

اثر آمفوتریسین B و فلوکونازول بر قارچ‌های جدا شده از بیمارستان

دکتر حسین نوروزی*^۱، دکتر دلارام کاظمی^۲، دکتر علی کاظمی^۳، لیلا حاجی^۴

۱- استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران. ۲- دکتری داروسازی. ۳- استادیار، گروه پرستاری و مامایی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین (پیشوا)، ورامین. ۴- دکتری دامپزشکی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران.

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های قارچی بیمارستانی در دهه اخیر در اثر افزایش بیماران دارای نقص ایمنی، افزایش چشمگیری داشته است. این مطالعه به منظور ارزیابی فعالیت ضدقارچی آمفوتریسین B و فلوکونازول علیه قارچ‌های جدا شده از محیط بیمارستان انجام شد. **روش بررسی:** این مطالعه توصیفی - تحلیلی روی ۳۳ نمونه قارچی جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستان امام خمینی (ره) تهران طی ۸ ماه در سال ۱۳۹۲ انجام شد. نمونه‌های قارچی با استفاده از سوآپ استریل تهیه شدند و نوع آنها با روش اسلاید کالچر تعیین شد. رقت‌های دارویی از ۱۲۸-۲۵۰ μg/ml و سوسپانسیون قارچی با محدوده سلولی ۱۰^۵-۵×۱۰^۵ cfu/ml تهیه شد. میزان MIC داروها طبق استاندارد NCCLS-M38P تعیین گردید.

یافته‌ها: آسپرژیلوس با فراوانی ۱۳ مورد (۳۹/۴ درصد) بیشترین و آلترناریا و سیرسینلا هر کدام با فراوانی یک مورد (۳ درصد) کمترین قارچ جدا شده بودند. محدوده MIC داروی فلوکونازول ۱۲۸-۶۴ μg/ml برای تمام سویه‌ها و محدوده MIC آمفوتریسین B ۱۶-۶۴ μg/ml تعیین شد. محدوده MIC آمفوتریسین B نسبت به فلوکونازول به طور معنی‌داری کاهش نشان داد (P<۰/۰۵). **نتیجه‌گیری:** سویه‌های قارچی جدا شده از محیط بیمارستان نسبت به دو داروی آمفوتریسین B و فلوکونازول مقاوم بودند. **کلید واژه‌ها:** قارچ‌های ساپروفیت، MIC، آمفوتریسین B، فلوکونازول

* نویسنده مسؤول: دکتر حسین نوروزی، پست الکترونیکی nowrozi.h@iums.ac.ir

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، تلفن ۰۲۱-۸۶۷۰۴۷۳۸، نامبر ۸۸۳۰۱۵۰۵
وصول مقاله: ۹۲/۶/۲۳، اصلاح نهایی: ۹۳/۱/۱۶، پذیرش مقاله: ۹۳/۴/۱۵

مقدمه

کودکان، انکولوژی، پیوند اعضا، اتاق عمل و مراقبت‌های ویژه احتمال بروز عفونت‌های قارچی بسیار بالاست. داروهای پرکاربرد در درمان عفونت‌های قارچی سیستمیک شامل پلی‌ان‌ها و آزول‌ها هستند. آمفوتریسین B (از دسته پلی‌ان‌ها) با ایجاد منفذ در غشاء سلول قارچی و بر هم زدن تعادل یونی دو طرف غشاء، اثر قارچ‌کشی خود را اعمال می‌کند؛ اما فلوکونازول (از دسته آزول‌ها) با مهار آنزیم ۱۴-آلفا لانوسترول دی متیلاز عمل می‌کند. فلوکونازول به دلیل بالا بودن فراهمی زیستی به شکل خوراکی، داروی ارجح در اغلب بیماری‌های قارچی است؛ اما به دلیل مصرف زیاد این دارو، مقاومت دارویی نسبت به آن در موارد متعدد گزارش شده است (۶و۵). همچنین مقاومت دارویی در موارد معدودی نسبت به آمفوتریسین B گزارش شده است (۵). این مطالعه به منظور ارزیابی فعالیت ضدقارچی آمفوتریسین B و فلوکونازول علیه قارچ‌های جدا شده از محیط بیمارستان انجام شد.

