بررسی حساسیت دارویی گونه‌های آسپرژیلوس جداشده از ضایعات بالینی به برخی داروهای ضدقارچی رایج درشرایط In- vitro

سیدجمال هاشمی
فریده زینی، روشنک داعی
انسیه زیبافر، میرابوالفضل ذاکری*

گروه انگل‌شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات مختلف نشان داده‌اند علی‌رغم توسعه داروهای ضد قارچی و به دلیل افزایش بروز مقاومت دارویی، افزایش Minimum Inhibitory Contration (MIC) و انتقال مقاومت (Cross- resistance) در میان ایزوله‌های آسپرژیلوس، میزان مرگ و میر عفونت‌های فرصت طلب و مهاجم ناشی از گونه‌های آسپرژیلوس افزایش یافته است. عدم پاسخ موثر به درمان‌های رایج و عدم دسترسی به اطلاعات حساسیت دارویی شایع‌ترین ایزوله‌های آسپرژیلوس بهانه‌ای برای طراحی و اجرای مطالعه اخیر گردید. ***روش بررسی:*** در طی ۱۳ ماه تعداد ۵۰ ایزوله کلینیکی آسپرژیلوس بر اساس روش Klich 2002 و مشخصات مورفولوژیک تشخیص داده شدند. سپس تست حساسیت دارویی آن‌ها طبق روش استاندارد Broth Microdillution NLCCLS– M38A انجام گرفت. ***یافته‌ها:*** در این بررسی مشاهده شد که ۷/۵٪ ایزوله‌های *A.flavus* با MIC>۲µg/ml در رابطه با داروی آمفوتریسین B(AMB) احتمالاً به عنوان ایزوله کلینیکی مقاوم و ۲۵٪ ایزوله‌ها در رابطه با داروی ایتراکونازول (ITR) به واسطه MIC<۸µg/ml، ایزوله با حساسیت کمتر تلقی شدند. در رابطه با داروی وریکونازول (VRC) نیز در مقایسه با مطالعات خارج از ایران، ایزوله‌ها از حساسیت کمتری برخوردار بودند. دامنه MIC ۹ استرین *A.niger* و MIC ۱ استرین *A.fumigatus* در رابطه با هر سه دارو در مقایسه با برخی مطالعات مشابه خارجی افزایش داشت. ***نتیجه‌گیری:*** ما در این بررسی مشاهده کردیم که دامنه MIC ایزوله‌ها در اکثر موارد در دامنه MIC استرین‌های استاندارد و در برخی موارد در دامنه مطالعات مشابه خارجی و در موارد قابل اهمیتی هم خارج از این دامنه‌ها قرار گرفت که حکایت از حساسیت کمتر ایزوله‌های ایرانی و افزایش MIC آن‌ها دارد.

* نویسنده مسئول: خوی، میدان ولیعصر، ،بیمارستان مدنی، آزمایشگاه تلفن: ۰۹۱۴۴۶۲۲۶۷۵
email: zakeri_fazel_msph@yahoo.com

کلمات کلیدی: آسپرژیلوس، مقاومت دارویی، انتقال مقاومت، MIC، آمفوتریسین B، ایتراکونازول، وریکونازول.

مقدمه

در سال‌های اخیر به دلیل افزایش شمار بیماران نقص ایمنی، عفونت‌های قارچی فرصت طلب به یک مشکل عمده پزشکی تبدیل شده است. میزان بروز آسپرژیلوزیس (Aspergillosis) نیز در دو دهه اخیر به بالاترین حد خود رسیده و به یکی از مرگبارترین عفونت‌های قارچی فرصت طلب و مهاجم تبدیل شده است.[۱و۲] افزایش میزان بروز مرگ و میر ناشی از آسپرژیلوزیس مهاجم با افزایش مصرف داروهای ایمونوساپرسیو در درمان بیماری‌های اتوایمیون و گسترش ایدز (AIDS) و افزایش شیمی درمانی علیه تومورهای مختلف و افزایش تعداد و تنوع انجام پیوندها مربوط می‌باشد.[۳و۴] علی‌رغم توسعه داروهای ضدقارچی در دهه‌های اخیر، هنوز تعداد و طیف درمان‌های مؤثر، محدود و سمیت و مسایل فارماکوکینتیک مرتبط با آن‌ها مشکل‌ساز است. آمفوتریسین B در چهار دهه اخیر، علی‌رغم میزان موفقیت پایین، هنوز در سطح وسیعی مصرف شده و به‌عنوان داروی خط اول و انتخابی در درمان آسپرژیلوزیس مهاجم باقی مانده است.[۵-۸] گونه‌های متعددی از قارچ‌ها مقاومت اکتسابی In vitro و هم مقاومت کلینیکی In vivo به عوامل ضدقارچی کلاسیک را مطرح می‌نمایند که قبلا متعلق به گونه‌های حساس بودند.[۹و۱۰] این افزایش مقاومت ضرورت نیاز به عوامل ضدقارچی جدید را مطرح ساخت. در دو دهه اخیر نیز میزان حساسیت گونه‌های آسپرژیلوس به داروهای ضدقارچی و به‌ویژه آزول‌ها کاهش یافته و تمایل به افزایش Minimum Inhibitory

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-16]

