مقاله پژوهشی

بررسی اثر چند داروی ضد قارچی متداول "کلوتریمازول، مایکونازول و فلوکونازول" به تنهایی و در همبست با آمفوتریسین B، بر روی گونه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از واژینیت کاندیدایی مزمن

عفت السادات شجاعی[۱]، مهربان فلاحتی[۱*]، فریده زینی[۱]، پریوش کردبچه[۱]، پروانه رحیمی مقدم[۲]، محمدرضا آقامیریان[۳]، شیما نوذری[۴]، عایشه مخدومی[۵]، سخاوت عامری[۱]، صنم افشار مقدم[۱]

۱- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۲- گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۳- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۴- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی بندر عباس، بندرعباس، ایران.
۵- شرکت داروسازی بهوزان، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۶/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۵/۰۷

چکیده

زمینه و هدف: واژینیت کاندیدیایی در اثر رشد بیش از حد گونه‌های کاندیدا به ویژه گونه آلبیکنس در دستگاه تناسلی زنان بروز می‌کند. این عفونت ممکن است به درمان مقاوم شود و گاهی هم به صورت مزمن درآید، همچنین گاهی بیماران پس از درمان با عود دوباره عفونت مواجه می‌شوند. از طرفی کشف داروهای ضدقارچی جدید توسط محققین و استفاده توام این داروها در قالب روش‌های نوین علاقه قارچ‌شناسان را به استفاده از این تکنیک‌ها برانگیخته است؛ لذا با استناد به روش‌های فوق، در این مطالعه اثر داروهای متداول ضدقارچی، به تنهایی و در همبست با آمفوتریسین‌ب، بر روی گونه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از واژینیت کاندیدیایی مزمن ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: این بررسی تجربی بر روی ۱۹ استرین کاندیدا آلبیکنس جدا شده از واژینیت کاندیدیایی مزمن انجام شد و اثر داروهای کلوتریمازول، مایکونازول و فلوکونازول، به تنهایی و در همبست با آمفوترسین‌ب، بر روی استرین‌های کاندیدیایی به روش میکرودایلوشن در محیط مایع ارزیابی شد.

نتایج: میانگین MIC کلوتریمازول، مایکونازول، فلوکونازول و آمفوتریسین‌ب، بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری به ترتیب ۷/۰۵، ۱۰/۷، ۴۷ و ۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در مرحله بعد آزول‌ها در همبست با آمفوتریسین‌ب بررسی شدند و دو همبست فلوکونازول +آمفوتریسین‌ب با FIC= ۰/۶ و مایکونازول +آمفوتریسین‌ب با FIC=1 از همه بیشتر مورد توجه بودند. همچنین در بررسی اثر قارچ‌کشی داروها، بیشترین اثر قارچ‌کشی در مورد آمفوتریسین ب با MFC=۱/۱۸ دیده شد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه ما، آمفوتریسین‌ب با کمترین MIC بیشترین اثر ضدقارچی را داشت اما بیشترین و کمترین اثر هم‌افزایی به ترتیب از همبست‌های فلوکونازول + آمفوتریسین‌ب و مایکونازول +آمفوتریسین‌ب، بدست آمد.

کلمات کلیدی: واژینیت کاندیدایی مزمن، همبست داروها، هم‌افزایی، میکرودایلوشن براث، کلوتریمازول، مایکونازول، فلوکونازول، آمفوتریسین‌ب.

مقدمه

عفونت‌های قارچی واژن در ۹۵-۸۵ درصد موارد در اثر کاندیدا آلبیکنس به وجود می‌آیند. کاندیدا آلبیکنس را می‌توان از واژن ۲۰ درصد زنان بدون علامت جدا کرد. واژینیت عود کننده در تعدادی از زنان که قبلاً تحت درمان قرار گرفته‌اند، دیده می‌شود (۱). اندازه‌گیری فعالیت ضد قارچی داروها در آزمایشگاه با استفاده از آزمون‌های حساسیت دارویی برای انتخاب داروی مناسب جهت درمان ایده‌آل بیماران مبتلا به عفونت‌های مزمن و سیستمیک

* **نویسنده مسئول: مهربان فلاحتی**، گروه قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱۸۸۶۲۲۶۵۳
Email:mehrabanfalahati@yahoo.com

