ارزیابی حساسیت دارویی گونه های آسپرژیلوس جدا شده از بخش ICU بیمارستان در شرایط آزمایشگاهی

آیت اله نصرالهی عمران[1*]

۱) گروه قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۲۴

چکیده

مقدمه: آسپرژیلوزیس مهاجم، تهدیدآمیزترین بیماری در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی بوده که بیشترین میزان مرگ و میر در بین عفونت های قارچی مهاجم را در بیمارستان دارد. هدف از این تحقیق تعیین حساسیت دارویی بر روی گونه های آسپرژیلوس جدا شده از بیمارستان ها بوده است.

مواد و روش ها: پس از جمع آوری ۱۶۰ پلیت حاوی محیط سابورود دکستروز آگار از هوا و محیط بخش مراقبت های ویژه بیمارستان ها، شناسایی فنوتیپی و مولکولی کلنی ها به منظور شناسایی گونه های آسپرژیلوس انجام شد. پس از استخراج DNA، شناسایی مولکولی با استفاده از پرایمرهای یونیورسال قارچ ها(ناحیه ژنی ITS) و نهایتاً توالی یابی DNA صورت گرفت. تست حساسیت دارویی به روش براث میکرودایلوشن(CLSI-M38A2) برای ایزوله های آسپرژیلوس انجام گرفت.

یافته های پژوهش: از ۱۶۰ نمونه محیط بیمارستان، ۱۱ گونه Aspergillus به دست آمد. ۱۱ ایزوله پس از توالی یابی ۵ مورد آ.فلاووس، ۳ مورد آ.سیدویی، ۱ مورد آ.فومیگاتوس و ۲ مورد آ.اوریزه شناسایی شدند. نتایج تست ارزیابی حساسیت داروی ضد قارچی مطالعه حاضر نشان داد که آ.سیدویی و آ.فومیگاتوس به آمفوتریسین ب و وریکونازول حساس و به ایتراکونازول مقاوم بودند. آ.سیدویی مقاوم به کاسپوفانژین بوده در حالی که آ.فومیگاتوس به این دارو حساس بود. آ.فلاووس ها به همه داروهای مورد مطالعه حساس بودند.

بحث و نتیجه گیری: به تاخیر افتادن تشخیص قطعی، عدم درمان مناسب و به موقع، وجود بیماری های مختلف زمینه ایی و نوتروپنی از دلایل بالا بودن مرگ و میر بیماران مبتلایان به آسپرژیلوزیس به خصوص در بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه بیمارستان ها می باشد.

واژه های کلیدی: حساسیت دارویی، آسپرژیلوس، بخش مراقبت های ویژه

***نویسنده مسئول: گروه قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران

Email: Ayat51@yahoo.com

Copyright © 2017Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

یکی از مسائل مهمی که در حال حاضر اکثر بیمارستان ها با آن روبرو می باشیم افزایش عفونت های بیمارستانی می باشد. وقوع عفونت های قارچی تهاجمی به طور قابل توجهی طی دو دهه گذشته در نتیجه افزایش تعداد بیماران بدون مصونیت، افزایش یافته است. قارچ های موجود در فضاهای سربسته از جمله بیمارستان ها از نظر تعداد و نوع آلودگی قارچی می تواند با فضای بیرون یکسان باشند. اگر وسایل و محیط داخلی بیمارستان در اثر عدم رعایت موازین بهداشتی خود تولیدکننده آلودگی های قارچی نباشند، این آلودگی ها می توانند ناشی از ورود هوای تصفیه نشده و یا حتی هوای تصفیه شده بیرون به داخل بیمارستان باشد. اگر منبع آلودگی های قارچی، فضای داخل بیمارستان در نظر گرفته شود؛ این مقدار آلودگی ها حتی می تواند بیشتر از آلودگی های قارچی موجود در هوای بیرون باشد(۱). بستری شدن در بیمارستان نیز اثر مهمی روی کلونی سازی قارچ ها در بیماران اخیر در بیمارستان ها داشته است؛ بنا بر این این بیماران شدیداً مستعد ابتلاء به عفونت های قارچی بوده و اقدامات جلوگیری کننده برای ممانعت و کنترل این عفونت های کشنده، بسیار حیاتی است. عفونت های قارچی فرصت طلب یکی از شایع ترین و مهلک ترین بیماری ها در بیماران واجد نقص ایمنی بستری در بیمارستان ها را ایجاد کرده و به عنوان یکی از چندین عوامل مسبب عفونت های بیمارستانی هستند ولی بیشتر این نوع عفونت های قارچی توسط گونه های کاندیدایی ایجاد می شوند(۲،۳). علاوه بر کاندیدا گونه های مهم قارچ های آسپرژیلوس، کریپتوکوکوس، زایگومایست ها، فوزاریوم، سدوسپوریوم و پنی سلیوم به ترتیب اهمیت، از عوامل اصلی مسبب عفونت های قارچی بیمارستانی می باشند(۴). مهم ترین علت عفونت های قارچی فرصت طلب بیمارستانی را ناشی از ورود اسپورهای قارچ از محیط بیرون به داخل بیمارستان می دانند که در مواردی حتی این عفونت ها به صورت اپیدمی هایی در می آید که علت آن را تعمیرات ناقص و عدم کارائی یا فقدان سیستم تهویه مناسب می دانند. با بستری شدن بیماران با وضعیت های وخیم و افزایش مدت زمان بستری شدن در بخش مراقبت های ویژه، بیماران از طریق منابع مختلفی با عوامل قارچی متعددی نظیر کاندیدا و آسپرژیلوس درگیر می شوند(۵،۶). امروزه با نفوذ زیست شناسی مولکولی به عرصه های تشخیصی، می توان با تشخیص سریع عامل عفونت اقدام به درمان کامل بیمار نمود. با توجه به مشکلاتی که در زمینه روش های تشخیصی بالینی متداول و سنتی وجود دارد، پژوهشگران پیوسته به دنبال روش های دقیق تر، آسان تر و سریع تر هستند. به همین دلیل، در سال های اخیر زیست شناسی مولکولی به حوضه قارچ شناسی پزشکی نیز راه پیدا کرده و افق های بسیار امیدوارکننده ای را برای متخصصین این رشته گشوده است. تعیین توالی DNA ریبوزومی هم چنان که به عنوان یکی از روش شناسایی قارچ ها است که می تواند بیانگر شناسایی یک جهش بزرگ در ژنوم قارچ ها باشد. ژنوم قارچ ها حاوی نواحی خاصی است که به لحاظ تنوع سکانس نوکلئوتیدی در گونه های مختلف یک جنس، ارزش زیادی در شناسایی گونه ها، اپیدمیولوژی مولکولی و هم چنین تاکسونومی قارچ ها پیدا کرده است. از جمله این نواحی می توان به ناحیه ITS ژن، β- tubulin ناحیه IGS و ناحیه Elongation factor 1 ژن کدکننده اشاره کرد. روش های مبتنی بر PCR می توانند روش بهینه برای تشخیص قارچ ها باشند که حساسیت بیشتری نسبت به سایر روش ها دارند و در مواردی در کنار تشخیص قارچ ها اطلاعات قابل توجه دیگری در رابطه با مقاومت دارویی، تاکسونومی و اپیدمیولوژی مولکولی نیز در اختیار ما قرار می دهند(۷). یافتن روش هایی که ما را از منابع آلوده کننده قارچی در بیمارستان آگاه سازد یکی از ضروریات مهم برای جامعه پزشکی می باشد. علی رغم پیشرفت های ضد قارچی و کیفیت های تشخیصی هنوز آسپرژیلوزیس مهاجم عامل مهم شیوع بیماری و مرگ و میر در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف به خصوص بستری شده در بخش مراقبت های

