مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۵۸/هفته دوم آذر ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۲۸

ارزیابی حساسیت گونه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از برفک دهانی مبتلایان به ایدز نسبت به داروی فلوکونازول با استفاده از دو روش مایکرودایلوشن

مجتبی تقی‌زاده ارمکی[۱]، احسان فرح‌بخش[۱]، دکتر محمد حسین یادگاری[۲]، دکتر معصومه رجبی بذل[۳]، دکتر فرزاد کتیرایی[۴]

خلاصه

مقدمه: کاندیدا آلبیکنس مخمری پاتوژن است که باعث عفونت‌های سیستمیک، واژینال و دهانی می‌شود. کاندیدیازیس دهانی با داروهای ضد قارچی تری‌آزولی مانند فلوکونازول درمان می‌شود، اما استفاده بیش از اندازه دارو منجر به پیدایش گونه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول می‌گردد. هدف از این مطالعه، ارزیابی حساسیت ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از ضایعات دهانی افراد مبتلا به ایدز نسبت به داروی فلوکونازول با دو روش مایکرودایلوشن براث و دیسک دیفیوژن بود.

روش‌ها: در این مطالعه ۶۶ گونه کاندیدا آلبیکنس جدا شده از ضایعات دهانی مبتلایان به ایدز بررسی گردید. دو گونه کاندیدا آلبیکنس استاندارد ATCC۱۰۲۳۱ به عنوان شاهد حساس و کاندیدا آلبیکنس استاندارد ATCC۷۶۶۱۵ به عنوان شاهد مقاوم استفاده شد. برای تمام ایزوله‌ها مطابق استاندارد (CLSI M27-A3)، حداقل غلظت ممانعت کننده‌ی رشد (MICs) پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین گردید. روش دیسک دیفیوژن مطابق استاندارد CLSI M44-S2 انجام شد. در این روش از دیسک‌های ۲۵ میکروگرمی فلوکونازول و محیط مولر هینتون آگار مکمل شده با گلوکز ۲ درصد و متیلن بلو به میزان ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده و نتایج پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرائت گردید.

یافته‌ها: اختلاف معنی‌داری بین روش‌های مایکرودایلوشن براث و دیسک دیفیوژن برای تعیین حساسیت ایزوله‌ها نسبت به داروی فلوکونازول وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: روش دیسک دیفیوژن برای تعیین حساسیت مخمرها به داروی فلوکونازول ساده، سریع بوده و انجام روش مایکرودایلوشن براث برای تعیین حساسیت ایزوله‌ها به دارو به طور معمول مشکل و وقت‌گیر بوده است.

واژگان کلیدی: کاندیدا، فلوکونازول، ارزیابی حساسیت دارویی، مایکرودایلوشن، دیسک دیفیوژن.

مقدمه

کاندیدیازیس یکی از شایع‌ترین عفونت‌های قارچی ایجاد شده توسط گونه‌های فرصت طلب کاندیدا می‌باشد، که به طور عمده توسط کاندیدا آلبیکنس ایجاد می‌شود. سیر بالینی بیماری کاندیدیازس به اشکال مختلف حاد، تحت حاد، مزمن و یا اسپورادیک است و عفونت می‌تواند همه‌ی قسمت‌های بدن را درگیر کند (۱). مخمر کاندیدا آلبیکنس جزء دسته‌ایی از قارچ‌های تک سلولی می‌باشد که به طریق جوانه زدن تکثیر می‌یابد و تحت شرایط محیطی و تغذیه‌ای خاص قادر به ایجاد میسیلیوم‌های کاذب و حقیقی می‌باشد. این قارچ از نظر تولید مثل غیرجنسی در رده‌ی

[۱] کارشناس ارشد، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۲] دانشیار، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۳] استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[۴] استادیار، گروه قارچ شناسی دامپزشکی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمد حسین یادگاری
Email: yadegarm@modares.ac.ir