Concentration (MIC) در میان ایزوله‌ها شیوع پیدا کرده است.[۱۱و۱۲] مطالعات متعددی حاکی از افزایش مقاومت دارویی گونه‌های آسپرژیلوس داشته و پیامد بروز انتقال مقاومت (Cross resistant) بین تری‌آزول‌های جدید و سایر داروها را نگران‌کننده می‌نماید. مروری بر مطالعات انجام یافته در ایران نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف آسپرژیلوس و شایع‌ترین گونه آن یعنی *A.flavus* از نمونه‌های مختلف بالینی جدا و گزارش گردیده‌اند. اما در خصوص حساسیت دارویی آن‌ها مطالعه‌ای صورت نگرفته است. علی‌رغم این‌که در مطالعات متعددی در خارج از کشور به آن پرداخته شده است. هاشمی و همکاران، در دو بررسی متفاوت عامل ۲۶/۶٪ و ۱۹٪ موارد اونیکومایکوزیس را به کپک‌های غیر درماتوفیتی و در یکی از این دو بررسی با ۳۵٪ به *A.flavus* نسبت دادند.[۱۴و۱۵] بدیعی نیز در مطالعه ۱۴۲ بیمار مبتلا به بیماری‌های قارچی با زمینه‌های قبلی، شش مورد *A.flavus* و دو مورد *A.fumigatus* ایزوله نمود.[۱۶] کردبچه و زینی هفت مورد سینوزیت قارچی مهاجم را که عامل پنج مورد از آن‌ها *A.flavus* و دو مورد از آن‌ها *A.fumigatus* بود، گزارش نمودند.[۱۷] زینی و دهقان نیز در مطالعه بر روی ۲۳ ایزوله آسپرژیلوس از بیماران با سینوزیت قارچی، عامل تمامی آن‌ها را به گروه *A.flavus* و یک ایزوله را هم به گونه *A.oryzea* نسبت دادند.[۱۸] Denning و همکاران اولین موارد مقاومت دارویی *A.fumigatus* را به داروی ایتراکونازول نشان دادند.[۱۱] در مطالعه مشترک Deninng و Moore نیز که بر روی ۹۴ ایزوله بالینی آسپرژیلوس انجام شده بود، ۳٪ ایزوله‌ها MIC بالای ۸µg/ml برای ایتراکونازول و ۲٪ ایزوله‌ها MIC بالا برای وریکونازول داشتند. همچنین مقاومت متقاطع در ۱٪ ایزوله‌ها مشاهده شد.[۱۹] با توجه به افزایش بروز مرگ و میر ناشی از قارچ‌های فرصت‌طلب و به‌خصوص آسپرژیلوزیس و گزارش‌های متعدد مقاومت و کاهش حساسیت دارویی در مطالعات خارج از کشور و اهمیت لزوم گزینش درمان مؤثر و با عنایت به این‌که درمان‌های ضد قارچی رایج در ایران پاسخ مناسبی را در مبتلایان در بر نداشته و تاکنون نیز مطالعه‌ای در خصوص میزان حساسیت گونه‌های آسپرژیلوس در ایران صورت نگرفته، لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی حساسیت دارویی شایع‌ترین ایزوله‌های ایرانی آسپرژیلوس، به ارزیابی MIC هریک از ایزوله‌ها در مقابل داروهای ضد قارچی رایج مصرفی در کشورمان، از جمله آمفوتریسین B، ایتراکونازول و وریکونازول می‌پردازد.

روش بررسی

پژوهش حاضر از نوع پژوهش توصیفی است که به‌صورت مقطعی در مدت ۱۳ ماه در فاصله شهریور ۱۳۸۸ تا مهر ۱۳۸۹ بر روی ۵۰ ایزوله آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بالینی از بیماران مراجعه‌کننده به بخش قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته است.

استرین‌های مورد مطالعه: استرین‌های مورد مطالعه مطابق اهداف پژوهش از گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بالینی ارجاعی به بخش قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتخاب شدند. از ۵۰ استرین جداشده، ۴۰ استرین به *A.flavus*، ۹ استرین به *A.niger* و یک استرین به *A.fumigatus* تعلق گرفت. تشخیص گونه‌های مورد بررسی از طریق خصوصیات مرفولوژیکی و بر اساس روش Klich2002 صورت گرفت. به‌علاوه دو استرین رفرانس شامل *A.flavus* CBS ۲۸/۹۵ و *A.fumigutus* ۵۴۲/۷۵ CBS که از موسسه CBS تهیه شدند مورد استفاده قرار گرفتند.

تست حساسیت دارویی به روش Broth Microdilution: در این مطالعه از روش استاندارد Broth Microdillution مطابق آنچه که در دستورالعمل NCCLS- M38A ارائه شده جهت بررسی و ارزیابی MIC هریک از ایزوله‌ها و استرین‌های استاندارد در مقابل داروهای مورد بررسی (آمفوتریسین B، وریکونازول و ایتراکونازول) استفاده شد و به ترتیب زیر انجام گرفت.[۲۵]

تهیه محلول مادر (استوک، Stock) دارویی: طبق راهنمای CLSI داروها بر اساس محلول و غیرمحلول بودن در آب به دو دسته تقسیم می‌شوند. داروهای مورد بررسی در این پژوهش از نوع غیر محلول در آب و محلول در دی متیل سولفاکساید (DMSO) بودند. پودر خالص آمفوتریسین B و ایتراکونازول و وریکونازول با مارک SIGMA امریکا تهیه شد. به منظور تهیه محلول استوک ۱۶۰۰µg/ml از داروهای فوق، مقدار ۰/۰۸gr از هر یک از داروها توزین و جداگانه در ۵۰ml، DMSO حل گردید و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد تا خودبه‌خود استریل شود. محلول‌های استوک فوق در حجم‌های ۴ml تقسیم شد و در $-70^{\circ}C$ تا شش ماه قابل نگهداری بود. آماده‌سازی محیط کشت RPMI 1640: طبق توصیه روش استاندارد NCCLS-M38A جهت رقیق‌سازی محلول‌های استوک دارویی از

