ORIGINAL ARTICLE

Antifungal Susceptibility Testing of 90 Clinical and Environmental Isolates of Aspergillus flavus to Voriconazole and Itraconazole

Akbar Hoseinnejad[1],
Mohammad Taghi Hedayati[2],
Maryam Moazeni[3],
Mojtaba Taghizadeh Armaki[1],
Mehdi Abastabar[3]
Mohammad Reza Jabari Amiri[4],
Syed Mojtaba Syedmousavi[3]

[1] MSc Student in Medical mycolog, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, Invasive Fungi Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Invasive Fungi Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] MSc in Medical mycolog Invasive Fungi Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 21, 2015 Accepted Junuary 13, 2016)

Abstract

Background and purpose: Invasive aspergillosis (IA) is a leading cause of morbidity and mortality in patients with decreased immune status. *Aspergillus flavus* is the second most common species causing invasive aspergillosis after *A. fumigatus*. According to limited information on the antifungal susceptibility test against *A. flavus* in Iran, in this study we aimed at evaluating the antifungal susceptibility of two antifungal agents including itraconazole and voriconazole against clinical and environmental isolates of *A. flavus*.

Materials and methods: Four hundred clinical and environmental samples were collected from Mazandaran, Tehran and Khorasan Razavi provinces. The identification of *A. flavus* isolates were confirmed by sequencing of *β-tubulin* gene. The MICs of itraconazole and voriconazole for all isolates of *A. flavus* were determined by the guidelines proposed by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2 for filamentous fungi.

Results: Ninety isolates of *A. flavus* were identified from clinical (n=30) and environmental (n=60) samples. MIC results of all *A. flavus* isolates showed susceptibility to antifungal agents, except for two environmental isolates that demonstrated MIC= 2 μg/ml for itraconazole. MIC_{50}, MIC_{90} and Geometric mean of itraconazole for *A. flavus* isolates were 0.25, 0.5, and 0.21 μg/ml, respectively. The MIC_{50}, MIC_{90} and Geometric mean of voriconazole were 0.25, 0.5 and 0.27 μg/ml, respectively.

Conclusion: In comparison to determined epidemiological cutoff value of *A. flavus*, our data have shown a probable resistance in two isolates of A. *flavus* against itraconazole which draws attention on emergence of full resistance *A. flavus* isolates from Iran.

Keywords: Antifungal susceptibility, *Aspergillus flavus*, voriconazole, itraconazole

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(133): 90-99 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۳ بهمن سال ۱۳۹۴ (۹۹-۹۰)

ارزیابی حساسیت دارویی وریکونازول و ایتراکونازول نسبت به ۹۰ ایزوله محیطی و بالینی آسپرژیلوس فلاووس

اکبر حسین نژاد[۱]
محمد تقی هدایتی[۲]
مریم موذنی[۳]
مجتبی تقی زاده ارمکی[۱]
مهدی عباس تبار[۳]
محمدرضا جباری امیری[۴]
سیدمجتبی سیدموسوی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: آسپرژیلوزیس تهاجمی بیماری شدید و کشنده‌ای می‌باشد که غالباً در افراد مبتلا به ضعف ایمنی اتفاق می‌افتد. آسپرژیلوس فلاووس به عنوان دومین عامل اصلی آسپرژیلوزیس تهاجمی بعد از آ. فومیگاتوس محسوب می‌شود. از آن‌جایی‌که اطلاعات محدودی در رابطه با حساسیت دارویی آسپرژیلوس فلاووس به تری آزول‌ها در ایران وجود دارد، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی حساسیت ایزوله‌های آ.فلاووس به دست آمده از نمونه‌های بالینی و محیطی به داروهای ضد قارچی وریکونازول و ایتراکونازول بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۴۰۰ نمونه بالینو محیطی از سه استان مازندران، تهران و مشهد جمع‌آوری شد. ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس با بررسی مولکولی (PCR و سکوانسینگ) به صورت قطعی شناسایی شدند. در مرحله بعد حساسیت این ایزوله‌های به دست آمده به دو داروی ضد قارچی ایتراکونازول و وریکونازول با روش CLSI (M38A2) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: ۹۰ ایزوله آ. فلاووس (۳۰ مورد نمونه بالینی و ۶۰ مورد نمونه محیطی) به دست آمد. همه ایزوله‌های مورد بررسی MIC<1 را نشان دادند به جز دو مورد از نمونه‌های محیطی که MIC آن‌ها ۲µg/ml بود. MIC_{90} ایزوله‌ها برای وریکونازول و ایتراکونازول به ترتیب ۰/۵ µg/ml، ۰/۵ µg/ml و MIC_{50} ایزوله‌ها برای این دو دارو به ترتیب ۰/۲۵ µg/ml، ۰/۲۵ µg/ml به دست آمد.

