به ناهنجاری‌های خونی هستند. تکنیک مولکولی Real-time PCR می‌تواند بعنوان روشی قابل اعتماد و سریع برای تشخیص این عفونت‌ها و مدیریت بیماری در افراد در معرض خطر باشد.

### کلمات کلیدی

آسپرژیلوزیس مهاجم ، کاندیدیازیس مهاجم ، Real-time PCR، مشهد، ایران

**پی نوشت:** این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

**مقدمه**

قارچ‌ها از عوامل اصلی عفونت سیستمیک در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی بستری در بیمارستان‌ها می‌باشند. تشخیصی و درمان زود هنگام این عفونت‌ها به دلیل بالا بودن میزان کشندگی آنها بسیار مورد توجه می‌باشند (۱-۳). بیشترین عوامل خطر جهت ابتلا به این بیماری استفاده از کاتتر وریدی مرکزی، استفاده از آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف، بستری طولانی مدت در بخش‌های مراقبت‌های ویژه با یا بدون تهویه کمکی (ventilation) (بیش از ۳ روز)، سابقه جراحی بزرگ، همودیالیز و استفاده از داروهای سرکوب کننده ایمنی گزارش شده است (۴). در طی دهه‌های گذشته، شیوع این عفونت‌ها افزایش یافته و مرگ و میر ناشی از آنها از معضلات مهم سلامت عمومی‌جامعه محسوب می‌شود. آسپرژیلوزیس و کاندیدیازیس شایعترین عفونت‌های قارچی مهاجم می‌باشند. کاندیدمی‌به‌عنوان چهارمین علت اصلی عفونت خون مرتبط با مراقبت‌های بهداشتی در بخش مراقبت‌های ویژه گزارش شده است (۵). گونه‌های *کاندیدا* و *آسپرژیلوس* رایج‌ترین ارگانیسم‌های جدا شده از عفونت‌های قارچی سیستمیک هستند. از آنجایی که گونه‌های *کاندیدا غیرآلبیکانس* و گونه‌های *آسپرژیلوس* غیر *فومیگاتوس* در حال افزایش هستند، روش‌های تشخیصی جدیدی برای پوشش تعداد زیادی از گونه‌های قارچی مورد نیاز است (۶, ۷). بررسی‌های انجام شده شیوع بیماری آسپرژیلوزیس را در بخش‌های مراقبت‌های ویژه از ۰/۳ درصد تا بیش از ۱۹٪ گزارش نموده و پیش‌بینی‌شده است که میزان مرگ و میر در این بیماران نیز بیشتر از ۸۰ ٪ باشد (۱, ۲). این عفونت‌ها دارای انتشار جهانی بوده و در حال افزایش می‌باشد. اگر چه بروزعفونت‌های آسپرژیلوزیس در مقایسه با عفونت‌های کاندیدایی بسیار کمترمی‌باشد، ولی این بیماری بعلت مرگ ومیر زیاد دارای اهمیت ویژه‌ای در ایجاد عفونت در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی مثل مبتلایان به بدخیمی‌های خونی، پیوند مغز استخوان و پیوند عضو می‌باشند (۸, ۹). تشخیص و درمان این بیماری‌ها دشوار می‌باشد و دستیابی به اطلاعات لازم در ارتباط با اپیدمیولوژی و پاتوژنسیتی آنها نیازمند مطالعات با روش‌های جدید تشخیصی و فرآیندهای درمانی مناسب می‌باشد. تشخیص این عفونت‌ها با استفاده از تصاویر رادیولوژی و بررسی مشاهده تظاهرات غیرطبیعی مثل آتلاکتازی و air-crescent و halo sign در بیماران نوتروپنیک دارای حساسیت‌های کم و حدود ۵ ٪ می‌باشند (۱۰). استفاده ازروش‌های تشخیصی تهاجمی‌مانند هیستوپاتولوژیک و کشت نمونه‌های بافتی نیز به علت وضعیت‌های کلینیکی وخیم بیماران مثل ترومبوسیتوپنی، غیرعملی می‌باشند. روش کشت نیز قادر به تفریق بین فرم‌های تهاجمی‌و کلونیزاسیون از هم نبوده و ارزش اخباری مثبت در حدود ۶۰-۲۰ ٪ دارد. و همچنین آزمایش مستقیم و کشت معمولاً زمان بر است و در مراحل پایانی بیماری مثبت می‌شوند و تاخیر در درمان با نتیجه ضعیفی در بهبودی بیماران همراه است(۱۱). به دلیل محدودیت این روش‌های تشخیصی و کشندگی بسیار بالای بیماری، استفاده از روش‌های غیر وابسته به کشت بر پایه روش‌های مولکولی در نمونه‌های بالینی بسیار مفید گزارش شده است (۱۲, ۱۳). معرفی فناوری Real-time PCR در تشخیص عفونت‌های قارچی، واقعیت‌پذیری نتایج rPCR را در مقایسه با نتایج به‌دست‌آمده با PCR معمولی افزایش داده است. عدم وجود فرآیندهای Post-PCR پس از آمپلیفیکیشن، خطر واکنش‌های مثبت کاذب را که ممکن است در طول استفاده از الکتروفورز آکریل آمید یا ژل آگارز رخ دهد، به شدت کاهش داده است. علاوه بر این، real-time PCR می‌تواند نتایج را در کمتر از ۲ ساعت ارائه دهد، که برای تصمیم گیری بالینی لازم است (۱۴). هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان عفونت‌های مهاجم قارچی (آسپرژیلوزیس و کاندیدیازیس) با استفاده از روش تشخیصی Real-time PCR در بیماران دارای نقص

