ارزیابی فعالیت ضد قارچی مشتقات جدید ایمیدازول با استفاده از روش رنگ سنجی

انسیه لطفعلی: دانشجوی دکترای قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران ensieh_4345@yahoo.com
***دکتر مهربان فلاحتی:** دانشیار گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. (*نویسنده مسئول). mehrabanfalahati@yahoo.com
دکتر علیرضا فرومدی: استاد دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. foroumadi@yahoo.com
دکتر سعید امامی: دانشیار دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران. sd_emami@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۲

چکیده

زمینه و هدف: افزایش شیوع عفونت‌های قارچی مهاجم طی دو دهه گذشته از طرفی و تعداد محدود دارو های ضد قارچی موثر برای درمان آن‌ها از طرف دیگر، نیاز به کشف داروهای جدید را تشدید می‌کند. امروزه داروهای موجود سبب افزایش مقاومت شده‌اند. هدف این بررسی اثر داروهای ضد قارچی جدید از مشتقات ایمیدازول با روش رنگ سنجی در مقایسه با روش میکرو دایلوشن (Micro Dillution) می‌باشد.

روش کار: این پژوهش یک مطالعه تجربی بود که در آن به بررسی اثرات ضد قارچی مشتقات جدید ایمیدازول در مقابل داروهای متداول ضد قارچی مایکونازول، کلوتریمازول و فلوکونازول بر روی سوش‌های استاندارد کاندیدا آلبیکنس (Candida Albicans)، ساکارومایسس سرویسیه(Saccharomyces cervisiae)، آسپرژیلوس نایجر (Aspergillus niger) و میکروسپوروم جیپسیوم (Microsporum gypseum) با روش رنگ سنجی پرداختیم و نتایج آن را با روش میکرودایلوشن براث (Broth Micro Dillution) مقایسه کردیم.

یافته‌ها: ترکیبات ۲- هیدروکسی فناسیل آزول و ۲- هیدروکسی فناسیل آزولیوم تعیین کننده یک کلاس جدید از عوامل آزولی (Azole) ضد قارچی با یک طیف فعالیتی قابل قبول می باشند و روش رنگ سنجی یک روش میکروتیتر ساده (Simple microtiter method) برای تعیین حساسیت سوش‌های قارچی (سوش استاندارد کاندیدا آلبی کانس (PTCC 5027)- ساکارو مایسس سرویسیه(PTCC 5177)- آسپوژیلوس نایجر (PTCC 5012)- میکروسپوروم جیپسئوم (PTCC 5070) در مقابل عوامل ضد قارچی می باشد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج بدست آمده، بیشتر مشتقات در عملکرد ضد قارچی بر روی قارچ‌های تست شده، اثرقابل توجهی نشان دادند که MIC (minimum inhibitory concentration) آن‌ها در دامنه۰/۲۵-۳۲میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با داروی استاندارد فلوکونازول بود.

کلیدواژه‌ها: ایمیدازول، تکنیک رنگ سنجی، فعالیت ضد قارچی، تست های تعیین حساسیت.

مقدمه

امروزه تنوع داروهای موثری که در پزشکی جهت عفونت‌های قارچی تجویز می شود، بسیار کمتر و محدودتر از داروهایی است که برای بیماری‌های باکتریایی مصرف می‌شوند. یکسان بودن داروهای ضد قارچی ومحدود بودن آن‌ها، سبب افزایش مقاومت شده است بنابر این باید در زمینه یافتن داروهای ضد قارچی جدید اقدام کنیم(۱).

با توجه به گستردگی ایمیدازول‌ها، اقدام به ترکیب آن ها در دانشکده داروسازی دانشگاه‌های علوم پزشکی مازندران تهران توسط دکتر سعید امامی دکتر علیرضا فرومدی کردیم و در این راستا تعدادی از مشتقات جدید را بر روی قارچ‌ها بررسی نمودیم.