ویژه محسوب می شود. احتمال ابتلاء به این میکروب ها در بخش مراقبت های ویژه بیش از هر بخش دیگری مشاهده می شود به طوری‌که احتمال ابتلای بیمارانی که در این بخش ها بستری می شوند بین ۷۰ تا ۸۰ درصد است و به همین دلیل خطر مرگ و میر در چنین مواردی زیاد می شود. هم چنین خطر مرگ و میر ناشی از عفونت های بیمارستانی در بیشتر کشورها بین ۱۰ تا ۱۵ درصد است. اگر چه مقاومت دارویی اکتسابی در آسپرژیلوس ها مسئله ای مهم محسوب می شود اما گونه های آسپرژیلوس فومیگاتوس ممکن است ذاتاً نسبت به دسته های معینی از عوامل ضد قارچی مقاوم باشند. علی رغم استفاده از داروهای ضد قارچی جدید برای درمان آسپرژیلوزیس مهاجم حل مشکل درمانی این بیماران بسیار دشوار بوده و میزان شیوع مرگ و میر بالا می باشد. برای سال های قبل، آمفوتریسین B یگانه داروی مورد اطمینان برای پیشگیری و درمان در بیماران تب دار نوتروپنیک قارچی مبتلا به آسپرژیلوزیس مهاجم بود که به صورت وریدی مصرف می شده است تا این که داروهای تری آزول های جدید کشف شدند. فلوکونازول و داروهای جدیدتر از آن مثل وریکونازول، ایتراکونازول و پوساکونازول از این جمله این داروهای ضد قارچی هستند؛ بنا بر این داروهای موثر روی آسپرژیلوزیس مهاجم، آمفوتریسین B، لیپوزومال آمفوتریسین B، کاسپوفانژین و به خصوص وریکونازول می باشند(۸). مقاومت آسپرژیلوس ها در برابر داروهای تری آزول ممکن است سبب به تاخیر انداختن تشخیص قطعی و عدم درمان مناسب و به موقع بیماران مبتلا به آسپرژیلوزیس تهاجمی با وجود بیماری های مختلف زمینه ایی و نوتروپنی شوند. علی رغم پیشرفت های اخیر در تشخیص و درمان، ظهور آسپرژیلوزیس تهاجمی در بخش مراقبت های ویژه معمولاً ناشی از نبود پیش بینی و تشخیص درست این بیماری می باشد(۳،۹). از آن جایی که مقاومت دارویی در آسپرژیلوس ها روبه افزایش است انجام تست حساسیت دارویی در بیماران مبتلا به این بیماری برای بهبود سریع تر و نجات از مرگ این بیماران ضرورت دارد. به دلیل پیدایش مقاومت به عوامل ضد قارچی تعیین طرح استراتژیک برای درمان این بیماری های قارچی یک موضوع مهم قابل پیگیری در قارچ شناسی بالینی است. استفاده از آنتی بیوتیک وسیع الطیف و خود درمانی با داروهای ضد قارچی می تواند دلیل اصلی افزایش مقاومت دارویی در بیماران مبتلا به این بیماری های قارچی باشد(۸،۹). به کار گیری روش های مناسب کنترل و پیشگیری برای مهار آلودگی هوای این بخش ها به منظور حذف این عناصر قارچی و جلوگیری از بروز عفونت های بیمارستانی، حفظ سلامتی بیماران، پرسنل و پزشکان می باشد با توجه به این که تعداد عفونت های مربوط به هر یک از این پاتوژن های جدید قارچی کم است، فهم و درک ما از اپیدمیولوژی و روش های درمان برای این دسته از عفونت های اختصاصی در حداقل میزان خود می باشد از این رو هدف از این تحقیق تعیین میزان حساسیت دارویی داروهای ضد قارچی موجود بر روی گونه های آسپرژیلوس جدا شده از بخش مراقبت های ویژه بیمارستان های مورد مطالعه به منظور بررسی تعیین حساسیت قارچ های جدا شده بود.

