

A serene landscape featuring a waterfall cascading down a rocky cliff. The waterfall is the central focus, with water flowing smoothly and creating a misty spray at the bottom. The surrounding environment is a dense, lush green forest with various types of trees and foliage, including ferns and moss-covered rocks. The lighting is soft and natural, highlighting the textures of the water and the vibrant greens of the forest.

In the name of GOD

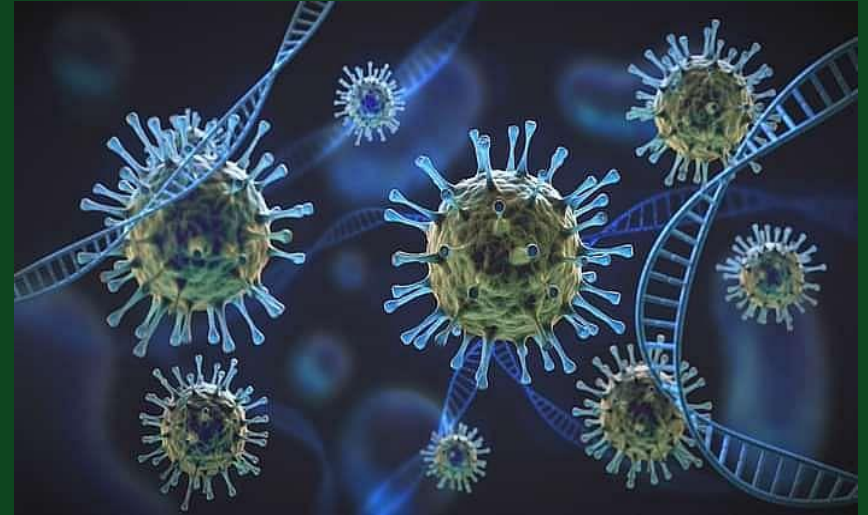
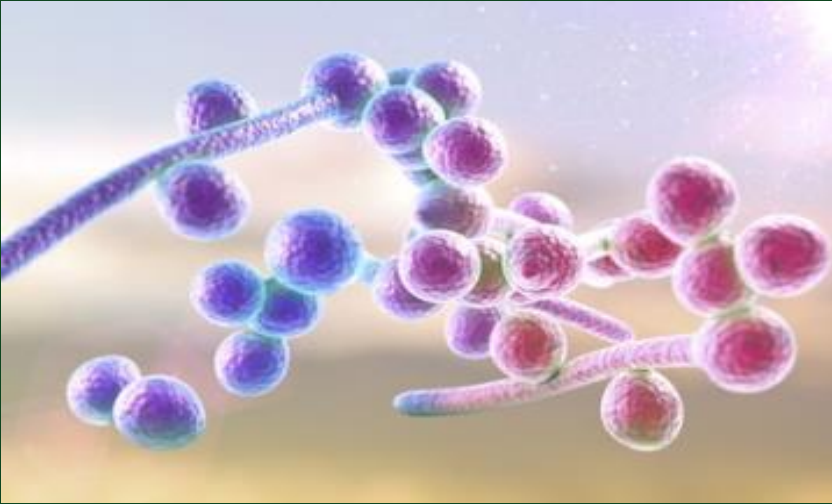
'Tsunami' of nasty fungal infections follows Covid



Diagnosis of mucromycosis in patients with COVID-19

Present by :

