

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

فرزانه اکبری<sup>۱</sup>، علی ناصری<sup>۱</sup>، عبدالمجید فتی<sup>۲</sup>، محمد جواد نجف‌زاده<sup>۲</sup>، لیدا جراحی<sup>۴</sup>، محمود پریان<sup>۵</sup>

### 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 سوبه‌های بالینی *Aspergillus* عامل *Onychomycosis* نسبت به داروهای ایتراکونازول، وریکونازول و آمفوتریسین B انجام شد.

**روش‌ها:** این مطالعه‌ی مقطعی بر روی ۵۰ سوبه‌ی *Aspergillus* جدا شده از بیماران مبتلا به *Onychomycosis* مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیصی بیمارستان‌های دانشگاهی مشهد انجام شد. بر اساس بررسی فوتیپی 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  $MIC < 2$  میکروگرم/میلی‌لیتر نسبت به آمفوتریسین B به عنوان ایزوله‌های بالینی مقاوم تلقی شدند و حساسیت نسبت به ایتراکونازول و وریکونازول ۱۰۰ درصد بود. MIC ۹۰ 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 ( $P < 0/05$ ).

**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): ۳۶۷-۳۷۵.

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.

### مقدمه

*Onychomycosis*، عفونت قارچی ناخن است که توسط سه گروه از قارچ‌ها (درماتوفیت‌ها، مخمرها و ساپروفیت‌ها) ایجاد می‌شود (۱). در

- 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

می‌توان با پیشنهاد داروهای مؤثر بر علیه گونه‌های *Aspergillus* به ویژه گونه‌های مقاوم به دارو، از انجام درمان‌های نابه‌جا 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 (۹-۱۰).

در مطالعه‌ی دیگری که هاشمی و همکاران بر روی ۵۰ ایزوله‌ی بالینی *Aspergillus* انجام دادند، ۳ مورد از ایزوله‌های *Aspergillus flavus* حداقل غلظت مهارکنندگی (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 ۰/۰۰۷-۱ میکروگرم/میلی‌لیتر برای ایتراکونازول بودند (۱۲). از آن جایی که مقاومت دارویی در *Aspergillus*‌ها 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 (۱۳-۱۴).

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* مراجعه‌کننده به درمانگاه ویژه و آزمایشگاه مرکزی بیمارستان‌های امام رضا (ع) و قائم (عج) در سال‌های ۹۷-۱۳۹۶ انجام شد.

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 فارماکوتیک 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 ترینافین 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،

۱۵ ثانیه ورتکس گردید. غلظت سوسپانسیون‌ها با اسپکتروفتومتر (SPEKOL1500) در ۵۳۰ نانومتر و ترانسمیشن ۸۲-۸۰ درصد جهت *Aspergillus*‌ها اندازه‌گیری شد. برای به دست آوردن غلظت نهایی  $10^4 \times 0.5-5$  CFU/ml Colony-forming unit/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 آموتریسین B و ایتراکنازول 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 شیوه‌نامه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های دارویی 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  $8 \leq$  و آموتریسین  $2 \leq$  تعیین شد.

از سوش‌های استاندارد *Candida parapsilosis* ۲۲۰۱۹ ATCC، *Candida albicans* ۵۰۲۷ PTCC و *Aspergillus flavus* ۵۰۰۶ PTCC 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.

بیمارانی که با توجه به معیارهای بالینی شامل بدشکلی ناخن، تغییر رنگ ناخن، هیپرکراتوزیس زیر ناخن 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 کلرامفنیکل (Conda, Spain) استفاده شد. نمونه‌ها به صورت نشاکاری در ۵-۷ نقطه (بسته به میزان نمونه) از محیط‌های کشت تلقیح و در دمای ۲۵-۳۰ 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- تهیه‌ی 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 ۳-۵ دقیقه، محلول رویی به لوله‌های استریل دیگری منتقل شد و به مدت

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 MIC50، MIC90 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*، *terreus* و *tubingensis* 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 (۱۸-۱۹). 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 می‌باشند، بیشتر به ناخن‌های تغییر شکل یافته (دیستروفیک) به خصوص ناخن‌های بزرگ پای اشخاص مسن حمله می‌کنند (۱۹).

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های Mann-Whitney و Kruskal-Wallis، Kolmogrov-Smirnov تجزیه و تحلیل شد.  $P < 0/050$  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 ۲۵-۸۶ 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

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

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

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

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

MIC: Minimum inhibitory concentration

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، محدوده‌ی MIC داروی مورد نظر ۰/۲۵-۰/۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آمد (۲۰).

همچنین، در مطالعه‌ی 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 ۲-۵ میکروگرم/میلی‌لیتر، میزان MIC پایین تری 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 ۱-۰/۰۷ میکروگرم/میلی‌لیتر برای ایتراکونازول بودند (۱۲). Oz و همکاران، در هند 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 نمونه‌ی 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

امروزه، میزان بروز *Onychomycosis* ناشی از قارچ‌های رشته‌ای غیر درماتوفیتی افزایش یافته است. بیشترین ساپروفیت‌هایی که باعث عفونت ناخن می‌شوند، *Aspergillus*، *Scopulariopsis* 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 مانیکیور 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 وسیله‌ی 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 مانیکیور 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 مطالعه‌ی 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.



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. با توجه به نقش قابل توجه *Aspergillus*‌ها در ایجاد *Onychomycosis* و کاهش حساسیت و مقاومت دارویی گونه‌های *Aspergillus*، پیشنهاد می‌گردد 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 بیمارستان‌های امام رضا (ع) و قائم (عج) مشهد اعلام می‌نمایند. نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافع با هیچ شخص و مؤسسه‌ای ندارند.

کویت را انجام دادند. در این مطالعه، تریازول‌ها و اکتینوکاندین‌ها فعالیت مهارکنندگی خوبی نشان دادند و ۱۰ درصد از ایزوله‌ها نسبت به آمفوتریسین B، مقدار  $MIC < 2$  میکروگرم/میلی‌لیتر داشتند (۲۴). نتایج این مطالعات با مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد و تفاوت‌های جزئی 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 مکانیسم‌های مقاومت دارویی در قارچ‌ها، 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 ایتراکانازول و ریکونازول حساس می‌باشند و این دو دارو، مؤثرتر از آمفوتریسین B بر

### References

- Midgley G, Moore MK. Nail infections. *Dermatol Clin* 1996; 14(1): 41-9.
- 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.
- 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].
- Kaur R, Kashyap B, Bhalla P. Onychomycosis--epidemiology, diagnosis and management. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26(2): 108-16.
- Elewski BE. Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(3): 415-29.
- Hojatinia H, Sabokbar A. Sensitivity determination of *Aspergillus Flavus* to Itraconazol, Voriconazol and Caspofungin. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal* 2016; 6(22): 51-8. [In Persian].
- Bongomin F, Batac CR, Richardson MD, Denning DW. A review of onychomycosis due to *aspergillus* species. *Mycopathologia* 2018; 183(3): 485-93.
- 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].
- 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].
- 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.
- 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].
- 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.
- Nasrolahiomran A. Evaluation 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].
- 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. 3<sup>rd</sup> 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.



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

Farzaneh Akbari<sup>1</sup>, Ali Naseri<sup>2</sup>, Abdolmajid Fata<sup>3</sup>, Mohammad Javad Najafzadeh<sup>2</sup>, Lida Jarahi<sup>4</sup>, Mahmoud Parian<sup>5</sup>

### 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%. MIC<sub>90</sub> 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