در هر صورت قبل از آغاز آزمایش باید این واقعیت را پذیرفت که به دلیل پیچیدگی‌های متعددی که در ساختمان، شکل، سرعت رشد و شرایط مناسب رشد قارچ ها در مقایسه با باکتری‌ها وجود دارد، تفسیر نتایج به دست آمده به مراتب مشکل‌تر از باکتری‌ها خواهد بود (۲-۶). روش‌های متعددی برای ارزیابی فعالیت داروهای

www.SID.ir

ضد قارچی موجود است (۷-۱۰).

هدف این بررسی اثر داروهای ضد قارچی جدید از مشتقات ایمیدازول با روش رنگ سنجی در مقایسه با روش میکرو دایلوشن می‌باشد و محدوده MIC آن‌ها در دامنه ۶۴ -۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیترمورد ارزیابی و تفسیر قرار گرفت (۲).

روش رنگ سنجی بر اساس اندازه گیری تنفس میتوکندریایی می باشد که با استفاده از پلیت‌های (PLate) میکروتیتر، در حضور رقت‌های مختلف داروهای ضد قارچی انجام شده و جذب مواد توسط قارچ‌ها به وسیله این روش ثبت می‌گردد. در این مرحله، از شاخص‌های رنگ سنجی نظیر ALARM Blue و Tetrazolium Bromide استفاده می‌شود (۲،۱۱و۱۲).

در این روند احیای نمک ۳-(۴،۵ دی متیل -۲-تیازولیل)-۲ ، ۵ -دی فنیل – ۲- تترازولیوم برومایـد(MTT) menadione-augmented 3(4,5imethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide به فورمازان (Formazan) صورت می‌گیرد (۱۵-۱۳).

سوبسترای (Substrate) واکنش، نمک‌های محلول تترازولیوم (Tetrazolium) زرد رنگ هستند که مهم‌ترین آن‌ها MTT می باشد. MTT توسط سیستم تترازولیوم ردوکتاز (آنزیم سوکسینات دهیدروژناز)که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی در میتوکندری‌ها است و فقط در سلول‌های زنده یافت می‌شود، شکسته شده و به کریستال‌های فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌شود. لذا میزان رنگ فورمازان تولید شده در طی آزمایش با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند، ارتباط مستقیم دارد. نمک فورمازان تولید شده در آب محلول بوده و بایستی توسط ماده حلالی نظیر DMSO (دی متیل سولفو کساید Dimethyl sulfoxide)، ایزوپروپانول(Isoproppanol) یا هر حلال ارگانیک دیگری به حالت محلول در آید و سپس رنگ سنجی شود (۲و۱۱-۱۴).

روش بررسی

این مطالعه، مطالعه‌ای تجربی وپژوهشی بود.

برای مطالعه روی ۴ سوش استاندارد کاندیدا آلبیکانس (PTCC 5027)، ساکارو مایسس سرویسیه (PTCC 5177)، آسپرژیلوس نایجر (PTCC 5012) و میکروسپوروم جیپسیوم (PTCC 5070)، آزمایش‌های رنگ‌سنجی با ماده MTT و میکرودایلوشن براث با پروتکل NCCLS M27-A برای مخمرها و با پروتکل CCLS M38-P برای قارچ‌های رشته‌ای انجام شد و در نهایت MIC داروهای تازه ترکیب شده (۲۲ داروی تازه ایمیدازولی) در برابر MIC داروهای متداول (فلوکونازول، کلوتریمازول و مایکونازول) بررسی شد(۱،۱۶و۱۷).

در روش رنگ سنجی برای قارچ های مخمری،از روی محیط کشت سابورو دکستروز اگار ،کلونی تک مخمری برداشته ودرمحیط کشت TSB (Trypticase Soy Broth) تلقیح شد. با کمک اسپکتروفوتومتر از سوسپانسیون موجود قارچ‌های مخمری (۱۸ تا ۲۴ ساعته)، یک سوسپانسیون حاوی۱۰۵ سلول مخمری در لوله‌های در پیچ‌دار حاوی سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد، به این صورت که سوسپانسیون حاصل در طول موج ۵۳۰ نانومتربا دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل LKB,Pharmacia- ساخت کشور امریکا) دارای عبور نوری (Transmitance) ۹۰٪ می‌باشد که در این حالت مقدار سلول‌های موجود در آن ۱۰۶سلول به ازای هر میلی لیتر سوسپانسیون می‌باشد. سپس ۴،۵ سی سی سرم فیزیولوژی استریل در لوله در پیچ دار استریل ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱۰۶ برداشته و به ۴،۵ سی سی اضافه کرده تا ۱۰۵ حاصل شود.

