در
امور دام و آبزیان شماره ۸۰ پاییز ۱۳۸۷
پژوهش و سازندگی

تعیین میزان حساسیت ایزوله های کاندیدا نسبت به داروی ایتراکونازول با مقایسه روش های دیسک دیفیوژن و رقیق سازی در مایع

• **لیلا نعمتی شیرزی**
کارشناس ارشد قارچ شناسی بخش کنترل کیفیت موسسه رازی
• **محمد حسین یادگاری**
استادیار بخش قارچ شناسی دانشگاه تربیت مدرس
• **پردیس عسکریان**
کارشناس میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد کرج
• **فاطمه نعمتی شیرزی**
کارشناس بخش کنترل کیفیت موسسه رازی
تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۶
Email: lili2nsh@yahoo.com

چکیده

شیوع عفونت های کاندیدیازیس خصوصاتوسط گونه های غیر آلبیکنسی، منجر به مصرف بی رویه داروهای ضد قارچی و مقاومت نسبت به آنها شده است و این مساله نیاز به متداول بودن تست های تعیین حساسیت دارویی ایزوله های بومی را قبل از تجویز دارو مطرح میکند. در این تحقیق،میزان حساسیت ۱۰۶ ایزوله از ۸ گونه با اهمیت کاندیدا نسبت به ایتراکونازول توسط مقایسه روش دیسک دیفیوژن باتست مرجع رقیق سازی در مایع، مورد بررسی قرار گرفت.کمترین میزان حساسیت مربوط به گونه کروزه ای بوده و پس از آن ترتیب گونه های گلابراتا،تروپیکالیس،آلبیکنس،کفیر، لوزیتانی، پاراپسیلوزیس و دوبلینینسیس دارای افزایش حساسیت بودند. وجود ۵/۶۶٪ مقاومت و ۷/۵۴٪ حساسیت بینابینی، مربوط به گونه های کروزه ای وگلابراتا بوده که در صورت عدم تعیین حساسیت و درمان با داروهای رایج آزولی، به صورت عفونت های پایدار و مزمن باقی می مانند. مطابق نتایج دیسک دیفیوژن و رقیق سازی در مایع به ترتیب ۸۵/۸۵٪ و ۸۶/۷۹٪ از ایزوله ها به ایتراکونازول حساس،۱۰/۳۷٪ و ۷/۵۴٪ با حساسیت وابسته به دوز و۳/۷۷٪ و۵/۶۶٪ مقاوم بودند. این مقایسه فاقد اختلاف معنی داری بوده ($p<0/05$) و ۸۹/۱٪ تشابه بین نتایج، موید ارزش تقریباً برابر و هم خوانی روش دیسک دیفیوژن با تست مرجع بوده که در نتیجه می توان از تست ساده وکم هزینه دیسک دیفیوژن به عنوان تست غربال گری درآزمایشگاههای تشخیص طبی به صورت روتین بهره برد.

کلمات کلیدی: کاندیدا، ایتراکونازول، دیسک دیفیوژن، حساسیت دارویی، رقیق سازی در مایع

Pajouhesh & Sazandegi No 80 pp: 96-102

Correlation between disk diffusion and broth micro dilution methods for determining susceptibilities of Candida spp. to Itraconazole

By: Nemati-shirzi L,M.Sc, Dept. of Quality Control, Razi Institute, Karadj, Tehran, Iran, Yadegari M H,pH.D, Dept. of Medical Mycology, Tarbiat Modares University,Tehran, Iran , Askarian P B.Sc, Dept. of Microbiology, Azad University, Karadj, Iran, Nemati-Shirzi F ,B.Sc, Dept. of Quality Control, Razi Institute, Karadj, Tehran, Iran.

Increasing prevalence of Candidasis with the emergence of non-albicans Candida spp. and acquiring antifungal resistance has showed routine antifungal susceptibility testing. In present work, Itraconazole(ITZ)susceptibility of 106 Candida strains of 8 different species isolated from clinical specimens of patient were studied by standard disk diffusion method(D.D) and the result were compared with results obtained form the broth micro dilution-based reference method(B.M.D).Susceptibility ranking to ITZ obtained with all yeasts tested was decreased from *C.dubliniensis* to *C.parapsilosis*, *C.lusittani, C.kefyr, C.albicans, C.tropicalis, C.glabera* and *C.krusei. C.krusei* and *C.glaberata* showed the highest rate (5.66%/7.54%) of S-DD/R among all species tested. In D.D and B.M.D method 85.85% and 86.79% of isolates were susceptible(S), whereas 10.37% and 7.54% showed dose-dependent susceptibility (S-DD), and 3.77% and 5.66% were resistant(R), respectively. A total correlation between D.D & reference methods was measured as 89.1 %($p<0.05$).this data suggest The D.D method is a rapid, simple and reliable screening test for routine susceptibility testing use.

