

حساسیت گونه‌های کاندیدای دهانی افراد آلوده به HIV نسبت به داروهای ضد قارچی تحت شرایط برون تنی در ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۰۱

چکیده

فرزاد کتیرائی^{۱*}، علیرضا خسروی^۲ و وحید خلج^۳، محیوبه حاجی عبدالباقی^۴، علی‌اصغر خاکسار^۳، مهرناز رسولی نژاد^۲

۱- مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی، دانشکده علوم دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران.
۴- مرکز تحقیقات ایبیز ایران، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

زمینه و هدف: مقاومت عوامل ایجاد کاندیدیازیس دهانی به داروهای ضد قارچی از مشکلات بیماران آلوده به HIV است. افزایش مقاومت و استفاده بیش از پیش از داروها، اهمیت بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی را نشان می‌دهد. مطالعه حاضر میزان حساسیت گونه‌های کاندیدای جدا شده از بیماران آلوده به HIV را به داروهای ضد قارچی بررسی می‌کند. **روش بررسی:** ۱۵۰ نمونه دهانی از بیماران آلوده به HIV بر روی محیط‌های کروم آگار و سابورو آگار کشت داده شد. جدایه‌های رشد یافته بر اساس روش‌های متداول تشخیص مخمرها تعیین هویت شدند. با روش‌های انتشار دیسک و میکرودیالوژن برات الگوی حساسیت به شش داروی ضد قارچی تعیین گردید. **یافته‌ها:** کاندیدا/آلیکنس (۵۰/۲٪) و کاندیدا/گلابراتا (۲۲٪) شایع‌ترین گونه‌های جدا شده بودند. ۲۵/۷٪ از جدایه‌های کاندیدا/آلیکنس نسبت به داروی فلوکونازول مقاوم بودند و این میزان برای کتوکونازول و کلوتریمازول به ترتیب ۲۱/۹٪ و ۱۶/۴٪ بوده است. مقاومت نسبت به داروهای آمفوتریسین، نیستاتین و داروی کاسپوفازین دیده نشد. از طرفی ۵۷/۷٪ از جدایه‌های کاندیدا/گلابراتا نسبت به فلوکونازول مقاوم بودند و این میزان برای کتوکونازول و کلوتریمازول به ترتیب ۳۱٪ و ۳۵٪ بود. **نتیجه‌گیری:** مقاومت گونه‌های کاندیدا به داروی آزولی، به‌خصوص فلوکونازول رو به افزایش است. بررسی مقاومت جدایه‌های کاندیدا به‌روش انتشار دیسک و یا میکرودیالوژن برات در آزمایشگاه‌ها جهت کنترل عفونت کاندیدیازیس دهانی مطلوب است. هرچند داروی نیستاتین به‌وفور برای بیماران مورد استفاده قرار می‌گیرد اما مقاومت به این دارو ناچیز است. استفاده از داروی کاسپوفازین نیز با توجه به عدم مقاومت توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: کاندیدیازیس دهانی، گونه‌های کاندیدا، مقاومت دارویی، بیماران آلوده به HIV.

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، بالاتر از میدان سرو، نرسیده به فروشگاه شهروند، نبش فراز یکم
تلفن: ۰۹۱۲-۶۰۴۳۱۱
E-mail: katirae_f@yahoo.com

مقدمه

حاوی مقادیر اندکی از گونه‌های مخمری به صورت هم‌زیست است و البته گونه‌های کاندیدایی به طور معمول حفره دهانی بیماران HIV را بیش از حد طبیعی کولونیزه می‌کنند که خود از عوامل مستعد کننده برای ایجاد بیماری کاندیدایی است. امروزه از مشکلات اصلی در راه درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های قارچی و خصوصاً بیماری‌های کاندیدایی بروز مقاومت‌های دارویی است و همان‌طور که می‌دانید درمان عفونت‌های قارچی به دلیل طول مدت درمان، عود مکرر، عدم وجود تنوع در انتخاب داروهای مختلف به‌طور اولیه مشکل است.^{۳،۴} ازدیاد گزارش‌های مختلف و متفاوت از سراسر دنیا در رابطه با بروز

اهمیت بیماری‌های قارچی فرصت طلب در بیماران مبتلا به نقایص سیستم ایمنی و خصوصاً ایمنی سلولی بر کسی پوشیده نیست. کاندیدیازیس دهانی (Oral candidiasis) رایج‌ترین عفونت قارچی فرصت طلب در بیماران آلوده به ویروس نقص سیستم ایمنی است و از طرفی بیماری‌های کاندیدایی شایع‌ترین عفونت قارچی در انسان و حیوان نیز می‌باشند و این اهمیت بررسی بر روی این گونه‌های قارچی را نشان می‌دهد.^{۱،۲} حفره دهانی انسان و حیوان

