Archive of SID

دانشور
پزشکی

بررسی میزان حساسیت گروهی از ایزوله‌های بومی کاندیدا نسبت به داروی فلوکونازول توسط روش‌های دیسک دیفیوژن و رقیق‌سازی در مایع

نویسندگان: لیلا نعمتی‌شیرزی[1]، دکتر معصومه شمس‌قهفرخی[3*] و دکتر محمدحسین یادگاری[2]

۱. دانش‌آموخته کارشناس ارشد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲. استادیار بخش قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

* نویسنده مسئول: Email: shamsm@modares.ac.ir

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال پانزدهم – شماره ۷۳
اسفند ۱۳۸۶

وصول: ۸۴/۴/۱
ارسال اصلاحات: ۸۵/۶/۶
دریافت اصلاحات: ۸۵/۹/۱۵
پذیرش: ۸۶/۳/۱

چکیده

مقدمه: گونه‌های مختلف *کاندیدا* دارای حساسیت‌های متفاوتی نسبت به داروهای ضد قارچی هستند و لذا شناسایی یک داروی مناسب توسط روش‌های تعیین حساسیت استاندارد و روتین کردن این روش‌ها جهت درمان قطعی، از ضروریات انکارناپذیر است.

روش کار: در تحقیق حاضر، حساسیت ۱۰۶ ایزوله بومی از ۸ گونه *کاندیدا* در شهر تهران که برخی از آن‌ها با مقاومت به کتوکونازول همراه بوده‌اند، با مقایسه روش دیسک دیفیوژن با تست رقیق‌سازی در مایع که تست مرجع است، مطابق استاندارد NCCLS، نسبت به فلوکونازول مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: طبق نتایج این دو روش، به ترتیب ۶۹/۸۱ درصد و ۶۱/۳۲ درصد از ایزوله‌ها به فلوکونازول حساس، ۲۲/۶ درصد و ۲۴/۵۲ درصد دارای حساسیت بینابینی و ۱۵/۰۹ درصد و ۱۴/۱۵ درصد مقاوم بودند. ترتیب گونه‌ها از حساسیت بیش‌تر تا کم‌تر (*دوبلینینسیس* ≈ *پاراپسیلوزیس* ≈ *لوزیتانی* ≈ *کفیر* > *آلبیکنس* > *تروپیکالیس* > *گلابراتا* > *کروزه‌ای*) گزارش شد.

بحث: نتایج حاصل، نشانگر وجود مقاومت بالای گونه‌های *کروزه‌ای* و *گلابراتا* نسبت به سایر گونه‌ها است. مقایسه نتایج دو تست، فاقد اختلاف معنادار بود ($p<0/05$) و ۹۴/۳۴ درصد تشابه بین نتایج، موید ارزش تقریباً برابر و همخوانی این روش است. همچنین می‌توان از تست دیسک دیفیوژن که ساده و کم هزینه بوده و نتایج آن نیز قابل مقایسه با تست مرجع است، به‌عنوان تست غربالگری در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی کشور به صورت روتین بهره برد.

واژه‌های کلیدی: *کاندیدا*، فلوکونازول، دیسک دیفیوژن، حساسیت دارویی، رقیق‌سازی در مایع

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کاندیدیازیس، شایع‌ترین عفونت قارچی فرصت‌طلب است که امروزه به دلیل افزایش فاکتورهای مستعدکننده ابتلا به آن، مانند پیوند اعضا، مصرف داروهای سرکوب‌کننده ایمنی و آلودگی به ویروس ایدز در حال گسترش چشمگیر است[۱]. عامل اصلی کاندیدیازیس، *کاندیدا آلبیکنس* می‌باشد و اشکال بالینی بیماری در فرم‌های سطحی و مخاطی تا عفونت‌های سیستمیک مشاهده می‌شود[۴-۱]. از نکات حائز اهمیت در درمان کاندیدیازیس، تشخیص صحیح عامل بیماری‌زا توسط مشاهدات میکروسکوپی و کشت است[۵]. بسنده‌کردن به معاینات بالینی، خصوصاً در فرم‌های شایع بیماری، مانند واژینیت، در اکثر موارد، منجر به تشخیص ناصحیح عامل عفونت‌زا شده که در نهایت، منجر به تجویز نامناسب دارو جهت درمان می‌شود. استفاده از دوز بالای دارو، کاهش حساسیت و مقاومت‌های اکتسابی نسبت به دارو و ایجاد فرم مزمن بیماری را به دنبال دارد [۹-۶].