Dr. Mojtaba Didehdar



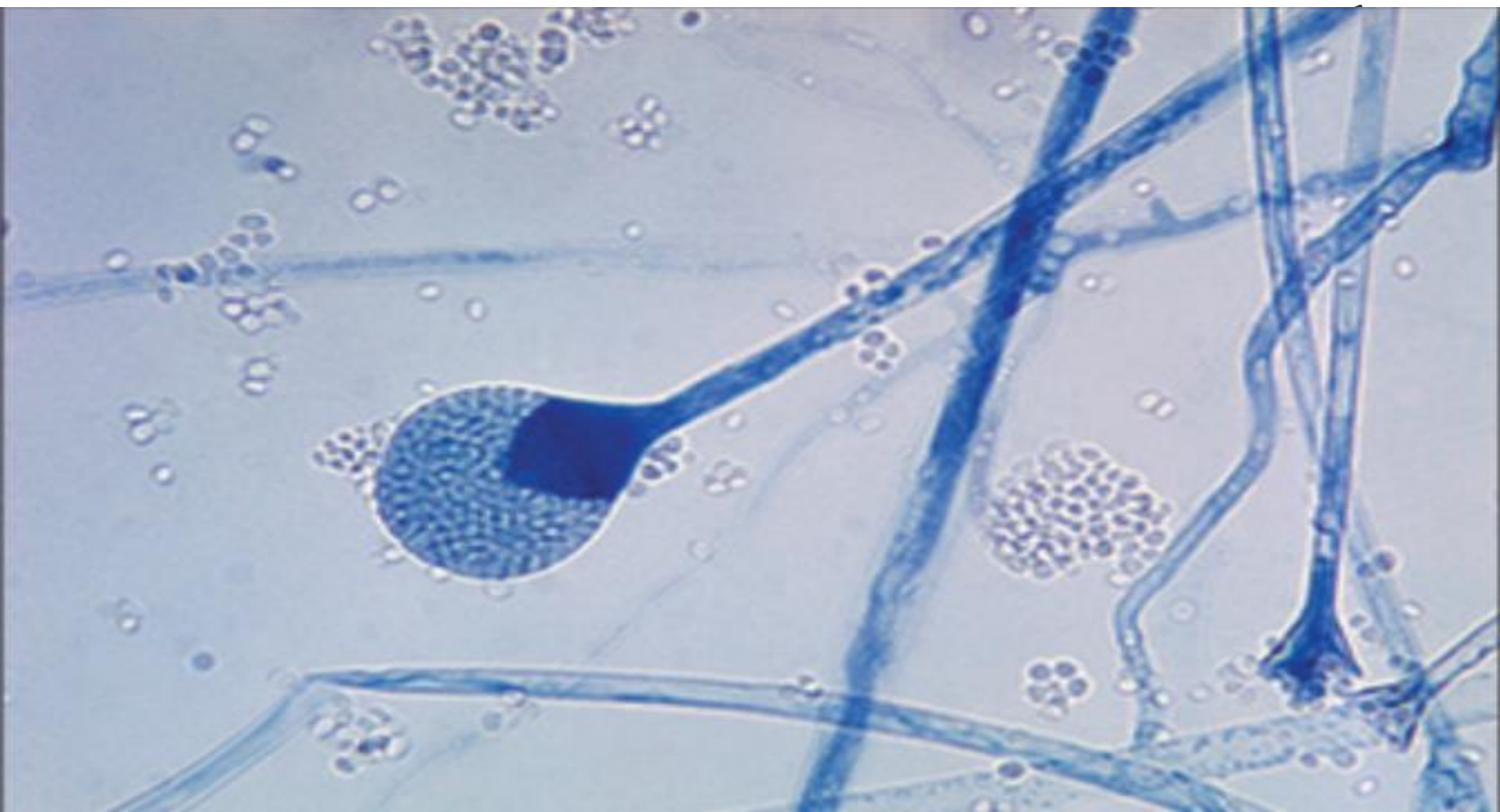
A decorative graphic featuring a central horizontal bar with a green-to-yellow gradient. The bar is framed by intricate black scrollwork and flourishes on all four sides. The word "Introduction" is written in a bold, black, serif font across the center of the bar.

Introduction

Mucormycosis

- X Mucormycosis (sometimes called Systemic zygomycosis) is a serious but rare fungal infection caused by a group of molds called mucorals invasive fungal infections (IFI)
- X Caused by saprophytic environmental fungi, belonging to the subphylum **Mucoromycotina**, order **Mucorales**. Among the most frequent genera are **Rhizopus** and **Mucor**; and less frequently **Lichtheimia**, **Saksenaea**, **Rhizomucor**, **Apophysomyces**, and **Cunninghamella**
- X **Rhizopus arrhizus**





Mucormycosis

- X It is characterized by vascular invasion by the fungal hyphae which leads to thrombosis and necrosis.
- X There has been a surge of mucormycosis co-infection in COVID-19 patients, many cases being reported worldwide.
- X The incidence of mucormycosis has risen more rapidly during the second wave compared with the first wave of COVID-19 in India, with at least 14872 cases as of May 28, 2021.



Mucormycosis

X CAM (Covid associated Mucormycosis) outbreak reasons (Host General Conditions)

- X Enviromental Factors
- X Diabetes and BS
- X Sreroid therapy
- X Hyper Ferritinemia & Fe
- X Endothelial cell receptor (GRP78 ???)



ENVIRONMENTAL FACTORS



Decaying matter



Favourable temperature and humidity (Tropics)



Mucorales

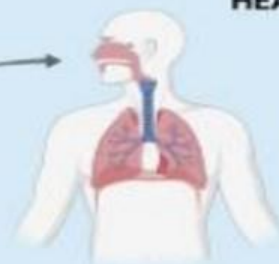
Construction and hospital environment



HEALTHY HOST



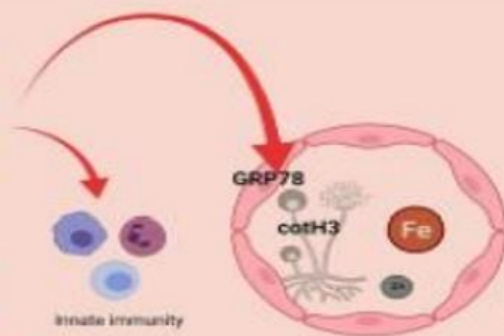
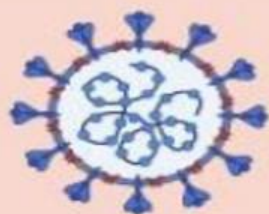
Inhalation of spores



