DOI: 10.22122/jims.v38i577.12946 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هشتم/شماره‌ی ۵۷۷/هفته‌ی اول مرداد ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۱۶ تاریخ چاپ: ۱۳۹۹/۵/۷

ارزیابی حساسیت دارویی گونه‌های Aspergillus جدا شده از بیماران مبتلا به Onychomycosis نسبت به داروهای ایتراکونازول، وریکونازول و آمفوتریسین

فرزانه اکبری[۱]، علی ناصری[۲]، عبدالمجید فتی،[۳] محمد جواد نجف‌زاده[۲]، لیدا جراحی[۴]، محمود پریان[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: امروزه، شیوع Onychomycosis ناشی از قارچ‌های رشته‌ای غیر درماتوفیتی در حال افزایش است. از آن جایی که Aspergillus شایع‌ترین عامل ایجاد کننده‌ی این بیماری می‌باشد، مطالعه‌ی حاضر به منظور ارزیابی حساسیت دارویی سویه‌های بالینی Aspergillus عامل Onychomycosis نسبت به داروهای ایتراکونازول، وریکونازول و آمفوتریسین B انجام شد.

روش‌ها: این مطالعه‌ی مقطعی بر روی ۵۰ سویه‌ی Aspergillus جدا شده از بیماران مبتلا به Onychomycosis مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیصی بیمارستان‌های دانشگاهی مشهد انجام شد. بر اساس بررسی فنوتیپی و مولکولی کلنی‌های Aspergillus، بیشترین فراوانی با ۳۴ مورد مربوط به Aspergillus flavus بود. آزمایش حساسیت دارویی طبق شیوه‌نامه‌ی Clinical and Laboratory Standards Institute-M38-A2 (CLSI-M38-A2) انجام گرفت و میزان Minimum inhibitory concentration (MIC) داروها تعیین گردید.

یافته‌ها: از ۵۰ نمونه‌ی ناخن، ۱۳ مورد مربوط به مردها و ۳۷ مورد مربوط به زن‌ها بود. از این تعداد، ۱۵ مورد مربوط به ناخن‌های دست و ۳۳ مورد مربوط به ناخن‌های پا و ۲ مورد به طور مشترک مربوط به ناخن‌های دست و پا بود. ۱۴/۷ درصد ایزوله‌های Aspergillus flavus با داشتن MIC > ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر نسبت به آمفوتریسین B به عنوان ایزوله‌های بالینی مقاوم تلقی شدند و حساسیت نسبت به ایتراکونازول و وریکونازول ۱۰۰ درصد بود. ۹۰ MIC داروهای آمفوتریسین B، ایتراکونازول و وریکونازول به روش Broth microdilution برای گونه‌ی Aspergillus flavus به ترتیب ۴، ۰/۲۵ و ۱ میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آمد. اختلاف معنی‌داری در MIC دو داروی ایتراکونازول و آمفوتریسین B دیده شد (P < ۰/۰۵۰).

نتیجه‌گیری: تمامی گونه‌های Aspergillus نسبت به داروهای ایتراکونازول و وریکونازول حساس می‌باشند و این دو دارو، مؤثرتر از آمفوتریسین B بر روی گونه‌های Aspergillus می‌باشند. با توجه به حساسیت متفاوت این گونه‌ها نسبت به عوامل ضد قارچی، انجام آزمایش حساسیت دارویی به منظور انتخاب داروی مناسب ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: Onychomycosis؛ Aspergillus؛ ایتراکونازول؛ آمفوتریسین B؛ وریکونازول

ارجاع: اکبری فرزانه، ناصری علی، فتی عبدالمجید، نجف‌زاده محمد جواد، جراحی لیدا، پریان محمود. **ارزیابی حساسیت دارویی گونه‌های Aspergillus جدا شده از بیماران مبتلا به Onychomycosis نسبت به داروهای ایتراکونازول، وریکونازول و آمفوتریسین.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۵۷۷): ۳۷۵-۳۶۷.

مقدمه

Onychomycosis، عفونت قارچی ناخن است که توسط سه گروه از قارچ‌ها (درماتوفیت‌ها، مخمرها و ساپروفیت‌ها) ایجاد می‌شود (۱). در حال حاضر، شناسایی عوامل کپکی به عنوان پاتوژن مسبب عفونت‌های ناخن افزایش یافته است (۲). عوامل ساپروفیتی بیشتر به ناخن‌های بزرگ پا و به افراد مسن (بالای ۶۰ سال) حمله می‌کنند.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳- استاد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴- دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۵- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: علی ناصری؛ دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
Email: naseria@mums.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

فراوانی این عارضه در سنین پیری به کاهش قابلیت سیستم ایمنی سلولی، ضعف در گردش خون عروق سطحی، افزایش انسیدانس دیابت شیرین و تغییرات ناخنی نسبت داده شده است (۳).

میزان شیوع Onychomycosis و عوامل مسبب آن در نواحی مختلف جغرافیایی متغیر است و با عواملی نظیر سن، عوامل زمینه‌ای، شغل، آب و هوا، محیط زندگی و مسافرت‌های زیاد ارتباط دارد (۴). در صورت تداوم این بیماری و عدم درمان بیماری، موجب بد شکلی و از بین رفتن کامل ناخن می‌شود و زندگی فردی و اجتماعی بیماران بسیار تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۵).