همچنین در سال‌های اخیر، شیوع عفونت‌های کاندیدیازیس توسط ایزوله‌های مقاوم به داروهای رایج آزولی، مانند *کاندیدا گلابراتا* و *کروزه‌ای* و عدم تشخیص صحیح آن‌ها، منجر به شکست در امر درمان می‌گردد [۱۰-۸]. موارد مطرح‌شده به همراه وجود الگوی حساسیتی قابل تعیین در ایزوله‌های *کاندیدا*، ضرورت استفاده از روش‌های تعیین ارزیابی حساسیت دارویی عوامل قارچی را بیش از پیش آشکار ساخته که در آزمایشگاه‌های کشور به‌طور روتین انجام نمی‌گیرد. امروزه کمیته استانداردسازی NCCLS الگوی استاندارد (National Committee for Clinical Laboratory Standards) روش رقیق‌سازی در مایع (Broth microdilution) را جهت تعیین میزان حساسیت مخمرهایی چون کاندیدا نسبت به داروهای ضد قارچی طراحی کرده است[۱۴-۱۱]. اگرچه این روش به عنوان تست مرجع (gold standard) از سوی کمیته استاندارد سازی مطرح شده، اما انجام آن در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به‌طور معمول، کار وقت‌گیر، پرهزینه و دشواری است. لذا وجود یک روش فرعی (alternative)، مانند روش دیسک‌دیفیوژن (Disk diffusion) که انجام آن ساده و مقرون به صرفه بوده، در عین حال نتایج حاصل از آن مورد تأیید کمیته استانداردسازی نیز باشد، از ضروریات انکارناپذیر است [۱۸-۱۴].

در تحقیق حاضر از مقایسه نتایج این دو روش در تعیین حساسیت گروهی از ایزوله‌های بومی *کاندیدا* در تهران که برخی از آن‌ها در درمان با کتوکونازول مقاوم و با عود مکرر همراه بوده‌اند، نسبت به فلوکونازول بهره‌گیری شده است. این دارو با نام تجاری دیفلوکان و فرمول شیمیایی $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ از دسته آزول‌ها است که با اثر بر روی آنزیم های سیستم سیتوکروم P-450 منجر به اختلال در سنتز ارگوسترول می‌گردد. این داروی جدید از لحاظ عملکردی، فونجی استاتیک بوده، نسبت به داروهای قدیمی‌تر کارایی مناسب‌تری دارد و عوارض جانبی آن به‌مراتب کم‌تر است [۱۸و۶].

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰۶ ایزوله *کاندیدا* از ۸ گونه مختلف، از افراد مبتلا به انواع عفونت‌های کاندیدیازیس، از بخش‌های عفونی و آزمایشگاهی بیمارستان‌ها و مراکز دندان‌پزشکی در نقاط مختلف تهران در فاصله سال‌های ۸۴-۱۳۸۳ جداسازی شدند(جدول۱). پس‌از خالص‌سازی‌کشت‌ها بر روی‌محیط سابورو دکستروز آگار (Merck,Germany,Cat No. 5438) گونه‌های کاندیدا توسط تست‌های جرم تیوب (تولید لوله زایا)، تولید کلامیدیواسپور، مورفولوژی کلنی بر روی محیط کروم آگار (Merck, Germany Cat. No10456) و تست جذب قندها شناسایی شدند. ایزوله‌های کنترل (Mast co, England): کاندیدا آلبیکنس ATCC ۱۰۲۳۱ و کاندیدا دوبلینینسیس CD ۳۶ به عنوان استاندارد جهت تشخیص، کاندیدا آلبیکنس ATCC ۶۴۶۵۸ به عنوان استاندارد حساس، و *کاندیدا آلبیکنس* ATCC ۶۴۵۵۰ به عنوان استاندارد مقاوم به فلوکونازول در هر دو استاندارد، و روش دیسک دیفیوژن و رقیق‌سازی در مایع استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین حساسیت دارویی به روش دیسک دیفیوژن

