مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و دو - بهار ۱۳۹۵

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی تعیین حساسیت آسپرژیلوس فلاووس نسبت به ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین

حمید حجتی نیا، آذر سبکبار*

گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی. کرج، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آسپرژیلوزیس شایع ترین عامل ایجاد کننده عفونت های قارچی با منشاء خارجی است. علی رغم توسعه داروهای ضد قارچی، به دلیل افزایش مقاومت دارویی، افزایش میزان MICدر بین سویه های آسپرژیلوس، میزان مرگ و میر عفونت های فرصت طلب ناشی از گونه های آسپرژیلوس فلاووس افزایش یافته است.

مواد و روش ها: این مطالعه در طی ۹ ماه بر روی ۴۰ سویه آسپرژیلوس فلاووس شامل ۲۰ سویه بالینی و ۲۰ سویه محیطی انجام شد. سپس تست حساسیت دارویی طبق روش استاندارد NCCLS-M38P انجام شد. سوسپانسیون قارچی از هر کلنی قارچ خالص شده با محدوده سلولی $1-10^4$ x۴ cfu/ml توسط اسپکتروفتومتر ۵۳۰ نانومتر تهیه گردید. رقت های سریالی از دارو برای ایتراکونازول و وریکونازول از mg/ml ۱۶-۰/۰۱۵ و برای داروی کاسپوفانژین از mg/ml ۸-۰/۰۰۷ تهیه و میزان MIC داروها بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تعیین گردید.

یافته ها: محدوده MIC به دست آمده آسپرژیلوس فلاووس در برابر داروی ایتراکونازول بین ۲-۰/۱۲۵ و۰/۵ $MIC_{=۵۰}$ و $MIC_{=۹۰}$۱و داروی وریکونازول بین ۲-۰/۲۵ و ۰/۵ $MIC_{=۵۰}$و $MIC_{=۹۰}$۱ و برای داروی کاسپوفانژین بین ۰/۱۲۵-۰/۰۱۳۱ و ۰/۰۶۳ $MIC_{=۵۰}$و ۰/۱۲۵ $MIC_{=۹۰}$ به دست آمد.

نتیجه گیری: تمامی نمونه ها به داروهای مورد مطالعه حساسیت نشان دادند. میزان محدوده MIC حاصل از ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین، سویه های به دست آمده آسپرژیلوس فلاووس، جزء سویه های حساس ارزیابی شدند و سویه مقاوم مشاهده نگردید. دامنه MIC سویه ها در دامنه مطالعه های مشابه و در مواردی نیز خارج از این دامنه ها قرار گرفت که نشان دهنده حساسیت بیش تر سویه های مورد مطالعه بود.

کلمات کلیدی: آسپرژیلوس فلاووس، حساسیت دارویی، کاسپوفانژین، ایتراکونازول، وریکونازول

مقدمه

شیوع بیماری های قارچی در دو دهه اخیر به خصوص در افراد دارای نقص سیستم ایمنی رو به افزایش است. از طرفی عوامل قارچی فرصت طلب در محیط زندگی به فراوانی وجود دارند و می توانند سبب آلودگی مواد غذایی و دارویی گردند (۱۷). مطالعه ها و مشاهده های مختلف محققان در سال های اخیر نشان داده است که گونه های آسپرژیلوس از عوامل اصلی تهدید کننده سلامت بیماران دچار نقص ایمنی شدید می باشد به طوری که میزان بروز آسپرژیلوزیس نیز در دو دهه اخیر به بالاترین حد خود رسیده و به یکی از مرگ بارترین عفونت های قارچی فرصت طلب و مهاجم تبدیل شده است (۲۱ ، ۹).

در بین ۶۰۰ گونه قارچ آسپرژیلوس، گونه های فلاووس، فومیگاتوس و نایجر از نظر بیماریزایی در انسان از اهمیت ویژه ای برخوردارند (۱۴). بیماری آسپرژیلوزیس ریوی، جلدی، منتشره و اعصاب مرکزی از اشکال بالینی بوده که فرم تظاهرات بالینی و شدت بیماری حاصله به شرایط فیزیولوژیک میزبان، نوع عضو مبتلا و گونه آسپرژیلوس بستگی دارد (۳۰) البته آسپرژیلوزیس بیش تر در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی نظیر بیماران مبتلا به ایدز و افراد دریافت کننده پیوند بروز می نماید.

