

مقاله اصلی

اثرات داروهای ضد قارچی متداول در نمونه های بالینی انواع مختلف کاندیدا آلبیکنس

* محمد جواد نجف زاده^۱ PhD، مهربان فلاحی^۲ PhD، لامع اخلاقی^۳ PhD،
کامران پوشنگ باقری^۴ MD

^۱ مربی گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ^۲ استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران، ^۴ دانشجوی دکترای میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
تاریخ دریافت: ۸۵/۹/۱ - تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲

خلاصه

مقدمه: در چند دهه اخیر، میزان وقوع عفونت های قارچی در بسیاری از کشورها افزایش یافته است. به دلیل پیدایش مقاومت به عوامل ضد قارچی تعیین طرح استراتژیک مؤثر برای درمان بیماری های قارچی یک موضوع مهم در قارچ شناسی بالینی است.

روش کار: روش های زیادی برای تعیین تست حساسیت آزمایشگاهی معرفی شده اند. اخیراً، فلوسیتومتری برای حل مشکل معرفی شده است. مقالات زیادی به مفید بودن این تکنیک استناد کرده اند. این مطالعه با هدف بررسی حساسیت آزمایشگاهی یک سوش استاندارد PTCC و تعدادی ایزوله های بالینی از کاندیدا مطابق با دستورالعمل NCCLS با روش ماکرودیولوشن براث و تست حساسیت فلوسیتومتری انجام شده است. این مطالعه توصیفی بر روی قارچ ها در دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شد. نمونه های بالینی کاندیدایی جدا شده تحت اثر داروهای ضد قارچی مانند آمفوتریسین B، فلوکونازول، کلوتریمازول، کتوکونازول، میکونازول به روش فلوسیتومتری و ماکرودیولوشن قرار گرفتند. مشخصات نمونه ها، نتایج آزمایشات در پرسشنامه و برگه مشاهده جمع آوری و سپس با استفاده از آمار توصیفی و جداول توزیع فراوانی پردازش شد.

نتایج: داده ها نشان دادند که روش ماکرودیولوشن براث و فلوسیتومتری نتایج مشابه در تعیین MIC برای آمفوتریسین B، کتوکونازول، کلوتریمازول، فلوکونازول و میکونازول داشتند.

نتیجه گیری: مقایسه نتایج حاصله با روش ماکرودیولوشن براث و فلوسیتومتری در مورد کاندیدا آلبیکنس PTCC5027 و همین طور ایزوله های بالینی نشان داد که فلوسیتومتری خیلی راحت تر و سریعتر از روش های براث است. پیشنهاد می شود که تست حساسیت فلوسیتومتری به عنوان یک ابزار قوی در تعیین MIC و تجویز بهترین داروی ضد قارچی در درمان بیماران با عفونت های کاندیدائی به خصوص کاندیدایازیس سیستمیک استفاده شود.

کلمات کلیدی: داروهای ضد قارچی، فلوسیتومتری، روش ماکرودیولوشن

* مشهد - دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی - گروه انگل شناسی و قارچ شناسی -

Email: mjd-najafzadeh@mums.ac.ir - نویسنده رابط

Jjavadi2000@yahoo.com

مقدمه

طی دهه های اخیر شمار بیماران مستعد به عفونت با میکروارگانیزم های فرصت طلب از قبیل سوش های کاندیدا، به خصوص در بیماران با نقص سیستم ایمنی، به طور قابل توجهی در خیلی از کشورها افزایش یافته است و همچنین نشان داده شده است که مخمرهای پاتوژن زیادی مقاومت ذاتی یا اکتسابی نسبت به داروهای ضد قارچی دارند.

بنابراین تعیین طرح استراتژیک موثر برای درمان بیماریهای قارچی یک موضوع مهم در قارچ شناسی بالینی است (۹ - ۱). کمیته بین المللی استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (NCCLS^۱)، روش دیلوشن براث (M27-A) را در آزمایشگاههای تشخیصی به عنوان روش منبع برای تست حساسیت ضد قارچی مخمرهای پاتوژن معرفی کرده اند، ولی استفاده از این روش نیاز به زمان زیادی دارد (۱۰). تعداد زیادی از محققین روش فلوسیتومتری را برای بدست آوردن سریع نتایج حساسیت برای کاندیداها گزارش کرده اند (۹ - ۱).