بیماری‌های رفتاری واقع در بیمارستان امام خمینی تهران در سال ۱۳۸۷ به دست آمده‌اند. عفونت بیماران به ویروس HIV با روش الیزا و سترن بلات به تایید رسیده بود و بیماران دارای پرونده پزشکی در رابطه با عفونت HIV بوده‌اند. ضایعات دهانی در کلیه بیماران از نظر بالینی بررسی شد و از هر بیمار نمونه سواب دهانی از نواحی مخاط دهان، زبان و لثه در محیط سابورو دکستروز آگار (Merck) و محیط کروم آگار کانیدیا (Paris France company) به طور مستقیم کشت داده شد. هم‌چنین نمونه دهانی با استفاده از پتاس ۱۰٪ به روش میکروسکوپی از نظر وجود هایف کاذب و سلول‌های مخمری بررسی شدند. پلیت‌های کشته داده شده کروم آگار برای تشخیص احتمالی گونه‌های مخمری و شکل و رنگ کلنی به مدت ۷۲ ساعت در دمای 35°C و در تاریکی انکوبه شدند و پلیت‌های سابورو دکستروز آگار در شرایط هوازی به مدت هفت روز در دمای 30°C انکوبه گردیدند تا تمام عوامل احتمالی در این محیط رشد یابند. پس از طی زمان انکوباسیون گونه‌های مخمری با روش‌های مختلف از جمله تشکیل کلامیدوسپور در محیط کورن میل آگار حاوی توین ۸۰ و جذب کربوهیدرات‌ها (Rap IDTM yeast identification system remel) شناسایی شدند.^{۱۱-۱۳}

- آزمایش تعیین حساسیت به داروهای ضد قارچی

روش انتشار دیسک: این روش برای پنج داروی ضد قارچی بر اساس روش پیشنهادی Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) تحت عنوان M44-A انجام گرفت.^{۱۴،۱۵} بدین منظور دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی فلوکونازول ($25\mu\text{g}$)، کتوکونازول ($15\mu\text{g}$)، کلوتریمازول ($10\mu\text{g}$)، نیستاتین ($50\mu\text{g}$) و آمفوتریسین B ($10\mu\text{g}$) تهیه و مورد استفاده قرار گرفت (Mast group Ltd, UK). از دو سویه استاندارد کانیدیا/آلبیکنس (ATCC1023) و کانیدیا/دابلیو نینسیس (CD 36) در کنار سایر جدایه‌های کانیدایی به کار برده شده در این مطالعه به عنوان کنترل استفاده شد. پلیت‌های مولر هیتون آگار (MHA) حاوی ۲٪ گلوکز و متیلن بلو (GMB) با قطر چهار میلی‌متر بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون سلول‌های مخمری در سرم فیزیولوژی استریل مطابق با کدورت نیم مک فارلند (که حاوی $5 \times 10^6 - 1$ سلول است) تهیه گردید. سپس سطح محیط کشت آماده شده به وسیله سواب استریل آغشته شده به سوسپانسیون سلول‌های مخمری تازه کشت داده شده

و افزایش مقاومت‌های دارویی در بین گونه‌های قارچی و کانیدایی و هم‌چنین کمک و تهییج پزشکان به تجویز داروی مناسب و کارا برای بیماران، و در کنار آن تولید داروهای ضد قارچی جدید نیاز به انجام آزمایش‌های تعیین حساسیت را به داروهای مذکور نشان می‌دهد و محققان را مشتاق به تعیین الگوی حساسیت به داروهای مختلف ضد قارچی می‌کند.^۵

با وجود درمان وسیع ضد قارچی و درمان ضد ویروسی موثر که منجر به بهبود سیستم ایمنی در بیماران HIV می‌گردد، بیماری کانیدیا زیس دهانی در این بیماران رایج است و البته میزان بروز بیماری وابسته به گونه عامل ایجاد بیماری، شیوع مقاومت دارویی، درمان قبلی با داروی ضد قارچی و شرایط سیستم ایمنی میزبان دارد. مطالعات مختلفی بر روی میزان حساسیت گونه‌های کانیدای جدا شده از بیماران HIV در سراسر دنیا انجام شده است اما میزان شیوع گونه‌های کانیدای مقاوم به داروهای ضد قارچی در بیماران آلوده به HIV در ایران مورد بررسی قرار نگرفته است. پر واضح است تعیین الگوی حساسیت به داروهای ضد قارچی گونه‌های کانیدای جدا شده از بیماران نقص ایمنی و از جمله بیماران آلوده به HIV در پیشگیری و درمان صحیح این بیماران موثر و اساسی است. تعیین حساسیت به روش انتشار دیسک که یک روش ساده و پذیرفته شده در آزمایشگاه‌ها است جهت تعیین حساسیت گونه‌های کانیدیا به داروهای ضد قارچی به خوبی ارایه شده و گسترش یافته است و با وجود آن‌که در تعیین دقیق مقاومت به دارو با مشکلاتی مواجه هستیم اما به نظر می‌رسد روش انتشار دیسک یک روش ساده و به نسبت ارزان برای آزمایش تعیین حساسیت در آزمایشگاه‌های بالینی مختلف است.^{۶-۹} مطالعه حاضر میزان حساسیت گونه‌های کانیدای جدا شده از بیماران آلوده به HIV را به برخی داروهای ضد قارچی نشان می‌دهد و در این مطالعه جهت تعیین هر چه بهتر میزان مقاومت از دو روش انتشار دیسک و میکرودایلوشن برات استفاده شده است.