عفونت‌های قارچی بیمارستانی بیش از ۹ درصد کل عفونت‌های بیمارستانی را به خود اختصاص می‌دهد. در دهه اخیر، در اثر افزایش بیماران دارای نقص ایمنی شیوع عفونت‌های قارچی بیمارستانی افزایش چشمگیری داشته است (۱). عفونت‌های قارچی بیمارستانی از دو منبع خارجی (محیط) و داخلی (فلور طبیعی میزبان یا کارکنان بیمارستان) ناشی می‌شود. مهم‌ترین عوامل قارچی ایجاد کننده عفونت قارچی بیمارستانی کاندیدا و آسپرژیلوس هستند که به ترتیب جزء منابع داخلی و خارجی آلوده کننده بیماران هستند (۲و۳). از علل عمده گسترش آلودگی قارچی به خصوص قارچ‌های ساپروفیت در بیمارستان، می‌توان به سیستم تهویه آلوده در بخش‌ها و اتاق عمل، کارهای ساختمانی در بیمارستان و اطراف آن و حضور گیاهان گل‌دانی اشاره کرد (۴). از همین رو با حضور عوامل قارچی ساپروفیتی به خصوص در بخش‌های در معرض خطر نظیر بخش

روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی روی ۳۳ نمونه قارچی جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستان امام خمینی (ره) تهران طی ۸ ماه در سال ۱۳۹۲ انجام شد.

از سطوح مختلف بخش‌های ICU، CCU، راهروهای بیمارستان، اتاق معاینه و اتاق بیمارارن نمونه‌گیری به عمل آمد. نمونه‌گیری از سطوح با سوآپ استریل و تکه‌های موکت پرزدار به ابعاد ۵×۵ سانتی‌متر انجام شد. نمونه‌گیری از هوا، از طریق باز گذاشتن درب پلیت حاوی محیط کشت به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه صورت گرفت. نمونه‌ها به مدت ۲۰-۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از رشد، قارچ‌ها ایزوله و نوع آنها با روش اسلاید کالچر (Slid Culture) تعیین گردید. تست حساسیت دارویی طبق دستورالعمل استاندارد (NCCLS M38-P) برای قارچ‌های رشته‌ای انجام شد (۸و۷).

با تایید نوع کلنی قارچی، نمونه‌ها مجدداً در محیط کشت پوتیتود کستروز آگار (PDA) کشت داده شدند. با آنس استریل در سطح کلنی ۷ روزه خراش‌هایی ایجاد و ۳ میلی‌لیتر نرمال سالین ۰/۸۵ درصد استریل در سطح کلنی پخش گردید. با حرکات دورانی، سوسپانسیون قارچی تهیه و به لوله‌های استریل منتقل شد. با ته‌نشین شدن ذرات سنگین، مایع رویی به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس و جذب نوری آن (OD) به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. به طوری که محدوده سلولی $10^5 \times 0.5 - 5 \times 10^8$ cfu/ml حاصل شد.

پودر استاندارد داروی آمفوتریسین B (شرکت سیپلا، هند) و فلوکونازول (پارس دارو، تهران) تهیه گردید. از محلول دی‌متیل سولفو کساید (DMSO) و آب مقطر استریل به منظور تهیه رقت‌های دارویی به ترتیب برای آمفوتریسین B (نامحلول در آب) و فلوکونازول (محلول در آب) استفاده شد. به منظور تهیه استوک داروی فلوکونازول با غلظت استاندارد $5120 \mu\text{g/ml}$ ، میزان ۶۰ میلی‌گرم پودر استاندارد دارو در مقدار تقریبی ۱۱/۷ میلی‌لیتر آب مقطر حل و غلظت مورد اشاره حاصل شد. در مورد آمفوتریسین B، ۲۳ میلی‌گرم پودر استاندارد در ۱۴ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفو کساید حل و غلظت حدود $1600 \mu\text{g/ml}$ حاصل شد که با افزودن محیط RPMI-1640 (حاوی گلو تاملین، بدون بی‌کربنات و بافر شده با مورفولینوپروپان سولفونیک اسید) رقیق شد و ده رقت سریالی از $128 - 0.25 \mu\text{g/ml}$ تهیه گردید.