گونه های مختلف آسپرژیلوس نه تنها از جنبه عفونت زایی بلکه از لحاظ مقاومت دارویی نیز حائز اهمیت هستند علیرغم توسعه داروهای ضد قارچی در دهه های اخیر هنوز طیف درمان های مؤثر، محدود بوده و سمیت و مسایل فارماکوکنتیک مرتبط با آن ها

مسئول نویسنده:گروه میکروبیولوژی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
پست الکترونیکی: sabokbar@kiau.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۱/۲۳

Archive of SID
www.SID.ir

مشکل ساز است. گونه های متعددی از قارچ ها مقاومت در شرایط آزمایشگاهی و هم مقاومت در شرایط بالینی به عوامل ضد قارچی را نشان می دهند در صورتی که در گذشته متعلق به گونه های حساس بودند(۲۶، ۲۵) .

مطالعه های متعددی از افزایش مقاومت دارویی گونه های آسپرژیلوس حکایت داشته و پیامد بروز انتقال مقاومت (Cross resistant) بین تری آزول های جدید و سایر داروها را نگران کننده می نماید(۶، ۸). مروری بر مطالعه های انجام یافته در ایران نشان می دهد که گونه های مختلف آسپرژیلوس و شایع ترین گونه آن یعنی آسپرژیلوس فلاووس از نمونه های مختلف بالینی جدا و گزارش گردیده اند(۱۵).

هاشمی و همکاران، در دو مطالعه جداگانه عامل ۲۶/۶ ٪ و ۱۹٪ از موارد ابتلا به اونیکومایکوزیس را کپک های غیر درماتوفیتی و در یکی از این دو بررسی با ۳۵٪ شیوع آسپرژیلوس فلاووس دانسته اند (۱۴،۱۳). بدیعی نیز در پژوهشی مشابه از ۱۴۲ بیمار مبتلا به بیماری های قارچی با زمینه های قبلی ۶ مورد آسپرژیلوس فلاووس ایزوله نمود(۴). کردبچه و زینی در گزارش مطالعه های خود از ۷ مورد سینوزیت قارچی مهاجم که عامل ۵ مورد از آن ها آسپرژیلوس فلاووس بود حکایت داشتند (۱۸) هم چنین زینی و دهقان با مطالعه بر روی ۲۳ ایزوله آسپرژیلوس از بیماران با سینوزیت قارچی، تمامی آن ها را به آسپرژیلوس فلاووس نسبت دادند(۷). در بررسی مشترک داینین و موری نیز که بر روی ۹۴ ایزوله بالینی آسپرژیلوس انجام شده بود، ۳٪ ایزوله ها MIC بالای ۸ µ g/ml برای ایتراکونازول و ۲٪ ایزوله ها MIC بالا برای وریکونازول داشتند (۲۳).

از آنجایی که اکثر داروهای ضد قارچی شناخته شده به دلیل تشابه ساختاری قارچ ها با سلول های یوکاریوت ها دارای اثر ها جانبی گسترده به ویژه در مصرف مکرر و طولانی مدت می باشد، استفاده از ترکیبات ضد قارچی مؤثر با حداقل اثر ها جانبی در مورد گونه ها و استرین های مختلف آسپرژیلوس در بهبود بیماران مبتلا به آسپرژیلوزیس حائز اهمیت فراوان است و با توجه به این مساله که، تا کنون مطالعه ای در خصوص میزان حساسیت آسپرژیلوس فلاووس در ایران صورت نگرفته لذا، این پژوهش با هدف بررسی حساسیت دارویی آسپرژیلوس فلاووس و ارزیابی MIC هر یک از ایزوله ها در مقابل داروهای ضد قارچی رایج مصرفی در کشورمان، از جمله ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین صورت گرفته است .

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

این پژوهش آزمایشگاهی بر روی ۴۰ سویه آسپرژیلوس فلاووس (شامل ۲۰ سویه بالینی و ۲۰ سویه محیطی) به مدت ۹ ماه انجام گرفته است. سویه های بالینی از بیماران مراجعه کننده به دو آزمایشگاه خصوصی در تهران، جدا شده است. ۲۰ سویه محیطی نیز با قرار دادن پلیت های حاوی محیط کشت سابرودکستروزآگار در چندین محل در شهرهای تهران، کرج، رشت و اصفهان به دست آمد.

آماده سازی نمونه ها

سویه ها پس از تایید آسپرژیلوس فلاووس به منظور اسپورزایی در محیط سابورودکستروزآگار در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. از کشت ۳ روزه با استفاده از آنس استریل سوسپانسیون تهیه شد و به لوله استریل دیگری منتقل گردید. پس از ته نشین شدن ذرات به مدت ۵ دقیقه محلول رویی به لوله استریل دیگری منتقل و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد. سپس عبور نوری سوسپانسیون در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد به طوری که محدوده تعداد سلولی حاصل ۱ به ۵- ۱۰^{۴} x cfu/ml دست آمد.