روش بررسی

این مطالعه یک مطالعه توصیفی-تحلیلی است. در این مطالعه حساسیت گونه‌های کانیدای به کار رفته در این مطالعه از ۱۵۰ بیمار آلوده به ویروس نقص سیستم ایمنی مراجعه کننده به مرکز مشاوره

یافته‌ها

بر اساس جدول ۱ کاندیدا آلبیکنس (۲/۵۰٪) و به دنبال آن کاندیدا گلابراتا (۲۲٪) شایع‌ترین گونه‌های جدا شده از حفره دهانی بیماران آلوده به ویروس HIV بودند. در رابطه با میزان شیوع کاندیدیازیس دهانی و اشکال بالینی مختلف آن در این بیماران در مقاله دیگری به تفصیل پرداخته‌ایم.^{۱۹} دویست جدایه کاندیدا از نظر حساسیت به پنج داروی ضد قارچی مورد بررسی قرار گرفتند. جدول ۲ میزان حساسیت گونه‌های کاندیدای مورد بررسی را به داروهای کلوتریمازول، کتوکونازول، کلوتریمازول، آمفوتریسین، نیستاتین و کاسپوفانژین را نشان می‌دهد. بر اساس روش انتشار دیسک از ۱۰۵ جدایه کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی ۲۵/۷٪ به فلوکونازول مقاومت نشان دادند ($MIC \geq 64 \mu g/ml$)، هم‌چنین ۲۱/۹٪ و ۱۶/۴٪ از کاندیدا آلبیکنس‌های مورد بررسی به ترتیب به کتوکونازول و کلوتریمازول مقاومت نشان دادند ($MIC > 0/125 \mu g/ml$). مقادیر $MIC < 0/90$ و محدوده MIC به دست آمده به روش میکروداپلوشن براث برای سایر جدایه‌های کاندیدا مورد بررسی در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول-۱: فراوانی گونه‌های کاندیدای جدا شده از بیماران آلوده به HIV

گونه‌ها	فراوانی	درصد
ک. آلیکنس	۱۰۳	۵۰/۲
ک. گلابراتا	۴۵	۲۲
ک. دابلی نیسیس	۹	۴/۴
ک. تروپیکاليس	۷	۳/۴
ک. کفیر	۷	۳/۴
ک. پاراسلیویزس	۶	۲/۹
ک. فاماتا	۲	۱/۰
ک. گلیرمندی	۱	۰/۵
ک. کروزه‌ای	۱	۰/۵
ساکارومایسس	۲	۱/۰
تریکوسپورون	۲	۱/۰
سایر مخمرها	۱	۰/۵
گونه‌های کاندیدا	۱۹	۹/۰
مجموع	۲۰۵	۱۰۰

تلقیح گردید. پلیت‌های تلقیح شده به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای $35^{\circ}C$ انکوبه گردیدند. قطر هاله عدم رشد از نقطه‌ای که رشد مخمر به میزان ۸۰٪ کاسته شده بود محاسبه گردید. سپس ۹۰ MIC گونه‌های مخمری متناسب با قطر هاله عدم رشد و بر اساس معیار توصیف شده از طرف CLSI و شرکت سازنده دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی محاسبه گردید.

روش میکروداپلوشن براث: در کنار روش انتشار دیسک و با هدف مقایسه و تایید از روش رقت‌سازی سریالی در محیط مایع در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای بر طبق روش پیشنهادی CLSI تحت عنوان M27-A2 استفاده گردید.^{۱۶} در این روش با استفاده از محیط RPMI1640 حاوی گلوتامین و گلوکز به همراه بافر MOPS با pH:۷ حداقل غلظت مهارتی تعیین گردید. در ابتدا غلظت‌های استوک پنج داروی مورد نظر بر طبق دستورالعمل CLSI در محیط RPMI تهیه گردید و در هنگام آزمایش در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای با استفاده از محیط RPMI به رقت مورد نظر رسانده شد. در کنار رقت‌های سریالی تهیه شده از دو چاهک برای کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده شد. سوسپانسیون سلول‌های مخمری در سرم فیزیولوژی استریل با استفاده از سلول‌های مخمری تازه کشت داده شده در محیط SDA آماده شد و به میزانی از آن برداشت گردید که پس از افزودن آن به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی محیط کشت و دارو شمارش نهایی آن در محدوده $10^3 \times 0/5 - 2/5$ قرار گیرد. پلیت‌های تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای $35^{\circ}C$ انکوبه گردیدند و سپس در یک محیط SDA جهت شمارش تعداد کلنی رشد یافته مجدداً کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای $35^{\circ}C$ انکوبه گردیدند. حداقل غلظت داروی ضد قارچی که به میزان ۹۰٪ مانع از رشد قارچ در مقایسه با چاهک کنترل مثبت شده باشد به عنوان MIC90 تلقی می‌گردد. ملاک حساسیت یا مقاومت برای برخی از داروها توسط CLSI پیشنهاد شده است. برای فلوکونازول $MIC \leq 8 \mu g/ml$ به عنوان حساس، $MIC: 16 - 32 \mu g/ml$ به عنوان حساس وابسته به دوز و $MIC \geq 64 \mu g/ml$ به عنوان مقاوم شناخته می‌شود. در رابطه به کتوکونازول و کلوتریمازول $MIC > 0/125 \mu g/ml$ به عنوان حساس شناخته می‌شود. این میزان برای داروهای آمفوتریسین B و نیستاتین و کاسپوفانژین $MIC \leq 1/0 \mu g/ml$ است و $MIC > 1/0 \mu g/ml$ به عنوان مقاوم شناخته شده است.^{۱۷،۱۸}