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های سریالی دارویی حاصله به چاهک‌های ۱ تا ۱۰ میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای تصاف ریخته شد. سپس به همان نسبت سوسپانسیون قارچی به چاهک‌ها اضافه و میکروپلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت

انکوباسیون شدند. میزان حداقل ممانعت‌کنندگی رشد (minimum inhibitory concentration: MIC) داروها طبق استاندارد NCCLS-M38P تعیین گردید (۸). استثناً در مورد قارچ رایزوپوس پس از ۲۱ تا ۲۶ ساعت میزان MIC بررسی شد. دو چاهک نیز به عنوان کنترل منظور شد. در چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر دارو بدون محیط RPMI-1640 به عنوان شاهد آلودگی دارو و چاهک دوم حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی با محیط RPMI-1640 به عنوان شاهد رشد قارچ در نظر گرفته شد. زمان خواندن نتایج با کدر شدن رنگ چاهک‌ها مشخص شد. پایین‌ترین غلظت دارو که قارچ (به استثناء رایزوپوس) بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در آن غلظت دارویی، رشد قابل ملاحظه‌ای نداشت؛ به عنوان MIC تعیین شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-17 و آزمون‌های آماری فیشر و کای اسکور تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از مجموع کلنی‌های شناسایی شده، یک کلنی قارچ آسپرژیلوس و یک کلنی قارچ پنی‌سیلوم از اتاق ICU و CCU و بقیه کلنی‌های جدا شده مربوط به راهروها، اتاق بیمارارن و اتاق معاینه بود. در نهایت ۳۳ نمونه قارچی به دست آمد. بیشترین تعداد مربوط به گونه قارچ‌های آسپرژیلوس (۳۹/۴ درصد) و پنی‌سیلوم (۳۶/۳۶ درصد) و کمترین تعداد مربوط به گونه قارچ‌های آلترناریا و سیرسینلا (۳/۰۳ درصد) بود (جدول یک).

جدول ۱: نوع و فراوانی قارچ‌های جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستان امام خمینی (ره) تهران در سال ۱۳۹۲

نوع قارچ	تعداد (درصد)
آسپرژیلوس	۱۳ (۳۹/۴)
پنی‌سیلوم	۱۲ (۳۶/۳۶)
فوزاریوم	۴ (۱۲/۱۲)
رایزوپوس	۲ (۶/۰۶)
آلترناریا	۱ (۳/۰۳)
سیرسینلا	۱ (۳/۰۳)

تنها ۲ مورد قارچ آسپرژیلوس و ۵ مورد قارچ پنی‌سیلوم با استفاده از داروی فلوکونازول با رقت $64 \mu\text{g/ml}$ رشد نداشتند و ۲۶ مورد (۷۸/۷ درصد) کلنی قارچ رشد کرد. در رقت‌های پایین‌تر از $64 \mu\text{g/ml}$ تمام کلنی قارچ‌ها رشد کردند و در رقت $128 \mu\text{g/ml}$ هیچ کلنی قارچی رشد نکرد.

داروی آمفوتریسین B با رقت $16 \mu\text{g/ml}$ روی ۵ کلنی (۴۱/۶۷ درصد) گونه قارچ پنی‌سیلوم موثر بود و با رقت $8 \mu\text{g/ml}$ روی ۲ کلنی (۵۰ درصد) گونه فوزاریوم موثر ارزیابی گردید.

در مجموع داروی آمفوتریسین B پاسخ‌بهتری به گونه‌های

دکتر حسین نوروزی و همکاران / ۱۳۳

فارچی جدا شده در مقایسه با فلوکونازول نشان داد ($P < 0.05$). در میان گونه‌های قارچی، پنی سیلیوم در مجموع حساسیت بیشتری در مقایسه با دیگر گونه‌های قارچی به داروها از خود نشان داد. اختلاف آماری معنی داری در مورد قارچ‌های رایزوپوس، آلترناریا و سیرسینلا نسبت به داروهای فلوکونازول و آمفوتریسین B مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲: محدوده MIC داروهای فلوکونازول و آمفوتریسین B نسبت به قارچ‌های فرصت جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستان امام خمینی (ره) تهران در سال ۱۳۹۲