طبق الگوی استاندارد، غلظت فلوکونازول در دیسک‌ها باید به میزان ۲۵ میکروگرم باشد [۱۹]. در نتیجه، میزان ۲ میلی‌گرم از پودر فلوکونازول (شرکت روز دارو، شماره آنالیز A-D۸۳۰۴) در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید و ۱۲/۵ میکرولیتر از این محلول دارویی بر روی کاغذهای دیسک استریل ریخته شد و در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا دیسک‌ها کاملاً خشک شدند. سپس تعداد 1×10^5 سلول در میلی‌لیتر از هر یک از ۱۰۶ ایزوله بالینی و استاندارد کاندیدا (معادل ۰/۵ مک‌فارلند استاندارد) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Biotech 25, Ulterospec 2108 تهیه و بر روی محیط مولرهینتون آگار با مکمل‌های گلوکز و متیلن‌بلو (Merck,Germany, cat. No 0252) که محیط انتخابی مخمر *کاندیدا* بود، به‌صورت خطی کشت داده شد. پس از جذب سوسپانسیون، دیسک‌های فلوکونازول در مرکز هر یک از پلیت‌ها قرار داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در نهایت، قطر نواحی مهار رشد اطراف دیسک‌ها پس از طی این مدت اندازه‌گیری شد [۲۴-۱۷].

استاندارد توصیه شده NCCLS جهت تفسیر نتایج روش دیسک دیفیوژن

ایزوله‌هایی که قطر ناحیه مهار رشد آن‌ها در برابر دیسک ۲۵ میکروگرمی فلوکونازول به ترتیب معادل یا کم‌تر از ۱۵، بین ۲۱-۱۶ و بیش‌تر از ۲۱میلی‌متر باشد، در گروه ایزوله‌های مقاوم، با حساسیت وابسته به دوز و حساس طبقه‌بندی می‌شوند[۱۹].

تعیین حساسیت دارویی به روش رقیق‌سازی در مایع

طبق توصیه استاندارد NCCLS داروی فلوکونازول باید در رقت‌های ۰/۰۶ تا ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI(Gibco,Island,Cat.No30870703) تهیه شود [۱۲]. طبق الگوی استاندارد، جهت رسیدن به رقت دارویی مورد نظر، سوسپانسیونی از ایزوله‌های بالینی و استاندارد *کاندیدا* توسط اسپکتروفتومتر مدل (Biotech 25, Ulterospec 2108) معادل ۵ مک فارلند استاندارد در محیط RPMI تهیه شد و در هر ۱۰۰ میکرولیتر از آن، تعداد 1×10^5-۰/۵ سلول مخمری زنده و فعال وجود داشت. رقت‌های دارویی در محدوده ۲۵۶-۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌صورت رقت‌های دو برابر با حجمی معادل ۱۰۰ میکرو لیتر در محیط کشت RPMI با pH معادل ۷ که حاوی مکمل‌های ال - گلوتأمین و آسپاراژین و بافر مورفولین پروپان سولفونیک اسید بود، در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل تهیه شد. متعاقب آن به هر چاهک، میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمری افزوده شد. از آن‌جا که حجم نهایی هر چاهک برابر با ۲۰۰ میکرولیتر شد، غلظت‌های نهایی دارو به میزان استاندارد رسید و چاهک حاوی محیط کشت RPMI بدون دارو به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد.

در نهایت، میکروپلیت‌ها در شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ در دقیقه با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس از هر رقت بر روی پلیت‌های حاوی محیط عصاره مغز و قلب و آگار، (Merck,Germany Cat.No1382) کشت گردید و ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه نگهداری شد و پس از آن، میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد MIC (Minimal Inhibitory Concentration) و یا حداقل غلظت کشندگی MFC (Minimal Fungicidal Concentration) تعیین گردید.

