

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

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

خلاصه

مقدمه: کاندیدا آلبیکنس مخمری پاتوژن است که باعث عفونت‌های سیستمیک، واژینال و دهانی می‌شود. کاندیدایازیس 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 مایکروداپلوشن 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 ATCC ۱۰۲۳۱ به عنوان شاهد حساس و کاندیدا آلبیکنس استاندارد ATCC ۷۶۶۱۵ به عنوان شاهد مقاوم استفاده شد. برای تمام ایزوله‌ها مطابق استاندارد (CLSI M27-A3)، حداقل غلظت ممانعت‌کننده‌ی 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 هیتتون 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 مایکروداپلوشن 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 مایکروداپلوشن براث برای تعیین حساسیت ایزوله‌ها به دارو به طور معمول مشکل و وقت‌گیر بوده است.

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

مقدمه

(۱). مخمر کاندیدا آلبیکنس جزء دسته‌ای از قارچ‌های تک سلولی می‌باشد که به طریق جوانه زدن تکثیر می‌یابد و تحت شرایط محیطی و تغذیه‌ای خاص قادر به ایجاد میسلیوم‌های کاذب و حقیقی می‌باشد. این قارچ از نظر تولید مثل غیرجنسی در رده‌ی بلاستومیست و از نظر تولید مثل جنسی در رده‌ی آسکومیست قرار می‌گیرد (۲). کاندیدا آلبیکنس اغلب

کاندیدایازیس 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 کاندیدایازس به اشکال مختلف حاد، تحت حاد، مزمن و یا اسپورادیک است و عفونت می‌تواند همه‌ی قسمت‌های بدن را درگیر کند

^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.

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 ارگانسیم‌ها را در دهان بر هم زده، باعث تکثیر میکروارگانسیم و ایجاد برفک دهانی گردد. برفک دهانی معمول‌ترین و شایع‌ترین شکل کاندیدیازیس دهان است که بیشتر در مخاط ناحیه‌ی لثه‌ها، پشت زبان و کام ظاهر می‌یابد. این شکل کاندیدیازیس با رشد فوق‌العاده و کلونیزاسیون کاندیدا آلیکس 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 آلیکس در ایجاد برفک دهانی در مبتلایان به ایدز نسبت به سایر گونه‌های کاندیدا که برخی از آن‌ها مقاومت ذاتی به داروی فلوکونازول دارند، بیشتر است (۶). میزان مقاومت در ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلیکس 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 میکروداپلوشن براث برای تعیین حساسیت ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلیکس استفاده و نتایج آن‌ها با هم مقایسه شد.

روش‌ها

تعداد ایزوله‌های کاندیدا آلیکس 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 سوآپ استریل از ضایعات مخاطی دهان جمع‌آوری گردید. پس از کشت بر روی محیط سابوری دکستروز آگار، گونه‌های کاندیدا آلیکس 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 میکروداپلوشن براث، سوش استاندارد کاندیدا آلیکس ۱۰۲۳۱ American Type Culture Collection (ATCC) به عنوان شاهد حساس به داروی فلوکونازول و سوش استاندارد کاندیدا آلیکس ATCCV۶۶۱۵ به عنوان شاهد مقاوم به فلوکونازول استفاده شد. محیط‌های کشت مورد استفاده در این پژوهش به این

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 آلیکنس در لوله‌های حاوی ۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیونی در حدود 1×10^3 cfu/ml تهیه گردید (۱۱).

ب) تهیه‌ی محیط کشت سابوری: برای انجام این آزمون از محیط سابوری دکستروز براث و سابوری دکستروز آگار استفاده شد. پس از تهیه و استریل کردن محیط‌ها از محیط سابوری 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 ارگانسیم از بیشترین غلظت دی‌متیل سولفو اکساید بدون وجود دارو به عنوان شاهد دارو و از یک لوله‌ی حاوی محیط کشت و عدم وجود ارگانسیم به عنوان شاهد استفاده شد. لوله‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در داخل شیکر

ترتیب بود: محیط سابوری دکستروز آگار (Merck)، محیط سابوری دکستروز براث (Merck)، کروم آگار (Company Paris France)، پودر متیلن بلو (Merck)، پودر فلوکونازول (Sigma Alderich)، دیسک ۲۵ میکروگرمی فلوکونازول (Mast England)، محیط مولر هیتون آگار (Merck)، گلوکز (Merck).