مواد و روش ها

این مطالعه به صورت تحلیلی-مقطعی به مدت ۹ ماه و در نتیجه پلیت گذاری از هوا و ابزار آلات متصل به بیماران در بخش مراقبت های ویژه بیمارستان شهید رجایی تنکابن و بیمارستان امام تهران انجام شد. ۱۶۰ پلیت حاوی محیط کشت سابورود دکستروز آگار (SDA) شرکت(آلمان Merk) حاوی کلرامفنیکل و به صورت در باز و در ارتفاع ۱/۵ متری اتاق بیماران و راهروهای بخش های مذکور قرار داده می شدند و پس از ۱۵ دقیقه در پلیت ها بسته و جمع آوری می گردیدند. هم چنین نمونه گیری با استفاده از سوآپ مرطوب از ابزار آلات متصل شده به بیمار و از روی سوندها و مانیتورهای متصل شده به بیمار و ماسک اکسیژن، توسط سواپ استریل صورت می گرفت. کلنی ها پس از چند روز نگهداری(۳ الی ۴ روز) در محیط آزمایشگاه ظاهر می شدند. کلنی هایی که از نظر میکروسکوپی و ماکروسکوپی مشکوک به آسپرژیلوس بودند برای بررسی اختصاصی و دقیق تر در محیط کشت پتیتو دکستروز آگار PDA شرکت(آلمان Merk) کشت داده و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری

می شدند تا کلنی های قارچ رشد کنند. سپس کلنی های رشد یافته در این محیط را از نظر ویژگی اسپور، نوع و اندازه ساقه های کونیدیوفور و نوع وزیکولشان مورد بررسی قرار می گرفتند. پس از تایید مورفولوژی ماکروسکوپی و پس از آن رنگ آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو از نظر میکروسکوپی، نمونه های مشکوک خالص سازی شده و نهایتاً به کمک روش توالی یابی مورد بررسی و شناسایی قرار می گرفتند(۱۰).

شناسایی ملکولی

استخراج DNA: استخراج DNA از جدایه های قارچی آسپرژیلوس به وسیله کیت تجاری Geno PlusTM Genomic DNA Extraction Miniprep System ساخت شرکت تایوانی Viogene طبق دستورالعمل ارائه شده انجام گرفت(۱۱). واکنش PCR برای ناحیه ITS (نواحی D1 و D۲) ژن rDNA (جدول شماره ۱) در حجم کل ۵۰ ماکرولیتر با ترکیبات زیر اجراء شد. برای انجام واکنش ۳۲ میکرولیتر dH20، ۵ میکرولیتر DNA polymerase Buffer(10x)، ۶ میکرولیتر MgCL2(25Mm)، ۱ میکرولیتر dNTP Mix(10 Mm)، ۱ میکرولیتر Primer Mix(20Mm)، ۰/۴ میکرولیتر(۵ واحد میکرولیتر) Taq DNA Polymerase، ۵ میکرولیتر Template استفاده گردید. برنامه دمایی ترموسایکر Bio Rad (Co.USA) جهت تکثیر ناحیه ITS شامل واسرشتگی اولیه (Initial denaturation) ۹۵ درجه سانتی گراد در ۵ دقیقه و به دنبال آن برای ۳۵ بار سیکل واسرشتگی (Denaturation) ۹۵ درجه سانتی گراد در ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو(Annealing) ۵۸ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، دمای طویل شدن رشته الگو (Extension)۷۲ درجه سانتی گراد در ۱ دقیقه و سپس طویل شدن نهایی(Final extension) ۷۲ درجه سانتی گراد در ۵ دقیقه انجام شد. با توجه به اندازه قطعات حاصل از هر یک از پرایمرهای یونیورسال قارچ ها(جدول شماره ۱)، از ژل آگاروز ۱ درصد به منظور لود کردن نمونه ها و برای شناسایی تکثیر قطعه مورد نظر استفاده و نتایج طریق ترانس لومیناتور و مانیتور مربوطه ثبت می گردید. نتیجه آنالیز کمی نشان داد که به طور متوسط در هر نمونه ۹۰ نانوگرم DNA وجود داشته و میزان پروتئین و کربوهیدرات آن جزئی و قابل چشم پوشی است. بر اساس غلظت حاصله مقدار ۵ میکرولیتر DNA ژنومی برای PCR به عنوان الگو مناسب بود. پس از اجرای PCR، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگاروز ۲ ,% USA^{300} Power supply model الکتروفورز گردید. پس از تایید تکثیر ۴۵ میکرولیتر باقی مانده برای تعیین توالی شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید(۱۲،۱۳).

جدول شماره ۱. ناحیه پرایمرهای یونیورسال قارچ ها

سایز محصول	توالی	پرایمر
500-600	(5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')	Forward primer(ITS1)
	(5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	Reverse primer(ITS4)

تست حساسیت دارویی ایزوله های مورد مطالعه نسبت به داروهای ضد قارچی مطابق با روش استاندارد CLSI M38A2: در این مطالعه از دستورالعمل روش استاندارد CLSI-M38A2 جهت بررسی و ارزیابی MIC در ۳ سری ۲ تایی میکروپلیت ۹۶ خانه ای برای آسپرژیلوس های شناسایی شده از کلنی های رشد یافته و مطابق با روش Broth Microdilution تست حساسیت دارویی گردید(۱۴).

تهیه سوسپانسیون قارچی: در ابتدا از کشت های هر یک از کلنی های آسپرژیلوس ایزوله شده در لوله های حاوی محیط کشت پتیتو دکستروز آگار(Merk) به کمک اضافه کردن یک میلی لیتر آب مقطر استریل و یک قطره توین ۲۰، سوسپانسیون اولیه اسپور تهیه و

سپس به لوله استریل دیگری منتقل می کردیم و سپس به کمک ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه سوسپانسیون تهیه شده را خوب مخلوط کرده و در ادامه اسپورهای سوسپانسیون فوق را به کمک تهیه رقت های متوالی مناسب با آب مقطر با روش چشمی به رقتی معادل با رقت لوله نیم مک فارلند می رساندیم و میزان کدر بودن نمونه فوق را با آن مقایسه کرده که معادل با میزان $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری و برابر $۲-۵\times۱۰^{۵}$ cfu/mL کونیدی قارچ می باشد(۱۴).