تعیین میزان MIC بر اساس شمارش تعداد کلنی‌های رشد کرده و مقایسه با تعداد اولیه سلول‌های تلقیح شده و کلنی‌های رشدکرده در گروه کنترل است. MIC_{50} و MIC_{90} حداقل غلظت‌هایی از دارو هستند که به ترتیب رشد ۵۰ درصد و ۹۰ درصد از کلنی‌ها را نسبت به گروه کنترل مهار می‌کند. MFC نیز حداقل غلظتی از دارو است که در پلیت آن، هیچ رشدی مشاهده نمی‌شود [۲۹-۲۵].

استاندارد توصیه شده NCCLS جهت تفسیر نتایج روش رقیق‌سازی در مایع: ایزوله‌هایی که در غلظت‌های معادل یا کم‌تر از ۸، بین ۱۶ تا ۳۲ و معادل یا بیش‌تر از ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر از فلوکونازول مهار رشد نشان

www.SID.ir

Archive of SID

بدهند، به ترتیب درگروه ایزوله‌های حساس، دارای حساسیت وابسته به دوز، و مقاوم به دارو دسته‌بندی می‌شوند [۱۲].

آنالیز آماری: نتایج به دست‌آمده بر حسب مورد با استفاده از آزمون «تی» (T-test) و آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقادیر P کم‌تر از ۰/۰۵ معنادار گزارش گردید.

نتایج

در تحقیق حاضر، آثار ضدقارچی داروی فلوکونازول بر روی ۱۰۶ ایزوله *کاندیدا* از ۸ گونه جداسازی‌شده از عفونت‌های مختلف بالینی کاندیدیازیس بررسی گردید (جدول ۱). طبق روش دیسک دیفیوژن در طی زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت با توجه به قطر ناحیه مهار رشد، میزان حساسیت به دارو بر حسب نوع ایزوله و محل درگیری متفاوت بوده (جدول۲) و بر اساس اطلاعات ارائه شده در جدول ۳، تعداد گونه‌های حساس، مقاوم و وابسته به دوز، هر کدام تفکیک شده است. همچنین بررسی تأثیر

جدول ۱ تعداد و درصد فراوانی ایزوله‌های *کاندیدا* در نمونه‌های بالینی به دست آمده از بیماران بر حسب محل درگیری عفونت

	ایزوله کاندیدا (درصد فراوانی)	واژن	ادرار	دندان	ناخن	دهان	زخم‌پوستی
۱	مجموع ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس*(٦٤) (٪٦٠/٣٧)	٢٦ (٪ ٦٢/٤٠)	١٠ (٪١٥/٦٢)	١١ (٪١٧/١٨)	٨ (٪١٢/٥)	٨ (٪١٢/٥)	١ (٪١/٥۶)
	ایزوله‌های مقاوم به کتوکونازول(٢٣) (٪٢١/٧٠)	١٨ (٪٧٨/٢٦)	٣ (١٣/٠٤)			٢ (٨/٩٦)	
۲	مجموع ایزوله‌های *کاندیداگلابراتا*(١٨) (٪١٦/٩٨)	٦ (٪٣/٣٣)	١ (٪٥/٥٥)	٤ (٪٢٢/٢)	٥ (٪٢٧/٧)	١ (٪٥/٥٥)	١ (٪٥/٥٥)
	ایزوله‌های مقاوم به کتوکونازول(٥) (٪٧/٢٧)	٣ (٪٦٠)		٢ (٪٤٠)			
۳	*کاندیداکروزه ای*(٦) (٪٥/٦٦)	٣ (٪٥٠)	٢ (٪٣٣/٣)	١ (٪١٦/٦)	–	–	–
۴	*کاندیدا دوبلینینسیس*(٦) (٪٥/٦٦)	-	–	–	–	٦ (٪١٠٠)	–
۵	*کاندیدا تروپیکالیس*(٥) (٪٤/٧١)	١ (٪٢٠)	٢ (٪٤٠)	١ (٪٢٠)	–	١ (٪٢٠)	–
۶	*کاندیداپاراپسیلوزیس*(٤) (٪٣/٧٧)	١ (٪٢٥)	–	–	–	٣ (٪٧٥)	–
۷	*کاندیداکفیر*(٢) (٪١/٨٨)	١ (٪٥٠)	١ (٪٥٠)	–	–	–	–
۸	*کاندیدا لوزیتانی*(١) (٪٠/٩٤)	–	١ (٪١٠٠)	–	–	–	–
	مجموع	٣٨ (٪٣٥/٨٤)	١٧ (٪١٦/٠٣)	١٧ (٪١٦/٠٣)	١٣ (٪١٢/٢٦)	١٩ (٪١٧/٩٢)	٢ (٪١/٨٨)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ تعداد ایزوله‌های حساس، با حساسیت بینابینی و مقاوم نسبت به فلوکونازول با استفاده از نتایج حاصل از تست‌های دیسک دیفیوژن و رقیق‌سازی در مایع