Key words: Candida, Itraconazole, Drug susceptibility, Disk diffusion, Broth micro dilution

مقدمه

امروزه به دلیل افزایش فاکتورهای مستعدکننده ای هم چون پیوند اعضاء، مصرف داروهای سرکوب کننده ایمنی، آلودگی به ویروس ایدز و سرطان ها، عفونت های قارچی فرصت طلب گسترش چشمگیری یافته اند که شایعترین آنها نیز کاندیدیازیس می باشد (۲، ۱۳). عامل اصلی کاندیدیازیس، *Candida albicans* می باشد، اما در سال های اخیر به دلیل وجود زمینه های مسائدکننده ،گونه های غیر آلبیکنسی مانند گلابراتا و کروزه ای نیز شیوع قابل توجهیٔ یافته اندکه فاقد حساسیت لازم به داروهای رایج می باشند(۳). افزایش مصرف داروهای ضد قارچی و به دنبال آن کاهش حساسیت گونه ها نسبت به دارو ، نیاز به مصرف با دوز بیشتر را منجرشده ودر نتیجه درمان ناموفق، عود مجدد بیماری، تبدیل آن به فرم مزمن و مقاومت به دارو را به دنبال دارد(۱۸، ۲۵). عفونت ممکن است توسط ایزوله هایی ایجاد شود که دارای مقاومت اولیه یا ذاتی نسبت به دارو باشند که در این حالت مقاومت بدون سابقه مصرف دارو است. اما مقاومت اکتسابی یا ثانویه در ایزوله هایی وجود دارد که سابقه حساسیت به دارو را داشته اند اما به عللی چون جهش ژنتیکی، بیان بیش از حد و یا تغییر در هدف دارو دچارپدیده مقاومت می شوند(۱، ۸، ۱۵، ۲۵). این موارد مطرح شده به همراه وجود الگوی حساسیتی قابل تعیین در ایزوله های کاندیدا ضرورت استفاده از روش های تعیین ارزیابی حساسیت دارویی عوامل قارچی را بیش از پیش آشکار ساخته است که در آزمایشگاه های کشور بطور روتین انجام نمی گیرد. هم چنین بکارگیری داروهای جدیدتر با حساسیت بیشتر، نفوذ و انتشار مناسب تر و عوارض جانبی محدودتر از ضروریات انکار ناپذیر می باشد. امروزه، پس از طی پانزده سال بررسی و تحقیق معیارهایی جهت تعیین حساسیت دارویی توسط یک کمیته بین المللی استانداردسازی بنام[1] CLSI مطرح شده است(۱). قبل از تشکیل این کمیته نتایج این گونه تست ها در آزمایشگاه های مختلف بسیار متناقض بود(۹). امروزه کمیته CLSI پروتکل های M-CLSI۴۴ و CLSI-M۲۷A را به عنوان یک الگوی استاندارد با جزئیات کامل برای روش های دیسک دیفیوژن (Disk Diffusion) و رقیق سازی در مایع (Broth Micro Dilution) جهت انجام تست تعیین حساسیت مخمرهایی چون کاندیدا نسبت به داروی ایتراکونازول طراحی نموده است (۸، ۱۰) تست رقیق سازی درمایع از سوی کمیته بین المللی به عنوان تست مرجع (Gold Standard) با حساسیت بیشتر انتخاب شده است. در تحقیق حاضر از این دو روش جهت تعیین حساسیت ایزوله های بومی کاندیدا نسبت به داروی جدید ایتراکونازول بهره گیری شده است. این دارو با نام تجاری اسپورانوکس و فرمول شیمیایی $C_{۳۵}H_{۳۸}Cl_۲N_۸O_۴$ ازدسته داروهای آزولی بوده که با اثربر روی آنزیم های سیستم سیتوکروم P۴۵۰ منجر به احتباس استرول های غیرطبیعی، اختلال در سنتز ارگوسترول و در نهایت مرگ سلول های قارچی می گردد. از لحاظ عملکردی فونجی استاتیک می باشد، دوز درمانی آن در مقایسه با داروهای قدیمی تر در حداقل بوده، نسبت به داروی رایج کتوکونازول ۱۰۰ برابر قویتر عمل می نماید ونسبت به آنها عوارض جانبی بسیار کمتری دارد(۱، ۸، ۱۵، ۲۵).

مواد و روش کار

با مراجعه به بخش های آزمایشگاهی بیمارستان های شریعتی، رسالت و امام خمینی و مراکز دندانپزشکی خصوصی در نقاط مختلف تهران تعداد ۱۰۶ ایزوله کاندیدا از ۸ گونه مختلف از انواع عفونت های بالینی کاندیدیازیس در سال های ۱۳۸۳ -۱۳۸۴ جداسازی شد.(جدول۱)پس از خالص سازی کشت ها بر روی محیط سابورودکستروز آگار (Merck،Germany،Cat. No۵۴۳۸) گونه های کاندیدا توسط تست های میکروسکوپی و تفریقی نظیر تست جرم تیوب (تولید لوله زایا)، تولید کلامیدیواسپور، مورفولوژی

کلنـی بر روی محیط کروم آگار (Merck،Germany،Cat.No۱۰۴۵۶) و تست جذب قندها شناسایی شدند. از ایزوله‌های کنترل *C.albicans* ۱۰۲۳۱ ATCC و *C.dublintensis* CD ۳۶ به عنوان استاندارد جهت تشخیص، *C.albicans* ۶۴۶۵۸ATCC به عنوان اسـتاندارد حساس و *C.albicans* ATCC به عنوان اسـتاندارد مقاوم به فلوکونازول در هر دو استاندارد و روش دیسک دیفیوژن و رقیق‌سازی در مایع استفاده شد.