سیستم ایمنی (مبتلایان به ناهنجاری‌های خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان) بود.

## روش کار

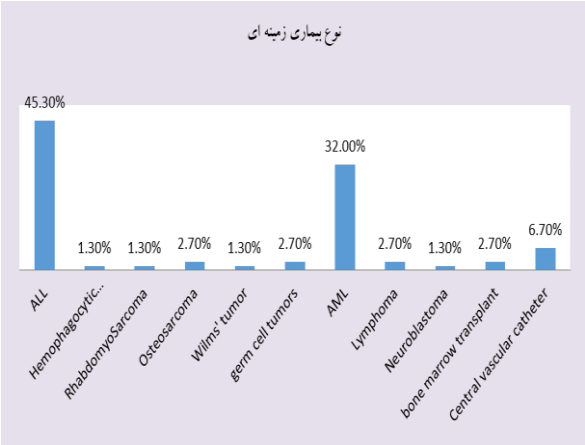
مطالعه حاضر به صورت توصیفی ـ مقطعی و جمعیت مورد مطالعه بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی در بخش‌های انکولوژی بیمارستان دکتر شیخ و بیمارستان قائم (عج) و بخش پیوند مغز استخوان بیمارستان منتصریه مشهد در مدت ۸ ماه از تاریخ فروردین ۹۷ تا آبان ۹۷ بود. این مطالعه بوسیله گروه اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد تایید شده بود (کد اخلاق: IR.MUMS.fm.REC.1395.5). معیارهای ورود به مطالعه شامل افراد مبتلا به بدخیمی‌های خونی، دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان ، مبتلایان به نوتروپنی بیشتر از ۱۰ روز، مبتلایان به تب بیش از ۹۶ ساعت علیرغم درمان با آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف و بیمارانی که به مدت طولانی از کورتیکواستروئیدها و ایمونوساپرس‌ها استفاده می‌کردند، بود. معیارهای خروج در این مطالعه عدم رضایت بیمار و یا همراهان او از انجام خونگیری و یا وضعیت نامناسب بالینی بیمار بود. اطلاعات دموگرافیک از بیماران شامل سن، جنس، شرح مختصری از علائم بیماری مثل تب بالا مقاوم به درمان و یا تب عود کننده، علائم نارسایی تنفسی حاد، یافته‌های برونکوسکوپی، علائم عفونت سینوس، بررسی میزان سلولهای خونی مثل تعداد گلبول‌های سفید و وجود نوتروپنی، انجام شیمی‌درمانی و انجام رادیوتراپی و نوع بدخیمی، استفاده از درمان ضد قارچی و زمان شروع دارو از پرونده بیماران جمع آوری شد. همچنین در شرایط استریل مقدار ۷ سی سی خون گرفته و ۴ سی سی داخل بطری کشت خون و ۳ سی سی داخل لوله حاوی ماده ضد انعقاد ریخته و پس از ثبت مشخصات بر روی نمونه ها، لوله‌ها و بطری‌های کشت خون بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردیدند. بطری‌های کشت خون به صورت هوازی در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد در داخل دستگاه BACTEC انکوبه شدند. هر ۴۸ ساعت یکبار بر روی دو محیط سابورو دکستروز آگار(مرک، آلمان) کشت داده شدند یک محیط سابورو دکستروز اگار در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد برای تشخیص کاندیدا انکوبه شد و پلیت دیگر تا دو هفته در دمای اتاق رها شد تا رشد قارچ‌های رشته‌ای تشخیص داده شود. این بطری‌ها به مدت دو هفته نگهداری شد و از نظر رشد قارچی مورد بررسی قرار گرفتند. پلاسمای لوله‌های خون حاوی ماده ضد انعقاد جدا شده و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰ – درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

