مقایسه اثر داروهای کتوکونازول، کلوتریمازول وفلوکونازول علیه ایزولههای کاندیداآلبیکنس در شرایط In vitro

حسین زرین فر* '، محمد حسین یادگاری '، صمد اطمینان "، فرزاد کتیرایی ٔ

۱) گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

لا) استادیار گروه قارچ شناسی پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرسی

ψ) عضو هیات علمی ، دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم یزشکی شهید صدوقی یزد

۷)گروه قارچ شناسی ، دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش:۸٦/١/٥

تاریخ دریافت:۸٥/٧/٥

چکیده:

مقدمه و هدف: ولوواژینیت کاندیدایی به عنوان یک بیماری مهم در زنان باردار، مبتلایان به دیابت، استفاده کنندگان از آنتی بیوتیکهای وسیعالطیف و داروهای ضدبارداری بروز می کند و مقاومت نسبتاً بالایی به داروهای رایج از خود نشان می دهد. از طرفی واژینیت های عود کننده در بسیاری از بیماران پروسه درمانی را با شکست مواجه می سازد. هدف این مطالعه یافتن دارویی مناسب تر از بین داروهای کلوتریمازول، کتو کونازول و فلو کونازول با استفاده از تست تعیین حساسیت دارویی در شرایط آزمایشگاهی، قبل از درمان مجدد واژینیت های کاندیدایی عود کننده بوده است.

مواد و روش ها : به این منظور از ۱۰ ایزوله کاندیداآلبیکنس به دست آمده از ۳۱ بیمار مشکوک به ولوواژینیت کاندیدایی استفاده شد و با بکار بردن محیط MFC و RPMI و میکروپلیتهای ۹۶ خانهای و انجام روش میکرو دایلوش براث مقادیر MIC_{50} ، MIC_{50} این داروها در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و MFC ایدازه گیری شد.

۱–۱-۴، ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر، داروی فلوکونازول به ترتیب MIC_{50} ها MIC_{50} ها MIC_{50} و MIC_{50} ها MIC_{50} و MIC_{50} در میلی لیتر و داروی کلوتریمازول به ترتیب MIC_{50} در MIC_{50} در میلی لیتر و داروی کلوتریمازول به ترتیب MIC_{50} در MIC_{50} در میلی لیتر و داروی کلوتریمازول به ترتیب MIC_{50} در MIC_{50} در M

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاضر داروی کلوتریمازول نسبت به دو داروی دیگر اثر بهتری را بر روی کاندیداآلبیکنس داشته است.

واژه های کلیدی: کاندیداآلبیکنس، کلوتریمازول، کتوکونازول، فلوکونازول، ولوواژینیت

مقدمه

عفونتهای قارچی واژن در ۸۵–۹۵ درصد موارد در اثر كانديداآلبيكنس بوجود مي آيند. كانديداآلبيكنس را می توان از واژن ۲۰ درصد زنان بدون علامت جـدا کرد(۲،۱).عواملی که با کاندیدیاز ارتباط دارند شامل تجویز آنتی بیوتیکهای سیستمیک، حاملگی، دیابت قندی و مصرف مواد سرکوب کننده ایمنی هستند. واژینیت عودکننده (RCCV) در تعدادی از زنان که قبلا تحت درمان قرار گرفتهاند دیده می شود به همین منظور اندازه گیری فعالیت ضد قارچی داروها در آزمایشگاه با استفاده از تستهای حساسیت می-تواند برای درمان ایده آل بیماران مبتلا به عفونت-های مزمن و نیز سیستمیک ضروری باشد. برآورد شده که ۷۵ درصد از زنان حداقل یک بار در طول عمر خود دچار ولوواژینیت کاندیدایی میشوند(۳، ۴) و ۵ درصد از زنان مبتلا به شکل مزمن یا عودکننده واژینیت میشوند. مشخص گردیده که گونههای غیر آلبیکنس عامل واژینیت مزمن و عودکننده رو به افزایش است، که علت آن را استفاده وسیعالطیف و طولانی مدت داروهای ضدقارچی و آزولها می-دانند(۵). عوامل بسیار متعددی نظیر میزان قارچ کشت داده شده(میزان تلقیح)، نوع محیط کشت، درجه حرارت و مدت زمان انکوباسیون بر روی نتایج تست تعیین حساسیت دارویی موثر میباشد لذا برای بهدست آوردن شرایط استاندارد و نتایج مناسب بایستی همه شرایط یکسان باشند(۶). در این تحقیق نیز سعی شد بیشتر از شرایطی که توسط NCCLS(کمیته ملی استاندارد آزمایشگاههای بالینی) جهت انجام تست پیشنهاد شده استفاده شود.