	تعداد ایزوله های کاندیدا	نتایج روش رقیق سازی در مایع			نتایج روش دیسک دیفیوژن		
		حساس	بینابینی	مقاوم	حساس	بینابینی	مقاوم
۱	*کاندیدا آلبیکنس(۶۴)*	۴۸	۱۴	۲	۵۵	۸(۲)*	۱
۲	*کاندیداگلابراتا(۱۸)*	۳	۸	۷	۴	۷(۲)*	۷(۱)*
۳	*کاندیداکروزه ای(۶)*	–	–	۶	–	–	۶
۴	*کاندیدا دوبلینینسیس(۶)*	۶	–	–	۶	–	–
۵	*کاندیدا تروپیکالیس(۵)*	۱	۴	–	۲	۳(۲)*	(۱)*
۶	*کاندیداپاراپسیلوزیس(۴)*	۴	–	–	۴	–	–
۷	*کاندیداکفیر(۲)*	۲	–	–	۲	–	–
۸	*کاندیدا لوزیتانی(۱)*	۱	–	–	۱	–	–
	مجموع	۶۵	۲۶	۱۵	۷۴	۱۸(۲۴)*	۱۴(۱۶)*
	(درصد فراوانی)	٪۶۱/۳۲	٪۲۴/۵۲	٪۱۴/۱۵	٪۶۹/۸۱	٪۱۶/۹ (٪۲۲/۶)*	٪۱۳/۲ (٪۱۵/۰۹)*

*:نتایج منحصراً مربوط به ۴۸ ساعت انکوباسیون است.

جدول ۳ نتایج حاصل از تعیین میزان حساسیت هر یک از ایزوله های *کاندیدا* نسبت به داروی فلوکونازول در تست‌های دیسک دیفیوژن (بر اساس میانگین قطر ناحیه مهار رشد) و رقیق سازی در مایع (براساس میانگین MIC)

	تعداد ایزوله های کاندیدا	نتایج تست رقیق سازی در مایع بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر				نتایج تست دیسک دیفیوژن بر حسب میلی‌متر	
		محدوده MIC	میانگین MIC_{50}	میانگین MIC_{90}	میانگین MFC	میانگین قطر ناحیه مهار رشد (۲۴ ساعت)	میانگین قطر ناحیه مهار رشد (۴۸ ساعت)
۱	*کاندیدا آلبیکنس(۶۴)*	۰/۰۶-۶۴	۴	۱۶	۶۴	۲۹	۲۷
۲	*کاندیداگلابراتا(۱۸)*	۰/۰۶-۶۴	۱۶	۶۴	۶۴<	۱۹	۱۸
۳	*کاندیداکروزه ای(۶)*	۰/۰۶-۶۴<	۳۲	۶۴<	۶۴<	۸	۶
۴	*کاندیدا دوبلینینسیس(۶)*	۰/۰۶-۱۶	۰/۵	۶	۳۲	۴۷	۴۵
۵	*کاندیدا تروپیکالیس(۵)*	۰/۰۶-۶۴	۴	۳۲	۶۴<	۲۵	۲۲
۶	*کاندیداپاراپسیلوزیس(۴)*	۰/۰۶-۱۶	۱	۴	۳۲	۴۱	۳۸
۷	*کاندیداکفیر(۲)*	۰/۰۶-۶	۰/۵	۱	۱۲	۳۶	۳۴
۸	*کاندیدا لوزیتانی(۱)*	۰/۰۶-۴	۰/۵	۴	۸	۴۹	۴۶