www.mui.ac.ir

بلاستومایست و از نظر تولید مثل جنسی در رده‌ی آسکومیست قرار می‌گیرد (۲). کاندیدا آلبیکنس اغلب به تعداد کم در دهان وجود دارد، اما عوامل خاصی ممکن است باعث تکثیر بیش از حد آن شوند. درمان با تعدد آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است تعادل طبیعی ارگانیسم‌ها را در دهان بر هم زده، باعث تکثیر میکروارگانیسم و ایجاد برفک دهانی گردد. برفک دهانی معمول‌ترین و شایع‌ترین شکل کاندیدیازیس دهان است که بیشتر در مخاط ناحیه‌ی لثه‌ها، پشت زبان و کام تظاهر می‌یابد. این شکل کاندیدیازیس با رشد فوق‌العاده و کلونیزاسیون کاندیدا آلبیکنس در دهان آغاز می‌شود. این ضایعات به شکل پلاک‌های برجسته، نرم، شیری رنگ و پنیری شکل تا زرد رنگ هستند که به سهولت پوسته ریزی کرده، یک زمینه‌ی قرمز ساییده شده تا زخمی و حساس را به جای می‌گذارند (۵-۳). نقش کاندیدا آلبیکنس در ایجاد برفک دهانی در مبتلایان به ایدز نسبت به سایر گونه‌های کاندیدا که برخی از آن‌ها مقاومت ذاتی به داروی فلوکونازول دارند، بیشتراست (۶). میزان مقاومت در ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از برفک دهانی مبتلایان به ایدز اغلب بین ۱۹-۱۲ درصد می‌باشد (۷). با شیوع عفونت‌های قارچی و به دنبال افزایش استفاده از داروهای ضد قارچی (مانند آزول‌ها، پلی‌ان‌ها و اکینوکاندین‌ها) شاهد افزایش قابل ملاحظه‌ی مقاومت گونه‌های کاندیدا نسبت به ترکیبات ضد قارچی هستیم. عوامل ضد قارچی تری‌آزولی مانند فلوکونازول و ایتراکونازول به علت نشان دادن خاصیت درمانی بالا به طور معمول جهت درمان عفونت‌های کاندیدا استفاده می‌شوند (۹-۸). ترکیبات آزول از عملکرد آنزیم لانسترول دمتیلاز (۱۴-α استرول دمتیلاز) جلوگیری می‌کند. این آنزیم لانسترول را با برداشتن ۱۴-α متیل به ارگوسترول تبدیل می‌کند. ۱۴-α استرول دمتیلاز یک آنزیم وابسته به سیتوکروم P۴۵۰ است و در سنتز ارگوسترول غشای سیتوپلاسمی قارچ نقش مهمی دارد. جلوگیری از عملکرد آنزیم ۱۴-α استرول دمتیلاز باعث ایجاد اختلال در نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی سلول قارچ می‌گردد (۱۰). امروزه استانداردهای مؤسسه‌ی آزمایشگاهی و بالینی (Clinical and Laboratory Standards Institute یا CLSI)، روش رقیق‌سازی در مایع و دیسک دیفیوژن را جهت تعیین میزان حساسیت مخمرهایی چون کاندیدا نسبت به داروهای ضد قارچی توصیف کرده است (۱۲-۱۱). در این مطالعه از دو روش دیسک دیفیوژن و مایکرودایلوشن براث برای تعیین حساسیت ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس استفاده و نتایج آن‌ها با هم مقایسه شد.

روش‌ها

تعداد ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران ۶۶ عدد بود. نمونه‌ها از بیماران مبتلا به ایدز بستری شده در بخش عفونی بیمارستان امام خمینی (ره) تهران و با استفاده از سواپ استریل از ضایعات مخاطی دهان جمع‌آوری گردید. پس از کشت بر روی محیط سابوروی دکستروز آگار، گونه‌های کاندیدا آلبیکنس از نظر تولید جرم تیوب، تولید کلامیدیوسپور و مورفولوژی کلنی در محیط کروم آگار مورد بررسی و تأیید قرار گرفتند. در هر دو آزمون استاندارد دیسک دیفیوژن و مایکرودایلوشن براث، سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس ۱۰۲۳۱ American Type Culture Collection (ATCC) به عنوان شاهد حساس به داروی فلوکونازول و سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس ATCCV۶۶۱۵ به عنوان شاهد

www.mui.ac.ir

مقاوم به فلوکونازول استفاده شد.

محیط‌های کشت مورد استفاده در این پژوهش به این ترتیب بود: محیط سابوروی دکستروز آگار (Merck)، محیط سابوروی دکستروز براث (Merck)، کروم آگار (Company Paris France)، پودر متیلن بلو (Merck)، پودر فلوکونازول (Sigma Alderich)، دیسک ۲۵ میکروگرمی فلوکونازول (Mast England)، محیط مولر هینتون آگار (Merck)، گلوکز (Merck).