برای قارچ‌های رشته ای (کلونی ۴۸ ساعته آسپرژیلوس نایجر و کلونی ۳ تا ۵ روزه میکروسپوروم جیپسیوم) از اسپور آسپرژیلوس نایجرو از ماکروکونیدی‌های میکروسپوروم جیپسیوم در لوله های در پیچ‌دار حاوی سرم فیزیولوژی استریل، یک سوسپانسیون حاوی۱۰۴ سلول تهیه شد (۲). در مورد رشته‌ای‌ها کافیست ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱۰۵ برداشته و به ۴/۵ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل اضافه کرده تا سوسپانسیون ۱۰۴ حاصل شود.

Archive of SID
www.SID.ir

سپس رقت سریال داروهای مورد نظر در میکروپلیت‌ها آماده شد و با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰۰ میکرولیتر ازسلول‌های قارچی، پس از طی مدت زمان انکوباسیون (۲۴ ساعت در ۳۷ درجه برای مخمری‌ها و ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه برای رشته‌ای‌ها)، به میزان ۲۵ میکرولیتر محلول MTT با غلظت نهایی ۵ میلی گرم درمیلی لیتر(پودر MTT در آب دیونیزه حل شد) به میکروپلیت اضافه شد و مجددا ۳ ساعت در ۳۷ درجه برای مخمری‌ها و رشته‌ای‌ها (هر دو) انکوبه شد، سپس سانتریفوژ شد و بعد از خروج مایع رویی، به رسوب،۱۰۰ میکرولیتر اسید ایزوپروپانول (۹۵ سی‌سی اسید ایزوپروپانول+۵ سی سی اسید کلریدریک یک نرمال) افزوده تا فورمازان حاصله حل شده و در دستگاه الایزا ریدر(ساخت کشور آمریکا. مدل Dynex MRX) در طول موج ۵۵۰ نانومتر جذب نوری فورمازان خوانده شد. بر اساس فرمول زیر، درصد حیات سلولی محاسبه گردید.

$$((X1 - OD\ blank) \times 100)/((OD\ control - OD\ blank))$$

در فرمول فوق OD (Optical density) بلانک، چگالی نوری چاهک‌های بدون سلول قارچی وOD کنترل چگالی نوری چاهک‌های حاوی سلول قارچی است که فاقد دارو است و ۱۰۰ می باشد.

چاهک شماره ۱۱ که حاوی محیط کشت و سلول قارچی است و فاقد دارو می باشد به عنوان شاهد مثبت و کنترل می باشد و چاهک شماره ۱۲ که فقط حاوی محیط کشت و بدون سلول قارچی و دارو می باشد ،به عنوان شاهد منفی و بلانک می‌باشد.

اثرات ضد قارچی داروهای متداول کلوتریمازول، فلوکونازول، مایکونازول و ترکیبات جدید روی سوش های استاندارد کاندیدا آلبیکنس، ساکارومایسس سرویسیه، آسپرژیلوس نایجر و میکروسپوروم جیپسیوم با دو روش میکرودایلوشن براث و رنگ سنجی درمحدوده MIC در دامنه ۶۴-۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیترتعیین گردید.

یافته‌ها

نتایج فعالیت ضد قارچی در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) نشان داد که ترکیبات اصلی بر ضد تقریبا هر ۴ سوش فعالیت داشتند. بیشتر مشتقات فعالیت ضد قارچی MIC در دامنه ۰/۲۵ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر داشتند. ترکیب ایمیدازول۳ (I.3) با MIC برابر با ۴ میکروگرم بر میلی لیتر روی کاندیدا آلبیکنس بیشترین اثر را داشته است که در مقایسه با داروی استاندارد فلوکونازول (MIC برابر با ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر روی این مخمر اثر بهتری نشان می‌دهد.