Clearance of fungi by innate immunity



HEALTHY



Innate immunity



COVID-19 associated mucormycosis



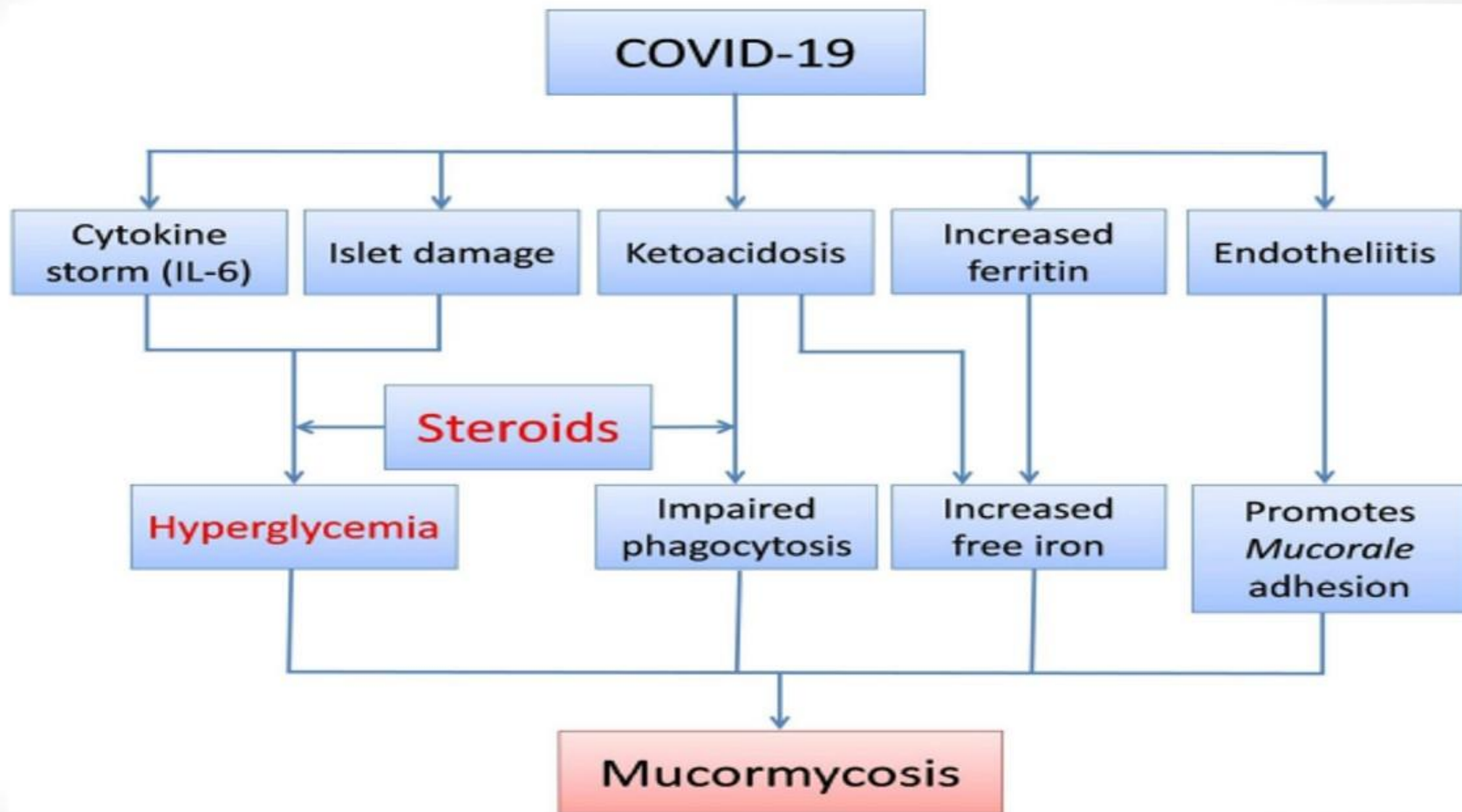
GLUCOCORTICOIDS

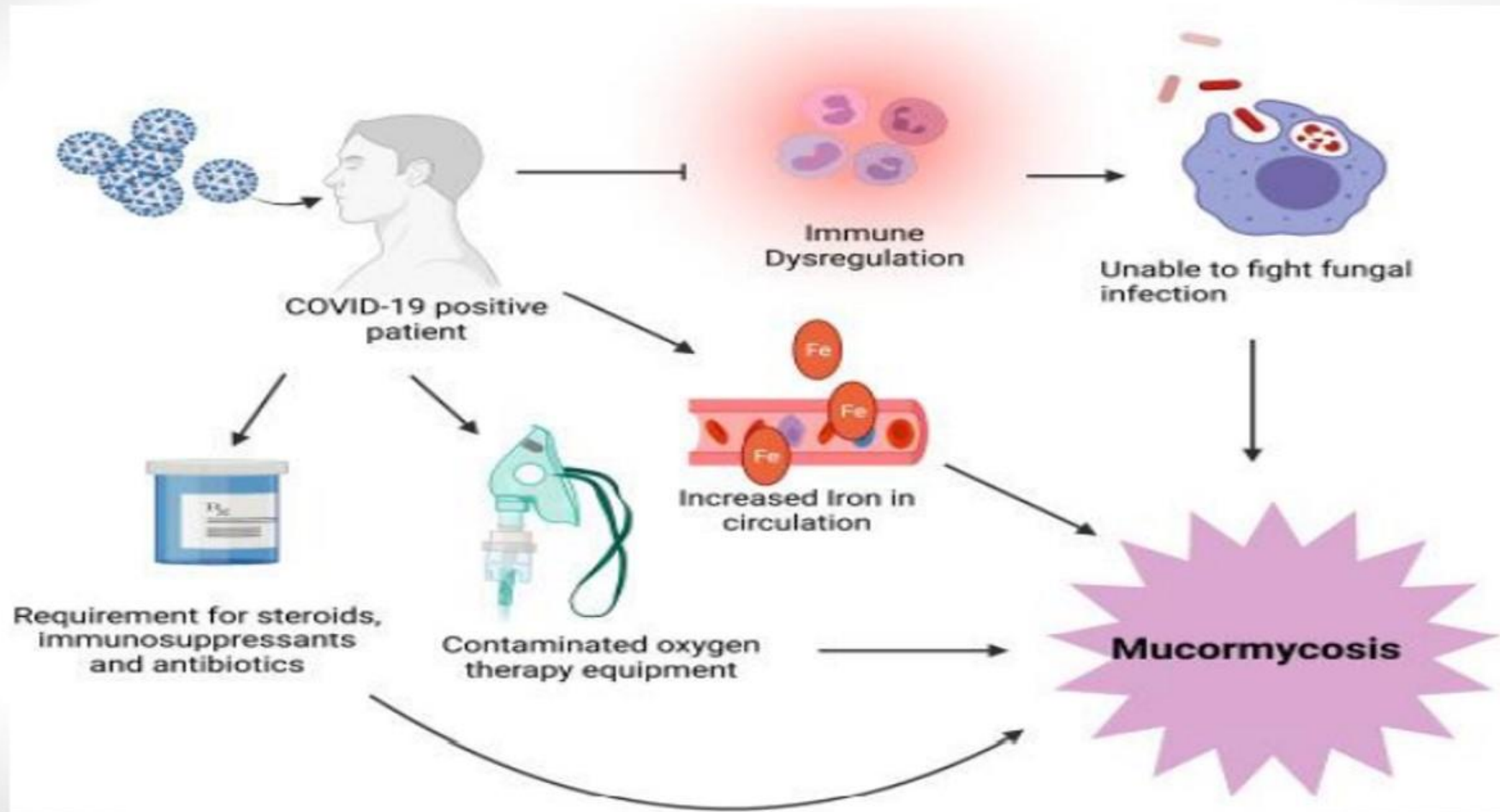


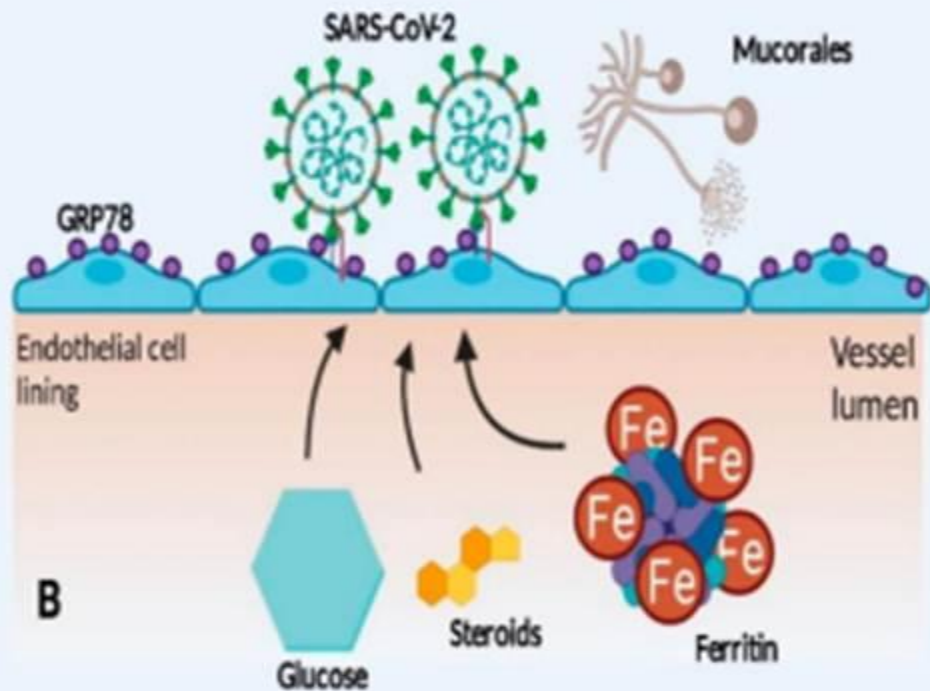
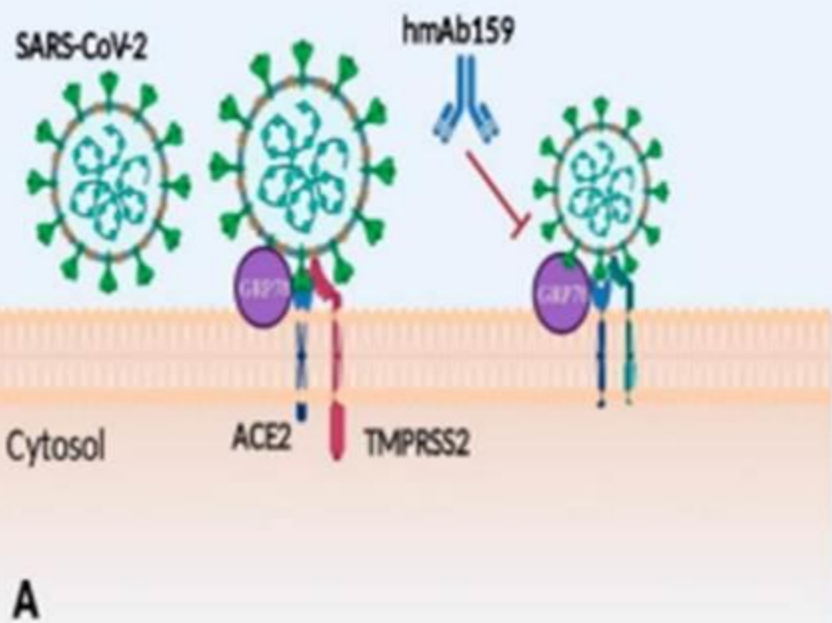
Altered mycobiome due to antimicrobial agents

TREATMENT FACTORS









GRP78 may either act as a co-receptor or stabilize the ACE2-spike protein interaction. Pre-treatment with