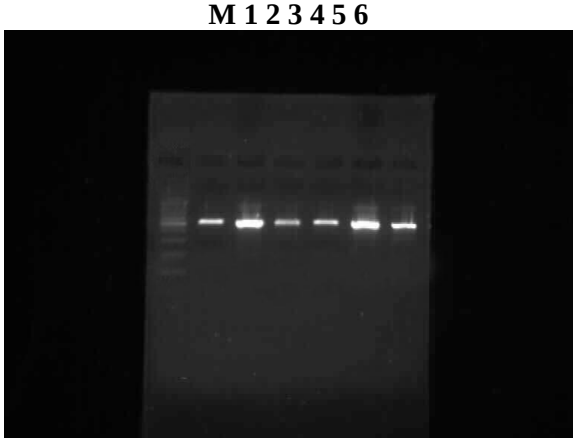
تهیه محلول مادر و تهیه رقت های دارویی مختلف از داروهای مورد مطالعه: طبق راهنمای CLSI داروها بر اساس محلول و غیرمحلول بودن در آب به دو دسته تقسیم می شوند. از ۵ داروی مورد بررسی در این تحقیق چهار دارو از نوع غیر محلول در آب و محلول در دی متیل سولفاکساید(DMSO) و یک دارو محلول درمتانول(کتوکونازول) بودند. به منظور تهیه محلول های استوک ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از داروهای وریکونازول(Sigma)، آمفوتریسین B(Hi Media India)، ایتراکونازول(Sigma) و کاسپوفانژین Sigma ۰/۰۸ گرم پودرهای داروهای فوق را جداگانه با ۵۰ میلی لیتر DMSO حل و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری می نمودیم تا خود به خود استریل شوند. جهت انجام تست میکرودایلوشن، رقت های ۰/۰۳۱۲۵ تا ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر از ایتراکونازول ITR، رقت های ۸-۰/۸ میکروگرم بر میلی لیتر از کاسپوفانژین(CAP)، رقت های ۱-۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از وریکونازول VRC، رقت های ۲ الی ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر آمفوتریسین(AmB) تهیه می گردید. برای تهیه رقت های ۸-۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از کتوکونازول Ket ۲ میکروگرم پودر(Hi Media India) این دارو را در ۱ میلی لیتر متانول حل و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری می کردیم تا خود به خود استریل شود(۱۴،۱۵).

انجام تست Broth Microdillution: طبق پروتکل، رقت های سریال برای هر داروی مورد بررسی در رقت های ذکر شده در میکروپلیت های مسطح ۹۶ خانه ای به مقدار µl ۱۰۰ برای هر چاهک تهیه می شد به طوری که چاهک اول حاوی بیشترین غلظت و چاهک دو تا مانده به آخر حاوی کمترین غلظت دارو بود. در چاهک های اول تا دو تا مانده به آخر مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI اضافه می گردید در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تلقیحی فینال به هر چاهک اضافه می شد. بدین ترتیب این دو ۱:۱ رقیق شده و به غلظت نهایی می رسیدند. چاهک یکی مانده به آخر حاوی ۵۰ میکرولیتر محیط RPMI و فاقد دارو و ارگانیسم به عنوان کنترل استریلی(منفی) و چاهک آخر حاوی ۵۰ میکرولیتر محیط RPMI بدون دارو و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تلقیحی و به عنوان کنترل رشد(مثبت) جهت مقایسه رشد با سایر چاهک ها در نظر گرفته می شد. در ادامه میکروپلیت ها سپس در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، به مدت ۴۸ ساعت انکوبه و نمونه ها در ۳ سری دو تایی کار می شدند. طبق دستورالعمل جهت خواندن نتایجMIC به صورت چشمی(Visual) به کمک یک آینه با بزرگ نمایی و مقایسه رشد قارچ در هر رقت و چاهک با حفره کنترل رشد(فاقد دارو) که رشد ۱۰۰ درصد دارد، انجام می گرفت در این روش MIC یعنی پایین ترین غلظت دارویی که بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون هیچ رشد قارچ (Breakpoint) مشاهده نمی شود(۱۴،۱۵). از روش آماری تحلیل واریانس یا ANOVA برای مقایسه میانگین داده های MIC هر دارو با استفاده از نرم افزار SPSS با$P=0.1$ استفاده شده است.

یافته های پژوهش

با توجه به مطالعه انجام شده از ۱۶۰ پلیت مورد بررسی ۱۴۰ پلیت دارای رشد مثبت قارچی بودند که از میان ۱۰۰ پلیت مربوط به کلنی های قارچ های غیر از آسپرژیلوس یعنی ۳۶ مورد گونه های پنیسیلیوم، ۲۸ مورد گونه های کلادوسپوریوم، ۱۱ مورد گونه های فوزاریوم، ۹ مورد گونه های آلترناریا، ۱۲ مورد گونه های موکور، ۴ مورد گونه های رایزوپوس را شامل می شدند. ۴۰ پلیت دیگر دارای رشد مشکوک به گونه های آسپرژیلوس بودند. پس از تایید مورفولوژی ماکروسکوپی و سپس مورفولوژی میکروسکوپی نمونه های مشکوک مورد بررسی و سپس خالص سازی شدند و در مجموع تعداد ۱۱ ایزوله مربوط به گونه های مهم آسپرژیلوس گزارش گردیدند و سپس به کمک

روش توالی یابی مورد بررسی و شناسایی نهایی قرار گرفتند که پس از توالی یابی آن ها ۵ مورد آ.فلاووس، ۳ مورد آ.سیدویی، ۱ مورد آ.فومیگاتوس و ۲ مورد آ.اوریزه آ مورد تایید قرار گرفتند(شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱. نمای الکتروفورز از تکثیر ژن ITS محصول تکثیر PCR. باندهای تشکیل شده تقریباً یکسان حاصل از الکتروفورزیس سویه های آسپرژیلوس مربوط به ناحیه ژنی ITS (M مارکر) ۱. آسپرژیلوس فومیگاتوس(509bp) ۳،۲ و ٤. آسپرژیلوس فلاووس(507bp) ۵. آسپرژیلوس ترئوس(506bp) آسپرژیلوس سیدویی(500bp)

نتایج تست حساسیت دارویی: با توجه به بررسی نتایج میانگین دامنه MIC برای ایزوله های آسپرژیلوس مطابق با روش استاندارد(جدول شماره ۲) در این مطالعه مشخص گردید گردید آ.سیدویی و آ.فومیگاتوس به آمفوتریسین ب و وریکونازول حساس و به ایتراکونازول مقاوم MIC90 مساوی یا کمتر از ۲ میکروگرم بر میلی لیتر بودند(۱۴،۱۵). آ.سیدویی مقاوم به کاسپوفانژین بوده در حالی که آ.فومیگاتوس به این دارو حساس بود. آ.فلاووس ها به آمفوتریسین، ایتراکونازول، وریکونازول، کاسپوفانژین و کتوکونازول حساس بودند.