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-16]

محیط کشت RPMI 1640 (با گلوتامین و فنل رد و بدون بی‌کربنات با شناساگر pH) استفاده شد. برای تهیه این محیط کشت، ۱۰/۴gr از پودر (RPMI) 1640 Roswell Park Momorial Instiute، 1640 و ۰/۱۶۵mol معادل ۳۴/۵۳gr از بافر MOPS[3-(N-morpholino) Paranesulfonic Acid] (با مارک SIGMA امریکا) در یک لیتر آب مقطر استریل با تکان ملایم حل گردید. سپس pH محیط با استفاده از NaoH یک نرمال (۱mol/lit) و با استفاده از کاغذ pH متر به pH=۷ رسانده شد. محیط به‌دست آمده با فیلتر ۰/۴۵µm استریل گشت و در ۴ °C به مدت یک ماه قابل نگهداری شد.

تهیه رقت‌های دارویی: جهت انجام تست میکرودایلوشن و تهیه رقت‌های دارویی هر سه داروی مورد بررسی، ۱۰ رقت از ۰/۰۳۱۲۵ تا ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر طبق جدول ۱ فراهم شد.

آماده کردن استرین رفرانس: برای این مطالعه از دو استرین استاندارد *A.flavus* CBS 28.95 و *A.fumigutus* CBS542.75 استفاده شد. ابتدا ۱۰ml محیط سابورو دکستروز مایع (S) به هر ویال استرین رفرانس در کنار شعله اضافه شد تا به‌صورت سوسپانسیون در آید. از سوسپانسیون به‌دست آمده هریک از گونه‌ها بر روی محیط S کشت داده شد تا از خالص و زنده بودن آن‌ها اطمینان حاصل شود. و در ادامه از هر یک از ارگانیسم‌ها چندین لوپ به‌طور جداگانه به لوله‌های در پیچ دار حاوی ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل منتقل شد، تا به‌صورت سوسپانسیون در آمدند آنگاه جهت مصارف بعدی در محل تاریکی نگهداری شدند.

تهیه سوسپانسیون قارچی: مطابق دستورالعمل CLSI از کشت‌های رسیده هریک از گونه‌ها در لوله‌های حاوی محیط کشت PDA (پتیتو دکستروز آگار) به کمک اضافه کردن یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل و یک قطره توین ۲۰، سوسپانسیون اولیه اسپور تهیه و سپس به لوله استریل دیگری منتقل گردید و سپس به کمک ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه خوب مخلوط شد.

در ادامه اسپورهای سوسپانسیون به کمک تهیه رقت‌های متوالی و مناسب با آب مقطر و شمارش آن‌ها با لام هموسیتومتر به میزان $۲-۵\times۱۰^{۶}$CFU/ml تنظیم شد. برای به‌دست آوردن شمارش $۲-۵\times۱۰^{۵}$CFU/ml و غلظت نهایی، دوباره با آب مقطر استریل رقت ۱:۱۰ تهیه و سوسپانسیون نهایی برای انجام تست حساسیت دارویی استفاده گردید.

انجام تست NCCLS-M38A Broth Microdillution: طبق پروتکل، رقت‌های سریال برای هر سه دارو مورد بررسی در ۱۰ رقت در میکرو پلیت‌های مسطح ۹۶ خانه‌ای به مقدار ۱۰۰µl برای هر چاهک تهیه شد، به طوری که چاهک اول حاوی بیشترین غلظت (۱۶µg/ml) و چاهک دهم حاوی کم‌ترین غلظت (۰/۰۳۱۲۵µg/ml) دارو باشد. در ادامه ۱۰۰µl از سوسپانسیون تلقیحی فینال به هر چاهک اضافه شد. بدین ترتیب این دو ۱:۱ رقیق شده و به غلظت نهایی رسیدند. چاهک یازدهم حاوی ۲۰۰µl محیط RPMI و فاقد دارو و ارگانیسم به عنوان کنترل استریلیتی (منفی) و چاهک دوازدهم حاوی ۱۰۰µl محیط RPMI بدون دارو و ۱۰۰µl از سوسپانسیون تلقیحی و به عنوان کنترل رشد (مثبت) جهت مقایسه رشد با سایر چاهک‌ها در نظر گرفته شد. در ادامه میکروپلیت‌ها پس از شیک (Shake) ملایم در دمای ۳۵ °C، به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. نمونه‌ها در سری دو تایی کار شدند.