humanized monoclonal antibody, hmAb159 against GRP78 may disrupt this interaction

Increased surface expression of GRP78 on endothelial cell lining in COVID-19 patients and/or with metabolic disorders may clear the decks for pathogenesis of mucormycosis

Diagnosis



Laboratory Methods for Diagnosis of Mucormycosis

Direct examination

- KOH - Wet mount
- Calcofluor or Blankophor

Histopathological examination

- Periodic acid Schiff stain
- Gomori methenamine silver stain

Culture

- Isolation and identification

Molecular methods

- Conventional PCR, PCR_RFLP
- DNA sequencing
- Real time PCR

Immunological methods

- ELISpot
- Immunoblotting
- Immuno-histochemistry

Conventional Method

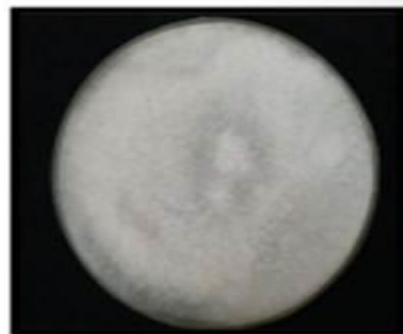
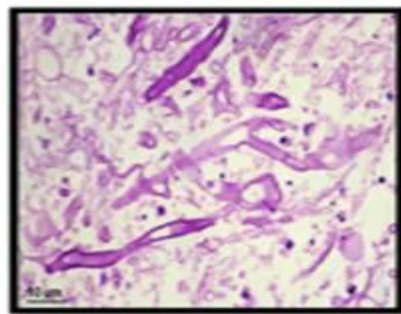
Non-Culture based Method

Limitation of conventional diagnostics methods

Invasive specimen collection.

Time-consuming

Needs great personal expertise.