جدول شماره ۲. نتایج تست حساسیت دارویی آسپرژیلوس های جدا شده نسبت به داروهای ضد قارچی مورد مطالعه مطابق با روش CLSI

نام قارچ / نام دارو	آسپرژیلوس سیدویی			آسپرژیلوس فومیگاتوس			آسپرژیلوس فلاووس		
	دامنه µg/ml	MIC۵۰ µg/ml	MIC۹۰ µg/ml	دامنه µg/ml	MIC۵۰ µg/ml	MIC۹۰ µg/ml	دامنه µg/ml	MIC۵۰ µg/ml	MIC۹۰ µg/ml
ایتراکونازول (ITZ)	۰/۰۳۱۲۵ -۲	۱	۲	۰/۰۳۱۲۵ -۲	۱	۲	۰/۱۲۵-۲	۰/۱۲۵	۰/۲۵
کتوکونازول(KTZ)	۰/۰۲۵-۱۲/۸	۰/۵	۱	۰/۰۲۵-۸	۰/۲۵	۰/۵	۰/۰۲۵-۶/۴	۰/۲۵	۰/۱۲۵
وریکونازول(VRC)	۰/۰۳۱۲۵ – ۱	۰/۲۵	۰/۵	۰/۰۳۱۲۵ -۱	۰/۰۳۱۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۶-۱	۰/۱۲۵	۰/۲۵
کاسپوفانژین(CAP)	۰/۰۰۸-۸	۰/۰۳	۰/۰۶	۰/۰۰۸-۸	۰/۰۳۲	۰/۰۶۴	۰/۰۳۱-۰/۵	۰/۰۳۶	۰/۱۲۵
آمفوتریسین ب(AMB)	۰/۵- ۴	۰/۲۵	۰/۵	۰/۵-۴	۰/۵	۱	۰/۵-۴	۰/۲۵	۰/۵

بحث و نتیجه گیری

مدیریت درمانی موفقیت آمیز آسپرژیلوزیس مهاجم وابسته به شروع به موقع درمان، انتخاب داروی موثر ضد قارچی و عدم وجود مقاومت دارویی توسط این قارچ می باشد. تشخیص آسپرژیلوزیس تهاجمی بسیار مشکل بوده بنا بر این این مسئله هم چنان به عنوان یکی از مشکلات اساسی در قارچ شناسی بالینی مطرح می باشد. لذا در این بیماران درمان بایستی سریع و در پی مظنون شدن به بیماری شروع شده و تا زمان بهبودی کامل ادامه یابد(۵). در این بررسی به کمک روش توالی یابی، در نهایت از ۴۰ پلیت حاوی کلنی های مشکوک به گونه هلی آسپرژیلوس تعداد ۱۱ ایزوله مربوط به آسپرژیلوس های مهم بیماریزا شامل ۵ مورد آ.فلاووس، ۳ مورد آ.سیدویی، ۱ مورد آ.فومیگاتوس و ۲ مورد آ.اوریزه آ مورد تایید قرار گرفتند. Garcia-Cruz(۲۰۱۲) و همکاران در بررسی

آلودگی قارچی و باکتریایی سطوح داخلی بیمارستانی در مکزیک در مجموع چندین باکتری های گرم منفی و قارچ ها را شناسایی و جدا سازی کردند و نتایج آن ها نشان داد که غالب باکتری های شناسایی شده شامل گونه های کلبسیلا، سودوموناس و اشریشیاکلی و هم چنین ایزوله های قارچی شامل گونه های کلادوسپوریوم(۲۹/۹ درصد)، میکروسپوروم(۲۵/۲ درصد)، آسپرژیلوس(۱۷/۳ درصد)، پنیسیلیوم(۱۳/۴ درصد) و در میان گونه های کاندیدا، کاندیداالبیکنس(۴/۷ درصد) و کاندیدا تروپیکالیس (۹/۴ درصد) به عنوان گونه های غالب بودند(۱۶). در بررسی دیبا و همکاران(۲۰۱۴) بررسی منابع عفونت برای شناسایی سویه های آسپرژیلوس موجود از هوا و دیوارهای ساختمان های بیمارستانی گزارش گردید که در مجموع ۱۱۰ گونه قارچ از جمله ۳۵ مورد(۳۱/۵ درصد) کاندیدا، ۴۸ مورد(۴۳/۲ درصد) آسپرژیلوس، ۲۸ مورد(۲۰/۳ درصد) ساپروفیت هایی مانند آلترناریا، ساکارومیسس، موکور و رایزوپوس، پنی سیلیوم، کلاوسپوریوم از طریق روش ملکولی شناسایی شدند و غالب آسپرژیلوس جدا شده در این مطالعه شامل آ.نیجر ۴۳/۷ درصد، آ.فلاووس ۴۱/۸ درصد و آ.فومیگاتوس ۱۴/۷ درصد بودند(۱۷).

با توجه به نتایج بررسی دو مطالعه فوق و مقایسه آن با مطالعه ما مشخص می گردد هنوز آسپرژیلوس ها به عنوان عوامل مهم منابع عفونت بیمارستانی قارچی بوده و علت حضور آن ها با افزایش تعداد کلنیزاسیون می تواند به علت تعمیرات نامناسب و قدیمی بودن ساختمان ها، عدم کارائی یا فقدان سیستم تهویه بیمارستان ها، عدم نظافت کافی بخش های مختلف بیمارستانی، دسترسی راحت و بیشتر مردم به این بخش ها که ناشی از افزایش بیش اندازه تعداد عیادت کنندگان، جا به جایی یک دفعه ای وسایل بخش های مختلف بیمارستانی، نگهداری مواد مرطوب و معدنی و وجودکابینت مرطوب در ارتباط باشند.