ضروری است (۱). بر آورد شده است که ۷۵ درصد از زنان، حداقل یک‌بار در طول عمر خود دچار ولوواژینیت کاندیدیایی می‌شوند و ۵ درصد از زنان مبتلا به این عفونت نیز به شکل مزمن یا عود کننده‌ی واژینیت مبتلا می‌شوند (۲). اخیرا مشخص شده که شیوع گونه‌های غیر آلبیکنس عامل واژینیت مزمن و عود کننده، رو به افزایش است که علت آن را استفاده وسیع الطیف و طولانی مدت داروهای ضد قارچی و آزول‌ها می‌دانند. با در نظر گرفتن عوامل فوق و این نکته که اکثر زنان جوان، یک‌بار در طول زندگی خود با این بیماری مواجه می‌شوند و برای درمان به صورت خودسرانه از داروهای ضد قارچی استفاده می‌کنند و باعث ایجاد بسیاری از مقاومت‌ها نسبت به داروهای ضدقارچی می‌شوند، در این پژوهش، کنش داروهای ضدقارچی متداول به تنهایی و در همبست با آمفوتریسین ب بر روی استرین‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از زنان مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی مزمن، مورد ارزیابی قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک مطالعه تجربی بود و کلیه مراحل کار براساس دستور کار کمیته استاندارد بین‌المللی برای مخمرها (CLSIM27-A2) ارزیابی شد (۳). با رعایت نکات اخلاقی و کسب رضایت از بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی مزمن، نمونه‌ای از ناحیه واژن آن‌ها توسط پزشک متخصص زنان تهیه شد و پس از ارسال سریع نمونه‌ها به آزمایشگاه با استفاده از روش‌های استاندارد معمول قارچ شناسی پزشکی ۱۹ استرین کاندیدا آلبیکنس از این نمونه‌ها جدا و تا روز آزمایش نگهداری شد. ازسویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس ATCC 1023 در مراحل اولیه برای استانداردسازی و پایه‌ریزی مراحل انجام کار نیز استفاده شد.

داروهای به کار رفته در این پژوهش، شامل: کلوتریمازول (CLT/1012/0076B) و مایکونازول (MCN110811-C) اهدایی از شرکت بهوزان و فلوکونازول (070209/90) اهدایی شرکت تهران دارو و آمپول آمفوتریسین ب تهیه شده از شرکت روز دارو بودند.

غلظت پایه مناسب داروهای کلوتریمازول، مایکونازول، فلوکونازول و آمفوتریسین ب با استفاده از dimethyl sulfoxide (DMSO) شرکت مرک (Merck) آلمان به عنوان حلال تهیه شد.

تهیه محیط‌های کشت:

الف) تهیه محیط کشت مایع: برای تهیه محیط کشت مایع (سابورو براث)، کلیه مراحل طبق دستور کارخانه سازنده انجام شد (۴ و ۶).

ب) تهیه محیط کشت جامد: بر طبق دستور کارخانه سازنده، تهیه و نگهداری شد (۴).

آزمون حساسیت دارویی:

کشت نمونه قارچی: گونه‌های کاندیدیایی شناسایی شده روی محیط سابورو دکستروز آگار، کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. پس از رشد، از کلنی قارچی یاد شده برای تهیه سوسپانسیون مخمری استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون مخمری: برای تهیه سوسپانسیون کاندیدیایی با غلظت ۱×۱۰^{۳} سلول بر میلی‌لیتر، از کشت ۲۴ ساعته بالا به کمک یک لوپ یک کلنی به یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه و سوسپانسیون گردید. با کاربری دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر و تغییر دادن انبوه سلولی و تنظیم نور عبوری ۹۰٪(T=90%) که معادل در بردارندگی ۱×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر بود، سوسپانسیون سلولی مناسب به دست آمد. سپس این محلول ۱۰۰۰ مرتبه رقیق شد. در یک لوله محتوی ۵ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل، ۵ میکرولیتر از آن خارج شد و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری ۱×۱۰^{۶} سلول را به آن افزوده شد. سوسپانسیون به دست آمده حاوی ۱×۱۰^{۳} سلول بود (۶ و ۷).

تهیه محلول دارویی: مقدار ۰/۰۱۲۸ گرم از هر کدام از داروهای (فلوکونازول، کلوتریمازول، مایکونازول و آمفوتریسین ب) با کمک ترازوی حساس، وزن و به آن ۱۰ میلی‌لیتر DMSO افزوده شد؛ به این ترتیب محلول دارویی با انباشتگی ۱۲۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد و پس از نیم ساعت، در شرایط آزمایشگاه از صافی میلی‌پور با منافذ به قطر ۰/۲۲ میکرومتر گذرانیده و سترون شد (۵ و ۶).