خواندن نتایج MIC: طبق دستورالعمل CLSI- M38A جهت خواندن نتایج MIC از روش چشمی (Visual) استفاده شد در این روش Minimum Inhibitory Concentration (MIC) یعنی پایین‌ترین غلظت دارویی که بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون مانع رشد قابل ملاحظه قارچ می‌شود به‌صورت چشمی و به کمک یک آینه با بزرگنمایی و مقایسه رشد قارچ در هر رقت و چاهک با حفره کنترل رشد (فاقد دارو) انجام گردید. مطابق یک رسم و قاعده کلی برای نشان دادن میزان رشد طبق راهنما از پنج امتیاز یعنی امتیاز صفر (عدم رشد واضح)، امتیاز یک (۲۵٪ رشد)، امتیاز دو (۵۰٪ رشد)، امتیاز سه (۷۵٪ رشد)، امتیاز چهار (۱۰۰٪ رشد) در مقایسه با حفره کنترل، که رشد ۱۰۰٪ دارد، استفاده شد. برای آمفوتریسین B اولین حفره از سمت رقت بیشتر که در آن ۱۰۰٪ رشد قارچ مهارشده بود، به عنوان MIC90 تعیین و تلقی گردید و برای تری‌آزول‌ها اولین حفره از سمت رقت بیشتر که در آن ۵۰٪ رشد قارچ در مقایسه با حفره کنترل رشد مهار شده بود، به عنوان MIC50 تعیین و ثبت گردید.

آماده‌سازی و تفسیر نتایج: طبق دستورالعمل NCCLS-M38A چنانچه دامنه MIC ایزوله‌ها در دامنه MIC استرین‌های استاندارد قرار می‌گرفت، به عنوان ایزوله حساس و در غیر این صورت، مقاوم تلقی شدند. در رابطه با آمفوتریسین B نیز چنانچه اطلاعات اولیه حاکی از داشتن MIC< ۲µg/ml بود به عنوان ایزوله حساس و در غیر این

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-16]

صورت، مقاوم تلقی شدند. در رابطه با تری‌آزول‌ها نیز چنانچه MIC< ۸µg/ml به دست آمد، به عنوان ایزوله کلینیکی حساس و در غیر این صورت مقاوم تلقی شدند. در رابطه با استرین‌ها و داروهایی که به دامنه MIC آن‌ها در پروتکل اشاره نشده، با مطالعات مشابه انجام شده مقایسه و بحث و نتیجه‌گیری صورت گرفت.

یافته‌ها

با توجه به جدول ۲ ملاحظه می‌شود که نتایج به دست آمده برای استرین‌های استاندارد CBS هلند کاملا در دامنه MIC استرین‌های استاندارد ATCC راهنمای CLSI قرار گرفته و با آن مطابقت دارد. با توجه به جدول ۳، دامنه MIC به دست آمده برای آمفوتریسین B معادل ۰/۵–۴µg/ml می‌باشد که در مقایسه با دامنه اثر استرین استاندارد ۱۰۰٪(۴۰ مورد) از *A.flavus* های مورد مطالعه در دامنه مذکور قرار گرفتند با این توضیح که ۹۲/۵٪(۳۷ مورد) از ایزوله‌های مورد مطالعه MIC< ۲µg/ml و ۷/۵٪(سه مورد) از آن‌ها MIC90=۴ داشتند. دامنه MIC به‌دست آمده برای ایتراکونازول ۱–۰/۲۵ می‌باشد که در مقایسه با دامنه اثر استرین استاندارد ۳۰ مورد (۷۵٪) از ایزوله‌ها در این دامنه و ۱۰ مورد (۲۵٪) با MIC50=۱ بالاتر از این دامنه قرار گرفتند. دامنه MIC برای وریکونازول و *A.flavus* های مورد مطالعه برابر ۴–۰/۲۵ می‌باشد که در مقایسه با MIC این دارو برای استرین استاندارد، ۱۰۰٪(۴۰ مورد) ایزوله‌های مورد مطالعه در دامنه MIC مذکور قرار گرفتند. مطابق جدول ۴ دامنه MIC به دست آمده برای داروی AMB (۱–۰/۵)، ITR (۲–۰/۵) و VRC (۲–۰/۲۵) در ارتباط با استرین‌های *A.niger*، در برخی موارد در دامنه MIC به دست آمده از مطالعات مشابه[۲۴-۲۰] قرار گرفت و در برخی موارد هم با آن‌ها مغایرت داشت. با توجه به جدول ۵، MIC به‌دست آمده

جدول- ۱: روش تهیه رقت‌های دارویی آمفوتریسین B، ایتراکونازول و وریکونازول با روش NCCLS-M38A.

مرحله	غلظت (µg/ml)	منبع	+ حجم (ML)	DMSO (ML) (دی‌متیل سولفوکساید)	غلظت میانی (µg/ml)	غلظت نهایی ۱:۱۰۰ (µg/ml)
۱	۱۶۰۰	Stock	–	–	۱۶۰۰	۱۶
۲	۱۶۰۰	Stock	۰/۵	۰/۵	۸۰۰	۸
۳	۱۶۰۰	Stock	۰/۵	۱/۵	۴۰۰	۴
٤	۱۶۰۰	Stock	۰/۵	۳/۵	۲۰۰	۲
۵	۲۰۰	مرحله ۴	۰/۵	۰/۵	۱۰۰	۱
٦	۲۰۰	مرحله ۴	۰/۵	۱/۵	۵۰	۰/۵
۷	۲۰۰	مرحله ۴	۰/۵	۳/۵	۲۵	۰/۲۵
۸	۲۵	مرحله ۷	۰/۵	۰/۵	۱۲/۵	۰/۱۲۵
۹	۲۵	مرحله ۷	۰/۵	۱/۵	۶/۲۵	۰/۰۶۲۵
۱۰	۲۵	مرحله ۷	۰/۵	۳/۵	۳/۱۲۵	۰/۰۳۱۲۵

جدول- ۲: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) داروهای ضد قارچی علیه گونه‌های استاندارد با روش NCCLS-M38A.