در این مطالعه جهت انجام مراحل استخراج DNA از کیت استخراج (QIAamp DNA Blood Mini Kit ) استفاده شد. جهت اطمینان از کیفیت استخراج DNA از دستگاه نانودراپ شرکت Thermo استفاده شد. جهت انجام آزمایشات مولکولی از دستگاه Real Time PCR مدل Rotor Gen 6000 ( Corbett، استرالیا)و کیتهای تجاری *Aspergillus* all pathogenic subtypes genesig® Standard Kit و *Candida albicans* genesig® Standard Kit از شرکت Primer design استفاده شد . در این مطالعه از سوش‌های استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (CBS1912) و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*(DTO-384-E4 ) بعنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل جهت کنترل منفی استفاده شد . بررسی ارتباط بین بیمار و نوع عفونت قارچی با استفاده از آزمون دقیق فیشر مشخص گردید.

## نتایج

در این مطالعه تعداد ۷۵ بیمار دارای شرایط ورود به مطالعه بودند. ازاین تعداد ۳۴ نفر (۴۵/۳ ٪) زن و ۴۱ نفر (۵۴/۷ ٪) مرد بودند که میانگین سنی ۸/۸ و میانه ۵ و دامنه میان چارکی ۶ سال بود. فراوانی نوع بیماری زمینه‌ای در بیماران مورد مطالعه شامل لوسمی‌لنفوسیتی حاد(ALL) (۴۵/۳ ٪)، لوسمی‌میلوئیدی حاد (AML) (۳۲ ٪)، سایر

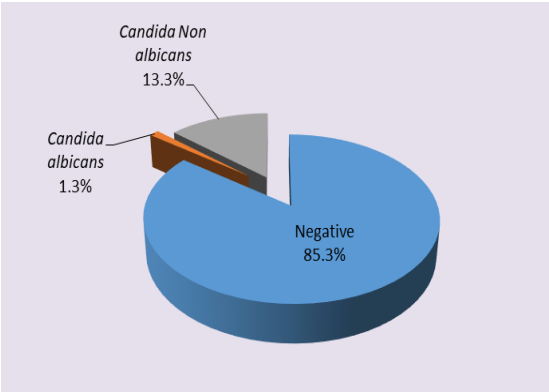
بیماری‌ها (۲۲/۷ ٪) و کمترین مربوط به بیماری همو فاگوسیتیک لیمفوهیستوسیتوزیز (۱/۳٪) بود (نمودار ۱).



