مقاله اصلی

نفس، سال ۸، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۶ تا ۱۴

بررسی الگوی حساسیت دارویی ۵ داروی ضد قارچی بر علیه گونه های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه های بالینی

زهرا وقار[۱]، حمید بدلی[۲]، صادق خداویسی[۳]، آذر سبکبار[۱*]

۱) گروه میکروبیولوژی، واحد کرج ، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج ، ایران
۲) گروه قارچ شناسی پزشکی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳) گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران ، ایران

چکیده:

عفونت آسپرژیلوزیس مهاجم هنوز هم یکی از علت‌های اصلی مرگ و میر در بیماران دارای ایمنی ناکارآمد می‌باشد. در مطالعات اخیر مقاومت گونه های آسپرژیلوس نسبت به داروهای ضد قارچی بخصوص آمفوتریسین B و تری‌آزول‌ها گزارش شده است. الگوی حساسیت دارویی گونه های آسپرژیلوس جهت انتخاب داروی موثر و مصرف به موقع آن جهت بهبود وضعیت بیماران مبتلا بسیار ضروری است. مطالعه حاضر با هدف بررسی الگوی حساسیت دارویی داروی های ضد قارچی بر علیه گونه های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه های بالینی انجام شد. ایزوله های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه های بالینی بر اساس مشخصات ماکروسکوپی و میروسکوپی و همچنین تعیین توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی ژن بتا توبولین شناسایی شدند. ارزیابی الگوی حساسیت داروهای آمفوتریسین ب، ایتراکونازول، وریکونازول، پوساکونازول و کاسپوفانجین بر علیه ایزوله های آسپرژیلوس بر اساس روش استاندارد میکرودایلوشن و مطابق آخرین نسخه از روش های تاییدی CLSI ، پروتکل M38-A2 برای قارچ های رشته ای انجام شد. در طی مطالعه حاضر تعداد ۱۶۳ نمونه بالینی از بیماران مشکوک به عفونت قارچی آسپرژیلوزیس از بیمارستان های شهر تهران و ساری مورد مطالعه بررسی شد. بر اساس شناسایی مولکولی، گونه های آسپرژیلوس فلاووس ۴۲ (۶۴/۴٪)، آسپرژیلوس فومیگاتوس ۱۲ (۱۸/۴٪)، آسپرژیلوس نایجر ۸ (۱۲/۳ ٪) و آسپرژیلوس ترئوس ۳ (۴/۶ ٪) شناسایی شدند. در بین داروهای مورد مطالعه، داروی کاسپوفانجین دارای بیشتری فعالیت ضد قارچی بر علیه ایزوله های آسپرژیلوس بوده و ۱۰۰٪ ایزوله ها دارای MIC90 برابر با µg/mL063/0 بودند. در بین داروهای آزولی، داروی پوساکونازول دارای بیشترین فعالیت ضدقارچی بود و میزان MIC این دارو برای تمام ایزوله های مورد مطالعه برابر با ۱≥ µg/mL بود. همچنین به ترتیب ۰/۵ ٪ و ۱ ٪ ایزوله ها آسپرژیلوس فومیگاتوس نسبت به داروهای ایتراکونازول و وریکونازول مقاوم بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که ایزوله های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه های بالینی مورد مطالعه نسبت به داروهای کاسپوفانجین و پوساکونازول بسیار حساس می باشند. نتایج ارائه شده بصورت آزمایشگاهی در مطالعه نیاز به بررسی های بیشتر بخصوص در مطالعات مدل های حیوانی مبتلا به تظاهرات مختلف بیماری آسپرژیلوزیس مبتلا به این عامل دارد.

واژگان کلیدی: حساسیت دارویی، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس فومیگاتوس

* **نویسنده مسئول:**

دکتر آذر سبکبار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران، پست الکترونیک: sabokbar@kiau.ac.ir

مقدمه:

