مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۹، شماره ۱۰، دی ۱۳۹۳(شماره پی در پی۹۳)

شناسایی و بررسی مقاومت دارویی گونه‌های بیماری‌زای کاندیدا جداسازی شده از عفونت‌های بیمارستانی

کامبیز دیبا[۱]، علیرضا چاوشین[۱]، نیما حسینی جزنی[۱]، پریسا بدیعی[۲]، فرزانه بنیادی[۳*]، حمید علیزاده[۳]، الهام شهنازی [۳]

[۱]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران، [۲] مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی پروفسور البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران،[۳]آزمایشگاه تحقیقات مولکولی قارچ شناسی و انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ وصول : ۱۳۹۳/۱/۲۸ تاریخ پذیرش:۱۳۹۳/۲/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: امروزه استفاده از داروهای ضد قارچی گروه آزول و تعداد مخمرهای مقاوم به این داروها رو به افزایش است. هدف از این مطالعه، تفکیک و شناسایی مخمرهای جداسازی شده از نمونه بالینی افراد مبتلا به کاندیدیازیس و بررسی مقاومت دارویی آن‌ها بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی از ۲۵۶ بیمار مشکوک به عفونت‌های کاندیدیازیس بیمارستانی نمونه‌های جمع‌آوری و بررسی آنها آزمایش مستقیم و کشت انجام گرفت. کلنی‌های مخمری با استفاده از روش‌های فنوتیپی و روش مولکولی واکنش زنجیره پلی‌مراز و هضم آنزیمی تعیین هویت گردیدند. برای بررسی مقاومت دارویی از روش‌های دیسک انتشاری و میکرودایلوشن استفاده گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش‌های آماری توصیفی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از ۶۰ جدایه مخمری، کاندیدا آلبیکنس ۳۷ مورد (۶۱/۶درصد)، کاندیدا کروزه‌ای و کاندیدا گلبراتا هر کدام ۷ مورد (۱۱/۶ درصد)، کاندیدا دوبلینیسیس ۵ مورد (۸/۳ درصد) و کاندیدا تروپیکالیس ۴ مورد (۶/۶ درصد)، شناسایی گردید. بررسی میزان حساسیت نشان داد که گونه‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا کروزه‌ای مقاومت ناچیزی به داروی آمفوتریسین ب در روش دیسک انتشاری داشتند. در روش میکرودایلوشن تمامی سویه‌های کاندیدایی مورد بررسی حساس بودند.

نتیجه‌گیری: هرچند نتایج آزمایش‌های حساسیت ضد قارچی، مقاومت بالایی از سویه‌های مورد مطالعه را نشان ندادند، ولی غربالگری ایزوله‌های کاندیدایی مقاوم به دارو در عفونت‌های کاندیدایی با روش‌های دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن برای مشاهده موارد جدید و مهم مقاومت‌های دارویی در عفونت‌های کاندیدایی، منطقی است.

واژه‌های کلیدی: *کاندیدا*، مقاومت دارویی، دیسک دیفیوژن، میکرودایلوشن

***نویسنده مسئول**: **فرزانه بنیادی**، ارومیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه،آزمایشگاه تحقیقات مولکولی قارچ شناسی و انگل شناسی
Email: farzane.bonyadi@yahoo.com

مقدمه

مخمرهای جنس *کاندیدا* میکروارگانیزم‌هایی هستند که انتشار وسیعی داشته و به طور طبیعی هم‌زیست انسان می‌باشند. شیوع عفونت‌های *کاندیدا*یی به خصوص در بیماران با اختلال سیستم ایمنی قابل توجه بوده و در طول سه دهه گذشته اهمیت فراوانی یافته‌اند. *کاندیدا آلبیکنس* به عنوان شایع‌ترین عامل عفونت‌های کاندیدیازیس مطرح است، اما در عین حال ۱۲ تا ۱۴ گونه کاندیدای غیر آلبیکنس نیز به عنوان عامل عفونت شناخته شده‌اند. مطالعه‌های اپیدمیولوژی اخیر نشان داده است که گونه‌های کاندیدایی مقاوم به درمان نظیر؛ *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا گلبراتا* به تدریج جایگزین *کاندیدا آلبیکانس* در ایجاد بیماری می‌شوند(۱). با شیوع عفونت‌های قارچی و به دنبال افزایش استفاده از داروهای ضد قارچی مانند؛ آزول‌ها، پلی‌ان‌ها و اکینوکاندین‌ها شاهد افزایش قابل ملاحظه مقاومت گونه‌های *کاندیدا* نسبت به ترکیبات ضد قارچی هستیم. عوامل ضد قارچی تری آزولی مانند "فلوکونازول" و "ایتراکونازول" به علت نشان دادن خاصیت درمانی بالا به طور معمول جهت درمان عفونت‌های *کاندیدا* استفاده می‌شوند. مواجهه مکرر با داروهای ضد قارچی به خصوص برای *کاندیدا آلبیکنس* باعث استرس محیطی می گردد که محرک پاسخ‌های سلولی به اثرات مضر دارو می‌باشد و اجازه رشد مستمر را به ارگانیزم می‌دهد. این استرس‌های دارویی از طریق مسیرهای سیگنال ساز منتقل می‌شوند(۲).

