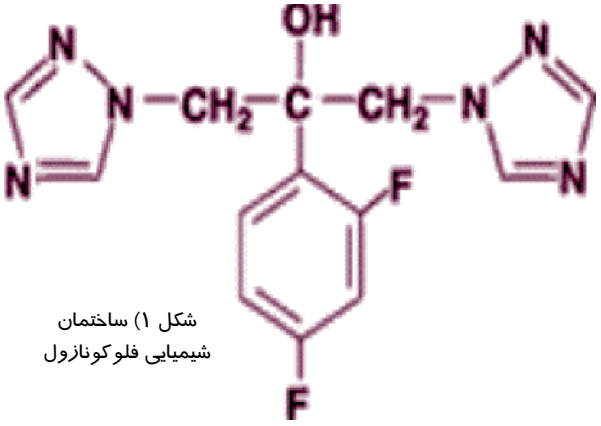
دکتر پروین دهقان(استادیاررشته قارچ شناسی پزشکی در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان)
مهرنوش ماهرالنقش (کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان)
دکتر مصطفی چادگانی پور(استاد رشته قارچ شناسی پزشکی در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان)

چگونگی تعیین MIC (Minimum Inhibitory Contraction) فلوکونازول به روش میکرودایلوشن بر ایزوله های بالینی کاندیدا

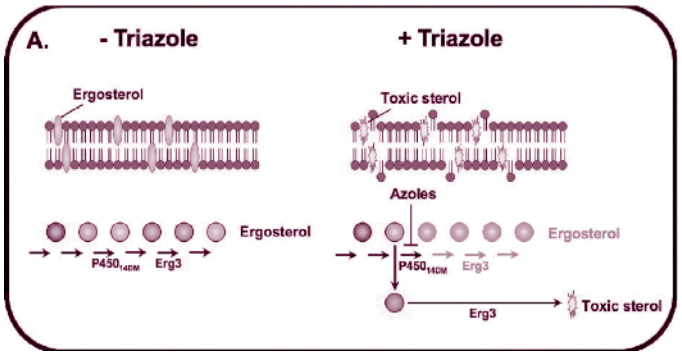
در انواع بیماری هایی که توسط مخمر کاندیدا در سطح پوست ومخاط بدن انسان ایجاد می شود، معمولا خط اول درمان داروی ضد قارچی فلوکونازول است، ولی اگر پس از استفاده از این دارو درمان ناموفق باشد انجام کشت و تست های حساسیت دارویی الزامی است. این تست ها به روش های متفاوتی انجام می گیرد که در اینجا انجام این تست به روش میکرودایلوشن شرح داده شده است.

بحث

فلوکونازول یک داروی تری آزول ضد قارچی وسیع الطیف و قابل دسترس است که در سطح وسیعی جهت عفونت های جزئی کاندیدایی به صورت قرص های خوراکی و پودر جهت تهیه سوسپانسیون خوراکی همچنین در عفونت های سیستمیک مانند مننژیت کریپتوکوکی به صورت داخل وریدی استفاده می شود. دلیل انتخاب این دارو جهت درمان عفونت های قارچی داشتن وزن مولکولی کم، تمایل کم به پلاسما، حلالیت در آب و نیمه عمرطولانی آن است(۱). ساختمان شیمیایی فلوکونازول در شکل (۱) نشان داده شده است. آزول ها با اثر بر روی غشاء میکروارگانیسم به دنبال اتصال به غشاء و ترکیب با آنزیم های سیتوکروم P450 سلول های قارچی موجب اختلال در سنتز ارگسترول و ساخته شدن ناقص دیواره سلولی و نهایتا مرگ سلول های قارچی می شود(۲). چگونگی تاثیر تری آزول ها بر روی ارگانیسم در شکل (۲) نشان داده شده است. به علت اینکه این ترکیبات با سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 پستانداران نیز واکنش می دهد مصرف خوراکی یا تزریقی آن موجب اختلالات متعددی در سنتز محصولات متابولیکی کلیدی شده و در نهایت با عوارض مختلفی همراه است. افزایش مرگ و میر در ارتباط با عفونت های قارچی ناشی از مقاومت



شکل ۱) ساختمان شیمیایی فلوکونازول



شکل ۲) چگونگی تاثیر تری آزول ها بر روی ارگانیسم

دارویی در گروه های مختلف بیماران وجود دارد. میزان مقاومت ایزوله های کاندیدا آلبیکنس و غیر آلبیکنس به فلوکونازول متفاوت و در حال افزایش است.استفاده مکرر از داروهای آزولی همانند فلوکونازول منجر به ایجاد مقاومت در گونه های کاندیدا می شود(۳).