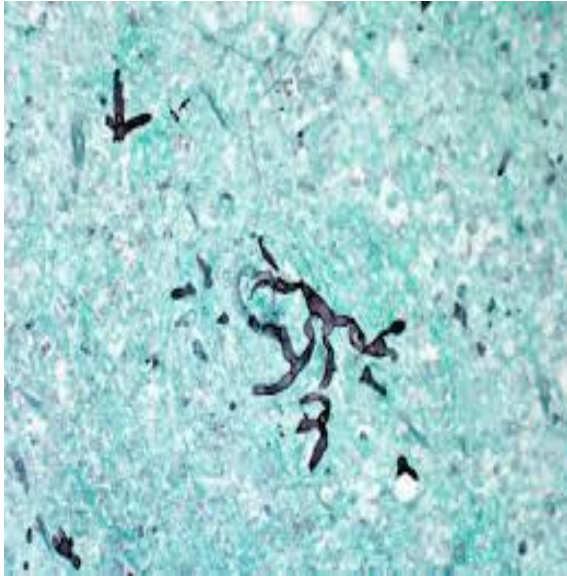
The hyphae of Mucorales may not be abundant so as to be seen.

Approximately 50% of histopathologically positive samples remain culture negative.

Some emerging Mucorales species such as *A. elegans* and *S. vasiformis* fail to sporulate on routine media.



Culture



- X The high number of culture-negative findings and, yet, microscopically positive findings may reflect the friability of hyphae and the fragile nonseptated growth of these fungi, thus becoming mechanically damageable during tissue excessive grinding (excessive tissue homogenization should be avoided)



Culture

- The species-level identification of the causative agent from cultures on the basis of its morphological characteristics is challenging.
- Furthermore, requires expertise and proper sampling and the collected strains from patients who receive antifungals, which sometimes show morphological abnormalities making it difficult to perform a correct identification.

Molecular methods



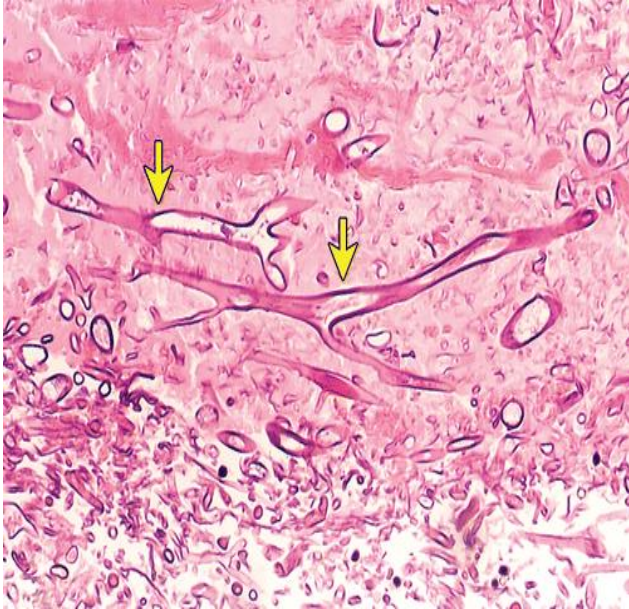
- X The use of molecular-based assays can help to detect different *Mucor* species and it can be recommended as a valuable add on tool that complements conventional diagnostic procedures.