تهیه محلول مادر(Stock) دارویی

طبق دستورالعمل NCCLSI داروها بر اساس محلول و غیر محلول بودن در اب به دو دسته تقسیم می شوند. داروهای مورد بررسی در این پژوهش از نوع غیر محلول در آب و محلول در دی متیل سولفوکساید (DMSO) بودند.

پودر خالص ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین (با مارک سیگما) تهیه شد. به منظور تهیه محلول استوک طبق دستورالعمل NCCLSI ، داروها وزن گردید و در ۵ میلی لیتر DMSO حل گردید. در دمای اتاق به ۳۰ دقیقه قرار داده شد تا خود به خود استریل گردد. سپس ۱ میلی لیتر از محلول فوق با ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل مخلوط گردید تا محلول دارویی آمده گردد.

جهت انجام تست ماکرو دایلوشن و تهیه رقت های دارویی، برای هر سه داروی مورد بررسی از رقت ۱۶-۰/۰۱۶ برای داروهای ایتراکونازول و وریکونازول و رقت های ۸-۰/۰۸ برای کاسپوفانژین تهیه شد. طبق پروتوکل NCCLS-M38P رقت های سریالی برای هر سه داروی مورد بررسی در لوله ها به میزان میلی لیتر تهیه شد در ادامه ۱ میلی لیتر محیط کشت سابرودکستروز براث نیز به لوله ها اضافه گردید و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی به آن اضافه گردید. به همراه کنترل منفی که فاقد ارگانیسم و کنترل مثبت که دارای سوسپانسیون قارچی بود به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

خواندن نتایج MIC

طبق دستورالعمل NCCLSI ،جهت خواندن نتایج MIC از روش چشمی (Visual) استفاده شد. در این روش Minimum Inhibitory Concenteration یعنی پایین ترین غلظت دارویی که بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، مانع رشد قابل ملاحظه ای می شود

www.SID.ir

Archive of SID

را به صورت چشمی و مقایسه با نمونه کنترل رشد ثبت گردید. طبق دستورالعمل NCCLSI ، چنانچه MIC به دست آمده برای داروی وریکونازول و ایتراکونازول بیش تر از ۴ µ g/ml به دست می آمد به عنوان نمونه مقاوم در نظر گرفته شد .هم چنین در مورد داروی کاسپوفانژین اگر میزان MIC به دست آمده بیش تر از ۱ µ g/ml باشد به عنوان نمونه مقاوم در نظر گرفته می شود.

تجزیه و تحلیل آماری

داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-19 و آزمونAnova تجزیه و تحلیل شدند. و سطح معنی دار کمتر از ۰۵/ ۰ در نظر گرفته شد.

یافته ها

جدول شماره ۱ نشان دهنده دامنه MIC برای داروهای کاسپوفانژین، ایتراکونازول و وریکونازول همراه با MIC_{50} و MIC_{90} به دست آمده می باشد.

دارو	MIC_{50} µg/ml	MIC_{90} µg/ml	MIC_{range} µg/ml
ایتراکونازول	۰/۵	۱	۰/۱۲۵-۲
وریکونازول	۰/۵	۱	۰/۱۲۵-۲
کاسپوفانژین	۰/۰۶۳	۰/۱۲۵	۰/۰۳۱-۰/۱۲۵

جدول۱-MIC داروهای ضد قارچی علیه آسپرژیلوس فلاووس

جدول شماره ۲ میزان حساسیت نمونه های مورد مطالعه را نسبت به داروها نشان داده است .با توجه به نتایج به دست آمده نمونه مقاومی مشاهده نشد .۹۰٪ (۳۶ مورد) نمونه های مورد مطالعه نسبت به ایتراکونازول حساسیت داشتند.۱۰۰٪ (۴۰ مورد) به داروی کاسپوفانژین حساس بودند و ۵ /۹۲٪ (۳۷ مورد) از نمونه ها به وریکونازول حساس بودند.

نتایج حاصل از آزمون آماری T-Test نشان داد که اختلاف معنی داری بین نمونه های بالینی و محیطی از نظر MIC وجود ندارد (P >0/05) یعنی هر سه دارو بر روی نمونه های بالینی و محیطی به صورت یکسان عمل می نماید.