غلظت‌های مختلف داروی فلوکونازول با روش رقیق‌سازی در مایع بر رشد ایزوله‌های *کاندیدا* نشان داد که این دارو از طریق وابسته به غلظت، در تمام غلظت‌های به‌کار گرفته شده، قادر به مهار رشد اکثر ایزوله‌های *کاندیدا* است و نتایج آن به تفکیک در جدول ۲ و ۳ عنوان گردیده است. در هر دو روش ذکرشده، اختلاف گروه حساس به دارو با دو گروه دیگر از نظر آماری در سطح کم‌تر از ۰/۰۵ معنادار بود ($p<0/05$).

در هر دو روش تحت آزمایش، ایزوله‌های استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* ATCC ۶۴۵۵۰ نسبت به فلوکونازول

www.SID.ir

Archive of SID

مقاوم و *کاندیدا دوبلینینسیس* CD۳۶، *کاندیدا آلبیکنس* ATCC۱۰۲۳۱ و *کاندیدا آلبیکنس* ATCC۶۴۶۵۸ حساس بودند.

بحث

در مطالعه حاضر، حداقل میزان حساسیت گروهی از ایزوله‌های بومی *کاندیدا* در شهر تهران نسبت به فلوکونازول، توسط دو روش دیسک دیفیوژن و رقیق‌سازی در مایع تعیین، و نتایج حاصل از دو تست با هم مقایسه شده است. نتایج به دست آمده از تحقیق نشان داد که ارتباط مناسبی بین نتایج حساسیت (MIC_s) حاصل از دو تست وجود دارد. بیش‌ترین میزان MIC نسبت به فلوکونازول در *کاندیدا کروزه‌ای* با ۱۰۰ درصد مقاومت دیده شد (MIC_{50}= ۳۲ µg/ml). بررسی‌ها نشان داده که این‌گونه دارای مقاومت ذاتی به داروهای آزولی است [۲۷-۲۳].

پس از آن، *کاندیدا گلابراتا* با ۳۸ درصد مقاومت و ۴۴ درصد حساسیت بینابینی و کاندیدا تروپیکالیس با ۷۵ درصد حساسیت بینابینی (MIC_{90}= ۴۸µg/ml) ایزوله‌هایی هستند که به فلوکونازول، حساسیت چندانی نداشته، دارای مقاومت هستند؛ اما *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *دوبلینینسیس* و *لوزیتانی* (MIC_{90}=۴µg/ml) دارای حساسیت فوق‌العاده نسبت به دارو هستند (جدول ۳) که این نتایج با مطالعات بسیاری از محققین در یک سطح است [۲۶-۱۸].

همچنین وجود ۹۴/۴ درصد توافق در مقایسه نتایج دو روش حساسیت‌سنجی به‌کار گرفته شده در تحقیق حاضر، مؤید همخوانی و ارزش تقریباً برابر تست‌ها است و از آن‌جا که تعیین حساسیت با تست مرجع برای تعداد بالای نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، کار وقت‌گیر، دشوار و مستلزم صرف هزینه بیش‌تر است، لذا با توجه به این نکته می‌توان از تست ساده‌تر دیسک دیفیوژن در تعیین حساسیت دارویی تعداد زیادی از ایزوله‌های *کاندیدا* به عنوان تست غربالگری در آزمایشگاه‌ها بهره برد.