شیوع بیماری‌های قارچی در دو دهه اخیر به خصوص در افراد دارای نقص سیستم ایمنی رو به افزایش است [۱]. آسپرژیلوس از جمله عوامل ساپروفیتی است که بطور وسیعی در هوا، خاک، گیاهان، مواد آلی در حال فساد و گرد و غبار یافت می‌شوند [۲،۳]. در اکثر موارد، گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس و با شیوع کمتری گونه آسپرژیلوس فلاووس بعنوان عوامل اصلی عفونت از بیماران درگیر جدا می‌شود [۲]. عفونت آسپرژیلوزیس مهاجم هنوز هم یکی از علت‌های اصلی مرگ و میر در بیماران دارای ایمنی ناکارآمد از جمله نوتروپنی شدید، بدخیمی‌های خونی، دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان، سلول‌های بنیادی و سایر بافت‌ها، دریافت کنندگان داروهای استروئیدی وآنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف به مدت طولانی و نیز بیماران دچار وضعیت وخیم بستری در بخش مراقبت‌های ویژه می‌باشد [۲]. آسپرژیلوزیس پیشرفت سریعی داشته و بقای بیماران به طور کلی کم و در حدود ۴۰-۳۰ درصد است که اغلب با توجه به عدم اثبات تشخیص بیماری در مراحل اولیه آلودگی و عدم شروع زود هنگام درمان مناسب ضد قارچی برای بهبود وضعیت بیماران می‌باشد [۴]. مدیریت درمان موفقیت آمیز این بیماری وابسته به شروع به موقع درمان، انتخاب داروی موثر ضد قارچی و عدم مقاومت قارچ به آن می‌باشد. درمان آسپرژیلوزیس مشکل بوده و حتی با تشخیص بیماری و شروع درمان با عدم پاسخ مناسب به درمان و منجر به مرگ بیمار خواهد شد [۵]. در طی دهه‌های اخیر، مطالعات زیادی در ارتباط با درمان آسپرژیلوزیس و استفاده از داروهای جدید و جایگزین صورت گرفته است [۶،۷]. با توجه به تعداد محدود داروهای ضد قارچی موجود و همین طور معضلاتی که درتشخیص آسپرژیلوزیس تهاجمی وجود دارد اضافه شدن پدیده مقاومت آزولی می‌تواند درمان این بیماری را با مشکلات بسیار بیش‌تری روبرو می‌نماید [۸]. لذا مطالعه حاضر با هدف ارزیابی حساسیت دارویی داروهای ضد قارچی بر علیه گونه‌های بالینی آسپرژیلوس جهت بررسی وضعیت الگوی مقاومت دارویی این گونه های قارچی جهت پیشنهاد بکارگیری در رژیم درمانی و استراتژی‌های صحیح و مناسب درمانی بیماران انجام گرفت.

مواد و روش ها:

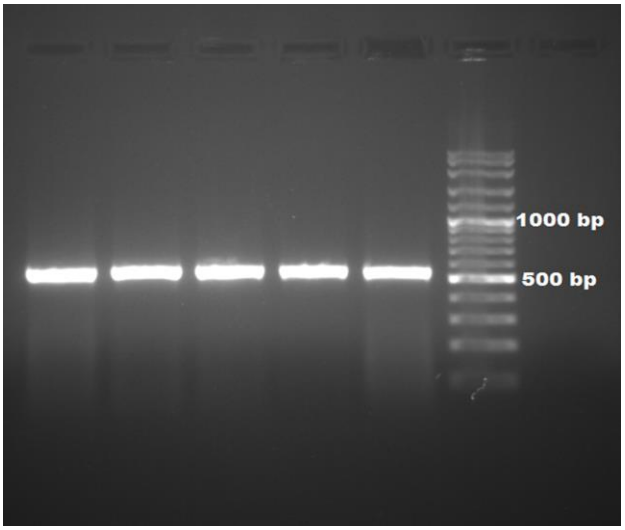
در طول دوره مطالعه، در بیمارستان‌های شهر تهران و ساری، بیماران مشکوک به ابتلا به هر نوع از علایم بالینی آسپرژیلوزیس ABPA، آسپرژیلوما، عفونت مزمن ریوی، آسپرژیلوزیس مهاجم، سینوزیت که از لحاظ معاینات و علایم بالینی، رادیوگرافی، CT اسکن و عدم پاسخ به داروهای متنوع آنتی بیوتیکی، مورد تایید توسط پزشک متخصص ریه و عفونی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از نمونه‌گیری (نمونه خلط، مایع BAL، بیوپسی، کشت خون و سایر نمونه‌های بالینی) و انتقال نمونه‌ها در شرایط زنجیره سرد به آزمایشگاه قارچ شناسی پزشکی، مورد بررسی قرار گرفتند. پس از آماده سازی نمونه‌ها و تلقیح در محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل در دمای ۲۸-۳۰ درجه به مدت ۷ روز انکوبه و هر ۲۴ ساعت از لحاظ رشد گونه‌های آسپرژیلوس مورد بررسی قرار گرفتند. کلنی‌های رشد کرده از لحاظ خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی مطالعه شده و در حد گونه تشخیص داده شدند. پس از شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس، ایزوله‌ها جهت استفاده در کار مولکولی ذخیره شدند. جهت تایید دقیق گونه آسپرژیلوس فلاووس از روش تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن بتا توبولین استفاده شد [۹]. پرایمر BTUa (5'ggTAACCAAATCggTgCTgCTTTC3') به عنوان پرایمر رفت یا سنس و پرایمر BTUb (5'ACCCTCAgTgTAgTgACCCTTggC3') به عنوان پرایمر برگشت یا آنتی سنس به کار گرفته شد. پس از شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس، الگو حساسیت داروهای ضد قارچی آمفوتریسین ب، ایتراکونازول، وریکونازول، پوساکونازول و کاسپوفانجین مطابق با آخرین نسخه از روش استاندارد و دستورالعمل‌های تفسیری CLSI، پروتکل M38-A2 برای قارچهای رشته‌ای انجام شد. جهت تهیه سوسپانسیون، از کشت سه تا چهار روزه ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس در محیط PDA در 30 ˚c استفاده شد. ۵-۴ میلی لیترمحلول آب مقطر استریل و توئین ۲۰ در فالکن ریخته و با سواپ استریل (خیس شده با آب مقطر) کمی از کلونی را به محلول