جدول- ۲: حساسیت جدایه‌های کاندیدای جدا شده از بیماران آلوده به HIV بر اساس میکروداپلوشن براث و انتشار دیسک

داروهای ضد قارچی	گونه‌های مخمری	میکروداپلوشن براث		انتشار دیسک	
		MIC Rang	MIC ₉₀ µg/ml	حساس %	وابسته به دوز %
آمفوتریسین B	کاندیدا آلبیکنس	۰/۰۳-۴	۰/۱۲۵	۹۶/۲	۱
	کاندیدا گلابراتا	۰/۰۳-۰/۵	۰/۱۲۵	۹۵/۶	۴/۴
	کاندیدا دابلی نینسیس	۰/۰۶-۰/۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا تروپیکالیس	۰/۰۳-۱	۰/۱۲۵	۹۲/۳	۷/۷
	کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۱۲۵-۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا کفیر	۰/۰۶-۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	سایر گونه‌های کاندیدا	۰/۰۶-۱	۰/۱۲۵	۸۵	۱۱/۷
	کاندیدا آلبیکنس	۰/۰۶-۱	۰/۱۲۵	۹۸/۱	۱/۹
	کاندیدا گلابراتا	۰/۰۶-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا دابلی نینسیس	۰/۰۶-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
نیستاتین	کاندیدا تروپیکالیس	۰/۰۶-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۰۶-۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا کفیر	۰/۰۳-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	سایر گونه‌های کاندیدا	۰/۰۳-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا آلبیکنس	۱-۱۲۸	۸	۵۵/۲	۱۹/۱
	کاندیدا گلابراتا	۲-۱۲۸	۱۲۸	۳۷/۹	۴/۴
	کاندیدا دابلی نینسیس	۱-۱۲۸	۴	۷۷/۸	۱۱/۱
	کاندیدا تروپیکالیس	۲-۱۲۸	۸	۵۶/۲	۱۷/۷
	کاندیدا پاراپسیلوزیس	۱-۱۲۸	۱۶	۶۰	۱۶/۷
	کاندیدا کفیر	۲-۱۲۸	۴	۶۷/۱	۰
فلوکنازول	سایر گونه‌های کاندیدا	۱-۱۲۸	۱۶	۶۴	۲۵/۲
	کاندیدا آلبیکنس	۰/۰۶-۸	۰/۱۲۵	۶۳/۳	۱۴/۸
	کاندیدا گلابراتا	۰/۰۶-۸	۰/۱۲۵	۵۵/۶	۱۳/۳
	کاندیدا دابلی نینسیس	۰/۰۶-۰/۱۲۵	۰/۰۶	۱۰۰	۰
	کاندیدا تروپیکالیس	۰/۰۶-۸	۰/۱۲۵	۵۶/۲	۲۳/۱
	کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۰۶-۰/۵	۰/۰۶	۷۶/۷	۲۳/۳
	کاندیدا کفیر	۰/۰۶-۴	۰/۱۲۵	۶۷/۱	۰
	سایر گونه‌های کاندیدا	۰/۰۶-۴	۰/۰۶	۷۹/۶	۱۰/۲
	کاندیدا آلبیکنس	۰/۰۶-۸	۰/۱۲۵	۷۵/۷	۱۱/۹
	کاندیدا گلابراتا	۰/۰۳-۸	۰/۲۵	۶۰	۴/۴
کتوکنازول	کاندیدا دابلی نینسیس	۰/۱۲۵-۰/۲۵	۰/۰۶	۱۰۰	۰
	کاندیدا تروپیکالیس	۰/۰۶-۴	۰/۰۶	۷۹/۲	۱۵/۴
	کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۱۲۵-۱	۰/۱۲۵	۶۰	۲۸/۳
	کاندیدا کفیر	۰/۰۶-۸	۰/۱۲۵	۶۷/۱	۰
	سایر گونه‌های کاندیدا	۰/۱۲۵-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا آلبیکنس	۰/۰۶-۱	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا گلابراتا	۰/۰۶-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا دابلی نینسیس	۰/۰۶-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا تروپیکالیس	۰/۰۶-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۰۶-۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
کلوتریمازول	کاندیدا کفیر	۰/۰۳-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	سایر گونه‌های کاندیدا	۰/۰۳-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا آلبیکنس	۰/۰۶-۱	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا گلابراتا	۰/۰۶-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا دابلی نینسیس	۰/۰۶-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا تروپیکالیس	۰/۰۶-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۰۶-۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا کفیر	۰/۰۳-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	سایر گونه‌های کاندیدا	۰/۰۳-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰
	کاندیدا آلبیکنس	۰/۰۳-۰/۲۵	۰/۱۲۵	۱۰۰	۰

