

## بررسی تعیین حساسیت اسپرژیلوس فلاووس نسبت به ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین

حمید حجتی نیا، آذر سبکبار\*

گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** اسپرژیلوزیس شایع ترین عامل ایجاد کننده عفونت های قارچی با منشأ خارجی است. علی رغم توسعه داروهای ضد قارچی، به دلیل افزایش مقاومت دارویی، افزایش میزان MIC در بین سویه های اسپرژیلوس، میزان مرگ و میر عفونت های فرصت طلب ناشی از گونه های اسپرژیلوس فلاووس افزایش یافته است.

**مواد و روش ها:** این مطالعه در طی ۹ ماه بر روی ۴۰ سویه اسپرژیلوس فلاووس شامل ۲۰ سویه بالینی و ۲۰ سویه محیطی انجام شد. سپس تست حساسیت دارویی طبق روش استاندارد NCCLS-M38P انجام شد. سوسپانسیون قارچی از هر کلنی قارچ خالص شده با محدوده سلولی  $10^4$  -  $10^6$  x cfu/ml توسط اسپکتروفتومتر ۵۳۰ نانومتر تهیه گردید. رقت های سریالی از دارو برای ایتراکونازول و وریکونازول از mg/ml ۰/۰۱۵-۱۶ و برای داروی کاسپوفانژین از mg/ml ۰/۰۰۷-۸ تهیه و میزان MIC داروها بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تعیین گردید.

**یافته ها:** محدوده MIC به دست آمده اسپرژیلوس فلاووس در برابر داروی ایتراکونازول بین ۰/۱۲۵-۲ و ۰/۵ MIC<sub>90</sub> و MIC<sub>50</sub> و داروی وریکونازول بین ۰/۲۵-۲ و ۰/۵ MIC<sub>90</sub> و MIC<sub>50</sub> و برای داروی کاسپوفانژین بین ۰/۱۳۱-۰/۱۲۵ و ۰/۰۶۳ و ۰/۱۲۵ MIC<sub>90</sub> و MIC<sub>50</sub> به دست آمد.

**نتیجه گیری:** تمامی نمونه ها به داروهای مورد مطالعه حساسیت نشان دادند. میزان محدوده MIC حاصل از ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین، سویه های به دست آمده اسپرژیلوس فلاووس، جزء سویه های حساس ارزیابی شدند و سویه مقاوم مشاهده نگردید. دامنه MIC سویه ها در دامنه مطالعه های مشابه و در مواردی نیز خارج از این دامنه ها قرار گرفت که نشان دهنده حساسیت بیش تر سویه های مورد مطالعه بود.

**کلمات کلیدی:** اسپرژیلوس فلاووس، حساسیت دارویی، کاسپوفانژین، ایتراکونازول، وریکونازول

### مقدمه

شیوع بیماری های قارچی در دو دهه اخیر به خصوص در افراد دارای نقص سیستم ایمنی رو به افزایش است. از طرفی عوامل قارچی فرصت طلب در محیط زندگی به فراوانی وجود دارند و می توانند سبب آلودگی مواد غذایی و دارویی گردند (۱۷). مطالعه ها و مشاهده های مختلف محققان در سال های اخیر نشان داده است که گونه های اسپرژیلوس از عوامل اصلی تهدید کننده سلامت بیماران دچار نقص ایمنی شدید می باشد به طوری که میزان بروز اسپرژیلوزیس نیز در دو دهه اخیر به بالاترین حد خود رسیده و

به یکی از مرگ بارترین عفونت های قارچی فرصت طلب و مهاجم تبدیل شده است (۲۱، ۹).

در بین ۶۰۰ گونه قارچ اسپرژیلوس، گونه های فلاووس، فومیگاتوس و نایجر از نظر بیماریزایی در انسان از اهمیت ویژه ای برخوردارند (۱۴). بیماری اسپرژیلوزیس ریوی، جلدی، منتشره و اعصاب مرکزی از اشکال بالینی بوده که فرم تظاهرات بالینی و شدت بیماری حاصله به شرایط فیزیولوژیک میزبان، نوع عضو مبتلا و گونه اسپرژیلوس بستگی دارد (۳۰) البته اسپرژیلوزیس بیش تر در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی نظیر بیماران مبتلا به ایدز و افراد دریافت کننده پیوند بروز می نماید.

گونه های مختلف اسپرژیلوس نه تنها از جنبه عفونت زایی بلکه از لحاظ مقاومت دارویی نیز حائز اهمیت هستند علیرغم توسعه داروهای ضد قارچی در دهه های اخیر هنوز طیف درمان های مؤثر، محدود بوده و سمیت و مسایل فارماکوکنتیک مرتبط با آن ها

مسئول نویسنده: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

پست الکترونیکی: sabokbar@kiaiu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۱/۲۳

انجام گرفته است. سویه های بالینی از بیماران مراجعه کننده به دو آزمایشگاه خصوصی در تهران، جدا شده است. ۲۰ سویه محیطی نیز با قرار دادن پلیت های حاوی محیط کشت سابوردکستروز آگار در چندین محل در شهرهای تهران، کرج، رشت و اصفهان به دست آمد.