دارو	تعداد نمونه ها					
	حساس		نیمه حساس		مقاوم	
	درصد حساسیت	نمونه	درصد حساسیت	نمونه	درصد حساسیت	نمونه
Itraconazole	۹۰	۳۶	۱۰	۴	–	–
Caspofungine	۱۰۰	۴۰	–	–	–	–
voriconazole	۹۲/۵	۳۷	۷/۵	۳	–	–

جدول ۲ : تعیین درصد حساسیت نمونه ها به داروها

بحث

شیوع عفونت های قارچی در سال های اخیر به دلایل مختلف از جمله افزایش وقوع عوامل تضعیف کننده سیستم ایمنی، مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها و ضدقارچ ها، کورتیکوستروئیدها و غیره به شدت رو به افزایش است و این مساله انتخاب دستورالعمل درمانی مؤثر و مناسب را در یک دوره زمانی مشخص اجتناب ناپذیر ساخته است. مطالعه های اپیدمیولوژیک نشان داده است که عفونت های با اهمیت قارچی به طور عمده به وسیله گونه های مقاوم به داروهای ضد قارچی ایجاد می شود و نتایج یک درمان ضد قارچی به فاکتورهای مختلف از جمله ویژگی های قارچ عامل عفونت، ویژگی های داروی ضد قارچی مورد استفاده و سایر فاکتورهای میزبان وابسته است.

آسپرژیلوس یکی از شایع ترین عفونت های فرصت طلب ومهاجم در افراد ایمونوساپرس و زمینه دار در دو دهه اخیر است آسپرژیلوس فومیگاتوس شایع ترین عامل آسپرژیلوس در اکثر مطالعه های خارج از ایران است . با این همه، در کشورمان فراوان ترین گونه ایزوله شده از نمونه های بالینی مربوط به آسپرژیلوس فلاووس می باشد (۱۵). در این پژوهش سعی بر آن شد تا حساسیت دارویی و MIC سه داروی ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین روی شایع ترین ایزوله های آسپرژیلوس فلاووس ایرانی جدا شده از بیماران با استفاده از روش NCCLS-M38P بررسی شود و نتایج آن در جهت انتخاب درمان های بهتر و مؤثرتر برای ارتقاء سطح سلامت جامعه مورد پژوهش و بررسی قرار گیرد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق سویه‌ها به ترتیب ۱۰۰٪ به داروی کاسپوفانژین، ۹۲/۵٪ نسبت به وریکونازول و ۹۰٪ نسبت به ایتراکونازول حساسیت نشان دادند.

MIC_{50} نتایج به دست آمده با مطالعه گییت و همکاران در سال ۲۰۱۴ مطابقت داشت. آن ها با روش E-TEST، دامنه MIC را برای داروی ایتراکونازول ۱-۰/۲۵و MIC_{50} را ۰/۵ و MIC_{90} را ۰/۸۳ به دست آوردند (۳۱). کاظمی و همکاران در سال ۱۳۹۲ روی ۲۵ نمونه قارچ آسپرژیلوس جدا شده بالینی با روش میکرودایلوشن میزان MIC برای داروی ایتراکونازول را ۴-۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آوردند. تا حدودی با مطالعه صورت گرفته این پژوهش مطابقت داشت (۱۷).

دکتر بدیعی و همکاران در سال ۲۰۱۲روی ۶۶ آسپرژیلوس فلاووس جدا شده بالینی مطالعه انجام دادند. آن ها به روش E-TEST برای ایتراکونازول دامنه ۱/۵-۰/۱۲۵ با MIC_{50} رابر با ۰/۵ و MIC_{90} برابر ۱به دست آوردند. نتیجه روش CLSI برای این دارو دامنه ۲-۰/۲۵ با MIC_{50} برابر با ۱و MIC_{90} را هم برابر با ۱ به دست آوردند که با نتایج مطالعه صورت گرفته این پژوهش هم خوانی داشت (۳).