مقدار $8\mu\text{g/ml}$ MIC-7/90 داروی فلوکونازول برای کاندیدا آلبیکنس به دست آمده است. این مقدار برای داروی کتوکونازول و کلوتریمازول برابر با $0/125\mu\text{g/ml}$ می‌باشد. در رابطه با جدایه استاندارد (ATCC 10231) کاندیدا آلبیکنس به عنوان یک نمونه مقاوم وابسته به دوز داروی آزول نتایج به دست آمده با وابسته به دوز بودن آن مطابقت داشت، هم‌چنین جدایه استاندارد *Candida dubliniensis* (CD36) به عنوان جدایه حساس به داروی آزول نتایج به دست آمده با حساس بودن آن مطابق بود. میزان مقاومت کاندیدا آلبیکنس به داروهای گروه پلی ان شامل آمفوتریسین و نیستاتین در حد پایینی به دست آمد (به ترتیب ۲/۹ و صفر درصد). کاندیدا گلابراتا - دومین گونه جدا شده از نظر شیوع در این مطالعه - مقاومت قابل توجهی به داروی فلوکونازول نشان داد به طوری که ۵۷/۷٪ از جدایه‌های کاندیدا گلابراتا دارای $125\mu\text{g/ml} > \text{MIC}$ برای این دارو بوده‌اند. هم‌چنین میزان مقاومت به داروهای کتوکونازول و کلوتریمازول به ترتیب ۳۱ و ۳۵ درصد به دست آمد (MIC range: $0/06-8\mu\text{g/ml}$). در رابطه با کاندیدا دابلی نیسیس میزان حساسیت بالایی نسبت به داروهای گروه آزول به دست آمد به طوری که ۷۷/۸٪ جدایه‌ها نسبت به فلوکونازول حساسیت نشان دادند و ۱۱/۱٪ نیز حساسیت وابسته به دوز داشتند. هم‌چنین ۱۰۰٪ از جدایه‌های کاندیدا دابلی نیسیس به کتوکونازول و کلوتریمازول حساسیت نشان دادند. کاندیدا کفیر به عنوان یک گونه حساس به داروهای آزول شناخته شده است، در صورتی که ۳۲/۹٪ از جدایه‌های به دست آمده در این مطالعه به داروهای آزول مقاومت نشان دادند و تمام این جدایه‌های مقاوم از بیماران مبتلا به بیماری عود کننده کاندیدیای به دست آمده است. در مجموع میزان مقاومت به داروهای آزول فراگیر است. تفاوت قابل توجهی بین بیمارانی که داروهای آزول دریافت کردند و آن‌دسته که این داروهای را دریافت نمی‌کردند در جداسازی گونه‌های کاندیدای مقاوم به آزول مشاهده گردید ($P: 0/02$). کلیه جدایه‌های به دست آمده گونه‌های کاندیدیایی در این مطالعه به داروی نیستاتین، آمفوتریسین B و کاسپوفانژین حساسیت نشان دادند.