از آنجایی که حساسیت گونه‌های مختلف در مقابل داروهای ضد قارچی از جمله آزول‌ها متفاوت می‌باشد، لذا کاندیداهای غیر آلبیکانس نیاز به بررسی بیشتری دارند. یک راه برای شناخت مقاومت‌های دارویی ضدقارچی، مقایسه سویه‌های بالینی با اعضای حساس‌تر خانواده می‌باشد، اما روش دیگر، بررسی مقاومت درآزمایشگاه است. مطالعه‌ها نشان داده است که مکانیزم‌های مقاومت در جمعیت‌های *کاندیدا آلبیکنس* در شرایط مختلف دارای الگوهای متفاوتی می‌باشند(۳).

برای ارزیابی حساسیت مخمرها نسبت به عوامل ضد قارچی، مطالعه‌های زیادی در دهه‌های اخیر صورت گرفته است و روش‌های مختلفی برای آن به کار برده شده است. مطالعه‌های گذشته نشان دادند که مقاومت دارویی به خصوص در مورد داروهای گروه آزول در گونه‌های کاندیدا از جمله *کاندیدا آلبیکنس* و گونه‌های غیر آلبیکنس نظیر *کاندیدا گلبراتا* و *کاندیدا کروزه‌ای* مشهود بوده است. به علاوه اثبات شده است که گونه‌های مقاوم *کاندیدا* در برخی موارد جایگزین گونه اصلی هم زیست طبیعی گشته‌اند(۴). پاک‌شیر و همکاران در سال ۱۳۸۹ نشان دادند که گونه‌های کاندیدای جدا شده از واژینیت‌ها بیشتر متعلق به *کاندیدا آلبیکنس* بوده است و بقیه را گونه‌های غیر آلبیکنس از جمله *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا گلبراتا* تشکیل داده‌اند(۵). از

طرفی بیشترین مقاومت دارویی در گونه‌های کاندیدای دهانی افراد مبتلا به ایدز به ترتیب مربوط به داروهای فلوکونازول، کتوکونازول و کلوتریمازول بوده است و این گونه‌ها هیچ مقاومتی به داروهای کسپافانژین، نیستاتین و آمفوتریسین ب نشان نداده اند. امروزه استانداردهای موسسه آزمایشگاهی و بالینی (CLSI)[1]، روش‌های بر پایه MIC[2] و دیسک دیفیوژن را جهت تعیین میزان حساسیت مخمرهایی چون کاندیدا نسبت به داروهای ضد قارچی ارایه کرده است. روش میکرودایلوشن داده‌های کمی از MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی) را به دست داده و می‌تواند در آزمایشگاه و در سطح گسترده‌ای اجرا گردد. امروزه به کارگیری روش‌هایی بر پایه آگار همانند دیسک دیفیوژن و E-Test نیز برای بررسی حساسیت دارویی مطلوب به نظر می‌رسند. روش دیسک دیفیوژن به عنوان یکی از قدیمی‌ترین تست‌های حساسیت دارویی است و به طور گسترده حتی در آزمایشگاه‌های روتین استفاده می‌گردد(۶). با توجه به تغییر حساسیت میکروارگانیزم‌ها به داروهای ضد قارچی و اهمیت درمان کاندیدیازیس، هدف از این مطالعه تشخیص و شناسایی گونه‌های بیماری‌زای کاندیدا، حاصل از عفونت‌های بیمارستانی و بررسی مقاومت دارویی آن‌ها بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی نمونه‌های بالینی شامل؛ خلط، مایع برونش، ادرار و نمونه‌های جلدی از تعداد ۲۵۶ بیمار مشکوک به عفونت کاندیدایی و حداقل ۴۸ ساعت بستری در بیمارستان آموزشی مرکزی ارومیه جمع آوری شدند. نمونه‌ها در لوله‌های کوچک ۱/۵میلی‌لیتری حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل قرار داده شده و به آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه‌ها از لحاظ حضور عناصر قارچی و رشد قارچ در محیط کشت بررسی گردید.

در آزمایشگاه اسمیرهای تهیه شده به روش‌های شفاف‌سازی و رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ با عدسی شیئی ۴۰× و ۱۰۰× مورد بررسی قرار گرفت. جلوه‌های اختصاصی هر یک از موارد مذکور با توجه به روش‌های تشخیصی جاری برای شناسایی و تفکیک ارگانیزم‌های مطرح در عفونت‌های کاندیدیایی مورد استفاده قرار گرفت(۷).

در صورت مشاهده اشکال مهاجم کاندیدایی شامل هایف و سودوهایف در بافت یا نمونه بالینی، کشت نمونه بر روی محیط پایه سابورود گلوکز آگار (Germany, MERCK) و سابورود به همراه کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید(SCC) انجام شد(۸). پس از تأیید رشد مخمرها پس از ۷۲ـ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد از کلنی‌های منفرد، به دو محیط کشت افتراقی انتقال یافتند.