www.SID.ir

هم چنین سیلوانو و همکاران سال۲۰۱۱ روی ۲۴ آسپرژیلوس فلاووس جدا شده برای داروی ایتراکونازول دامنه MIC برابر با ۰/۵-۰/۲۵ به دست آوردند که حد پایین آن ها، انطباق زیادی با نتایج مطالعه صورت گرفته در این پژوهش داشت(۵). سید جمال هاشمی و همکاران در سال ۱۳۹۰ از بین ۵۰ ایزوله آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بالینی از بیماران ۴۰ استرین فلاووس به‌دست آوردند. باروش میکرودایلوشن طبق پروتوکل NCCLS-M38A دامنه برای ایتراکونازول را ۱-۰/۲۵ به دست آوردند.که تا حد زیادی با نتایج مطالعه صورت گرفته در این پژوهش مطابقت داشت(۱۵). کومار راووی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ از ۲۵ نمونه آسپرژیلوس فلاووس جدا شده با روش براث دایلوشن طبق استاندارد CLSI M38A برای داروی ایتراکونازول برابر با ۰/۱۲۵-۰/۰۶ به دست آوردند. که تا حد زیادی با نتایج مطالعه صورت گرفته در این پژوهش مطابقت داشت (۲۴).کومار ساراوو و همکارن در سال ۲۰۱۰ از ۲۰۴ بیمار ۳۲ نمونه آسپرژیلوس فلاووس جداکردند و با روش ماکرودایلوشن طبق استاندارد CLSI M38A برای داروی ایتراکونازول دامنه MIC برابر با ۰/۲۵-۰/۱۲به دست آوردند (۱۹) . شی جون یان و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی ۳۵ آسپرژیلوس فلاووس به روش E-TEST، نتیجه را برای داروی ایتراکونازول را با دامنه۴ MIC-۰/۰۴۷ و MIC_{50} برابر با ۰/۷۵ و MIC_{90} برابر با ۱/۵ به دست آوردند.که این نتایج نیز تا حدی، با نتایج مطالعه صورت گرفته در این مطالعه هم خوانی داشت (۲۸).کوزوکو در سال ۲۰۰۴ تعداد ۵۴ ایزوله قارچ رشته ای از بیماران جدا کردند که ۳ مورد آن آسپرژیلوس فلاووس بود. با روش SAAS نتیجه برای ایتراکونازول را دامنه۱۲ MIC/-۰/۰۳ و با روش M38P دامنه MICرا ۰/۱۲-۰/۰۶ به دست آوردند (۲۰) از طرفی سرانو و همکاران در سال ۲۰۰۳ با متد M38P میکرودایلوشن براث بر روی نمونه‌های آسپرژیلوس فلاووس بررسی کردند و دامنه MIC مساوی با ۰/۱۲-۰/۰۳ و MIC_{90} ۱۲ /۰ را برای داروی ایتراکونازول به دست آورند. که با نتایج مطالعه صورت گرفته هم خوانی نداشت (۲۷) اختلاف این دو مطالعه می تواند به علت نوع گونه و حساسیت بیش تر آن ها به این داروها باشد.ایتمار شالتی و همکاران در سال ۲۰۰۳ روی ۶ نمونه آسپرژیلوس فلاووس با استفاده از روش میکرودایلوشن دامنه ایتراکونازول را ۱-۰/۲۵ به دست آوردند که تا حدی با نتایج تحقیق های صورت گرفته انطباق داشت (۲۹).گیبت و همکاران در سال ۲۰۱۴ از ۴۸ بیمار مبتلا به قارچ ۱۸ نمونه آسپرژیلوس فلاووس جدا کردند. با روش E-TEST، دامنه MIC را برای داروی وریکونازول ۰/۵-۰/۰۶ و MIC_{50} را ۰/۱۹ و MIC_{90} را ۰/۲۵ به دست آوردند که با نتایج کار این پژوهش مطابقتی نداشت (۳۱). می توان این استنباط را داشت که تعداد نمونه های مورد آزمایش علت این اختلاف باشد.

دکتر بدیعی و همکاران سال ۲۰۱۲روی ۶۶ آسپرژیلوس فلاووس کار کردند. آن ها به روش E-TEST، برای وریکونازول دامنه ۰/۰۶۴-۰/۰۶۴ و MIC_{50} مساوی با ۰/۱۲۵ و MIC_{90} مساوی با ۰/۱۹ به دست آوردند. نتیجه روش CLSI این دارو با دامنه ۰/۵-۰/۱۲۵ با MIC_{50}برابر با ۰/۲۵ و MIC_{90} برابر با ۰/۲۵ به دست آمد. حد پایین آن ها با نتایج این پژوهش هم خوانی داشت (۳).

سالوانوس و همکاران سال ۲۰۱۱ روی ۲۴ آسپرژیلوس فلاووس جدا شده برای داروی وریکونازول MIC را ۱-۰/۱۲ به دست آوردند. حد بالای آن ها مطابق با MIC_{90} پژوهش صورت گرفته بود (۵). سید جمال هاشمی و همکاران، در سال ۱۳۹۰ روی ۵۰ ایزوله آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بالینی از بیماران ۴۰ استرین فلاووس به دست آوردند. آن ها با روش میکرودایلوشن مطابق دستورالعمل NCCLS-M38A دامنه را برای وریکونازول، ۴-۰/۲۵ به دست آوردند. که حد پایین آن با نتایج پژوهش مطابقت داشت (۱۵).