فلوکونازول ($\mu\text{g/ml}$)	آمفوتریسین B ($\mu\text{g/ml}$)	
<128	16-32	آسپرژیلوس
<128	16-32	پنی سیلیوم
128	64-128	فوزاریوم
128	64	رایزوپوس
128	64	آلترناریا
128	64	سیرسینلا

در مطالعه دیبا در زمینه بررسی فلور قارچی بخش‌های CCU، ICU و اتاق‌های عمل، قارچ‌های پنی سیلیوم و آسپرژیلوس به ترتیب با ۶۳ درصد و ۱۰/۷ درصد بیشترین قارچ‌های جدا شده بودند (۹). در مطالعه زینی و هدایتی در زمینه نوع اسپورهای قارچی موجود در هوای بیمارستان، به ترتیب قارچ‌های پنی سیلیوم، کلادوسپوریوم و آسپرژیلوس بیشترین قارچ‌های جدا شده بودند (۱۰). مطالعه حاضر با دو مطالعه مذکور (۹ و ۱۰) از لحاظ نوع قارچ و شیوع هم‌خوانی دارد.

در مطالعه حاضر میزان MIC داروی فلوکونازول علیه بعضی از سویه‌های قارچ‌های آسپرژیلوس و پنی سیلیوم $64 \mu\text{g/ml}$ بود و داروی فلوکونازول به ترتیب ۴۱/۶ درصد و ۱۵/۳۸ درصد رشد سویه‌های قارچ‌های پنی سیلیوم و آسپرژیلوس را مهار کرد که با مطالعه Dóczy و همکاران مطابقت دارد (۱۱). طبق استاندارد NCCLS M38-P چنانچه میزان MIC قارچ آسپرژیلوس برای داروهای آزولی نظیر فلوکونازول بیش از $8 \mu\text{g/ml}$ باشد؛ آن سویه قارچی مقاوم در نظر گرفته می‌شود؛ گرچه ارزیابی بالینی نیز ضرورت دارد (۸).

در مطالعه ما MIC داروی آمفوتریسین B علیه سویه‌های آسپرژیلوس و پنی سیلیوم بیشتر مساوی $16 \mu\text{g/ml}$ بود. محدوده MIC داروی آمفوتریسین B برای سویه‌های مرجع آسپرژیلوس

است (۱۶) که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. در انتها یادآور می‌شویم که مطالعات هم‌زمان *in vivo* در کنار مطالعات *in vitro* ضرورت دارد. استفاده از فیلترهای تصفیه هوا در بخش‌ها؛ جلوگیری از ورود گردوغبار به بخش‌ها؛ ضدعفونی سطوح و هوا با استفاده از لامپ UV و ضدعفونی کننده‌های موثر توصیه می‌گردد. همچنین استفاده از داروهای جدید آزولی نظیر پوساکونازول و وریکونازول در درمان عفونت‌های قارچی ناشی از گونه‌های قارچ آسپرژیلوس پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های قارچی جدا شده از محیط بیمارستان نسبت به دو داروی آمفوتریسین B و فلوکونازول مقاوم هستند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی (شماره ۹۱-۰۲-۳۱-۱۶۸۷۴) مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ایران بود و با حمایت مالی آن معاونت محترم انجام گردید. بدین وسیله از همه همکاران، متخصصین، مدیران و مسئولین معزز بخش‌های مختلف بیمارستان امام خمینی (ره) تهران و دانشجویان محترمی که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند؛ صمیمانه سپاسگزاریم.

