

بررسی حساسیت دارویی گونه‌های آسپرژیلوس جدانشده از ضایعات بالینی به برخی داروهای ضدقارچی رایج در شرایط In-vitro

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۶

چکیده

سیدجمال هاشمی

فریده زینی، روشنگر داعی

انسبه زیبا، میرابوالفضل ذاکری*

گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی،
دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران،
تهران، ایران.

زمینه و هدف: مطالعات مختلف نشان داده‌اند علی‌رغم توسعه داروهای ضد قارچی و به دلیل افزایش بروز مقاومت دارویی، افزایش Minimum Inhibitory Contration (MIC) و انتقال مقاومت (Cross-resistance) در میان ایزوله‌های آسپرژیلوس، میزان مرگ و میر عفونت‌های فرصت طلب و مهاجم ناشی از گونه‌های آسپرژیلوس افزایش یافته است. عدم پاسخ موثر به درمان‌های رایج و عدم دسترسی به اطلاعات حساسیت دارویی شایع‌ترین ایزوله‌های آسپرژیلوس بهانه‌ای برای طراحی و اجرای مطالعه اخیر گردید. **روش بررسی:** در طی ۱۳ ماه تعداد ۵۰ ایزوله کلینیکی آسپرژیلوس بر اساس روش Klich 2002 و مشخصات مورفولوژیک تشخیص داده شدند. سپس تست حساسیت دارویی آن‌ها طبق روش استاندارد Broth Microdilution NLCCLS- M38A انجام گرفت. **یافته‌ها:** در این بررسی مشاهده شد که ۷۰٪ ایزوله‌های *A. flavus* با MIC > ۲ μg/ml در رابطه با داروی آمفوتریسین B (AMB) احتمالاً به عنوان ایزوله کلینیکی مقاوم و ۲۵٪ ایزوله‌ها در رابطه با داروی ایتراکونازول (ITR) به واسطه MIC < ۸ μg/ml، ایزوله‌ها حساسیت کمتر تلقی شدند. در رابطه با داروی وریکونازول (VRC) نیز در مقایسه با مطالعات خارج از ایران، ایزوله‌ها از حساسیت کمتری برخوردار بودند. دامنه MIC ۹ استرین *A. niger* و MIC ۱ استرین *A. fumigatus* در رابطه با هر سه دارو در مقایسه با برخی مطالعات مشابه خارجی افزایش داشت. **نتیجه‌گیری:** ما در این بررسی مشاهده کردیم که دامنه MIC ایزوله‌ها در اکثر موارد در دامنه MIC استرین‌های استاندارد و در برخی موارد در دامنه مطالعات مشابه خارجی و در موارد قابل اهمیتی هم خارج از این دامنه‌ها قرار گرفت که حکایت از حساسیت کمتر ایزوله‌های ایرانی و افزایش MIC آن‌ها دارد.

کلمات کلیدی: آسپرژیلوس، مقاومت دارویی، انتقال مقاومت، MIC، آمفوتریسین B، ایتراکونازول، وریکونازول.

* نویسنده مسئول: خوی، میدان ولیعصر، بیمارستان
مدنی، آزمایشگاه
تلفن: ۰۹۱۴۴۶۲۲۶۷۵
email: zakeri_fazel_msp@yaho.com

مقدمه

هنوز تعداد و طیف درمان‌های مؤثر، محدود و سمیت و مسایل فارماکوکیتیک مرتبط با آن‌ها مشکل‌ساز است. آمفوتریسین B در چهار دهه اخیر، علی‌رغم میزان موفقیت پایین، هنوز در سطح وسیعی مصرف شده و به‌عنوان داروی خط اول و انتخابی در درمان آسپرژیلوزیس مهاجم باقی مانده است.^{۱-۵} گونه‌های متعددی از قارچ‌ها مقاومت اکتسابی In vitro و هم مقاومت کلینیکی In vivo به عوامل ضدقارچی کلاسیک را مطرح می‌نمایند که قبلاً متعلق به گونه‌های حساس بودند.^{۶،۷} این افزایش مقاومت ضرورت نیاز به عوامل ضدقارچی جدید را مطرح ساخت. در دو دهه اخیر نیز میزان حساسیت گونه‌های آسپرژیلوس به داروهای ضدقارچی و به‌ویژه آزول‌ها کاهش یافته و تمایل به افزایش Minimum Inhibitory

در سال‌های اخیر به دلیل افزایش شمار بیماران نقص ایمنی، عفونت‌های قارچی فرصت طلب به یک مشکل عمده پزشکی تبدیل شده است. میزان بروز آسپرژیلوزیس (Aspergillosis) نیز در دو دهه اخیر به بالاترین حد خود رسیده و به یکی از مرگ‌بارترین عفونت‌های قارچی فرصت طلب و مهاجم تبدیل شده است.^{۱،۲} افزایش میزان بروز مرگ و میر ناشی از آسپرژیلوزیس مهاجم با افزایش مصرف داروهای ایمونوساپرسیو در درمان بیماری‌های اتوایمیون و گسترش ایدز (AIDS) و افزایش شیمی درمانی علیه تومورهای مختلف و افزایش تعداد و تنوع انجام پیوندها مربوط می‌باشد.^{۳،۴} علی‌رغم توسعه داروهای ضدقارچی در دهه‌های اخیر،

روش بررسی

پژوهش حاضر از نوع پژوهش توصیفی است که به صورت مقطعی در مدت ۱۳ ماه در فاصله شهریور ۱۳۸۸ تا مهر ۱۳۸۹ بر روی ۵۰ ایزوله آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بالینی از بیماران مراجعه‌کننده به بخش قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته است.