شی جون یان و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی ۳۵ آسپرژیلوس فلاووس به روش E-TEST، نتیجه را برای داروی وریکونازول با دامنه MIC برابر با ۰/۵-۰/۰۹۴ و MIC_{50} برابر با ۰/ ۲۵ و MIC_{90} برابر با ۰/۳۸دست آوردند. نتایج آن ها با نتایج ما مطابقتی نداشت (۲۸) و چون تعداد نمونه های مورد مطالعه به طور تقریبی مشابه بود این اختلاف می تواند به علت یکسان نبودن محیط نمونه های جدا شده باشد. گوییبنا و همکاران در سال ۲۰۰۸ از ۳۴ آسپرژیلوس فلاووس جدا شده برای داروی وریکونازول دامنه ۲ MIC-۰/۱۲۵ و MIC_{90} برابر با ۱به دست آوردند که حد بالای MIC و MIC_{90}آن ها با نتایج این مطالعه هم خوانی داشت (۱۲).

فرانک مایکل نیزدر سال ۲۰۰۵ از ۲۴ آسپرژیلوس فلاووس جدا شده با روش میکرودایلوشن برای داروی وریکونازول دامنه ۱-۰/۰۶و MIC_{50} ۰/ ۲۵ به دست آورد. که با حد بالای آن با MIC_{90}این پژوهش مطابقت داشت (۱۶). لینارز و همکاران در سال ۲۰۰۴ از ۲۴۴ بیمار مبتلا به قارچ ۱۶ مورد آسپرژیلوس فلاووس جدا کردند. با متد M38P دامنه MIC را برای داروی وریکونازول برابر با ۱-۰/۰۳ و MIC_{50} را مساوی با ۰/۲۵ و MIC_{90} مساوی با ۰/۵ به دست آوردند. آن ها باروش Sensititer yeastone دامنه MIC را برابر با ۰/۵-۰/۰۶ به دست آوردند. نتایج آن ها در مقایسه با نتایج پژوهش صورت گرفته، نشان‌دهنده اندکی حساسیت بیش تر سویه‌های آن ها نسبت به سویه‌های این پژوهش بود. در واقع سویه‌های آن ها رقت بالاتری از دارو واکنش نشان دادند (۲۲) .گیبت و همکاران در سال ۲۰۱۴ از ۴۸ بیمار مبتلا به قارچ ۱۸ نمونه آسپرژیلوس فلاووس جدا کردند. با روش E-TEST، دامنه MIC را برای داروی کاسپوفانژین

www.SID.ir

۳۲-۰/۰۰۴ MIC_{50} و ۰/۰۶ MIC_{90} را ۳۲ به دست آوردند. حد بالای آن ها به نتایج این مطالعه نزدیک بود (۳۲).

سالوانوس و همکاران سال ۲۰۱۱ روی ۲۴ آسپرژیلوس فلاووس جدا شده برای داروی کاسپوفانژین MIC را بزرگ تر از ۱۶ به دست آوردند که با نتایج این پژوهش هم خوانی نداشت (۵). شی جون یان و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی ۳۵ آسپرژیلوس فلاووس به روش E-TEST، نتیجه حاصله برای داروی کاسپوفانژین دامنه MIC ۰/۱۹-۰/۰۱۶ و MIC_{50} برابر با ۰/۰۴۷ و MIC_{90} ۰/۰۹۴ به دست آوردندکه تا حد زیادی با نتایج این پژوهش مطابقت داشت (۲۸). دکتر بدیعی در سال ۱۳۹۰ حدود ۱۴٪ آسپرژیلوس فلاووس را از ۲۲۳ بیماری قارچی جدا کردند که MIC_{90}برای کاسپوفانژین در آن تحقیق را ۱ به دست آوردند که بالاتر از MIC_{90} این پژوهش بود (۳).

دکتر بدیعی و همکاران سال ۱۳۸۹ از ۳۶ نمونه سینوس ۷ موردآسپرژیلوس فلاووس جدا کردند دامنه MIC برای کاسپوفانژین را ۰/۷۵-۰/۳۲ به دست آوردند. سویه‌های این پژوهش در مقایسه با آن حساسیت بیش تری داشت. در واقع سویه‌های این پژوهش در رقت‌های پایین‌تری از دارو جواب داده بودند (۴). ایتمار شالتی و همکاران در سال ۲۰۰۳ روی ۶ فلاووس جدا شده از ۳۱ بیمار با روش میکرودایلوشن MIC بزرگ تر و مساوی ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر را برای داروی کاسپوفانژین به دست آورده‌اند. که با کار صورت گرفته مطابقت نداشت و نشان‌دهنده حساسیت بیش تر سویه‌های این پژوهش بود (۲۹). آریخان و همکاران در سال ۲۰۰۲ از ۲۷ آسپرژیلوس جدا شده برای داروی کاسپوفانژین به روش میکرودایلوشن، دامنه MIC را ۱۶-۰/۵ به دست آوردند. که با مطالعه ما هم خوانی نداشت (۱).