برای ارزیابی حساسیت دارویی به روش دیسک دیفیوژن از نمونه‌های استاندارد و ۶۶ ایزوله‌ی بالینی کاندیدا آلیکنس سوسپانسیون سلولی به تعداد 1×10^6 سلول در یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی تهیه و بر روی محیط مولر هیتون آگار حاوی مکمل‌های گلوکز به میزان ۲ درصد و متیلن بلو به میزان ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر با سواب 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 آلیکنس با روش دیسک دیفیوژن

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

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 کانیدیا آلیکنس 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 کانیدیا آلیکنس مقاوم (ATCC ۷۶۶۱۵) و حساس (ATCC ۱۰۲۳۱) جهت تأیید نتایج استفاده گردید. تعداد و درصد فراوانی حساسیت ایزوله‌های بالینی کانیدیا آلیکنس نسبت به داروی فلوکونازول در دو روش میکروداپلوشن 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 میکروداپلوشن براث ۳ بار به طور همزمان تکرار شد. تعداد ارگانسیم در MIC_{۵۰} و تعداد ارگانسیم در MFC به دست آمده از رقت‌های مختلف دارویی تهیه شده در روش میکروداپلوشن براث به صورت نمودار رسم گردید (اشکال ۲ و ۳).

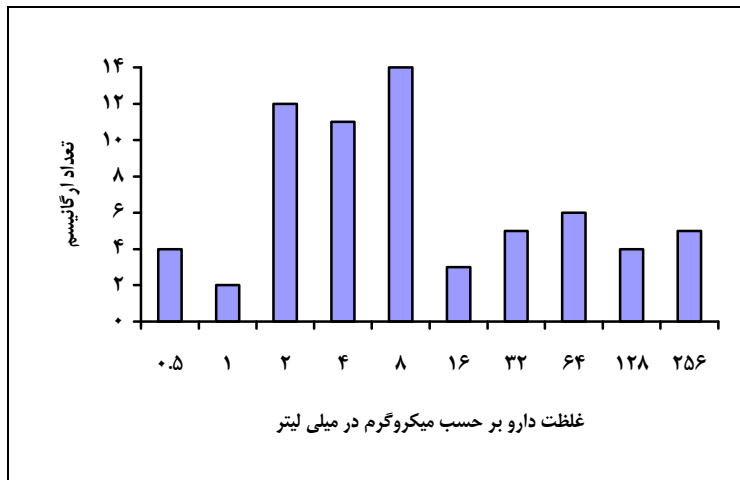
انکوباتور با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته، ۱۰ میکرولیتر از هر یک از محتویات لوله‌ها به پلیت‌های حاوی محیط سابوردکستروز آگار تلقیح و توسط سواب استریل پخش و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. بر اساس شمارش تعداد کلنی‌های رشد کرده از هر یک از 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 میکروداپلوشن براث و دیسک دیفیوژن جهت ارزیابی حساسیت ایزوله‌های بالینی کانیدیا آلیکنس 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 کانیدیا آلیکنس در رقت

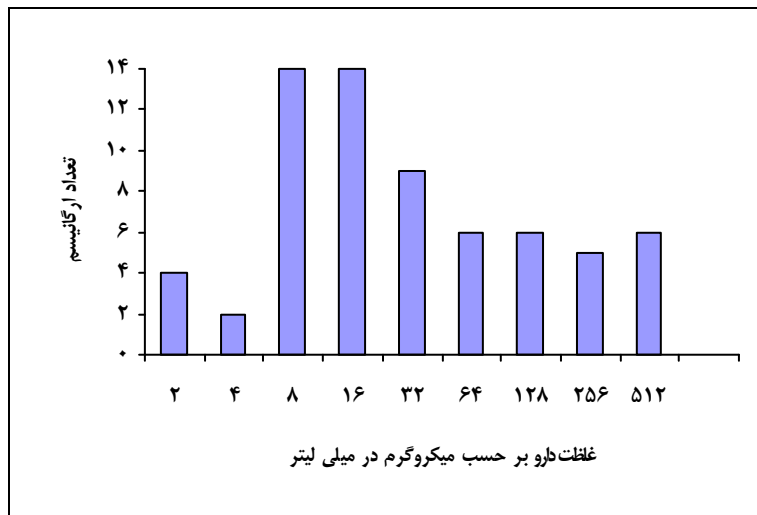
جدول ۱. فراوانی حاصل از تعیین میزان حساسیت داروی فلوکونازول بر روی ایزوله‌های بالینی

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



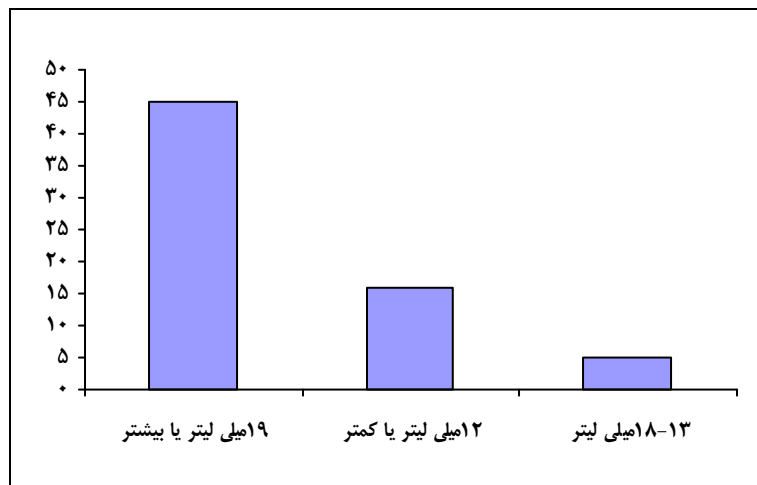
شکل ۲. تعداد ارگانیزم در MIC_{50} (Minimal inhibitory concentration 50) به دست آمده