تعیین حساسیت دارویی به روش دیسک دیفیوژن مطابق با استاندارد:CLSI

طبق توصیه اسـتاندارد غلظت ایتراکونازول در دیسـکها باید به میزان ۸ میکروگرم باشد و نتایج بر این اساس تفسیر می شوند در نتیجه مطابق پروتکل ارائه شـده میزان ۱ میلی گرم از داروی ایتراکونازول (شـرکت روز دارو،شماره آنالیز ۸۳۰۴) A در ۱ میلی لیتر از حلال پلی اتیلن گلیکول اسـتریل حل شد و ۸ میکرو لیتر از این محلول بر روی کاغذهای اسـتریل دیسـک ریخته شد و در انکوباتور ۳۵ درجه سـانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد تا محلول دارویی کاملاً جذب دیسـک ها شـود. سـپس تعداد ۱×۱۰^{۵}(معادل ۰/۵ مک فارلند استاندارد) سلول در میلی لیتر از هر یک از $۱۰^{۶}$ ایزوله بالینی و استاندارد کاندیدا توسط اسپکتروفتومتر در مقایسه با استاندارد مک فارلند در طول موج ۵۶۰ نانومتر تهیه شد و بر روی محیط مولر هینتون اگار که حاوی مکمل های گلوکز و متیلن بلو بوده (Merck،Germany،Cat.No۲۵۳۸) و محیط انتخابی مخمر کاندیدا است، به صورت خطی کشت داده شد. پس از جذب سوسپانسیون دیسـک های ایتراکونازول در مرکز هر یک از پلیت ها قرار داده شـد و پلیت ها بمدت۲۴ سـاعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد نگهداری شده و در نهایت قطر نواحی مهار رشد اطراف دیسک ها پس از ۲۴ ساعت اندازه گیری شد(۱۲، ۱۴).

استاندارد توصیه شده CLSI جهت تفسیر نتایج
روش دیسک دیفیوژن در برابر داروی ایتراکونازول

ایزوله هایی که قطر ناحیه مهار رشد آنها در برابر دیسک ۸ میکروگرمی ایتراکونازول معادل یا کمتر از۸ میلیمتر باشـد، در گروه ایزوله های مقاوم و اگر این قطربین ۱۵-۹ میلیمتر باشـد،درگروه ایزوله هایی که حساسیت آنها وابسـته به دوز می باشـد بوده و اگر این قطر بیشتر از ۱۶ میلیمتر باشد، در گروه ایزوله های حساس طبقه بندی می شوند(۱۴).

تعیین حساسیت دارویی به روش رقیق سازی در مایع مطابق با استاندارد CLSI

طبق توصیه استاندارد CLSI داروی ایتراکونازول باید در رقت‌های ۰/۰۶ الی ۶۴ میکرو گرم در میلی‌لیتر در محیط کشـت (Gibco،Island،Cat. No۳۰۸۷۰۷۰۳) RPMI تهیه شـود(۱۴). طبق الگوی اسـتاندارد، جهت رسـیدن به رقت دارویی مـورد نظر سوسپانسـیونی از ایزوله‌های بالینی و اسـتاندارد کاندیدا توسط اسـپکتروفتومتر مدل (Ulterospec،۲۱۰۸۲۵ biotech) معـادل ۵ مک فارلند اسـتاندارد در محیط RPMI تهیه شـد و در هـر ۱۰۰ میکرولیتـر از آن تعداد ۱×۱۰^{۵}-۰/۵ سـلول مخمری زنده و فعال وجود داشـت. رقت‌های دارویی در محدوده ۲۵۶ -۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتـر به‌صـورت رقت‌هـای دو برابـر با حجمی معـادل معادل ۵۰ میلی لیتر در حلال پلی اتیلن گلیکول تهیه شـد و به همراه ۵۰ میکرو لیتر محیط کشت RPMI با pH معادل ۷ که حاوی مکمل‌های ال - گلوتأمین و آسپاراژین و بافر مورفولین پروپان سولفونیک اسید بوده، به داخل هر چاهک از پلیت های ۹۶ خانه ای به صورت اسـتریل افزوده شد. متعاقب آن به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمری افزوده شد.از آنجاییکه حجم نهایی هر چاهک برابر با ۲۰۰ میکرولیتر شد، غلظت‌های نهایی دارو به میزان استاندارد رسید و بالاترین غلظت حلال بدون حضور دارو بعنوان گروه شـاهد در نظر گرفته شد.در نهایت میکرو پلیت‌ها در شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ در دقیقه با دمای ۳۵ درجه سـانتیگراد به مدت ۴۸ سـاعت نگهداری شدند. سپس از هر رقت بر روی پلیت‌های حاوی محیط عصاره مغزوقلب و آگار (Merck،Germany Cat.No۱۳۸۲)کشـت داده و ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه نگهداری شده و پس از آن میزان Minimal inhibitory concentration) MIC) یاحداقـل غلظـت مهارکنندگـی رشـد و Minimal fungicidal concentration) MFC) یـا حداقل غلظت کشـندگی تعیین گردیـد. تعیین میزانMIC بر اسـاس شـمارش تعداد کلنی‌های رشـد کـرده و مقایسـه با تعداد اولیه سـلول‌های تلقیح شـده وکلنی‌های رشـد کـرده درگروه کنترل می باشـد. ۵۰ MIC و۹۰ MIC حداقـل غلظت‌هایی از دارو می‌باشـند که به ترتیب رشـد ۵۰ درصد و۹۰ درصداز کلنی‌ها را نسـبت به گروه کنترل مهار می‌کند. MFC نیز حداقل غلظتی از دارو است که درپلیت آن هیچ رشدی مشاهده نمی‌شود(۲۳).