استنتاج: با مقایسه cutoff اپیدمیولوژیکی تعیین شده برای آسپرژیلوس فلاووس، نتایج مطالعه حاضر نشان از بروز مقاومت احتمالی در دو گونه جدا شده از محیط در برابر ایتراکونازول می‌باشد که می‌تواند هشداری برای بروز مقاومت جدی در ایزوله‌های گزارش شده از ایران باشد.

واژه های کلیدی: حساسیت دارویی، آسپرژیلوس فلاووس، وریکونازول، ایتراکونازول

مقدمه

آسپرژیلوزیس عفونت فرصت طلبی است که ناشی از گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس می‌باشد. در بسیاری از نقاط دنیا آسپرژیلوس فومیگاتوس به عنوان شایع‌ترین عامل ایجادکننده آسپرژیلوزیس تهاجمی

مولف مسئول: محمدتقی هدایتی– ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی E-mail: hedayatimt@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استاد، گروه قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳ استادیار، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت :۱۳۹۴/۶/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۸/۲۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۱۰/۲۳

مطرح می‌باشد(۱). هرچند مطالعات انجام شده در ایران نشان داده است که آسپرژیلوس فلاووس (آ.فلاووس) گونه غالب جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیطی می‌باشد(۴-۲). در مناطق مختلف دنیا، آب و هوا و ویژگی‌های جغرافیایی منطقه دو فاکتور مهم در تغییر میزان شیوع گونه‌های مختلف آسپرژیلوس می‌باشد. در کشورهایی با آب و هوای خشک و نیمه خشک نظیر عربستان سعودی، تانزانیا، کویت و هند آ.فلاووس عامل اصلی و اول آسپرژیلوزیس مهاجم به حساب می‌آید(۹-۵). علاوه بر آن، به دلایل ناشناخته در مناطق مختلف فراوانی عفونت‌های ناشی از آ.فلاووس در برخی از بیمارستان‌ها در حال افزایش است(۱۱،۱۰). آ.فلاووس عامل ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها از نوع افزایش حساسیت تا انواع تهاجمی در انسان می‌باشد. هم‌چنین این گونه به عنوان یکی از مهم‌ترین تولید کننده‌های مایکوتوکسین در طبیعت و ورود آن به چرخه غذایی انسان، از تهدید کنندگان جدی سلامت انسان نیز محسوب می‌شود(۱۲). در طی دهه‌های اخیر، مطالعات گسترده‌ای در ارتباط با درمان عفونت‌های تهاجمی ناشی از آسپرژیلوس با استفاده از داروهای جدید و جایگزین صورت گرفته است(۱۳). تا سال‌های اخیر درمان‌های مورد استفاده برای عفونت‌های آسپرژیلوسی، تزریق‌های وریدی آمفوتریسین B و ایتراکونازول خوراکی بوده است. اخیراً وریکونازول، پوساکونازول و کاسپوفانژین نیز برای درمان آسپرژیلوزیس تایید شده است(۱۵،۱۴،۱). با وجود تشخیص زود هنگام این بیماری و درمان ضد قارچی آن، میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری هم‌چنان بالا است(۱۸-۱۶). یکی از دلایل این موضوع، ظهور مقاومت در گونه‌های مختلف آسپرژیلوس به داروهای اصلی ضد قارچی در درمان آسپرژیلوزیس می‌باشد. از طرف دیگر به نظر می‌رسد این فرآیند در حال افزایش نیز باشد که آن را به یک مشکل بالینی برجسته با مرگ و میر بالای ناشی از بیماری تبدیل نموده است(۲۱-۱۹). از دلایل پیدایش مقاومت در این دسته از داروها، استفاده بیش از حد از آزول‌ها در کارهای بالینی و هم‌چنین استفاده زیاد از مهارکننده‌های دمتیلاز در کشاورزی می‌باشد(۲۲). اخیراً برای تفسیر بهتر نتایج به دست آمده از تست‌های حساسیت انجام شده بر روی گونه‌های مختلف قارچی وتعیین گونه‌های وحشی مقاوم، از اندازه cutoff اپیدمیولوژیکی ECV (Epidemiological cutoff value) که برای چندین گونه قارچی تعیین شده، استفاده می‌شود. ECV برای گونه‌های آسپرژیلوس به خصوص آ.فلاووس در بعضی نقاط دنیا مشخص شده است(۲۴،۲۳). ولی این مقادیر در ایران تعیین نشده و نیاز است تا مطالعات بیش‌تری دراین زمینه انجام شود. با توجه به واقعیت‌های اشاره شده و وجود مطالعات محدود در زمینه ارزیابی حساسیت دارویی آ.فلاووس در ایران(۲۵) و هم‌چنین با توجه به گزارش وجود ایزوله‌های مقاوم از آسپرژیلوس فومیگاتوس در محیط و نمونه‌های بالینی، این مطالعه برای اولین بار در ایران با تعداد نمونه بیش‌تر وتنوع منطقه‌ای بالاب روی آ.فلاووس با هدف ارزیابی حساسیت دارویی آ.فلاووس نسبت به دو داروی اصلی در درمان آسپرژیلوزیس یعنی وریکونازول وایتراکونازول و نیزجداسازی گونه‌های مقاوم انجام گردید. داده‌های حاصل از این مطالعه می‌توانند در تعیین کاتاف اپیدمیولوژیکی آ.فلاووس برای دو داروی ایتراکوناول و وریکونازول در ایران موثر باشد.