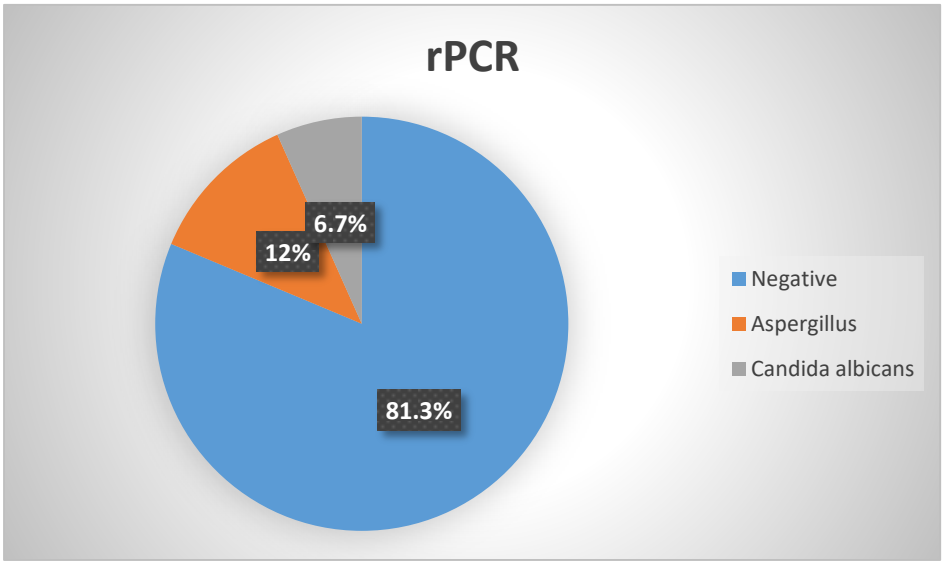

نمودار ۱. فراوانی نوع بیماری زمینه‌ای در بیماران مشکوک به عفونت‌های قارچی مهاجم

فراوانی نتایج کشت خون در بیماران مورد مطالعه نشان داد که هیچ کشتی ازنظر *آسپرژیلوس* مثبت نشد. با توجه به بررسی‌های بالینی و آزمایشگاهی صورت گرفته و تجزیه وتحلیل نتایج علائم بالینی بیماران (مثل یافته‌های رادیوگرافی، سی‌تی‌اسکن و تظاهرات و علائم کلینیکی)، فاکتورهای زمینه‌ای میزبان و آزمایش‌های قارچ‌شناسی بر اساس دستورالعمل تأیید شده در موسسه‌های بین المللی (۱۵)، ۱۱ (۱۴/۶ ٪) مورد عفونت تأیید شده دربیماران وجود داشت که علاوه بر مشاهده معیارهای کلینیکی و معیارهای میزبان، گونه کاندیدا از کشت خون بیمار جدا گردیده و کاندیدیازیس مهاجم شناسایی شد. که از این بیماران (۱۰ بیمار) گونه‌های کاندیدایی غیر از *کاندیدا آلبیکنس* (۱۳/۳ ٪) و یک گونه *کاندیدا آلبیکنس* (۱/۳ ٪) گزارش‌شده است (نمودار ۲).

نتایج آزمایشات مولکولی در ( ۸۱/۳ ٪) ۶۱ بیمار منفی، ۵ بیمار(۶/۷ ٪) ازنظر *کاندیدا آلبیکنس* و۹ بیمار(۱۲ ٪) ازنظر *آسپرژیلوس* مثبت بودند. درصد بهبودی ۹۸/۷ ٪ و درصد فوت ۳/ ۱٪ بوده است (نمودار۳).




نمودار ۲. فراوانی گونه‌های کاندیدای جدا شده از کشت خون بیماران مبتلا به بدخیمی‌و پیوند مغز استخوان




نمودار ۳. فراوانی نتایج آزمون Real- time PCR در بیماران مبتلا به بدخیمی و پیوند مغز استخوان

## بحث

طی دو دهه گذشته، فاکتورهای خطر متعددی سبب افزایش عفونت قارچی مهاجم شده اند که استفاده از وسایل پزشکی تهاجمی‌مانند کاتترهای وریدی، آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف، مصرف کورتیکو استروئیدها و نوتروپنی از مهم‌ترین این فاکتورها هستند (۲۰-۱۶). از دیگر فاکتورهایی که بیماران را جهت ابتلا به عفونت کاندیدایی مهاجم تهدید می‌کند می‌توان به شیمی درمانی و درمان‌های مهارکننده سیستم ایمنی در بیماران مبتلابه بدخیمی‌های خونی یا سرطانی اشاره نمود(۱۶). در این مطالعه جمعیت مورد مطالعه بیماران با ناهنجاری‌های خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان بودند و شایعترین بیماری زمینه‌ای لوسمی‌لنفوسیتی حاد بود.