برای ارزیابی حساسیت دارویی به روش دیسک دیفیوژن از نمونه‌های استاندارد و ۶۶ ایزوله‌ی بالینی کاندیدا آلبیکنس سوسپانسیون سلولی به تعداد 1×10^6 سلول در یک میلی‌لیترسرم فیزیولوژی تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار حاوی مکمل‌های گلوکز به میزان ۲ درصد و متیلن بلو به میزان ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر با سواپ استریل به صورت چمنی کشت داده شد. پس از کشت دیسک‌های ۲۵ میکروگرمی فلوکونازول بعد از ۱۵ دقیقه در مرکز هر یک از پلیت‌ها قرار داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت پلیت‌ها از نظر قطر هاله مطابق استاندارد CLSI با استفاده از کولیس مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفتند (۱۳) (شکل ۱).

شکل ۱. ارزیابی حساسیت ایزوله‌های استاندارد و بالینی کاندیدا آلبیکنس با روش دیسک دیفیوژن

برای ارزیابی حساسیت دارویی به روش مایکرودایلوشن براث مراحل زیر انجام شد:

الف) تهیه‌ی سوسپانسیون قارچی: پس از تهیه‌ی کشت تازه از مخمرها، با استفاده از لام نئوبار از هر یک از ایزوله‌های بالینی و استاندارد کاندیدا آلبیکنس در لوله‌های حاوی ۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیونی در حدود 1×10^3 cfu/ml تهیه گردید (۱۱).

ب) تهیه‌ی محیط کشت سابوروی: برای انجام این آزمون از محیط سابوروی دکستروز براث و سابوروی دکستروز آگار استفاده شد. پس از تهیه و استریل کردن محیط‌ها از محیط سابوروی دکستروز براث و سابورو دکستروز آگار برای مراحل تهیه‌ی رقت‌های متوالی دارویی و انجام آزمون حساسیت دارویی استفاده گردید.

ج) تهیه‌ی استوک محلول دارویی: برای تهیه‌ی استوک دارویی بر اساس استاندارد توصیه شده CLSI، ۲۰۴۸ میلی‌گرم از پودر فلوکونازول (سیگما) وزن و در یک میلی‌لیتر دی‌متیل سولفو اکساید (DMSO) حل گردید. دامنه‌ی دارویی از غلظت ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر در اولین لوله تا ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در لوله‌ی آخر ادامه یافت. با انجام این عمل بالاترین غلظت دارویی ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و پایین‌ترین غلظت دارویی ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و در ادامه به هر یک از لوله‌های حاوی رقت‌های مختلف دارویی 1×10^3 cfu/ml سوسپانسیون مخمری اضافه گردید. در این آزمون از ۲ لوله نیز به عنوان شاهد استفاده گردید. برای اطمینان از عدم اثر سوء حلال دی‌متیل سولفو اکساید بر روی ارگانیسم از بیشترین غلظت دی‌متیل سولفو اکساید بدون وجود دارو به عنوان شاهد دارو و از یک لوله‌ی حاوی محیط کشت و عدم وجود

www.mui.ac.ir

ارگانیسم به عنوان شاهد استفاده شد. لوله‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در داخل شیکر انکوباتور با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته، ۱۰ میکرولیتر از هر یک از محتویات لوله‌ها به پلیت‌های حاوی محیط سابورودکستروز آگار تلقیح و توسط سواپ استریل پخش و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. بر اساس شمارش تعداد کلنی‌های رشد کرده از هر یک از رقت‌های دارویی نسبت به گروه شاهد، مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (Minimal inhibitory concentration یا MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (Minimal fatal concentration یا MFC) داروی فلوکونازول محاسبه گردید (۱۱).

یافته‌ها

نتایج دو روش مایکرودایلوشن براث و دیسک دیفیوژن جهت ارزیابی حساسیت ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس نسبت به داروی فلوکونازول در شرایط دمایی ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به دست آمد. طبق استاندارد توصیه شده CLSI M27-A3 هر ایزوله‌ای که میزان $MIC_{۵۰}$ آن در رقت دارویی کمتر از ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمده باشد به عنوان ایزوله‌ی حساس، رقت دارویی بیشتر از ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان ایزوله‌ی مقاوم و رقت دارویی ۱۶ تا ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان ایزوله‌ی وابسته به دوز در نظر گرفته شد. بالاترین میزان MFC در بین ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس در رقت دارویی ۵۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و کمترین میزان آن در رقت دارویی ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو بود. بالاترین میزان مقاومت نسبت به داروی فلوکونازول در $MIC_{۵۰}$ نسبت به گروه شاهد در رقت ۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر برای ۵ ایزوله‌ی بالینی کاندیدا آلبیکنس به دست آمد.