مواد و روش ها

در مطالعه تجربی حاضر طی سال های۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴، ۴۰۰ نمونه بالینیو محیطی از شهر های ساری، تهران و مشهد جمع‌آوری شد. ۱۵۰ نمونه بالینی شامل نمونه های تنفسی بیماران مشکوک به آسپرژیلوزیس شامل برونکو آلوئولار لاواژ، خلط، ترشحات برونشیال، نمونه‌برداری از ضایعات سینوسی، ضایعات جلدی، احشائی، مایع مغزی نخاعی، کراتیت قارچی، ضایعات ناخن و سوختگی از بیمارستان‌های شهرهای ساری، تهران

و مشهد بود. از این ۱۵۰ نمونه بالینی، ۵۰ درصد از شهر ساری و ۳۳/۳ درصد از تهران و ۱۶/۶ درصد از مشهد جمع‌آوری گردید. هم‌چنین تعداد ۲۵۰ مورد از نمونه‌های محیطی که از خاک کشاورزی، هوا و گرد و غبار فضای داخلی بیمارستان، از شهرهای مشهد (۲۶/۶ درصد) و ساری (۷۳/۳ درصد) جمع‌آوری گردید. بعد از جمع‌آوری و آماده سازی نمونه‌ها، با انجام آزمایش مستقیم به وسیله تهیه اسمیر و رنگ آمیزی با کالکوفلور سفید و هم‌چنین کشت بر روی محیط‌های سابورو دکستروز آگار (Difco) و چاپکس (Difco) و بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی‌های قارچی رشد یافته، ایزوله های مشکوک به آ.فلاووس از نمونه های بالینی و محیطی جدا شدند(۲۶). جهت تشخیص دقیق گونه‌های جدا شده از روش مولکولی استفاده گردید. برای این کار DNA نمونه‌های مشکوک به آ.فلاووس با روش فنل کلروفورم استخراج گردید(۲۷) و با استفاده از پرایمرهای Bt2a (5'-gg TAACCAAATCggTgCTgCTTTC-3') و Bt2b (5'-ACCCTCAgTgTAgTgACCCTTggC-3') ناحیه ژنی بتاتوبولین توسط PCR برای این نمونه‌ها تکثیر گردید. مراحل PCR شامل واسرشت اولیه با دمای ۹۵درجه سانتی‌گراد (°C) به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشت °C ۹۴ به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال°C ۶۰ به مدت ۴۵ ثانیه، طویل شدن°C ۷۲ به مدت یک دقیقه و طویل شدن نهایی در دمای °C۷۲ به مدت ۵ دقیقه بود.

حجم نهایی هر یک از واکنش ها۲۵ میکرولیتر بوده که شامل ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه مخصوص PCR، ۱۲ میکرولیتر mastermix(ampilicon) و ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای رفت وبرگشت بود. اندازه محصول PCR برای ژن بتا توبولین در گونه‌های مختلف آسپرژیلوس ۵۰۰-۵۵۰bp می‌باشد. تعیین توالی توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام گردید. آنالیز سکانس جهت تعیین هویت قطعی نمونه‌ها توسط نرم افزار BLAST انجام شد.

