پاسخ کچلی سر به داروهای ضد قارچی در یک مدل In vitro

مسعود امامی[۱]، مینا ثابت قدم*[۲]، پروانه عدیمی[۳]

۱. قارچ شناس، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی ، انستیتو پاستور ایران
۳. PhD قارچ شناسی،مدیر گروه انگل شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران،خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش تحقیقات و مرکز رفرانس هاری- تلفن: ۲۰-۶۶۹۵۳۳۱۱ - ۰۹۱۲۶۱۵۳۲۵۸
mina59s@yahoo.com
دریافت مقاله: آبان هشتاد و شش **پذیرش برای چاپ: بهمن هشتاد و شش**

چکیده

سابقه و هدف: *کچلی سر (Tinea capitis) یکی از انواع درماتوفیتوزیس است که می تواند پوست و موی سر، ابروها و مژه ها را آلوده کند و در صورت عدم درمان مناسب به یک بیماری مزمن تبدیل شود. هدف از این پژوهش تعیین میزان مقاومت داروئی قارچ های ایجاد کنندهٔ کچلی سر، بررسی پاسخ داروهای ضد قارچی در یک مدل invitro از عفونت کچلی سر و پیشگیری از هزینه های درمانی اضافی بوده است.*

روش کار: *در این بررسی حساسیت ۸ سویه متعلق به ۵ گونهٔ درماتوفیت نسبت به ۴ داروی ضد قارچی تربینافین، گریزئوفولوین، فلوکونازول و کتوکونازول توسط روش Broth macrodilution مورد بررسی قرار گرفت. حساسیت این سویه ها در ابتد بدون حضور خرده موی کودکان و در مرحله دوم با حضور خرده موی کودکان نسبت به داروهای ضد قارچی مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته ها: *در مرحلهٔ اول تربینافین موثرترین دارو بر علیه اکثر سویه ها بود. داروی فلوکونازول کمترین تأثیر را روی سویه ها داشت. Trichophyton rubrum و Trichophyton mentagerophytes بیشترین MICو Trichophyton schoenlinie کمترین MIC را نسبت به داروی کتوکونازول نشان دادند. بیشترین و کمترین MIC نسبت به گریزئوفولوین به ترتیب مربوط به Microsporum gypseum و Trichophyton schoenlinie بود. در مرحلهٔ دوم در حضور خرده های مو MIC اکثر سویه ها نسبت به داروهای مورد مطالعه افزایش یافت. آنالیز آماری داده ها تفاوت معنی داری (P= ۰/۰۰۰۱) را بین MIC داروها در مرحله اول و مرحله دوم نشان داد.*

نتیجه گیری: *مطالعه حاضر تأثیر بیشتر تربینافین را نسبت به اکثر سویه ها نشان داد، با وجود این به دلایل مختلف از جمله تحمل پذیری بیمار، هزینه، ... گریزئوفولوین به عنوان داروی انتخابی درمان کچلی سر می باشد. در این تحقیق از خرده های مو جهت ایجاد شرایط مشابه in vivo استفاده شد و مشاهده گردید که این حالت باعث افزایش معنی دار MIC قارچها و مقاومت بیشتر آنها نسبت به داروها می شود . این امر کمک می کند تا انتخاب دارو با گزینه های درمانی مناسب تر صورت گیرد.*

واژگان کلیدی: ***کچلی سر، درماتوفیتوزیس، درماتوفیت، داروهای ضد قارچی، MIC***

مقدمه

درماتوفیتوزیس یا عفونت های جلدی قارچی در انسان گستره وسیعی از بیماری ها را شامل می شود که پوست و ضمائم آن مثل مو و ناخن را در بر می گیرد. کچلی سر (tinea capitis) یکی از شایع ترین عفونت های درماتوفیتی در انسان است که پوست و موی سر ، ابروها و مژه ها را گرفتار می کند(۱) .گونه های Microsporum وTrichophyton در اتیولوژی کچلی سر نقش دارند . افراد معمولا در محدوده سنی ۷-۳ سال دچار این بیماری می گردند. کچلی سر در بزرگسالان غیر معمول می باشد . این عفونت در پسرها ۵ برابر بیشتر از دخترهاست، هر چند بعد از بلوغ این حالت برعکس می شود(۲).