مواد و روشها

نمونه گیری: در این تحقیق از ۳۱ بیمار مشکوک به واژینیت که ۳ تا ۴ بار در سال به خاطر این بیماری مراجعه کرده بودند نمونهبرداری با سواپ استریل انجام شد که تعداد ۱۰ بیمار پس از انجام بررسی مستقیم میکروسکوپی وتهیه کشت تازه سابورودکستروزآگار و تولید لوله زایا در سرم اسب و

ایجاد کلامیدوسپور در محیط کشت کورن میل آگار حاوی ۰/۵ درصد تویین ۸۰ و جذب قندهای گلوکز، گالاکتوز، لاکتوز، مالتوز، رافینوز، ساکارز و سلوبیوز با کمک دیسکهای قندی(روش اگزانوگرام)، بعنوان واژینیت کاندیدایی با عامل کاندیداآلبیکنس شناسایی شدند.

انجام تست حساسیت دارویی: برای انجام این تست مراحل زیر به دقت انجام شد:

الف) تهیه سوسپانسیون قارچی: سوسپانسیونی از هـر یک از کشتهای تازه (۴۸ سـاعته) کاندیـداآلبیکنس توسـط سـرم فیزیولـوژی اسـتریل تهیـه گردیـد و مخمرها پس از خوب بهم زدن لوله ها با اسـتفاده از لام نئوبار در زیـر میکروسـکوپ شـمارش گردیـد و غلظتی معادل ۲۰۱۳ تنظیم گردید (۷) تـا غلظتی معادل ایـن غلظـت بـه هـر چاهـک و پس از اضافه کردن ایـن غلظـت بـه هـر چاهـک و رقیق شدن آن، تعداد مخمر مورد نظر(۵۰۰ مخمر در هر میلیلیتر برای هر چاهـک) بدست آید.

ب) تهیه محیط کشت RPMI ایودر محیط را تهیه محیط را در آب خوب حل کرده و مقدار ۲ RPMI افرم بی کربنات سدیم را نیز به ازای هر لیتر محیط نیز به آن اضافه کردیم. سپس محیط کشت را نیز از فیلتر ۲/۰ میکرون عبور دادیم و محیط RPMI فیلتر ۱۰۰ میکرون عبور دادیم و محیط افراد در لولههای درپیچدار استریل داخل یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد و در هنگام استفاده از این محیط، یک میلی لیتر گلوت امین به ازای ۱۰۰ میلی لیتر محیط

ج) تهیه محلول دارویی: برای تهیه استوک دارویی(بر اساس میزان حساسیت مخمرها به داروها)(۸) ۲۰۴۸ میکروگرم از پودر کتوکونازول و کلوتریمازول، ۴۰۹۶ میکروگرم از پودر فلوکونازول هر کدام بطور جداگانه در یک میلیلیتر حلال دی-متیل سولفوکساید(DMSO) تهیه و بهمدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. قابل ذکر است برای حذف اثر کشندگی حلال دیمتیل سولفوکساید بر روی مخمرها این حلال را تا ۱/۳۲ رقیق کردیم. انجام مراحل آزمایش: در این تحقیق از روش میکرودایلوشن براث استفاده شد(۸) که با استفاده از میکرودایلوشن براث استفاده شد(۸) که با استفاده از

^{1.} Recurrent Candica Vulvovaginitis

سرمفیزیولوژی استریل رقتهای متوالی دو برابر از استوک داروهای فوق در حجم یک میلی لیتر در یک سـری ۱۲ لولـهای بـرای دو داروی کتوکونــازول و کلوتریمازول (بالاترین غلظت دارو ۱۰۲۴ میکروگـرم در میلی لیتر و پایین ترین غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) و ۱۳ لولهای برای داروی فلوکونازول (بالاترین غلظت دارو ۲۰۴۸ میکروگرم در میلیلیتر و پایین ترین غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) تهیه گردید. در این روش از ۷/۲ pH برای محیط کشت RPMI 1640 استفاده شد که از این محیط مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به میکروپلیتهای ۹۶ خانهای اضافه شد. از طرفی سوسپانسیون مخمری را با توجه به تعداد ۱×۱۰^۳ cfu/ml (برای هـر چاهـک) در يـک لوله تهیه و با محاسبه مقدار لازم برای هر چاهک، به همـراه ۱۰۰ میکرولیتـر از رقـت دارویـی بـه میکروپلیتها اضافه کردیم. از بیشترین غلظت دی-متيل سولفو كسايد بدون حضور دارو نيز بعنوان كنترل (شاهد) استفاده شد.