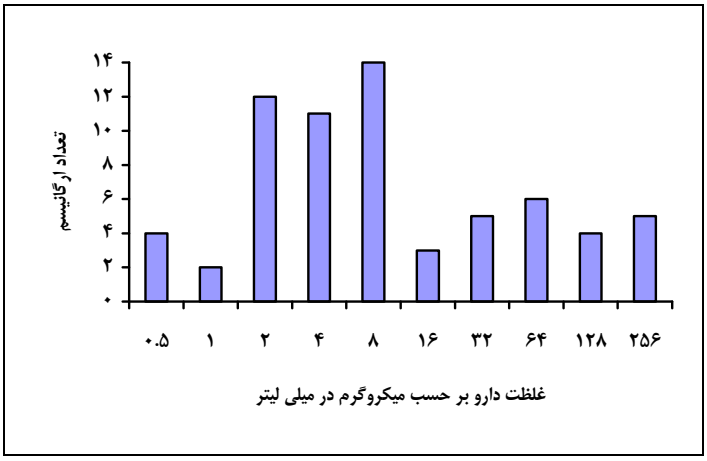
بر اساس استاندارد توصیه شده‌ی CLSI جهت تفسیر نتایج روش دیسک دیفیوژن برای دیسک‌های ۲۵ میکروگرمی، قطر هاله‌ی در گونه‌ی حساس ۱۹ میلی‌متر یا بیشتر، در گونه‌ی وابسته به دوز بین ۱۳ تا ۱۸ میلی‌متر و در گونه‌ی مقاوم ۱۲ میلی‌متر یا کمتر می‌باشد. از ایزوله‌ی استاندارد کاندیدا آلبیکنس مقاوم (ATCC ۷۶۶۱۵) و حساس (ATCC۱۰۲۳۱) جهت تأیید نتایج استفاده گردید. تعداد و درصد فراوانی حساسیت ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس نسبت به داروی فلوکونازول در دو روش مایکرودایلوشن براث و دیسک دیفیوژن ثبت گردید. تفاوت بین این دو روش در تعیین حساسیت دارویی معنی‌دار نبود (جدول ۱).

هر دو روش دیسک دیفیوژن و مایکرودایلوشن براث ۳ بار به طور همزمان تکرار شد. تعداد ارگانیسم در $MIC_{۵۰}$ و تعداد ارگانیسم در MFC به دست آمده از رقت‌های مختلف دارویی تهیه شده در روش مایکرودایلوشن براث به صورت نمودار رسم گردید (اشکال ۲ و ۳).

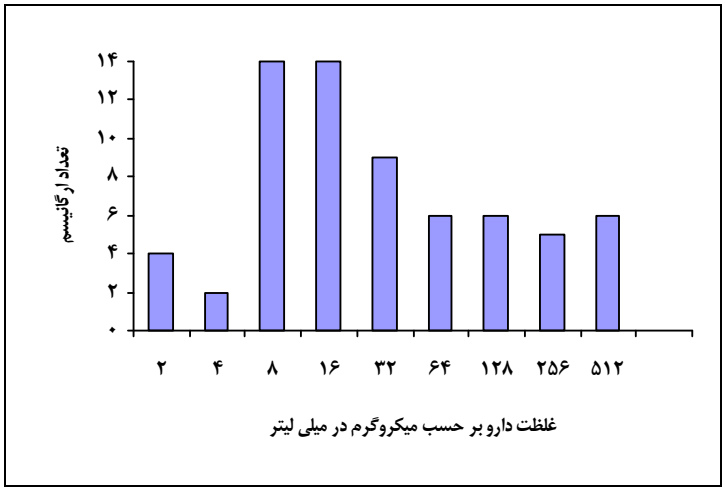
جدول ۱. فراوانی حاصل از تعیین میزان حساسیت داروی فلوکونازول بر روی ایزوله‌های بالینی

	آزمون دیسک دیفیوژن (درصد) تعداد	آزمون مایکرودایلوشن (درصد) تعداد
حساس	۴۵ (۶۸/۱۸)	۴۳ (۶۵/۱۵)
مقاوم	۱۶ (۲۴/۲۴)	۱۵ (۲۲/۷۳)
وابسته به دوز	۵ (۷/۵۸)	۸ (۱۲/۱۲)