ارزیابی حساسیت دارویی نسبت به داروهای وریکونازول و ایتراکونازول

تست حساسیت دارویی با توجه به پروتکل استاندارد CLSI (M38A2) برای قارچ‌های رشته‌ای انجام گردید. برای این منظور حجم اولیه دارویی برای هر یک از داروهای ضد قارچی تهیه شد. به دلیل این که این دو دارو در آب محلول نیستند، پودر خالص این دو دارو در محلول دی‌متیل‌سولفوکساید DMSO (Sigma) حل و غلظت نهایی µg/ml ۳۲۰۰ تهیه گردید. سپس با محیط RPMI 1640 (Sigma) حاوی گلوتامین و بدون بی کربنات، بافر شده با مورفولینوپروپان سولفونیک اسید) که در PH برابر با ۷ تنظیم شدو به نسبت۱ به ۵۰رقیق و رقت‌های سریالی از ۰/۲۵۳۱ تا µg/ml ۱۶ تهیه شد. از کشت ۴ تا ۵ روزه ایزوله‌های آ.فلاووس جهت تهیه سوسپانسیون قارچی استفاده گردید. با توجه به پروتکل استاندارد، سوسپانسیون اولیه توسط سرم فیزیولوژی+ 0.5 tween درصد در لوله‌های استریل تهیه شد. پس از ته نشین شدن ذرات به مدت ۴ تا ۵ دقیقه، محلول رویی به لوله‌های استریل دیگر منتقل و به مدت ۱۵ثانیه شدت تکان شدند. جذب نوری سوسپانسیون‌ها با اسپکتروفوتومتر در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد و توسط محیط RPMI رقیق گردید به طوری که به دو برابر غلظت هر چاهک برسد. غلظت سوسپانسیون قارچی در هر چاهک $0.5\text{-}5\times10^4$ CFU/ml بود(۲۸). پس ازتهیه رقت‌های سریالی از داروهای ایتراکونازول ووریکونازول، ۱۰۰میکرولیتر از داروها به چاهک ۱تا ۱۰ میکروپلیت‌های ۹۶خانه ته صاف ریخته شدند. سپس به همان نسبت سوسپانسیون قارچی به میکروپلیت‌ها اضافه شد. دو چاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. چاهک اول شامل ۱۰۰میکرولیتر از دارو بدون محیط RPMI 1640 به عنوان شاهد آلودگی دارو و چاهک دیگر حاوی ۱۰۰میکرولیتر سوسپانسیون قارچی با محیط RPMI 1640 بدون دارو به عنوان شاهد رشد

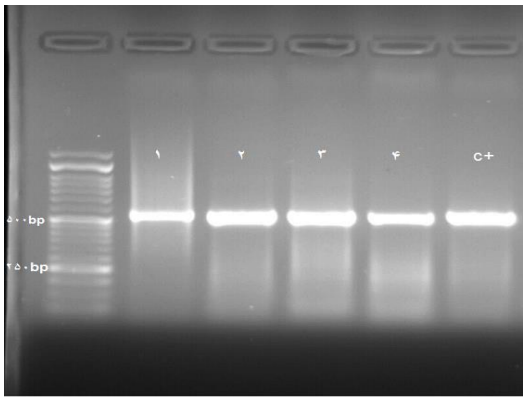
قارچ بود. پس از مواجهه سوسپانسیون قارچی با داروهای مورد نظر در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای، پلیت‌ها در دمای ۳۵ °C انکوبه شد و نتایج پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت به صورت چشمی با استفاده از آینه مخصوص خوانده شد. کم‌ترین غلظت مهاری، اولین چاهکی می‌باشد که باعث مهار ۱۰۰درصد رشد قارچی شده باشد. به‌منظور تفسیر نتایج به دست آمده از مقادیر کاتاف اپیدمیولوژیکی که برای هرکدام از دو دارو در چند مطالعه قبلاً تعیین شد(۲۴،۲۳)، استفاده گردید. مقادیر کاتاف اپیدمیولوژیکی در جدول شماره ۱ آمده است.در این مطالعه از نمونه‌های استاندارد *Paecilomyces variotii* (ATCC 22319), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) برای کنترل کیفی آزمایش حساسیت استفاده شد. هم‌چنین GM (Geometric mean) با استفاده از نرم افزار Microsoft Office Excel 2010 SP3 برای این دو دارو به دست آمد.