استاندارد توصیه شده CLSI جهت تفسیر نتایج روش رقیق‌سازی در مایع

ایزوله‌هایـی که در غلظت های معادل یاکمتـر از۰/۱۲۵، بین ۰/۲۵ الی ۰/۵ و معادل یا بیشتر از ۱ میکروگرم در میلی لیتراز ایتراکونازول مهار شوند، به ترتیب درگروه ایزوله های حساس، دارای حساسیت وابسته به دوز و مقاوم به دارو قرار دارند(۱، ۱۰).

نتایج

در تحقیـق حاضـر ۱۰۶ ایزولـه کاندیـدا از ۸ گونـه مختلـف از انـواع عفونت های بالینی کاندیدیازیس جداسازی گردید که در جدول شماره ۱ تعداد ایزوله ها و درصد فراوانی آنها بر حسب نوع و محل در گیری عفونت عنوان گردیده اسـت. در این مطالعه اثرات ضد قارچی داروی ایتراکونازول بر روی هر ایزوله کاندیدا به طور جداگانه بررسی شد و میزان حساسیت و مقاومت آنها تعیین گردید. مطابق روش توصیه شـده CLSI، نتایج حاصل از روش رقیق سـازی در مایع(تست مرجع) به عنوان اسـتاندارد در نظر گرفته شد و نتایج به دسـت آمده طبق روش دیسـک دیفیوژن نسـبت به آن مقایسه گردید. طبق روش دیسک دیفیوژن پس از ۴۸ ساعت با توجه به قطر ناحیه مهار رشـد، میزان حساسـیت به دارو بر حسب نوع ایزوله و محل در گیری متفـاوت بوده و تعداد گونه های حسـاس، مقاوم و وابسـته به دوز تفکیک شـده اسـت.(جدول ۲و۳) تاثیر غلظت هـای مختلـف داروی ایتراکونازل طبـق روش رقیق سـازی در مایع و محاسـبه میانگین میـزان MIC ۹۰، MIC ۵۰ و MFC هـر ایزولـه وابسـته به غلظت، در کلیـه غلظت های به کار گرفته شـده قادر به مهار رشـد اکثر ایزوله های کاندیدا می باشـد. (جـدول ۲) با توجه بـه نتایج هر دو روش، اختلاف گروه حسـاس به دارو بـا دوگـروه دیگر از نظر آماری در سـطح کمتـر از ۰/۰۵ معنـی دار بود. ($p<۰/۰۵$)(نمودار ۱)، که این نتایج نشانگر تاثیر مناسب دارو می باشد. هم چنین هدف دیگر از این تحقیق بررسی تشابه روش دیسک دیفیوژن با تست مرجع بود که بین نتایج دو روش ۸۹/۱٪ توافق کلی دیده شد. بدین صورت

که ابتدا میانگین درصد تشابه در سه گروه حساس،حساس وابسته به دوز و مقاوم با در نظر گرفتن نتایج تست مرجع بعنوان استاندارد محاسبه شد وپس از آن میانگین کل آنها بعنوان در صد تشابه نهایی در نظر گرفته شد. در هر دو روش تحت آزمایش، ایزوله های استاندارد *C.albicans* ATCC ۶۴۵۵۰ نسبت به ایتراکونازول مقاوم و *C.albicans* ۶۴۶۵۸ ATCC *C.albicans* ۱۰۲۳۱ ATCC و *C.albicans* ۳۶ ATCC حساس بودند.

آنالیز آماری

نتایج به دست آمده بر حسب مورد با استفاده از تست t و واریانس یک طرفه، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار گزارش گردید.