عوامل خطر کچلی سر در بزرگسالان شامل مواردی مثل دیابت، کم خونی، نقص سیستم ایمنی، تغییرات هورمونی (مثل یائسگی)، کورتیکواستروئیدها و درجهٔ قرار گرفتن در معرض عوامل بیماری زا می باشد(۳). با توجه به مکان شکل گیری آرتروکنیدی قارچ ها سه فرم بالینی کچلی سر شامل انواع اکتوتریکس، اندوتریکس و فاووس مشاهده می شود(۴).

برای درمان کچلی سر از دو روش درمان موضعی و سیستمیک استفاده می شود. اغلب برای درمان کچلی سر روش سیستمیک لازم است. حداقل دوره درمان ها ۶ هفته است اما در مواردی ممکن است درمان تا چند ماه ادامه یابد(۵).

معمولا علت اصلی شکست های درمانی عدم تحمل بیمار است. در درمان کچلی سر داروهای مختلف از جمله گریزئوفولوین، تربینافین، ایتراکونازول، کتوکونازول و فلوکونازول به کار می رود. اخیرا موارد مقاوم به درمان نیز گزارش شده است(۶). بنابراین ارائه تکنیک جدید نزدیک به مدل in vitro جهت آنتی بیوگرام عناصر قارچی ایجاد کننده عفونت کچلی سر در کوتاه کردن مدت درمان می تواند موثر باشد. ارزیابی اثر ضد قارچی داروها با ابداع تست هایی که شرایط بدن میزبان را برای قارچ بازسازی می کنند، مثلا استفاده از خرده های مو در شرائط آزمایشگاهی، به کاربردی بودن نتایج این آزمون در استفاده بالینی آن کمک می کند.

هدف از این پژوهش تعیین میزان مقاومت داروئی قارچ های ایجاد کننده کچلی سر، ارائهٔ روش جدید برای آنتی بیوگرام قارچ های ایجاد کننده این بیماری ، بررسی پاسخ داروهای ضد قارچی در یک مدل in vitro از عفونت کچلی سر و کاربرد آنتی بیوگرام قارچ ها همانند باکتری ها و پیشگیری از هزینه های درمانی اضافی بوده است.

روش کار

در این مطالعه اثر ضد قارچی ۴ داروی فلوکونازول (پارس دارو)، کتوکونازول (روز دارو)، تربینافین (بهوزان) و گریزئوفولوین (دارو پخش) روی عوامل قارچی درماتوفیتی تهیه شده از بخش قارچ شناسی دانشکدهٔ بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد بررسی قرار گرفت.

قارچ های درماتوفیت تهیه شده شامل Trichophyton rubrum ، Trichophyton mentagerophytes ، Trichophyton schoenlinie ، Microsporum gypseum و Microsporum canis بود. محیط سابرو دکستروز آگار(s) ، PDA (Potato dextrose agar) ، سابرو دکستروز آگار به همراه کلرامفنیکل (sc) و RPMI 1640 به همراه بافرMOPS جهت کشت مورد استفاده قرار گرفتند. در این بررسی از کشت های ۱۵-۷ روزه قارچ بر روی محیط PDA استفاده شد.

سوسپانسیون قارچی طبق روش پیشنهادی NCCLS تهیه گردید(۷)، به طوریکه در طول موج ۵۳۰ نانومتر ترانس میتنس ۹۵ ٪ را نشان بدهد. سوسپانسیون تهیه شده را به مدت ۱۵ ثانیه در شیکر قرار داده تا کاملا مخلوط شوند. سپس در لوله استریل ml ۰/۱ از سوسپانسیون قارچی و ml ۴/۹ از محیط RPMI 1640 اضافه شد.