مقایسه بین نتایج تست دیسک دیفیوژن پس از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت انکوباسیون نیز نشان‌دهنده وجود تشابه بیش‌تر در نتایج پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون با نتایج تست مرجع یا رقیق‌سازی در مایع است. همچنین در تحقیقات مشابه در کانادا [۲۲] بر روی ۴۹۵ ایزوله و در آمریکا [۳۰] بر روی ۴۰۰ ایزوله *کاندیدا*، به‌ترتیب ۹۳/۵ درصد و ۸۳ درصد توافق بین نتایج دو روش نامبرده مطرح شده است. همچنین از مجموع ۶۲ ایزوله کاندیدا *آلبیکنس* تحت بررسی، تعداد ۳۲ ایزوله از افراد مبتلا به عفونت‌های مقاوم به درمان با کتوکونازول جداسازی شده بود (جدول ۱) که از این میان فقط ۲/۳۴ درصد از آن‌ها به فلوکونازول مقاومت داشته، ۱۸/۷۵ درصد دارای حساسیت بینابینی و۱۴/۸۳ درصد دارای حساسیت کامل نسبت به دارو بوده‌اند که یکی از ایزوله‌های مقاوم به دارو نیز از حفره دهانی یک فرد مبتلا به ایدز جداسازی شده بود. نتایج مشابه توسط محققین بر روی ایزوله‌های بومی برزیل وجود دارد که از بین ۱۳۶ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس* تحت بررسی، ۴ درصد دارای مقاومت به فلوکونازول بوده‌اند که این تعداد نیز از عفونت‌های کاندیدیازیس در افراد مبتلا به ایدز جداسازی شده بود[۲۳]. در ارتباط با *کاندیدا گلابراتا* نیز از مجموع ۱۸ ایزوله تحت بررسی، ۵ ایزوله از عفونت‌های مقاوم حاصل شده بود که از این میان ۱۱/۱۱ درصد از آن‌ها به فلوکونازول حساس بودند (جدول ۱). در مجموع، این مطالعه نشان داد که فلوکونازول، فعالیت بسیار مناسبی در شرایط آزمایشگاهی، در برابر اکثر ایزوله‌های پاتوژن *کاندیدا* دارد و اختلاف گروه حساس به دارو با دو گروه دیگر از لحاظ آماری معنادار گزارش شد ($p<0/05$). بنابراین می‌توان از این دارو در درمان کاندیدیازیس، خصوصاً عفونت‌های واژینال که شیوع فراوانی در ایران دارد و به درمان با داروهای آزولی قدیمی‌تر همچون کلوتریمازول، کتوکونازول و مایکونازول پاسخ مناسبی نمی‌دهد، سود جست. وجود مقاومت و حساسیت بینابینی در ۱۷/۲۱ درصد از ایزوله‌های تحت بررسی که بیش‌تر مربوط به *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا کروزه‌ای* است، بیان‌کننده اهمیت این دو ایزوله در ایجاد عفونت‌های

www.SID.ir

Archive of SID

مزمن و مقاوم است. در همین راستا، لزوم یافتن ترکیبات دارویی جدیدتر با خواص مهارکنندگی بیش‌تر رشد عوامل قارچی، تشخیص دقیق عامل اتیولوژیک بیماری، انجام تست تعیین حساسیت دارویی جهت انتخاب داروی مناسب جهت درمان، استفاده معقولانه از دارو با دوز مناسب، و انجام مطالعات بیش‌تر و به‌روز برای تعیین وجود مقاومت‌های اولیه و ثانویه نسبت به داروها در تحقیقات آتی پیشنهاد می‌گردد.