برای کشت در محیط کشت آرد ذرت آگار CMA[3] که محیطی حاوی عصاره ذرت و

1-Clinical and Laboratory Standards Institute
2-Minimum Inhibitory Concentration
3-Corn Meal Agar

آگار(Difco, East Molsey UK) بود، ابتدا دو شیار موازی هم بر روی محیط کشت داخل پلیت ایجاد شد، سپس داخل شیارها کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط پایه SCC وارد گردید. سطح آگار محل تلقیح با یک لامل استریل پوشانده شده و برای انکوباسیون در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. در این محیط برخی گونه‌های کاندیدا بر اساس نوع و شکل سلول‌ها، تشکیل هایف، سودوهایف و آرایش رشد مخمرها بر روی شاخه‌ها افتراق داده شدند(۹).

با ایجاد سوسپانسیون مخمری در سرم فیزیولوژی، یک لوپ از آن بر روی محیط کشت کروم آگار کاندیدا(CHROMagar, Paris, France) گسترش داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. محیط کروم آگار پس از ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت(۱۰).

در این مطالعه روش مولکولی PCR-RFLP برای تأیید شناسایی گونه‌های غیر آلبیکانس کاندیدا و افتراق آن‌ها از یکدیگر مورد استفاده قرار گرفت. منطقه ژنی ITS مربوط به ژن ریبوزومال DNA برای تکثیر انتخاب گردید. برای تکثیر این ناحیه ژنی از یک روش بدون نیاز به استخراج به نام Rapid Colony PCR استفاده گردید. برای تکثیر ناحیه ژنی، شرایط دمایی زیر فراهم شد، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه، در ادامه ۳۰ چرخه ۴۵ ثانیه‌ای در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه (۱۱). سلول‌های مخمری در مقادیر جزئی مستقیماً به پروفایل PCR برده شده و برای تأیید تکثیر قطعه ژنی، محصول PCR روی ژل الکتروفورز افقی برده شد. سپس با استفاده از آنزیم محدودساز[1] به نام *Msp* I (۱۲) قطعات تکثیر یافته DNA ناحیه ژنی ITS مورد هضم آنزیمی قرار گرفت تا با توجه به الگوهای برش متفاوت در گونه‌های مختلف، امکان شناسایی و تفکیک بین گونه‌های کاندیدا از روی جداول الگو فراهم گردد.

روش دیسک انتشاری[2]، از ایزوله‌های بالینی کاندیدا سوسپانسیون سلولی به تعداد 1×10^6 سلول در یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار (MERCK, Germany) حاوی مکمل‌های گلوکز به میزان ۲ درصد و متیلن‌بلو به میزان ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر با سواپ استریل به صورت چمنی کشت داده شد. پس از کشت، دیسک‌های فلوکونازول، آمفوتریسین ب، ایتراکونازول و کسپافانژین بعد از ۱۵ دقیقه در هر یک از پلیت‌ها قرار داده شده و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت قطر هاله آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی شد و نتایج به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم ثبت شدند.

روش مایکرودایلوشن براث[3]، برای تهیه رقت‌های متوالی دارویی و انجام تست حساسیت دارویی، محیط‌های سابوروی دکستروز براث و

1-Restriction Enzyme
2-Disc Diffusion Method
3-Micro Dilution Broth

سابورو دکستروز آگار تهیه و استریل گردید(۱۴). برای تهیه استوک دارویی بر اساس استاندارد توصیه شده CLSI، پودرهای فلوکونازول، آمفوتریسین ب، ایتراکونازول و کسپافانژین وزن گردید و در یک میلی‌لیتر دی متیل سولفو اکساید (DMSO) حل گردید. دامنه دارویی از غلظت ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به میزان ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر ادامه یافت. در ادامه به هر یک از لوله‌های حاوی رقت‌های مختلف دارویی، $۱۰^{۳}$× ۱کلنی در هر لیتر سوسپانسیون مخمری اضافه گردید. لوله‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد در داخل انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. بر اساس بررسی رشد نمونه‌ها در هر یک از رقت‌های دارویی نسبت به گروه کنترل، مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ($MIC_{۵۰}$) داروها محاسبه گردید(۱۴).

در نهایت با مقایسه نتایج روش‌های دیسک‌های انتشاری و مایکرودایلوشن با مقادیر استاندارد معرفی شده در مقیاس CLSI موارد مقاوم و میزان مقاومت سویه‌های مورد آزمایش تعیین گردید.

یافته‌ها

در طول شش ماه از تاریخ اردیبهشت ماه ۱۳۹۲ تا آبان ماه ۱۳۹۲ حدودا ۲۵۶ نمونه بالینی شامل؛ خلط، مایع شستشوی برونش، ادرار، ترشحات سینوسی و پوست از بخش‌های پیوند، خون وبخش مراقبتهای ویژه بیمارستان‌های مرکزی آموزشی شهر ارومیه جمع‌آوری گردید.

در نتیجه آزمایش‌های اولیه میکروسکوپی در مرکز قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده پزشکی ارومیه، تعداد کل ۶۰ مورد گونه‌های مختلف مخمر کاندیدا از نمونه‌های مورد مطالعه تشخیص داده شد. از بررسی‌های تکمیلی شامل کشت‌های افتراقی و آزمایش مولکولی PCR-RFLP گونه‌های *کاندیدایی*، *کاندیدا آلبیکنس* ۳۷ مورد، *کاندیدا کروزه‌ای* و *کاندیدا گلبراتا* هر کدام ۷ مورد، *کاندیدا دوبلینیسیس* ۵ مورد و *کاندیدا تروپیکالیس* ۴ مورد، شناسایی گردید(جدول ۱).