MIC مشتقات آزمایش شده بر ساکارومایسس بیان گر این است که بیشتر ترکیبات نهایی فعالیت بهتر و قابل مقایسه ای در برابر داروی مرجع دارند. در حقیقت، ترکیبات ایمیدازول۲ I.2 و ایمیدازول۳ با MIC برابر با ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر، ۱۲۸ برابر بیشتر از فلوکونازول و ۴ برابر بیشتر از مایکونازول بر روی ساکارومایسس سرویسیه موثر بوده است.

همین طور ترکیب ایمیدازول۱۷ (I.17) با MIC برابر با ۲ میکروگرم بر میلی لیتر فعالیتی در حد کلوتریمازول بر روی ساکارومایسس سرویسیه داشته است.

در میان ترکیبات، ترکیب ایمیدازول۵ I.5 فعالیت بالاتری روی آسپرژیلوس نایجر با MIC برابر با ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داد که در مقایسه با فلوکونازول، ۲ برابر بیشتر بود.

ترکیب ایمیدازول۳ (I.3) با MIC برابر با ۸ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی میکروسپوروم جیپسیوم در مقایسه با داروی استاندارد فلوکونازول نیز اثر خوبی داشت (۲ برابر بیشتر).

به طور کلی نتایج ارزیابی ترکیبات تست شده در مقایسه با داروهای استاندارد، این گونه بوده است که ترکیبات ایمیدازول۲ و ایمیدازول۳ نشان داده‌اند که اثر ضد قارچی بهتری روی همه سوش‌های قارچی آزمایش شده، داشته اند. در این ترکیبات جایگزینی حلقه آزولی با استفاده از ۱H-ایمیدازول /۱،۲،۴H-۱-تری آزول /۱،۲،۴H-۴-تری آزول ۴ آمینوتری آزولیوم و ۴،۱ تری آزولیوم

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱. حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر حاصل از سنجش اثرات ضد قارچی مشتقات ایمیدازول بر روی ۴ سوش قارچی استاندارد با ۲ روش میکرودایلوشن براث و رنگ سنجی.

ردیف	کاندیدا آلبیکنس		ساکارومایسس سرویسیه		آسپرژیلوس نایجر		میکروسپوروم جیپسیوم	
	میکرودایلوشن	کلریمتری	میکرودایلوشن	کلریمتری	میکرودایلوشن	کلریمتری	میکرودایلوشن	کلریمتری
MIC فلوکونازول	۸	۸	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۱۶
MIC کلوتریمازول	۲	۰/۵	۴	۲	۲	۱	۳۲	۳۲
MIC مایکونازول	۱	۰/۵	۱	۱	۲	۲	۸	۸
MIC ایمیدازول۱	۳۲	۱۶	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول۲	۶۴	۶۴	۰/۲۵	۰/۲۵	۶۴	۶۴	۳۲	۱۶
MIC ایمیدازول۳	۸	۴	۰/۲۵	۰/۲۵	۱۶	۱۶	۸	۸
MIC ایمیدازول۴	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول۵	۳۲	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
MIC ایمیدازول۶	۱۶	۱۶	۸	۱۶	۳۲	۱۶	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول۷	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۱۶	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول۸	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۱۶
MIC ایمیدازول۹	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول۱۰	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۱۶	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول۱۱	۶۴	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول۱۲	۱۶	۸	۱۶	۱۶	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲
MIC ایمیدازول۱۳	۶۴	۶۴	۶۴	۳۲	۶۴	۳۲	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول۱۴	۶۴	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲
MIC ایمیدازول۱۵	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۱۶	۱۶	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول۱۶	۶۴	۶۴	۳۲	۳۲	۶۴	۶۴	۶	۳۲
MIC ایمیدازول۱۷	۸	۸	۲	۲	۶۴	۳۲	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول۱۸	۶۴	۶۴	۱۶	۱۶	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول۱۹	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول۲۰	۱۸	۸	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول۲۱	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲	۳۲	۱۶
MIC ایمیدازول۲۲	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول۲۳	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴	۳۲	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول۲۴	۴	۸	۱۶	۰/۵	۱۶	۱۶	۶۴	۶۴

به جای اسکلت ۲ هیدروکسی استوفنون صورت گرفته است.