تشخیص افتراقی عوامل قارچی بیماری‌زا قبل از شروع درمان جهت جلوگیری از شکست درمان دارویی از اهمیت بالایی برخوردار است. زیرا مقاومت دارویی برای گونه‌های قارچی گزارش شده است (۲۰-۱۸). تشخیص عفونت آسپرژیلوس مهاجم مشکل است زیرا علائم بالینی متغیر و غیر اختصاصی است. در اکثر موارد تشخیص بر پایه ترکیب علائم بالینی، رادیولوژیکی، میکروبیولوژیکی و یافته‌های هیستوپاتولوژیکی استوار است. تکنیک‌های رایج تشخیصی حساسیت کافی جهت تشخیص این عفونت‌ها را در مراحل ابتدایی بیماری ندارند. از روش‌های تشخیصی رایج جهت تشخیص عفونت قارچی مهاجم می‌توان به بررسی کشت و میکروسکوپی بافت‌ها یا مایع حاصل از شستشوی ریه، بررسی پروتئین‌های سطحی (گالاکتومنان و ۳ و ۱ بتا دی گلوکان) و بررسی آنتی‌بادی‌ها اشاره نمود(۲۱-۲۳). روش کشت از بافت‌های آلوده زمان بر بوده و جهت رسیدن به جواب آزمایش چندین روز وقت لازم است. همچنین تهیه این نمونه‌ها در بیماران با ناهنجاری‌های خونی به علت پلاکت پایین مشکل و در بعضی موارد غیر ممکن می‌باشد. کشت خون از حساسیت کمی‌برخوردار است در مورد آسپرژیلوزیس بندرت مثبت می‌شود و در مورد کاندیدیازیس در ۵۰٪ موارد مثبت می‌شود. اگر قارچ از محیط کشت جدا شود ارزش تشخیصی بالایی دارد. روش‌های تشخیصی متعددی که اساس تشخیصی آن‌ها بر پایه کشت نیستند روز به‌روز در حال افزایش هستند. روش‌های تشخیصی مولکولی نسبت به روش‌های مبتنی برکشت دارای حساسیت و سرعت تشخیصی بیشتر(کمتر از ۱۲ ساعت) می‌باشند. استاندارد سازی تکنیک‌های تشخیصی مولکولی، جهت شناسایی گونه‌های قارچی از خون بیماران رو به افزایش است (۲۳-۲۵). در این مطالعه بعلت اینکه جمعیت مورد مطالعه نقص سیستم ایمنی داشتند تهیه نمونه از بافت‌های بیمار مشکل بود، بنابراین از بیماران نمونه خون تهیه شد و با روش مولکولی Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه با توجه به نتایج کشت خون ۱۴/۶ ٪ از بیماران مبتلا به کاندیدمی‌بودند که از این بیماران گونه‌های *کاندیدایی غیرآلبیکنس* (۱۳/۳ ٪) و گونه *کاندیدا آلبیکنس* (۱/۳ ٪) جدا شد . باآزمایش مولکولی ۶/۷ ٪ از بیماران مبتلا به عفونت *کاندیدا آلبیکنس* بودند که کارایی بیشتر روش مولکولی نسبت به روش کشت را نشان می‌دهد. در مطالعه بدیعی و همکاران که در بین سال‌های ۲۰۰۶-۲۰۰۴ بر روی ۱۹۴ بیمار مبتلا به بدخیمی‌های خونی بوسیله روش PCR-ELISA صورت گرفت ۲۱ مورد *کاندیدا آلبیکنس*، ۳ مورد *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و ۱ مورد *کاندیدا کروزئی* گزارش شده است وکاندیدا آلبیکنس به‌عنوان شایع‌ترین قارچ جداشده از خون بیماران دچار عفونت‌های قارچی مهاجم گزارش شده بود(26) که دلیل این اختلاف نتایج با نتایج این مطالعه احتمالا بخاطر اختلاف زمانی، مکانی، جمعیت مورد مطالعه و تکنیک استفاده شده است. در حالیکه مطالعات مختلف افزایش شیوع عفونت‌های کاندیدایی ناشی از کاندیداهای غیر *کاندیدا آلبیکنس* مثل *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا کروزئی* را در بیماران مبتلابه بدخیمی‌های خونی که دارای ضعف سیستم ایمنی و شرایط بحرانی می‌باشند، گزارش کرده‌اند (۲۸-۲۷). نتیجه مطالعه حاضر مشابه مطالعات دیگر

گزارش شده بود(۲۹،۳۰) و میزان پراکندگی آلودگی کاندیدایی بر حسب گونه در هر ناحیه‌ای بستگی به میزان آلودگی آن ناحیه دارد و در مناطق مختلف متفاوت می‌باشد.