داخل فالکن انتقال داده، سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ ثانیه ورتکس شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. OD سوسپانسیون حاصل در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. بر اساس پروتکل سوسپانسیون با (Transmission 82-78٪) برای ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس تهیه گردید. سپس برای اینکه CFU در هر میلی لیتر به ۱۰۶×۵-۱ برسد سوسپانسیون حاصل را به نسبت ۱ به ۵۰ با و سپس ۱:۱۰ رقیق شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI براث (آماده شده طبق پروتکل) در هر چاهک از ۹۶ خانه‌ی موجود بجز چاهک‌های ردیف اول در پلیت ریخته شد. در چاهک‌های ردیف اول از سمت چپ پلیت میزان ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کاری هرکدام از داروها اضافه گردید. در مرحله بعد با استفاده از مولتی سمپلر برای ایجاد غلظت به صورت سریال از ستون اول ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به ستون سوم انتقال داده شد و سپس۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به ردیف جلو انتقال داده این عمل تا ستون یازدهم ادامه یافت و ۱۰۰ میکرولیتر انتهایی دور ریخته شد. ستون آخر کنترل مثبت (فقط ارگانیسم، بدون دارو) در نظر گرفته شد. سپس از ستون دوم، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده قارچی در هر چاهک از محلول به دست آمده ریخته شد. حجم نهایی در هر چاهک به۲۰۰ میکرولیتر و غلظت نهایی تلقیح به $۱۰^{۶}$×۵-۱ کونیدی در هر میلی لیتر رسید. پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۶ تا ۵۰ ساعت انکوبه شده و بعد از انکوباسیون MIC و MEC نمونه ها خوانده شد. استرین استاندارد کاندیدا پاراپسیلوزیس (ATCC22019) جهت کنترل کیفی تست، مورد بررسی قرار گرفت. طبق CLSI M38-A2 برای قارچهای رشته‌ای بعد از زمان انکوباسیون میکروپلیت‌ها جهت تعیین MIC داروهای پلی ان و آزولی و MEC برای کاسپوفانجین سنجیده شد. میزان MIC بر اساس رشد و عدم رشد اسپورها و استانداردها در چاهک حاوی داروها در مقایسه با حفره کنترل مثبت با استفاده از آینه مخصوص مورد بررسی قرار گرفتند. و همچنین میزان MEC بر اساس مشاهده هایف های تغییر ساختاری و تجمع یافته در مقایسه با چاهک کنترل مثبت مشخص شد. بر اساس نقاط شکست معرفی شده توسط Verweij و همکاران [۱۰]، ایزوله‌های آسپرژیلوس مورد بررسی با MIC و MECهای بالاتر از این نقاط شکست‌ها بعنوان ایزوله‌های مقاوم شناسایی شدند.

نتایج:

در طی مطالعه حاضر تعداد ۱۶۳ نمونه بالینی از بیماران مشکوک به عفونت قارچی آسپرژیلوزیس از بیمارستان‌های شهر تهران و ساری مورد مطالعه بررسی شد که بر اساس شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی‌های رشد کرده در کشت نمونه ها، تعداد ۶۵ ایزوله آسپرژیلوس شناسایی شد. بر اساس شناسایی مولکولی (شکل شماره ۱)، این تعداد ایزوله آسپرژیلوس شامل گونه‌های آسپرژیلوس فلاووس ۴۲ (۶۴/۴٪)، آسپرژیلوس فومیگاتوس ۱۲ (۱۸/۴٪)، آسپرژیلوس نایجر ۸ (۱۲/۳٪) و آسپرژیلوس ترئوس ۳ (۴/۶٪) شناسایی شدند. ایزوله آسپرژیلوس به ترتیب فراوانی از نمونه‌های بالینی مختلف شامل ۲۶ (۴۰٪) نمونه سینوس، ۱۴ (۲۱/۵٪) نمونه‌های جلدی شامل ناخن، پوست، ترشحات، ۱۱ (۱۷٪) نمونه شستشوی مایع برونش (BAL)، ۸ (۱۲/۳٪) نمونه خلط، ۳ (۴/۶ ٪) نمونه بیوپسی ریه و ۳ (۴/۶ ٪) نمونه سواپ گوش جدا شده بودند. در جدول شمار۱ الگوی حساسیت داروهای ضد قارچی آمفوتریسین ب، ایتراکونازول، وریکونازول، پوساکونازول و کاسپوفانجین بر علیه ۶۵ ایزوله ی آسپرژیلوس نشان داده شده است.