بررسی میزان حساسیت گونه‌های شناسایی شده به چهار آنتی‌بیوتیک ضد قارچی شامل؛ فلوکونازول، ایتراکونازول، آمفوتریسین ب و نیستاتین نشان داد که گونه *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به گونه‌های دیگر مورد مطالعه، حساسیت کمتری به داروی فلوکونازول نشان می‌دهد، در صورتی که در میان سویه‌های *کاندیدایی* مورد مطالعه، سویه‌های مربوط به *کاندیدا تروپیکالیس* از حساسیت بیشتری برخوردار بود. نسبت به داروی آمفوتریسین ب نیز *کاندیدا تروپیکالیس* بیشترین و *کاندیدا آلبیکنس* کمترین حساسیت را داشته‌اند. بیشترین و کمترین حساسیت به ایتراکونازول به ترتیب مربوط به *کاندیدا کروزه‌ای* و *کاندیدا آلبیکنس* بود. *کاندیدا گلبراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* حساس‌ترین گونه‌ها نسبت به نیستاتین بودند و هیچ‌کدام از گونه‌های مورد آزمایش در دامنه مقاومت تست قرار نگرفتند(جدول ۲). گونه‌های *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا دوبلینیسیس* و

کاندیدا آلبیکنس نسبت به آمفوتریسین ب و *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به فلوکونازول مقاومت نشان دادند که بیشترین مقاومت مربوط به *کاندیدا کروزه‌ای* نسبت به داروی آمفوتریسین ب بود(جدول ۲). گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلبراتا*، *کاندیدا دوبلینیسیس*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا کروزه‌ای* تحت تأثیر مجاورت داروهای ضد قارچی مورد مطالعه، حساسیت متفاوتی را به شکل کدورت لوله‌های رقتی نشان دادند. با مقایسه کدورت حاصله در لوله‌های تست با میزان کدورت استاندارد معرفی شده به وسیله CLSI بیشترین میزان حساسیت دارویی به طور کلی در مورد کسپافانژین دیده شد و کمترین حساسیت گونه‌ها نسبت به داروی ضد قارچی فلوکونازول مشاهده شد. در میان گونه‌های کاندیدایی مورد بررسی، بیشترین حساسیت تقریبی به داروهای فوق در میان سویه‌های *کاندیدا گلبراتا* مشاهده گردید و به همین ترتیب کمترین حساسیت در *کاندیدا کروزه‌ای* ثبت گردید، نتایج در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول ۱: فراوانی و درصد گونه‌های *کاندیدای* جداسازی شده از ۲۵۶ نمونه بالینی بیمارستانی

گونه	فراوانی	درصد
کاندیدا آلبیکنس	۳۷	۶۱/۶
کاندیدا تروپیکالیس	۴	۶/۶
کاندیدا کروزه‌ای	۷	۱۱/۶
کاندیدا گلبراتا	۷	۱۱/۶
کاندیدا دوبلینیسیس	۵	۸/۳
مجموع	۶۰	۱۰۰

جدول ۲: نتایج حاصل از آزمون حساسیت دارویی گونه‌های *کاندیدای* مورد مطالعه با روش انتشاردیسک

گونه	فلوکونازول		آمفوتریسین ب		ایتراکونازول		نیستاتین	
	الگوی حساسیت	قطر هاله (میلی‌متر)	الگوی حساسیت	قطر هاله(میلی‌متر)	الگوی حساسیت	قطر هاله(میلی‌متر)	میزان حساسیت	**قطر هاله میلی متر**
کاندیدا آلبیکنس	حساس	۵۳	مقاوم	۱۹	حساس	۲۲	حساس	۲۲
کاندیدا تروپیکالیس	حساس	۵۴	حساس	۱۷/۵	حساس	۲۱	حساس	۲۱/۵
کاندیدا کروزه‌ای	حساس	۴۹	مقاوم	۱۵	حساس	۲۳	حساس	۲۱
کاندیدا گلبراتا	حساس	۴۱	حساس	۱۴	حساس	۲۳	حساس	۲۳
کاندیدا دوبلینیسیس	حساس	۴۸	مقاوم	۱۹/۵	حساس	۲۳	حساس	۲۴

جدول ۳: نتایج آزمایش‌های حساسیت دارویی گونه‌های *کاندیدا* با روش میکرودایلوشن براث و تعیین MIC (حداقل غلظت مهار کنندگی)