سوفیا پریا و همکاران سال ۲۰۰۲ از ۹ آسپرژیلوس فلاووس جدا شده به روش میکرودایلوشن، دامنه MIC را بیش تر از ۶۴ برای داروی کاسپوفانژین به دست آوردند. که با نتایج پژوهش ما مطابقتی نداشت (۳۱). آریخان و همکاران در سال ۲۰۰۰ تعداد ۲۷ آسپرژیلوس فلاووس جدا کردند. با روش میکرودایلوشن، دامنه MIC را برای داروی کاسپوفانژین ۱۶< -۰/۲۵ به دست آوردند. هم چنین MIC ۵ /۰-۰/۲۵ بود که با نتایج این مطالعه هم خوانی نداشت (۱) در این مطالعه های تعداد نمونه ها نسبت به پژوهش ما کم تر بود ممکن است تعداد نمونه ها تاثیر روی نتایج دامنه به دست آمده داشته باشد.

در سال ۱۹۹۸ اینگروف و همکاران روی ۱۱ آسپرژیلوس فلاووس با روش میکرودایلوشن M38-A2 بررسی انجام داده و برای داروی کاسپوفانژین MIC برابر با ۰/۵ به دست آوردند. که نشان دهنده حساسیت بیش تر سویه‌های آن ها می‌باشد (۱۱).

همان طور که مشاهده می شود در بعضی موارد نتایج این بررسی با نتایج سایر محققان متفاوت است که این اختلاف موجود می تواند دلایل مختلفی داشته باشد از جمله:

۱- تفاوت زیر گونه های قارچی در مقابل داروهای مورد بررسی

۲-مقاومت سویه ها نسبت به ضد قارچ ها.

۳-اختلاف در کیفیت دارو و درجه خلوص آن که می تواند. ناشی از اختلاف در شرکت سازنده دارو باشد.

۴-از طرفی این اختلاف نتایج می تواند به دلیل تفاوت در جامعه مورد مطالعه باشد بدین معنی که افزایش مصرف داروها باعث ایجاد مقاومت سویه های آسپرژیلوس به داروهای ضد قارچی شده است. و یا سایر مواردی که پرداختن به آن نیاز به تحقیق های بیش تری دارد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده و میزان محدوده MIC حاصل از ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین، سویه های به دست آمده آسپرژیلوس فلاووس بررسی شده در این پژوهش، جزء سویه های حساس ارزیابی شدند و سویه مقاوم مشاهده نگردید. دامنهMIC سویه ها در دامنه مطالعه های مشابه و در مواردی نیز خارج از این دامنه ها قرار گرفت، نشان دهنده حساسیت بیش تر سویه های مورد مطالعه بود.

با توجه به افزایش افراد در معرض خطر و شیوع عفونت های فرصت طلبی چون آسپرژیلوزیس و کاهش حساسیت و مقاومت دارویی گونه های آسپرژیلوس مطالعه بر روی تعداد بیش تری نمونه در جوامع مختلف، پیشنهاد می گردد. هم چنین بهتر است برای دستیابی به درمان های موثرتر، مطالعه هایی با تعداد داروی بیش تر و با بررسی اثر ها سینرژیسمی درمان های ترکیبی و داروهای نوظهور، صورت پذیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله برخود لازم می دانند از آقایان دکتر شیدفر، دکتر بدلی و دکتر کتیرایی و مسئولین آزمایشگاه دانشگاه آزاد کرج که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، قدردانی و تشکر به عمل آورند.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1- Arikan,S.S, Maro.L-C, Victor. P, and John. Rex, In Vitro Susceptibility Testing Methods for Caspofungin against Aspergillus and Fusarium Isolates antimicrobial agents and chemotherapy Jan. 2001. p. 327–330

2- Arikan, S., Lozano-Chiu, M., Paetznick, V. & Rex, J. H. In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against Aspergillus and Fusarium spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002; 46, 245–7.

3- Badiee P, Alborzi A, Moeini M, Haddadi P, Farshad S. Japoni A, et al.Antifungal susceptibility of the aspergillus species by Etest and CLSI, reference methods. Arch Iran Med. 2012; 15(7): 429 – 432.