استرین‌های مورد مطالعه: استرین‌های مورد مطالعه مطابق اهداف پژوهش از گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بالینی ارجاعی به بخش قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتخاب شدند. از ۵۰ استرین جدا شده، ۴۰ استرین به *A. flavus*، ۹ استرین به *A. niger* و یک استرین به *A. fumigatus* تعلق گرفت. تشخیص گونه‌های مورد بررسی از طریق خصوصیات مرفولوژیکی و بر اساس روش Klich2002 صورت گرفت. به علاوه دو استرین رفرانس شامل CBS ۲۸/۹۵ *A. flavus* و CBS ۵۴۲/۷۵ *A. fumigatus* که از موسسه CBS تهیه شدند مورد استفاده قرار گرفتند.

تست حساسیت دارویی به روش Broth Microdilution: در این مطالعه از روش استاندارد Broth Microdilution مطابق آنچه که در دستورالعمل NCCLS- M38A ارائه شده جهت بررسی و ارزیابی MIC هر یک از ایزوله‌ها و استرین‌های استاندارد در مقابل داروهای مورد بررسی (آمفوتریسین B، وریکونازول و ایتراکونازول) استفاده شد و به ترتیب زیر انجام گرفت.^{۲۵}

تهیه محلول مادر (استوک، Stock) دارویی: طبق راهنمای CLSI داروها بر اساس محلول و غیرمحلول بودن در آب به دو دسته تقسیم می‌شوند. داروهای مورد بررسی در این پژوهش از نوع غیر محلول در آب و محلول در دی متیل سولفاکساید (DMSO) بودند. پودر خالص آمفوتریسین B و ایتراکونازول و وریکونازول با مارک SIGMA امریکا تهیه شد. به منظور تهیه محلول استوک ۱۶۰۰ μg/ml از داروهای فوق، مقدار ۰/۰۸gr از هر یک از داروها توزین و جداگانه در ۵۰ ml DMSO حل گردید و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد تا خودبه‌خود استریل شود. محلول‌های استوک فوق در حجم‌های ۴ ml تقسیم شد و در ۷۰°C تا شش ماه قابل نگهداری بود. آماده‌سازی محیط کشت RPMI 1640: طبق توصیه روش استاندارد NCCLS-M38A جهت رقیق‌سازی محلول‌های استوک دارویی از

Concentration (MIC) در میان ایزوله‌ها شیوع پیدا کرده است.^{۱۱،۱۲} مطالعات متعددی حاکی از افزایش مقاومت دارویی گونه‌های آسپرژیلوس داشته و پیامد بروز انتقال مقاومت (Cross resistant) بین تری‌آزول‌های جدید و سایر داروها را نگران‌کننده می‌نماید. مروری بر مطالعات انجام یافته در ایران نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف آسپرژیلوس و شایع‌ترین گونه آن یعنی *A. flavus* از نمونه‌های مختلف بالینی جدا و گزارش گردیده‌اند. اما در خصوص حساسیت دارویی آن‌ها مطالعه‌ای صورت نگرفته است. علی‌رغم این‌که در مطالعات متعددی در خارج از کشور به آن پرداخته شده است. هاشمی و همکاران، در دو بررسی متفاوت عامل ۶/۲۶٪ و ۱۹٪ موارد اونیکومایکوزیس را به کپک‌های غیر درماتوفیتی و در یکی از این دو بررسی با ۳۵٪ به *A. flavus* نسبت دادند.^{۱۴،۱۵} بدیعی نیز در مطالعه ۱۴۲ بیمار مبتلا به بیماری‌های قارچی با زمینه‌های قبلی، شش مورد *A. flavus* و دو مورد *A. fumigatus* ایزوله نمود.^{۱۶} کربچه و زینی هفت مورد سینوزیت قارچی مهاجم را که عامل پنج مورد از آن‌ها *A. flavus* و دو مورد از آن‌ها *A. fumigatus* بود، گزارش نمودند.^{۱۷} زینی و دهقان نیز در مطالعه بر روی ۲۳ ایزوله آسپرژیلوس از بیماران با سینوزیت قارچی، عامل تمامی آن‌ها را به گروه *A. flavus* و یک ایزوله را هم به گونه *A. oryzae* نسبت دادند.^{۱۸} Denning و همکاران اولین موارد مقاومت دارویی *A. fumigatus* را به داروی ایتراکونازول نشان دادند.^{۱۱} در مطالعه مشترک Moore و Denning نیز که بر روی ۹۴ ایزوله بالینی آسپرژیلوس انجام شده بود، ۳٪ ایزوله‌ها MIC بالای ۸ μg/ml برای ایتراکونازول و ۲٪ ایزوله‌ها MIC بالا برای وریکونازول داشتند. همچنین مقاومت متقاطع در ۱٪ ایزوله‌ها مشاهده شد.^{۱۹} با توجه به افزایش بروز مرگ و میر ناشی از قارچ‌های فرصت‌طلب و به خصوص آسپرژیلوزیس و گزارش‌های متعدد مقاومت و کاهش حساسیت دارویی در مطالعات خارج از کشور و اهمیت لزوم گزینش درمان مؤثر و با عنایت به این‌که درمان‌های ضد قارچی رایج در ایران پاسخ مناسبی را در مبتلایان در بر نداشته و تاکنون نیز مطالعه‌ای در خصوص میزان حساسیت گونه‌های آسپرژیلوس در ایران صورت نگرفته، لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی حساسیت دارویی شایع‌ترین ایزوله‌های ایرانی آسپرژیلوس، به ارزیابی MIC هر یک از ایزوله‌ها در مقابل داروهای ضد قارچی رایج مصرفی در کشورمان، از جمله آمفوتریسین B، ایتراکونازول و وریکونازول می‌پردازد.