در ترکیب I.3 به طور واضح فعالیت بیشتری دیده می شود. در این ترکیب به جای اتم کلر یا هیدروژن، آنالوگ ۴ متوکسی فناسیل ایمیدازول قرار گرفته و اثر ان روی کاندیدا آلبیکنس بیشتر شده است. بنابراین بخش متوکسی از ایمیدازول فناسیل سبب افزایش فعالیت ضد قارچی می شود.

نتیجه این است که ترکیبات ۲-هیدروکسی فناسیل ازول و ۲-هیدروکسی فناسیل آزولیوم می‌تواند تعیین کننده یک کلاس جدید عوامل آزولی ضد قارچی با یک طیف فعالیتی قابل قبول باشد.

بیشتر مشتقات در فعالیت ضد قارچی بر روی قارچ‌های تست شده، عملکرد قابل توجهی نشان دادند که MIC آن‌ها در دامنه ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با داروهای استاندارد بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در روش رنگ سنجی از فعالیت متابولیک قارچ‌ها بر اساس تنفس میتوکندری استفاده شده است که با اندازه گیری کمی فورمازانی که از MTT به دست می‌آید. می‌توان برای ارزیابی حیات سلولی یا مرگ آن، سلول های یوکاریوت استفاده نمود.

به طور کلی انواع حلقه های آزول و اتم کلرین به ۴ موقعیت بخش فناسیل وصل شده و به نظر می‌رسد که تاثیرات مختلفی روی فعالیت ضد قارچی سوش‌های مختلف قارچی دارد (۱۰). مخمرها (کاندیدا آلبیکنس و ساکارومایسس سرویسیه) به طور ویژه به نظر می رسد که نسبت به هر دو تغییر در الگوی جانشینی حلقه آزول و بخش فناسیل حساس هستند.

از مزایای این تست، دقت و پرهیز از کاربرد

www.SID.ir

هرگونه ترکیب پرتوزا می باشد و چون بین طول موج حداکثر جذب سوبسترا (MTT) با محصول واکنش تفاوت زیادی هست، هیچ مرحله شستشویی در طی مراحل آزمون وجود ندارد. ما این روش را به عنوان یک روش میکروتیتر ساده برای آزمایش های حساسیت دارویی ۴ سوش قارچی استاندارد و ۲۲ مشتق ایمیدازولی استفاده کردیم. نتایج بیانگر این واقعیت بود که فعالیت تنفسی میتوکندریال می تواند به صورت کمی با یک پروسه رنگ سنجی ساده بیان شود. در این بررسی نتایج آزمایش هایانجام شده به روش رنگ سنجی و نیز روش میکرودایلوشن براث با یکدیگر هم خوانی داشت. ضمنا این نتیجه به دست آمد که روش رنگ سنجی به سادگی برای سایر قارچها و عوامل ضد قارچی قابل تعمیم می باشد. اگر چه هنوز به طور گسترده برای ارزیابی تست‌های حساسیت دارویی قارچ ها کاربردی نشده است.

در مورد محدودیت های پژوهش می‌توان گفت به موجب ناچیز بودن مقدار داروهای تازه ترکیب شده، انجام آزمایشات گسترده تر بر روی سوش‌های قارچی بیشتر امکان پذیر نبود.

در تحقیقی که در ۱۹۹۴ انجام شد، در آزمون رنگ سنجی با نمکMTT سوش کاندیداآلبیکنس و آسپرژیلوس فومی‌گاتوس کردند. نتایج بیانگر این مطلب بود که این روش برای بررسی اثرات عوامل ضد قارچی جدید کاملا قابل اعتماد می‌باشد و نتایج سوش های مخمری و هایفی دقیقا با نتایج حاصل از روش ماکرودایلوشن براث همخوانی دارد (۲).