از رقت‌های مختلف دارویی تهیه شده در روش مایکرودایلوشن براث



شکل ۳. تعداد ارگانیزم در MFC (Minimal fatal concentration) به دست آمده

از رقت‌های مختلف دارویی تهیه شده در روش مایکرودایلوشن براث



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

تعداد کانیدیا 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 کانیدیا معمول‌ترین قارچ‌هایی هستند که از عفونت‌های انسانی جدا می‌شوند. با وجود پیشرفت در مراقبت‌های بهداشتی و روش‌های درمانی، وقوع کانیدیازیس 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 (۱۴-۱۵). 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 بیماری‌هایی 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 عفونت‌های فرصت طلب از جمله کانیدیازیس شده است، اما ظهور گونه‌های کانیدای مقاوم به درمان منجر به افزایش وقوع این بیماری در بیماران مبتلا به ایدز شده است و در کنار سایر عفونت‌های 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 کانیدیا آلبیکنس قادر به کلونیزه شدن در دهان بیماران مبتلا به ایدز است و در ۵۰ درصد موارد دیگر سایر مخمرها نظیر کانیدیا دابلینسیس، کانیدیا گلابراتا، کانیدیا تروپیکالیس، کانیدیا کروژنی 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 کانیدیا 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 کانیدیا آلبیکنس عواملی از قبیل مقاومت ذاتی گونه‌های اندوژن کانیدیا آلبیکنس، جایگزینی کانیدیا آلبیکنس با یک گونه‌ی

ضرورت استفاده از روش‌های تعیین حساسیت دارویی عوامل قارچی را بیش از پیش آشکار ساخته است. تعیین حساسیت عامل ایجاد بیماری قبل از شروع درمان جهت درمان مناسب، کارآمد و ریشه‌کنی و حذف عوامل قارچی روش بسیار سودمندی می‌باشد تا بدین ترتیب از مصرف بی‌رویه داروها و بالطبع ایجاد مقاومت‌های دارویی ثانویه و ناخواسته جلوگیری شود. همچنین استفاده از داروی مناسب‌تر جهت درمان، پیش‌گیری از بروز مقاومت‌های 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 میکرودایلوشن برات و روش دیسک دیفیوژن به ترتیب $22/83$ و $24/33$ 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 کانیدیدا آلیکسنس و از طرفی باعث برهم خوردن تعادل فلور نرمال کانیدیدا در بدن می‌گردد. از

مقاوم‌تر (کاندیدا کروزئی و کانیدیدا گلابراتا)، جایگزینی کانیدیدا آلیکسنس فلور نرمال با یک گونه‌ی مقاوم‌تر کانیدیدا آلیکسنس، 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 فوتیپی) از جمله این عوامل می‌باشند (۱۸). Ruhnke و همکاران میزان مقاومت به داروی فلوکونازول را در ایزوله‌های کانیدیدا آلیکسنس 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 کانیدیدا آلیکسنس 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 کانیدیدا آلیکسنس جدا شده از حفره‌ی دهانی مبتلایان به ایدز را با روش میکرودایلوشن برات ارزیابی و میزان مقاومت به داروی فلوکونازول را $17/28$ درصد گزارش کردند (۲۲). Kabli حساسیت ۱۰۷ ایزوله‌ی کانیدیدا آلیکسنس را به داروی فلوکونازول با روش دیسک دیفیوژن مورد ارزیابی قرار داد. نتیجه‌ی به دست آمده حاکی از این بود که $26/1$ درصد از ایزوله‌ها به داروی فلوکونازول مقاوم بودند (۲۳).

شیوع عفونت‌های حاد و سیستمیک کانیدیدیایی و متعاقب آن درمان با داروهای ضد قارچی به ویژه ترکیبات آزولی و مقاومت نسبت به این ترکیبات،

مهم انجام آزمایش از مزایای این روش است.

نتیجه‌گیری

نظر به این که اختلاف معنی‌داری بین نتایج مایکروداپلوشن 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 آزمایشگاه‌های 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 مایکروداپلوشن 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.

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 مایکروداپلوشن براث و دیسک دیفیوژن توسط کارشناس آزمایشگاه قارچ‌شناسی 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 دیسک‌های مورد تأیید استاندارد‌های بین‌المللی، 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

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 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-Flörl 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-Flörl C, Perkhöfer 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-Ingróff 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.

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

Mojtaba Taghizadeh Armaki¹, Ehsan Farahbakhsh¹, Mohammad Hossein Yadegari PhD², Masoumeh Rajabi Bazl PhD³, Farzad Katiraei PhD⁴

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