در ایزوله آسپرژیلوس فلاووس رنج وسیعی از MIC داروی آمفوتریسین ب (۰/۲۵-۸ µg/mL) مشاهده شد. در کل تعداد ۸ (۴٪) ایزوله آسپرژیلوس فلاووس دارای MIC بیشتر از ۲µg/mL برای داروی آمفوتریسین ب بودند. در بین داروهای مورد مطالعه، داروی کاسپوفانجین دارای بیشتری فعالیت ضد قارچی بر علیه ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس بوده و ۱۰۰٪ ایزوله‌ها دارای MIC_{90} برابر با ۰/۰۶۳ µg/mL بودند. در بین داروهای آزولی، داروی پوساکونازول دارای بیشترین فعالیت ضدقارچی بود و میزان MIC این دارو برای تمام ایزوله‌های مورد مطالعه برابر با ≤1 µg/mL بود. همچنین به ترتیب ۰/۵٪ و ۱٪ ایزوله‌ها آسپرژیلوس فومیگاتوس نسبت به داروهای ایتراکونازول و وریکونازول مقاوم بودند و این درحالیست که هیچ ایزوله‌ی مقاومی به داروهای پوساکونازول و کاسپوفانجین شناسایی نشد.



شکل ۱ - الکتروفورز محصولات PCR ناحیه ژنی β- tubulin ایزوله‌های آسپرژیلوس

ایزوله‌های آسپرژیلوس نایجر MIC با رنج متفاوت برای هر دارو داشتند. در کل تمام ایزوله‌ها نسبت به داروی پسوکونازول و کاسپوفانژین MIC پایین داشتند. در حالی که بالاترین MIC به طور مستمر با داروهای ضد قارچی آمفوتریسین B و وریکونازول حاصل شد. نتایج نشان داد که MIC_{90} تمام سویه‌های جداشده بالینی و محیطی آسپرژیلوس نایجر بسیار حساس به پسوکونازول با (MIC:0.125 µg/mL) و کاسپوفانژین (MIC:0.031 µg/mL) و (MIC:0.063 µg/mL) بود. همچنین در ایزوله‌های آسپرژیلوس ترئوس، آمفوتریسین B دارای بالاترین MIC (محدوده µg/mL ۰.۱۲۵-۲) دارد.

بحث:

الگوی حساسیت دارویی گونه‌های جدا شده از تظاهرات بالینی مختلف آسپرژیلوزیس جهت انتخاب داروی موثر و مصرف به موقع آن جهت بهبود وضعیت بیماران مبتلا بسیار ضروری است. همانطور که ذکر شد گونه آسپرژیلوس فلاووس از جمله گونه‌های مهم عامل آسپرژیلوزیس در ایران می‌باشد ولی در مورد وضعیت مقاومت دارویی و ارتباط بینMIC و نتیجه درمان با داروهای ضد قارچی متداول و جدید برای عفونت‌های ایجاد شده با گونه‌های آسپرژیلوسی در کشور ما اطلاعات کمی وجود دارد [۱۱]. لذا بررسی الگوی حساسیت دارویی این عامل از نمونه‌های جدا شده از ایران در بررسی و تصمیم گیری و همچنین مقایسه با اطلاعات سایر مناطق بسیار کمک کننده است. در مطالعات اندکی استفاده از داروی آمفوتریسین ب به عنوان خط اول درمانی تحت بررسی قرار گرفته است، اما امروزه در مطالعات تجربی به عنوان یک روش استاندارد برای درمان افراد مبتلا به نوتروپنی تب دار مورد پژوهش قرار گرفته است [۱۳،۱۲]. داروی آمفوتریسین ب از دسته داروهای پلی ان با مصرف بالا بر علیه طیف وسیعی از قارچ ها می‌باشد که با توجه به عوارض جانبی بالا در اکثر موارد جهت درمان عفونت‌های سیستمیک از جمله آسپرژیلوزیس تهاجمی در ایران مورد استفاده قرار می گیرد [۱۴]. مطالعه‌ی حاضر رنج وسیعی از MIC داروی آمفوتریسین ب برای ایزوله‌های بالینی (µg/mL ۸-۰.۲۵) و ایزوله های محیطی (µg/mL ۴-۰.۲۵) را نشان داد و ۳/۵٪ از کل ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس مورد بررسی، مقاوم به داروی آمفوتریسین ب بودند. همچنین این یافته‌ها با نتایج اکثر مطالعات صورت گرفته در این زمینه یکسان بود و سایر مطالعات نیز نشان داده‌اند که مقاومت به پلی‌ان‌ها از جمله آمفوتریسین ب گسترش در گونه‌های آسپرژیلوس فلاووس در حال افزایش است [۱۲]. در مطالعه Hsueh و همکاران در تایوان نیز ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس فومیگاتوس با کاهش حساسیت آمفوتریسین ب (MIC=۲ µg/mL) گزارش شده، آسپرژیلوس فلاووس