درپژوهش دیگری از روش رنگ سنجی با نمک MTT برای ارزیابی قابلیت حیات آسپرژیلوسفومی گاتوس و رایزوپوساوریزه و کاندیداآلبیکانس استفاده کرد و در نهایت یک رابطه خطی بین میزان تلقیح سوسپانسیون و احیا MTT به دست آوردند و استفاده از این روش را به عنوان روشی ساده و جدید برای ارزیابی بقای سلول‌های قارچی توصیه کردند (۱۲).

در آزمون رنگ سنجی که بر روی سوش های کاندیدا و تورولوپسیس.گلابراتا و کریپتوکوکوس نیوفرمنس در برابر داروهای آمفوتریسین B و فلوکونازول و ۵-فلوسیتوزین انجام شد،نتایج بیانگر این بود که یافته های رنگ سنجی برای آزمایش‌های حساسیت ضد قارچی قابل اعتماد می‌باشد و این روش می تواند به عنوان روش استاندارد برای مخمرها معرفی شود (۱۳).

در تحقیق مورد اشاره، تعداد ۱۰۰ ایزوله مخمری (از چندین آزمایشگاه جمع آوری شده بود) که با روش رنگ سنجی در برابر داروهای آمفوتریسین B و فلوکونازول ارزیابی گردیدند.همزمان ۵ ایزوله مخمری استاندارد دیگر به عنوان کنترل بررسی شدند.در نهایت ۹۹/۴٪ نتایج در برابر فلوکونازول و ۹۸/۶٪ در برابر آمفوتریسین B با نتایج حاصله از سوش‌های استاندارد هم خوانی داشتند (۱۴).

مایکل روش میکرودایلوشن را با روش رفرانس ماکرودایلوشن NCCLS M27-P بر روی ده ایزوله مخمری در مقابل ۵-فلوسیتوزین و آمفوتریسین B و فلوکونازول را مقایسه کرد. هم خوانی نتایج میان MICهای به دست آمده برای آمفوتریسین B ۸۶٪، برای فلوکونازول ۹۰٪ و برای ۵-فلوسیتوزین ۹۳٪ در دو روش بود. در نهایت استفاده کاربردی از روش کلریمتری در آزمایشگاه‌های کلینیکی توصیه شد (۱۵).

در سال ۱۳۸۶ مشتقات جدید ایمیدازول و تری‌آزول توسط امامی و فرومدی سنتز شد و تحت نظر فلاحتی، اثرات ضد قارچی و MIC آن‌ها تعیین شد (۱۶).