گونه‌ها	حداقل غلظت مهارکنندگی بعد از ۴۸ ساعت							
	فلوکونازول		آمفوتریسین ب		ایتراکونازول		کسپافانژین	
	الگوی حساسیت	غلظت دارو میکروگرم بر میلی‌لیتر	الگوی حساسیت	غلظت دارو میکروگرم بر میلی لیتر	الگوی حساسیت	غلظت دارو میکروگرم بر میلی لیتر	الگوی حساسیت	غلظت دارو میکروگرم بر میلی لیتر
کاندیدا آلبیکنس	حساس	۴/۵	حساس	۲/۵	حساس	۰/۲۳	حساس	۰/۲۰۳
کاندیدا تروپیکالیس	حساس	۸/۰	حساس	۲/۵	حساس	۰/۰۹۴	حساس	۰/۰۳۲
کاندیدا کروزه‌ای	حساس	۰/۲۵	حساس	۱/۱۲۵	حساس	۰/۰۴۸	حساس	۰/۵۱۶
کاندیدا گلبراتا	حساس	۴/۰	حساس	۰/۲۵	حساس	۰/۱۲۵	حساس	۰/۰۳۲
کاندیدا دوبلینیسیس	حساس	۱/۳	حساس	۰/۳۱	حساس	۰/۰۴۸	حساس	۰/۰۳۲

بحث

مطالعه‌های سال‌های ۱۹۸۰ به بعد نشان می‌دهد که عفونت‌های فرصت طلب ناشی از گونه‌های کاندیدا به خصوص در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی به طور قابل توجهی افزایش یافته است، اگرچه *کاندیدا آلبیکانس* ارگانیسم غالب عفونت‌های *کاندیدایی* بوده است، ولی مواردی از عفونت‌های ناشی از سایر گونه‌های *کاندیدا* مثل *کاندیدا گلبراتا*، *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا گیلرموندی*، *کاندیدا فاماتا* و *کاندیدا لوزیتانیا* گزارش شده است (۱۵). برخی از عوامل کاندیدایی فوق الذکر به داروهای ضد قارچی رایج مانند داروهای گروه آزول و به ویژه فلوکونازول که عمدتا برای پیشگیری استفاده می‌شود در حال مقاوم شدن هستند که از آن جمله می‌توان *کاندیدا کروزه‌ای* و *کاندیدا گلبراتا* را نام برد(۱۶). بنابراین عفونت‌های کاندیدایی غیر آلبیکانس احتیاج به بررسی بیشتری داشته و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی نیازمند افزایش توانایی‌های خود در جهت تشخیص سریع و دقیق این گونه‌های مخمری می‌باشند. هدف از این تحقیق بررسی الگوی حساسیت به داروهای ضد قارچی در گونه‌های *کاندیدایی* حاصل از بیماران بستری در بیمارستان آموزشی مرکزی ارومیه بود.

مطالعه‌های بسیاری برای تشخیص و شناسایی گونه‌های مخمری عامل عفونت‌های کاندیدایی انجام گرفته است که از آن جمله می‌توان به مطالعه کولومبو(۱۷) و کنسولارو(۱۸) بر جدایه‌های بیمارستانی، مطالعه‌های پاکشیر بر روی ولوواژینیت(۵) و سایر مطالعه‌ها(۲۱ و ۲۰، ۱۹) در زمینه عفونت‌های کاندیدایی اشاره کرد که همگی نشانگر این هستند که بیشتر عوامل عفونت‌های بررسی شده، به وسیله گونه *کاندیدا آلبیکنس* ایجاد شده‌اند. البته گونه‌های کاندیدایی غیر آلبیکنس نیز در انواع عفونت‌های کاندیدایی به کرات شناسایی شده و مورد مطالعه قرار گرفته‌اند(۲۰). مطالعه‌های لاکهارت(۱۹) و کولومبو(۱۷) موید نتایج حاضر می‌باشند که بر اساس آن *کاندیدا آلبیکنس* در میان گونه‌های مخمری جداسازی شده از موارد متنوع کاندیدیازیس، گونه غالب بوده است. البته برخی مطالعات نتایج متفاوتی را بیان کردند. در سال ۲۰۰۷ موهانتی و همکاران اشاره نمودند که شایع‌ترین گونه جداسازی شده از کاندیدیازیس ولوواژینال، *کاندیدا گلبراتا*(۵۰/۴ درصد) بوده است(۲۰). به طور کلی در طول سال‌ها گونه *کاندیدا آلبیکنس* فراوان‌ترین مخمر همزیست غشاهای مخاطی انسانی می‌باشد و توانایی چسبندگی و اتصال بالایی به این غشاها دارد، لذا به نظر می‌رسد که جداسازی این مخمر با فراوانی بالا در موارد عفونت‌های مختلف توجیه گردد. هرچند که در دهه اخیر گونه‌هایی نظیر *کاندیدا گلبراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* در برخی از عفونت‌ها نظیر ولوواژینیت‌های عود کننده از فراوانی قابل ملاحظه‌ای برخوردار بوده‌اند(۲۲) و یا سایر گونه‌ها نظیر *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گیلرموندی* در موارد

سیستمیک(۲۳) در برخی مطالعات تعداد موارد بالاتری را نسبت به *کاندیدا آلبیکنس* نشان داده‌اند(۲۰).

در میان گونه‌های *کاندیدا* برخی از گونه‌ها در مواردی نسبت به درمان قطعی و موقت مقاومت نشان می‌دهند که از آن جمله می‌توان به گونه‌های *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا گلبراتا* و *کاندیدا کروزه‌ای*(۲۴) اشاره نمود که در بیشتر موارد این نوع مقاومت مرتبط با کاهش حساسیت دارویی ناشی از موتاسیون‌هایی در برخی ژن‌ها می‌باشد(۲۵).