انجام تست NCCLS-M38A Broth Microdillution: طبق پروتکل، رقت‌های سریال برای هر سه دارو مورد بررسی در ۱۰ رقت در میکرو پلیت‌های مسطح ۹۶ خانه‌ای به مقدار $100 \mu\text{l}$ برای هر چاهک تهیه شد، به طوری که چاهک اول حاوی بیشترین غلظت ($16 \mu\text{g/ml}$) و چاهک دهم حاوی کم‌ترین غلظت ($0.3125 \mu\text{g/ml}$) دارو باشد. در ادامه $100 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون تلقیحی فینال به هر چاهک اضافه شد. بدین ترتیب این دو ۱:۱ رقیق شده و به غلظت نهایی رسیدند. چاهک یازدهم حاوی $200 \mu\text{l}$ محیط RPMI و فاقد دارو و ارگانیسیم به عنوان کنترل استریلیتی (منفی) و چاهک دوازدهم حاوی $100 \mu\text{l}$ محیط RPMI بدون دارو و $100 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون تلقیحی و به عنوان کنترل رشد (مثبت) جهت مقایسه رشد با سایر چاهک‌ها در نظر گرفته شد. در ادامه میکروپلیت‌ها پس از شیک (Shake) ملایم در دمای 35°C ، به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. نمونه‌ها در سری دو تایی کار شدند.

خواندن نتایج MIC: طبق دستورالعمل CLSI- M38A جهت خواندن نتایج MIC از روش چشمی (Visual) استفاده شد در این روش Minimum Inhibitory Concentration (MIC) یعنی پایین‌ترین غلظت دارویی که بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون مانع رشد قابل ملاحظه قارچ می‌شود به صورت چشمی و به کمک یک آینه با بزرگنمایی و مقایسه رشد قارچ در هر رقت و چاهک با حفره کنترل رشد (فاقد دارو) انجام گردید. مطابق یک رسم و قاعده کلی برای نشان دادن میزان رشد طبق راهنما از پنج امتیاز یعنی امتیاز صفر (عدم رشد واضح)، امتیاز یک (25% رشد)، امتیاز دو (50% رشد)، امتیاز سه (75% رشد)، امتیاز چهار (100% رشد) در مقایسه با حفره کنترل، که رشد 100% دارد، استفاده شد. برای آمفوتریسین B اولین حفره از سمت رقت بیشتر که در آن 100% رشد قارچ مهار شده بود، به عنوان MIC90 تعیین و تلقی گردید و برای تری‌آزول‌ها اولین حفره از سمت رقت بیشتر که در آن 50% رشد قارچ در مقایسه با حفره کنترل رشد مهار شده بود، به عنوان MIC50 تعیین و ثبت گردید.

آماده‌سازی و تفسیر نتایج: طبق دستورالعمل NCCLS-M38A چنانچه دامنه MIC ایزوله‌ها در دامنه MIC استرین‌های استاندارد قرار می‌گرفت، به عنوان ایزوله حساس و در غیر این صورت، مقاوم تلقی شدند. در رابطه با آمفوتریسین B نیز چنانچه اطلاعات اولیه حاکی از داشتن $\text{MIC} < 2 \mu\text{g/ml}$ بود به عنوان ایزوله حساس و در غیر این

محیط کشت RPMI 1640 (با گلوتامین و فنل رد و بدون بی‌کربنات با شناساگر pH) استفاده شد. برای تهیه این محیط کشت، $10/4 \text{ gr}$ از پودر (RPMI) Roswell Park Memorial Institute 1640، $0/165 \text{ mol}$ معادل $34/53 \text{ gr}$ از بافر MOPS[3-(N-morpholino) Paranesulfonic Acid] (با مارک SIGMA آمریکا) در یک لیتر آب مقطر استریل با تکان ملایم حل گردید. سپس pH محیط با استفاده از NaOH یک نرمال (1 mol/lit) و با استفاده از کاغذ pH متر به $\text{pH}=7$ رسانده شد. محیط به دست آمده با فیلتر $0/45 \mu\text{m}$ استریل گشت و در 4°C به مدت یک ماه قابل نگهداری شد.

تهیه رقت‌های دارویی: جهت انجام تست میکرودایلوشن و تهیه رقت‌های دارویی هر سه داروی مورد بررسی، ۱۰ رقت از $0.3125/0$ تا 16 میکروگرم در میلی‌لیتر طبق جدول ۱ فراهم شد. آماده کردن استرین‌ها: برای این مطالعه از دو استرین استاندارد *A. flavus* CBS 28.95 و *A. fumigatus* CBS542.75 استفاده شد. ابتدا 10 ml محیط سابورو دکستروز مایع (S) به هر ویال استرین رفرانس در کنار شعله اضافه شد تا به صورت سوسپانسیون در آید. از سوسپانسیون به دست آمده هر یک از گونه‌ها بر روی محیط S کشت داده شد تا از خالص و زنده بودن آن‌ها اطمینان حاصل شود. و در ادامه از هر یک از ارگانیسیم‌ها چندین لوپ به طور جداگانه به لوله‌های در پیچ دار حاوی 15 میلی‌لیتر آب مقطر استریل منتقل شد، تا به صورت سوسپانسیون در آمدند آنگاه جهت مصارف بعدی در محل تاریکی نگهداری شدند.