Molecular methods

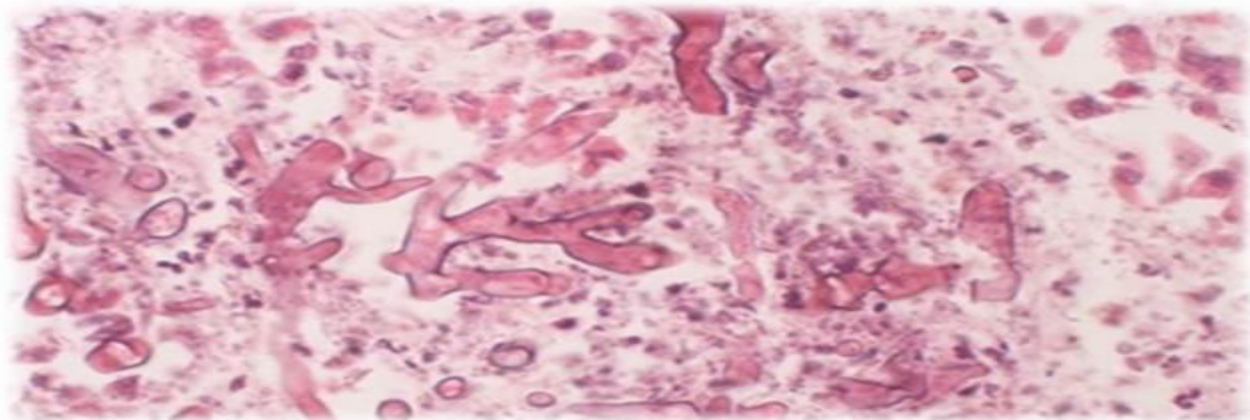
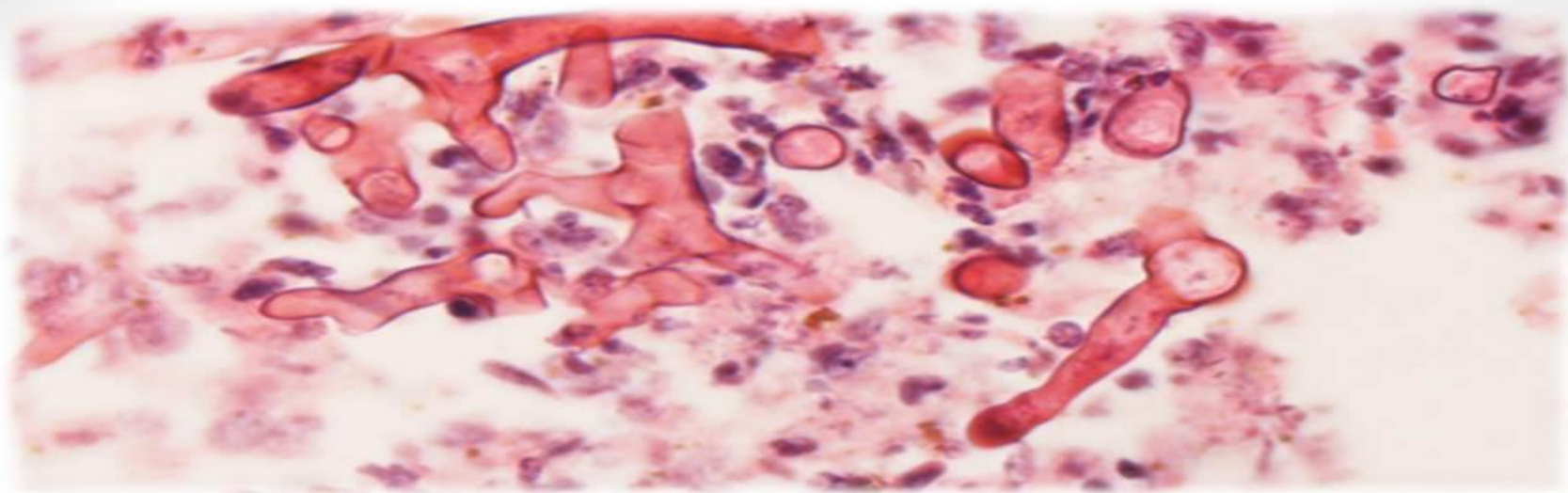
- ✓ Semi-nested qPCR
 - ✓ HRM
 - ✓ Internal transcribed spacer (ITS) sequencing
- However, the efficiency of molecular-based diagnosis requires a thorough clinical evaluation and has not been widely confirmed; therefore, it cannot be recommended as a standalone, single approach to clinical routine diagnostics.

Histopathological findings



- X Histopathological findings can be very helpful in diagnosis.
- X Obtaining a diagnosis of mucormycosis on histomorphological basis is challenging, and the most common cause for incorrect morphological diagnosis is the misidentification of Mucorales as *Aspergillus* spp.





فرآیند تشخیص بیماری موکورمایکوزیس در آزمایشگاه های قارچ شناسی پزشکی

بیمار مشکوک به موکورمایکوزیس



در صورت در دسترس نبودن نمونه های بافتی، امکان تراشیدن شایعه با اسکالپل نیز وجود دارد.

نمونه های بافتی آلوده و نکروزه ارزش تشخیصی بالایی دارند.
نمونه ی سوآب برای تشخیص موکورال ها کاربردی نمی باشد.

نمونه ها در نرمال سالین و در اسرع وقت باید به آزمایشگاه ارسال شوند.
حساسیت موکورال ها به سرما وجود دارد و نکه داری نمونه ها باید در طبقات پایین یخچال صورت بگیرد.

بررسی مستقیم نمونه ها و کشت

از کوبیدن و له کردن بافت باید اجتناب شود چرا که می تواند باعث آسیب رسیدن به هایف موکورال ها شود.

بررسی میکروسکوپی و سریع نمونه های مختلف ارسالی به آزمایشگاه با استفاده از KOH 20%

رنگ های فلورسنت همچون کالکوفلور سفید در کنار KOH می تواند به مشاهده هایف ها کمک کند.

می توان از کاشت نمونه های بافتی در محیط کشت، برای افزایش جداسازی موکورال ها استفاده کرد.

استفاده از روش Slide culture برای شناسایی جنس و گونه ی موکورال ها

رشد موکورال ها پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت و بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی کلتی قارچی

به کارگیری روش های مولکولی== برای تایید جنس و گونه ی عامل عفونت

استفاده از کشت مثبت، روش برات دایلوئن و پروتکل CLSI M38-A2 برای تعیین الگوی مقاومت آنتی فونگال ها در موکورال ها

در بیماران مبتلا به بدخیمی های خوبی امکان جمع آوری بومی به علت اختلالات انعقادی یا محدودیت های بالتری روبه رو است.