مکانسم عمل فلوسیتومتری برای تست حساسیت ضد قارچی در این جا افتراق میکروارگانیزم های مرده از زنده با استفاده از رنگ حیاتی منتقل شونده به DNA سلول است. در این روش از سدیم داکسی کولات برای افزایش نفوذ پذیری و پروپیدیوم یدید، یک رنگ حیاتی متصل شونده به DNA، برای تشخیص افزایش نفوذ پذیری غشاء سلولی بعد از درمان ضد قارچی استفاده شده است.

این مطالعه با هدف بررسی اثرات درمانی داروهای ضدقارچی مانند: آمفوتریسین B، فلوکونازول، کلوتریمازول، کتوکونازول، میکونازول را بر روی کاندیدا آلیکسس (PTCC 5027)، کاندیدا آلیکسس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کفایر و کاندیدا دابلینسیس با دو روش ماکرودیوشن براث و فلوسیتومتری انجام شده است.

روش کار

این مطالعه توصیفی بر روی قارچها در آزمایشگاه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است. میکروارگانیزم های مورد استفاده شامل کاندیدا آلیکسس (PTCC 5027) که از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری های صنعتی و عفونی ایران (وابسته به سازمان و پژوهش های علمی و صنعتی ایران) تهیه گردید و نیز کاندیدا آلیکسس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کفایر و کاندیدا دابلینسیس که نمونه های بالینی جدا شده بوده و با استفاده از کیت API20C AUX تعیین گونه شده بودند و داروهای ضد قارچی شامل آمفوتریسین B (C47H73NO₁₃-A₄₈₈₈-10T47H1247) که از شرکت سیگما خریداری شد و نیز دارای فلوکونازول (Batch no: 104/70 (اهدایی شرکت پارس دارو) و کلوتریمازول (Lot Number = 200211060136) (Batch Number: Det "50" 02-03) و میکونازول (Lot: ZRO14889pud67) (اهدایی شرکت بهوزان رشت) بودند.

برای تهیه سوسپانسیون تلقیحی از نمونه های مخمری ۱۸ تا ۲۴ ساعته به کمک آنس استریل چند تکه کلنی در کنار شعله به داخل لوله در پیچ دار حاوی سرم فیزیولوژی استریل منتقل کرده و خوب تکسان داده شد. بعد از یکنواخت شدن سوسپانسیون مقداری از سوسپانسیون فوق روی لام شمارش سلولهای خونی قرار داده و تعداد سلولهای مخمری در خانه های شمارش گلوبول های سفید شمرده شده و طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{مخمر در mL} = 10^4 * \text{تعداد مخمر (در یک خانه)}$$

رقت حاصله طوری تهیه شده که مقدار سلولهای موجود در ۱۰^۶ سلول به ازای هر میلی لیتر سوسپانسیون مخمری باشد.

¹NCCLS: National Criteria of Clinical Laboratory Standards

برای انجام تست حساسیت به وسیله فلوسیتومتری ابتدا باید پارامترهای دستگاه (BD کالیبر FACS) را برای مخمر تنظیم کرد. برای این کار ابتدا یک سوسپانسیون مخمری زنده را با رنگ پروپیدیوم دیدید (PI) رنگ آمیزی کرده و به دستگاه داده شد. سپس یک سوسپانسیون مخمری کشته شده با حرارت را با رنگ PI رنگ آمیزی کرده و تهیه می شود و در نهایت مخلوطی از سلولهای زنده و مرده را با رنگ PI رنگ آمیزی نموده و در دستگاه قرار گرفته می شود.