ارگانیسم	حساسیت	MIC یا دامنه MIC (µg/ml)		
	تعداد اسپور تلقیحی	آمفوتریسین B (AMB)	ایتراکونازول (ITR)	وریکونازول (VRC)
A.flavus*1 28.95CBS	۲–۵ ×۱۰^۵	۲	۰/۵	۰/۵
A.flavus*2 ATCC 204304	۲–۵ ×۱۰^۵	۰/۵–۴	۰/۲۵–۰/۵	۰/۵–۴
A.fumigatus*1 542.75 CBS	۲–۵ ×۱۰^۵	۲	۰/۲۵	۰/۲۵
A.fumigatus*2 ATCC 204305	۲–۵ ×۱۰^۵	۰/۵–۲	۰/۱۲۵–۱	–

*1 سوش‌های استاندارد مورد استفاده در این بررسی، *2 سوش‌های استاندارد مورد اشاره در راهنمای CLSI

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-16]

جدول- ۳: دامنه Minimum Inhibitory Concentration (MIC) داروهای ضدقارچی علیه استرین‌های A.flavus با روش NCCLS-M38A.

دارو	دامنه MIC رفرانس (µg/ml)	دامنه MIC به‌دست آمده (µg/ml)	تعداد و درصد استرین‌های A.flavus در دامنه MIC رفرانس	تعداد و درصد استرین‌های A.flavus بالاتر از دامنه MIC رفرانس	تعداد و درصد استرین‌های A.flavus بالاتر از MIC=۸µg/ml برای آزول‌ها	تعداد و درصد استرین‌های A.flavus بالاتر از MIC=۲µg/ml برای AMB
آمفوتریسین B (AMB)	۰/۵–۴	۰/۵–۴	۳۷(٪۹۲/۵)	–	–	۳(٪۷/۵)
ایتراکونازول (ITR)	۰/۲۵–۰/۵	۰/۲۵–۱	۳۰(٪۷۵)	۱۰(٪۲۵)	–	–
وریکونازول (VRC)	۰/۵–۴	۰/۲۵–۴	۴۰(٪۱۰۰)	–	–	–

جدول- ٤: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) داروهای ضدقارچی علیه استرین‌های A.niger با روش NCCLS-M38A.

دارو	دامنه MIC در مطالعات مختلف (µg/ml)	دامنه MIC به‌دست آمده (µg/ml)	تعداد و درصد استرین‌های A.niger با MIC>۲ برای AMB	تعداد و درصد استرین‌های A.niger با MIC>۸ برای ITR
آمفوتریسین B (AMB)	۰/۱۲۵–۰/۵(۲۲) ۰/۲۵–۰/۵(۲۱) ۰/۱۲۵–۱(۲۱) ۰/۱۲۵–۰/۵(۲۰)	۰/۵–۱	–	–
ایتراکونازول (ITR)	۲(۲۰)> تا ۱ ۰/۰۶–۰/۵(۲۱) ۰/۲۵(۲۱)	۰/۵–۲	–	–
وریکونازول (VRC)	۰/۰۳–۰/۱۲۵(۲۲) ۰/۵–۲(۲۰) ۰/۰۶–۰/۱۲۵(۲۲) ۰/۰۳–۲(۲۳) ۰/۱۲۵–۲(۲۳) ۰/۱۲۵–۱(۲۴)	۰/۲۵–۲	–	–

AMB= Amphotericin B. ITR=Itraconazole, VRC=Voriconazole

جدول- ۵: MIC داروهای ضد قارچی علیه یک استرین A.fumigatus با روش NCCLS-M38A.

ارگانیسم	دارو	MIC(µg/ml)					
		AMB		ITR		VRC	
		MIC به دست آمده	دامنه MIC رفرانس	MIC به دست آمده	دامنه MIC رفرانس	MIC به دست آمده	دامنه MIC مطالعات مشابه
A.fumigatus		۲	۰/۵–۲	۱	۰/۱۲۵–۱	۰/۲۵	۰/۰۳–۰/۱۲ ۰/۱۲۵–۱ ۰/۰۳–۱ ۰/۰۶–۰/۵

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-16]

A.fumigatus نسبت به داروی AMB (MIC90=۲) و ITR (MIC50=۱)، در دامنه MIC استرین استاندارد قرار گرفت و با آن مطابقت داشت. در رابطه با وریکونازول نیز MIC به دست آمده (MIC50=۰/۲۵) در برخی موارد در دامنه MIC مطالعات مشابه[۲۴و۲۳و۲۲و۱۲] قرار گرفت و در برخی موارد با آن‌ها مغایرت داشت.