در مطالعه حاضر با روش دیسک انتشاری گونه *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به گونه‌های دیگر مورد مطالعه، حساسیت کمتری نسبت به داروی فلوکونازول نشان داد. مقاومت به داروی فلوکونازول نیز در *کاندیدا آلبیکنس* مشاهده شد که با نتایج حاصل از مطالعه تامسون و همکاران (۲۶) که به بررسی حساسیت دارویی گونه‌های *کاندیدای* حاصل از ضایعات کاندیدایی افراد ایدزی پرداختند، مطابقت دارد. در مطالعه سرینکا و سوبیکا(۲۰۰۶) نیز مقاومت ۳/۶ درصدی از *کاندیدا آلبیکنس* به فلوکونازول نشان داده شده است(۲۷). در میان سویه‌های *کاندیدایی* مورد مطالعه در تحقیق حاضر، سویه‌های مربوط به *کاندیدا تروپیکالیس* از حساسیت بیشتری نسبت به فلوکونازول برخوردار بودند. طبق مطالعه کولومبو و همکاران(۲۰۰۲) نیز گونه‌های *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا گیلرموندی* حساسیت تقریباً برابری نسبت به فلوکونازول داشتند و حساسیت آن‌ها بیشتر از *کاندیدا گلبراتا* و *کاندیدا کروزه‌ای* بوده است(۱۷). پس می‌توان گفت یکی از حساس‌ترین گونه‌ها به فلوکونازول می‌تواند *کاندیدا تروپیکالیس* باشد که هنوز حساسیت خود را به فلوکونازول حفظ کرده است. محققان علت بروز مقاومت گونه‌های *آلبیکانس* به فلوکونازول را افزایش مصرف بی‌رویه داروهای ضد قارچی و درمان طولانی مدت با آن‌ها، جهت درمان عفونت‌های *کاندیدایی* عنوان کرده‌اند. بیشترین و کمترین حساسیت به ایتراکونازول در مطالعه حاضر به ترتیب مربوط به *کاندیدا کروزه‌ای* و *کاندیدا آلبیکنس* بود و هیچ مقاومتی به این دارو دیده نشد. می‌توان گفت که این نتایج با نتایج حاصل از تحقیق اوزکان و همکاران(۲۰۰۵) که اعلام کردند همه نمونه‌های مورد بررسی غیر از یک مورد *کاندیدا آلبیکنس* به ایتراکونازول حساس بوده‌اند، مطابقت دارد(۲۸).

طبق نتایج مطالعه حاضر از روش دیسک دیفیوژن و در مورد داروی آمفوتریسین ب، *کاندیدا تروپیکالیس* بیشترین و *کاندیدا آلبیکنس* کمترین حساسیت را داشته‌اند و مقاومتی به این دارو در هیچ کدام از گونه‌ها دیده نشد. کتیرائی و همکاران(۱۳۹۰) نیز که به بررسی مقاومت دارویی ایزوله‌های دهانی از بیماران آلوده به ایدز پرداختند، نشان دادند که هیچ کدام از گونه‌های مورد مطالعه، مقاومتی به آمفوتریسین ب نشان نداد(۲۹).

در این مطالعه هیچ‌گونه مقاومتی به داروی نیستاتین برای هیچ‌کدام از گونه‌ها مشاهده نشد و *کاندیدا گلبراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* حساس‌ترین

گونه‌ها به نیستاتین بوده‌اند. فلاحتی و همکاران نیز در مطالعه خود حساسیت بالای *کاندیدا آلبیکنس* و گونه‌های غیر *آلبیکانس* را به این دارو نشان داده‌اند(۳۰). این نتایج مشابه نتایج مطالعه فان در چین(۳۱) بر مخمرهای جدا شده از ولوواژینال کاندیدیایی(۲۰۰۸) است، ولی مغایر با گزارش مرکز کنترل بیماری‌ها می‌باشد(۲۹). فان درصد بالای حساسیت گونه‌های *کاندیدا آلبیکانس* را نسبت به نیستاتین به علت مصرف زیاد داروهای گروه آزول در دو دهه اخیر می‌داند(۳۱).