پروپیدیوم دیدید (PI) یک رنگ فلورسنتی است که از غشاء سلولهای مرده عبور می کند و به DNA این سلولها متصل می شود. این رنگ قادر به عبور از غشاء سلولهای زنده نیست. PI با طول موج ۴۸۸nm تحریک می شود و نور فلورسنس با طول موج ۵۵۰ تا ۶۷۰nm را از خود منتشر می کند. در مطالعه اخیر از سدیم داکسی کلرات برای افزایش نفوذپذیری رنگ پروپیدیوم دیدید (PI) از بین دیواره سلولی سلولهای مخمری استفاده شده است. در این روش ابتدا از کشت ۲۴-۱۸ ساعته مخمر (جدا شده روی محیط سابورود کستروز آگار)، سوسپانسیون مخمری در سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪ تهیه شد. دانسیته سلولهای مخمری به وسیله اسپکتروفتومتر برابر با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد. یک میلی لیتر محلول استوک هریک از داروهای مورد آزمایش را با ۹ میلی لیتر از محیط مایع استریل رقیق کرده و غلظت نهائی ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر را به دست آمد (برای آمفوتریسین B غلظت نهائی ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر).

برای آزمایش هریک از داروها بر روی هر قارچ، ۱۱ لوله در پیچ دار (۱۶mm*۱۱۰) که هر یک حاوی نیم میلی لیتر RPMI 1640 حاوی گلوتامین بدون بی کربنات که با MOPS (مورفولین پروپان سولفونیک اسید) در PH=۷ بافری شده است در جالوله ای قرار داده و از شماره ۱ تا ۱۱ شماره گذاری شد. نیم میلی لیتر از داروی مورد آزمایش رقیق شده به اولین لوله اضافه شده و پس از مخلوط کردن، نیم میلی لیتر از محتویات لوله اول را به لوله دوم انتقال داده و این ترتیب رقیق شدن پی در پی تا لوله نهم ادامه یافته و از این لوله نیم میلی لیتر

سوسپانسیون حاصل در طول موج ۵۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری دارای عبور نوری ۹۰٪ است که اندازه گیری شد. مایع تلقیحی تهیه شده باید بلافاصله مورد استفاده قرار گیرد تا در فاصله زمانی پس از استاندارد کردن، تکثیر صورت نگیرد (۱۰، ۱۱، ۱۲).

در روش اندازه گیری MIC در محیط مایع به روش ماکرودیلوشن برات ابتدا یک میلی لیتر محلول استوک هر یک از داروهای مورد آزمایش را با ۹ میلی لیتر از محیط مایع استریل رقیق کرده و غلظت نهائی ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر را به دست آورده شد برای آمفوتریسین B از غلظت نهائی ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر استفاده می کنیم.

برای آزمایش هریک از داروها بر روی هر قارچ، ۱۱ لوله در پیچ دار (۱۶mm*۱۱۰) که هر یک حاوی ۱ میلی لیتر محیط مایع استریل بوده در جالوله ای قرار داده و از شماره ۱ تا ۱۱ شماره گذاری شد. سپس یک میلی لیتر از داروی مورد آزمایش رقیق شده (۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر) به اولین لوله اضافه کرده و پس از مخلوط کردن، ۱ میلی لیتر از محتویات لوله اول به لوله دوم انتقال می یابد و این ترتیب رقیق شدن پی در پی تا لوله نهم ادامه یافته و از این لوله ۱ میلی لیتر مخلوط ماده دارویی و محیط کشت مایع خارج و دور ریخته می شود. بدین ترتیب غلظت های (۶۴ تا ۰/۲۵٪) میکروگرم در میلی لیتر ماده مورد آزمایش بدست می آید و برای آمفوتریسین غلظت های ۱۶ تا ۰/۰۳ میکروگرم در میلی لیتر بدست می آوریم. به کمک سمپلر ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی مورد آزمایش به ۱۰ لوله اول اضافه کرده.

لوله شماره ۱۰، شاهد مثبت و فاقد دارو و لوله شماره ۱۱ شاهد منفی بوده و فاقد دارو و میکروارگانیسم است.

لوله ها در گرمخانه ۳۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد و در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت مخمرها بعد از ۴۸ ساعت که شاهد مثبت رشد کرده بود نتایج خوانده شد و کمترین غلظتی که از رشد قارچ جلوگیری کرده بود به عنوان MIC دارو برای گونه مربوط ثبت گردید (۱۰، ۱۱، ۱۳).