MIC سویه ها نسبت به داروهای ذکر شده به روش Broth macrodilutionطبق پروتکل NCCLS در دو مرحله تعیین گردید(۷). در مرحلهٔ اول MIC سویه ها بدون حضور خرده های موتعیین شد ، در مرحله دوم خرده های مو ابتدا با کلرفرم و اتانول تیمار شده و سپس اتوکلاو گردیدند. سپس mg ۱۰ از این خرده ها به ml ۰/۹ از سوسپانسیون قارچ و RPMI افزوده شده و سپس به مدت ۱۰ روز در دمای ^{o}c ۳۷ انکوبه شدند . سپس از سوسپانسیون حاوی خرده های مو جهت تعیین MIC در مرحله دوم استفاده گردید. در این آزمون از سه شاهد برای کنترل حلال ، دارو و رشد قارچ استفاده شد.در مرحله اول با گذشت ۴۸ ساعت به بعد می توان نتایج را مورد بررسی قرار داد. در مرحله دوم در طی ۴ هفته تغییرات هیف های قارچی به صورت میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت(۷و۸).

میزان رشد ارگانیسم ها با میزان رشد لوله کنترل سنجیده شد. OD لولهٔ کنترل رشد در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مشاهده و ثبت شد، لوله ای که کدورت آن نصف کدورت لوله کنترل باشد به عنوان لولهMIC در نظر گرفته شد. این متد توسط کمیته NCCLS ارائه شده است و روش انجام تست بر اساس پروتکل M38-A می باشد(۷و۹).

یافته ها

نتایج قابل تشخیص برای **Microsporum gypseum** ظرف ۲ روز و برای **Trichophyton rubrum** ، **Trichophyton mentagerophytes** و **Microsporum canis** ظرف ۷ تا ۱۰ روز و برای **Trichophyton schoenlinie** ظرف ۱۰ تا ۱۵ روز انکوباسیون در دمای ^{o}c ۳۷-۳۵ قابل مشاهده و بررسی بود.

نتایج حاصل از بررسی تاثیر آنتی بوتیک های ضد قارچی در حضور و عدم حضور خرده های مو برروی قارچهای مورد مطالعه نشان داد که در هر دو مرحله تربینافین موثرترین داروی ضد قارچی بر علیه سویه ها می باشد و فلوکونازول کمترین تاثیر را بر روی نمونه ها داشت(جدول ۱ و ۲).

جدول۱: MIC اولیه قارچ ها نسبت به ۴ داروی ضد قارچی

قارچ	آنتی بیوتیک MIC اولیه			
	گریزئوفولوین	تربینافین	فلوکونازول	کتوکونازول
Microsporum gypseum	۶۴	۸	۲۴	۱۶
Microsporum canis	۱۶	۸	۲۴	۸
Trichophyton rubrum 1	۳۲	۲	۴۸	۳۲
Trichophyton rubrum 2	۱۶	۴	۲۴	۱۶
Trichophyton rubrum 3	۳۲	۲	۴۸	۳۲
Trichophyton mentagerophytes1	۳۲	۱	۴	۳۲
Trichophyton mentagerophytes2	۸	۰/۱۲۵	۴۸	۱۶
Trichophyton schoenlinie	۰/۵	۴	۴۸	۰/۵

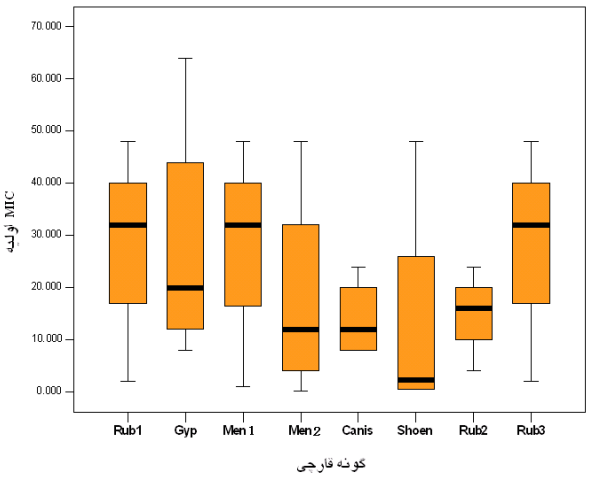
جدول۲: MIC ثانویه قارچ ها نسبت به ۴ داروی ضد قارچی