با توجه به انجام تست های حساسیت برای آسپرژیلوس های ایزوله شده در این مطالعه مشخص گردید آسپرژیلوس سیدویی و آسپرژیلوس فومیگاتوس به آمفوتریسین و وریکونازول حساس در حالی که هر دو به ایتراکونازول مقاوم بودند. در ضمن آسپرژیلوس سیدویی مقاوم به کاسپوفانژین بوده در حالی که آسپرژیلوس فومیگاتوس به این دارو حساس بود. آ.فلاووس ها به آمفوتریسین، ایتراکونازول، وریکونازول و کاسپوفانژین و کتوکونازول حساس بودند.

دنیگ و همکاران(۲۰۰۲) در بررسی خود نشان دادند گونه های آسپرژیلوس فومیگاتوس ممکن است به طور ذاتی نسبت به داروهای ضد قارچ ها مقاوم باشند و حتی کمترین میزان MIC آمفوتریسین B و آزول ها برای برخی گونه های غیر فومیگاتوس در مقایسه با گونه فومیگاتوس قابل ارزش است(۱۸). هاشمی و همکاران(۲۰۱۱) حساسیت دارویی گونه های آسپرژیلوس جدا شده به برخی از داروهای ضد قارچی مانند ایتراکونازول را در شرایط آزمایشگاهی با روش میکرودایلوشن را مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که ۲۵ درصد ایزوله ها در ارتباط با داروی ایتراکونازول به واسطه MIC کمتر از ۸ میکروگرم بر میلی لیتر، ایزوله هایی با حساسیت کمتر تلقی می شوند و در رابطه با داروی وریکونازول نیز در مقایسه با مطالعات خارج از ایران، این ایزوله ها از حساسیت کمتری برخودار می بودند. هم چنین مشاهده گردید که دامنه MIC این ایزوله ها در اکثر موارد در دامنه MIC استرین های استاندارد بوده و حکایت از حساسیت کمتر ایزوله های ایرانی و افزایش MIC آن ها دارند(۱۹). بررسی مقایسه ای مطالعه ما با مطالعه دکتر هاشمی نشان می دهد ایزوله فومیگاتوس در مطالعه ما به ایتراکونازول مقاوم ولی در آن مطالعه حساس بوده و تفاوت استرین های ژنتیکی مختلف جدا شده از دو مطالعه یا به دلیل استفاده از تکنیک های مختلف آزمون تست حساسیت و یا به دلیل جهش در سویه های مقاوم می باشد. در بررسی Araujo و همکاران(۲۰۰۸) برای تعیین حساسیت گونه آ.فومیگاتوس با داروهای ضد قارچی مثل آمفوتریسین B، ایتراکونازول و وریکونازول، آن ها نشان دادند محدوده MIC برای این سه دارو برابر ۰/۰۶ میکروگرم بر میلی لیتر و در بین آن ها وریکونازول بالاترین نقطه MIC داشت(۲۰).

در بررسی نتایج تست حساسیت دارویی توسط shi

(۲۰۱۰) بر روی چندین گونه های آسپرژیلوس با چند داروی ضد قارچی گزارش گردید که $MIC_{۵۰}$. کاسپوفونجین برای آ.فومیگاتوس، آ.فلاووس و آ.نیجر برابر ۰/۰۹۴ میکروگرم بر میلی لیتر در حالی که $MIC_{۹۰}$. کاسپوفونجین، آ.نیجر برابر با ۰/۰۱۹ میکروگرم بر میلی لیتر بود. برای گونه های فوق، $MIC_{۹۰}$. کاسپوفونجین پایین ترین MIC را در میان پنج داروی ضد قارچی را دارا بود. برای آ.ترئوس، $MIC_{۹۰}$. پوسوکونازول کمترین مقدار و برای آ.فومیگاتوس و آ.فلاووس، $MIC_{۹۰}$. در مورد داروهای کاسپوفونجین، پوسوکونازول، وریکونازول، ایتراکونازول و آمفوتریسین ب بیشتر از $MIC_{۹۰}$. آ.ترئوس و بالاتر از ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر در تمام سویه های تست شده گزارش گردید(۳). نتایج این بررسی تا حد زیادی با نتایج مطالعه صورت گرفته در این پژوهش مطابقت داشته است. بررسی نتایج تست حساسیت در این نوع مطالعات و مقایسه آن با مطالعه ما نشان می دهد کاسپوفونجین داروی جدید است و به همراه وریکونازول به عنوان داروی انتخابی مورد تایید اکثر دانشمندان در درمان آسپرژیلوزیس مطرح می باشد.

در بررسی حجتی نیا و همکاران(۲۰۱۶) برای تعیین تست حساسیت ۲۰ نمونه آ.فلاووس محیطی بیمارستانی مشخص گردید که تمامی نمونه ها به داروهای مورد مطالعه حساسیت نشان می دادند. میزان محدوده $MIC_{۹۰}$. حاصل از ایتراکونازول برابر با ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر، وریکونازول ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و کاسپوفانژین ۰/۰۶۳ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است و قارچ های شناسایی شده جزء سویه های حساس ارزیابی و گزارش گردیدند در حالی که سویه مقاوم در بین آن ها مشاهده نگردید(۲۱). دامنه MIC سویه ها در دامنه مطالعه های مشابه و در مواردی نیز خارج از این دامنه ها قرار گرفته که نشان دهنده حساسیت بیشتر سویه های مورد مطالعه بود.

حسین نژاد و همکاران(۲۰۱۶) در ارزیابی حساسیت دارویی به داروهای ضد قارچی وریکونازول و ایتراکونازول بر روی ۹۰ ایزوله محیطی و بالینی آسپرژیلوس فلاووس شناسایی شده به روش ملکولی مشخص کردند که همه ایزوله های مورد بررسی MIC دارای حساسیت کمتر از ۱ میکروگرم بر میلی لیتر را نسبت داروهای فوق نشان می دادند به جز دو ایزوله ای که دارای MIC برابر با ۲ میکروگرم بر میلی لیتر بودند. $MIC_{۹۰}$ برای وریکونازول و ایتراکونازول به ترتیب برابر با ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر در این مطالعه بوده است(۲۲).