تهیه سوسپانسیون قارچی: مطابق دستورالعمل CLSI از کشت‌های رسیده هر یک از گونه‌ها در لوله‌های حاوی محیط کشت PDA (پتیتو دکستروز آگار) به کمک اضافه کردن یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل و یک قطره توین ۲۰، سوسپانسیون اولیه اسپور تهیه و سپس به لوله استریل دیگری منتقل گردید و سپس به کمک ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه خوب مخلوط شد.

در ادامه اسپورهای سوسپانسیون به کمک تهیه رقت‌های متوالی و مناسب با آب مقطر و شمارش آن‌ها با لام هموسیتمتر به میزان $2-5 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ تنظیم شد. برای به دست آوردن شمارش $2-5 \times 10^5 \text{ CFU/ml}$ و غلظت نهایی، دوباره با آب مقطر استریل رقت ۱:۱۰ تهیه و سوسپانسیون نهایی برای انجام تست حساسیت دارویی استفاده گردید.

مذکور قرار گرفتند با این توضیح که ۹۲/۵٪ (۳۷ مورد) از ایزوله‌های مورد مطالعه $MIC < 2 \mu\text{g/ml}$ و ۷/۵٪ (سه مورد) از آن‌ها $MIC_{90} = 4$ داشتند. دامنه MIC به دست آمده برای ایتراکونازول ۱-۰/۲۵ می‌باشد که در مقایسه با دامنه اثر استرین استاندارد ۳۰ مورد (۷۵٪) از ایزوله‌ها در این دامنه و ۱۰ مورد (۲۵٪) با $MIC_{50} = 1$ بالاتر از این دامنه قرار گرفتند. دامنه MIC برای وریکونازول و *A.flavus* های مورد مطالعه برابر ۴-۰/۲۵ می‌باشد که در مقایسه با MIC این دارو برای استرین استاندارد، ۱۰۰٪ (۴۰ مورد) ایزوله‌های مورد مطالعه در دامنه MIC مذکور قرار گرفتند. مطابق جدول ۴ دامنه MIC به دست آمده برای داروی AMB (۱-۰/۵)، ITR (۲-۰/۵) و VRC (۲-۰/۲۵) در ارتباط با استرین‌های *A.niger*، در برخی موارد در دامنه MIC به دست آمده از مطالعات مشابه^{۲۳-۲۴} قرار گرفت و در برخی موارد هم با آن‌ها مغایرت داشت. با توجه به جدول ۵، MIC به دست آمده

صورت، مقاوم تلقی شدند. در رابطه با تری‌آزول‌ها نیز چنانچه $MIC < 8 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد، به عنوان ایزوله کلینیکی حساس و در غیر این صورت مقاوم تلقی شدند. در رابطه با استرین‌ها و داروهایی که به دامنه MIC آن‌ها در پروتکل اشاره نشده، با مطالعات مشابه انجام شده مقایسه و بحث و نتیجه‌گیری صورت گرفت.

یافته‌ها

با توجه به جدول ۲ ملاحظه می‌شود که نتایج به دست آمده برای استرین‌های استاندارد CBS هلند کاملاً در دامنه MIC استرین‌های استاندارد ATCC راهنمای CLSI قرار گرفته و با آن مطابقت دارد. با توجه به جدول ۳، دامنه MIC به دست آمده برای آمفوتریسین B معادل $4-0.5 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد که در مقایسه با دامنه اثر استرین استاندارد ۱۰۰٪ (۴۰ مورد) از *A.flavus* های مورد مطالعه در دامنه

جدول ۱: روش تهیه رقت‌های دارویی آمفوتریسین B، ایتراکونازول و وریکونازول با روش NCCLS-M38A.

مرحله	غلظت ($\mu\text{g/ml}$)	منبع	+ حجم (ML)	DMSO (ML) (دی‌متیل سولفوکساید)	غلظت میانی ($\mu\text{g/ml}$)	غلظت نهایی ۱:۱۰۰ ($\mu\text{g/ml}$)
۱	۱۶۰۰	Stock	-	-	۱۶۰۰	۱۶
۲	۱۶۰۰	Stock	۰/۵	۰/۵	۸۰۰	۸
۳	۱۶۰۰	Stock	۰/۵	۱/۵	۴۰۰	۴
۴	۱۶۰۰	Stock	۰/۵	۳/۵	۲۰۰	۲
۵	۲۰۰	مرحله ۴	۰/۵	۰/۵	۱۰۰	۱
۶	۲۰۰	مرحله ۴	۰/۵	۱/۵	۵۰	۰/۵
۷	۲۰۰	مرحله ۴	۰/۵	۳/۵	۲۵	۰/۲۵
۸	۲۵	مرحله ۷	۰/۵	۰/۵	۱۲/۵	۰/۱۲۵
۹	۲۵	مرحله ۷	۰/۵	۱/۵	۶/۲۵	۰/۰۶۲۵
۱۰	۲۵	مرحله ۷	۰/۵	۳/۵	۳/۱۲۵	۰/۰۳۱۲۵

جدول ۲: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) داروهای ضد قارچی علیه گونه‌های استاندارد با روش NCCLS-M38A.