بحث

ظهور گونه‌های کاندیدای مقاوم به داروهای ضد قارچی و

افزایش بیماران مبتلا به نقایص سیستم ایمنی از مهم‌ترین عوامل یا فاکتورهای دخیل در اپیدمیولوژی بیماری کاندیدیازیس و خصوصاً کاندیدیازیس دهانی است. تعیین الگوی حساسیت به داروهای ضد قارچی و شناسایی یا تشخیص ظهور مقاومت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا مقاومت به داروها مهم‌ترین معضل بر سر راه درمان این بیماری‌ها است. در مطالعه حاضر دو روش انتشار دیسک و میکروبراث دایلوژن برای ۲۰۰ گونه کاندیدای جدا شده از بیماران آلوده به HIV به کار برده شد که ۹۸ گونه آن گونه‌های غیر آلبیکنس بوده‌اند و این مطالعه جدیدترین بررسی انجام شده در راستای تعیین حساسیت دارویی بر روی این بیماران در ایران است. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد انواع مختلفی از گونه‌های غیر آلبیکنس شامل کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گیلرموندی و کاندیدا گلابراتا از این بیماران جدا می‌شود. در بین این گونه‌های غیر آلبیکنس کاندیدا دابلی نیسیس با ایجاد بیماری کاندیدیازیس دهانی - حلقی در بیماران HIV مثبت در ارتباط است.^{۲۰} مطابق با بسیاری از مطالعات صورت گرفته در سراسر دنیا کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین گونه کاندیدا در ایجاد بیماری و شایع‌ترین گونه جدا شده از بیماران HIV است، هر چند میزان جداسازی کاندیدا گلابراتا قابل توجه و دور از انتظار بوده است. بر اساس مطالعات صورت گرفته در سایر کشورها کاندیدا گلابراتا به عنوان اولین یا دومین گونه شایع غیر آلبیکنس در بیماران مبتلا به HIV گزارش شده است.^{۲۱-۲۳} ذکر این نکته ضروری به نظر می‌رسد که کلونیزاسیون با کاندیدا گلابراتا پس از درمان با فلوکونازول افزایش می‌یابد.^{۲۴} در رابطه با آزمایشات تعیین حساسیت به داروهای ضد قارچی از دو روش مورد تایید CLSI استفاده شده است که البته در رابطه با مزایا و معایب و نکات تکنیکی این روش‌ها بحث بسیار است و مجال آن نیست. به‌طور معمول مقاومت به داروی آمفوتریسین B در بین گونه‌های کاندیدا درصد کمی را شامل می‌شود^{۲۵} و در مطالعه حاضر حساسیت به داروی آمفوتریسین B و نیستاتین که از داروهای خانواده پلی‌ان‌ها داروی کاسپوفانژین از خانواده اکتینوکاندین‌ها قابل توجه بود، هر چند در موارد اندکی نیز نسبت به داروی آمفوتریسین در بین گونه‌های کاندیدا مقاومت مشاهده گردید (کم‌تر از ۳٪). این یافته مطابق با سایر مطالعات انجام گرفته است نشان می‌دهد میزان مقاومت به این دارو پایین است، هر چند Badiee در بیماران نقص ایمنی میزان

به نحوی باید شرایط واردات یا تولید داروهای جدید را مهیا کنند. در مقایسه با روش میکرودایلوشن، در روش انتشار دیسک نیز نتایج قابل قبولی به دست آمد و اختلاف معنی داری بین این دو روش دیده نشد. به نظر می رسد استفاده از روش های تعیین حساسیت به داروهای ضد قارچی نیز به راحتی با استفاده از روش انتشار دیسک در آزمایشگاه های روتین قابل انجام باشد و به نحوی باید در دستور کار قرار گیرد. به طور خلاصه، در این تحقیق الگوی حساسیت به داروهای ضد قارچی گونه های کاندیدا به دست آمده از بیماران آلوده به HIV مراجعه کننده به مرکز تحقیقات ایدز ایران واقع در بیمارستان امام خمینی تهران بررسی شد. درصد بالای جداسازی گونه های کاندیدای غیر آلبیکنس زنگ خطر تغییر در اپیدمیولوژی کاندیدیازیس دهانی را در بیماران ایرانی در آورده است. بر اساس نتایج به دست آمده، نویسندگان این مقاله بررسی و ردیابی جدایه های کاندیدای مقاوم به دارو را با روش انتشار دیسک و رقت سازی مایع در آزمایشگاه های بالینی برای ارائه خدمات بهتر به بیماران مبتلا توصیه می کنند. با وجود آن که نیستاتین به طور گسترده در این بیماران مورد مصرف بوده است و مقاومتی در برابر این دارو دیده نشد تجویز این دارو برای پیشگیری از بیماری کاندیدیازیس دهانی توصیه می شود. از طرفی میزان بالای مقاومت به داروهای آزول، خصوصا فلوکونازول ما را در استفاده از این دارو به عنوان داروی پیشگیری کننده از بیماری دهانی کاندیدا با تردید مواجه می کند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه تحت عنوان "تعیین ژنوتایپ و الگوی حساسیت گونه های کاندیدای جدا شده از بیماران آلوده به ویروس HIV مبتلا به کاندیدیازیس دهانی در ایران"، در مقطع دکترای تخصصی در سال ۱۳۸۸ به کد ۳۸۰ می باشد که با حمایت دانشگاه تهران انجام شده است. نویسندگان مقاله از کلیه همکارانی که در این تحقیق ما را یاری نمودند، تقدیر و تشکر می نمایند و بر سفید جامگان علوم آزمایشگاهی و پرستاری درود می فرستند.