مطالعات کمی‌در مورد ابتلا به آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران مبتلابه اختلال ایمنی در ایران انجام‌شده است. میزان بروز و مرگ و میر ناشی از آسپرژیلوزیس مهاجم ممکن است بر اساس وضعیت ایمنی و مدیریت بیماران و کنترل عفونت محیطی در بخش و بیمارستان‌ها متفاوت باشد. در این مطالعه هیچ کشت خون مثبتی ازنظر آسپرژیلوس به دست نیامد. ولی با توجه به علائم کلینیکی و رادیولوژی و به روش مولکولی ۱۲ ٪ از بیماران از نظر عفونت آسپرژیلوزیس مهاجم مثبت بودند. میزان بروز و مرگ و میر ناشی از عفونت *آسپرژیلوسی* ممکن است بر اساس وضعیت ایمنی و مدیریت بیماران و کنترل عفونت محیطی در بخش و بیمارستان‌ها متفاوت باشد. در یک مطالعه گذشته نگر توسط Pagano و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بر روی بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی بستری‌شده بین سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۳ در ایتالیا، ۱۸ بخش هماتولوژی برای ارزیابی بروز عفونت قارچی مهاجم مورد مطالعه قرار گرفتند. از ۱۱۸۰۲ بیمار مبتلابه بدخیم‌های هماتولوژیک شرکت کننده در (۴/۶ ٪) ۵۳۸ مورد عفونت قارچی ثابت شده یا محتمل گزارش شد که(۶۹ ٪) ۳۷۱ مورد بیماری در مبتلایان به لوسمی‌میلوئید حاد رخ داده بود. میزان مرگ و میر برای آسپرژیلوزیس (۴۲ ٪) گزارش شده بود (۳۱). در حالیکه در در مطالعه ما میزان مرگ و میر ۱/۴ ٪ بود. دریکی دیگر از مطالعات کوهورت که با استفاده از پایگاه داده‌های کودکان بستری در ایالات‌متحده در سال ۲۰۰۰ انجام شد، کودکان مبتلا به بدخیمی، بیشترین (۷۴٪) موارد آسپرژیلوزیس مهاجم را تشکیل می‌دهند بیشترین شیوع آسپرژیلوزیس مهاجم در کودکان تحت پیوند مغز استخوان آلوژنیک (۴،۵٪) و کسانی که دارای لوسمی‌حاد میلوئید (۴٪) بودند گزارش شد (۳۲). در مطالعه ما این میزان با توجه به تعداد ۷۵ بیمار و ۱۰۰ نمونه گرفته‌شده ۱۲٪ موارد مبتلا به آسپرژیلوزیس مهاجم بودند. که دلیل آن می‌تواند محدودیت زمانی و تعداد پایین نمونه‌های جمع آوری شده و یا به دلیل انجام درمان ضد قارچی زود هنگام و به موقع در بیماران مورد مطالعه باشد.

در مطالعه حاضر نسبت جمعیت زن به مرد ۳۴ به ۴۱ بود؛ و میانگین سن ۸/۸ سال بود. در مطالعه بدیعی و همکاران در سال ۲۰۱۵ در ایران نسبت جمعیت زن به مرد ۳۸ به ۴۸ بود؛ و میانگین سن ۶ سال و انحراف معیار ۳/۹ بود. در مطالعه ما بیشترین بیماری (All(34% و AML(24%) بود. در مطالعه بدیعی و همکارن (All(58% و AML(24%) و موارد proven در این مطالعه ۱ مورد ۴/۵٪ و موارد probable نداشتیم. درحالی‌که در مطالعه بدیعی این موارد (۱۶/۳٪)۱۴ بود (۳۳).

## نتیجه گیری

قارچ‌ها یکی از عوامل عفونت در بیماران مبتلا به ناهنجاریهای خونی می‌باشند. تکنیک Real-time PCR می‌تواند به عنوان روشی قابل‌اعتماد و سریع برای تشخیص این عفونت‌ها و مدیریت بیماری در افراد در معرض خطر استفاده شود. بکارگیری این روش تشخیصی در آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی جهت کنترل و درمان بیماران توصیه می‌شود.

## تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد به شماره آ-۱۰۳۳ و طرح پژوهشی با کد ۹۴۰۰۰۶ مصوبه کمیته پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد است. نویسندگان از همکاری سرکار خانم علیرضایی صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

## References


1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. Critical reviews in microbiology. 2010;36(1):1-53.
2. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. Clinical infectious diseases. 2009;48(12):1695-703.
3. Badiee P, Kordbacheh P, Alborzi A, Malekhoseini SA. Invasive fungal infection in renal transplant recipients demonstrated by panfungal polymerase chain reaction. Exp Clin Transplant. 2007;5(1):624-9.
4. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, et al. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. Clinical Infectious Diseases. 2001;33(2):177-86.
5. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clinical infectious diseases. 2004;39(3):309-17.
6. Dornbusch HJ, Manzoni P, Roilides E, Walsh TJ, Groll AH. Invasive fungal infections in children.Pediatr Infect Dis J 2009;28(8):734-7.
7. Bille J, Marchetti O, Calandra T. Changing face of health-care associated fungal infections. Curr Opin Infect Dis 2005;18:314-9.
8. Garcia-Vidal C, Upton A, Kirby KA, Marr KA. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. Clinical Infectious Diseases. 2008;47(8):1041-50.
9. Neofytos D, Fishman JA, Horn D, Anaissie E, Chang CH, Olyaei A, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. Transplant Infectious Disease. 2010;12(3):220-9.
10. Dimopoulos G, Matthaiou DK, Moussas N, Apostolopoulou O, Arabatzis G, Velegraki A, et al. Pathogenesis of Aspergillosis in Humans. Human Emerging and Re-emerging Infections: Viral and Parasitic Infections. 2015:967-84.
11. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, De Repentigny L, Chapman SW, et al. The impact of culture isolation of Aspergillus species: a hospital-based survey of aspergillosis. Clinical Infectious Diseases. 2001;33(11):1824-33.
12. Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. Journal of clinical microbiology. 2007;45(3):906-14.
13. Badiee P, Alborzi A, Shakiba E, Ziyaeyan M, Pourabbas B. Molecular diagnosis of *Aspergillus* endocarditis after cardiac surgery. Journal of medical microbiology. 2009;58(2):192-5.
14. Bretagne S, Costa JM. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2005;45(3):361-8.
15. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer/invasive fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group. Clinical infectious diseases. 2008;46(12):1813-21.
16. Choi J-K, Cho S-Y, Yoon S-S, Moon J-H, Kim S-H, Lee J-H, et al. Epidemiology and Risk Factors for Invasive Fungal Diseases among Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients in Korea: Results of "RISK" Study. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2017;23(10):1773-9.
17. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. Therapeutics and clinical risk management. 2014;10:95.
18. Badiee P, Badali H, Boekhout T, Diba K, Moghadam AG, Nasab AH, et al. Antifungal susceptibility testing of *Candida* species isolated from the immunocompromised patients admitted to ten university hospitals in Iran: comparison of colonizing and infecting isolates. BMC infectious diseases. 2017;17(1):727.
19. Mello E, Posteraro B, Vella A, De Carolis E, Torelli R, D'Inzeo T, et al. Susceptibility testing of common and uncommon *Aspergillus* species against posaconazole and other mold-active antifungal azoles using the Sensititre method. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2017:AAC. 00168-17.