جدول ۱ - الگوی حساسیت داروهای ضد قارچی بر علیه ایزوله‌های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بالینی

ایزوله ها (تعداد)	داروهای ضد قارچی	حداقل و حداکثر MIC	MIC (µg/mL)		
			MIC_{50}	MIC_{90}	Geometric Mean
کل ایزوله‌ها آسپرژیلوس (۶۵)	آمفوتریسین ب	۰/۲۵-۸	۰/۵	۱	۰/۵۰۲۹
	ایتراکونازول	۰/۰۳۱->۱۶	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۳۷۰
	وریکونازول	۰/۰۳۱->۱۶	۰/۵	۰/۵	۰/۳۴۶۵
	پوساکونازول	۰/۰۰۸-۱	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۱۳۵۲
	کاسپوفانجین	۰/۰۰۸-۰/۲۵	۰/۰۱۶	۰/۰۶۳	۰/۰۱۹۰
ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس (۴۲)	آمفوتریسین ب	۰/۲۵-۴	۰/۵	۱	۰/۴۹۶۲
	ایتراکونازول	۰/۰۳۱-۲	۰/۱۲۵	۰/۵	۰/۲۰۸۰
	وریکونازول	۰/۰۳۱-۸	۰/۵	۰/۵	۰/۳۸۵۵
	پوساکونازول	۰/۰۰۸-۰/۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۱۳۹۱
	کاسپوفانجین	۰/۰۰۸-۰/۲۵	۰/۰۱۶	۰/۰۶۳	۰/۰۱۸۷
ایزوله‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس (۱۲)	آمفوتریسین ب	۰/۲۵-۱	۰/۵	۱	۰/۵۱۲۵
	ایتراکونازول	۰/۲۵-۱۶	۱	۲	۰/۵۲۵۳
	وریکونازول	۰/۲۵-۸	۰/۵	۱	۰/۹۰۵۷
	پوساکونازول	۰/۰۴۷-۱	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۱۷۰۵
	کاسپوفانجین	۰/۰۰۸-۰/۱۲۵	۰/۰۱۶	۰/۱۲۵	۰/۰۲۱۳
ایزوله‌های آسپرژیلوس نایجر (۸)	آمفوتریسین ب	۰/۲۵-۴	۱	۲	۰/۹۱۴۹
	ایتراکونازول	۰/۲۵->۱۶	۰/۵	۱	۰/۴۶۸۲
	وریکونازول	۰/۱۲۵->۱۶	۰/۵	۰/۵	۰/۳۸۰۵
	پوساکونازول	۰/۰۱۶-۰/۱۲۵	۰/۰۶۳	۰/۱۲۵	۰/۰۶۷۵
	کاسپوفانجین	۰/۰۰۸-۰/۰۶۳	۰/۰۰۸	۰/۰۳۱	۰/۰۱۴۲
ایزوله‌های آسپرژیلوس ترئوس (۳)	آمفوتریسین ب	۰/۲۵-۲	۰/۵	۲	۰/۸۶۴۲
	ایتراکونازول	۰/۰۱۶-۲	۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۰/۱۳۲۱
	وریکونازول	۰/۲۵-۱	۰/۲۵	۰/۵	۰/۳۷۶۲
	پوساکونازول	۰/۱۲۵-۰/۵	۰/۱۲۵	۰/۵	۰/۱۸۶۲
	کاسپوفانجین	۰/۰۰۸-۰/۰۱۶	۰/۰۰۸	۰/۰۳۱	۰/۰۰۸