4. Badiei 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.

5- Christudas Silvanose, Tom Bailey and Antonio Di Somma , In Vitro Sensitivity of Aspergillus Species Isolated from Respiratory Tract of Falcons ,on line veterinary journal 2011, Vol. 6 No. 2, Article 95

6. Dannaoui, E., Borel, E., Monier, M.F., Piens, M.A., Picot, S., Persat, F. Acquired itraconazole resistance in Aspergillus fumigatus. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47(3):333-40

7- Dehghan P, Zaini F, Rezaei S, Jebali A, Kordbacheh P, Mahmoudi M. Detection of Aflr gene and oxigenicity of Aspergillus flavus. Iranian J Publ Health 2008; 37(3):134-41

8. 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.

9. 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 Dis2002; 34(5):563-71. Epub 2002 Jan 22.

10. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA.Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, itravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. J Clin Microbiol.2003 Aug; 41(8):3623-6.

11- Espinel-Ingroff, A. (1998). Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. Journal of Clinical Microbiology 36, 2950–6.

12- Jesús Guinea, Teresa Peláez, Sandra Recio, Marta Torres-Narbona and Emilio Bouza *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52(4):1396.

13. 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.

14. 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]

15-Hashemi, J, Zaini.F. Daie .R, Zibafar .E, Zakeri.A In-vitro susceptibility of Aspergillus species isolated from cutaneous and visceral lesions to antifungal agents, Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 2, May 2011*:* 83-91

16-Kazemi A, Nowrozi H, Teshfam M, Teimorian Sh, Drug susceptibility of Aspergillus flavus and A.fumigatus to Itraconazole and Amphotericin B, 71 / Journal of Gorgan University of Medical Sciences

www.SID.ir

Archive of SID

17- Kathrin Heyn, Antje Tredup, Stefanie Salvenmoser and Frank-Michael C. Müller, Effect of Voriconazole Combined with Micafungin against *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. and *Fusarium solani* , ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Dec. 2005, p. 5157–5159

18. Kordbacheh P, Badiee P, Alborzi A, Zaini F, Mirhendi H,Mahmoudi M, et al. Acute fulminant fungal sinusitis in patint with acute leukemia. *Iranian J Publ Health* 2008; 37(2):46-51.

19-Kumar Saurav and K. Kannabiran , In vitro Susceptibility Pattern and Distribution of Aspergillus spp. in Hospitalized Patients with Chronic Pulmonary Infection, British Journal of Pharmacology and Toxicology 1(1): 45-49, 2010

20- 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

21. Manuel RJ, Kibbler CC. The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. *J Hosp Infect* 1998; 39(2):95-109.

22- Maria Jose´ Linares, Guadalupe Charriel, Francisco Solı´s, Fernando Rodriguez, Ana Ibarra, and M. Casal, Susceptibility of Filamentous Fungi to Voriconazole Tested by Two Microdilution Methods, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2005, p. 250–253

23. 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.

24- Ravi Kumar, Sandeep Kumar Shrivastava, Arunaaloke Chakraborti, 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.

25. Perfect, J.R., Schell, W.A. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis*., 1996; 22 (2): 112-8.

26. 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.

27- 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.

28- SHI Jun-yan, XU Ying-chun, SHI Yi, LÜ Huo-xiang, LIU Yong, ZHAO Wang-sheng, CHEN Dong-mei, XI Li-yan, ZHOU Xin, WANG He and GUO Li-na, In vitro susceptibility testing of Aspergillus spp. against voriconazole, itraconazole, posaconazole, amphotericin B and caspofungin, Chin Med J 2010;123(19):2706-2709

29- Shalit, Itamar Yona Shadkchan, Zmira Samra,and Nir Osherov, In Vitro Synergy of Caspofungin and Itraconazole against *Aspergillus* spp.: MIC versus Minimal Effective Concentration End Points, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr. 2003, p. 1416–1418

30. Spanakis EK, Aperis G, Mylonakis E. New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. Clin Infect Dis. 2006 Oct; 43(8):1060-8.

31-Sofia Perea,Gloria Gonzalez, Annette W. Fothergill, William R. Kirkpatrick,Michael G. Rinaldi and

www.SID.ir
Archive of SID

Thomas F. Patterson1, In Vitro Interaction of Caspofungin Acetate with Voriconazole against Clinical Isolates of Aspergillus spp. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Sept. 2002, p. 3039–3041

32- Soukeina, Gheith. et al. In vitro susceptibility to amphotericin B,itraconazole, voriconazole, posaconazole and caspofungin of Aspergillus spp. isolated from patients with haematological malignancies in Tunisia. *Gheith et al.,* 2014; (3):19.

Archive of SID

www.SID.ir