تهیه فلوکونازول آماده مصرف

ابتدا با استفاده ازپودر فلوکونازول و آب مقطر استریل دارویی با غلظت ده بار بالاتر ازبالاترین غلظت مورد نیاز یعنی ۱۲۸ میکرو گرم در میلی لیتر تهیه می نماییم.

سپس به نسبت ۱/۲۰۰ میلی گرم در میکرو لیتر محلول دی متیل سولفوکساید(Dimethyl sulfoxide: DMSO) اضافه نموده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می دهیم تا استوک دارویی هموژنیزه گردد سپس آن را از فیلتر ۰/۴۵ عبور داده و در ویال های پلاستیکی تقسیم نموده و در فریزر۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می نماییم. جهت استفاده از دارو هر بار یکی از ویال ها را به نسبت ۱ به ۵ با RPMI1460 رقیق می کنیم. غلظت سریال از قلوکونازول ۰/۲۵ – ۱۲۸ میکرو گرم در میلی لیتر در سری ۱۰ تایی تهیه می نماییم.

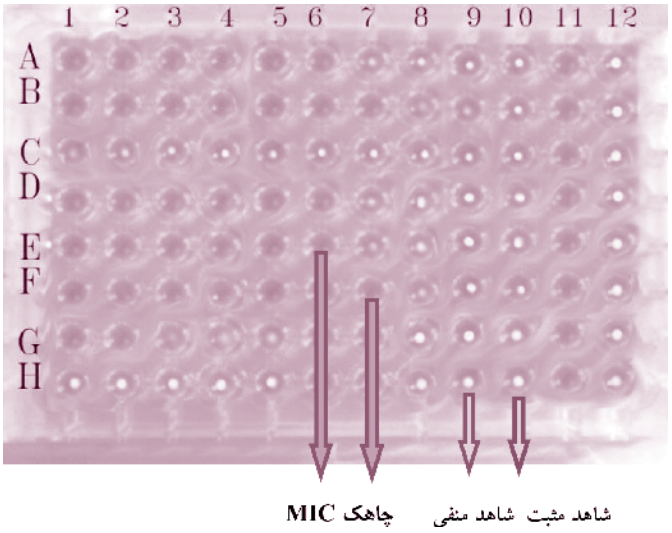
تعیین MIC گونه های ایزوله شده

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی MIC از رقت سازی از میکروپلیت الایزا استفاده می گردد. ابتدا ازایزوله های جدا شده پس از یک پاساژ روی محیط SDA سوسپانسیون سلولی با غلظت 1×10^{3} سلول در هر میلی لیتر در سرم فیزیولوژی استریل تهیه می شود و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه می گردد سپس غلظت سریال از قلوکونازول µg ۰/۲۵ – ۱۲۸ در ml در سری ۱۰تایی تهیه می شود و به میزان ۱۰۰میکرو لیتر به چاهک ها اضافه می شود (۵-٤). میزان MIC ایزوله های حساس ≤ ۸ µg درml ایزوله های حساس وابسته به دوز µg ۱٦-۳۲ درml و ایزوله های مقاوم ≤ ٦٤ µg درml در نظر گرفته می شود.

ایزوله هایی که به این طریق در بیشترین غلظت دارو که ۱۲۸ µg در ml بود رشدشان متوقف نشد با غلظت بالاتر یعنی ۲٥٦µg در ml باید تکرار شود، دو چاهک آخر به عنوان شاهد مثبت و منفی استفاده می شود. در چاهک شاهد مثبت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی و همچنین ۱۰۰ میکرولیتر RPMI اضافه کرده و در چاهک شاهد منفی فقط ۲۰۰ میکرولیتر RPMI اضافه شد.

پس از٤۸ – ۲٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳٥ درجه سانتی گراد، نتایج از نظر کدورت ایجادشده در چاهک ها بررسی می شود.

اولین چاهکی که در آن کدورت مشاهده نشود به عنوان MIC چاهک در نظر گرفته می شود همان طور که در شکل (۳) نشان داده شده است.