قارچ	آنتی بیوتیک MIC ثانویه			
	گریزئوفولوین	تربینافین	فلوکونازول	کتوکونازول
Microsporum gypseum	-	۳۲	۹۶	۳۲
Microsporum canis	۱۶	۸	۹۶	۱۶
Trichophyton rubrum 1	۳۲	۲	۹۶	۳۲
Trichophyton rubrum 2	۳۲	۸	۴۸	۱۶
Trichophyton rubrum 3	۳۲	۲	۹۶	۳۲
Trichophyton mentagerophytes1	۶۴	۴		۶۴
Trichophyton mentagerophytes2	۱۶	۰/۵	-	۱۶
Trichophyton schoenlinie	۲	۸	۹۶	۰/۵

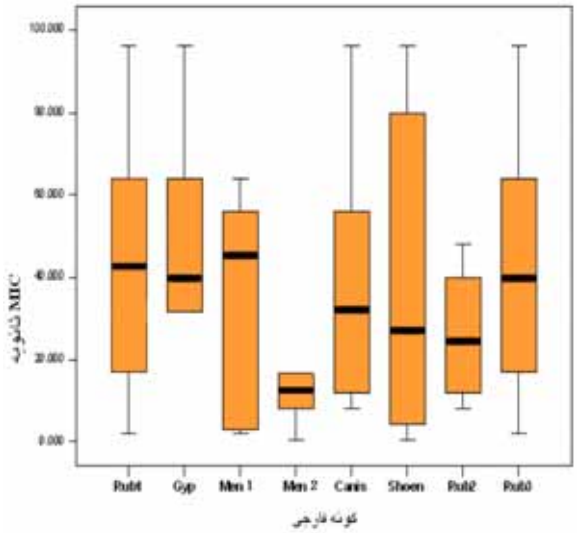
در مرحلـــه اول کمتـــرین MIC مربـــوط بـــه **Trichophyton mentagerophytes** نسبت بـه داروی تربینـافین (۰/۱۲۵ µg/ml) و بیشـترین MIC مربـوط بـه **Microsporum gypseum** نسـبت بـه داروی گریزئوفولوین بود (۶۴ µg/ml).

در مرحلـه دوم یعنـی بعـد از اضـافه کـردن خـرده هـای مـو نیـز قـارچ **Trichophyton mentagerophytes** حساس ترین قارچ نسبت به تربینافین بود، با این تفاوت که در این مرحله MIC آن نسبت به این دارو (۰/۵ µg/ml) بود، که این امر افزایش MIC را در حضور خرده های مـو نشان می دهد. در مرحله دوم بیشـترین MIC قارچهـا مربـوط بـه داروی فلوکونازول بود.

در مرحلـه اول **Microsporum gypseum** و **Microsporum canis** بیشترین MIC را نسبت به تربینافین نشـان دادنـد (۸ µg/ml). در مرحله دوم **Microsporum gypseum** MIC نسبت به این دارو بـه ۳۲ µg/ml افـزایش یافـت در حالیکـه MIC **Microsporum canis** همان ۸ µg/ml باقی ماند. بررسی سایر دارو های ضد قارچی نیز در حضور خرده های مو نتایج مشابهی را نشان داد ، یعنیMICاکثر سویه ها افزایش یافت. اختلاف معنی داری بین MIC سویه ها در مرحلـه اول و مرحله دوم (در حضور خرده های مو) دیده شـد (P <۰/۰۰۰۱). و اضـافه کردن خرده های مو باعث افزایش معنی دار MIC قارچها گردید.



نمودار۱: بیشترین و کمترین میانگین MIC اولیه



نمودار۲: بیشترین و کمترین میانگین MIC ثانویه

بحث

تا اواخر سال ۱۹۸۰ مقاومت بالینی به عوامل ضد قارچی نادر بـوده و تنهـا در بیماران کاندیدیازیس جلدی- مخاطی مزمن مشاهده می شد، اما شیوع عفونت های قارچی که عفونت های مقاوم را هم شامل مـی شـود طـی دو دهه گذشته افزایش یافته است، به طوری کـه در سـالهای اخیـر مقاومـت دارویی به عوامل ضد قارچی به صورت یک مشکل در آمده است(۱۰).