جدول شماره ۱: MIC_{90}، MIC_{50} و GM(geometric mean) و *MIC rang(µg/ml)* ایتراکونازول و وریکونازول نسبت به ایزوله های آ.فلاووس

	MIC_{90}	MIC_{50}	MIC rang(µg/ml)	GM	ECV < درصد
ایتراکونازول	۰/۵۰	۰/۲۵	۰/۲۵-۲	۰/۲۱	۲/۲
وریکونازول	۰/۵۰	۰/۲۵	۰/۲۵-۱	۰/۲۷	۰/۰

یافته ها

۱۵۰ (۳۷/۵درصد) نمونه بالینی و هم‌چنین ۲۵۰ (۶۲/۵درصد) مورد نمونه محیطی از سه شهر تهران، ساری و مشهد جمع آوری شد. پس از بررسی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی از کلنی‌های قارچی رشد یافته، ۶۰ مورد از نمونه های بالینی(۴۰درصد) (شامل برونکو آلوئولار لاواژ ۵۶/۶ درصد، خلط۶/۶ درصد، نمونه‌برداری از ضایعات سینوسی۱۳/۳ درصد، ضایعات جلدی۶/۶ درصد، مایع مغزی- نخاعی۶/۶ درصد، ضایعات ناخن ۱۰درصد) و ۱۴۰ مورد از نمونه های محیطی (۵۶درصد)(شامل خاک کشاورزی۵۱/۶درصد، هوا و گرد و غبار فضای داخلی بیمارستان۴۸/۳درصد) مشکوک به آ.فلاووس تشخیص داده شدند. در نهایت با انجام روش مولکولی PCR (تصویر شماره۱) و هم‌چنین با انجام تعیین توالی (DNA sequencing) تعداد ۳۰ مورد از نمونه‌های بالینی (۵۰ درصد) و ۶۰ مورد از نمونه‌های محیطی (۴۲درصد) آ.فلاووس شناسایی شدند که مشخصات کامل این ایزوله‌ها در جدول شماره۲ آمده است. طبق نتایج به دست آمده از ارزیابی حساسیت دارویی ایزوله‌های آ.فلاووس، میزان MIC_{90} و MIC_{50} برای همه ایزوله‌ها نسبت به ایتراکونازول به ترتیب ۰/۵۰ µg/ml و ۰/۲۵ µg/ml بود. دو مورد (۲/۲درصد) از ایزوله‌ها دارای MIC بالاتری نسبت به کاتاف اپیدمیولوژیکی ارائه شده برای آ.فلاووس بودندکه نشان‌دهنده مقاومت این دو ایزوله نسبت به داروی ایتراکونازول می‌باشد. ۸۸ ایزوله نیز ITR MIC≤ECV داشتند که همه‌گونه حساس محسوب می‌شوند. میزان MIC_{90} و MIC_{50} برای کل ایزوله‌ها نسبت به وریکونازول نیز به ترتیب ۰/۵۰ µg/ml و ۰/۲۵ µg/ml بود (جدول شماره ۱). برای وریکونازول همه ایزوله‌های مورد آزمایش دارای MIC پایین تری نسبت به ECV داشتند که نشان‌دهنده حساسیت این ایزوله ها به وریکونازول می‌باشد.



تصویر شماره ۱: الگوی باندی محصولات PCR در ایزوله های مشکوک به آ.فلاووس

جدول شماره۲: منابع آ.فلاووس‌های جداشده از محیط و نمونه‌های بالینی

شهر	نوع نمونه	مکان	تعداد
مشهد	بالینی	برونکو آلوئولار لاواژ	۵
	محیطی	خاک مزارع کشاورزی	۱۶
ساری	بالینی	برونکو آلوئولار لاواژ	۴
		خلط	۲
		سینوس	۲
		ضایعات جلدی	۲
		CSF	۲
		ضایعات ناخن	۳
	محیطی	خاک مزارع کشاورزی	۱۵
		گردو غبار	۲۹
تهران	بالینی	سینوس	۲
		برونکو آلوئولار لاواژ	۸
تعداد کل نمونه ها		۹۰	