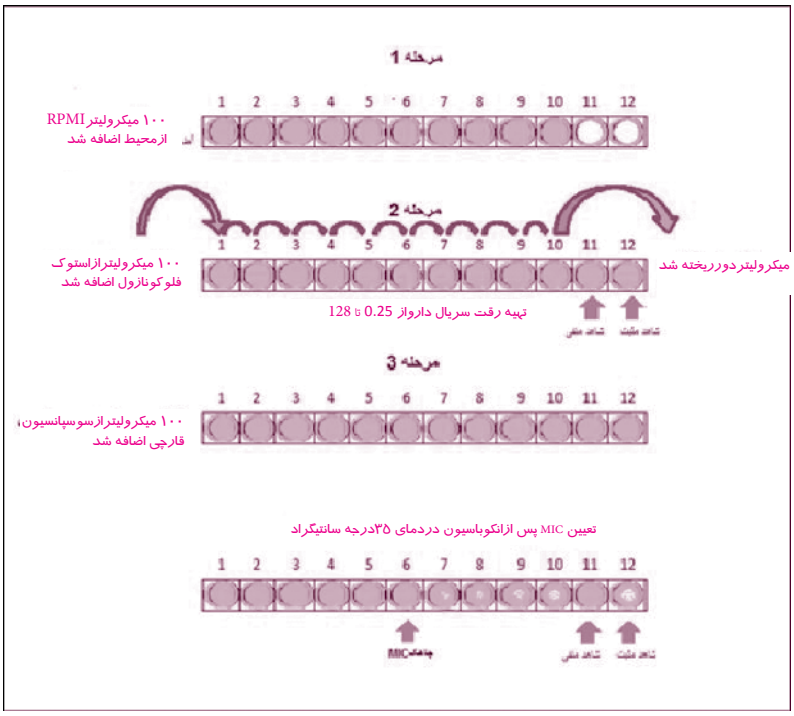
شکل ۳) چاهک های حاوی محیط RPMI، سوسپانسیون قارچی و رقت های سریال دارو از غلظت ۰/۲۵تا ۱۲۸ (۱۲-۱) µg/ml در ۸ ایزوله مختلف (A-H)

مراحل تعیین میزان MIC در ده رقت طی سه مرحله انجام می شود. ابتدا اضافه نمودن RPMI به چاهک ها، مرحله بعداضافه نمودن ۱۰۰میکرو لیتراز غلظت µg ۲٥٦ درml دارو به چاهک اول که با توجه به وجود ۱۰۰ میکرولیتر RPMI موجود در این چاهک غلظت دارو در این چاهک µg ۱۲۸ درml در نظر گرفته می شود و به همین ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر محلول از چاهک اول به دوم منتقل می شود تا چاهک دهم و در انتها ۱۰۰ میکرولیتر محلول را از چاهک دهم بیرون می ریزیم. لازم به ذکر است که در این مرحله فقط به چاهک شاهد منفی دارو اضافه می شود. در مرحله آخر، سوسپانسیون قارچی را به همه چاهک ها به جز چاهک شاهد منفی اضافه می نماییم. این مراحل در شکل (٤) نمایش داده شده است.

افزایش استفاده گسترده از داروهای ضد قارچی باعث شده است کاندیدا آلبیکنس به عنوان یک پاتوژن با ایجاد مقاومت بالا در برابر داروهای ضدقارچی معرفی شود. با توجه به شیوع بیماری های حاصله از این مخمر و لزوم در مان های مناسب دارویی، استفاده از تست های حساسیت دارویی استاندارد دارای اهمیت خاصی است. طبق مطالعه ای که روی حساسیت دارویی گونه های کاندیدا ی جدا شده از بیماران بستر ی در چهار منطقه جغرافیایی آمریکا انجام شد مشخص شد که گونه های جدا شده از مناطق جنوب شرقی و شمال غرب نسبت به فلوکونازول مقاوم بودند ولی گونه های جدا شده از مناطق شمال شرق و جنوب غربی مقاومت کمتری در برابر دارو داشته اند و به نظرمی رسد در بیمار مبتلا به عفونت کاندیدایی پس از در یافت درمان های دارویی مختلف مقاومت دارویی ایجاد می شود. بنابر این جهت پی گیری میزان مقاومت دو نکته مورد توجه است اول منطقه از نظر جغرافیایی به دلیل استفاده از پروتوکل درمانی خاص و دوم مدت زمان در معرض قرارگرفتن دارو اهمیت دارد(٦).