#### آماده سازی نمونه ها

سویه ها پس از تایید اسپرژیلوس فلاووس به منظور اسپورزایی در محیط سابوردکستروز آگار در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. از کشت ۳ روزه با استفاده از آنس استریل سوسپانسیون تهیه شد و به لوله استریل دیگری منتقل گردید. پس از ته نشین شدن ذرات به مدت ۵ دقیقه محلول رویی به لوله استریل دیگری منتقل و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد. سپس عبور نوری سوسپانسیون در دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد به طوری که محدوده تعداد سلولی حاصل  $10^4 \times \text{cfu/ml}$  -۵ تا ۱ به دست آمد.

#### تهیه محلول مادر (Stock) دارویی

طبق دستورالعمل NCCLSI داروها بر اساس محلول و غیر محلول بودن در آب به دو دسته تقسیم می شوند. داروهای مورد بررسی در این پژوهش از نوع غیر محلول در آب و محلول در دی متیل سولفو کساید (DMSO) بودند.

پودر خالص ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین (با مارک سیگما) تهیه شد. به منظور تهیه محلول استوک طبق دستورالعمل NCCLSI، داروها وزن گردید و در ۵ میلی لیتر DMSO حل گردید. در دمای اتاق به ۳۰ دقیقه قرار داده شد تا خود به خود استریل گردد. سپس ۱ میلی لیتر از محلول فوق با ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل مخلوط گردید تا محلول دارویی آماده گردد.

جهت انجام تست ماکرو دایلوژن و تهیه رقت های دارویی، برای هر سه داروی مورد بررسی از رقت ۱۶-۰/۱۶ برای داروهای ایتراکونازول و وریکونازول و رقت های ۸-۰/۸ برای کاسپوفانژین تهیه شد. طبق پروتوکول NCCLSI-M38P رقت های سریالی برای هر سه داروی مورد بررسی در لوله ها به میزان میلی لیتر تهیه شد در ادامه ۱ میلی لیتر محیط کشت سابوردکستروز براث نیز به لوله ها اضافه گردید و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی به آن اضافه گردید. به همراه کنترل منفی که فاقد ارگانیزم و کنترل مثبت که دارای سوسپانسیون قارچی بود به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

#### خواندن نتایج MIC

طبق دستورالعمل NCCLSI، جهت خواندن نتایج MIC از روش چشمی (Visual) استفاده شد. در این روش Minimum Inhibitory Concentration یعنی پایین ترین غلظت دارویی که بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، مانع رشد قابل ملاحظه ای می شود

مشکل ساز است. گونه های متعددی از قارچ ها مقاومت در شرایط آزمایشگاهی و هم مقاومت در شرایط بالینی به عوامل ضد قارچی را نشان می دهند در صورتی که در گذشته متعلق به گونه های حساس بودند (۲۶، ۲۵).

مطالعه های متعددی از افزایش مقاومت دارویی گونه های اسپرژیلوس حکایت داشته و پیامد بروز انتقال مقاومت (Cross resistant) بین تری آزول های جدید و سایر داروها را نگران کننده می نماید (۸، ۶). مروری بر مطالعه های انجام یافته در ایران نشان می دهد که گونه های مختلف اسپرژیلوس و شایع ترین گونه آن یعنی اسپرژیلوس فلاووس از نمونه های مختلف بالینی جدا و گزارش گردیده اند (۱۵).

هاشمی و همکاران، در دو مطالعه جداگانه عامل ۲۶/۶٪ و ۱۹٪ از موارد ابتلا به اونیکومایکوزیس را کپک های غیر درماتوفیتی و در یکی از این دو بررسی با ۳۵٪ شیوع اسپرژیلوس فلاووس دانسته اند (۱۴، ۱۳). بدیعی نیز در پژوهشی مشابه از ۱۴۲ بیمار مبتلا به بیماری های قارچی با زمینه های قبلی ۶ مورد اسپرژیلوس فلاووس ایزوله نمود (۴). کردچچ و زینی در گزارش مطالعه های خود از ۷ مورد سینوزیت قارچی مهاجم که عامل ۵ مورد از آن ها اسپرژیلوس فلاووس بود حکایت داشتند (۱۸) هم چنین زینی و دهقان با مطالعه بر روی ۲۳ ایزوله اسپرژیلوس از بیماران با سینوزیت قارچی، تمامی آن ها را به اسپرژیلوس فلاووس نسبت دادند (۷). در بررسی مشترک داینین و موری نیز که بر روی ۹۴ ایزوله بالینی اسپرژیلوس انجام شده بود، ۳٪ ایزوله ها MIC بالای  $8 \mu\text{g/ml}$  برای ایتراکونازول و ۲٪ ایزوله ها MIC بالا برای وریکونازول داشتند (۲۳).