گونه‌های مختلف Aspergillus نه تنها از جنبه‌ی عفونت‌زایی بلکه از لحاظ مقاومت دارویی نیز حایز اهمیت هستند. با توجه به توسعه‌ی داروهای ضد قارچی در دهه‌های اخیر هنوز طیف درمان‌های مؤثر، محدود می‌باشد و سمیت و مسایل فارماکوکنتیک مرتبط با آن‌ها مشکل‌ساز است. گونه‌های متعددی از قارچ‌ها که در گذشته به داروهای ضد قارچی حساسیت نشان داده‌اند، امروزه در شرایط آزمایشگاهی و بالینی به عوامل ضد قارچی مقاومت نشان می‌دهند (۶).

شیوه‌نامه‌های درمانی برای Onychomycosis ناشی از قارچ‌های رشته‌ای غیر درماتوفیتی تاکنون محدود مانده است. با این وجود، Onychomycosis ایجاد شده توسط گونه‌های Aspergillus با استناد به عملکرد بهتر ایتراکونازول نسبت به تربینافین در In vitro، به داروهای ضد قارچی سیستمیک به خوبی پاسخ می‌دهد (۷).

به تازگی، برای تفسیر نتایج به دست آمده از روش‌های حساسیت انجام شده بر روی گونه‌های مختلف قارچی و تعیین گونه‌های وحشی مقاوم، از اندازه‌ی Cut off اپیدمیولوژیکی (Epidemiological cutoff value) تعیین شده برای چندین گونه‌ی قارچی، استفاده می‌شود.

External cephalic version (ECV) برای گونه‌های Aspergillus به خصوص Aspergillus flavus در بعضی نقاط جهان مشخص شده است، اما این مقدار در ایران تعیین نشده و نیاز است تا مطالعات بیشتری در این زمینه انجام شود. همچنین، با توجه به افزایش افراد در معرض خطر و شیوع عفونت‌های فرصت‌طلبی همچون Aspergillus و کاهش حساسیت و مقاومت دارویی گونه‌های Aspergillus، لازم است مطالعاتی بر روی تعداد بیشتری از نمونه‌ها در جوامع مختلف، انجام گردد. علاوه بر این، دست‌یابی به درمان‌های مؤثرتر، مطالعاتی با تعداد داروی بیشتر و با بررسی اثرات سینرژیسمی درمان‌های ترکیبی و داروهای نوظهور را می‌طلبد (۸).

با تعیین دقیق عوامل Aspergillus دخیل در Onychomycosis و همچنین، بررسی حساسیت آن‌ها نسبت به داروهای ضد قارچی، می‌توان با پیشنهاد داروهای مؤثر برعلیه گونه‌های Aspergillus به ویژه گونه‌های مقاوم به دارو، از انجام درمان‌های نابه جا و اتلاف منابع جلوگیری نمود.

مروری بر مطالعات انجام یافته در ایران، نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف Aspergillus و شایع‌ترین گونه‌ی آن یعنی Aspergillus flavus، از نمونه‌های مختلف بالینی جدا و گزارش گردیده‌اند. احمدی و همکاران در بررسی خود، عامل ۲۸/۳۷ درصد از موارد ابتلا به Onychomycosis را کپک‌های غیر درماتوفیتی دانسته‌اند (۹) و در مطالعه‌ی دیگر، هاشمی و همکاران کپک‌های غیر درماتوفیتی را عامل ۱۹ درصد از موارد بیماری گزارش کردند (۱۰). در هر دو مطالعه، شایع‌ترین عامل اتیولوژیک، Aspergillus flavus اعلام شد (۱۰-۹).

در مطالعه‌ی دیگری که هاشمی و همکاران بر روی ۵۰ ایزوله‌ی بالینی Aspergillus انجام دادند، ۳ مورد از ایزوله‌های Aspergillus flavus، حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration یا MIC) بالای ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر برای آمفوتریسین B داشتند (۱۱). در مطالعه‌ی Tupaki-Sreepurna و همکاران بر روی ۴۴ ایزوله‌ی بالینی عامل Onychomycosis غیر درماتوفیتی، ۲۰ ایزوله‌ی Aspergillus دارای محدوده‌ی ۱-۰/۰۰۷ میکروگرم/میلی‌لیتر برای ایتراکونازول بودند (۱۲). از آن جایی که مقاومت دارویی در Aspergillusها رو به افزایش است، انجام آزمایش حساسیت دارویی بر روی ایزوله‌ها برای بهبود سریع‌تر ضرورت دارد. به دلیل پیدایش مقاومت به عوامل ضد قارچی، تعیین طرح راهبردی برای درمان بیماری‌های قارچی یک موضوع مهم قابل پی‌گیری در قارچ‌شناسی بالینی است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های دارای طیف گسترده و خود درمانی با داروهای ضد قارچی، می‌تواند دلیل اصلی افزایش مقاومت دارویی در بیماران مبتلا به بیماری‌های قارچی باشد (۱۴-۱۳).

با توجه به اهمیت مقاومت دارویی نسبت به داروهای ضد قارچی، مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی حساسیت دارویی سویه‌های بالینی Onychomycosis ناشی از Aspergillus نسبت به داروهای ایتراکونازول، وریکونازول و آمفوتریسین B انجام شد.

روش‌ها

این مطالعه به شکل مقطعی با هدف بررسی حساسیت دارویی سویه‌های بالینی Aspergillus در بیماران مبتلا به Onychomycosis مراجعه کننده به درمانگاه ویژه و آزمایشگاه مرکزی بیمارستان‌های امام رضا (ع) و قائم (عج) در سال‌های ۹۷-۱۳۹۶ انجام شد.