ارگانیزم	حساسیت	MIC یا دامنه MIC ($\mu\text{g/ml}$)
تعداد اسپور تلقیحی		
آمفوتریسین B (AMB)	ایتراکونازول (ITR)	وریکونازول (VRC)
۲	۰/۵	۰/۵
۰/۵-۴	۰/۲۵-۰/۵	۰/۵-۴
۲	۰/۲۵	۰/۲۵
۰/۵-۲	۰/۱۲۵-۱	-

^۱سوش‌های استاندارد مورد استفاده در این بررسی، ^۲سوش‌های استاندارد مورد اشاره در راهنمای CLSI

جدول- ۳: دامنه Minimum Inhibitory Concentration (MIC) داروهای ضدقارچی علیه استرین های *A.flavus* با روش NCCLS-M38A.

تعداد و درصد استرین های <i>A.flavus</i> بالاتر از MIC=۲µg/ml برای AMB	تعداد و درصد استرین های <i>A.flavus</i> بالاتر از MIC=۸µg/ml برای آزولها	تعداد و درصد استرین های <i>A.flavus</i> بالاتر از دامنه MIC رفرانس	تعداد و درصد استرین های <i>A.flavus</i> در دامنه MIC رفرانس	دامنه MIC به دست آمده (µg/ml)	دامنه MIC رفرانس (µg/ml)	دارو
۳(۷/۵)	-	-	۳۷(۹۲/۵)	۰/۵-۴	۰/۵-۴	آمفوتریسین B (AMB)
-	-	۱۰(۲۵)	۳۰(۷۵)	۰/۲۵-۱	۰/۲۵-۰/۵	ایتراکونازول (ITR)
-	-	-	۴۰(۱۰۰)	۰/۲۵-۴	۰/۵-۴	وریکونازول (VRC)

جدول- ۴: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) داروهای ضدقارچی علیه استرین های *A.niger* با روش NCCLS-M38A.

تعداد و درصد استرین های <i>A.niger</i> با MIC>۸ برای ITR	تعداد و درصد استرین های <i>A.niger</i> با MIC>۲ برای AMB	دامنه MIC به دست آمده (µg/ml)	دامنه MIC در مطالعات مختلف (µg/ml)	دارو
-	-	۰/۵-۱	۰/۱۲۵-۰/۵(۲۲) ۰/۲۵-۰/۵(۲۱) ۰/۱۲۵-۱(۲۱) ۰/۱۲۵-۰/۵(۲۰)	آمفوتریسین B (AMB)
-	-	۰/۵-۲	۱ تا >۲(۲۰) ۰/۰۶-۰/۵(۲۱) ۰/۲۵(۲۱) ۰/۰۳-۰/۱۲۵(۲۲) ۰/۵-۲(۲۰)	ایتراکونازول (ITR)
-	-	۰/۲۵-۲	۰/۰۶-۰/۱۲۵(۲۲) ۰/۰۳-۲(۲۳) ۰/۱۲۵-۲(۲۳) ۰/۱۲۵-۱(۲۴)	وریکونازول (VRC)

AMB= Amphotericin B, ITR=Itraconazole, VRC=Voriconazole

جدول- ۵: MIC داروهای ضد قارچی علیه یک استرین *A.fumigatus* با روش NCCLS-M38A.

دامنه MIC مطالعات مشابه	MIC(µg/ml)			دامنه MIC رفرانس	دامنه MIC به دست آمده	دارو	ارگانسیم
	VRC	ITR	AMB				
۰/۰۳-۰/۱۲	MIC به دست آمده	دامنه MIC رفرانس	MIC به دست آمده	۱	۰/۵-۲	۲	<i>A.fumigatus</i>
۰/۱۲۵-۱							
۰/۰۳-۱							
۰/۰۶-۰/۵							

بحث

A. fumigatus نسبت به داروی AMB (MIC90=2) و ITR (MIC50=1)، در دامنه MIC استرین استاندارد قرار گرفت و با آن مطابقت داشت. در رابطه با وریکونازول نیز MIC به دست آمده (MIC50=0/25) در برخی موارد در دامنه MIC مطالعات مشابه^{۲۳،۲۲،۱۲} قرار گرفت و در برخی موارد با آن‌ها مغایرت داشت.

آسپرژیلوس یکی از شایع‌ترین عفونت‌های فرصت طلب و مهاجم در افراد ایمنوساپرس و زمینه‌دار در دو دهه اخیر است. آفومیگاتوس شایع‌ترین عامل آسپرژیلوس در اکثر مطالعات خارج از ایران است. با این همه، در کشورمان فراوان‌ترین گونه ایزوله شده از نمونه‌های بالینی مربوط به آفلووس می‌باشد. در حال حاضر به موازات افزایش مصرف آمفوتریسین B و آزول‌ها در درمان آسپرژیلوس مهاجم، مقاومت دارویی و کاهش حساسیت برخی از ایزوله‌ها شیوع پیدا کرده و مشکلاتی را در درمان مبتلایان ایجاد کرده است. در مطالعه حاضر سعی بر آن شده تا حساسیت دارویی و MIC شایع‌ترین ایزوله‌های ایرانی، با استفاده از متد استاندارد NCCLS-M38A ارزیابی و نتایج آن در جهت انتخاب درمان‌های بهتر و مؤثرتر و ارتقاء سلامت جامعه مورد تحقیق و پژوهش قرار گیرد. ایزوله‌های مورد مطالعه استرین‌های استاندارد CBS هلند و گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بالینی هستند. مطابق نتایج تحقیق MIC به دست آمده برای استرین‌های رفرانس (CBS) برای هر سه دارو مورد بررسی در دامنه MIC استرین استاندارد مورد اشاره در راهنمای CLSI گنجیده و با آن مطابقت دارد (جدول ۲). از ۴۰ استرین *A. flavus* مورد مطالعه دامنه MIC آمفوتریسین B برای همه استرین‌ها در دامنه MIC=0/5-4 قرار گرفت که با دامنه اثر استرین استاندارد مطابقت دارد. با توضیح این‌که احتمال حساس بودن ۹۲/۵٪ (۳۷ مورد) ایزوله‌ها به لحاظ MIC90<2 و هم‌چنین احتمال مقاوم بودن ۷/۵٪ (سه مورد) ایزوله‌ها به لحاظ داشتن MIC90>2 وجود دارد. نتایج به دست آمده با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38P با دامنه MIC=0/06-2 و MIC90=1 و Kuzucu^{۲۱} در سال ۲۰۰۴ با متد SAAS با دامنه MIC=0/25-1 و M38P با دامنه MIC=0/12-1 مطابقت نداشته و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Lass-florl^۲ در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST و ایزوله‌های ایرانی مطابقت داشت. دامنه MIC برای ۹ استرین *A. niger* و آمفوتریسین B برابر 0/5-1 به دست آمد که با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38P با دامنه MIC=0/06-2 و Kuzucu^{۲۱} در سال ۲۰۰۴ با متد SAAS با دامنه MIC=0/12-1 و Lass-florl^۲ در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Kuzucu^{۲۱} در سال ۲۰۰۴ با متد SAAS با دامنه MIC=0/06-2 و Lass-florl^۲ در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST و ایزوله‌های ایرانی مطابقت داشت. دامنه MIC برای ۹ استرین *A. niger* و داروی ایتراکونازول برابر 0/5-2 به دست آمد که با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38P با دامنه MIC=0/06-2 و Kuzucu^{۲۱} در سال ۲۰۰۴ با متد SAAS با دامنه MIC=0/06-2 و Lass-florl^۲ در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST با دامنه >2 تا