از آنجایی که اکثر داروهای ضد قارچی شناخته شده به دلیل تشابه ساختاری قارچ ها با سلول های یوکاریوت ها دارای اثر ها جانبی گسترده به ویژه در مصرف مکرر و طولانی مدت می باشد، استفاده از ترکیبات ضد قارچی مؤثر با حداقل اثر ها جانبی در مورد گونه ها و استرین های مختلف اسپرژیلوس در بهبود بیماران مبتلا به اسپرژیلوزیس حائز اهمیت فراوان است و با توجه به این مساله که، تا کنون مطالعه ای در خصوص میزان حساسیت اسپرژیلوس فلاووس در ایران صورت نگرفته لذا، این پژوهش با هدف بررسی حساسیت دارویی اسپرژیلوس فلاووس و ارزیابی MIC هر یک از ایزوله ها در مقابل داروهای ضد قارچی رایج مصرفی در کشورمان، از جمله ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین صورت گرفته است.

#### مواد و روش ها

##### جمع آوری نمونه ها

این پژوهش آزمایشگاهی بر روی ۴۰ سویه اسپرژیلوس فلاووس (شامل ۲۰ سویه بالینی و ۲۰ سویه محیطی) به مدت ۹ ماه

## بحث

شیوع عفونت های قارچی در سال های اخیر به دلایل مختلف از جمله افزایش وقوع عوامل تضعیف کننده سیستم ایمنی، مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها و ضدقارچ ها، کورتیکواستروئیدها و غیره به شدت رو به افزایش است و این مساله انتخاب دستورالعمل درمانی مؤثر و مناسب را در یک دوره زمانی مشخص اجتناب ناپذیر ساخته است. مطالعه های اپیدمیولوژیک نشان داده است که عفونت های با اهمیت قارچی به طور عمده به وسیله گونه های مقاوم به داروهای ضد قارچی ایجاد می شود و نتایج یک درمان ضد قارچی به فاکتورهای مختلف از جمله ویژگی های قارچ عامل عفونت، ویژگی های داروی ضد قارچی مورد استفاده و سایر فاکتورهای میزبان وابسته است.

آسپرژیلوس یکی از شایع ترین عفونت های فرصت طلب و مهاجم در افراد ایمنوساپرس و زمینه دار در دو دهه اخیر است آسپرژیلوس فومیگاتوس شایع ترین عامل آسپرژیلوس در اکثر مطالعه های خارج از ایران است. با این همه، در کشورمان فراوان ترین گونه ایزوله شده از نمونه های بالینی مربوط به آسپرژیلوس فلاووس می باشد (۱۵). در این پژوهش سعی بر آن شد تا حساسیت دارویی و MIC سه داروی ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین روی شایع ترین ایزوله های آسپرژیلوس فلاووس ایرانی جدا شده از بیماران با استفاده از روش NCCLS-M38P بررسی شود و نتایج آن در جهت انتخاب درمان های بهتر و مؤثرتر برای ارتقاء سطح سلامت جامعه مورد پژوهش و بررسی قرار گیرد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق سویه ها به ترتیب ۱۰۰٪ به داروی کاسپوفانژین، ۹۲/۵٪ نسبت به وریکونازول و ۹۰٪ نسبت به ایتراکونازول حساسیت نشان دادند.

MIC<sub>50</sub> نتایج به دست آمده با مطالعه گبیت و همکاران در سال ۲۰۱۴ مطابقت داشت. آن ها با روش E-TEST، دامنه MIC را برای داروی ایتراکونازول ۱-۲/۵ تا MIC<sub>50</sub> را ۰/۵ و MIC<sub>90</sub> را ۰/۸۳ به دست آوردند (۳۱). کاظمی و همکاران در سال ۱۳۹۲ روی ۲۵ نمونه قارچ آسپرژیلوس جدا شده بالینی با روش میکرودیالوشن میزان MIC برای داروی ایتراکونازول را ۴-۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آوردند. تا حدودی با مطالعه صورت گرفته این پژوهش مطابقت داشت (۱۷).

دکتر بدیعی و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی ۶۶ آسپرژیلوس فلاووس جدا شده بالینی مطالعه انجام دادند. آن ها به روش E-TEST برای ایتراکونازول دامنه ۱/۵-۰/۱۲۵ تا MIC<sub>50</sub> رابر با ۰/۵ و MIC<sub>90</sub> برابر ۱ به دست آوردند. نتیجه روش CLSI برای این دارو دامنه ۲-۰/۲۵ تا MIC<sub>50</sub> برابر با ۱ و MIC<sub>90</sub> را هم برابر با ۱ به دست آوردند که با نتایج مطالعه صورت گرفته این پژوهش هم خوانی داشت (۳).