بیمارانی که با توجه به معیارهای بالینی شامل بدشکلی ناخن، تغییر رنگ ناخن، هیپرکراتوزیس زیر ناخنی و اونیکولیز مشکوک به ابتلا به Onychomycosis بودند، وارد مطالعه شدند. بیماران دارای نمونه‌های ناخن منفی از نظر Aspergillus، نمونه‌های آلوده و بیمارانی که در ۴ هفته‌ی اخیر داروی ضد قارچی موضعی و یا سیستمیک مصرف نموده بودند، از مطالعه خارج شدند.

بعد از جمع‌آوری و آماده‌سازی، نمونه‌ها با انجام آزمایش مستقیم با تهیه‌ی اسمیر، از نظر وجود میسیلیوم مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند.

جهت کشت اولیه‌ی نمونه‌ها، از محیط کشت Sabouraud dextrose agar (SDA) حاوی کلرآمفنیکل (Conda, Spain) استفاده شد. نمونه‌ها به صورت نشاکاری در ۷-۵ نقطه (بسته به میزان نمونه) از محیط‌های کشت تلقیح و در دمای ۳۰-۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در داخل انکوباتور به مدت یک هفته (۱۶-۱۵) نگهداری شدند و در نهایت، کشت‌های مثبت، از نظر وجود Aspergillus مورد شناسایی قرار گرفتند.

شناسایی کشت‌های به دست آمده به دو طریق انجام شد.

روش ریخت‌شناسی (Morphologic): در این روش، مونته‌ی خرد شده (Teased mount) و اسلاید کالچر روی محیط‌های کشت SDA حاوی کلرامفنیکل و جنتامایسین و سیب‌زمینی دکستروز آگار (QUELAB, Canada) استفاده شد. همچنین، در مورد برخی از کلنی‌ها، برای شناسایی و بررسی بیشتر ریخت‌شناسی گونه‌های Aspergillus، از محیط چاپکس داکس آگار (Hi Media, India) استفاده گردید.

روش مولکولی: به منظور تشخیص مولکولی کشت‌های به دست آمده، ابتدا DNA آن‌ها با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA (دنازیست، ایران) جدا شد و سپس، بر مبنای ژن کالمودولین (Calmodulin) تعیین توالی (Sequance) انجام گردید (۱۷).

آزمایش حساسیت دارویی: آزمایش حساسیت دارویی طبق شیوه‌نامه‌ی استاندارد Clinical and Laboratory Standards Institute-M38-A2 (CLSI-M38-A2) برای قارچ‌های رشته‌ای و طی مراحل زیر انجام گرفت:

۱- تهیه ی سوسپانسیون قارچی: بدین منظور، سویه‌ها پس از تعیین گونه در محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت داده شدند. از کشت‌های ۷ روزه با ریختن نرمال‌سالین ۰/۸۵ درصد استریل حاوی توئین ۲۰ با غلظت ۵ درصد روی محیط و ایجاد خراش در سطح کلنی‌ها با سر آنس استریل، سوسپانسیونی تهیه و به لوله‌ی استریل دیگر منتقل شد. پس از ته‌نشین شدن ذرات به مدت ۵-۳ دقیقه، محلول رویی به لوله‌های استریل دیگری منتقل شد و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس گردید. غلظت سوسپانسیون‌ها با اسپکتروفتومتر (SPEKOL1500) در ۵۳۰ نانومتر و ترانسمیشن ۸۲-۸۰ درصد جهت Aspergillusها اندازه‌گیری شد. برای به دست آوردن غلظت نهایی ۱۰۴ × ۵-۰/۵ unit/ml Colony-forming (CFU/ml) این سوسپانسیون به میزان ۱ به ۵۰ با محیط کشت Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) سیگما حاوی گلوتامین و بدون بی‌کربنات، بافر شده با مورفولین پروپان سولفونیک (MOPS)که در pH معادل ۷ تنظیم شده بود، رقیق گردید.

۲- تهیه‌ی محلول مادر (استوک) دارویی: طبق راهنمای شیوه‌نامه‌ی داروهای مورد استفاده شامل آمفوتریسین B و ایتراکونازول و وریکونازول (Sigma, USA) در دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردید؛ به طوری که غلظت ۱۶۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آید. محلول‌های دارویی حاصل به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد.

سپس، با محیط RPMI-1640 به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق و رقت‌های سریالی از ۰/۰۳۱۳ تا ۱۶ میکروگرم/میلی‌لیتر تهیه شد.

طبق شیوه نامه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های داروی تهیه شده به چاهک‌های میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه و در نهایت، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی نیز به هر چاهک افزوده شد. دو چاهک آخر به عنوان شاهدهای مثبت و منفی استفاده شدند. چاهک شاهد استریلیتی منفی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط RPMI-1640 و چاهک شاهد مثبت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI-1640 و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی بود. میکروپلیت‌ها پس از شیک ملایم در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند.

جهت خواندن نتایج از روش چشمی (Visual) با آینه‌ی مخصوص استفاده گردید و اولین چاهکی که باعث مهار ۱۰۰ درصد رشد قارچی شده بود، به عنوان کمترین غلظت مهاری (MIC) در نظر گرفته شد.

به منظور تفسیر نتایج دامنه‌ی MIC ایزوله‌ها، محدوده‌ی حساسیت داروها بر اساس CLSI-M38-A2 و همچنین، سایر مطالعات انجام شده (۱۶)، برای وریکونازول و ایتراکونازول ≤ ۸ و آمفوتریسین ≤ ۲ تعیین شد.