بحث

بر اساس نتایج حاصله از این تحقیق، شایع ترین عامل ایجادکننده کاندیدیازیس *C.albicans* با فراوانی ۶۰/۳۷٪ بوده و واژینیت به عنوان شایع ترین فرم کاندیدیازیس در ایران مشاهده گردید(جدول ۱). که این امر با نتایج سایر محققین همخوانی دارد(۱۴، ۱۵، ۱۶). اما طی یک بررسی که در کشور هند بر روی ۱۰۲ ایزوله کاندیدای جداسازی شده از عفونت های بیمارستانی، انجام شده است شایع ترین گونه *C.tropicalis* با فراوانی ۴۸٪ بوده که حساسیت چندانی به داروهای آزولی نداشته است. در این مطالعه، *C.albicans* با فراوانی ۲۲/۵٪ گزارش شده است(۴). شیوع ایزوله های غیرآلبیکنسی (جدول ۱) با فراوانی ۳۹/۶۳٪ و جداسازی گونه جدید *C.dublintensis* با فراوانی ۵/۶٪ در مطالعه حاضر و همچنین وجود مقاومت و یا حساسیت وابسته به دوز برخی از آنها در برابر ایتراکونازول نشان دهنده گسترش عوامل مساعدکننده بیماری می باشد که این امر به لزوم تست حساسیت سنجی را توسط روش های استاندارد جهت ریشه کنی عوامل قارچی و درمان قطعی را آشکار ساخته است. در تحقیق حاضر مشابه با نتایج حاصله از تحقیقات در کشورهای اروپایی و آمریکا شایع ترین گونه بعد از C.albicans، C.glabrata می باشد (۱۱، ۲۱، ۲۲). اما در اما تحقیق بر روی ایزوله های بومی در برزیل و تایوان نشان دهنده شیوع *C.tropicalis* و *C.gilermondi* بعد از گونه آلبیکنس بوده که از حساسیت بالایی نسبت به داروهای آزولی برخوردار بوده اند. در این مطالعات شیوع *C.glaberata* و *C.krusei* مجموعاً ۹٪ بوده است(۲۱، ۲۳). در کشور هند نیز فراوانی این دو گونه برابر با ۰/۸۸٪ گزارش شده است(۴). در این مطالعه، بر اساس نتایج تست مرجع ۱/۵۶٪ از ایزوله های *C.albicans* با مقاومت و ۳/۱۲٪ با حساسیت بینابینی نسبت

جدول ۱: تعداد ودرصد فراوانی ایزوله های کاندیدا در نمونه های بالینی به دست آمده از بیماران بر حسب محل درگیری عفونت

	ایزوله کاندیدا (درصد فراوانی بر حسب تعداد و محل جدا سازی٪)	واژن	ادرار	ناخن	دهان و دندان	زخم پوستی
۱	(۶۴) C.albicans (٪۶۰/۳۷)	۲۶ (٪۴۰/۶۲)	۱۰ (٪۱۵/۶۲)	۸ (٪۱۲/۵)	۱۹ (٪۲۹/۶۸)	۱ (٪۱/۵۶)
۲	(۱۸) C.glaberata (٪۱۶/۹۸)	۶ (٪۳۳/۳)	۱ (٪۵/۵۵)	۵ (٪۲۷/۷)	۵ (٪۲۷/۷)	۱ (٪۵/۵۵)
۳	(۶) C.krusei (٪۶۶/۵)	۳ (٪۵۰)	۲ (٪۳۳/۳)	-	۱ (٪۱۶/۶)	-
۴	(۶) C.dublintensis (٪۶۶/۵)	-	-	-	۶ (٪۱۰۰)	-
۵	(۵) C.tropicalis (٪۷۱/۴)	۱ (٪۲۰)	۲ (٪۴۰)	-	۲ (٪۴۰)	-
۶	(۴) C.parapsilosis (٪۷۷/۳)	۱ (٪۲۵)	-	-	۳ (٪۷۵)	-
۷	(۲) C.kefyr (٪۸۸/۱)	۱ (٪۵۰)	۱ (٪۵۰)	-	-	-
۸	(۱) C.lussitani (٪۹۴/۰)	-	۱ (٪۱۰۰)	-	-	-
	مجموع (درصد فراوانی بر حسب محل درگیری)	۳۸ (٪۳۵/۸۴)	۱۷ (٪۱۶/۰۳)	۱۳ (٪۱۲/۲۶)	۳۶ (٪۳۳/۹۵)	۲ (٪۱/۸۸)