دور ریخته شد.

تعیین MIC به وسیله فلوسیتومتری (FCM): کمترین غلظت دارو که ۵۰٪ افزایش در MCF^۲ در مقایسه با کنترل مثبت نشان می‌دهد به عنوان MIC برگزیده شد (۱). مشخصات نمونه‌های، نتایج هر یک از آزمایشات در پرسشنامه ای ثبت گردید و سپس به وسیله آمار توصیفی و جداول توزیع فراوانی پردازش گردید.

نتایج

اثرات ضد قارچی داروهای آمفوتریسین B، فلوکونازول، میکونازول، کلوتریمازول و کتوکونازول بر روی سوش‌های مخمری کاندیدا آلبیکس PTCC5027، کاندیدا کفایر، کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا دابلینسیس به دو روش ماکرودیلوشن برات و فلوسیتومتری تعیین گردید که در جدول ۱ نشان داده شده است.

آزمایش‌ها برای هر دارو حداقل ۲ بار تکرار گردید. شکل ۱ کمترین غلظت مهار کنندگی (MIC) آمفوتریسین B بر روی سوش استاندارد کاندیدا آلیکنس PTCC5027 به روش ماکرودیلوشن برات و به روش فلوسیتومتری را نشان می‌دهد. که در هر دو روش جواب یکسان است.

سپس نیم میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمری به نیم میلی‌لیتر رقت دارویی سریال اضافه کرده و در ۳۵°C انکوبه شد. لوله کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون مخمری و محیط RPMI₁₆₄₀ بدون دارو است. لوله کنترل منفی حاوی محیط کشت و بدون مخمر است.

مخلوط دارو و سوسپانسیون مخمری برای آمفوتریسین ۴-۶ ساعت و برای دیگر داروها ۴-۶ ساعت انکوبه شدند. (۱) سدیم داکسی کلات و PI در پایان انکوباسیون اضافه شد و شدت فلورسنت با فلوسیتومتری (Becton Dickinson) FACS calibur اندازه‌گیری شد.

مرحله رنگ آمیزی به وسیله PI (پروپیدیوم یدید)

الف) بدون سدیم داکسی کلات (SDC): در پایان انکوباسیون ۴۰۰ میکرولیتر از مخلوط مخمر و دارو را در لوله‌های فالکون ۷۵*۱۲ ریخته و ۱۰ μl از رنگ PI (۲۰۰ μg/ml) به هر رقت اضافه گردید و به مدت ۱/۵ تا ۴ ساعت بسته به نوع دارو و نوع فیزیولوژی مخمر انکوبه می‌کنیم سپس در دستگاه گذاشته شد.

ب) با سدیم داکسی کلات (SDC): ابتدا یک غلظت استوک ۲۵mM، سدیم داکسی کلات تهیه کرده و آن را به میزان $\frac{1}{8}$ ، $\frac{1}{16}$ و $\frac{1}{32}$ با آب مقطر رقیق گردید، ۲۰۰ میکرولیتر از این SDC رقیق شده را به ۲۰۰ میکرولیتر از رقت دارویی درون لوله فالکون اضافه کرده و ۵ میکرولیتر از رنگ PI (۲۰۰ μg/ml) به هر لوله نیز اضافه شد و لوله‌ها را بسته به نوع فیزیولوژی مخمر و نوع دارو بین زمان ۱۰ دقیقه تا ۳۰ دقیقه انکوبه می‌کنیم و سپس نمونه در دستگاه گذاشته شد.