از سوش‌های استاندارد Candida parapsilosis ۲۲۰۱۹ ATCC، Candida albicans PTCC ۵۰۲۷ و Aspergillus flavus PTCC ۵۰۰۶ به منظور کنترل کیفی آزمایش استفاده گردید و همچنین، آزمایش‌ها به صورت دوتایی گذاشته شد.

این مطالعه با کد اخلاق IR.MUMS.Medical.Rec.1397.660 در دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام گرفت.

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های Kolmogrov-Smirnov، Kruskal-Wallis و Mann-Whitney تجزیه و تحلیل شد. P < ۰/۰۵۰ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، از میان بیماران مشکوک به Onychomycosis که جهت تشخیص عفونت قارچی ناخن به بیمارستان‌های دانشگاهی مشهد ارجاع شده بودند، با توجه به نتایج آزمایش مستقیم و کشت، ۵۰ بیمار مبتلا به Onychomycosis ناشی از Aspergillus بودند. از این تعداد، ۱۳ بیمار (۲۶ درصد) مرد و ۳۷ بیمار (۷۴ درصد) زن بودند. محدوده‌ی سنی بیماران بین ۸۶-۲۵ سال و میانگین سن آنان ۵۱ سال بود. در این بررسی، بیشترین میزان شیوع Onychomycosis در بیماران در محدوده‌ی سنی ۵۹-۵۰ سال (۳۲ درصد) دیده شد.

از ۵۰ بیمار مبتلا به Onychomycosis، ۱۵ بیمار مبتلا به Onychomycosis ناخن دست (۳۰ درصد)، ۳۳ بیمار مبتلا به Onychomycosis ناخن پا (۶۶ درصد) و ۲ بیمار (۴ درصد) به طور هم‌زمان مبتلا به Onychomycosis ناخن دست و پا بودند.

نتایج شناسایی گونه‌های Aspergillus شناسایی شده در جدول ۱ آمده است که بر این اساس Aspergillus flavus با ۳۴ مورد (۶۸ درصد) بیشترین فراوانی را داشت.

جدول ۱. فراوانی مطلق و نسبی گونه‌های Aspergillus جدا شده از بیماران مبتلا به Onychomycosis مراجعه کننده به بیمارستان‌های دانشگاهی مشهد

گونه‌های Aspergillus	تعداد (درصد)
Aspergillus flavus	۳۴ (۶۸/۰)
Aspergillus terreus	۷ (۱۴/۰)
Aspergillus tubingensis	۳ (۶/۰)
Aspergillus welwitschiae	۲ (۴/۰)
Aspergillus oryzae	۲ (۴/۰)
Aspergillus minischlerotigenes	۱ (۲/۰)
Aspergillus ochraceus	۱ (۲/۰)
جمع کل	۵۰ (۱۰۰)

بر اساس نتایج آزمایش حساسیت دارویی، کمترین محدوده‌ی MIC، داروهای ایتراکونازول و وریکونازول برای گونه‌ی Aspergillus terreus و به ترتیب برابر ۰/۰۶۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر و ۰/۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. این مقدار، در مورد داروی آمفوتریسین B برای گونه‌ی Aspergillus tubingensis و به مقدار ۰/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین، بیشترین محدوده‌ی MIC، داروی آمفوتریسین B مربوط به گونه‌ی Aspergillus flavus (۴ میکروگرم/میلی‌لیتر)، داروی ایتراکونازول مربوط به گونه‌ی Aspergillus tubingensis (۲ میکروگرم/میلی‌لیتر)، داروی وریکونازول مربوط به گونه‌های Aspergillus tubingensis و Aspergillus welwitschiae (۲ میکروگرم/میلی‌لیتر) بود.

جدول ۲، نشان دهنده‌ی نتایج به دست آمده در زمینه‌ی MIC90، MIC50 و MIC داروهای آمفوتریسین B، ایتراکونازول و وریکونازول به تفکیک ایزوله‌های شناسایی شده، می‌باشد.

حساسیت گونه‌های Aspergillus نسبت به وریکونازول و ایتراکونازول ۱۰۰ درصد بود. از بین ۵۰ گونه‌ی Aspergillus، بیشترین تعداد مقاومت، مربوط به داروی آمفوتریسین B با تعداد ۵ نمونه‌ی مربوط به Aspergillus flavus بود.

نتایج حاصل از آزمون‌های آماری Kolmogrov-Smirnov و Kruskal-Wallis نشان داد که اختلاف معنی‌داری در MIC دو دارو ایتراکونازول و آمفوتریسین B وجود دارد. همچنین، بر اساس آزمون Mann-Whitney، این تفاوت بین گونه‌های flavus و terreus، flavus و tubingensis، terreus و tubingensis، flavus و welwitschiae بود.