بحث

آسپرژیلوس یکی از شایع‌ترین عفونت‌های فرصت طلب و مهاجم در افراد ایمونوساپرس و زمینه‌دار در دو دهه اخیر است. آ.فومیگاتوس شایع‌ترین عامل آسپرژیلوس در اکثر مطالعات خارج از ایران است. با این همه، در کشورمان فراوان‌ترین گونه ایزوله شده از نمونه‌های بالینی مربوط به آ.فلاووس می‌باشد. در حال حاضر به موازات افزایش مصرف آمفوتریسین B و آزول‌ها در درمان آسپرژیلوس مهاجم، مقاومت دارویی و کاهش حساسیت برخی از ایزوله‌ها شیوع پیدا کرده و مشکلاتی را در درمان مبتلایان ایجاد کرده است. در مطالعه حاضر سعی بر آن شده تا حساسیت دارویی و MIC شایع‌ترین ایزوله‌های ایرانی، با استفاده از متد استاندارد NCCLS-M38A ارزیابی و نتایج آن در جهت انتخاب درمان‌های بهتر و مؤثرتر و ارتقاء سلامت جامعه مورد تحقیق و پژوهش قرار گیرد. ایزوله‌های مورد مطالعه استرین‌های استاندارد CBS هلند و گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بالینی هستند. مطابق نتایج تحقیق MIC به‌دست آمده برای استرین‌های رفرانس (CBS) برای هر سه دارو مورد بررسی در دامنه MIC استرین استاندارد مورد اشاره در راهنمای CLSI گنجیده وبا آن مطابقت دارد (جدول ۲). از ۴۰ استرین *A.flavus* مورد مطالعه دامنه MIC آمفوتریسین B برای همه استرین‌ها در دامنه ۴-۰/۵=MIC قرار گرفت که با دامنه اثر استرین استاندارد مطابقت دارد. با توضیح این‌که احتمال حساس بودن ۹۲/۵٪(۳۷ مورد) ایزوله‌ها به لحاظ MIC90<۲ و هم‌چنین احتمال مقاوم بودن ۷/۵٪(سه مورد) ایزوله‌ها به لحاظ داشتن MIC90>۲ وجود دارد. نتایج به‌دست آمده با مطالعه Serrano[۲۲] در سال ۲۰۰۳ با متد M38P با دامنه ۲- ۰/۰۶=MIC و MIC90=۱ و Kuzucu[۲۱] در سال ۲۰۰۴ با متد SAAS با دامنه ۱-۰/۲۵=MIC و با متد M38P با دامنه ۱-۰/۱۲=MIC مطابقت نداشته و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Lass-florl[۲۰] در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST با دامنه ۲< تا MIC=۰/۱۲ و ۲=MIC90 مطابقت داشت. دامنه MIC به دست آمده برای ۴۰ استرین *A.flavus* و داروی ایتراکونازول برابر ۱-۰/۲۵ که در مقایسه با دامنه اثر استرین استاندارد ۳۰ مورد (۷۵٪) از ایزوله‌ها در این دامنه قرار گرفته و با MIC<۸ حساس تلقی شدند. ۱۰ مورد (۲۵٪) ایزوله‌ها با دامنه MIC50=۱ بالاتر از این دامنه و به لحاظ MIC<۸ نیز حساس تلقی شدند که حساسیتشان کمتر بود. نتایج به دست آمده با مطالعه Serrano[۲۲] در سال ۲۰۰۳ با متد M38P و دامنه MIC=۰/۰۳-۰/۱۲ و MIC50=۰/۰۳ و Kuzucu[۲۱] در سال ۲۰۰۴ با متد M38P و دامنه ۰/۱۲- ۰/۰۶=MIC و با متد SAAS با دامنه MIC=۰/۰۳-۰/۱۲، مطابقتی نداشت و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Lass-florl[۲۰] در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST با دامنه ۰/۵-۰/۱۲=MIC مطابقت داشت. دامنه MIC ۴۰ استرین *A.flavus* و داروی وریکونازول برابر ۴-۰/۲۵ به دست آمد که ۱۰۰٪ (۴۰ مورد) از استرین‌های مورد مطالعه در دامنه اثر استرین استاندارد قرار گرفته و با MIC<۸ حساس تلقی شدند. نتایج به‌دست آمده با مطالعه Serrano[۲۲] در سال ۲۰۰۳ با متد M38P و دامنه MIC=۰/۰۳-۰/۱۲ و MIC50=۰/۰۶ و Linares با متد M38A و دامنه ۱-۰/۰۳=MIC و MIC50=۰/۲۵ و با متد Sensititer yeastone با دامنه MIC=۰/۰۶-۰/۵ مطابقت نداشته و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Chryssanthou[۲۳] در سال ۲۰۰۶ با متد M38A با دامنه ۲-۱=MIC و با متد EUCAST-AFST با دامنه ۲-۱=MIC و Lass-florl[۲۰] در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST با دامنه ۱-۰/۵=MIC مطابقت داشت. دامنه MIC برای ۹ استرین *A.niger* و آمفوتریسین B برابر ۱-۰/۵ به دست آمد که با مطالعه Serrano[۲۲] در سال ۲۰۰۳ با متد M38P با دامنه ۰/۵-۰/۱۲=MIC و MIC90=۰/۵ و Kuzucu[۲۱] در سال ۲۰۰۴ با متد M38P و دامنه ۰/۵-۰/۲۵=MIC و MIC90=۰/۵ و Lass-florl[۲۰] در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST و دامنه ۰/۵-۰/۱۲=MIC و MIC90=۰/۵ مطابقتی نداشته و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Kuzucu[۲۱] در سال ۲۰۰۴ با متد SAAS و دامنه ۱-۰/۱۲=MIC و MIC90=۰/۵ مطابقت داشت. دامنه MIC برای ۹ استرین A.niger و داروی ایتراکونازول برابر ۲-۰/۵ به دست آمد که با مطالعه، Serrano[۲۲] در سال ۲۰۰۳ با متد M38P با دامنه ۰/۱۲-۰/۰۳=MIC و MIC90=۰/۰۶ و Kuzucu[۲۱] در سال ۲۰۰۴ با متد M38P با دامنه ۰/۵-۰/۰۶=MIC و MIC50=۰/۲۵ و با متد SAAS