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه انسیه لطفعلی در مقطع کارشناسی ارشد به راهنمایی دکتر مهربان فلاحتی و مشاوره دکتر علیرضا فرومدی در سال۱۳۸۶ و کد۱-۱۰۵۱ می باشد که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران اجرا شده است. نویسندگان این مقاله به این وسیله مراتب قدردانی خود را از جناب آقای دکتررضا فلک اعلام می‌دارند.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1. Jahn B, Martin E, Stueben A, Bhakdi S. Susceptibility Testing of Candida albicans and Aspergillus Species by a Simple Microtiter Menadione-Augmented 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl) -2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide Assay. American Society for Mcrobiology; 1995.661-667.
2. Alcezar Fuoli L, Rodriguez-Tudela JL, Mellado E. Antifungal drug resistance in molds. Clinical and Microbiological Factors 2008; 2: 36-42.
3. Rex JH, Pfaller MA, Whaksh T, Chatarvedi. Antifungal susceptibility testing practical aspects and current challenges. Clinical Microbiology Review. 2001. 6;367-381.
4. Kumar R, Shrivastava S, Chakraborti R. Comparison of Broth dilution and disc diffusion method for the antifungal susceptibility testing of Aspergillus flavus. Am J Biomed Sci 2010; 2(3): 202-208.
5. Lass-Flörl C, Perkhofer, Mayr A. In-Vitro susceptibility testing in fungi. Global perspective on a variety of methods. Mycoses 2010; 53: 1-11.
6. Clancy C, Neguyen M H.Correlation between in vitro susceptibility determined by E-test and response to therapy with amphotericin B: result from a multicenter prospective study of candidemia. Antimicrobial Agents Chmother.1999; 4, 3:1289-1290.
7. Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA. Antibacterial susceptibility test dilution and diffusion methods. In: Murray E J, Pfaller M A, Tenover FC, Yolken RH. Manual of clinical microbiology. Washington DC: ASM Press. 7th ed. 1999; 1: 1526-1543.
8. Espinel-Ingoroff A, Kerkering TM, Goldson P R. Comparison study of marcrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. Journal of Clinical Microbiology.1991;29:1080- 1094
9. Wrnock WD. Method with antifungal drugs. In: Tikyo, Evanse EG, Richardson ND. New York: Irl Press at oxford University Press. Medical Mycology 1989; 1: 235- 259.
10. Odd FC, Geruen FV, Espinel-Ingroff A, Bartlett MS, Ghan MA, Lancaster MV, et al. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungin in-vitro and fungal treatment outcomes in animal infection models. Anti Microb Agents 1998; 42: 282-288.
11. Espinel-Ingroff A. In-Vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. J Clin Microbiol 2001; 39: 954-958.
12. Diamond R, Stuart M, Richard d. A Rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. Journal of infectious Disease.1985; 152, 5: 12-19.
13. Pfaller M, Barry AL. Evaluation of a novel colorimetric Broth Micro-dilution Method for Antifungal Susceptibility Testing of yeast isolates. Journal of clinical microbiology.1997; 1: 1992-1996.
14. Pfaller M, Espinel A, Moore S.Multisite Reproducibility colorimetric Broth Microdilution Method for Antifungal Susceptibility testing of yeast Isolates. Journal of Clinical Microbiolog 1995; 1:1628- 1635.
15. Michael A, Pfaller M, Barry B.Multicenter comparison of a colorimetric Broth Micro-dilution Method with the reference macrodilution method for in vitro susceptibility testing of yeast isolates. Diagn Microbial Infect Dis 1994;1:9-13.
16. Emami S, Forumadi A, Falahati M, Lotfali E, et al. 2-Hydroxyphenacyl azoles and related azolium derivatives as antifungal agents. BMCL 2007; 1:1010-16.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts approved standard M27A, NCCLS, Wayne, PA. 2002.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of Filamentous Fungi approved standard M38-p, NCCLS, Wayne, PA. 2002.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of Antifungal activity of new derivatives of Imidazole using Colorimetric method

Ensieh Lotfali, PhD. Resident of Mycology, Health Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ensieh_4345@yahoo.com.
*** Mehraban Falahati**, **PhD**. Associate Professor of Mycology, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (*Corresponding author). mehrabanfalahati@yahoo.com
Alireza Foroumadi, PhD. Professor of Pharmacology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.aforoumadi@yahoo.com.
Saied Emami, PhD. Associate Professor of Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Mazandaran, Iran. sd_emami@yahoo.com

Abstract

Background: The incidence of invasive fungal infections has been increasing for two decades. Amatter of concern in the treatment of fungal infections is the limited number of efficacious antifungal drugs. Many available drugs lead to the development of resistance, In order to seek new antifungal agents we assessed the antifungal activity of newly synthesized Imidazol compounds by a colorometric method .

Methods: In this experimental study antifungal activity of the new Imidazol compounds against Candida albicans, Saccharomyces cervisiae, Aspergillus niger, Microsporum gypseom was investigated by colorometric method and results were compared to microdilution ones.

Results: 2-hydroxyphenacyl-azole and 2- hydroxyphenacyl-azolium compounds have been identified as a new class of azole antifungal agents with a good spectrum of activity.The colorimetric method is a simple microtiter method for determining the susceptibility of species of fungal against antifungal agents.

Conclusion: Most derivatives showed significant in vitro antifungal activities against tested fungi with low MIC (minimum inhibitory concentration) values included in the range of 0.25-32 µg/mL comparable to the reference drug Fluconazole.

Keywords: Imidazole, Colorimetric method, Antifungal activity, Susceptibility tests.

Archive of SID

www.SID.ir