بحث

Onychomycosis توسط درماتوفیت‌ها، مخمرها و کپک‌ها ایجاد می‌شود. Onychomycosis ناشی از درماتوفیت‌ها، بیشتر در بالغین و در هر دو جنس دیده می‌شود. ضایعات در ۸۰ درصد موارد در ناخن‌های دست می‌باشند. عفونت هم‌زمان ناخن‌های پا و ناخن‌های دست نادر بوده است. محققین، ۲ درماتوفیت Trichophyton rubrum و Trichophyton interdigitale را بیشتر از بقیه جدا کرده‌اند (۱۹-۱۸). گونه‌های Candida اغلب از Onychomycosis ناخن‌های دست جدا می‌گردند؛ چرا که شرایط رشدشان به دلیل تماس دست با مواد قندی، دترجنت‌ها، مانیکور و خیس خوردگی، مناسب‌تر است. عامل ۷۰ درصد از Onychomycosis ناشی از مخمرها، Candida albicans و به میزان کمتر، Candida parapsilosis، Candida tropicalis و Candida krusei می‌باشد. ۶-۱/۵ درصد موارد Onychomycosis توسط قارچ‌های ساپروفیت ایجاد می‌شود. عفونت‌های هم‌زمان به ندرت مشاهده شده است. قارچ‌های ساپروفیت، اغلب فرصت‌طلب می باشند، بیشتر به ناخن‌های تغییر شکل یافته (دیستروفیک) به خصوص ناخن‌های بزرگ پای اشخاص مسن حمله می‌کنند (۱۹).

جدول ۲. نتایج فعالیت‌های مهار رشد Minimum inhibitory concentration (MIC)، (MIC90) و (MIC50) داروهای آمفوتریسین B، ایتراکونازول و وریکونازول بر روی گونه‌های Aspergillus جدا شده از بیماران مبتلا به Onychomycosis

گونه‌های Aspergillus	دارو	MIC												MIC90 µg/ml	MIC50 µg/ml	MIC Range	G mean
		۱۶	۸	۴	۲	۱	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۶۲	۰/۰۳۱						
Aspergillus flavus	آمفوتریسین B	–	–	۵	۲۳	۶	–	–	–	–	–	۴	۲	۱–۴	۱/۹۵
	ایتراکونازول	–	–	–	–	–	۳	۲۰	۱۱	–	–	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵–۰/۵	۰/۲۱
	وریکونازول	–	–	–	–	۲۴	۱۰	–	–	–	–	۱	۱	۰/۵–۱	۰/۷۶
Aspergillus terreus	آمفوتریسین B	–	–	–	۱	۶	–	–	–	–	–	۲	۱	۱–۲	۱/۱۰
	ایتراکونازول	–	–	–	–	–	–	۱	۵	۱	–	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۶۲۵–۰/۲۵	۰/۱۲
	وریکونازول	–	–	–	۱	۳	–	۳	–	–	–	۲	۱	۰/۲۵–۲	۰/۶۰
Aspergillus tubingensis	آمفوتریسین B	–	–	–	–	–	۳	–	–	–	–	–	–	۰/۵	۰/۵۰
	ایتراکونازول	–	–	–	۱	۲	–	–	–	–	–	–	–	۱–۲	۱/۲۵
	وریکونازول	–	–	–	–	۳	–	–	–	–	–	–	–	۱	۱
Aspergillus welwitschiae	آمفوتریسین B	–	–	–	–	۲	–	–	–	–	–	–	–	۱	۱
	ایتراکونازول	–	–	–	–	۲	–	–	–	–	–	–	–	۱	۱
	وریکونازول	–	–	–	۱	۱	–	–	–	–	–	–	–	۱–۲	۱/۴۱
Aspergillus oryzae	آمفوتریسین B	–	–	–	۱	۱	–	–	–	–	–	–	–	۱–۲	۱/۴۱
	ایتراکونازول	–	–	–	–	–	–	۲	–	–	–	–	–	۰/۲۵	۰/۲۵
	وریکونازول	–	–	–	–	۲	–	–	–	–	–	–	–	۱	۱
Aspergillus minischlerotigenes	آمفوتریسین B	–	–	–	–	۱	–	–	–	–	–	–	–	۱	۱
	ایتراکونازول	–	–	–	–	–	۱	–	–	–	–	–	–	۰/۵	۰/۵
	وریکونازول	–	–	–	–	۱	–	–	–	–	–	–	–	۱	۱
Aspergillus ochraceus	آمفوتریسین B	–	–	–	۱	–	–	–	–	–	–	–	–	۲	۲
	ایتراکونازول	–	–	–	–	–	۱	–	–	–	–	–	–	۰/۵	۰/۵
	وریکونازول	–	–	–	–	۱	–	–	–	–	–	–	–	۱	۱

MIC: Minimum inhibitory concentration

امروزه، میزان بروز Onychomycosis ناشی از قارچ‌های رشته‌ای غیر درماتوفیتی افزایش یافته است. بیشترین ساپروفیت‌هایی که باعث عفونت ناخن می‌شوند، Scopulariopsis، Aspergillus و Fusarium می‌باشند. در بعضی منابع، بیشترین ساپروفیت‌های مسبب عفونت‌های ناخن Aspergillus، Acromion، Penicillium، Scopulariopsis و Fusarium گزارش شده است (۳). عواملی که در این افزایش نقش دارند، عبارت از آسیب به سطح ناخن هنگام سوهان کشیدن یا مانیکور کردن، استفاده از ناخن‌های مصنوعی، افزایش سن، بیماری‌های عروقی محیطی، دیابت، سیگار کشیدن و شنای مداوم می‌باشند (۲).

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که عفونت‌های با اهمیت قارچی، به طور عمده به وسیله ی گونه‌های مقاوم به داروهای ضد قارچی ایجاد می‌شود و نتایج یک درمان ضد قارچی به عوامل مختلفی نظیر ویژگی‌های قارچ عامل عفونت، ویژگی‌های داروی ضد قارچی مورد استفاده و سایر عوامل میزبان وابسته است (۶).

جنس Aspergillus دارای گونه‌های متعددی می‌باشد. Aspergillus fumigatus، شایع‌ترین عامل Aspergillus در بیشتر مطالعه‌های خارج از ایران است. با این همه، در کشورمان فراوان‌ترین گونه‌ی ایزوله شده از نمونه‌های بالینی مربوط به Aspergillus flavus می‌باشد (۶).