میکروپلیتها را به مدت ۴۸ ساعت بطور جداگانه در ۳۵ درجه سانتیگراد در داخل شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته، ۱۰ میکرولیتر از هر یک از محتویات چاهکها به پلیتهای حاوی محیط سابورودکستروزآگار حاوی کلرامفنیکل (SC) تلقیح و توسط لوپ پخش گردید و پلیتها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بر اساس شمارش تعداد کلنیهای رشد کرده از هر یک از رقتهای دارویی نسبت به گروه کنترل، مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC و MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) داروهای کتوکونازول ، کلوتریمازول وفلوکونازول محاسبه گردید.

نتايج

در دمای $^{\circ}C$ و $^{\circ}PH = V/T$ نتایج حاصل از بررسی اثر غلظ تهای مختلف داروی کتوکونازول در محدوده $^{\circ}C$ میکروگرم در میلیلیتر بر روی ایزولههای کاندیداآلبیکنس بدین قرار است:

اثر غلظتهای مختلف داروی فلوکونازول در محدوده ۵/۰- ۲۰۴۸ میکروگرم در میلیلیتر بر روی ایزولههای کاندیداآلبیکنس بدین قرار است:

MIC مقادیر ۰/۲۵، ۰/۲۵ و ۱ میکروگرم در میلی لیتر به ترتیب ۳، ۶ و ۱ ایزوله بدست آمد. میزان 90 MIC برای این دارو ۱، ۲ و ۴ میکروگرم در میلی MIC لیتر برای ۱، ۷ و ۲ ایزوله به ترتیب بدست آمد. میزان MFC برای این دارو ۲۵۶، ۲۵۲، ۱۰۲۴ و بیشتر از ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر به ترتیب برای ۱، ۱، ۷ و ۱ ایزوله بدست آمد(جدول شماره۲). اثر غلظتهای مختلف داروی کلوتریمازول در محدوده 10 میکروگرم در میلیلیتر بر روی ایزولههای کاندیداآلبیکنس بدین قرار است:

مقدار $_{50}$ MIC به ترتیب در غلظتهای کمتر از MIC مقدار 50 1 به ترتیب در میلی لیتر برای MIC به 2 و ۱ میکروگرم در میلی لیتر برای 2 خلظتهای ۱، ۲ و ۴ میکروگرم در میلی لیتر برای ۲، غلظتهای HFC میکروگرم در میلی لیتر برای ۱۲۸ و ۲ ایزوله بدست آمد.مقدار MFC در غلظتهای ۲۵۶، ۲۵۶ و ۵۱۲ میکروگرم در میلی لیتر برای ۱، ۸ و ۱ ایزوله بدست آمد(جدول شماره 2).

بحث

از دلایل مهم ایجاد بیماری واژینیت کاندیدایی عودکننده، حذف ناقص کاندیدا از واژن پس از درمان ضدقارچی است، هر چند ممکن است علایم بالینی والتهابات بیمار کم شود، اما ارگانیسم به تعداد کم در واژن می ماند و منجر به ناقل شدن بیمار می-گردد(۹). هنگامی که شرایط هورمونی و فیزیولوژیک نرمال میزبان تغییر یابد، کلنیزاسیون ارگانیسم افزایش پیدا کرده و باعث بروز علایم بالینی جدید در فرد می گردد(۱۰).