چن و همکاران(۲۰۱۶) در بررسی خود از ۱۴۴ نمونه محیطی آسپرژیلوس فومیگاتوس جمع آوری شده از ۱۲ استان چین گزارش کردند که ۱/۴ درصد از این ایزوله ها به پنج داروی آزولی مقاوم و علت مقاومت را در به تغییرات پلیمورفیسم و موتاسیون TR34/L98H در ژن(cyp51A تغییرات اسید آمینه) نسبت دادند(۲۳). تانگ و همکاران(۲۰۱۶) در تایلند در بررسی بر روی ۳۰۰ نمونه آسپرژیلوس محیطی گزارش کردند که اکثر نمونه های آ.فومیگاتوس ایزوله شده، مقاوم به ایتراکونازول و دارای MIC بیشتر یا مساوی ۸ میکروگرم بر میلی لیتر بودند در حالی که فقط دو ایزوله به پسوکونازول مقاوم و دارای MIC برابر با ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر و یک ایزوله مقاوم به وریکونازول دارای MI برابر با ۲ میکروگرم بر میلی لیتر بودند(۲۴). نتیجه این بررسی نیز با مطالعه ما در مبحث مقاومت دارویی شباهت دارد.

عفونت های قارچی مهاجم آسپرژیلوزیس و کاندیدیوزیس در حال ایجاد مشکل حاد برای بیماران دارای ایمنی سرکوب شده در سراسر دنیا می باشند. هم چنین در این زمینه نگرانی قابل توجهی در افزایش تدریجی مقاومت در برابر آزول های و اکینوکاندین وجود دارد. میزان مرگ و میر با عفونت قارچی در ۵۰ درصد از مطالعات وابسته به محل عفونت، وجود بیمارهای زمینه ای می باشد از این رو استفاده از عوامل ضد قارچی مانند اکینوکاندین و وریکونازول در درمان چنین بیماری هایی در حال حاضر در ارجحیت می باشد. درمان استاندارد و قدیمی آسپرژیلوزیس مهاجم ریوی آمفوتریسین B به خصوص در بیماران پر مخاطره و بیماری های شدید علی رغم عوارض جانبی متعدد، به ویژه عوارض کلیوی با حداکثر دوز قابل تحمل استفاده می شود این در حالی است که پاسخ درمانی آسپرژیلوزیس مهاجم نسبت به وریکونازول بهتر

از آمفوتریسین B می باشد و به عنوان اولین رده دارویی برای این بیماری به تصویب رسیده است. هم چنین به طور روتین از ایتراکونازول و سایر آزول های خوراکی یا تزریقی استفاده می شود. داروی اکینوکاندین در موارد شکست درمانی سایر آنتی فانگال ها و یا عدم تحمل سایر دارو نیز مورد استفاده قرار می گیرد. در سال های اخیر به علت افزایش مقاومت آزولی در آسپرژیلوس های محیطی مبحث درمان بیماری های حاصل از آن ها سبب مشکلات بسیار مهمی گردیده است زیرا گسترش مقاومت دارویی می تواند در کنترل بیماری های ناشی از این قارچ ها اختلال ایجاد کند؛ بنا بر این نیاز به تعیین گونه و شناسایی سویه های مقاوم به دارو با توجه به تظاهرات بالینی مختلف در بیماران دچار آسپریلوزیس مهاجم هستیم(۲۵).

با توجه به نتایج مطالعه صورت گرفته در این پژوهش و مقایسه آن با مطالعات فوق در می یابیم که گونه های ناشناخته جدا شده آسپرژیلوس از محیط های متفاوت به ویژه بیمارستانی ممکن است نسبت به داروهای ضد قارچی حساسیت های مختلفی نشان دهند. تفاوت در نتایج تست حساسیت دارویی می تواند در نتیجه تفاوت زیر گونه های قارچی در مقابل داروهای مورد بررسی، مقاومت سویه ها نسبت به داروهای ضد قارچی، ا ختلاف در کیفیت داروی تولید شده توسط کارخانه سازنده و درجه خلوص آن و یا تفاوت در جامعه مورد مطالعه باشد. به دلیل تفاوت در پاسخگویی به داروها و امکان بروز مقاومت و انتقال مقاومت، بررسی مداوم تاثیر داروهای ضد قارچی از طریق روش های تعیین حساسیت نسبت به گونه های بیماریزای آسپرژیلوس امری ضروری است که باید مورد توجه هم پزشکان و هم میکروبیولوژیست ها قرار گیرد. علاوه بر پیشرفت هایی که در سالیان اخیر در تشخیص و درمان بیماران در معرض خطر آسپرژیلوزیس تهاجمی نشان داده شده است برنامه ریزی های لازم نیز بایستی در جهت اقدامات بهتر بهداشتی و پیشگیرانه از آن ها صورت گیرد؛ بنا بر این پیشنهاد می گردد برای دسترسی به موفقیت درمانی بهتر در ارتباط با این بیماری مطالعات بیشتری و با داروهای ترکیبی همراه با بررسی اثرات سینرژیسمی این داروها با داروهای نوظهور انجام گیرد.

سپاسگزاری

با سپاس فراوان از همکاری معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن که در تصویب و تامین هزینه های این طرح تحقیقاتی از محل بودجه پژوهشی کمال همکاری را داشته و هم چنین کارشناسان آزمایشگاه گروه میکروبیولوژی که امکان انجام این تحقیق را میسر نمودند تشکر و قدردانی می نمایم.

References

1.Suleyman G, Alangaden GJ.Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, InfectionControl, and Prevention.Infec Dis Clin North Am 2016;30:1023-52.

2. Curtis, LT. Prevention of hospital-acquiredinfections review of non pharmacological interventions . J Hosp Infect 2008;69:204-19.

3.Shi JY, Xu YC, Shi Y, Lu HX, Liu Y, Zhao WS, et al. In vitro susceptibility testing of Aspergillus spp. against voriconazole itraconazole posaconazole amphotericin B and caspofungin. Chin Med J 2010; 123:2706-9.