MIC=0/12 و MIC90=2 مطابقت داشت. دامنه MIC به دست آمده برای ۴۰ استرین *A. flavus* و داروی ایتراکونازول برابر 0/25-1 که در مقایسه با دامنه اثر استرین استاندارد ۳۰ مورد (۷۵٪) از ایزوله‌ها در این دامنه قرار گرفته و با MIC<8 حساس تلقی شدند. ۱۰ مورد (۲۵٪) ایزوله‌ها با دامنه MIC50=1 بالاتر از این دامنه و به لحاظ MIC<8 نیز حساس تلقی شدند که حساسیتشان کمتر بود. نتایج به دست آمده با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38P و دامنه MIC=0/03-0/12 و Kuzucu^{۲۱} در سال ۲۰۰۴ با متد M38P و دامنه MIC=0/06-0/12 و با متد SAAS با دامنه MIC=0/03-0/12 مطابقتی نداشت و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Lass-florl^۲ در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST با دامنه MIC=0/12-0/5 مطابقت داشت. دامنه MIC ۴۰ استرین *A. flavus* و داروی وریکونازول برابر 0/25-4 به دست آمد که ۱۰٪ (۴۰ مورد) از استرین‌های مورد مطالعه در دامنه اثر استرین استاندارد قرار گرفته و با MIC<8 حساس تلقی شدند. نتایج به دست آمده با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38P و دامنه MIC=0/03-0/12 و Linares با متد M38A و دامنه MIC=0/03-1 و MIC50=0/25 و با متد Sensititer yeastone با دامنه MIC=0/06-0/5 مطابقت نداشته و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Chryssanthou^{۲۳} در سال ۲۰۰۶ با متد M38A با دامنه MIC=1-2 و با متد EUCAST-AFST با دامنه MIC=1-2 و Lass-florl^۲ در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST با دامنه MIC=0/5-1 مطابقت داشت. دامنه MIC برای ۹ استرین *A. niger* و آمفوتریسین B برابر 0/5-1 به دست آمد که با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38P با دامنه MIC90=0/5 و Kuzucu^{۲۱} در سال ۲۰۰۴ با متد M38P و دامنه MIC90=0/5 و Lass-florl^۲ در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST و دامنه MIC=0/12-0/5 و Kuzucu^{۲۱} در سال ۲۰۰۴ با حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Kuzucu^{۲۱} در سال ۲۰۰۴ با متد SAAS و دامنه MIC=0/12-1 و Lass-florl^۲ در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST مطابقت داشت. دامنه MIC برای ۹ استرین *A. niger* و داروی ایتراکونازول برابر 0/5-2 به دست آمد که با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38P با دامنه MIC=0/06-2 و Kuzucu^{۲۱} در سال ۲۰۰۴ با متد SAAS با دامنه MIC=0/06-2 و Lass-florl^۲ در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST با دامنه >2 تا