بررسی های هیستوپاتولوژی

سیتوس ها، نواحی نکروتیک کام نرم و سخت و شایعات نکروزه چگدی نمونه های بسیار مناسبی برای شناسایی موکورال ها هستند.
نمونه های بافتی از سایر نواحی درگیر همچون ریه ها و دستگاه گوارش نیازمند استفاده از روش های آندوسکوپی با فرایند تهاجمی بالتر است.
نمونه های دیگری همچون BAL و مایع پلور نیز برای تشخیص مورد استفاده قرار می گیرند.

رنگ آمیزی معمولی H&E تنها دیواره ی میکروارکتیسم را بدون محتوای داخلی نشان می دهد.
رنگ آمیزی های PAS و GMS در نشان دادن دیواره ی قارچی برتری بالتری دارند.

هایف های پهن و روپاتی شکل با دیواره ی نازک، نامنظم بدون دیواره ی عرضی با عرض متغیر از ۵ تا ۳۰ میکرومتر و با انشعابات ۹۰ درجه

مشاهده ی هایف موکورال ها

محدودیت های بالای بررسی مستقیم میکروسکوپی در افتراق پاتوزن های قارچی

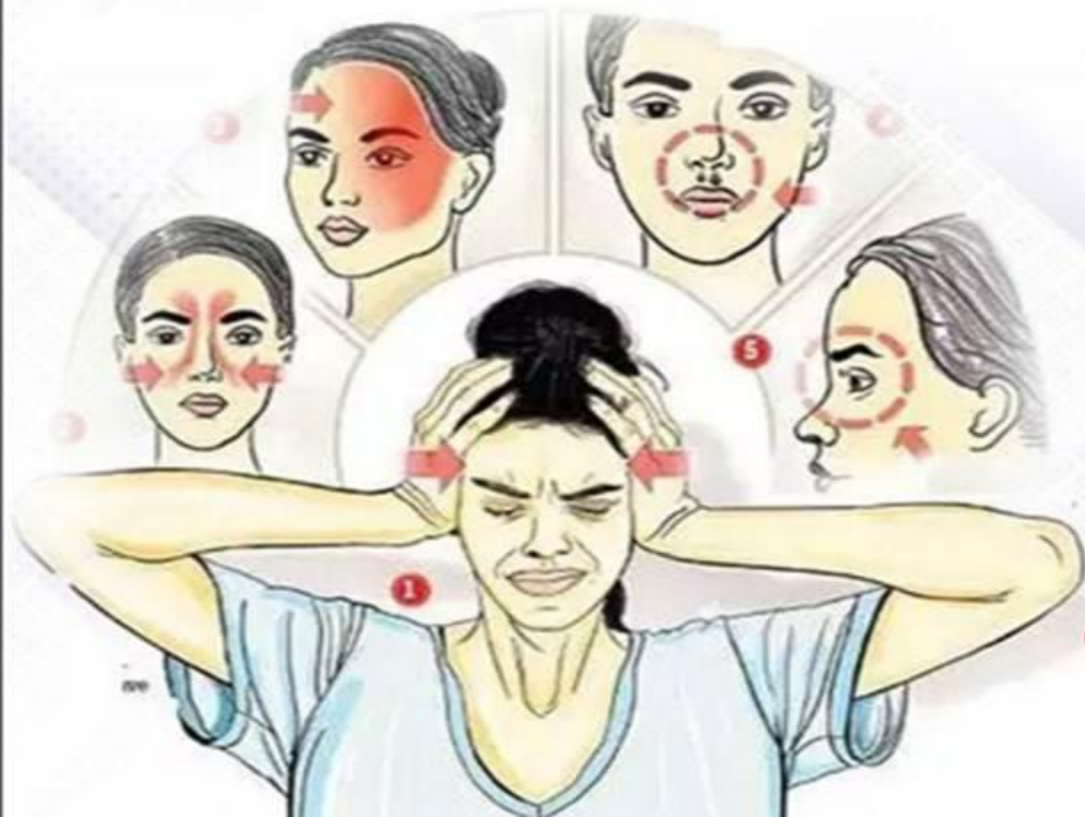
هایف های دارای دیواره ی عرضی با عرض معمول ۳ تا ۵ میکرومتر و با انشعابات ۴۵ درجه افتراق اسپریزپلوس

مشاهده ی سودهایف ها افتراق از کانیدیا

در صورت امکان، تایید تشخیص نهایی با روش های مولکولی زیر انجام می شود:

- 16S and Internal Transcribed Spacer (ITS) Ribosomal RNA (rRNA) Sequencing
- Nested PCR
- Real-time PCR
- Nested PCR Combined With RFLP
- High-resolution melt analysis (HRM)

STEPS TO PREVENT MUCORMYCOSIS



- **Keep blood sugar under check Covid or no Covid**
- **Use steroids judiciously while treating Covid**
- **Use clean water in humidifier used for O2 support**
- **Maintain overall cleanliness around patients**
- **Any oral ulcer should be treated immediately**