را به صورت چشمی و مقایسه با نمونه کنترل رشد ثبت گردید. طبق دستورالعمل NCCLSI، چنانچه MIC به دست آمده برای داروی وریکونازول و ایتراکونازول بیش تر از ۴ μg/ml به دست می آمد به عنوان نمونه مقاوم در نظر گرفته شد. هم چنین در مورد داروی کاسپوفانژین اگر میزان MIC به دست آمده بیش تر از ۱ μg/ml باشد به عنوان نمونه مقاوم در نظر گرفته می شود.

## تجزیه و تحلیل آماری

داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-19 و آزمون Anova تجزیه و تحلیل شدند. و سطح معنی دار کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## یافته ها

جدول شماره ۱ نشان دهنده دامنه MIC برای داروهای کاسپوفانژین، ایتراکونازول و وریکونازول همراه با MIC<sub>50</sub> و MIC<sub>90</sub> به دست آمده می باشد.

دارو	MIC <sub>90</sub> μg/ml	MIC <sub>50</sub> μg/ml	MIC range μg/ml
ایتراکونازول	۱	۰/۵	۰/۱۲۵-۲
وریکونازول	۱	۰/۵	۰/۱۲۵-۲
کاسپوفانژین	۰/۱۲۵	۰/۰۶۳	۰/۰۳۱-۰/۱۲۵

جدول ۱- MIC داروهای ضد قارچی علیه آسپرژیلوس فلاووس

جدول شماره ۲ میزان حساسیت نمونه های مورد مطالعه را نسبت به داروها نشان داده است. با توجه به نتایج به دست آمده نمونه مقاومی مشاهده نشد. ۹۰٪ (۳۶ مورد) نمونه های مورد مطالعه نسبت به ایتراکونازول حساسیت داشتند. ۱۰۰٪ (۴۰ مورد) به داروی کاسپوفانژین حساس بودند و ۹۲/۵٪ (۳۷ مورد) از نمونه ها به وریکونازول حساس بودند.

نتایج حاصل از آزمون آماری T-Test نشان داد که اختلاف معنی داری بین نمونه های بالینی و محیطی از نظر MIC وجود ندارد (P > 0/05) یعنی هر سه دارو بر روی نمونه های بالینی و محیطی به صورت یکسان عمل می نماید.

دارو	تعداد نمونه ها					
	مقاوم		نیمه حساس		حساس	
	نمونه	درصد حساسیت	نمونه	درصد حساسیت	نمونه	درصد حساسیت
Itraconazole	-	-	۴	۱۰	۳۶	۹۰
Caspofungine	-	-	-	-	۴۰	۱۰۰
voriconazole	-	-	۳	۷/۵	۳۷	۹۲/۵

جدول ۲: تعیین درصد حساسیت نمونه ها به داروها

علت این اختلاف باشد.

دکتر بدیعی و همکاران سال ۲۰۱۲ روی ۶۶ اسپرژیلوس فلاووس کار کردند. آن ها به روش E-TEST، برای وریکونازول دامنه ۰/۰۶۴-۰/۰۶۴ و  $MIC_{50}$  مساوی با ۰/۱۲۵ و  $MIC_{90}$  مساوی با ۰/۱۹ به دست آوردند. نتیجه روش CLSI این دارو با دامنه ۰/۱۲۵-۰/۵ با  $MIC_{50}$  برابر با ۰/۲۵ و  $MIC_{90}$  برابر با ۰/۲۵ به دست آمد. حد پایین آن ها با نتایج این پژوهش هم خوانی داشت (۳).

سالوانوس و همکاران سال ۲۰۱۱ روی ۲۴ اسپرژیلوس فلاووس جدا شده برای داروی وریکونازول  $MIC$  را ۰/۱۲-۱ به دست آوردند. حد بالای آن ها مطابق با  $MIC_{90}$  پژوهش صورت گرفته بود (۵). سید جمال هاشمی و همکاران، در سال ۱۳۹۰ روی ۵۰ ایزوله اسپرژیلوس جدا شده از نمونه های بالینی از بیماران ۴۰ استرین فلاووس به دست آوردند. آن ها با روش میکروداپلوشن مطابق دستورالعمل NCCLS-M38A دامنه را برای وریکونازول، ۴-۰/۲۵ به دست آوردند. که حد پایین آن با نتایج پژوهش مطابقت داشت (۱۵).