متدولوژی استاندارد NCCLS برای آزمایشات ضد قارچی از سوسپانسیون کنیدیال یا از سوسپانسیون مخلوط کنیدیال و میسلیال که در محیط غنی شده رشد کرده، استفاده می کند. البته این نکته را باید در نظر داشت کـه درجه حرارت انکوباسیون، زمان خواندن نتایج و نوع نمونه ها ممکـن اسـت نتایج متفاوتی را در آزمایشهای حساسیت ضد قارچی درماتوفیت ها حاصل کنند(۱۱). اندازه مایه تلقیح یکی از مهمترین عوامل در انجام تست هـای حساسیت ضد قارچی به شمار می رود. در این تحقیق مایه تلقیح ۸ سـویه به کار رفته در ترنس میتنس ۹۵ ٪ تحت شـرایط یکسـان تنظـیم شـده و مورد بررسی قرار گرفت. تراکم مایه تلقیح $۱۰^{۴} \times ۵$ تا $۱۰^{۴} \times ۰/۵$بود که با مقدار توصیه شده توسط متد NCCLS برای قارچ های رشته ای مطابقت داشـت. در سـالهای اخیـر بررسـی هـای مختلفـی بـر روی حساسـیت در ماتوفیت ها به داروهای ضد قارچی در شرایط in vitro انجام شـده اسـت که نتایج آنها تغییرات قابل ملاحظه ای را نشان داده اسـت .ایـن تغییـرات احتمالا ناشی از تفاوت های متدلوژیک در بین آزمایشگاه ها می باشد.

MIC های اولیه (مرحله اول) مشاهده شده در این تحقیق در مـورد تمـام داروهای آزمایش شده یک محدوده ای از تغییرات را بـر علیـه گونـه هـای درماتوفیت (میکروسپوروم و ترایکوفایتون) نشان داده است.

یکی از داروهای به کار رفته در ایـن تحقیـق تربینـافین بـود، امـروزه ایـن داروی ضد قارچی برای بسیاری از درماتوفیتوزیس ها یـک داروی انتخـابی است ولی هنوز برای درمان کچلی سر به عنوان یک داروی انتخابی معرفـی نشده است(۱۲). در کل تربینافین قوی ترین داروی مورد استفاده بـود کـه **Trichophyton mentagerophytes** بیشـــترین حساســـیت و **Microsporum gypseum** و **Microsporum canis** کمتـرین حساسیت را به این ضد قـارچ نشـان دادنـد. خلاصـه ای از مقایسـه نتـایج مرحله اول این تحقیق با نتایج سایر محققان در جدول (۳) آمده است.

مرحله اول این تحقیق یعنی آنتی بیوگرام قارچ ها در کشور هـای مختلـف صورت گرفته و نتایج قابل بررسی و مقایسه می باشد. مرحلـه دوم تـاکنون در جایی صورت نگرفته، بنابراین نمی توان مقا یسه ای انجـام داد، در ایـن تحقیق از خرده های مو برای ایجاد شرایط مشابه in vivo استفاده شـد و با فرض اینکه شرایط به موقعیت و شرایط بالینی کچلی سر شباهت داشـته که در این شرایط اثر دارو بر عفونت ایجاد شده مورد بررسی قـرار گرفـت و همان طور که مشاهده می شود در بعضی موارد نتایج این بررسی بـا نتـایج سایر محققان متفاوت است که ایـن اخـتلاف موجـود در نتـایج مـی توانـد دلایل مختلفی داشته باشد از جمله :

۱- تفاوت گونه ها و زیر گونه های قارچی در مقابل داروهای مورد بررسی

۲-مقاومت سویه ها نسبت به ضد قارچها

۳-اختلاف در کیفیت دارو که می تواند ناشی از اختلاف در شرکت سـازنده دارو باشد و یا سایر مواردی که پرداختن به آن نیاز به تحقیقـات بیشـتری دارد.

نتیجه گیری

متفاوت بودن نتایج، روتین کردن تست های آنتی بیوگرام قارچها را ضروری ساخته تا با پرداختن و مد نظر قرار دادن نتایج، عوارض نا خواسته دارویی را در نزد مصرف کنندگان این داروها به حداقل رساند.

تشکر و قدر دانی

از سرکار خانم وجیهه سادات نیک بین بابت یاری رساندن در ویرایش مقاله صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

REFERENCES

1. Rippon. J. W. The pathogenic fungi and actinomycetes. In: W. B. Sauders Company, Medical mycology. 2th edition., 1988; chap 8.