انجام مراحل آزمایش: برای انجام آزمایش و تعیین MIC (کمترین انباشتگی بازدارنده دارو)، ۱ میلی‌لیتر از محلول اندوخته (Stock) هر یک از داروهای مورد آزمایش با ۹ میلی‌لیتر از محیط

کشت مایع (سابورو براث) سترون رقیق شد و غلظت نهایی ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. سپس این محلول با محیط سابورو براث که قبلاً تهیه شده بود، به ترتیب در ۷ لوله دیگر رقیق شد تا یک غلظت پشت سر هم از ۱۲۸ تا ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آید. با استفاده از میکرو پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای U شکل سترون شده دردار، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های پشت سر هم هر یک از داروهای(کلوتریمازول،مایکونازول،فلوکونازول) در ۸ ردیف افقی در چاهک‌ها ریخته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از داروی آمفوتریسین ب نیز در ۸ ردیف عمودی در چاهک‌ها با آن‌ها مجاورشد (بدین ترتیب غلظت داروی مورد نظر ما در اولین ردیف افقی، ۶۴ و در هشتمین ردیف افقی ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و رقت داروی آمفوتریسین ب در اولین و هشتمین ردیف عمودی به ترتیب ۴ و ۰/۰۱۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود). سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از داروهای فوق در رقت‌های پشت سر هم تهیه شده به تنهایی، در ۹ چاهک دیگر ریخته شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی به تمام چاهک‌ها (غیر از یک چاهک که در آن فقط محیط سابورو براث ریخته شده و به عنوان کنترل منفی و در چاهک دیگر محیط سابورو همراه با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی ریخته شده بود و به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده بود) افزوده شد. در میکروپلیت بسته شد و به مدت ۵-۳ دقیقه روی شیکر مخلوط گردید و سپس داخل انکوباتور ۳۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد و پس از ۴۸ ساعت مورد بازبینی قرار گرفت. این روند برای هر مورد ۳ بار تکرار و میانگین آن به عنوان MIC در نظر گرفته شد. سپس FIC این دارو طبق فرمول محاسبه و نتایج این گونه تفسیر شد. اگر۰/۵≥ FIC = سینرژیسم،۱<FIC< ۰/۵=سینرژیسم نسبی، FIC=1=اثر افزایشی ،۴<FIC<۱=بی اثر، ۴ <FIC=آنتاگونیسم (۳، ۶ و ۷).

$$FIC = \frac{MIC \text{ داروی اول در ترکیب}}{MIC \text{ داروی اول به تنهایی}} + \frac{MIC \text{ داروی دوم در ترکیب}}{MIC \text{ داروی دوم به تنهایی}}$$

نتایج

نتایج ما نشان داد که میانگین MIC کلوتریمازول بر روی گونه های کاندیدا آلبیکنس بعد از ۴۸ ساعت، ۷/۰۵ میکروگرم در میلی لیتر با محدوده ۳۲-۱ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد که این عدد بعد از ۷۲ ساعت به ۱۹/۸۹ میکروگرم در میلی‌لیتر با محدوده ۶۴-۲ رسید. در مورد داروی مایکونازول، بعد از ۴۸ ساعت، میانگین MIC=۱۰/۷ و محدوده آن ۱۶-۱ بود که بعد از ۷۲ ساعت به میانگین ۱۷/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر با محدوده ۳۲-۲ رسید. فلوکونازول، دارای میانگین MIC =۲۱/۴۷ میکروگرم در میلی‌لیتر و محدوده ۱۲۸-۱ در ۴۸ ساعت بود که بعد از گذشت ۷۲ ساعت به میانگین ۵۰/۲۵ با محدوده۲-۰/۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رسید. میانگین MIC آمفوتریسین ب در ۴۸ ساعته ۰/۶۴میکروگرم در میلی‌لیتر و محدوده ۲-میکروگرم در میلی‌لیتر بود که بعد از ۷۲ ساعت به میانگین ۰/۹۷MIC میکروگرم در میلی‌لیتر با محدوده ۴-۰/۰۶۲۵ رسید. در بررسی ما از بین داروهای فوق، میانگین MIC فلوکونازول بعد از ۴۸ ساعت ۲۱/۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و میانگین MICآمفوتریسین ب بعد از ۴۸ ساعت ۰/۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

در آزمون اثر قارچ‌کشی داروها بر روی استرین‌های کاندیدیایی، میانگین MFC کلوتریمازول ۲۴/۷ میکروگرم برمیلی‌لیتر و میانگین MFC مایکونازول ۲۰/۸۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MFC فلوکونازول۵۷/۴۷ میکروگرم برمیلی لیتر و آمفوتریسین ب ۱/۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر حاصل شد.