شی جون یان و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی ۳۵ اسپرژیلوس فلاووس به روش E-TEST، نتیجه را برای داروی وریکونازول با دامنه  $MIC$  برابر با ۰/۰۹۴-۰/۵ و  $MIC_{50}$  برابر با ۰/۲۵ و  $MIC_{90}$  برابر با ۰/۳۸ به دست آوردند. نتایج آن ها با نتایج ما مطابقتی نداشت (۲۸) و چون تعداد نمونه های مورد مطالعه به طور تقریبی مشابه بود این اختلاف می تواند به علت یکسان نبودن محیط نمونه های جدا شده باشد. گوینا و همکاران در سال ۲۰۰۸ از ۳۴ اسپرژیلوس فلاووس جدا شده برای داروی وریکونازول دامنه ۲  $MIC$ -۰/۱۲۵ و  $MIC_{90}$  برابر با ۱ به دست آوردند که حد بالای  $MIC$  آن ها با نتایج این مطالعه هم خوانی داشت (۱۲).

فرانک مایکل نیز در سال ۲۰۰۵ از ۲۴ اسپرژیلوس فلاووس جدا شده با روش میکروداپلوشن برای داروی وریکونازول دامنه ۰/۰۶-۱ و  $MIC_{50}$  برابر با ۰/۲۵ به دست آورد. که با حد بالای آن با  $MIC_{90}$  این پژوهش مطابقت داشت (۱۶). لینارز و همکاران در سال ۲۰۰۴ از ۲۴۴ بیمار مبتلا به قارچ ۱۶ مورد اسپرژیلوس فلاووس جدا کردند. با متد M38P دامنه  $MIC$  را برای داروی وریکونازول برابر با ۰/۰۳-۱ و  $MIC_{50}$  را مساوی با ۰/۲۵ و  $MIC_{90}$  مساوی با ۰/۵ به دست آوردند. آن ها با روش Sensititer yeastone دامنه  $MIC$  را برابر با ۰/۵-۰/۰۶ به دست آوردند. نتایج آن ها در مقایسه با نتایج پژوهش صورت گرفته، نشان دهنده اندکی حساسیت بیش تر سویه های آن ها نسبت به سویه های این پژوهش بود. در واقع سویه های آن ها رقت بالاتری از دارو واکنش نشان دادند (۲۲). گییت و همکاران در سال ۲۰۱۴ از ۴۸ بیمار مبتلا به قارچ ۱۸ نمونه اسپرژیلوس فلاووس جدا کردند. با روش E-TEST، دامنه  $MIC$  را برای داروی کاسپوفانژین

هم چنین سیلوانو و همکاران سال ۲۰۱۱ روی ۲۴ اسپرژیلوس فلاووس جدا شده برای داروی ایتراکونازول دامنه  $MIC$  برابر با ۰/۲۵-۰/۵ به دست آوردند که حد پایین آن ها، انطباق زیادی با نتایج مطالعه صورت گرفته در این پژوهش داشت (۵). سید جمال هاشمی و همکاران در سال ۱۳۹۰ از بین ۵۰ ایزوله اسپرژیلوس جدا شده از نمونه های بالینی از بیماران ۴۰ استرین فلاووس به دست آوردند. با روش میکروداپلوشن طبق پروتوکل NCCLS-M38A دامنه برای ایتراکونازول را ۰/۲۵-۱ به دست آوردند. که تا حد زیادی با نتایج مطالعه صورت گرفته در این پژوهش مطابقت داشت (۱۵). کومار راوی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ از ۲۵ نمونه اسپرژیلوس فلاووس جدا شده با روش برات داپلوشن طبق استاندارد CLSI M38A برای داروی ایتراکونازول برابر با ۰/۰۶-۰/۱۲۵ به دست آوردند. که تا حد زیادی با نتایج مطالعه صورت گرفته در این پژوهش مطابقت داشت (۲۴). کومار ساراو و همکاران در سال ۲۰۱۰ از ۲۰۴ بیمار ۳۲ نمونه اسپرژیلوس فلاووس جدا کردند و با روش ماکروداپلوشن طبق استاندارد CLSI M38A برای داروی ایتراکونازول دامنه  $MIC$  برابر با ۰/۱۲-۰/۲۵ به دست آوردند (۱۹). شی جون یان و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی ۳۵ اسپرژیلوس فلاووس به روش E-TEST، نتیجه را برای داروی ایتراکونازول با دامنه ۴  $MIC$ -۰/۰۴۷ و  $MIC_{50}$  برابر با ۰/۷۵ و  $MIC_{90}$  برابر با ۱/۵ به دست آوردند. که این نتایج نیز تا حدی، با نتایج مطالعه صورت گرفته در این مطالعه هم خوانی داشت (۲۸). کوزوکو در سال ۲۰۰۴ تعداد ۵۴ ایزوله قارچ رشته ای از بیماران جدا کردند که ۳ مورد آن اسپرژیلوس فلاووس بود. با روش SAAS نتیجه برای ایتراکونازول را دامنه ۱۲  $MIC$ -۰/۰۳ و با روش M38P دامنه  $MIC$  را ۰/۱۲-۰/۰۶ به دست آوردند (۲۰). از طرفی سرانو و همکاران در سال ۲۰۰۳ با متد M38P میکروداپلوشن برات بر روی نمونه های اسپرژیلوس فلاووس بررسی کردند و دامنه  $MIC$  مساوی با ۰/۱۲-۰/۰۳ و  $MIC_{90}$  را برای داروی ایتراکونازول به دست آوردند. که با نتایج مطالعه صورت گرفته هم خوانی نداشت (۲۷) اختلاف این دو مطالعه می تواند به علت نوع گونه و حساسیت بیش تر آن ها به این داروها باشد. ایتمار شالتی و همکاران در سال ۲۰۰۳ روی ۶ نمونه اسپرژیلوس فلاووس با استفاده از روش میکروداپلوشن دامنه ایتراکونازول را ۰/۲۵-۱ به دست آوردند که تا حدی با نتایج تحقیق های صورت گرفته انطباق داشت (۲۹). گییت و همکاران در سال ۲۰۱۴ از ۴۸ بیمار مبتلا به قارچ ۱۸ نمونه اسپرژیلوس فلاووس جدا کردند. با روش E-TEST، دامنه  $MIC$  را برای داروی وریکونازول ۰/۵-۰/۰۶ و  $MIC_{50}$  را ۰/۱۹ و  $MIC_{90}$  را ۰/۲۵ به دست آوردند که با نتایج کار این پژوهش مطابقتی نداشت (۳۱). می توان این استنباط را داشت که تعداد نمونه های مورد آزمایش