Odds در سال ۱۹۹۳ میلادی مشاهده کرد که ایزوله های کاندیداآلبیکنس در دمای ۲۵ درجه نسبت به ۳۷ درجه حساسیت کمتری را به داروی فلوسیتوزین نشان می دهند (۱۱). Hacek و همکاران در سال ۱۹۹۵ میلادی در بررسی دو دمای ۳۰ و۳۵ درجه بر روی حساسیت مخمرهای مختلف نسبت به کتوکونازول، فلوکونازول، فلوسیتوزین و آمفوتریسین B نشان دادند که در دمای ۳۰ درجه مخمرها مقاومت بیشتری از خود نشان میدهند(۱۲). Cook و همکاران نیز در سال ۱۹۹۰ میلادی پس از بررسی عوامل مختلف از جمله دمای انکوباسیون بر روی تستهای میکرو و ماکرودایلوشن انجام شده بر روی مخمرها مشاهده کردند که دمای انکوباسیون ۳۵ درجه نسبت به ۳۷ درجه و ۳۰ درجه بهتر است(۱۳) که به همین جهت در این تحقیق از دمای ۳۵ درجه سانتیگراد (از بین دماهای بالاتر از دمای آزمایشگاه) استفاده شد که در این دما نیز نسبت به دمای آزمایشگاه (۲۷ درجه) نتایج مطلوبتری به-دست مي أيد.

رحیم زاده و رحیمی در سال ۱۳۸۴ در بررسی میزان حساسیت دارویی مبتلایان به واژینیت کاندیدایی مشاهده کردند که پاسخ به کلوتریمازول موضعی ۸۴/۶ درصد، کتوکونازول خوراکی (۲۰۰ میلی گرم دو بار در روز) ۶۹/۲ درصد و فلوکونازول تک دوز خوراکی (۱۵۰ میلی گرم) ۴۶/۷ درصد بوده است خوراکی (۱۵۰ میلی گرم)

Sobel و همکاران در سال ۲۰۰۳ میلادی مشاهده کردند که در زنان مبتلا به واژینیت کاندیدایی MIC پیچیده MIC داروی فلوکونازول به روش میکرودایلوشن در ۹۶ درصد موارد کمتر از $\mu g/ml$ و در $\pi/۶$ درصد موارد بیشتر از $\pi/۶$ بوده است (۱۵).

شهبازیان و همکاران در سال ۱۳۸۵ در دانشگاه علوم پزشکی اهواز با بررسی ۱۹۲ بیمار مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی و حساسیت آنها نسبت به درمان فلوکونازول خوراکی و کلوتریمازول واژینال، پاسخ ۹۷ درصدی به کلوتریمازول و پاسخ ۸۶ درصدی به فلوکونازول را پس از ۱ تا ۳ روز مشاهده درصدی به فلوکونازول را پس از ۱ تا ۳ روز مشاهده

کردند (۱۶) و ملاحظه می شود که اثر داروی کلوتریمازول واژینال بر روی ولوواژینیت کاندیدایی همانند این تحقیق بیشتر بوده است.

در بررسی MIC $_{50}$ و MIC $_{50}$ ایزولههای استفاده شده در این تحقیق ملاحظه می شود که نتایج بدست أمده با نتایج سایر محققین، بخصوص در میزان دقیق حساسیت کاندیداها به داروها نسبتاً ناهمخوانی داشته، منتها در بین داروهای استفاده شده کلوتریمازول همانند برخی دیگر از تحقیقات انجام شده اثر مطلوب تری را داشته است. به نظر مىرسد اختلافات موجود در نتايج بعضى محققين به واسطه محل ضایعه و مزمن بودن بیماری و درمانهای مکرر قبلی، تفاوت در سیستم ایمنی میزبانهای مختلف و روش انجام تست به روشهای مختلف و شرایط انجام تست باشد. در مجموع، نتایج بدست آمده مؤید این نکته است که در شرایط بکار رفته V/Y و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد بر ایزولههای کاندیداآلبیکنس جدا شده از واژینیتهای عود كننده همانند شرايط پيشنهاد شده توسط NCCLS و دیگر محققین برای دیگر ایزولههای کاندیداآلبیکنس دارای اثر بهتری میباشد و داروی کلوتریمازول میتواند اثر بهتری نسبت به داروهای کتوکونازول و فلوکونازول بر روی ایزولههای ولوواژینیت کاندیدایی داشته باشد.البته برای مشخص شدن ميزان تطابق آن با شرايط بدن بایستی بررسیهای بیشتری بر روی بیماران درمان شده با این داروها انجام شود.