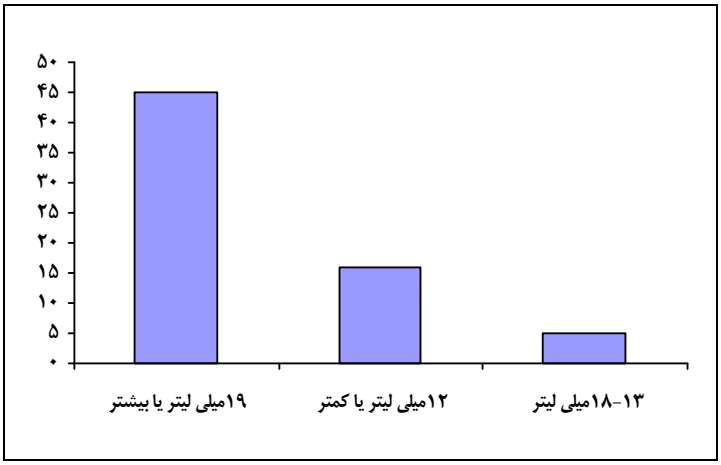
www.mui.ac.ir



شکل ۲. تعداد ارگانیسم در MIC_{50} (**Minimal inhibitory concentration 50**) به دست آمده از رقت‌های مختلف دارویی تهیه شده در روش مایکرودایلوشن براث



شکل ۳. تعداد ارگانیسم در **MFC** (**Minimal fatal concentration**) به دست آمده از رقت‌های مختلف دارویی تهیه شده در روش مایکرودایلوشن براث



شکل ۴. تعداد ارگانیسم در دامنه‌ی حساسیت به دست آمده در روش دیسک دیفیوژن

www.mui.ac.ir

تعداد کاندیدا آلبیکنس در دامنه‌ی حساسیت روش دیسک دیفیوژن نیز تعیین و به صورت نمودار رسم گردید (شکل ۴).

بحث

امروزه قارچ‌های بیماری‌زای فرصت طلب جزء عفونت‌های تهدیدکننده‌ی زندگی در بیماران با نقص سیستم ایمنی می‌باشند. مخمرها و در رأس آن‌ها گونه‌های کاندیدا معمول‌ترین قارچ‌هایی هستند که از عفونت‌های انسانی جدا می‌شوند. با وجود پیشرفت در مراقبت‌های بهداشتی و روش‌های درمانی، وقوع کاندیدیازیس سیستمیک مهاجم به طور قابل توجهی افزایش یافته است. امروزه به علت کشف داروها و ترکیبات ضد قارچی جدید و مشاهده‌ی مقاومت تعدادی از عوامل قارچی نسبت به بعضی داروها مانند فلوکونازول و همچنین افزایش میزان بروز عفونت‌های قارچی و استفاده از داروهای ضد قارچی مختلف، بیش از گذشته تعیین حساسیت دارویی نسبت به قارچ‌ها احساس می‌شود. 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 (۱۵-۱۴). اهمیت بیماری‌های قارچی در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی از جمله عفونت HIV بر هیچ یک از محققین پوشیده نیست و به عبارت دیگر باید بگوییم بیماری هایی که با نقص سیستم ایمنی همراه هستند و اغلب در دهه‌های اخیر ظهور پیدا کرده‌اند، جان تازه‌ای در رگ‌های علم قارچ شناسی دمیده‌اند و اهمیت این شاخه از علوم پزشکی را بیش از پیش نمایان کرده‌اند. بیماران مبتلا به ایدز به خصوص مبتلایان به برفک دهانی به دوز پایین داروی فلوکونازول جواب نداده‌اند و نیازمند به دوز بالای داروی فلوکونازول می‌باشند. مواجه شدن این گروه از بیماران با دوز بالای داروی فلوکونازول منجر به افزایش مقاومت خواهد شد. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که عفونت‌های حایز اهمیت قارچی اغلب توسط سویه‌های مقاوم به دارو ایجاد می‌شود (۱۶). با وجود این که درمان فعال ضد رترو ویروسی (HAART یا Highly active anti retroviral therapy) باعث کاهش عفونت های فرصت طلب از جمله کاندیدیازیس شده است، اما ظهور گونه‌های کاندیدای مقاوم به درمان منجر به افزایش وقوع این بیماری در بیماران مبتلا به ایدز شده است و در کنار سایر عفونت های فرصت طلب موجبات ناراحتی بیماران را سبب می‌شود. در بررسی که توسط Thompson و همکاران انجام شد، به این نتیجه رسیدند که در ۵۰ درصد موارد کاندیدا آلبیکنس قادر به کلونیزه شدن در دهان بیماران مبتلا به ایدز است و در ۵۰ درصد موارد دیگر سایر مخمرها نظیر کاندیدا دابلینسیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا کروزئی در بروز بیماری نقش دارند. میزان مقاومت به فلوکونازول گزارش شده توسط این محقق ۲۵ درصد بود (۱۷). در بررسی که توسط Perea و همکاران صورت گرفت، حساسیت ۷۸ گونه‌ی کاندیدا آلبیکنس پاتوژن انسانی جدا شده از بیماران عفونی مبتلا به ایدز نسبت به فلوکونازول مورد ارزیابی قرار گرفت. این محققین بر این باور بودند که در پیدایش مقاومت آزولی در ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس عواملی از قبیل مقاومت ذاتی گونه‌های اندوژن کاندیدا آلبیکنس، جایگزینی کاندیدا آلبیکنس با یک گونه‌ی