۳۲-۰/۰۰۴ و  $MIC_{50}$  را ۰/۰۶ و  $MIC_{90}$  را ۳۲ به دست آوردند. حد بالای آن ها به نتایج این مطالعه نزدیک بود (۳۲).

سالونوس و همکاران سال ۲۰۱۱ روی ۲۴ اسپرژیلوس فلاووس جدا شده برای داروی کاسپوفانژین  $MIC$  را بزرگ تر از ۱۶ به دست آوردند که با نتایج این پژوهش هم خوانی نداشت (۵). شی جون یان و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی ۳۵ اسپرژیلوس فلاووس به روش E-TEST، نتیجه حاصله برای داروی کاسپوفانژین دامنه  $MIC$  ۰/۱۹-۰/۱۶ و  $MIC_{50}$  برابر با ۰/۴۷ و  $MIC_{90}$  ۰/۰۹۴ به دست آوردند که تا حد زیادی با نتایج این پژوهش مطابقت داشت (۲۸). دکتر بدیعی در سال ۱۳۹۰ حدود ۱۴٪ اسپرژیلوس فلاووس را از ۲۲۳ بیماری قارچی جدا کردند که  $MIC_{90}$  برای کاسپوفانژین در آن تحقیق را ۱ به دست آوردند که بالاتر از  $MIC_{90}$  این پژوهش بود (۳).

دکتر بدیعی و همکاران سال ۱۳۸۹ از ۳۶ نمونه سینوس ۷ مورد اسپرژیلوس فلاووس جدا کردند دامنه  $MIC$  برای کاسپوفانژین را ۰/۳۲-۰/۷۵ به دست آوردند. سوبه های این پژوهش در مقایسه با آن حساسیت بیش تری داشت. در واقع سوبه های این پژوهش در رقت های پایین تری از دارو جواب داده بودند (۴). ایتمار شالیتی و همکاران در سال ۲۰۰۳ روی ۶ فلاووس جدا شده از ۳۱ بیمار با روش میکروداپلوشن  $MIC$  بزرگ تر و مساوی ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر را برای داروی کاسپوفانژین به دست آورده اند. که با کار صورت گرفته مطابقت نداشت و نشان دهنده حساسیت بیش تر سوبه های این پژوهش بود (۲۹). آریخان و همکاران در سال ۲۰۰۲ از ۲۷ اسپرژیلوس جدا شده برای داروی کاسپوفانژین به روش میکروداپلوشن، دامنه  $MIC$  را ۰/۵-۱۶ به دست آوردند. که با مطالعه ما هم خوانی نداشت (۱).