² Mean Channel Fluorescence

جدول ۱- اثرات ضدقارچی داروهای ضدقارچ بر روی مخمرهای انواع مختلف کاندیدا آلبیکانس

کلوتریمازول		فلوکونازول		آمفوتریسین B				میکونازول		سوش قارچی
NCCLS	FCM	NCCLS	FCM	NCCLS	FCM	NCCLS	FCM	NCCLS	FCM	
۲	۱	۲	۱	۸	۱۶	۰/۵	۰/۵	۱	۱	کاندیدا آلبیکانس
۳۲	۶۴	۰/۵	۱	۲	۴	۰/۵	۱	۰/۵	۱	کاندیدا کفیر
۴	۲	۰/۵	۰/۵	۸	۸	۰/۱۲۵	۰/۵	۲	۲	کاندیدا آلبیکانس
۸	۴	۸	۸	۴	۴	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۱	۱	کاندیدا کلایرانا
۲	۱	۴	۴	۲	۱	۰/۵	۰/۵	۱	۲	کاندیدا پارابلوزیس
۳۲	۶۴	۰/۵	۰/۵	۴	۲	۰/۲۵	۱	۱	۰/۵	کاندیدا دابلینسیس

بحث

روش‌های دیگر که حداقل ۴۸ ساعت می‌باشد از این بابت هم ارزش این روش مشخص می‌گردد.

ضمن تجربیات این نتیجه بدست آمد که سرعت کار در شرایط یکسان برای آزمایش بستگی به نوع دارو، نوع رنگ فلورسنس و گونه و حتی نژاد قارچ مورد استفاده دارد.

با مراجعه به کارهای انجام شده در این مطالعه رنگ PI با غلظت 200µg/ml به عنوان رنگ فلورسانس و محیط کشت RPMI1640 و نیتروژن حاوی ۱٪ دکستروز جهت رقیق‌سازی دارو و از سدیم داکسی کولات جهت افزایش نفوذپذیری رنگ استفاده شد (۱۲). نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که اثر داروهای ضد قارچی بر روی گونه‌های مخمری را می‌توان در طی ۶-۴ ساعت انکوباسیون به وسیله فلوسیتومتری بدست آورد و نتایج بدست آمده در این تحقیق مشابه مطالعات انجام شده توسط رامانی^۳ و همکارانش (۷، ۱) و گرین^۴ و همکارانش (۸) بود. در این مطالعه همانند روش محققین دیگر از سدیم داکسی کولات برای افزایش نفوذپذیری رنگ به داخل سلول استفاده شد (۷، ۱، ۱۵). اما غلظت پیشنهادی توسط این محققین (۲۵mM) بر روی مخمرهای زنده مورد مطالعه اثر کشندگی داشت که طی یک رشته آزمایش‌های نمونه جهت انتخاب غلظت مناسب انجام شد و

امروزه به علت کشف داروها و ترکیبات ضد قارچی جدید از یک سو و مشاهده مقاومت پاره‌ای از عوامل قارچی نسبت به بعضی داروها مانند فلوروسیتوزین و آمفوتریسین B و همچنین افزایش میزان بروز عفونت‌های قارچی و استفاده از داروهای ضد قارچی مختلف، از طرف دیگر بیش از پیش نیاز به آزمایش تعیین حساسیت داروئی جهت قارچ‌ها احساس می‌شود (۱۲). پزشکان معتقدند حداقل برای درمان مناسب بیمارانی که به عفونت‌های سیستمیک و خطرناک قارچی مبتلا هستند، انجام آزمایش برای تعیین حساسیت عامل بیماری نسبت به داروهای ضد قارچی ضروری است (۱۳، ۱۴).

علاوه بر کاندیدا آلبیکانس گونه‌های دیگر کاندیدا نیز مکرراً باعث عفونت در بیماران با نقص ایمنی می‌شوند. بعضی از این پاتوژن‌ها مقاومت ذاتی یا الگوی حساسیت متفاوت در برابر آزول‌های معمولی دارند.

باتوجه به مراتب یاد شده بالا روش حساسیت سنجی دقیق، سریع و کارآمد مورد نیاز است. در این بررسی آزمایش‌های انجام شده به روش فلوسیتومتری و نیز روش NCCLS با هم قابل مقایسه و همچنین تکرارپذیر بودند و از آنجائی که تعداد زیادی سلول آزمایش می‌شوند و سلولهای مرده و زنده حتی در حد تعداد بسیار کم مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند می‌توان گفت از دقت بالائی برخوردار است.