www.mui.ac.ir

مقاومتر (کاندیدا کروزئی و کاندیدا گلابراتا)، جایگزینی کاندیدا آلبیکنس فلور نرمال با یک گونه‌ی مقاوم‌تر کاندیدا آلبیکنس، تغییرات ژنتیکی که منجر به ایجاد یک گونه‌ی مقاوم اندوژنی می‌شود، تغییرات بیان ژنی که منجر به ایجاد مقاومت گونه‌ی اندوژنی موقت می‌شود و همچنین تغییرات در نوع سلول (مخمری، هیف، تغییرات فنوتیپی) از جمله این عوامل می‌باشند (۱۸). Ruhnke و همکاران میزان مقاومت به داروی فلوکونازول را در ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از افراد مبتلا به ایدز با ضایعات دهانی به میزان ۹ درصد گزارش نمودند (۱۹). Martins و همکاران نیز میزان مقاومت به داروی فلوکونازول را در مبتلایان به ایدز با ضایعات دهانی ارزیابی و به میزان ۳۰ درصد گزارش کردند (۲۰). Magaldi و همکاران میزان حساسیت ۱۰۸ ایزوله‌ی کاندیدا آلبیکنس ایزوله شده از بیماران مبتلا به ایدز را با روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار دادند و میزان مقاومت به داروی فلوکونازول را ۱۰ درصد گزارش نمودند (۲۱). Silva و همکاران حساسیت ۵۲ ایزوله‌ی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از حفره‌ی دهانی مبتلایان به ایدز را با روش مایکرودایلوشن براث ارزیابی و میزان مقاومت به داروی فلوکونازول را ۱۷/۲۸درصد گزارش کردند (۲۲). Kabli حساسیت ۱۰۷ ایزوله‌ی کاندیدا آلبیکنس را به داروی فلوکونازول با روش دیسک دیفیوژن مورد ارزیابی قرار داد. نتیجه‌ی به دست آمده حاکی از این بود که ۲۶/۱ درصد از ایزوله‌ها به داروی فلوکونازول مقاوم بودند (۲۳).

شیوع عفونت های حاد و سیستمیک کاندیدیایی و متعاقب آن درمان با داروهای ضد قارچی به ویژه ترکیبات آزولی و مقاومت نسبت به این ترکیبات، ضرورت استفاده از روش های تعیین حساسیت دارویی عوامل قارچی را بیش از پیش آشکار ساخته است. تعیین حساسیت عامل ایجاد بیماری قبل از شروع درمان جهت درمان مناسب، کارامد و ریشه کنی و حذف عوامل قارچی روش بسیار سودمندی می‌باشد تا بدین ترتیب از مصرف بی‌رویه‌ی داروها و بالطبع ایجاد مقاومت‌های دارویی ثانویه و ناخواسته جلوگیری شود. همچنین استفاده از داروی مناسب‌تر جهت درمان، پیش‌گیری از بروز مقاومت های ثانویه، شناسایی ایزوله‌هایی با مقاومت ذاتی نسبت به داروها، جلوگیری از درمان بیهوده و شیوع مقاومت و تسریع در امر درمان از امور ضروری دیگر می‌باشند.

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که مقاومت به داروی فلوکونازول در بیماران مبتلا به ایدز در حال افزایش است. در این تحقیق میزان مقاومت به دست آمده با روش مایکرودایلوشن براث و روش دیسک دیفیوژن به ترتیب ۲۲/۸۳ و ۲۴/۳۳ درصد بود. بنابراین با توجه به افزایش مقاومت دارویی در مبتلایان به ایدز، علت این مقاومت را باید ریشه‌یابی کرد و یا از داروهای جایگزین نظیر کسپوفونژین، ایتراکونازول و دیگر داروها جهت درمان این بیماران استفاده کرد. همچنین چون مبتلایان به ایدز جزء بیماران خاص بوده، در وضعیت اضطراری قرار دارند، لذا قبل از درمان این بیماران مقاوم به دارو باید آزمون حساسیت به داروی فلوکونازول را اغلب توسط روش دیسک دیفیوژن به علت سرعت در جواب‌دهی استفاده کرد. تبعات تجویز دارو به بیماران مقاوم به فلوکونازول بدون ارزیابی حساسیت منجر به پیدایش گونه‌های مقاوم‌تر کاندیدا آلبیکنس و از طرفی باعث بر هم خوردن تعادل فلور نرمال کاندیدا در بدن می‌گردد. از