در نهایت، با بررسی میزان FIC حاصل از ترکیب داروهای فوق میانگین FIC ترکیب کلوتریمازول و آمفوتریسین ب ۱/۱۷ و FIC مایکونازول و آمفوتریسین ب ۱/۲۶ و FIC فلوکونازول و آمفوتریسین ب ۱/۰۱ بدست آمد و مشخص شد که همبست فلوکونازول و آمفوتریسین ب، بیشترین اثر هم‌افزایی و همبست مایکونازول و آمفوتریسین ب،کمترین اثر هم‌افزایی را دارا می‌باشد.

شایان ذکر است که یافته‌های حاصل از این پژوهش با به کارگیری آزمون‌های آماری من-ویتنی، کای-دو، کروسکال والیس و زوجی توکی با ضریب معنی داری۰/۰۵ >p. value واکاوی شد.

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش، ۷۸٪ از استرین‌ها به کلوتریمازول حساس و ۲۱٪ مقاوم بودند. در مطالعه‌ای مشابه توسط فلاحتی و شریفی نیا در سال ۱۳۸۶، ۵۶٪ از استرین‌ها به این دارو حساس و ۳۰٪ حساسیت وابسته به دوز و ۱۵٪ نیز مقاوم گزارش شده بود که با نتایج ما همخوانی دارد (۱۲). در بررسی نصرالهی در سال ۱۳۹۰

در تنکابن، مانند نتایج مطالعه ما، ۷۰٪ استرین‌ها به کلوتریمازول حساس و ۳۰٪ مقاوم بودند (۱۴). اما در پژوهش نوذری در سال ۱۳۹۰ بر خلاف نتایج حاصل از مطالعه حاضر، تمام استرین‌های کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی به کلوتریمازول مقاوم بودند که علت این عدم همخوانی می‌تواند استفاده مکرر از سوش‌ها باشد (۱۳). درپژوهش ما ۵۲٪ از استرین‌ها به مایکونازول حساس و ۴۷٪ حساسیت وابسته به دوز داشتند و هیچ مقاومتی نسبت به این دارو گزارش نشد. در پژوهش محمودی راد در سال ۱۳۸۸ بر روی استرین‌های کاندیدیایی نیز هیچ مقاومتی نسبت به مایکونازول گزارش نشده است (۱۵).

در بررسی اثر فلوکونازول، ۴۲٪ از استرین‌ها به فلوکونازول حساس و ۴۲٪ مقاوم و ۱۶٪ حساسیت وابسته به دوز داشتند. مانند مطالعه حاضر، در سال ۱۳۸۴ رحیم زاده و رحیمی نیز میزان حساسیت استرین‌های جدا شده از مبتلایان به واژینیت کاندیدیایی در برابر فلوکونازول را ۴۶٪ گزارش کردند (۱۶).

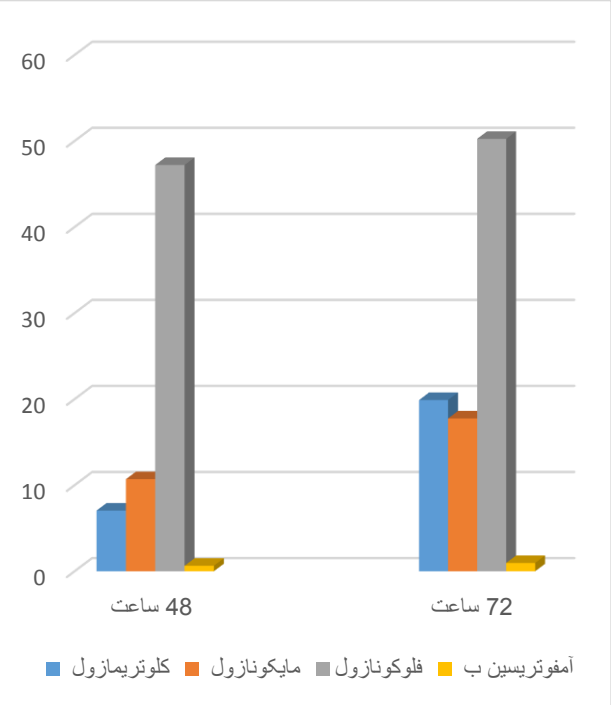
۶۸ درصد سویه‌های کاندیدای مورد مطالعه ما به داروی آمفوتریسین ب حساسیت داشتند و ۳۲٪ مقاوم بودند اما بر خلاف نتایج مطالعه ما، ۱۰۰ درصد استرین‌های مورد مطالعه در پژوهش علی نژاد در سال ۱۳۹۰ به آمفوتریسین ب حساس بودند که می تواند نشانه‌ای از ظهور مقاومت باشد؛ هر چند لازم است در مطالعات بعدی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد (۱۷).