مقاومت به دارو را در کاندیدا آلبیکنس در حدود ۷٪ گزارش نموده و در برخی مطالعات دیگر این میزان تا حدود ۸٪ بوده است.^{۲۶-۲۸} علی رغم سایر مطالعات انجام شده، با وجود آن که در بیماران مورد بررسی در این مطالعه تجویز نیستاتین رایج بوده است اما هیچ مقاومتی به این دارو دیده نشد و نشان می دهد این دارو همچنان به عنوان یک داروی موثر برای پیشگیری از کاندیدیازیس دهانی مناسب است. هر چند که مصرف موضعی و فقدان جذب سیستمیک در مورد این دارو از دلایل عدم کاربرد آن برای بیماری سیستمیک و کاندیدیازیس مری است. مقاومت به داروی فلوکونازول در اثر استفاده طولانی مدت از این دارو توسط سایر محققین به اثبات رسیده است.^{۲۹} بنابراین این که فلوکونازول داروی کاملا موثری در برابر گونه های کاندیدا و به طور خاص کاندیدا آلبیکنس (به عنوان شایع ترین گونه در ایجاد بیماری های کاندیدیایی) نباشد دور از ذهن نیست، به طوری که در حدود ۲۵٪ از جدایه های کاندیدا آلبیکنس مقاومت به فلوکونازول را نشان دادند. یافته اخیر تا حدودی از نظر درجه و میزان مقاومت به این دارو با سایر گزارشات از این دارو متفاوت است. هر چند در بسیاری از مطالعات مقاومت به این دارو گزارش شده است اما درصد مقاومت نسبت به این مطالعه کم تر بوده است.^{۳۲-۲۹} احتمال می رود با توجه به این که جمعیت مورد بررسی بیماران مبتلا به ویروس نقص سیستم ایمنی بوده است و این بیماران در بیش تر موارد سابقه درمان های قبلی و مداوم را داشته اند، میزان مقاومت در آن ها بیش تر بوده است. با توجه به آزمایشات انجام شده در این مطالعه میزان حساسیت در بین گونه های کاندیدا به ترتیب زیر است:

C. dubliniensis > C. kefyr > C. parapsilosis > C. tropicalis > C. albicans > C. Krusei > C. glabrata.

متأسفانه به دلیل در دسترس نبودن داروی جدید ضد قارچی و یا در پاره ای موارد گرانی برخی داروها بیماران راهی جز مصرف داروی فلوکونازول را ندارند. به نظر می رسد پزشکان می بایست توجه و تمایل به تجویز داروهای جدید داشته باشند و ارگان های ذیربط

References

1. Pelletier R, Peter J, Antin C, Gonzalez C, Wood L, Walsh TJ. Emergence of resistance of *Candida albicans* to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: in vitro and clinical correlations. *J Clin Microbiol* 2000;38(4):1563-8.
2. M. Bharathi and A. Usha Rani. Pathogenic fungal isolates in sputum of HIV positive patients. *Journal of AIDS and HIV Research*, June 2011, Vol. 3(6), pp. 107-113.

3. Morgan J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. *Curr Infect Dis Rep* 2005;7(6):429-39.
4. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis* 2004;10(1):14-9.
5. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(6):1704-13.
6. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Hazen KC, Martinez-Suarez JV, Scalise G. Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. *Med Mycol* 1998;36 Suppl 1:68-78. Erratum in: *Med Mycol* 1999;37(2):147.
7. Pfaller MA, Dupont B, Kobayashi GS, Müller J, Rinaldi MG, Espinel-Ingroff A, et al. Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(9):1805-9.
8. Barry AL, Brown SD. Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1996;34(9):2154-7.
9. Pfaller MA, Diekema DJ, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ. Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2003;41(5):1875-80.
10. P. Saravana Bhavan, Culture and Identification of *Candida Albicans* from Vaginal Ulcer and Separation of Enolase on SDS-PAGE, *International Journal of Biology* 2010, Vol 2 No10 p: 84-93
11. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994;32:1923-9.
12. Sanguinetti M, Porta R, Sali M, La Sorda M, Pecorini G, Fadda G, et al. Evaluation of VITEK 2 and RapID yeast plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2007;45(4):1343-6.
13. Odds FC, Davidson A. "Room temperature" use of CHROMagar *Candida*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38(3):147-50.
14. Wayne P. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004
15. Hazen KC, Baron EJ, Colombo AL, Girmenia C, Sanchez-Sousa A, del Palacio A, et al. Comparison of the susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-year global evaluation using disk diffusion. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5623-32.
16. Wayne P. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution testing of yeasts. Approved standard. 2nd ed. M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002
17. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Infect Dis* 1997;24(2):235-47.
18. Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(5):1647-51.
19. Katirae F, Khosravi AR, Khalaj V, Hajiabdolbaghi M, Khaksar AA, Rasoulinjad M. Oral candidiasis in Human Immunodeficiency Virus (HIV) infected individuals in Iran. *Tehran Univ Med J (TUMJ)*;68(1):37-44.
20. Repentigny LD, Lewandowski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(4):729-59.
21. Blignaut E, Messer S, Hollis RJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibility of South African oral yeast isolates from HIV/AIDS patients and healthy individuals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44(2):169-74.
22. Enwuru CA, Ogunledun A, Idika N, Enwuru NV, Ogbonna F, Aniedobe M, et al. Fluconazole resistant opportunistic oropharyngeal *Candida* and non-*Candida* yeast-like isolates from HIV infected patients attending ARV clinics in Lagos, Nigeria. *Afr Health Sci* 2008;8(3):142-8.
23. Lyon JP, Moreira LM, Cardoso MAG, Saade J, Resende MA. Antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. oral isolates obtained from denture wearers. *Brazil J Microbiol* 2008;39:668-72.
24. Sobel JD, Ohmit SE, Schuman P, Klein RS, Mayer K, Duerr A, et al. The evolution of *Candida* species and fluconazole susceptibility among oral and vaginal isolates recovered from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. *J Infect Dis* 2001;183(2):286-93.
25. 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.
26. Mokaddas EM, Al-Sweih NA, Khan ZU. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. *J Med Microbiol* 2007;56(Pt 2):255-9.
27. Powderly WG, Kobayashi GS, Herzig GP, Medoff G. Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. *Am J Med* 1988;84(5):826-32.
28. Badiee P, Alborzi A, Shakiba E, Ziyaeyan M, Rasuli M. Molecular identification and in-vitro susceptibility of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* isolated from immunocompromised patients. *Iran Red Crescent Med J* 2009;11(4):391-7.
29. Lewis RE, Klepser ME, Pfaller MA. Update on clinical antifungal susceptibility testing for *Candida* species. *Pharmacotherapy* 1998;18(3):509-15.
30. Haberland-Carrodegua C, Allen CM, Beck FM, Buesching WJ, Koletar SL, Sundstrom P. Prevalence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in otherwise healthy outpatients. *J Oral Pathol Med* 2002;31(2):99-105.
31. Rubio Calvo MC, Gil J, Ramirez de Ocariz I, Benito R, Rezusta A. In vitro activity of fluconazole, voriconazole and posaconazole against *Candida* spp. *Rev Esp Quimioter* 2003;16(2):227-32.
32. Bailey DA, Feldmann PJ, Bovey M, Gow NA, Brown AJ. The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J Bacteriol* 1996;178(18):5353-60.