در بین چهار گونه آزمایش شده دارای حداقل حساسیت به آمفوتریسین ب بود و و در ۵۰-۹۰ درصد از ایزوله‌ها آسپرژیلوس فلاووس با دو برابر غلظت بیشتر MIC از آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس نایجر مهار شدند [۱۵]. در مطالعه Rath و همکاران نیز دارای MIC با رنج µg/mL ۲-۶ از داروی آمفوتریسین ب برای ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس گزارش کردند [۱۶]. اخیراً در مطالعات ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس جدا شده از نمونه‌های بالینی با میزان MIC بالاتری نسبت به تری آزول‌ها گزارش شده است [۱۷]. در مطالعه بدلی و همکاران پیشنهاد شد که استفاده طولانی مدت از داروهای آزولی و یا استفاده از داروهای ضدقارچی در کشاورزی از عوامل اصلی افزایش مقاومت به ایتراکونازول و وریکونازول می‌باشند [۱۱]. براساس نتایج مطالعه حاضر داروهای ایتراکونازول و وریکونازول در مقابل ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس مورد مطالعه دارای MIC90 معادل ۰/۵ بودند. همچنین در کل به ترتیب ۰/۵٪ و ۱٪ کل ایزوله‌ها نسبت به داروهای ایتراکونازول و وریکونازول مقاوم بودند و این درحالیست که هیچ ایزوله‌ی مقاومی به داروهای پوساکونازول شناسایی نشد. [۱۸]. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۱ بر روی ۳۱ بیمار انجام شد، در ۴۸٪ بیماران مبتلا به آسپرژیلوزیس پاسخ به ایتراکونازول

گزارش شده است [۱۹]. همچنین در ارتباط با داروی وریکونازول در مقایسه با سایر مطالعات صورت گرفته در این زمینه نتایج این مطالعه نشان داد که ایزوله‌های مورد بررسی از حساسیت بیشتری برخوردار بودند [۲۰،۱۰-۲۳]. مطالعه حاضر میزان MIC_{90} بسیار پائینی (۰/۲۵ µg/ml) را برای داروی پوساکونازول نشان داد که موافق با سایر مطالعات صورت گرفته در این زمینه فعالیت ضد قارچی بسیار خوب این دارو را بر علیه ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس نشان می دهد [۲۴-۲۶]. چنانکه مشابه با مطالعه حاضر، در مطالعه Al-Wathiqi و همکاران از داروی MIC_{90}=0.25 µg/mL پوساکونازول بر علیه ایزوله‌های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیطی جدا شده از کویت گزارش کردند [۲۷]. اخیراً در یک پژوهش دوسوکور و چند مرکزی، دو داروی پوساکونازول و فلوکونازول به عنوان پیشگیری از بروز عفونت های قارچی در ۶۰۰ بیمار دریافت کننده پیوند آلوژنیک تحت بررسی قرار گرفت. در طی یک دوره ۶ هفته‌ای استفاده از پوساکونازول در مقایسه با فلوکونازول، به طور چشم‌گیری بروز آسپرژیلوزیس تهاجمی را در مصرف کنندگان آن کاهش داد (۲ درصد در برابر ۷ درصد). هم چنین در این افراد میزان مرگ و میر گزارش شده به ترتیب ۱٪ و ۴٪ می‌باشد [۲۸]. با توجه به نتایج به دست آمده از این گونه مطالعات، در آینده نزدیک پوساکونازول می‌تواند به عنوان داروی ضد قارچی مناسب برای درمان بیماران مبتلا به آسپرژیلوزیس مقاوم به درمان به کار رود. اکینوکاندین‌ها در مقابل گونه‌های آسپرژیلوس فعالیت فانژیستیکی دارند. مقاومت به داروهای اکینوکاندین از جمله کاسپوفانجین در گونه‌های آسپرژیلوس فلاووس به ندرت گزارش شده است [۲۹]. در مطالعه حاضر MIC بسیار پائین از دارو کاسپوفانجین بر علیه ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس مشاهده شد. همچنین در اکثر مطالعات میزان MIC پائینی (<۰/۵ µg/mL) را برای این دارو نشان داده‌اند که در کل فعالیت ضد قارچی بسیار بالاتری از سایر داروهای ضد قارچی از جمله تری آزول‌ها و آمفوتریسین ب را بر علیه ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس نشان می‌دهد [۳۱،۳۰،۲۲]. پس از بررسی‌های به دست آمده در ۸۳ بیمار مبتلا به آسپرژیلوزیس، داروی کاسپوفانجین به عنوان یک داروی ایمن و اثر بخش معرفی شد. این افراد مبتلا به آسپرژیلوزیس، دریافت کنندگان خون، پیوندهای بافت‌های سخت، مغز استخوان و یا مبتلایان به سرطان خون بودند که مقاومت دارویی و عدم تحمل سایر داروهای ضد قارچی در آنان به ترتیب ۸۶ درصد و ۱۴ درصد بوده است. بنابراین بر اساس این یافته‌ها این سری از داروهای ضدقارچی در درمان هرچه بهتر بیماران مبتلا به آسپرژیلوزیس می‌توان مورد استفاده قرار گیرند [۳۲،۲۹].