یافته‌های مطالعه ما با روش MIC به طور کلی با نتایج روش دیسک انتشاری تقریباً هماهنگی نشان می‌دهد. به طور مثال در مورد داروی فلوکونازول، همه گونه‌ها نتایج یکسانی را بروز دادند، به جز گونه *کاندیدا دوبلینیسیس* که در روش دیسک انتشاری حساسیت بالاتر از میزان استاندارد را نمایش می‌داد، اما در روش MIC میزان حساسیت در داخل دامنه استاندارد CLSI می‌باشد. هم‌چنین در مورد داروی آمفوتریسین ب با چشم‌پوشی از اختلاف جزیی بین قطر هاله، عدم رشد و حداقل استاندارد CLSI در مورد برخی گونه‌ها مشاهده شد. عمده‌ترین اختلاف در حساسیت دارویی مربوط به گونه *کاندیدا کروزه‌ای* بود که روش دیسک انتشاری این گونه را نسبتاً مقاوم نشان می‌دهد. هر دو روش مورد مطالعه در ارتباط با اثر ایتراکونازول بر تمامی گونه‌های مورد مطالعه انطباق نشان می‌داد. در مطالعه حاضر در روش MIC آنتی‌بیوتیک کسپافانژین نیز مورد مطالعه قرار گرفت که اتفاقاً بیشترین میزان حساسیت دارویی را در گونه‌های کاندیدا شامل می‌گردید در حالی که در همین روش مقاومت گونه‌ها به فلوکونازول بیشترین بود. لوکارت و همکاران نیز در تحقیق خود نتایج حاضر را تأیید کرده و مقاومت بسیار ناچیزی را نسبت به کسپافانژین (۱ درصد) نشان داده‌اند. وجود ارگوسترول در غشای کاندیداها می‌تواند دلیلی برای حساسیت آن‌ها به اکینوکاندین‌ها باشد که ارگوسترول غشاء را مورد هدف قرار می‌دهند(۱۹).

از زاویه‌ای دیگر مقایسه گونه‌های *کاندیدای* مورد بررسی، بیشترین میزان حساسیت به داروی مورد مطالعه را در میان سویه‌های *کاندیدا گلبراتا* و کمترین آن را در *کاندیدا کروزه‌ای* نشان داد. در مطالعه نجف‌زاده و همکاران(۳۲) حساس‌ترین گونه به فلوکونازول، *کاندیدا دوبلینیسیس* و مقاوم‌ترین گونه‌ها *کاندیدا کفایر* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* بودند که با نتایج روش MIC مطالعه ما تا حدودی اختلاف نشان می‌دهد که احتمالاً به نوع نمونه‌های اخذ شده از بیمار مربوط می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به این که در مقایسه با روش MIC، در روش دیسک دیقیوژن نیز نتایج قابل قبولی به دست آمد، به نظر می‌رسد که هر دو روش برای تعیین حساسیت به داروهای ضد قارچی و به صورت معمول در آزمایشگاه‌ها به صورت معمول قابل انجام باشند و باید در دستور کار قرار گیرند. بر اساس

نتایج به دست آمده غربالگری ایزوله‌های کاندیدایی مقاوم به دارو در عفونت‌های کاندیدایی با روش‌های دیسک دیفیوژن و MIC برای مشاهده موارد جدید و مهم مقاومت‌های دارویی در عفونت‌های کاندیدایی، منطقی است.

تقدیر و تشکر

این تحقیق حاصل اجرای طرح پژوهشی می‌باشد که با حمایت مالی معاونت تحقیقات وفنآوری دانشگاه علوم پزشکی ارومیه انجام شد.

REFERENCES

1.Carrasco L, Ramos M, Galisteo R, Pisa D, Fresno M, Gonzalez ME. Isolation of Candida famata from a patient with acute zonal occult outer retinopathy. J Clin Microbiol 2005; 43: 635-40.
2.White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 382-402.
3.White TC. The Presense of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanostrol 14-demethylase in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 1488-94.
4.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 fluconazoleresistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2676-84.
5.Pakshir K, Akbarzadeh M, Bonyadpour B, Mohagheghzadeh AA. In vitro and comparison of Clotrimazol, Fluconazol and Nystatin Against Candida Vaginitis isolates in Shiraz, 2008. J Raf Uni Med Sci 2010; 9(3): 210-20.
6.Wayne P. Clinical laboratory standard institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.Approved standard, M27-A3. Clinical Laboratory Standard Institute, 2008.
7.Raper KB, Fennell DI. The Genus Aspergillus. Baltimore: Williams & Wilkins; 1965.
8.Diba K, Kordbacheh P, Mirhendi H, Rezaie S, Mahmoudi M. Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. Pak J Medl Sci 2007; 23(6): 867-72.
9.Warren N, Shadomy HJ. Yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolkens RH(editors). Manual of clinical microbiology. 6th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1995; 617-29.
10.Larone D. Medically Important Fungi, Washingtone: ASM press, DC 2002.
11.Mirhendi H, Diba K, Rezaei A, Jalalizand N, Hosseinpur L, Khodadadi H. Colony-PCR Is a Rapid and Sensitive Method for DNA Amplification in Yeasts. Iranian J Publ Health 2007; 36(1): 40-4.
12.Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2006; 47(3): 225-9.
13.Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute: 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 (M44-S2) Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
14.Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ. Activities of Fluconazole and Voriconazole against 1586 recent clinical isolates of Candida species determined by Broth Microdilution, Disk Diffusion, and Etest Methods: Report from the ARTEMIS global antifungal susceptibility program, 2001. J Clin Microbiol 2003; 41(4): 1440-6.
15.Jabra-Rizk MA, Baqui AA, Kelley JA, Falkles WA, Mez WG, Meiller TF. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. J Clin Microbiol 1999; 37: 321-6.
16.Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, *et al*. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. J Clin Microbiol 2003; 41: 5729-31.
17.Colombo AL, Matta D, Almeida LP, Rosas R. Fluconazole susceptibility of brazilian *candida* isolates assessed by a disk diffusion method. Braz J Infec Dis 2002; 6(3): 118-23.
18.Consolaro MEL, Albetoni TA, Yoshida CS, Mazucheli J, Peralta RM, Svidzinski TIE. Correlatin of *candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in marina parana Brazil. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 202-5.
19.Lockhart SR, Iqbal N, Clevelan AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, *et al*. Species Identification and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Bloodstream Isolates from Population-Based Surveillance Studies in Two U.S. Cities from 2008 to 2011. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3435-42.
20.Mohanty S, Xess I, Fahmi H, Arti K, Suneeta M, Jorge E. Tolosa. Prevalence & susceptibility to fluconazole of *Candida* species causing vulvovaginitis. Indian J Med Res 2007; 126: 216-9.
21.Ghahri M, Mirhendi H, Imani Fooladi AA, Beyraghi S. Species Identification of *Candida* Strains Isolated from Patients with Candidemia, Hospitalized in Tehran, by Enzymatic Digestion of ITS–rDNA. J Isfahan Med Sch 2012; 29(167): 2413-26.