در این مطالعه، ۳۷ مورد (۷۴ درصد) از عوامل Aspergillus جدا شده از زنان بود. علت شیوع فراوان‌تر عوامل Aspergillus در زنان، به احتمال زیاد به دلیل عواملی نظیر خیس خوردگی ناخن‌ها ضمن شستشو، تماس با مواد پاک کننده و آسیب به کوتیکول ناخن در پی مانیکور کردن ناخن‌ها می‌باشد (۲).

بیشترین ساپروفیت‌های جدا شده در این مطالعه، از ناخن‌های پا بود. احتمال می‌رود گرفتاری بیشتر این ناحیه، به شرایط محیطی مناسب (گرما و رطوبت)، پوشیدن کفش نامناسب، نارسایی عروق سطحی و اختلالات آناتومیک (بد شکلی و تغییرات ناخنی) بستگی داشته باشد (۱۹).

در این پژوهش، سعی بر آن شد تا حساسیت دارویی و MIC سه داروی آمفوتریسین B، ایتراکونازول و نیز وریکونازول علیه گونه‌های Aspergillus جدا شده از بیماران مبتلا به Onychomycosis با استفاده از شیوه‌نامه‌ی CLSI-M38-A2 بررسی شود.

نتایج حاصل از بررسی حساسیت ایزوله‌های Aspergillus نسبت به داروهای ضد قارچی در مطالعه ی حاضر نشان داد که بیشترین موارد مقاومت مربوط به آمفوتریسین B (۱۰ درصد) بود؛ به طوری که این میزان مقاومت دارویی نسبت به آمفوتریسین B در ۱۴/۷ درصد از موارد Aspergillus flavus مشاهده شد و حساسیت نسبت به آزول‌ها (ایتراکونازول و وریکونازول) ۱۰۰ درصد بود.

در این زمینه، مطالعات مشابهی انجام شده است. از جمله Zalacain و همکاران، در اسپانیا مطالعه‌ای بر روی ۳۰ ایزوله از قارچ‌های رشته‌ای غیر درماتوفیتی عامل Onychomycosis انجام دادند. بر اساس نتایج حاصل از انجام آزمایش حساسیت دارویی بر روی ۹ ایزوله‌ی Aspergillus برای ایتراکونازول توسط این محققین، محدوده ی MIC داروی مورد نظر ۰/۵۰–۰/۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آمد (۲۰).

همچنین، در مطالعه ی Kulkarni و همکاران در هند که بر روی بیماران مشکوک به Onychomycosis انجام شد، عامل ۱۱/۱ درصد از موارد بیماری، قارچ‌های رشته‌ای غیر درماتوفیتی گزارش گردید. نتایج آزمایش حساسیت دارویی بر روی ایزوله‌های Aspergillus نشان داد که ایزوله‌های Aspergillus niger و Aspergillus terreus به ترتیب با MIC معادل ۰/۲۵ و ۰/۰۶ میکروگرم/میلی‌لیتر نسبت به ایتراکونازول حساس بودند. در این مطالعه، گونه‌های Aspergillus niger، مقدار MIC بالایی نسبت به فلوکونازول داشتند (۲۱).

Tsang و همکاران در مطالعه‌ای در هنگ‌کنگ بر روی ۱۳ ایزوله‌ی Aspergillus به دست آمده از نمونه‌های ناخن، آزمایش حساسیت دارویی را برای داروهای ایتراکونازول، وریکونازول و فلوکونازول انجام دادند. در این مطالعه، بیشترین MIC مربوط به فلوکونازول بود (MIC > ۱۶) و تمام نمونه‌ها نسبت به داروی ایتراکونازول با MIC < ۲ و وریکونازول با محدوده‌ی MIC ۵–۲ میکروگرم/میلی‌لیتر، میزان MIC پایین‌تری نشان دادند (۲۲).

در مطالعه‌ی Tupaki-Sreepurna و همکاران که بر روی ۴۴ ایزوله‌ی بالینی عامل Onychomycosis غیر درماتوفیتی انجام شد، ۲۰ ایزوله‌ی Aspergillus دارای محدوده‌ی MIC ۱–۰/۰۰۷ میکروگرم/میلی‌لیتر برای ایتراکونازول بودند (۱۲). Oz و همکاران، در هلند به بررسی فعالیت داروهای ضد قارچی در برابر ۱۴ ایزوله‌ی Aspergillus جدا شده از بیماران مبتلا به کراتیت پرداختند. در این مطالعه، بیشترین میزان MIC مربوط به آمفوتریسین B نسبت به Aspergillus flavus بود (۲۳). همچنین، حجتی‌نیا و سبکبار، در کرج بر روی ۴۰ ایزوله‌ی Aspergillus flavus شامل ۲۰ نمونه‌ی بالینی و ۲۰ نمونه ی محیطی، آزمایش حساسیت دارویی انجام دادند که تمام نمونه‌ها به داروهای ایتراکونازول و وریکونازول حساس بودند (۶). هاشمی و همکاران، حساسیت دارویی ۵۰ ایزوله‌ی Aspergillus جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران مراجعه کننده به بخش قارچ‌شناسی دانشکده‌ی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران را مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی، ۷/۵ ایزوله‌ی Aspergillus با MIC > ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر نسبت به آمفوتریسین B به عنوان ایزوله‌های بالینی مقاوم تلقی شدند (۱۱).