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که ایزوله‌های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بالینی مورد مطالعه نسبت به داروهای کاسپوفانجین و پوساکونازول بسیار حساس بود و همچنین سپس به ترتیب سایر داروها از جمله ایتراکونازول، وریکونازول و آمفوتریسین ب دارای فعالیت ضد قارچی خوبی بر علیه این قارچ داشتند. هر چند که داروهای مورد مطالعه دارای فعالیت و پتانسیل درمانی خوبی بوده، نتایج ارائه شده بصورت آزمایشگاهی در مطالعه نیاز به بررسی‌های بیشتر بخصوص در مطالعات مدل‌های حیوانی مبتلا به تظاهرات مختلف بیماری آسپرژیلوزیس مبتلا به این عامل دارد. همچنین در ایزوله‌هایی که مقاوم به هر کدام از داروهای ضد قارچی موثر و مورد استفاده در بالین بودند باید مکانیسم و نحوه القاء مقاومت دارویی و موتاسیون های منجر به این مقاومت جهت پیدا نمودن راهکارهای مناسب دیگر دارویی مورد بررسی قرار گیرد.

منابع:

1) Ostrosky-Zeichner L, Al-Obaidi M. Invasive fungal infections in the intensive care unit. Infectious Disease Clinics. 2017;31(3):475-87.
2) Zmeili O, Soubani A. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. Qjm. 2007;100(6):317-34.
3) Chandrasekhar P, Alangaden G, Manavathu E. Aspergillus: an increasing problem in tertiary care hospitals? Clinical Infectious Diseases. 2000;30(6):984-5.
4) Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, et al. Invasive Aspergillosis Disease Spectrum, Treatment Practices, and Outcomes. Medicine. 2000;79[4]:250-60.
5) Trof R, Beishuizen A, Debets-Ossenkopp Y, Girbes A, Groeneveld A. Management of invasive pulmonary aspergillosis in non-

fibrosis exposed to itraconazole. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012;56[2]:869-74.
18) Denning DW, Lee JY, Hostetler JS, et al. NIAID Mycoses Study Group multicenter trial of oral itraconazole therapy for invasive aspergillosis. The American journal of medicine. 1994;97[2]:135-44.
19) Caillot D, Bassaris H, McGeer A, et al. Intravenous itraconazole followed by oral itraconazole in the treatment of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies, chronic granulomatous disease, or AIDS. Clinical Infectious Diseases. 2001;33[8]:e83-e90.
20) Abdolvahab Alborzi M, Mahsa Moeini M, Pedram Haddadi M. Antifungal susceptibility of the Aspergillus species by Etest and CLSI Reference Methods. Archives of Iranian medicine. 2012;15(7):429.
21) Saravolatz LD, Johnson LB, Kauffman CA. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. Clinical Infectious Diseases. 2003;36[5]:630-7.
22) Shi J-y, Xu Y-c, Shi Y, et al. In vitro susceptibility testing of Aspergillus spp. against voriconazole, itraconazole, posaconazole, amphotericin B and caspofungin. Chinese Medical Journal (English Edition). 2010;123[19]:2706.
23) Van Der Linden JW, Warris A, Verweij PE. Aspergillus species intrinsically resistant to antifungal agents. Medical mycology. 2011;49(sup1):S82-S9.
24) Alexander BD, Perfect JR, Daly JS, et al. Posaconazole as salvage therapy in patients with invasive fungal infections after solid organ transplant. Transplantation. 2008;86(6):791-6.
25) Canuto MM, Rodero FG. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. The Lancet infectious diseases. 2002;2[9]:550-63.
26) Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN. Triazole and echinocandin MIC distributions with epidemiological cutoff values for differentiation of wild-type strains from non-wild-type strains of six uncommon species of Candida. Journal of clinical microbiology. 2011;49[11]:3800-4.
27) Al-Wathiqi F, Ahmad S, Khan Z. Molecular identification and antifungal susceptibility profile of Aspergillus flavus isolates recovered from clinical specimens in Kuwait. BMC infectious diseases. 2013;13[1]:126.
28) Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. New England Journal of Medicine. 2007;356[4]:335-47.
neutropenic critically ill patients. Intensive care medicine. 200.۷۰۳-۱٦۹٤:[۱۰]۳۳;۷
6) Lin S-J, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. Clinical Infectious Diseases. 2001;32(3):358-66.
7) Kaya AD, Kiraz N. In vitro susceptibilities of Aspergillus spp. causing otomycosis to amphotericin B, voriconazole and itraconazole. Mycoses. 2007;50(6):447-50.
8) Von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zühlsdorf M, Van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. Respiration. 1995;62(6):341-7.
9) Khodavaisy S, Badali H, Hashemi S, et al. In vitro activities of five antifungal agents against 199 clinical and environmental isolates of Aspergillus flavus, an opportunistic fungal pathogen. Journal de mycologie medicale. .۲۱-۱۱٦:[۲]۲٦;۲۰۱٦
10) Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJ, Denning DW. Azole-resistance in Aspergillus: proposed nomenclature and breakpoints. Drug Resistance Updates. 2009;12(6):141-7.
11) Badali H, Vaezi A, Haghani I, et al. Environmental study of azole-resistant Aspergillus fumigatus with TR34/L98H mutations in the cyp51A gene in Iran. Mycoses. 2013;56(6):659-63.
12) Dannaoui E, Meletiadis J, Tortorano A-M, et al. Susceptibility testing of sequential isolates of Aspergillus fumigatus recovered from treated patients. Journal of medical microbiology. 2004;53[2]:129-34.
13) Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and Aspergillus spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55[11]:5150-4.
14) Hedayati MT, Khodavaisy S, Alialy M, Omran SM, Habibi MR. Invasive aspergillosis in intensive care unit patients in Iran. Acta Medica (Hradec Kralove). 2013;56[2]:52-6.
15) Hsueh P-R, Lau Y-J, Chuang Y-C, et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of Candida species, Cryptococcus neoformans, and Aspergillus species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2005;49[2]:512-7.
16) Rath P. Susceptibility of Aspergillus strains from culture collections to amphotericin B and itraconazole. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1998;41[5]:567-70.
17) Burgel P-R, Baixench M-T, Amsellem M, et al. High prevalence of azole-resistant Aspergillus fumigatus in adults with cystic