In vitro antifungal susceptibility of oral candida species from Iranian HIV infected patients

Received: December 08, 2011 Accepted: January 21, 2012

Abstract

Farzad Katiraei Ph.D.^{1*}
Ali Reza Khosravi Ph.D.²
Vahid Khalaj Ph.D.³
Mahbobeh Hajiabdolbaghi
M.D.⁴
Ali Asghar Khaksar D.V.M.³
Mehrnaz Rasoulinejad M.D.⁴

1- Mycology Research Center,
Faculty of Veterinary Medicine,
Azad University, Science and
Research Branch, Tehran, Iran.
2- Department of Microbiology,
Faculty of Veterinary Medicine,
University of Tehran, Iran.
3- Biotechnology Research Center,
Pasteur Institute of Iran, Tehran,
Iran.
4- IRCHA, Imam Khomeini
Hospital, Tehran University of
Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Mycology
Research Center, Islamic Azad
University, Science and Research
Branch, Sarv Sq., Before Shahrivand
Shop, Tehran, Iran.
Tel: +98- 912- 6047311
E-mail: katiraei_f@yahoo.com

Background: Oropharyngeal candidiasis and antifungal drug resistance are major problems in HIV positive patients. The increased reports of antifungal resistance and expanding therapeutic options prompted the determination of antifungal susceptibility profile of Candida species isolates in Iranian patients living with HIV/AIDS (PLWHA) in the present study.

Methods: One hundred fifty oral samples from Iranian HIV positive patients were obtained and cultured on CHROMagar and Sabouraud's dextrose agar. All isolates were identified according to assimilation profile, germ tube, colony color and other conventional methods. Disk diffusion testing and Broth Microdilution of six antifungal agents were performed according to the methods described in CLSI.

Results: Candida albicans (50.2%) was the most frequent isolated yeast, followed by C. glabrata (22%). Non-Candida albicans species were isolated from 71 (61%) positive cultures. 25.7% of Candida albicans isolates were resistant to fluconazole (MIC \geq 64 μ g/ml) as were 21.9% and 16.4% to ketoconazole and clotrimazole (MIC $>$ 0.125 μ g/ml), respectively. Resistance to polyene antifungals including amphotericin B and nystatin, and caspofungin were scarce. 57.7% of candida glabrata isolates were resistant to fluconazole, 31% to ketoconazole and 35% to clotrimazole.

Conclusion: Screening for antifungal resistant candida isolates by disk diffusion or broth dilution methods in clinical laboratories is an ideal surveillance measure in the management of oral thrush in patients with HIV/AIDS. Although nystatin is widely used in clinical practice for HIV positive patients, there was no evidence of enhanced resistance to it. Regarding no resistance to caspofungin, its administration is suggested.

Keywords: Antifungal drug resistance, azoles, candida species, HIV infections, oral candidiasis, patients.