www.mui.ac.ir

سوی دیگر با ارزیابی حساسیت کاندیدا آلبیکنس به داروی‌های ضد قارچی، پزشک این امکان را خواهد داشت که بهترین داروی ضد قارچ را جهت درمان تجویز نماید. یکی از عوامل مؤثر در افزایش مقاومت، تجویز نادرست دارو با دوز بالا می‌باشد. با انجام روش‌های مایکرودایلوشن براث و دیسک دیفیوژن توسط کارشناس آزمایشگاه قارچ شناسی پزشکی بهترین غلظت و دوز دارویی مؤثر جهت درمان کاندیدیازیس دهانی در اختیار پزشک قرار خواهد گرفت. لذا با انجام آزمایش حساسیت نسبت به هر داروی ضد قارچ کمک شایانی به پزشک و بیمار خواهد شد. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان ادعا نمود که در ارزیابی اثربخشی داروهای ضد قارچ روش دیسک دیفیوژن، در صورت استفاده از دیسک های مورد تأیید استانداردهای بین المللی، روش مطمئن و قابل اعتمادی است و در کلیه‌ی آزمایشگاه‌ها امکان انجام آن وجود دارد و می‌توان آن را در آزمایش‌های معمول برای بیماران انجام داد. سهولت انجام روش دیسک دیفیوژن و دستیابی به جواب در زمان مناسب و قرائت آسان نتایج و تکرارپذیری بالا در صورت رعایت نکات مهم انجام آزمایش از مزایای این روش است.

نتیجه‌گیری

نظر به این که اختلاف معنی‌داری بین نتایج مایکرودایلوشن براث و دیسک دیفیوژن برای تعیین حساسیت دارویی وجود نداشت، به علت سهولت و سرعت بالای روش دیسک دیفیوژن، این روش جهت تعیین حساسیت دارویی در آزمایشگاهای بالینی پیشنهاد می‌گردد. اما روش دیسک دیفیوژن قادر به نشان دادن دقیق میزان MIC در ایزوله‌های بالینی به دست آمده نبود و توصیه می‌شود چنانچه میزان مقاومت با روش دیسک دیفیوژن در یک بیمار به کرات گزارش شد، این نمونه برای بررسی با روش مایکرودایلوشن به آزمایشگاه رفرانس ارجاع شود تا نتایج دقیق MIC و MFC محاسبه شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشکده‌ی علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که حمایت مالی این طرح را در قالب پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۱۳۲۷۳۹ بر عهده داشت، تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, Entenza J, Bille J. Calcineurin A of Candida albicans: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. Mol Microbiol 2003; 48(4): 959-76.
2. Sudbery PE. The germ tubes of Candida albicans hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. Mol Microbiol 2001; 41(1): 19-31.
3. Al-Karaawi ZM, Manfredi M, Waugh AC, McCullough MJ, Jorge J, Scully C, et al. Molecular characterization of Candida spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. Oral Microbiol Immunol 2002; 17(1): 44-9.
4. Heald AE, Cox GM, Schell WA, Bartlett JA, Perfect JR. Oropharyngeal yeast flora and fluconazole resistance in HIV-infected patients receiving long-term continuous versus intermittent fluconazole therapy. AIDS 1996; 10(3): 263-8.
5. Masia CM, Gutierrez RF, Ortiz de la Tabla Ducasse, Hernandez A, I, Martin GC, Sanchez SA, et al. Determinants for the development of oropharyngeal colonization or infection by fluconazole-resistant Candida strains in HIV-infected patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19(8): 593-601.
6. Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the