سوفیا پریا و همکاران سال ۲۰۰۲ از ۹ اسپرژیلوس فلاووس جدا شده به روش میکروداپلوشن، دامنه  $MIC$  را بیش تر از ۶۴ برای داروی کاسپوفانژین به دست آوردند. که با نتایج پژوهش ما مطابقتی نداشت (۳۱). آریخان و همکاران در سال ۲۰۰۰ تعداد ۲۷ اسپرژیلوس فلاووس جدا کردند. با روش میکروداپلوشن، دامنه  $MIC$  را برای داروی کاسپوفانژین  $16 > MIC_{25}$  به دست آوردند. هم چنین  $MIC$  ۵-۰/۲۵ بود که با نتایج این مطالعه هم خوانی نداشت (۱) در این مطالعه های تعداد نمونه ها نسبت به پژوهش ما کم تر بود ممکن است تعداد نمونه ها تاثیر روی نتایج دامنه به دست آمده داشته باشد. در سال ۱۹۹۸ اینگروف و همکاران روی ۱۱ اسپرژیلوس فلاووس با روش میکروداپلوشن M38-A2 بررسی انجام داده و برای داروی کاسپوفانژین  $MIC$  برابر با ۰/۵ به دست آوردند. که نشان دهنده حساسیت بیش تر سوبه های آن ها می باشد (۱۱).

همان طور که مشاهده می شود در بعضی موارد نتایج این بررسی با

نتایج سایر محققان متفاوت است که این اختلاف موجود می تواند دلایل مختلفی داشته باشد از جمله:

- ۱- تفاوت زیر گونه های قارچی در مقابل داروهای مورد بررسی
- ۲- مقاومت سوبه ها نسبت به ضد قارچ ها.
- ۳- اختلاف در کیفیت دارو و درجه خلوص آن که می تواند ناشی از اختلاف در شرکت سازنده دارو باشد.
- ۴- از طرفی این اختلاف نتایج می تواند به دلیل تفاوت در جامعه مورد مطالعه باشد بدین معنی که افزایش مصرف داروها باعث ایجاد مقاومت سوبه های اسپرژیلوس به داروهای ضد قارچی شده است. و یا سایر مواردی که پرداختن به آن نیاز به تحقیق های بیش تری دارد.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده و میزان محدوده  $MIC$  حاصل از ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین، سوبه های به دست آمده اسپرژیلوس فلاووس بررسی شده در این پژوهش، جزء سوبه های حساس ارزیابی شدند و سوبه مقاوم مشاهده نگردید. دامنه  $MIC$  سوبه ها در دامنه مطالعه های مشابه و در مواردی نیز خارج از این دامنه ها قرار گرفت، نشان دهنده حساسیت بیش تر سوبه های مورد مطالعه بود.

با توجه به افزایش افراد در معرض خطر و شیوع عفونت های فرصت طلبی چون اسپرژیلوس و کاهش حساسیت و مقاومت دارویی گونه های اسپرژیلوس مطالعه بر روی تعداد بیش تری نمونه در جوامع مختلف، پیشنهاد می گردد. هم چنین بهتر است برای دستیابی به درمان های موثرتر، مطالعه هایی با تعداد داروی بیش تر و با بررسی اثر ها سینرژیمی درمان های ترکیبی و داروهای نوظهور، صورت پذیرد.

### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند از آقایان دکتر شیدفر، دکتر بدلی و دکتر کتیرایی و مسئولین آزمایشگاه دانشگاه آزاد کرج که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، قدردانی و تشکر به عمل آورند.

## منابع

- 1- Arikan, S.S, Maro. L-C, Victor. P, and John. Rex, In Vitro Susceptibility Testing Methods for Caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* Isolates antimicrobial agents and chemotherapy Jan. 2001. p. 327–330
- 2- Arikan, S., Lozano-Chiu, M., Paetznick, V. & Rex, J. H. In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46, 245–7.
- 3- Badiie P, Alborzi A, Moeini M, Haddadi P, Farshad S. Japoni A, et al. Antifungal susceptibility of the *aspergillus* species by Etest and CLSI, reference methods. *Arch Iran Med.* 2012; 15(7): 429 – 432.
4. Badiie P. The study of the aggressive antifungal diseases in patients with insufficient immune system in order to give them an appropriate pattern of immediate diagnosis of fungal diseases. Thesis, Tehran University of Medical Science, Health Faculty, 2006.
- 5- Christudas Silvanose, Tom Bailey and Antonio Di Somma, In Vitro Sensitivity of *Aspergillus* Species Isolated from Respiratory Tract of Falcons, on line veterinary journal 2011, Vol. 6 No. 2, Article 95
6. Dannaoui, E., Borel, E., Monier, M.F., Piens, M.A., Picot, S., Persat, F. Acquired itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47(3):333-40
- 7- Dehghan P, Zaini F, Rezaei S, Jebali A, Kordbacheh P, Mahmoudi M. Detection of Aflr gene and oxigenicity of *Aspergillus flavus*. *Iranian J Publ Health* 2008; 37(3):134-41
8. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(6):1364-8.
9. Denning DW, Ribaud P, Milpied N, Caillot D, Herbrecht R, Thiel E, et al. Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2002; 34(5):563-71. Epub 2002 Jan 22.
10. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. *J Clin Microbiol.* 2003 Aug; 41(8):3623-6.
- 11- Espinel-Ingroff, A. (1998). Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 2950–6.
- 12- Jesús Guinea, Teresa Peláez, Sandra Recio, Marta Torres-Narbona and Emilio Bouza *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52(4):1396.
13. 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. Epub 2009 Mar 7.
14. Hashemi S, Zaini F, Shidfar MR, Daei R, Geramishoar M, Zibafar E, Ahmadi B, Hosseinpour L. Study and identification of the ethiological agents onychomycosis in 171 patients in Tehran. A. The 7th National and 2nd Regional Congress of Parasitology and Parasitic Diseases in Iran, 2009. [Persian]
- 15-Hashemi, J, Zaini.F, Daie .R, Zibafar .E, Zakeri.A In-vitro susceptibility of *Aspergillus* species isolated from cutaneous and visceral lesions to antifungal agents, *Tehran University Medical Journal*; Vol. 69, No. 2, May 2011: 83-91
- 16-Kazemi A, Nowrozi H, Teshfam M, Teimorian Sh, Drug susceptibility of *Aspergillus flavus* and *A.fumigatus* to Itraconazole and Amphotericin B, 71 / *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*