در مورد سرعت نیز نظر به این که زمانی که برای انجام آزمایش لازم است حدود ۶-۴ ساعت است که در مقایسه با

³ Ramani

⁴ Green

نشدن با این مشکلات می‌توان از فلوسیتومتری سود جست که این یکی از دلایل کارآمد بودن روش فلوسیتومتری می‌باشد. روی هم رفته می‌توان نتیجه گرفت که این روش دقیق، سریع و کارآمد می‌باشد.

تشکر و قدر دانی

به این وسیله از شرکتهای دارویی بهوزان رشت وپارس دارو جهت اهدای داروهای ضد قارچی تشکر و قدر دانی می‌شود.

غلظت ۱/۳۲، ۱/۱۶ و ۱/۸ از غلظت پیشنهادی آنها برای مطالعه مناسب شناخته شد.

نتیجه گیری

بعضی از ترکیبات نظیر آزولها به علت حلالیت کم در آب و ایجاد تیرگی در محیطهای کشت تعیین دقیق و صحیح MIC برای آنها براساس روشهای کدورت سنجی دشوار و شاید هم غیر ممکن باشد که در چنین مواردی برای درگیر

References:

- 1- Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than candida albicans and comparison with the NCCLS broth MICrodilution test. *AntiMICrob. Agent Chemother.* 2000; 44: 2752 - 8.
- 2- Kirk S M, Callister S. M, Lim L.C.L, Schell R.F. Rapid susceptibility testing of candida albicans by flow cytometry. *J Clin-MICrobiol* 1997; 35: 358-363.
- 3- Wenisch C, Moore C, Krause R, Presterl E Antifungal susceptibility testing of fluconazole by flow cytometry correlates with clinical outcome. *J Clin MICro* July 2001; 2458-62.
- 4- Chaturvedi V, Ramani R Pfaller M.A. Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal testing of candida albicans. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2249-51.
- 5- Rudensky B, Broidie E, et al. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of candida species. *J of Antimicrobial chemotherapy* 2005;55:106-109.
- 6- Mitchell M, Hudspeth M, Wright A. Flow Cytometry Susceptibility Testing for the Antifungal Caspofungin J *Clin Microbiol* June 2005; 2586-9.
- 7- Ramani R, Ramani A, Wong SJ. Rapid Flow cytometric susceptibility Testing of candida albicans. *J Clin MICrobiol* 1997; 35: 2320-4.
- 8- Green L, Petersen B, Steimel L. Haeber P. Current W. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. *J Clin MICrobiol* 1994; 32: 1088-91.
- 9- Wenisch C, Linnau KF, Parschalk B, Zed twitz – Liebenstein K, Georgopoulos A. Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. *J Clin MICro* 1997; 35: 5-10.
- 10- National Committee for clinical laboratory standards. 2002. Reference Method for Broth Dilution antifungal Susceptibility Testing of yeasts; Approved Standard second Edition.
- ۱۱- اوانس ای جی، ریچارد سن ان جی. «قارچ شناسی پزشکی روشهای عملی» ترجمه خسروی، علیرضا. فصل ۱۱. صفحه ۳۴۹-۳۱۳، انتشارات جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. چاپ دوم ۱۳۸۲.
- ۱۲- زینی، فریده. امامی، مسعود و مهبد، امیرسید علی «قارچ شناسی پزشکی جامع» فصل ۹ صفحه ۴۵۵-۴۱۳، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ پنجم، پائیز ۱۳۷۶.
- 13- Ghannoum M A, Rex JH, Galgiani J. N. Susceptibility testing of Fungi: current status of correlation of in vitro data with clinical outcome. *J Clin MICrobiol* 1996; 34: 489-495.
- 14- O’Gorman M R, Hopfer RL. Amphotericin B suceptibility testing of candida species by flow cytometry *Cytometry* 1991; 12: 743-7.
- 15- Martin E, Schlasius U, Bhakdi S. Flow cytometric assay for estimating fungicidal activity of amphotericin B in human serum. *Med MIC Immun* 1992; 181: 117-126.