Al-Wathi و همکاران، آزمایش حساسیت ضد قارچی ایزوله‌های Aspergillus flavus جدا شده از ۹۲ نمونه‌ی بالینی در

کویت را انجام دادند. در این مطالعه، تریازول ها و اکینوکاندین ها فعالیت مهار کنندگی خوبی نشان دادند و ۱۰ درصد از ایزوله ها نسبت به آمفوتریسین B، مقدار MIC > ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر داشتند (۲۴).

نتایج این مطالعات با مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد و تفاوت‌های جزیی در درصد مقاومت با مطالعه‌ی حاضر، می‌تواند به دلایل تفاوت در گونه‌های قارچی مورد بررسی، اختلاف در کیفیت دارو و درجه‌ی خلوص آن ناشی از اختلاف در شرکت سازنده، تفاوت در شیوه‌نامه‌ی آزمایش حساسیت دارویی و جمعیت مورد مطالعه باشد.

بر اساس مطالعات انجام شده در مورد مکانیسم های مقاومت دارویی در قارچ ها، برخی از آن‌ها با تغییر در جایگاه اتصال، نسبت به داروهای ضد قارچی مقاومت نشان می‌دهند؛ به طوری که مشخص شده است مقاومت نسبت به آمفوتریسین از طریق تغییر در ژن CAT A رخ می‌دهد. همچنین، گونه‌های مختلف قارچی در نقاط مختلف جغرافیایی می‌توانند دارای تفاوت‌هایی از لحاظ ژن‌های مقاومت دارویی با یکدیگر باشند (۲۵).

نتیجه‌گیری

تمامی گونه‌های Aspergillus نسبت به داروهای ایتراکونازول و وریکونازول حساس می‌باشند و این دو دارو، مؤثرتر از آمفوتریسین B بر روی گونه‌های Aspergillus می‌باشند. با توجه به حساسیت متفاوت این گونه ها نسبت به عوامل ضد قارچی، انجام آزمایش حساسیت دارویی به منظور انتخاب داروی مناسب ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به نقش قابل توجه Aspergillusها در ایجاد Onychomycosis و کاهش حساسیت و مقاومت دارویی گونه های Aspergillus، پیشنهاد می گردد مطالعه بر روی تعداد بیشتری نمونه و همچنین، داروهای بیشتر و نوظهور صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد قارچ‌شناسی پزشکی، مصوب معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به شماره‌ی ۹۷۰۸۳۴ و کد کمیته‌ی اخلاق به شماره‌ی IR.MUMS.Medical.Rec.1397.660 می‌باشد. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از حمایت‌های این معاونت و همکاری پرسنل محترم بخش انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی بیمارستان های امام رضا (ع) و قائم (عج) مشهد اعلام می نمایند. نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافع با هیچ شخص و مؤسسه‌ای ندارند.

References

1. Midgley G, Moore MK. Nail infections. Dermatol Clin 1996; 14(1): 41-9.
2. Nouripour-Sisakht S, Mirhendi H, Shidfar MR, Ahmadi B, Rezaei-Matehkolaei A, Geramishoar M, et al. Aspergillus species as emerging causative agents of onychomycosis. J Mycol Med 2015; 25(2): 101-7.
3. Ghasemi Z, Falahati M, Sadri M, Farehyar S, Nami S, Nozari S, et al . Report of 34 cases of saprophytic fungi isolated from dystrophic nails of patients referred to Razi Hospital (2010-2011). Razi J Med Sci 2012; 18(92): 8-14. [In Persian].
4. Kaur R, Kashyap B, Bhalla P. Onychomycosis--epidemiology, diagnosis and management. Indian J Med Microbiol 2008; 26(2): 108-16.
5. Elewski BE. Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management. Clin Microbiol Rev 1998; 11(3): 415-29.
6. Hojatinia H, Sabokbar A. Sensitivity determination of Aspergilus Flavus to Itraconazol, Voriconazol and Caspofungin. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal 2016; 6(22): 51-8. [In Persian].
7. Bongomin F, Batac CR, Richardson MD, Denning DW. A review of onychomycosis due to aspergillus species. Mycopathologia 2018; 183(3): 485-93.
8. Hoseinnejad A, Hedayati MT, Moazeni M, Taghizadeh Armaki M, Abastabar M, Jabari Amiri MR, et al. Antifungal susceptibility testing of 90 clinical and environmental isolates of Aspergillus flavus to voriconazole and itraconazole. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 25(133): 91-9. [In Persian].
9. Ahmadi B, Rezaei S, Hashemi F, Zareei M, Deli H, Hashemi SJ. The use of PCR to diagnose onychomycosis caused by non-dermatophytic molds. Payavard Salamat 2015; 9(4): 388-99. [In Persian].
10. 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.
11. Hashemi SJ, Zaini F, Daie R, Zibafar E, Zakeri MA. In-vitro susceptibility of Aspergillus species isolated from cutaneous and visceral lesions to antifungal agents. Tehran Univ Med J 2011; 69(2): 83-91. [In Persian].
12. Tupaki-Sreepurna A, Jishnu BT, Thanneru V, Sharma S, Gopi A, Sundaram M, et al. An assessment of in vitro antifungal activities of efinaconazole and itraconazole against common non-dermatophyte fungi causing onychomycosis. J Fungi (Basel) 2017; 3(2): 20.
13. Nasrolahiomran A. Evatuation of drug susceptibility of Aspergillus species isolated from ICU of hospitals in invitro. J Ilam Univ Med Sci 2018; 25(6): 130-40. [In Persian].
14. Bakhshi T, Salari S, Naseri A, Esfandiarpour I, Mohammadi MA, Ghasemi Nejad Almani P. Molecular identification of candida species in patients with candidiasis in Birjand, Iran, using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay. J Isfahan Med