22.Diba K. Human Mycoses. 1th ed. Iran: Andishe Rafi Press; 2011; 126-138.
23.Zaini F, Mehbod ASA, Emami M. Comprehensive medical mycology. 3rd ed. Iran: University of Tehran Press; 2009; 362.
24.Diba K, Namaki A, Ayatolahi H, Hanfian H. Rapid Identification of Drug Resistant Candida Species causing recurrent vulvovaginal candididasis. Med Mycol J 2012; 53: 193-8.
25.Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, Singh R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. Acta Microbiologica et Immunonologica Hungarica 2007; 54(31): 201-35.
26.Thompson GR, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. Pathol Oral Radiol Endod 2010; 109(4): 488-95.
27.Cernicka J, Subicka J. Resistance mechanism in fluconazole-resistant *candida*. Int J Antimicrob Ag 2006; 27(5): 403-8.
28.Ozcan S, Budak F, Yucesoy G. Prevalence, susceptibility profile & proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. APMIS 2005; 114(2): 139-45.
29.Katiraee F, Khosravi AR, Khalaj V, Hajiabdolbaghi M, Khaksar AA, Rasoulinejad M. *In vitro* antifungal susceptibility of oral candida species from Iranian HIV infected patients. T U M J 2012; 70(2): 96-103.
30.Falahati M, Mahmoodian M, Roodaki MA, Shariat MJ. Study of antifungal effects of nystatin, clotrimazole and miconazole on *candida* specimens isolated from patients. Razi J Med Sci 2004; 12(47): 99-106.
31.Fan SR. Clinical characteristics of vulvovaginal candidiasis and antifungal susceptibilities of *Candida* species isolates among patients in southern China from 2003 to 2006. J Obstet Gyn Res 2008; 34(4): 561-6.
32.Najafzadeh MJ, Falahati M, Akhlagi L, Pushang bageri K. Effects of antifungal drugs commonly used in a variety of clinical *Candida albicans* specimens. Med J Mashhad 2007; 50(95): 89-94.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ) **Original Article**

Identification and Determination of Drug Resistant of Candida species isolated from Hospital Acquired Infections

Diba K[1], Chavoshin AR[1], Hoseyni Jazani N[1], Badie P[2], Bonyadi F [3]*, Alizadeh HR[3], Shahnazi E[3]

[1]Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran, [2]Alborzi Professor Research Center for Infectious Diseases, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, [3]Research Laboratory of Molecular Mycology and Parasitology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Received: 17 April 2014 Accepted: 21 May 2014

Abstract

Background & aim: Currently, the use of antifungal azole group and yeasts resistant to these drugs is increasing. The aim of this study was to isolate and identify the yeasts obtained from candidiasis patients and furthermore determining thier antifungal resistance.

Methods: In the present descriptive study, infections samples were collected from 256 patients with suspected nosocomial candidiasis, then direct exam and culture were performed. Yeast colonies were identified using phenotypic methods, polymerase chain reaction method and enzyme digestion. Data were analyzed using Descriptive statistical tests.

Results: Of sixty isolated yeast**,** thirty-seven cases of *Candida albicans* (61.6%), seven cases of *C. krusei* and *C. glabrata* (11.6%) each, five cases of *C. dubliniensis* (8.3%) and four cases of *C. tropicalis* (6.6%) were indicated. The study showed that the sensitivity of *C. albicans* and *C. cruise* species to amphotericin B was negligible in disk diffusion and very sensitve in microdilution.

Conclusion: Inspite of the results of antifungal susceptibility test of strains studied did not show high resistance, but screening for drug-resistant Candida isolates in Candida infection by disk diffusion and microdilution methods for new cases of drug resistance is reasonable.

Keywords: *Candida*, Drug resistance, Disk diffusion, Microdilution

***Corresponding author: Bonyadi F,** Research Laboratory of Molecular Mycology and Parasitology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
Email: farzane.bonyadi@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Diba K, Chavoshin AR, Hoseyni Jazani N, Badie P, Bonyadi F, Alizadeh HR, et al. Identification and Determination of Drug Resistant of Candida species isolated from Hospital Acquired Infections. Armaghane-danesh 2015; 19(10): 870-882.