همچنین با استناد به یافته‌های نتایج این پژوهش، میانگین MICکلوتریمازول بر روی گونه‌های کاندیدا آلبیکنس بعد از ۴۸ ساعت ۷/۰۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و بعد از ۷۲ ساعت ۱۹/۸۹میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد. در حالی که در مطالعه‌ای که توسط فلاحتی و همکاران در سال ۱۳۸۴ انجام شد، میانگین MIC کلوتریمازول روی استرین‌های کاندیدا آلبیکنس ۲/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۱۲) و این افزایش MIC در تحقیق ما نیز می‌تواند زنگ خطر از کاهش حساسیت باشد.

در مورد مایکونازول بعد از ۴۸ ساعت، میانگین MIC=۱۰/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود اما بعد از ۷۲ ساعت این عدد به ۱۷./۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش یافت. مانند مطالعه ما در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه ایران، میانگین MIC مایکونازول ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (۱۲).

فلوکونازول دارای میانگین MIC=۲۱/۴۷ میکروگرم در میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت بود که بعد از گذشت ۷۲ ساعت به میانگین ۵۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رسید. در سال ۱۳۹۰ طبق تحقیقات نوذری و فلاحتی که برای اولین بار روش ترکیب داروها را با یکدیگر انجام دادند، محدوده MIC فلوکونازول ۱۲۸-۴ گزارش شد (۱۳) که با نتایج ما نیز همخوانی دارد.

میانگینMIC آمفوتریسین ب بعد از ۴۸ ساعته ۰/۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و بعد از ۷۲ ساعت به میانگین MIC ۰/۹۷ میکروگرم در میلی‌لیتر رسید. این در حالی است که Hana این محدوده را ۲-۰/۲۵گزارش نموده بود (۹). این اختلاف می‌تواند به علت کاهش پایداری داروها باشد. در نمودار (۱) مقایسه MIC داروها بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت صورت گرفته است.



نمودار ۱: مقایسه بین MIC داروهای متداول بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت

مقایسه اثر قارچکشی داروها: از طرفی در اندازه‌گیری میزان اثر قارچکشی داروها (MFC) بعد از ۷۲ ساعت، دیده شد که اثر قارچکشی کلوتریمازول MFC=۲۴/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر، مایکونازول MFC=۲۰/۸۹ میکروگرم در میلی‌لیتر، فلوکونازول MFC=۵۴/۴۷ میکروگرم در میلی‌لیتر، آمفوتریسین

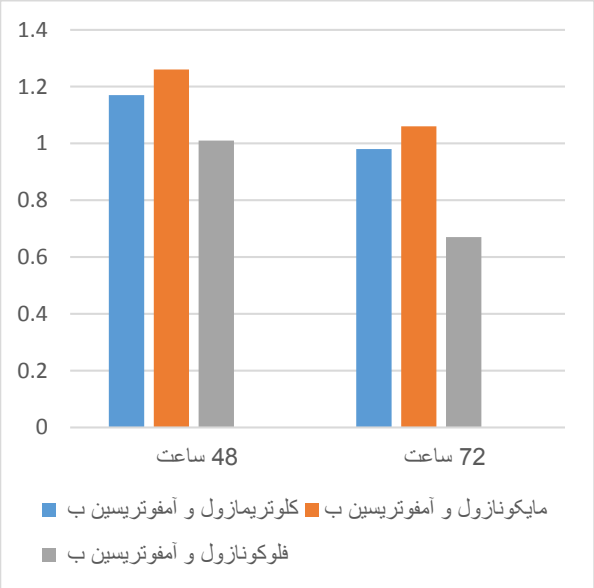
ب MFC=۱/۱۸ میکروگروم در میلی‌لیتر می‌باشد. البته طی تحقیقاتی که در دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۰ صورت پذیرفته، MFC کلوتریمازول و فلوکونازول به ترتیب ۱۷۷و ۱۵۴ گزارش شده است. البته Hana و همکاران محدوده MFC مایکونازول را ۱۶-۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش نموده‌اند و Carolina محدوده MFC برای آمفوتریسین ب را ۲-۰/۶۲۵ گزارش نموده است. بنابراین به راحتی قابل درک است که آمفوتریسین ب در غلظت پایین‌تری اثر قارچ‌کشی خود را اعمال می‌نماید و فلوکونازول در غلظت بالاتری این خاصیت را دارا می‌باشد.