بـه دارو بوده اند کـه ایزوله مقاوم بـه دارو نیز از حفـره دهانی یک بیمار مبتلا به ایدز در بیمارسـتان امام خمینی جدا سازی شده بود. یک مطالعه که بر روی ایزوله های بومی اسـلواکی نشـان داد که ۱۸/۵٪ از ایزوله های *C.albicans* به ایتراکونازول مقاومت دارند(۲۰). نتایج مشـابه نیز توسط محققیـن بر روی ایزوله های بومی هند وجـود دارد که از بین ۱۰۲ ایزوله *C.albicans* تحـت بررسـی، ۴/۳٪ دارای مقاومت بـه ایتراکونازول بوده انـد که این تعـداد نیز از عفونت های کاندیدیازیـس در افراد مبتلا به ایدز جداسـازی شـده بودند. در این مطالعه ۳/۹٪ از ایزوله های *C.tropicalis* نیز نسبت به ایتراکونازول مقاومت داشتند(۴). در این تحقیق *C.krusei* با ۵۰٪ مقاومت و ۵۰٪ حساسیت بینابینی، *C.glaberata* با ۱۱/۱٪ مقاومت و ۱۱/۱٪ حساسـیت بینابینی و *C.tropicalis* با ۲۵٪ حساسیت بینابینی گونه هایی هسـتندکه به ایتراکونازول حساسـیت چندانی نداشته و هنگام درمان، ضمن تشخیص صحیح آنها باید در انتخاب داروی مناسب دقت لازم را مبذول داشـت. امـا *C.kefyr. C.dublintensis. C.parapsilosis* و *C.lussitani* دارای حساسـیت ۱۰۰٪ بـه ایتراکونـازول مـی باشـند (جداول ۲و۳) و این نتایج با مطالعات بسـیاری از محققین در یک سـطح می باشـد(۱۷، ۲۰، ۲۴). اما گزارشاتی مبنی بر تبدیل ایزوله های حساس به مقاوم نسـبت بـه این دارو وجود دارد. چنانکه در کشـور سـوئد ۳٪ از ایزولـه‌هـای *C.paropsilosis* دارای مقاومـت بـه ایتراکونـازول بوده اند(۷). اصطلاح مقاومت گاهی در زمانی استفاده می‌شود که یک بیمار در درمان با یک داروی ضد قارچی دچار شکسـت می‌شود اما بهتر است به صورتی عنوان شـود که براسـاس میزان MIC تعریف شود و آن عبارتست از هنگامیکـه میـزان MIC آن در صورت تعیین، نسـبت به میزان MIC متعارف آن بیشـتر باشـد. مقاومت نیز به دو صورت اولیـه یا ذاتی و ثانویه یا اکتسـابی می باشـد. در مقاومت ذاتی بدون اسـتفاده از هیچگونه دارو و سابقه مصرف آن مقاومت وجود دارد مانند مقاومت ذاتی برخی از گونه‌های کاندیدا به فلوسـیتوزین و *C.krusei* نسـبت به فلوکونـازول، اما مقاومت ثانویه در ایزوله‌هایی می‌باشـد که سابقه حساسـیت به دارو را داشته‌اند اما بـه علل مختلفی دچار مقاومت شـده‌اند. در رابطه بـا مقاومت فاکتورهای مختلفـی چون عوامل مربوط به خود قارچ ماننـد مورفولوژی قارچ، MIC اولیه آن نسـبت به دارو، تغییر فنوتایپی، سرو تایپ قارچ، پایداری ژنومیکی و میزان تزاید و ایجاد عفونت قارچ در مقاومت های ثانویه دخیل می باشد. در رابطه با گونه آلبیکنس مقاومت به ندرت اتفاق می افتد و معمولاً دارای حساسـیت بالایی نسبت به ایتراکونازول می باشد(۲۰). در مجموع، با توجه به درصد فراوانی ایزوله های حسـاس به دارو در مقایسـه با دو گروه دیگر (نمودار ۱) ایتراکونازول اثر بسیار مناسبی در شرایط آزمایشگاهی، در برابر اکثر

جدول ۲: مقایسه نتایج حاصله از تاثیر ایتراکونازول بر ایزوله های مختلف کاندیدا و دسته بندی بر اساس حساسیت، حساسیت وابسته به دوز و مقاومت با استفاده از تست های دیسک دیفیوژن و رقیق سازی در مایع

	تعداد ایزوله های کاندیدا	میانگین درصد تشابه دو روش برای هر ایزوله	روش رقیق سازی در مایع (برحسب میکروگرم در میلی لیتر)			روش دیسک دیفیوژن (بر حسب میلی متر)		
			تعداد ایزوله حساس	تعداد ایزوله وابسته به دوز	تعداد ایزوله مقاوم	تعداد ایزوله حساس	تعداد ایزوله وابسته به دوز	تعداد ایزوله مقاوم
			≥MIC ۰/۱۲۵ lm/µg	MIC ۰/۵ : ۰/۲۵- lm/µg	≤MIC۱ lm/µg	قطر ناحیه مهار شده ۶۱ mm ≤	قطر ناحیه مهارشده ۹-۱۵ mm بین	قطر ناحیه مهارشده ≥۸mm
۱	(۶۴) *C.albicans*	۷۸/۳۶	۶۱	۲	۱	۵۸	۵	۱
۲	(۱۸) *C.glaberata*	٪۵۹/۵	۱۴	۲	۲	۱۶	۱	۱
۳	(۶) *C.krusei*	٪۷۵	-	۳	۳	-	۴	۲
۴	(۶) *C. dublintensis*	٪۱۰۰	۶	-	-	۶	-	-
۵	(۵) *C.tropicalis*	٪۱۰۰	۴	۱	-	۴	۱	-
۶	(۴) *C.parapsilosis*	٪۱۰۰	۴	-	-	۴	-	-
۷	(۲) *C.kefyr*	٪۱۰۰	۲	-	-	۲	-	-
۸	(۱) *C.lussitani*	٪۱۰۰	۱	-	-	۱	-	-
	درصد تشابه کلی	٪۸۹/۱						
	مجموع ایزوله ها		۹۲	۸	۶	۹۱	۱۱	۴
	درصد فراوانی نسبت به کل ایزوله ها		٪۸۶/۷۹	٪۷/۵۴	٪۵/۶۶	٪۸۵/۸۵	٪۱۰/۳۷	٪۳/۷۷

MIC: حداقل غلظت مهار کنندگی دارو

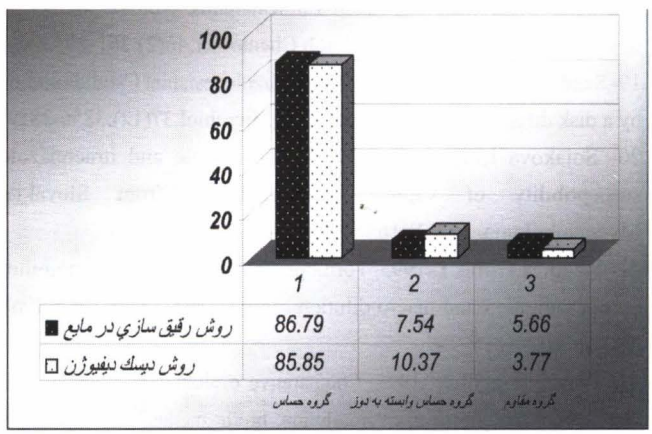
جدول ۳: نتایج حاصل از تعیین میزان حساسیت هر یک از ایزوله های کاندیدا نسبت به داروی ایتراکونازول در تست های دیسک دیفیوژن (میانگین قطر ناحیه مهار رشد) و رقیق سازی در مایع (براساس میانگین MIC)