4. Kordbacheh P, Zaini F, Kamali P, Ansari K, Safara M. [Study on the sources of nosocomial fungal infections at ICU and transplant wards at a teaching hospital in Tehran]. Iranian J Pub Health 2005;34: 1-8. (Persian)

5. Vandewoude KH, Vogelaers D, Blot SI.Aspergillosis in the ICU-the new 21 st century problem? Med Mycol 2006; 44: 71-6.

6. Zilberberg MD, Shorr AF.Fungal infection in the ICU. Infect Dis Clin North Am 2009; 23:625-42.

7.Nabili M, Moazeni M, Taghizadeh Armaki M, Asgari MR, Nosrati A, Shokohi T. [Diagnostic Tools in Fungal Infections since Classical to Molecular Era] . J Mazandaran Uni Med Sci 2013;23:109-29. (Persian)

8.Denning DW,Venkateswarlu K,Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ. Itraconazole resistance in Aspergillus

fumigatus. Antimicrob Agents Chemo1997; 41:1364-8.
9. Howard SJ, Arendrup MC.Acquired antifungal drug resistancein Aspergillus fumigatus epidemiology and detection. Med Mycol 2011; 49: 90-5.
10. Arujo R, Amorim A, Gusma oL. Genetic diversity of Aspergillus fumigatus in indoor hospital environments. Med Mycol 2010; 48: 832-38.
11. Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, Molecular typing of environmental and patient isolates of Aspergillus fumigatus from various hospital settings. J Clin Microbiol1998 Jun;36:1494-500.
12. Hinrikson HP, Hurst SF, Agurre SF. Morrison CJ.Molecular methods for the identification of Aspergillus species. Med Mycol 2005; 43:129-37.
13. Hinrikson H P, Hurst S F, Lott TJ, Warnock DW, C J Morrison. Assessment of Ribosomal Large-Subunit D1-D2, Internal Transcribed Spacer 1, and Internal Transcribed Spacer 2 Regions as Targets forMolecular Identification of Medically Important Aspergillus Species. J Clin Microbiol 2005;43:2092-103.
14. Wayne PA . Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of Filamentous fungi . 2th ed. CLSI Clin Lab Standards Institute Publication. 2008. P.
15. Lassflorl C. Invitro susceptibility testing in Aspergillus species an update. Future Microbio 2010;5:789-99.
16.Garciacruz CP, Najeraaguilar MJ, Arroyohelguera OE. Fungal and bacterial contamination on indoor surfaces of a hospital in Mexico. Jundishapur J Microbiol 2012;5:460-4.
17. Diba K, Khadijeh Makhdoomi K, Mirhendi H.Molecular characterization of Aspergillus infections in an Iranian educational hospital using RAPD-PCR method. Iran J Basic Med Sci 2014; 17:646-50.
18. Denning DW, Ribaud P, Milpied N, Caillot D, Herbrecht R, Thiel E, et al. Efficacy and safety of voriconazole in thetreatment of acute invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 2002; 34:563-71.
19Hashemi SJ , Zaini F , Daie R , Zibafar E , Zakeri MA .A.[Invitro susceptibility of Aspergillus species isolated from cutaneous andvisceral lesions to antifungal agents]. Tehran Uni Med J 2011; 69:83-91. (Persian)
20.Araujo R, Coutinho I, Espinel-Ingroff A.Rapid method for testing the susceptibility of Aspergillus fumigatus to amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazoleby assessment of oxygen consumption. J Antimicrob Chemother 2008; 62:1277-80.
21. Hojatinia H, Sabokbar A. Sensitivity determination of Aspergilus flavus to Itraconazol Voriconazol and Caspofungin. NCMBJ 2016; :51-8
22.Hoseinnejad A, Hedayati MT, Moazeni M, Taghizadeharmaki M, Abastabar M, Jabariamiri MR, et al. [Antifungal susceptibility testing of 90 clinical and environmental isolates of Aspergillus flavus to Voriconazole and Itraconazole].J Mazandaran Uni Med Sci 2016; 25:91-99. (Persian)
23.Chen Y, Lu Z, Zhao J, Zou Z, Gong Y, Bao Z, Qiu G tal. Epidemiology and molecular characterizations of Azole resistance in clinical and environmental Aspergillus fumigatus isolates from China. Antimicrob Agents Chemo 2016; 60:5878-84.
24. Tangwattanachuleeporn M, Sasse C, Buchheidt D, Weig M, Grob U, Bader O. Molecular tools for the detection and deduction of azole antifungal drug resistance phenotypes in Aspergillus species. Clin Microbiol Rev 2017;30 :1065-91.
25. Enoch DA, Aliyu SH, Micallef C.The changing epidemiology of invasive fungal infections. Meth Mol Biol 2017; 1508:17-65.

Evatuation of Drug susceptibility of Aspergillus species Isolated from ICU of Hospitals in Invitro

*Nasrolahiomran A[1]**

(Received: May 6, 2017 Accepted: November 15, 2017)

Abstract

Introduction: Invasive aspergillosis is the most threatening disease inimmunoco-mpromised patients which has the highest morbidity and mortality rate among invasive fungal infections in the hospitals. The aim of present study was to assess antifungal susceptibilitytesting versus Aspergillus spp isolated from the hospitals environment**.**

Materials & Methods: After collecting 160 plates containing Sabouraud dextrose agar from the air and the environment of hospital's ICUs (intensive care units), the phenotypic and molecular identification of the colonies was performed for the identification of Aspergillusspp. After DNA extraction, the molecular identification was carried out using universal fungal primers (ITS gene) and DNA sequencing. Antifungal susceptibility testing was performed using the CLSI broth microdilution (M38-A2) method for Aspergillus isolates**.**

Findings: Out of 160 hospital environmental samples, 11Aspergillus species were obtained. The eleven Aspergillus spp. were identified by sequencing as: 5 A. flavus, 3 A. sydowii, 1 A. fumigates and 2A. Oryzae. Our antifungal susceptibility testing results indicated that A. sydowii and A. fumigatus were sensitive to Amphotericin and Voriconazole and also were resistant to Itraconazole. A. sydowii was resistant to Caspofungin while A.fumigatus was sensitive to this drug. A. flavus was susceptible to all the drugs.

Discussion & Conclusions: There were a number of reasons including delayed diagnosis, lack of appropriate curing, and the existence of various diseases and neutropenia which could lead to the high mortality rate of patients with Aspergillosis, especially in patients of hospital's ICUs.

Keywords: Drug susceptibility, Aspergillus SP. ICU

1. Dept of Mycology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Tonkabon Branch,Tonkabon, Iran
** Correspondin author Email: Ayat51@yahoo.com*