در بررسی FIC ترکیبات دارویی همبست به کار رفته در این پژوهش، نتایج FIC ۷۲ ساعته این ترکیبات چنین بود:

FIC کلوتریمازول+آمفوتریسین ب= ۰/۹۸

FIC مایکونازول+آمفوتریسین ب = ۱/۰۶

FIC فلوکونازول+آمفوتریسین ب= ۰/۶۷



نمودار ۲: مقایسه FIC ترکیبات داروهای متداول بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت

در بررسی نتایج MIC50 و MIC90 داروهای متداول، محدوده MIC50 برای کلوتریمازول ۲-۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MIC90 آن ۳۲-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

MIC5 داروی مایکونازول ۲-۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و محدوده MIC90 آن ۱۶-۱تعیین شد. در مورد فلوکونازول محدوده MIC50 آن ۱۶-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و محدوده MIC90آن ۱۲۸-۱ مشخص شد. محدوده MIC50 داروی آمفوتریسین ب ۰/۵- ۰/۰۱۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MIC 90 آن ۱-۰/۰۶۲۵ بدست آمد.

از بررسی MIC50 و MIC90 داروهای مورد مطالعه در این مطالعه دریافت می‌شود که در این بین آمفوتریسین ب اثر مطلوبی داشته است و فلوکونازول، همچون نتایج سایر محققین، اثر کمتری داشته است. کلوتریمازول نیز همچون سایر تحقیقات انجام شده اثر مطلوبی را نشان داده است اما نسبت به آمفوتریسین ب در جایگاه دوم قرار دارد. اختلافی که در نتایج ما نسبت به نتایج سایر محققین به چشم می‌خورد، احتمالا به واسطه تفاوت در محل ضایعه، مزمن بودن بیماری، درمان‌های ناموفق قبلی، تفاوت سیستم ایمنی میزبان و روش‌های مختلف انجام تست می‌باشد.

در بررسی نهایی میزان MIC داروها همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، آمفوتریسین ب کمترین MIC (۰/۶µ/ml) و فلوکونازول بیشترین MIC (۴۷µ/ml) را دارد. مطالعات Carolina و همکاران نشان داد که محدوده MIC فلوکونازول بر روی استرین‌های کاندیدا آلبیکنس ۶۴-۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (۸). Hana محدوده MIC آمفوتریسین ب را ۲-۰/۲۵ گزارش نموده است (۹). همچنین بر اساس نتایج مطالعاتی انجام گرفته در دانشگاه ایلام، MIC داروی کلوتریمازول روی استرین‌های کاندیدا آلبیکنس ۱۶-۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (۱۰). Wachler و همکاران در سال ۲۰۱۱ پس از مطالعه‌ای در بیمارستان آلمان نشان دادند که کلوتریمازول جزء مهمترین داروهای ضد قارچی بر علیه عفونت‌های مخاطی ناشی از کاندیدا آلبیکنس می‌باشد (۱۱).

در مقایسه اثر دوتایی داروها بر اساس آزمون توکی مشخص شد که داروهای متداول بعد از گذشت ۴۸ ساعت با یکدیگر اختلاف معناداری دارند اما این اختلاف در اثر ضد قارچی دو داروی کلوتریمازول و مایکونازول وجود ندارد.

در بررسی میزان FIC ترکیبات دارویی این تحقیق مشخص شد که فلوکونازول و آمفوتریسین ب با میانگین FIC=۰/۶ دارای

اثر هم‌افزایی نسبی و کلوتریمازول و آمفوتریسین ب با میانگین FIC =۰/۹ باز دارای اثر هم‌افزایی نسبی و مایکونازول و آمفوتریسین ب با میانگین FIC=1 دارای اثر افزایشی می‌باشند.

با استفاده از آزمون کای –دو مشخص شد که ترکیب دارویی مایکونازول و آمفوتریسین ب، در مقایسه با بقیه ضعیف‌تر عمل می‌کند، به این معنی که فقط بر روی ۱۰/۵ درصد از استرین‌ها دارای اثر افزایشی است و روی ۲۱/۰۵ درصد از استرین‌ها دارای اثر هم‌افزایی نسبی است.

در ادامه در بررسی مقایسه‌ای دوتایی داروهای همبست با آزمون توکی مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین ترکیب مایکونازول و آمفوتریسین ب و فلوکونازول و آمفوتریسین ب وجود دارد اما بعد از گذشت ۷۲ ساعت مشاهده شد که این اختلاف فقط بین دو ترکیب دارویی کلوتریمازول و آمفوتریسین ب و فلوکونازول و آمفوتریسین ب وجود دارد.