20. Badiee P, Alborzi A, Moeini M, Haddadi P. Antifungal susceptibility of the *Aspergillus* species by Etest and CLSI reference methods. Archives of Iranian medicine. 2012;15(7):429.
21. Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU. Comparative evaluation of (1, 3)-β-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. BMC infectious diseases. 2007;7(1):103.
22. Hao W, Pan Y-X, Ding Y-Q, Xiao S, Yin K, Wang Y-D, et al. Well-characterized monoclonal antibodies against cell wall antigen of *Aspergillus* species improve immunoassay specificity and sensitivity. Clinical and Vaccine Immunology. 2008;15(2):194-202.
23. Mikulska M, Furfaro E, Viscoli C. Biomarkers for diagnosis and follow-up of invasive candidiasis: a brief review of the ECIL recommendations. Current Fungal Infection Reports. 2012;6(3):192-7.
24. White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. Journal of clinical microbiology. 2005;43(5):2181-7.
25. White PL, Perry MD, Barnes RA. An update on the molecular diagnosis of invasive fungal disease. FEMS microbiology letters. 2009;296(1):1-10.
26. Badiee P, Kordbacheh P, Alborzi A, Zakernia M, Haddadi P. Early detection of systemic candidiasis in the whole blood of patients with hematologic malignancies. Jpn J Infect Dis. 2009;62(1):1-5.
27. Hope W, Morton A, Eisen DP. Increase in prevalence of nosocomial non-Candida albicans candidaemia and the association of Candida krusei with fluconazole use. Journal of Hospital Infection. 2002;50(1):56-65.
28. Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, Gentile G, Boccanera M, Monaco M, et al. Rising incidence of Candida parapsilosis fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. Clinical Infectious Diseases. 1996;23(3):506-14.
29. Trofa D, Gácser A, Nosanchuk JD. Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen. Clinical microbiology reviews. 2008;21(4):606-25.
30. Tan TY, Tan AL, Tee N, Ng L. A retrospective analysis of antifungal susceptibilities of Candida bloodstream isolates from Singapore hospitals. Ann Acad Med Singapore. 2008;37(10):835-40.
31. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. Haematologica. 2006;91(8):1068-75.
32. Zaoutis TE, Heydon K, Chu JH, Walsh TJ, Steinbach WJ. Epidemiology, outcomes, and costs of invasive aspergillosis in immunocompromised children in the United States, 2000. Pediatrics. 2006;117(4):e711-e6.
33. Badiee P, Zareifar S, Haddadi P, Jafarian H. Incidence of Fungal Infections in Pediatric Patients with Hematologic Neoplasms. Archives of Pediatric Infectous Disease .2017;5(3): :e41317.

*Original Article*

# Identification of invasive fungal infections in patients with hematologic disorders by Real-time PCR

Received: 13/07/2021 - Accepted: 10/03/2022

Mohammad Javad Najafzadeh [1*]
Mohsen Dashti [2]
Mohammad Hasan Aelami [3]
Monavvar Afzalaghaee [4]
Zahra Badiei [5]
Parisa Badiee [6]
Ali Ghasemi [3]
Hamid Harhangi 3

*[1] Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
*[2] Master of Sciences, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
*[3] Associate Professor, Department of Pediatrics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
*[4] Associate Professor, Department of Social Medicine, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
*[5] Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
*[6] Professor, Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran*

Email: najafzadehmj@mums.ac.ir

**Abstract**

**Introduction:** Invasive fungal infections due to *Aspergillus* and *Candida* often occur in leukemia and transplantation patients because of a severe compromised in their immune systems. Rapid identification and initiation of treatment in the early stages of the disease can reduce mortality from fungal infection. The aim of this study was the identification of invasive fungal infections by Real-time PCR in patients with hematologic disorders and bone marrow transplantation.

**Materials and Methods:** patients with immunodeficiency hospitalized in Mashhad hospitals between March to November 201۸ were evaluated for invasive fungal infections using TaqMan Real-time PCR with fluorescence probes and specific primers to identify fungal DNA in peripheral blood samples.

**Results:** Seventy-five patients participated in this study. The female/ male ratio was 34 (45.3%)/ 41 (54.7%). The most common underlying disease was acute lymphoblastic leukemia (45.3%) and acute myeloid leukemia (32%) and the lowest was related to haemophagocytic patients with lymphohistiocytosis (1.3%). Blood culture results showed isolation of *non-albicans Candida* (13.3%) and *Candida albicans* (1.3%). *Aspergillus* species was not isolated from the blood culture. Real-time PCR were positive for *Candida albicans* and *Aspergillus* species in 5 (6.7%) and 9 patients (12%), respectively and 61 patients (81.3%) had negative results for invasive fungal infections.

**Conclusion:** Fungi are one of the major cause of infections in the patients with hematologic disorders. Real-time PCR techniques can be a reliable and fast way to diagnose these infections and manage the disease in high-risk individuals.

**Key words:** Invasive Candidiasis, Invasive Aspergillosis, Real Time PCR, Mashhad, Iran

**Acknowledgement:** There is no conflict of interest.