	تعداد ایزوله های کاندیدا	میانگین نتایج تست رقیق سازی در مایع			میانگین نتایج تست دیسک دیفیوژن بر حسب میلیمتر
		محدوده MIC	میانگین MIC ۵۰	میانگین MIC ۹۰	میانگین MFC	
۱	*C.albicans* (۶۴)	۰/۰۶-۴	۰/۰۶	۰/۵	۱۶	۲۱
۲	*C.glaberata* (۱۸)	۰/۰۶-۱۶	۰/۵	۱	۳۲	۱۵
۳	*C.krusei* (۶)	۰/۰۶-۶۴	۲	۴	۶۴	۱۰
۴	*C.dablintensis* (۶)	۰/۰۶-۰/۱۲۵	>۰/۰۶	۰/۰۶	۰/۲۵	۲۷
۵	*C.tropicalis* (۵)	۰/۰۶-۱	۰/۱۲۵	۰/۵	۱۶	۱۸
۶	*C.parapsilosis* (۴)	۰/۰۶-۱	۰/۰۶	۰/۱۲۵	۱	۲۵
۷	*C.kefyr* (۲)	۰/۰۶-۱	۰/۰۶	۰/۱۲۵	۰/۵	۳۰
۸	*C.lussitani* (۱)	۰/۰۶-۱	۰/۰۶	۰/۱۲۵	۱	۲۲

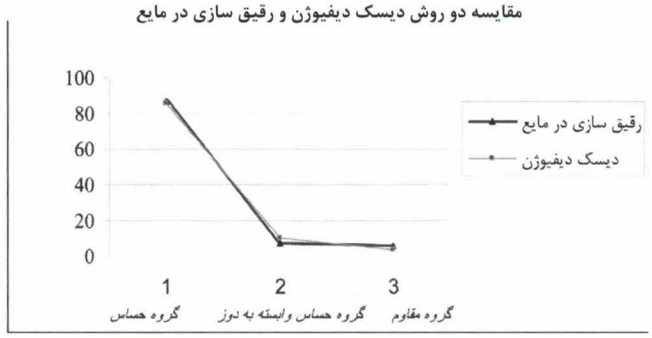
MIC ۵۰: حداقل غلظتی از دارو که رشد ۵۰٪ از ایزوله ها را مهار می کند.

MIC ۹۰: حداقل غلظتی از دارو که رشد ۹۰٪ از ایزوله ها را مهار می کند.

MFC: حداقل غلظتی از دارو است که درپلیت آن هیچ رشدی مشاهده نمی‌شود.



نمودار ۱- درصد فراوانی حساسیت مجموعه ایزوله های کاندیدا نسبت به اینراکونازول با مقایسه دو روش دیسک دیفیوژن و رقیق سازی در مایع



نمودار ۲- میزان تشابه کلی بین دو روش

ایزوله های پاتوژن کاندیدا دارد و اختلاف گروه حساس به دارو با دو گروه دیگر از لحاظ آماری معنی دار می باشد. بنابراین می توان از این دارو در درمان کاندیدیازیس، خصوصاً عفونت های واژینال که شیوع فراوانی درایران داشته و به درمان با داروهای آزولی قدیمی پاسخ مناسبی نمی دهد، سود جست. نتایج یک تحقیق حساسیت سنجی در آمریکا با پنج داروی رایج ضد قارچ چون فلوکونازول فلوسیتوزین،کتوکونازول، ایتراکونازول و آمفوتریسین ب، بر روی ۵۶ ایزوله بومی کاندیدا نشانگر فعالیت مناسب ایتراکونازول با مصرف دوز حداقل وحساسیت بالاتر بوده و به عنوان داروی برتر انتخاب گردیده است(۲۳). وجود ۵/۶۶٪ مقاومت و ۷/۵۴٪ حساسیت بینابینی در ایزوله های تحت بررسی که بیشتر مربوط به *C.glaberata* و *C.krusei* می باشد، بیان کننده اهمیت این دو ایزوله در ایجاد عفونت های مزمن و مقاوم در ایران می باشد. همچنین با نگاهی دیگر به تحقیق حاضر، با توجه به ۸۹/۱٪ توافق در مقایسه نتایج دو روش دیسک دیفیوژن و تست مرجع رقیق سازی در مایع موید تشابه و ارزش تقریباً برابر(نمودار ۲) دوروش بوده و از آنجائی که تعیین حساسیت دارویی با روش رقیق سازی در مایع یا تست مرجع (Gold standard) برای تعداد بالای نمونه های ارسالی به آزمایشگاه های تشخیص طبی کار وقت گیر، دشوار و مستلزم صرف هزینه بیشتری است، لذا باتوجه به این نکته می توان از تست ساده تر دیسک دیفیوژن در تعیین حساسیت دارویی تعداد زیادی از ایزوله های کاندیدا به عنوان تست غربالگری در آزمایشگاه ها بهره برد. هم چنین در تحقیقات مشابه نیز در برزیل بر روی ۵۹ و در آمریکا بر روی ۳۴۹ ایزوله کاندیدا، به ترتیب ۹۰/۴٪ و۹۵/۴٪ توافق را بین نتایج دو روش نامبرده مطرح نموده است(۵، ۷، ۱۷). به طور خلاصه به دلیل شیوع گونه های غیر آلبیکنسی، وجود مقاومت های ذاتی و اکتسابی با توجه به افزایش زمینه های مساعدکننده بیماری و وجود الگوهای حساسیتی قابل تعیین در ایزوله های کاندیدایی لزوم استفاده از روش های ساده،کم هزینه و قابل اطمینان تعیین حساسیت دارویی جهت انتخاب داروی مناسب جهت درمان و استفاده معقولانه از دارو با دوز مناسب، یافتن ترکیبات دارویی