همچنین در بررسی نتایج MFC داروها مشخص شد که آمفوتریسین ب با میانگین MFC =۱/۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر قارچ‌کشی و فلوکونازول ب MFC=۵۷/۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمترین اثر قارچ‌کشی را روی استرین‌ها داشته است. البته Carolina و همکاران محدوده MFC فلوکونازول را ۲۵۶-۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش نمودند (۸). اما Hanaدر مطالعه خود این محدوده را ۱۶-۸ گزارش داد (۹). Carolina محدوده MFC برای آمفوتریسین ب را ۲-۰/۰۶۲۵ گزارش داده است (۸). در نهایت، از بین داروهای متداول قارچ‌شناسی استفاده شده دراین تحقیق (کلوتریمازول، مایکونازول، فلوکونازول و آمفوتریسین ب)، آمفوتریسین ب نسبت به بقیه اثر بهتری روی استرین‌های کاندیدا آلبیکنس داشت و با MIC کمتری قادر به جلوگیری از رشد قارچ‌ها بود و فلوکونازول همچون نتایج سایر محققین دارای کمترین اثر بر روی استرین‌های کاندیدا آلبیکنس بود که اکثر استرین‌ها نسبت به آن مقاومت حاصل کرده‌اند.

همچنین در بررسی نهایی نتایج حاصل از ترکیب داروهای این تحقیق با یکدیگر مشخص شد که همبست کردن آزول‌های متداول، که امروزه از آن‌ها در درمان بیماری‌های قارچی استفاده می‌شود، با آمفوتریسین ب که دارویی از گروه پلی‌ان‌ها می‌باشد، قادر است با کاهش MIC آزول‌ها اثر ضد قارچی آن‌ها را افزایش دهد. در این راستا، افزایش اثر ضدقارچی فلوکونازول که امروزه اکثر استرین‌های قارچی نسبت به آن مقاومت حاصل کرده‌اند، قابل ارزش می‌باشد. با استناد به نتایج این تحقیق، MIC فلوکونازول در مجاورت آمفوتریسن ب کاهش پیدا کرده و ترکیب فلوکونازول+آمفوتریسین ب دارای اثر سینرژیسمی می‌باشد. البته این اثر را در ترکیب کلوتریمازول و آمفوتریسین ب هم مشاهده گردید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران در قالب پایان نامه دانشجویی اجرا شده است. نویسندگان این مقاله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و کارکنان آن معاونت تشکر دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Ferrer. J.Vaginal candidiasis: Epidemiological and etiological factors, International journal of gynecology of and obstrics.2000; 71(1):21-27.
2. Larry S,Skokos C,An evaluation of butoconazole nitrate 2site release vaginal cream (gynazole-1)compared to fluconazole 150 mg tablets (diflucan)in the time to relief of systems inpatients with vulvovaginal candidiasis ,Iraviav journal of clinical infections disease.2007;2(1):17-22.
3. Refrence method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast fungi, Approved standard second edition (formarly NCCLS m27 A2) 16,2008.
4. Zaini F, Mahbod A, Emami M.Medical mycology.3th edition.Tehran: Tehran university publications; 2009. [In Persian]
5. Barchiesi F,Colombo AL, Mcgough D A. Comparative study of broth macrodilutionand microdilution techniques for Invitro antifungal susceptibility testing ofyeast by