www.mui.ac.ir

therapy of candidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 48(3): 153-60.
7. Milan EP, Burattini MN, Kallas EG, Fischmann O, Costa PR, Colombo AL. Azole resistance among oral Candida species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 32(3): 211-6.
8. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev 1998; 11(2): 382-402.
9. Menon T, Umamaheswari K, Kumarasamy N, Solomon S, Thyagarajan SP. Efficacy of fluconazole and itraconazole in the treatment of oral candidiasis in HIV patients. Acta Trop 2001; 80(2): 151-4.
10. Loffler J, Kelly SL, Hebart H, Schumacher U, Lass-Florl C, Einsele H. Molecular analysis of cyp51 from fluconazole-resistant Candida albicans strains. FEMS Microbiol Lett 1997; 151(2): 263-8.
11. Wayne PA. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts.Approved standard M27-A3. 3rd ed. Clinical Laboratory Standard Institute; 2008.
12. Wayne PA. Methods for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts:Approved Standard M44-A. 2nd ed. Clinical Laboratory Standard Institute; 2004.
13. Wayne PA. Zone diameter interpretive standards, corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints, and quality control limits for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Informational supplement CLSI document M44-S2. 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
14. Lass-Florl C, Perkhofer S, Mayr A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. Mycoses 2010; 53(1): 1-11.
15. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 643-58, table.
16. Baccaglini L, Atkinson JC, Patton LL, Glick M, Ficarra G, Peterson DE. Management of oral lesions in HIV-positive patients. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 2007; 103(Suppl): S50.e1-S50.e23.
17. Thompson GR, III, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010; 109(4): 488-95.
18. Perea S, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillan RA, Martinez M, et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in Candida albicans strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(10): 2676-84.
19. Ruhnke M, Eigler A, Tennagen I, Geiseler B, Engelmann E, Trautmann M. Emergence of fluconazole-resistant strains of Candida albicans in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol 1994; 32(9): 2092-8.
20. Martins MD, Lozano-Chiu M, Rex JH. Point prevalence of oropharyngeal carriage of fluconazole-resistant Candida in human immunodeficiency virus-infected patients. Clin Infect Dis 1997; 25(4): 843-6.
21. Magaldi S, Mata S, Hartung C, Verde G, Deibis L, Roldan Y, et al. In vitro susceptibility of 137 Candida sp. isolates from HIV positive patients to several antifungal drugs. Mycopathologia 2001; 149(2): 63-8.
22. Silva MR, Costa MR, Miranda AT, Fernandes OF, Costa CR, Paula CR. Evaluation 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 Sao Paulo 2002; 44(3): 121-5.
23. Kabli SA. In vitro susceptibilities of clinical yeast isolates to antifungal drugs of polyene, pyrimidine, and azoles, and their effect in yeast adhesion and mycelial formation. Saudi Journal of Biological Sciences 2008; 15(2): 189-98.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 158, 2nd week, December 2011 Received: 17.3.2011 Accepted: 19.8.2011

Evaluating the Sensitivity of *Candida Albicans* Isolates from Oral Candidiasis of AIDS Patients to Fluconazole by Microdilution Broth and Disk Diffusion Methods

Mojtaba Taghizadeh Armaki[1], Ehsan Farahbakhsh[1], Mohammad Hossein Yadegari PhD[2], Masoumeh Rajabi Bazl PhD[3], Farzad Katiraee PhD[4]

Abstract

Background: *Candida albicans* is a pathogenic yeast that causes oral, vaginal and systemic infections. Oral candidiasis is treated with antifungal agents, particularly triazoles such as fluconazole. However, the overuse of fluconazole has resulted in the emergence of azole-resistant strains of *Candida*. This study tried to evaluate the sensitivity to fluconazole in strains of *C. albicans* clinical isolates from oral candidiasis of AIDS patients by broth microdilution and disk diffusion methods.

Methods: The study included 66 *C. albicans* isolated from oral candidiasis of AIDS patients. *C. albicans* ATCC10231 was used as sensitive control and *C. albicans* ATCC76615 as resistant control. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of fluconazole for all isolates were determined by broth microdilution assays for yeasts according to the clinical and laboratory standards institute (CLSI) guidelines. The MICs were evaluated after 48h of incubation at 35°C. The disk diffusion test was performed according to the procedure outlined in CLSI M44-S2 document. Mueller-Hinton agar supplemented with 2% glucose and 0.5 µg/ml of methylene blue was used and the results were read after 24h incubation at 35°C.

Findings: Significant differences were not observed between broth microdilution and disk diffusion methods for evaluating the sensitivity of isolates to fluconazole.

Conclusion: However, while broth microdilution is a difficult, time consuming technique, disk diffusion test is a quick and simple method for determining the sensitivity of yeasts to fluconazole.

Keywords: Candida, Fluconazole, Evaluation of sensitivity, Microdilution, Disk diffusion.

[1] MSc Student, Department of Mycology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2] Associate Professor, Department of Mycology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[4] Assistant Professor, Department of Veterinary Mycology, School of Veterinary, The University of Tehran, Tehran, Iran.
Corresponding Author: Mohammad Hossein Yadegari PhD, Email: yadegarm@modares.ac.ir