منابع

1. Ajello L, Medical mycology, In; Topley and Wilson's. Microbiology and microbial infection, oxford university press. USA. 1998.
2. Osman O.Identification of different Candida species isolated in varioushospitals inAnkara by fungichrom test kit and their differentiation by SDS-PAGETurk med sci. J Clin Microbiol 2000, 30(6):355-358.
3. Ahmad S, Khan Z. Semi nested PCR for diagnosis of Candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. J Clin Microbiol 2002, 46(3):2484-2489.
4. Ruhnke E, Westhaven A. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida Dubliniensis* in a patient with AIDS.J Antimicrob Chemother 2000, 46(2):261-295.
5. White T, Marr A. Clinical, cellular and molecular factor that contribute to antifungal testing resistant. Clin Microbiol review 1998, 11(2):312-402.
6. Pfizer.Antifungal drug resistance:a focus on *Candida*. Clin Updates in Fungal Infec 1997, 1(3):1-5.
7. Ghannoum M, Rice L. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance.Clin Microbial Rewiews 1999, 12(4):501-517.
8. Marichal P, Bossche V. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolates. Antimicrib agents Chemother 1997, 41(10): 2229-2237.
9. Odds F. The evolution of antifungal resistance in *Candida* species. Microbiol today 2004, 31(5):166-168.
10. Ramos A, Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2000, 23(2):1214-1220.
11. Lozano M, Nelson W. Disk diffusion method for determining susceptibilies of *Candida* spp. to MK-0991. J Clin microbial. 1999,37(5):1625-1627
12. National committee for clinical laboratory standard 2002. Reference method for broth dilution Susceptibility testing of yeasts. Approved standard NCCLS document M27-A.ds. Wayne ،pa.
13. National committee for clinical laboratory standards.2002. Reference method for broth Dilution susceptibility testing conidium forming filamentous fungi.approved standard NCCLS document M38-P A.ds.wayne, pa
14. Eldere.J,Joosten.L.Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by national committee for clinical laboratory standards broth macrodilution method compared with Etest and semi automated broth microdilution test.J Clin Microbial 1996,34(4):842-847
15. Robert S, Robert P.Novel fluorescent broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*. J Clin Microbial 2001, 39(7): 2708–2712.
16. Pfaller A, Messer A. Evaluation of the NCCLS M44-P disk diffusion method for determining susceptibilities of 276 clinical isolates of *C. neoformans* to fluconazole.J Clin Microbiol 2004, 42(1):380-383.
17. Sandven P.Detection of fluconazole resistant *Candida* strains by a disk diffusion screening test.J Clin Microbiol 1999, 37(12):3856-3859.
18. Nelson Sh, M Cartwritht P.Detecion of fluconazol resistance isolates of *Candida* strains by a disk diffusion screening test. J Clin Microbiol 2002, 41(3):2141-2143.
19. Scheven M.Susceptibility testing of yeasts to fluconazole by Etest and agar-diffusion disk test using the syntetic agar medium mycoplate.Mycosos 2002, 45(3):156-159.
20. Yun-Ling Y, Shu-Ying L.The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species from 1999 to 2002 in Taiwan.BMC Infect dis 2005,99(5):1-5.
21. Posteraro B, Romano L. Commercial systems for flucona zole susceptibility testing of yeasts: comparison with the broth microdilution method. Diagno Microb Infect Dis, 2000.38(3):29-36.
22. Madona J, Luis O. Correlation between E test, disk diffusion and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. Antimicrob agents Chemother 2003, 47(5): 1647-1651.
23. Arnaldo L, Colombo D.Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by disk diffusion method.The Brazilian J Infect Dis 2002,6(3):118-123.
24. Morac G, Amato G. Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the national committee for clinical laboratory standards M27-A microdilution methods for fluconazole sceptibility testing of *Candida* species. J Clin Microbiol 2000, 40(7):2953-2958.
25. Tiballi N, Larins T. *Torulopsis glabrata*: azole susceptibilies by microdilution and macro dilution broth assays. J Clin Microbiol 1995, 33(10):2613-1615.

www.SID.ir

Archive of SID

26. To K, Fothergill A. Comparative evalution of macrodilution and alamar colorimetric microdilution broth method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. J Clin Microbial 1995, 33(6):2660-2664.

27. Erja Ch.Trends in antifungal susceptibility among Swedish *Candida* species blood stream isolates from 1994 to 1998: comparison of the Etest and the sensitive yeast one colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27A reference method. J Clin Microbiol 2001, 39(11): 4181-4183.

28. Wagner A, Mills P W. Comparison of Etest and national committee for clinical laboratory standards broth microdilution method for antifungal susceptibility Testing: enhanced ability to detect amphotericin B resistant *Candida* isolates. Antimicrob agents Chemother 1995, 39(4):2520-2522.

29. Takakura S, Fujihar N. National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafungin. J Antimicrob Chemother 2004, 53(7):283-289.

30. Barry A, Pfaller R. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth micro dilution, Etest, and disk diffusion methods. Antimicrob agents chemother 2002, 46(6):1781-1784.

www.SID.ir