آمد که در دامنه اثر استرین استاندارد قرار گرفته و به لحاظ $MIC < 8$ حساس تلقی شد که با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38P و دامنه $MIC = 0.03 - 0.25$ و $MIC_{50} = 0.06$ و Dannaoui^{۱۲} در سال ۲۰۰۵ و با متد M38A و دامنه $MIC = 0.03 - 0.5$ و $MIC_{50} = 0.12$ و Kuzucu^{۲۱} در سال ۲۰۰۴ و با متد M38P و دامنه $MIC = 0.06 - 16$ و $MIC_{50} = 0.12$ داشت. ولی با مطالعه Lass-florl^{۲۰} در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST و دامنه $MIC = 1 - 2$ و $MIC_{90} = 1$ تطابق داشت. در رابطه با ۱ استرین *A.fumigatus* و داروی وریکونازول، $MIC_{50} = 0.25$ به دست آمد که با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38P و دامنه $MIC = 0.03 - 0.12$ و $MIC_{90} < 0.03$ تطابق نداشت و ایزوله ایرانی حساسیت کمتری داشت. ولی با مطالعه Linares^{۲۴} در سال ۲۰۰۵ با متد Sensititer و دامنه $MIC = 0.25 - 1$ و $MIC_{90} = 1$ تطابق داشت. در رابطه با ۱ استرین *A.fumigatus* و داروی وریکونازول، $MIC_{50} = 0.25$ به دست آمد که با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38P و دامنه $MIC = 0.03 - 0.12$ و $MIC_{90} < 0.03$ تطابق نداشت و ایزوله ایرانی حساسیت کمتری داشت. ولی با مطالعه Linares^{۲۴} در سال ۲۰۰۵ با هر دو متد M38A و Sensititer yeastone و Chryssanthou^{۳۳} در سال ۲۰۰۶ با دو متد M38A و EUCAST-AFST با دامنه $MIC = 0.03 - 2$ و $MIC_{50} = 0.06$ و با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38A و دامنه $MIC = 0.06 - 2$ تطابق داشت. به عنوان نتیجه‌گیری کلی نتایج MIC ایزوله‌های مورد بررسی و استرین‌های استاندارد CBS با دامنه اثر استرین رفرنس راهنمای CLSI و برخی از مطالعات مشابه مطابقت داشته و در موارد عدم تطابق نتایج، ایزوله‌های ایرانی حساسیت نسبتاً کمتری نسبت به داروهای مورد مطالعه داشتند. با توجه به افزایش افراد در معرض خطر و شیوع عفونت‌های فرصت طلبی چون آسپرژیلوزیس و کاهش حساسیت و مقاومت دارویی گونه‌های آسپرژیلوس مطالعه بر روی تعداد بیشتری نمونه در جوامع مختلف، پیشنهاد می‌گردد. همچنین بهتر است برای دستیابی به درمان‌های مؤثرتر، مطالعاتی با تعداد داروی بیشتر و با بررسی اثرات سینرژیسمی درمان‌های ترکیبی و داروهای نوظهور، صورت پذیرد.

با $MIC_{50} = 0.25$ مطابقتی نداشت و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Lass-florl^{۲۰} در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST با دامنه $MIC > 2$ تا $MIC = 1$ و $MIC_{90} > 1$ تطابق نزدیکی داشت که در مقایسه ایزوله‌های ایرانی حساسیت بیشتری داشتند. دامنه MIC ۹ استرین *A.niger* و داروی وریکونازول برابر $2 - 0.25$ به دست آمد که با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38P با دامنه $MIC = 0.06 - 0.12$ و $MIC_{50} = 0.06$ و Linares^{۲۴} در سال ۲۰۰۵ با متد M38A با دامنه $MIC = 0.125 - 1$ و $MIC_{50} = 0.25$ و با متد Sensititer yeastone با دامنه $MIC = 0.125 - 1$ و $MIC_{50} = 0.25$ تطابق نداشت و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Chryssanthou^{۳۳} با متد M38A و دامنه $MIC = 0.03 - 2$ و با متد EUCAST-AFST و دامنه $MIC = 0.12 - 2$ و Lass-florl^{۲۰} در سال ۲۰۰۸ با متد M38P و دامنه $MIC = 0.5 - 2$ و $MIC_{50} = 2$ با اختلاف در مقایسه، ایزوله‌های ایرانی عموماً حساسیت کمتری داشتند. در رابطه با ۱ استرین *A.fumigatus* و داروی آمفوتریسین B، $MIC_{90} = 2$ به دست آمد که در دامنه MIC استرین استاندارد ($2 - 0.5$) قرار گرفت و به لحاظ $MIC < 2$ حساس تلقی شد. که با مطالعه Serrano^{۲۲} در سال ۲۰۰۳ با متد M38P و دامنه $MIC = 0.06 - 2$ و Kuzucu^{۲۱} در سال ۲۰۰۵ با متد SAAS در دامنه $MIC = 0.125 - 2$ و $MIC_{90} = 1$ تقریباً در دامنه اثر مشابه قرار گرفته ولی MIC_{90} متفاوتی داشتند که حاکی از حساسیت کمتر ایزوله ایرانی داشت. در مقایسه با مطالعه Dannaoui^{۱۲} در سال ۲۰۰۵ با متد M38A و دامنه $MIC = 0.125 - 1$ و $MIC_{90} = 1$ و Kuzucu^{۲۱} در سال ۲۰۰۴ با متد M38P و دامنه $MIC = 0.125 - 1$ و $MIC_{90} = 1$ و Lass-florl^{۲۰} در سال ۲۰۰۸ با متد M38P و دامنه $MIC = 0.12 - 1$ و $MIC_{90} = 1$ نیز تطابق وجود نداشت و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشت. در رابطه با داروی ایتراکونازول و ۱ استرین *A.fumigatus* $MIC_{50} = 1$ به دست

References

- Denning DW, Ribaud P, Milpied N, Caillot D, Herbrecht R, Thiel E, et al. Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2002;34(5):563-71. Epub 2002 Jan 22.
- Manuel RJ, Kibbler CC. The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. *J Hosp Infect* 1998;39(2):95-109.
- Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998;26(4):781-803; quiz 804-5.
- Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001;32(3):358-66. Epub 2001 Jan 26.
- Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003;11(6):272-9.
- Kauffman CA. Clinical efficacy of new antifungal agents. *Curr Opin Microbiol* 2006;9(5):483-8. Epub 2006 Aug 9.
- Kelmenson VA. Treatment of pulmonary Aspergillosis. *Diseases of the Chest* 1959;36(1):442-3.