جدیدتر با خواص مهارکنندگی بیشتر رشد عوامل قارچی، تشخیص دقیق عامل اتیولوژیک بیماری، انجام مطالعات بیشتر و به روز برای تعیین وجود مقاومت های اولیه و ثانویه نسبت به داروها در تحقیقات آتی پیشنهاد می گردد.

پاورقی

1- Clinical & laboratory standard institute

منابع مورد استفاده

1- A Espinel-Ingorff,F Barchiesi,2005.International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of Candida spp. to fluconazole ,Itraconazole,Posaconazole and Voriconazole. J Clin Microbiol 43(8):3884-3889

2- Ajello l, 1998 ,Medical mycology ,In; Topley and Wilson's. Microbiology and microbial infection, oxford university press.USA.

3- Ahmad S,Khan Z,2002. Semi nested PCR for diagnosis of Candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. J Clin Microbiol, 46(3):2484-2489

4- Capoor M,Nair D ,2005.Emergence of Non-albicans Candida species and antifungal resistance in a tertiary care hospital.Jpn J Infect Dis,58:344-348.

5- Carol A, Kauffman & Lidija T ,1999.Colorimetric method for susceptibility testing of voriconazole and other azoles against Candida sp.Mycoses,42(9-10):53.

6- Eldere.J,Joosten.L ,1996.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,34(4):842-847.

7- Erja Ch, 2001.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, 39(11): 4181-4183.

8- Ghannoum M,Rice L ,1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of Resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance.Clin Microbial Rewiews, 12(4):501-517.

9- Lozano M, Nelson W, 1999. Disk diffusion method for determining susceptibilies of Candida spp. to MK-0991. J Clin microbial,37(5):1625-1627.

10- Madona J,Luis O ,2003. Correlation between E test, disk diffusion and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole.Antimicrob agents Chemother , 47(5):1647-1651

11- Morac G, Amato G, 2000. 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, 40(7):2953-2958.

12- Nelson Sh, M Cartwritht P, 2002.Detecion of fluconazol resistance isolates of Candida strains by a disk diffusion screening test. J Clin Microbiol, 41(3):2141-2143

13- Osman O ,2000.Identification of different Candida species isolated in varioushospitals inAnkara by fungichrom test kit and their differentiation by SDS-PAGETurk med sci. J Clin Microbiol, 30(6):355-358.

14- Pfaller A, Messer A, 2004. Evaluation of the NCCLS M44-P disk diffusion method for determining susceptibilities of 276 clinical isolates of C neoformans to fluconazole.J Clin Microbiol.,42(1):380-383.

15- Pfizer.Antifungal drug resistance: a focus on Candida.Clin Updates in Fungal Infec 1997, 1(3):1-5.

16- Robert S, Robert P ,2001.Novel fluorescent broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of Candida albicans.J Clin Microbial, 39(7): 2708–2712.

17- Rosario M, Marcio R ,2002.Evalution of etest and macrodilution broth method for antifungal susceptibility testing of Candida sp strains isolated from oral cavities of AIDS patients.Rev Inst Med Trop,44(3):121-125.

18- Ruhnke E, Westhaven A, 2000. Development of simultaneous resistance to fluconazole in Candida albicans and Candida Dubliniensis in a patient with AIDS.J Antimicrob Chemother,46(2):261-295.

19- Sandven P ,1999.Detection of fluconazole resistant Candida strains by a disk diffusion screening test.J Clin Microbiol,37(12):3856-3859.

20- Sojakova I,Liptajova D ,2004.Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. Mycopathologia, 157(2):163-169.

21- Tiballi N,Larins T ,1995. Torulopsis glabrata: azole susceptibilies by microdilution and macro dilution broth assays. J Clin Microbiol, 33(10):2613-1615

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

23- Virchow K 1996.Comparative evalution of three antifungal susceptibility test methods for Candida albicans isolates and correlation with response to fluconazole therapy. J Clin Microbiol, 34(12):3208-3211

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

25- White T, Marr A. Clinical, cellular and molecular factor that contribute to antifungal testing resistant. Clin Microbiol review 1998, 11(2):312-402