Sch 2016; 33(359): 1986-93. [In Persian].
15. Diba K, Kordbacheh P, Mirhendi SH, Rezaie S, Mahmoudi M. Identification of Aspergillus species using morphological characteristics. Pak J Med Sci 2007; 23(6): 867-72.
16. McClenny N. Laboratory detection and identification of Aspergillus species by microscopic observation and culture: The traditional approach. Med Mycol 2005; 43(Suppl 1): S125-S128.
17. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. Stud Mycol 2014; 78: 141-73.
18. Moghaddami M, Shidfar MR. A study of onychomycosis in Tehran. Med J Islam Repub Iran. 1989; 3(3-4): 143-9.
19. Zeini F, Mehbod ASA, Emami M. Comprehensive medical mycology. 3rd ed. Tehran, Iran: University of Tehran Publications; 2009. p. 154. [In Persian].
20. Zalacain A, Obrador C, Martinez JP, Vinas M, Vinuesa T. Characterization of the antimicrobial susceptibility of fungi responsible for onychomycosis in Spain. Med Mycol 2011; 49(5): 495-9.
21. Kulkarni SS, Bhakre JB, Damle AS. In vitro susceptibility testing of four antifungal drugs against fungal isolates in onychomycosis. Int J Res Med Sci 2018; 6(8): 2774-80.
22. Tsang CC, Hui TW, Lee KC, Chen JH, Ngan AH, Tam EW, et al. Genetic diversity of Aspergillus species isolated from onychomycosis and Aspergillus hongkongensis sp. nov., with implications to antifungal susceptibility testing. Diagn Microbiol Infect Dis 2016; 84(2): 125-34.
23. Oz Y, Ozdemir HG, Gokbolat E, Kiraz N, Ilkit M, Seyedmousavi S. Time-kill kinetics and in vitro antifungal susceptibility of non-fumigatus Aspergillus species isolated from patients with ocular mycoses. Mycopathologia 2016; 181(3-4): 225-33.
24. Al-Wathiqi F, Ahmad S, Khan Z. Molecular identification and antifungal susceptibility profile of Aspergillus flavus isolates recovered from clinical specimens in Kuwait. BMC Infect Dis 2013; 13: 126.
25. Howard SJ, Arendrup MC. Acquired antifungal drug resistance in Aspergillus fumigatus: Epidemiology and detection. Med Mycol 2011; 49(Suppl 1): S90-S95.

DOI: *10.22122/jims.v38i577.12946* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 38, No. 577, 1st Week, August 2020**

Received: 18.04.2020 Accepted: 06.07.2020 Published: 05.08.2020

The Drug Susceptibility of Aspergillus Species Isolated from the Patients with Onychomycosis to Itraconazole, Voriconazole, and Amphotericin B

Farzaneh Akbari[1], Ali Naseri[2], Abdolmajid Fata[3], Mohammad Javad Najafzadeh[2], Lida Jarahi[4], Mahmoud Parian[5]

Original Article

Abstract

Background: Nowadays, the prevalence of onychomycosis caused by non-dermatophyte molds is increasing. As Aspergillus is the most common etiologic agents of the disease, this study was performed to evaluate the susceptibility of clinical isolates of Aspergillus as the cause of onychomycosis to itraconazole, voriconazole, and amphotericin B.

Methods: This cross-sectional study was performed on 50 Aspergillus strains isolated from the patients with onychomycosis referred to diagnostic laboratories of university hospitals in Mashhad, Iran. According to the phenotypic and molecular analysis of Aspergillus isolates, the most frequent species was Aspergillus flavus (A. flavus) with 34 cases. The drug susceptibility test was performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute-M38-A2 (CLSI-M38-A2) protocol, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of the drugs was determined.

Findings: From 50 patients with dystrophic nails, 13 were men and 37 were women. 15 patients had fungal infection of fingernails, and 33 patients had fungal infection on toenails; 2 patients had both infections of finger and toe nails. 14.7% of A. flavus isolates with MIC > 2 µg/ml to amphotericin B were considered as resistant clinical isolates. The sensitivity to itraconazole and voriconazole was 100%. MIC90 of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole were obtained by broth microdilution method for A. flavus species as 4, 0.25, and 1 µg/ml, respectively. Significant difference was observed in MIC between itraconazole and amphotericin B ($P < 0.050$).

Conclusion: All Aspergillus species are susceptible to itraconazole and voriconazole, and these two drugs are more effective than amphotericin B on Aspergillus species. Due to the different susceptibility of these species to antifungal agents, it is necessary to perform drug susceptibility testing in order to select the appropriate drug.

Keywords: Onychomycosis; Aspergillus; Itraconazole; Amphotericin B; Voriconazole

Citation: Akbari F, Naseri A, Fata A, Najafzadeh MJ, Jarahi L, Parian M. **The Drug Susceptibility of Aspergillus Species Isolated from the Patients with Onychomycosis to Itraconazole, Voriconazole, and Amphotericin B.** J Isfahan Med Sch 2020; 38(577): 367-75.

1- MSc Student, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2- Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3-.Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4- Associate Professor, Department of Community Medicine, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
5- Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Corresponding Author: Ali Naseri, Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran; Email: naseria@mums.ac.ir