8. Warnock DW. Amphotericin B: an introduction. *J Antimicrob Chemother* 1991;28 Suppl B:27-38.
9. Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis* 1996;22 Suppl 2:S112-8.
10. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN; International Fungal Surveillance Participant Group. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):78-83.
11. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(6):1364-8.
12. Dannaoui E, Borel E, Monier MF, Piens MA, Picot S, Persat F. Acquired itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2001;47(3):333-40.
13. Mosquera J, Denning DW. Azole cross-resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(2):556-7.
14. Hashemi SJ, Gerami M, Zibafar E, Daei M, Moazeni M, Nasrollahi A. Onychomycosis in Tehran: mycological study of 504 patients. *Mycoses* 2010;53(3):251-5. Epub 2009 Mar 7.
15. Hashemi S, Zaini F, Shidfar MR, Daei R, Geramishoar M, Zibafar E, Ahmadi B, Hosseinpour L. Study and identification of the ethiological agents onychomycosis in 171 patients in Tehran. A. The 7th National and 2nd Regional Congress of Parasitology and Parasitic Diseases in Iran, 2009. [Persian]
16. Badii P. The study of the aggressive antifungal diseases in patients with insufficient immune system in order to give them an appropriate pattern of immediate diagnosis of fungal diseases. Thesis, Tehran University of Medical Science, Health Faculty, 2006.
17. Kordbacheh P, Badii P, Alborzi A, Zaini F, Mirhendi H, Mahmoudi M, et al. Acute fulminant fungal sinusitis in patient with acute leukemia. *Iranian J Publ Health* 2008;37(2):46-51.
18. Dehghan P, Zaini F, Rezaei S, Jebali A, Kordbacheh P, Mahmoudi M. Detection of *Aflr* gene and toxigenicity of *Aspergillus flavus*. *Iranian J Publ Health* 2008;37(3):134-41.
19. Moore CB, Walls CM, Denning DW. In vitro activity of the new triazole BMS-207147 against *Aspergillus* species in comparison with itraconazole and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(2):441-3.
20. Lass-Flörl C, Perkhöfer S. In vitro susceptibility testing in *Aspergillus* species. *Mycoses* 2008;51(2):437-46.
21. Kuzucu C, Rapino B, McDermott L, Hadley S. Comparison of the semisolid agar antifungal susceptibility test with the NCCLS M38-P broth microdilution test for screening of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):1224-7.
22. Serrano Mdel C, Valverde-Conde A, Chávez M M, Bernal S, Claro RM, Pemán J, et al. In vitro activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER002, LY303366) and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45(2):131-5.
23. Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Comparison of the EUCAST-AFST broth dilution method with the CLSI reference broth dilution method (M38-A) for susceptibility testing of posaconazole and voriconazole against *Aspergillus* spp. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(9):901-4.
24. Linares MJ, Charriel G, Solís F, Rodríguez F, Ibarra A, Casal M. Susceptibility of filamentous fungi to voriconazole tested by two microdilution methods. *J Clin Microbiol* 2005;43(1):250-3.
25. Rex JH, Alexander BD, Andes D, Arthington-Skaggs B, Brown SD, Chaturveil V, et al. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. 2nd ed [Online]. 2002 [Cited 2011 Apr 15]. Available from: URL:<http://www.clsi.org/source/orders/free/M38-A2.pdf>

In-vitro susceptibility of *Aspergillus* species isolated from cutaneous and visceral lesions to antifungal agents

Received: January 31, 2011 Accepted: March 07, 2011

Abstract

Jamal Hashemi PhD.
Farideh Zaini PhD.
Roshanak Daie PhD.
Ensie Zibafar PhD.
Mir Abolfazl Zakeri MSPH.*

Department of Parasitology and
Medical Mycology, School of Public
Health, Tehran University Of
Medical Sciences, Tehran, Iran.

Background: Different studies have shown that despite the expanding number of antifungal agents, death rate caused by *Aspergillus* species has been increased during the recent decades due to drug-resistance occurrence, increased minimum inhibitory concentration (MIC) and cross-resistance among the isolated species. Regarding the lack of effective response to conventional treatments and antifungal susceptibility patterns of the most common isolated *Aspergillus* species, this study was undertaken to draw a clearer picture in the Iranian setting.

Methods: During 13 months from September 2009 to October 2010, 50 clinically isolated *Aspergillus* cases were identified based on the method described by Klich (2002) and their morphological features. Subsequently, their susceptibility test was carried out according to NCCLS- M38A broth microdilution method.

Results: We found that 7.5% of the isolated *A. flavus* with an MIC > 2 µg/ml to amphotericin B were probably clinically resistant types, and 25% of them with an MIC < 8 µg/ml to itraconazole were less sensitive isolated species. The isolates were less sensitive to voriconazole too. The MIC range of 9 strains of *A. niger* and the MIC of one strain of *A. fumigatus* had increased to all the three medications in comparison with similar foreign studies.

Conclusion: In this study we found that the MICs of most isolates were in the range of the reference strains and the MICs of some isolates were in the range of similar foreign studies. In some significant cases, the MICs were beyond the known ranges showing the lower sensitivity of Iranian isolates and their increased MIC patterns.

Keywords: Amphotericin B, aspergillus, cross-resistance, drug resistance, itraconazole, minimum inhibitory concentration, voriconazole.

*Corresponding author: Medical
Laboratory, Madani Hospital, Valiasr
Sq., Khoy, Iran.
Tel: +98-914-4622675
email: zakeri_fazel_msph@yahoo.com