جدول ۱: اثر داروی کتوکونازول در PH ۷/۲ و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر

ايزولهها	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MFC
کاندیدااّلبیکنس بیمار شماره ۱	١	۴	۵۱۲
کاندیدااَلبیکنس بیمار شماره ۲	٠/۵	٢	>۵1۲
کاندیدااّلبیکنس بیمار شماره ۳	٠/٢۵	٢	۶۴
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۴	١	۴	>۵1۲
کاندیدااّلبیکنس بیمار شماره ۵	١	۴	>۵1۲
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۶	٠/۵	٢	۵۱۲
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۷	٠/٢۵	١	۵۱۲
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۸	٠/٢۵	١	TD 5
کاندیدااّلبیکنس بیمار شماره ۹	٠/٢۵	١	۶۴
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۱۰	٠/٢۵	١	۶۴

جدول ۲: اثر داروی فلوکونازول در ۷/۲ pH و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر

ايزولهها	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MFC
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۱	٠/۵	٢	1.74
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۲	٠/۵	٢	1.74
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۳	٠/۵	۴	1.74
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۴	-/۲۵	٢	1.74
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۵	٠/۵	٢	1.74
کاندیدااَلبیکنس بیمار شماره ۶	٠/۵	۲	1.74
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۷	-/۲۵	١	۵۱۲
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۸	-/۲۵	۲	1.74
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۹	١	۴	>1.74
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۱۰	٠/۵	٢	Y08

ايزولهها	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MFC
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۱	٠/۵	۲	708
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۲	٠/۵	۲	708
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۳	٠/۵	۲	705
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۴	< ./۲۵	١	708
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۵	٠/۵	۲	۵۱۲
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۶	٠/۵	۲	708
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۷	٠/٢۵	١	708
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۸	< ./۲۵	۲	708
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۹	٠/۵	۴	177
کاندیداآلبیکنس بیمار شماره ۱۰	1	۴	708

جدول۳: اثر داروی کلوتریمازول در ۳۲ pH و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر

References:

- 1. Nyiryesy P.S, Seeney M.H, Terry G, Card J, Helen R. Chronic fungal vaginitis: The value of cultures. *Am. J. obstet.gynecol.* 1995, 173: 820-823.
- 2. Kinghorn. G.R. Vulvovaginal candidosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1991. 928 supp. A 59-66.
- 3. McCormack, W. M., Jr. S. H. Zinner, W. M. McCormack. The incidence of genitourinary infections in a cohort of healthy women. *Sex. Transm. Dis.* 1994, 21:63-64.
- 4. Jonathan S Berek. Novak's Gynecology, 12th ed, Baltimor, Williams & Wilkins, 1996, PP 432-4.
- 5. Saporiti AM, Gomez D, Levalle S, Galeano M, Vivit W, Rodero L. Vaginal Candidiasis: etiology and sensitivity profile to antifungal agent in clinical use. *Rev Argent Microbiol.* 2001; 33(4): 217-222.
- ۶ زینی، فریده ؛ مهبد، امیر سید علی ؛ امامی مسعود. قارچ شناسی پزشکی جامع. تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۸۳.
- 7. Michelle A. Tornatore., Gary A. noskin. Effects of incubation time and buffer concentration on in vitro Activities of Antifungle Agents Against candida Albicans. *J. clin. Mic.*1997, 35: 1473-1476.
- 8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27-A. Wayne, Pa: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. 1997.
- 9. Sandra S. Richter, Rudolph P. Galask, Shawn A. Messer, Richard J. Hollis et al. Antifungal Susceptibilities of Candida Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. *J Clin Micr. May 2005*, p 2155-2162, Vol 43, No 5
- 10. Anassie, E., Mc Ginnis, M.R. Pfaller, M.A. Clinical Mycology. 2003.

- 11. Frank C. Odds. Effects of temperature on anti candida activities of antifungal antibiotics. *Anti. Age.Che.1993*, *37:* 685-691.
- 12. Donna M. Hacek, Gary A. Boskin. Initial use of a broth microdilution method suitable for in vitro testing of fungal isolates in a clinical microbiology laboratory. *J. clin. Micr.*1995, 33: 1884-1889.
- 13. 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.
- ۱۴. رحیم زاده آ.؛ رحیمی ع. مقایسه اثر درمان سیستمیک و موضعی واژینیت کاندیدایی. مجله پزشکی هرمزگان، سال نهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۸۴، ۱۴۸–۱۴۳.
- 15. J.D. Sobel, M. Zerros. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated candida vaginitis: clinical implications. *Anti. Agen. Chem.* 2003, 47: 34-38.
- ۱۶. شهبازیان، ن؛ نجفیان م؛ رجب زاده ع. مقایسه اثر درمانی کلوتریمازول با فلوکونازول در ولوواژینیت کاندیدیایی. مجله علمی یزشکی(علوم یزشکی اهواز)، دوره ۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۵، ۵۲۲–۵۱۹.