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-16]

با MIC50=۰/۲۵ مطابقتی نداشت و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Lass-florl[۲۰] در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST با دامنه ۲< تا ۱=MIC و ۱>MIC90 تطابق نزدیکی داشت که در مقایسه ایزوله‌های ایرانی حساسیت بیشتری داشتند. دامنه MIC ۹ استرین *A.niger* و داروی وریکونازول برابر ۲-۰/۲۵ به دست آمد که با مطالعه Serrano[۲۲] در سال ۲۰۰۳ با متد M38P با دامنه ۰/۱۲-۰/۰۶=MIC و MIC50=۰/۰۶ و Linares[۲۴] در سال ۲۰۰۵ با متد M38A با دامنه ۱-۰/۱۲۵=MIC و MIC50=۰/۲۵ و با متد Sensititer yeastone با دامنه ۱-۰/۱۲۵=MIC و MIC50=۰/۲۵ مطابقتی نداشت و ایزوله‌های ایرانی حساسیت کمتری داشتند. ولی با مطالعه Chryssanthou با متد M38A[۲۳] و دامنه ۲-۰/۰۳=MIC و با متد EUCAST-AFST[۲۳] و دامنه ۲-۰/۱۲=MIC و Lass-florl[۲۰] در سال ۲۰۰۸ با متد M38P و دامنه ۲-۰/۵=MIC و ۲=MIC50 با اختلاف در MIC50 و در مقایسه، ایزوله‌های ایرانی عموما حساسیت کمتری داشتند. در رابطه با ۱ استرین *A.fumigatus* و داروی آمفوتریسین B، ۲=MIC90 به دست آمد که در دامنه MIC استرین استاندارد (۲-۰/۵) قرار گرفت و به لحاظ ۲>MIC حساس تلقی شد. که با مطالعه Serrano[۲۲] در سال ۲۰۰۳ با متد M38P و دامنه ۲-۰/۰۶=MIC و ۱=MIC90 و Kuzucu[۲۱] در سال ۲۰۰۵ با متد SAAS در دامنه ۲-۰/۱۲۵=MIC و ۱=MIC90، تقریبا در دامنه اثر مشابه قرار گرفته ولی MIC90 متفاوتی داشتند که حاکی از حساسیت کمتر ایزوله ایرانی داشت. در مقایسه با مطالعه Dannaoui[۱۲] در سال ۲۰۰۵ با متد M38A و دامنه ۱-۰/۱۲۵=MIC و ۱=MIC90 و Kuzucu[۲۱] در سال ۲۰۰۴ با متد M38P و دامنه ۱-۰/۲۵=MIC و ۱=MIC90 و Lass-florl[۲۰] در سال ۲۰۰۸ با متد M38P و دامنه ۱-۰/۱۲=MIC و ۱=MIC90 نیز مطابقتی وجود نداشت و ایزوله های ایرانی حساسیت کمتری داشت. در رابطه با داروی ایتراکونازول و ۱ استرین *A.fumigatus* ۱=MIC50 به دست آمد که در دامنه اثر استرین استاندارد قرار گرفته و به لحاظ ۸>MIC حساس تلقی شد که با مطالعه Serrano[۲۲] در سال ۲۰۰۳ با متد M38P و دامنه ۰/۲۵-۰/۰۳=MIC و۰/۰۶=MIC50 و Dannaoui[۱۲] در سال ۲۰۰۵ و با متد M38A و دامنه ۰/۵-۰/۰۳=MIC و ۰/۱۲=MIC50 و Kuzucu[۲۱] در سال ۲۰۰۴ و با متد M38P و دامنه ۱۶-۰/۰۶=MIC و ۰/۱۲=MIC50 تطابقی نداشت و ایزوله ایرانی حساسیت کمتری داشت. ولی با مطالعه Lass-florl[۲۰] در سال ۲۰۰۸ با متد EUCAST-AFST و دامنه ۱-۰/۲۵=MIC و ۱=MIC90 تطابق داشت. در رابطه با ۱ استرین *A.fumigatus* و داروی وریکونازول، ۰/۲۵=MIC50 به دست آمد که با مطالعه Serrano[۲۲] در سال ۲۰۰۳ با متد M38P و دامنه ۰/۱۲-۰/۰۳=MIC و ۰/۰۳>MIC90 مطابقتی نداشت و ایزوله ایرانی حساسیت کمتری داشت. ولی با مطالعه Linares[۲۴] در سال ۲۰۰۵ با هر دو متد M38A و Sensititer yeastone و Chryssanthou[۲۳] در سال ۲۰۰۶ با دو متد M38A و EUCAST-AFST با دامنه ۲-۰/۰۳=MIC و ۲-۰/۱۲۵=MIC و Dannaoui[۱۲] در سال ۲۰۰۵ با متد M38A با دامنه ۰/۵-۰/۰۶=MIC و ۰/۲۵=MIC50 مطابقت داشت. به عنوان نتیجه‌گیری کلی نتایج MIC ایزوله‌های مورد بررسی و استرین‌های استاندارد CBS با دامنه اثر استرین رفرانس راهنمای CLSI و برخی از مطالعات مشابه مطابقت داشته و در موارد عدم تطابق نتایج، ایزوله‌های ایرانی حساسیت نسبتاً کمتری نسبت به داروهای مورد مطالعه داشتند. با توجه به افزایش افراد در معرض خطر و شیوع عفونت‌های فرصت طلبی چون آسپرژیلوزیس و کاهش حساسیت و مقاومت دارویی گونه‌های آسپرژیلوس مطالعه بر روی تعداد بیشتری نمونه در جوامع مختلف، پیشنهاد می‌گردد. همچنین بهتر است برای دستیابی به درمان‌های مؤثرتر، مطالعاتی با تعداد داروی بیشتر و با بررسی اثرات سینرژیسمی درمان‌های ترکیبی و داروهای نوظهور، صورت پذیرد.