Winter 2014 / vol 15 / no 4

- 17- Kathrin Heyn, Antje Tredup, Stefanie Salvenmoser and Frank-Michael C. Müller, Effect of Voriconazole Combined with Miconazole against *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. and *Fusarium solani*, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Dec. 2005, p. 5157–5159
18. Kordbacheh P, Badiiee P, Alborzi A, Zaini F, Mirhendi H, Mahmoudi M, et al. Acute fulminant fungal sinusitis in patient with acute leukemia. *Iranian J Publ Health* 2008; 37(2):46-51.
- 19- Kumar Saurav and K. Kannabiran, In vitro Susceptibility Pattern and Distribution of *Aspergillus* spp. in Hospitalized Patients with Chronic Pulmonary Infection, *British Journal of Pharmacology and Toxicology* 1(1): 45-49, 2010
- 20- Kuzucu C, Rapino B, McDermott L, Hadley S. Comparison of the semisolid agar antifungal susceptibility test with the NCCLS M38-P broth microdilution test for screening of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3):1224-7
21. Manuel RJ, Kibbler CC. The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. *J Hosp Infect* 1998; 39(2):95-109.
- 22- Maria Jose´ Linares, Guadalupe Charriel, Francisco Soli´s, Fernando Rodriguez, Ana Ibarra, and M. Casal, Susceptibility of Filamentous Fungi to Voriconazole Tested by Two Microdilution Methods, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Jan. 2005, p. 250–253
23. Moore CB, Walls CM, Denning DW. In vitro activity of the new triazole BMS-207147 against *Aspergillus* species in comparison with itraconazole and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(2):441-3.
- 24- Ravi Kumar, Sandeep Kumar Shrivastava, Arunaaloke Chakraborti, Comparison of Broth Dilution and Disc Diffusion Method for the Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus flavus*, *Am. J. Biomed. Sci.*, 2010; 2(3): 202-208.
25. Perfect, J.R., Schell, W.A. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis.*, 1996; 22 (2): 112-8.
26. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN; International Fungal Surveillance Participant Group. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1):78-83.
- 27- Serrano Mdel C, Valverde-Conde A, Chávez M M, Bernal S, Claro RM, Pemán J, et al. In vitro activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER002, LY303366) and amphotericin B against *aspergillus* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45(2):131-5.
- 28- SHI Jun-yan, XU Ying-chun, SHI Yi, LÜ Huo-xiang, LIU Yong, ZHAO Wang-sheng, CHEN Dong-mei, XI Li-yan, ZHOU Xin, WANG He and GUO Li-na, In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp. against voriconazole, itraconazole, posaconazole, amphotericin B and caspofungin, *Chin Med J* 2010; 123(19):2706-2709
- 29- Shalit, Itamar Yona Shadkchan, Zmira Samra, and Nir Osherov, In Vitro Synergy of Caspofungin and Itraconazole against *Aspergillus* spp.: MIC versus Minimal Effective Concentration End Points, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr. 2003, p. 1416–1418
30. Spanakis EK, Aperis G, Mylonakis E. New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. *Clin Infect Dis.* 2006 Oct; 43(8):1060-8.
- 31- Sofia Perea, Gloria Gonzalez, Annette W. Fothergill, William R. Kirkpatrick, Michael G. Rinaldi and

Thomas F. Patterson<sup>1</sup>, In Vitro Interaction of Caspofungin Acetate with Voriconazole against Clinical Isolates of *Aspergillus* spp. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Sept. 2002, p. 3039–3041

32- Soukeina, Gheith. et al. In vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole and caspofungin of *Aspergillus* spp. isolated from patients with haematological malignancies in Tunisia. *Gheith et al.*, 2014; (3):19.