بحث

آسپرژیلوزیس تهاجمی بیماری شدید و کشنده‌ای می‌باشد که غالباً در افراد مبتلا به ضعف ایمنی اتفاق می‌افتد(۱۷). مدیریت درمانی موفقیت‌آمیز آسپرژیلوزیس مهاجم، بستگی به شروع به موقع درمان و هم‌چنین انتخاب داروی ضد قارچی مناسب و عدم مقاومت قارچ به آن دارد(۲۹). مقاوت گونه‌های آسپرژیلوس نسبت به داروهای آزولی که در درمان آسپرژیلوزیس تهاجمی به عنوان داروهای خط اول درمان محسوب می شوند با گذشت زمان درحال افزایش بوده است(۳۰)؛ که این مساله نهایتاً موجب عدم موفقیت در درمان آسپرژیلوزیس تهاجمی و به دنبال آن افزایش میزان مرگ ومیر ناشی از آن را در پی داشته است(۲۰). با توجه به اهمیت موضوع و توسعه فعالیت‌های کشاورزی و باغداری در ایران و استفاده زیاد از سموم متنوع دفع آفات و هم‌چنین عدم وجود اطلاعات کافی در مورد تاثیرات ضد قارچی داروهای وریکونازول و ایتراکوناول در درمان آسپرژیلوزیس با عامل آ.فلاووس در ایران، در مطالعه حاضر حساسیت دارویی گونه‌های آسپرژیلوس فلاوس جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیطی نسبت به ایتراکونازول و وریکونازول مورد ارزیابی قرار گرفته است. در مطالعه حاضر همه ایزوله‌ها برای وریکونازول MIC بالاتراز مقدار ECV داشتند که این نشان‌دهنده حساس بودن همه ایزوله‌ها به وریکونازول می‌باشد. هم‌چنین تمامی این ایزوله‌ها به جز دو مورد که دارای MIC> ECV بودند، نسبت به ایتراکونازول حساسیت نشان دادند. میزان MIC_{50} برای کل ایزوله‌ها نسبت به ایتراکونازول و وریکونازول به ترتیب ۰/۵ µg/ml و ۰/۵ µg/ml بود. هم‌چنین MIC_{90} و GM برای ایتراکونازول و وریکونازول به ترتیب ۰/۲۵، ۰/۰،۲۱/۲۵ و۰/۲۷ µg/ml بود. بررسی‌های اخیر حساسیت ایزوله‌های آ.فلاووس نسبت به ایتراکونازول و وریکونازول در مناطق مختلف دنیا از جمله اسپانیا در مطالعه Lass-Florl و همکاران(۳۱)، هند در مطالعه Shobana و همکاران(۳۲)، تونس در مطالعه Gheith و همکاران(۲۳) پرتغال در مطالعه Araujo و همکاران(۳۳)، یونان در مطالعه Arabatzis و همکاران(۳۴) مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج مطالعات ذکر شده همانند مطالعه حاضر حاکی از حساسیت خوب این ایزوله‌ها به ایتراکونازول و وریکونازول می‌باشد. در تمامی این مطالعات ۹۵ درصد الی ۱۰۰درصد ایزوله‌ها دارای MIC < 1 µg/ml و یا به عبارتی دارای MIC پایین‌تری نسبت به مقدار ECV تعیین شده برای وریکونازول و ایتراکونازول بودند. از طرف دیگر در دو مورد (۲/۲درصد) از ایزوله‌های محیطی MIC بالاتری از ایتراکونازول در مقایسه با کاتاف اپیدمیولوژیکی ارائه شده برای آ.فلاووس به دست آمد که نشان دهنده مقاومت نسبی این دو ایزوله نسبت به ایتراکونازول می‌باشد. نتایج مطالعات انجام شده در ارتباط با حساسیت ایزوله‌های بالینی(۳۱-۲۷) در مقایسه با ایزوله‌های محیطی آ. فلاووس(۳۶،۳۵) نشان می‌دهد که ایزوله‌هایی که از بالین جدا می‌شوند، حساسیت بهتری به وریکونازول و ایتراکونازول نشان می‌دهند. این مسئله می‌تواند به علت میزان بالای مصرف ترکیبات ضد قارچی محیطی (مانند مهارکننده‌های دمتیلاز) در کشاورزی باشد(۳۸،۳۷). در چندین مطالعه که

توسط Espinel-Ingroff و همکاران (۳۹)، Pfaller و همکاران(۲۴) و هم‌چنین Gheith و همکاران(۲۳) انجام گرفته MIC>ECV یا به عبارتی دیگر MIC>1 µg/ml برای دو داروی وریکونازول و ایتراکونازول در برابر گونه آ.فلاووس به عنوان گونه مقاوم در نظر گرفته شده است. بر این اساس در بررسی‌های Shivaprakash و همکاران(۴۰)، Lionakis و همکاران(۴۱) و Hsueh و همکاران(۴۲) برخلاف مطالعه حاضر که فقط دو مورد از ایزوله‌ها دارای MIC=2 µg/ml بودند، چند مورد ایزوله با MIC>8 µg/ml به عنوان گونه‌های مقاوم آ.فلاووس به وریکونازول و ایتراکونازول گزارش شده است که نسبت به دو مورد مطرح شده در مطالعه حاضر، مقاومت بالایی را از خود نشان دادند که این اتفاق ممکن است حاصل استفاده بیش از حد از داروهای آزولی در بیمارستان‌ها و مراکز درمانی در این مناطق باشد(۳۷).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نتایج مطالعه حاضر همانند مطالعات قبلی انجام شده در ایران(۴-۲) نشان داد که گونه غالب جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیطی در ایران آ.فلاووس می‌باشد. هم‌چنین آ.فلاووس‌های به دست آمده از این نمونه‌ها حساسیت قابل قبولی نسبت به داروهای ایتراکونازول (۹۷/۷ درصد ایزوله‌ها دارای MIC≤1) و وریکونازول (۱۰۰ درصد ایزوله‌ها دارای MIC≤1) داشتند. با مقایسه ECV تعین شده برای آ.فلاووس، نتایج مطالعه حاضر نشان از بروز مقاومت احتمالی در دو گونه جدا شده از محیط در برابر ایتراکونازول می‌باشد که می‌تواند هشداری برای بروز مقاومت جدی در ایزوله‌های گزارش شده از ایران باشد.