درسه حالت از فرد بیمار گونه کاندیدای مقاوم می توان جدا کرد حالت اول اینکه در ابتدای کلونیزه شدن، ارگانیسم به دارو حساس بوده ولی موتاسیون پیدا کرده و مقاوم شده باشد. حالت دوم اینکه از ابتدا بیمار با چند استرین یا گونه جهش یافته آلوده گردد و حالت سوم آلوده شدن بیمار از ابتدا با یک گونه ذاتا مقاوم به دارو می باشد(۷).

تعیین مقاومت دارویی بر اساس تعیین MIC دارو در شرایط آزمایشگاهی انجام می گردد. اما متاسفانه بعضی از ایزوله ها با تعیین MIC بالای دارو بدون در نظر گرفتن



شکل ٤) مراحل تعیین MIC فلوکونازول در ۱۰ رقت

نتایج بالینی بر چسب مقاوم می خورند. افزایش میزان MIC در صورتی که فرد از نظر کلینیکی بهبود پیدا کند از اهمیت کمی بر خوردار است. بنابر این رابطه قابل پیش بینی بین میزانMIC دارو و سطح دارو در سرم فرد وجود ندارد و تفسیر میزان MIC نباید بدون در نظر گرفتن علائم کلینیکی در بیمار باشد. شکست درمان برای از بین بردن قارچ تفسیر آسانی ندارد وتفسیر MIC و تفسیر مقاومت دارویی باید با در نظر گرفتن علایم بالینی بیمار همراه باش‌د(۸) لازم به تذکر است که این روش متداول در آزمایشگاه های تشخیص طبی نیست ودر آزمایشگاه های پژوهشی و تحقیقاتی در صورت درخواست پزشک انجام شده که معمولا به صورت مقایسه ای با سایرداروهای ضد قارچی متداول نظیر ایتراکونازول کتوکونازول و آمفوتریسین B انجام می پذیرد (۹). در موارد مقاوم به درمان استفاده از ایتراکونازول، پساکونازول، وریکونازول و آمفوتریسین B طبق دستورالعمل IDSA (Infectious Diseases Society of America) توصیه شده است استفاده از داروهای سیستمیک جهت پیش گیری به علت ایجاد گونه های مقاوم احتمالی توصیه نمی گردد. در بیماران مبتلا به نوتروپنی پیشگیری با ایتراکونازول توصیه شده است (۱۰).

منابع:

1. Malik A. Origin of drugs in current use: the Diflucan story.
2. Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, Parkinson T, Falconer D, Ibrahim AS, et al. Mechanism of Fluconazole Resistance inCandida krusei. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1998;42(10):2645-9.
3. Canuto MM, Rodero FG. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. The Lancet infectious diseases. 2002;2(9):550-63.
4. Wiegand, Irith, Kai Hilpert, and Robert EW Hancock. "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances." Nature protocols 3.2 (2008): 163-175.
5. Cook, R.A., K.A. Mcintyre. Effects of incubation temperature, inoculum size, and medium on agreement of macro and microdilution broth susceptibility test results for yeasts. Ant. Age. Che.1990, 34: 1542-1545
6. Rex JH, Rinaldi M, Pfaller M. Resistance of Candida species to fluconazole. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1995;39(1):1.
7. Pfaller M, Jones R, Messer S, Edmond M, Wenzel R. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to Candida albicans: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. Diagnostic microbiology and infectious disease. 1998;31(1):327-32
8. Rex JH, Pfaller M, Rinaldi M, Polak A, Galgiani J. Antifungal susceptibility testing. Clinical microbiology reviews. 1993;6(4):367-81
9. Shokohi T, Bandalizadeh Z, Hedayati MT, Mayahi S. In vitro antifungal susceptibility of Candida species isolated from oropharyngeal lesions of patients with cancer to some antifungal agents. Jundishapur J Microbiol. 2011;4(Supplement 1):S19-S26..
10. de Vries R, Daenen S, Tolley K, Glasmacher A, Prentice A, Howells S, et al. Cost effectiveness of itraconazole in the prophylaxis of invasive fungal infections. Pharmacoeconomics. 2008;26(1):75-90.