References

1. Nowrozi H, Kazemi A, Afshar S, Adimi P. [Antifungal activity of commercial disinfectants: formaldehyde, glutaraldehyde, microten, alcohol 70 and savlon-alcohol on isolated saprophytic fungi from hospital environments]. *J Gorgan Uni Med Sci*. 2013; 14(4):107-12. [Article in Persian]
2. Nowrozi H, Kazemi A, Teshfam M, Temorian Sh, Adimi P, Bashashati M. [Efficacy of ultraviolet radiation on drug susceptibility of *Candida* Spp. to itraconazole, fluconazole and amphotericin B]. *J Gorgan Uni Med Sci*. 2014; 15(4): 53-8. [Article in Persian]
3. Adell C, Trilla A, Bruguera M, Giol M, Sallés M, Bayas JM, et al. [Nosocomial infections due to opportunistic fungi: analysis of a news outbreak in the Spanish press]. *Med Clin (Barc)*. 2000 Feb; 114(7):259-63. [Article in Spanish]
4. Kazemi A, Nowrozi H, Teshfam M, Teimorian Sh. [Drug susceptibility of *Aspergillus flavus* and *A.fumigatus* to itraconazole and amphotericin B]. *J Gorgan Uni Med Sci*. 2014; 15(4): 66-71. [Article in Persian]
5. Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003 Jun;11(6):272-9.
6. Pfaller MA, Diekema DJ, Ghannoum MA, Rex JH, Alexander BD, Andes D, et al. Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *J Clin Microbiol*. 2009 Oct; 47(10):3142-6.
7. Hesseltine CW, Dorothy I, Fennell. *Mycologia*. 1979 Sep-Oct; 71(5):889-91.
8. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidial forming filamentous fungi. Approved standard NCCLS M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne. 2002.
9. Diba K. [Fungal flora of operation room, ICU, CCU in A, B hospitals and disinfectant effect on current isolated fungi]. M.S.P.H Thesis (no 2525). Faculty of Health. Tehran University of Medical Sciences. 1990. [Persian]
10. Zaini F, Hedayati MT. [Fungal Spores of air in different wards of Tehran Hospitals]. *J Med Counc I.R. Iran*. 1995;13(3): 208-15. [Article in Persian]
11. Dóczy I, Dósa E, Varga J, Antal Z, Kredics L, Nagy E. Etest for assessing the susceptibility of filamentous fungi. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2004;51(3):271-81.
12. Meneau I, Sanglard D. Azole and fungicide resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol*. 2005 May;43 Suppl 1:S307-11.
13. Arian S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Nangia S, Rex JH. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *J Clin Microbiol*. 1999 Dec; 37(12):3946-51.
14. Chandrasekar PH. Antifungal resistance in *Aspergillus*. *Med Mycol*. 2005 May;43 Suppl 1:S295-8.
15. Hedayati MT, Shokoohi T, Myahi S, Bahoush M, Haghghani I, Saltanatpoori Z, et al. [Survey of fungal contamination of air, the books and library shelves, in Mazandaran University of Medical Sciences]. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2008; 18(67): 107-10. [Article in Persian]
16. Hashemi SJ, Zini F, Daei R, Zibafar E, Zakeri MA. [In-vitro susceptibility of *Aspergillus* species isolated from cutaneous and visceral lesions to antifungal agents]. *Tehran Univ Med J*. 2011; 69(2): 83-91. [Article in Persian]

Short Communication

Effect of Amphotericin B and Fluconazole on hospital wards fungi

Nowrozi H (Ph.D)*¹, Kazemi D (Pharm.D)², Kazemi A (Ph.D)³, Khaji L (D.V.M)⁴

¹Assistant Professor, Department of Laboratory Science, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ²Pharmacologist. ³Assistant Professor, Department of Nursing, College of Nursing and Midwifery, Varamin (Pishva) Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran. ⁴Veterinary Medicine, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Nosocomial fungal infections have considerably increased due to increasing of immunocompromised diseases. This study was done to evaluate the antifungal activity of Amphotericin B and Fluconazole on hospital wards fungi.

Methods: In this descriptive - analytic study, 33 fungal samples isolated from Imam Khomini hospital in Tehran, Iran during 2013. Samples were identified using slide culture method. Serial dilution of drugs and fungal suspensions were supplied from 0.25-128 µg/ml and range 0.5–5×10⁵ cfu/ml, respectively. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined in accordance with NCCLS M38-p guideline.

Results: The most frequent isolated fungus was *Aspergillus spp.* with 39.4% while the low frequent were *Alternaria Spp.* and *Circinella* with similar frequency (3%). MIC range for Fluconazole and Amphotericin B were 64-128 µg/ml and 16-64 µg/ml, respectively. Amphotericin B showed a MIC significant reduction in comparison with Fluconazole (P<0.05).

Conclusion: Hospital wards fungi were resistant to Amphotericin B and Fluconazole.

Keywords: Fungus, Amphotericin B, Fluconazole, MIC, Hospital

* Corresponding Author: Nowrozi H (Ph.D), E-mail: aaa.nowrozi.h@iums.ac.ir

Received 14 Sep 2013

Revised 5 Apr 2014

Accepted 6 Jul 2014