References

1. Hedayati MT, Khodavaisy S, Aliali M. A review on invasive aspergillosis in patients admitted to Intensive Care Unit with emphasis on diagnosis methods. J Mazandaran Univ Med Sci 2010; 19(74): 99-112.
2. Hedayati MT, Bahoosh M, Kasiri A, Ghasemi M, Motahhari SJ, Poormosa R. Prevalence of fungal rhinosinusitis among patients with chronic rhinosinusitis from Iran. Journal de Mycologie Médicale 2010; 20(4): 298-303.
3. Hedayati MT, Khodavaisy S, Alialy M, Omran SM, HabiBi M. Invasive aspergillosis in intensive care unit patients in Iran. Acta Medica (Hradec Králové) 2013; 56(2): 52-56.
4. Khodavaisy S, Alialy M, Omran SM, Habibi M, Amri P, Monadi M, et al. The study on fungal colonization of respiratory tract in patients admitted to Intensive Care Units of Sari and Babol hospitals, 2009-2010. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2011; 54(3): 177-184.
5. Hadrich I, Makni F, Sellami H, Cheikhrouhou F, Sellami A, Bouaziz H, et al. Invasive aspergillosis: epidemiology and environmental study in haematology patients (Sfax, Tunisia). Mycoses 2010; 53(5): 443-447.
6. Hadrich I, Makni F, Neji S, Cheikhrouhou F, Sellami H, Ayadi A. A Review Molecular Typing Methods for Aspergillus flavus Isolates. Mycopathologia 2011; 172(2): 83-89.
7. Khairallah S, Byrne K, Tabbara K. Fungal keratitis in Saudi Arabia. Doc ophthalmol 1992; 79(3): 269-276.
8. Suganthini K, Natesana b, Pranatharthi H, Chandrasekara, Alangadena GJ, Manavathua EK. Molecular characterisation of cyp51A and cyp51B genes coding for P450 14-alfa - lanosterol demethylases A (CYP51Ap) and B (CYP51Bp) from voriconazole-resistant

laboratory isolates of Aspergillus flavus. Int J Antimicrob AG 2008; 32(6): 519-524.

9. 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.
10. Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca.estrella M, Rodriguez.Tudela JL. Identification of Two Different 14-a Sterol Demethylase-Related Genes (cyp51A and cyp51B) in Aspergillus fumigatus and Other Aspergillus species. J Clin Microbiol 2001; 39(7): 2431-2438.
11. Sutton DA, Sanche SE, Revankar SG, Fothergill AW, Rinaldi MG. In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of Aspergillus terreus, with a head-to-head comparison to voriconazole. J Clin Microbiol 1999; 37(7): 2343-2345.
12. Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P ,Denning DW. Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology 2007; 153(6): 1677-1692.
13. Ullmann A, Cornely O. Antifungal prophylaxis for invasive mycoses in high risk patients. Curr Opin Infect Dis 2006; 19(6): 571-576.
14. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fung. J Clin Microbiol 2003(41): 3623-3626.
15. Rudramurthy S, Chakrabarti A, Geertsen E, Mouton J, Meis J. In vitro activity of isavuconazole against 208 Aspergillus flavus isolates in comparison with 7 other antifungal agents: assessment according to the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 71(4): 370-377.
16. Hadrich Is, et al. Invasive Aspergillosis: resistance to antifungal drugs. Mycopathologia 2012; 174(2): 131-141.
17. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J,Wijngaerden EV. Invasive Aspergillosis in the Intensive Care Unit. Clin Infect Dis 2007; 45(2): 205-215.
18. Denning DW. Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998; 26(4): 781-805.
19. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers W. Azole resistance in Aspergillus fumigatus: a side-effect of environmental fungicide use? Lancet Infect Dis 2009; 9(12): 789-795.
20. Chamilos G, Kontoyiannis D. Update on antifungal drug resistance mechanisms of Aspergillus fumigatus. Drug Resist Updat 2005; 8(6): 344-358.
21. Verweij P, Mellado E, Melchers W. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. N Engl J Med 2007; 356(14): 1481-1483.
22. Morrow PE. Physics of airborne particles and their deposition in the lung. Ann N Y Acad Sci 1980; 353(1): 71-80.
23. Gheith S, Saghrouni F, Bannour W, Youssef YB, Khelif A, Normand A-C, et al. In vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole and caspofungin of Aspergillus spp. isolated from patients with haematological malignancies in Tunisia. Springer Plus 2014; (3): 19.
24. Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, et al. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of Aspergillus species to the triazoles. J Clin Microbiol