29) Candoni A, Mestroni R, Damiani D, et al. Caspofungin as first line therapy of pulmonary invasive fungal infections in 32 immunocompromised patients with hematologic malignancies. European journal of haematology. 2005;75(3):227-33.
30) Maertens J, Raad I, Petrikkos G, et al. Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy. Clinical Infectious Diseases. 2004;39[11]:1563-.۷۱
31) Singh N, Limaye AP, Forrest G, et al. Combination of voriconazole and caspofungin as primary therapy for invasive aspergillosis in solid organ transplant recipients: a prospective, multicenter, observational study. Transplantation. 2006;81(3):320-6.
32) Maertens JA, Madero L, Reilly AF, et al. A randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus liposomal amphotericin B for empiric antifungal therapy in pediatric patients with persistent fever and neutropenia. The Pediatric infectious disease journal. 2010;29[5]:415-20.

Nafas, Vol. 8, No. 4, Winter 2022, Pages: 6-14 **Original Article**

In Vitro Activities of Five Antifungal Agents Against Clinical Isolates of Aspergillus Species

ZahraVaghar[1], Sadegh Khodavaisy[2], Hamid Badali[3], Azar Sabokbar*[1]

1) Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2) Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3) Department of Medical Mycology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Abstract:
Invasive aspergillosis is one of the leading causes of death in patients with weakened immune systems. Since resistance to antifungal agents has been observed in patients, susceptibility testing is helpful in defining the activity spectrum of antifungals and determining the appropriate drug for treatment. Despite an increasing number of infections of Aspergillus in Iran, the antifungal susceptibility patterns and molecular epidemiology of clinical strains has not been well studied. In the current study, we evaluated the in vitro antifungal susceptibilities of five antifungal agents against clinical Aspergillus isolates from Iran. Clinical Aspergillus isolates were preliminarily identified to the species level based on microscopic and macroscopic characteristics; subsequently, their identity was confirmed by DNA sequencing of the partial β-tubulin (BTU) gene. Antifungal susceptibilities of AMB, ITC, VRC, POS, and CAS against clinical Aspergillus isolates were determined in accordance with the CLSI M38-A2 document. One hundred and sixty-three clinical (n = 163) Aspergillus isolates were evaluated for their antifungal susceptibilities patterns. Aspergillus flavus 42 (64.4%), Aspergillus fumigatus 12 (18.4%), Aspergillus niger 8 (12.3%) and Aspergillus terreus 3 (4.6%) species were identified. Caspofangin (MIC90=0.063 µg/mL) had the highest antifungal activity against Aspergillus isolates and 100% of the isolates had MIC90 equal to 0.063 µg/mL. Among azole drugs, posaconazole had the highest antifungal activity and the MIC of this drug for all isolates was ≤1 µg/mL. Also, 0.5% and 1% of Aspergillus fumigatus isolates were resistant to itraconazole and vriconazole, respectively.
Our results suggest that clinical Aspergillus isolates are the most susceptible to posaconazole and caspofungin. These results should be further investigation, especially in in vivo study with different manifestations of aspergillosis.
Keywords: Antifungal susceptibility, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus

* **Corresponding Author**:
Dr. Azar Sabokbar, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. Email: sabokbar@kiau.ac.ir