References

1. 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.
2. Manuel RJ, Kibbler CC. The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. *J Hosp Infect* 1998;39(2):95-109.
3. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998;26(4):781-803; quiz 804-5.
4. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001;32(3):358-66. Epub 2001 Jan 26.
5. Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003;11(6):272-9.
6. Kauffman CA. Clinical efficacy of new antifungal agents. *Curr Opin Microbiol* 2006;9(5):483-8. Epub 2006 Aug 9.
7. Kelmenson VA. Treatment of pulmonary Aspergillosis. *Diseases of the Chest* 1959;36(1):442-3.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-16]

8. Warnock DW. Amphotericin B: an introduction. *J Antimicrob Chemother* 1991;28 Suppl B:27-38.
9. Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis* 1996;22 Suppl 2:S112-8.
10. 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.
11. 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.
12. Dannaoui E, Borel E, Monier MF, Piens MA, Picot S, Persat F. Acquired itraconazole resistance in Aspergillus fumigatus. *J Antimicrob Chemother* 2001;47(3):333-40.
13. Mosquera J, Denning DW. Azole cross-resistance in Aspergillus fumigatus. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(2):556-7.
14. 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.
15. 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]
16. Badiei 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.
17. Kordbacheh P, Badiee P, Alborzi A, Zaini F, Mirhendi H, Mahmoudi M, et al. Acute fulminant fungal sinusitis in patint with acute leukemia. *Iranian J Publ Health* 2008;37(2):46-51.
18. Dehghan P, Zaini F, Rezaei S, Jebali A, Kordbacheh P, Mahmoudi M. Detection of Aflr gene and toxigenicity of Aspergillus flavus. *Iranian J Publ Health* 2008;37(3):134-41.
19. 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.
20. Lass-Florl C, Perkhofer S. In vitro susceptibility testing in Aspergillus species. *Mycoses* 2008;51(2):437-46.
21. 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.
22. 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.
23. Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Comparison of the EUCAST-AFST broth dilution method with the CLSI reference broth dilution method (M38-A) for susceptibility testing of posaconazole and voriconazole against Aspergillus spp. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(9):901-4.
24. Linares MJ, Charriel G, Solís F, Rodriguez F, Ibarra A, Casal M. Susceptibility of filamentous fungi to voriconazole tested by two microdilution methods. *J Clin Microbiol* 2005;43(1):250-3.
25. Rex JH, Alexander BD, Andes D, Arthington-Skaggs B, Brown SD, Chaturveil V, et al. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. 2nd ed [Online]. 2002 [Cited 2011 Apr 15]. Available from: URL:http://www.clsi.org/source/orders/free/M38-A2.pdf

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-16]

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 2, May 2011: 83-91

In-vitro susceptibility of Aspergillus species isolated from cutaneous and visceral lesions to antifungal agents

Jamal Hashemi PhD.
Farideh Zaini PhD.
Roshanak Daie PhD.
Ensie Zibafar PhD.
Mir Abolfazl Zakeri MSPH.*

Department of Parasitology and Medical Mycology, School of Public Health, Tehran University Of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: January 31, 2011 Accepted: March 07, 2011

Abstract

***Background*:** Different studies have shown that despite the expanding number of antifungal agents, death rate caused by Aspergillus species has been increased during the recent decades due to drug-resistance occurrence, increased minimum inhibitory concentration (MIC) and cross-resistance among the isolated species. Regarding the lack of effective response to conventional treatments and antifungal susceptibility patterns of the most common isolated Aspergillus species, this study was undertaken to draw a clearer picture in the Iranian setting.

***Methods*:** During 13 months from September 2009 to October 2010, 50 clinically isolated Aspergillus cases were identified based on the method described by Klich (2002) and their morphological features. Subsequently, their susceptibility test was carried out according to NCCLS- M38A broth microdilution method.

***Results*:** We found that 7.5% of the isolated *A. flavus* with an MIC>2 µg/ml to amphotericin B were probably clinically resistant types, and 25% of them with an MIC<8 µg/ml to itraconazole were less sensitive isolated species. The isolates were less sensitive to voriconazole too. The MIC range of 9 strains of *A. niger* and the MIC of one strain of *A. fumigatus* had increased to all the three medications in comparison with similar foreign studies.

Conclusion: In this study we found that the MICs of most isolates were in the range of the reference strains and the MICs of some isolates were in the range of similar foreign studies. In some significant cases, the MICs were beyond the known ranges showing the lower sensitivity of Iranian isolates and their increased MIC patterns.

Keywords: Amphotericin B, aspergillus, cross-resistance, drug resistance, itraconazole, minimum inhibitory concentration, voriconazole.

*Corresponding author: Medical Laboratory, Madani Hospital, Valiasr Sq., Khoy, Iran.
Tel: +98-914-4622675
email: zakeri_fazel_msph@yahoo.com

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-16]