2011; 49(2): 586-590.

25. Dehghan P, Bui T, Campbell L, Lai Y, Tran-Dinh N, Zaini F, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of clinical isolates of Aspergillus flavus from Iran reveals the first cases of Aspergillus minisclerotigenes associated with human infection. BMC Infect Dis 2014; 14: 358.
26. De Hoog G GJ, Gené J, Figueroo M. Atlas of clinical fungi. 2th ed. Amer Society for Microbiology; 2000.
27. Abastabar M, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Shidfar MR, Kordbacheh P, Makimura aK. Restriction Analysis of β-Tubulin Gene for Differentiation of the Common Pathogenic Dermatophytes. J Clin Lab Anal 2014; 28(2): 91-96.
28. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous Fungi; Approved standard, 2nd edition. CLSI Document. M38-A2. Clinical and laboratory Standards Institute, Wane (2008).
29. Patterson T. Advances and challenges in management of invasive mycoses. Lancet 2005; 366(9490): 1013-1025.
30. Verweij P, Snelders E, Kema G, Mellado E, Melchers W. Azole resistance in Aspergillus fumigatus: a side-effect of environmental fungicide use? Lancet 2009; 9(12): 789-795.
31. Lass-Florl C, Alastruey-Izquierdo A,Cuenca-Estrella M, Perkhofer S, Rodriguez-Tudela J. In vitro activities of various antifungal drugs against Aspergillus terreus: Global assessment using the methodology of the European committee on antimicrobial susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(2): 794-795.
32. Shobana C, Mythili A, Homa M, Galgóczy L, Priya R, Singh YB, et al. In vitro susceptibility of filamentous fungi from mycotic keratitis to azole drugs. J Mycol Med 2015; 25(1): 44-49.
33. Araujo R1, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Susceptibility of environmental versus clinical strains of pathogenic Aspergillus. Int J Antimicrob Agents 2007; 29(1): 108-111.
34. Arabatzis M, Kambouris M, Kyprianou M, Chrysaki A, Foustoukou M, Kanellopoulou M, et al. Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 Aspergillus isolates recovered from immunocompromised hosts in Greece. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(6): 3025-3030
35. Mortensen K, Mellado E, Lass-Florl C, Rodriguez-Tudela J, Johansen H, Arendrup M. Environmental study of azole-resistant Aspergillus fumigatus and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(11): 4545-4549.
36. Verweij P, Snelders E, Kema G, Mellado E, Melchers W. Azole resistance in Aspergillus fumigatus: a side-effect of environmental fungicide use? Lancet Infect Dis 2009; 9(12): 789-795.
37. Morrow PE. Physics of Airborne Particles and their Deposition in the Lung. Ann N Y Acad Sci 1980; 353(1): 71-80.
38. Vaezi A, Haghani I, Davoudi MM, Mousavi B, Ansari S, Noshak MA, et al. Azole Resistance in Aspergillus fumigatus Isolates. J Mazandaran Univ Med Sci .2013; 23(103): 120-137 (Persian).
39. Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller MA, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six Aspergillus spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). J Clin Microbiol 2010; 48(9): 3251-3257.

40. Shivaprakash MR, Geertsen E, Chakrabarti A, Mouton JW, Meis JF. In vitro susceptibility of 188 clinical and environmental isolates of Aspergillus flavus for the new triazole isavuconazole and seven other antifungal drugs. Mycoses 2011; 54(5): 583-589.
41. Lionakis MS, Lewis RL, Torres HA, Albert ND, Raad II, Kontoyiannisa DP. Increased frequency of non-fumigatus Aspergillus species in amphotericin B- or triazole-pre-exposed cancer patients with positive cultures for aspergill. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 52(1): 15-20.
42. Hsueh PR, Lau YJ, Chuang YC, Wan JH, Huang WK, Shyr JM, 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. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(2): 512-517.