using the nationalcommittee for laboratory standards,proposed standards.Journal of clinical Microbiology. 1994;32(10):2494-2500.
6. Warnok WD, Evans EGN FGN, Richardson MD. Method with antifungal drugs, Medical mycology practical approach. New York: oxford university press; 1989,p. 235-259.
7. Khodavandi A, Alizadeh F.Invitro Investigation of antifungal activity of allicin Alone and in combination with Azole against candida species.Mycopathologia. 2010;169(17):287-295. [Article in Persian]
8. Carolina Pereira S,Josep MTR, EidiAlvarado–R, Francisca MG, Maribel D, Mereedes P and vera R. MIC and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in sporothrix schenckii. J Med Microbiol.2009;58(12):1607-1610.
9. Hanan M, AL-Abeid khaled H, Abo–Elteen A E, Mawieh AH. Isolation and characterization of candida spp. In Jordania cancer patients: preralance, pathogenic Determinants, and Antifungal sensitivity. JPN JInfect.2004; 57(6):279-284.
10. Zarfar H,Yadegari M, Etminan S, Katiraee F. Coparition of ketoconazol, clotrimazol,fluconazol against 11of candida albicans isolates in invitro.Ilam University Medical Journal.2007;15(1): 1-8. [Article in Persian]
11. WachtlerB, WilsonD, HubeB.Candidaalbicance adhesion to and invasionmand damage to epithelial cells.Department of microbial pathogenicitymechanism .plos one journal.2011;6(2):17-46.
12. Falahati M, SharifiniaSA, ForoumadiR, Bolouri F, AkhlaghL, Yazdan Parast A, Haghani H.Drug resistance patternin candidaspeciesisolatedfrom vaginitis.Razi Journal of medicalsciences.2009; 16(65):40-45.[Article in persian].
13. Nozari sh, FalahatiM, Haidarikohan F, AshrafikhozaniM, Ahmadi F, Ghasemi Z, et al.Comparition of antifungal effect of fluconazolealone and in combination with nanosilver particles against candida species isolated from chronic candidal vulvovaginitis. Razi Journal of medical sciences.2012;18(93):26-33.[Article Persian]
14. Nasrollahi omran, Vakilli L, Jafarpoor M.The determination of vaginal candidiasis in woman referred to shahid Rajaeihospital in Tonekabon (2009-2010).Journal of medicalscience of tonecabon university, 2012;5(1): p:1-7. [Article in Persian].
15. Mahmoodi rad M, Zafar ghandi A,Shivaee M,Mahmoodirad N, Abasabadi B,Zabihi M, et al. Antifungal susceptibility testing of vaginal candida isolates:the broth microdilution method.Tehran University Medical Journal.2010;67(11):793-798. [Article in Persian]
16. Rahimzade A, Rahimi A. Comparition effect of systemic treatment and topical treatment on vaginal candidiasis.Hormozgan University Medical Journal.2006;9(2):143-148. [Article in Persian]
17. Alinejad M, Nasrollahi omran A, Hashemi SJ.Drugresistance ofcandidaspecies isolatedfromfungal peritonitisby PCR-RFLP Method.Babol university medical Journal.2012;114(1):53-62. [Article in Persian].

Original Article

A Effects of Several Common Antifungal Drugs (Clotrimazole, Miconazole, Fluconazole) alone and in Combination with Amphotericin B on Candida Species Isolated from Chronic Candidal Vulvovaginitis

Shojaei ES[1], Falahati M[1*] ,Zaini F[1], Kord Bache P[1], Rahimi Moghadam P[2], Aghamirian MR[3], Nozari SH[4], Makhdoomi A[5], Ameri S[1], Afshar Moghadam S[1]

1- Department of Parasitology and Mycology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Pharmacology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Department of Parasitology and Mycology, Qazvin University of Medical Sciences.
4- Department of Parasitology and Mycology, Bandar Abbas University of Medical sciences.
5- Department of Parasitology and Mycology, Qazvin University of Medical Sciences.

Received: 20 Sep 2013 Accepted: 29 Jul 2014

Abstract

Background & Objective: Candidal vulvovaginitis occurs in female genital by the over growth of candida especially candida albicans. This infection may be resistant to therapy and occasionally becomes chronic. In some patients, this form of infection is recurrent. Moreover, discovering new antifungal drugs and the use of these drugs in new methods encourage mycologists to use these techniques. Therefore, according to the above methods, this research investigated effects of several common antifungal drugs with the use of combination methods against candida species isolated from chronic candidal vulvovaginitis.

Materials & Methods: This study carried out on 19 strains of candida albicans that were isolated from recurrent vulvovaginitis. The effects of clotrimazole, miconazole, fluconazole were assessed separately and in combination with amphotericin B on candida albicans using micro dilution methods.

Results: The mean Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of clotrimazole, miconazole, fluconazole, and amphotericin B were 7.05, 10.7,47, and 0.6 µgr/ml, respectively after 48 hours incubating. Then, the azole antifungal drugs were evaluated in combination with amphotericin B. The two combinations of fluconazole + amphotericin and miconazole + amphotericin with the Fungicidal Inhibitory Concentrations (FIC) of 0.6 and 1, respectively, attracted the most attentions. In addition, comparing the antifungal effects, the most effective drug was amphotericin B with the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of 1.18.

Conclusion: In this study, amphotericin B with the least MIC had the best antifungal effect. The most and the least synergic effects of combination therapy were for fluconazole + amphotericin B and Miconazole + amphotericin B, respectively.

Keywords: **Chronic candidal vulvovaginitis, Drugs combination, Synergism, Micro dilution broth, Clotrimazole, Miconazole, Fluconazole, Amphotericin B**

[*]**Corresponding author: Mehraban Falahati,** Department of Parasitology and Mycology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Tel: +982188622653
Email: mehrabanfalahati@yahoo.com