2. Grase F Kao, MD.,Franklin Flowers,MD.,Michael J Wells, MD. Tinea capitis, Departments of dermatology and pathology, George Washington university Medical school, Department of pathology and laboratory, Emedicine journal 2005 Jun . Available from: http://www.emedicine.com/DERM/topic420.htm.

3. Jin Yu, Ruoyu Li, Glenn Bulmer. Current topics of tinea capitis in china department of dermatology / Research center of medical mycology, china. Jpn. J. Med. Mycol. 2005, 46; 61 – 66.

4. Gupta AK, Hofstoder sL, Adomp, Summer bell RC: tinea capitis: an over view with emphasis on manage mental. Pediatric dermal, 1999 may – Jun, 16 (16): 171 – 89.

5. Temple ME, Jeffrey T. Kirchner, D. O. Pharmacotherapy of tinea capitis. J Am Board Fam Pract, 1999 May- June, 12; 236- 241.

6. E. M. Higgings, L. C. Fuller and C. H. Smith . Guide lines for the management of tinea capitis. British Journal of Dermatology 2000, 143; 53 – 58.

7. Michael A Pfaller , M.D., Chair holder, Vishnu Chaturvedi,Ph.D.,Ana Espinel - Ingroff, PhD- Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi ; Approved standard –NCCLS document M38-A , USA.2002 ; 22 –No. 16 .

8. Perea Sofia., AnneHe W. Fothergill, Deanna A. Sutton and Michael G. Rinaldi. Comparison of in vitro activities of voriconazole and five Established antifungal agents against different species of Dermatophytes using a Broth Macrodilution Method; Journal of clinical Microbiology, 2001 Jan, 19; 385 – 388.

9. C. S. Osborne , I. Leitner, B. Farre and N. S. Ryder. Antifungal drug response in an in vitro model of dermatophyte nail infection, infection diseases department, Novartis research institute, Vienna, Austria, medical mycology April 2004, 42: 159 – 163 .

10. Mahmoud A. Ghannoum and Louis B. Rice. Antifungal agents: mode of action, mechanism of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance; clinical microbiology reviews, 1999 octuber. 12; 501 – 517.

11. B. Fernandes – Torres, A. J. Carrillo, E. Martin, A. Dell. In Vitro activities of 10 anti fungal drugs Against 508 Dermatophyts strains. Anti microbial agents and chemotherapy september 2001, 45; 2524 – 2528,

12. Osborne colin S, Be Hina Hofbauer , Bertrand Fuvre, and Neil S. Ryder invitro analysis of the ability of trichophyton rubrum to become Resistance to Terbinafine; antimicrobial agents and chemothropy. November 2003, 47; 3634 – 3636.

13. Alia S, M. Mendoz, E.A.Zambrano, E.Diaz. Dermatophytes growth curve and in vitro susceptibility test; a broth microtitration method .Medical mycology, June 2005, 43 ;319-325.

14. Bradley M.C, Leidich S,Isham N, et al .Antifungal susceptibilitises and genetic relatedness of serial Trichophyton rubrum isolates from patients with onychomycosis. Mycoses 1999, 42; 105-110.

15. Granade TC, Hehmann MF, Artis W. Monitoring of filamentous fungal growth by in situ microspectrophotometry, fragmented mycelium absorbance, density, and 14C incorporation: Alternatives to mycelial dry weight. Appl Environ Microbial, 1985, 49; 101-108.

16. Jessup CJ, Ryder NS, Ghannoum MA . An evaluation of the in vitro activity of terbinafine. Med Mycol 2000, 38; 155-159.

17. Nenoff P, Wolf T, Uwe-Frithjof H. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes. 14th congres of societiese international mycological human and animals. 2000 May 8-13: Buenos Aires, Argentina.

18. Rex J, Pfaller M, Galgiani J, et al. Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing; Conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole and three other antifungal drugs and candida infection. Clin Infect Dis, 1997, 24; 235-247.

19. Belkys Fernandez – Torres. Isabel Inza, and Josef Guarro. In vitro activities of the new antifungal drug eberconazole and three other topical agent against 200 strain of dermatophytes . Journal of clinical microbiology, Nov 2003, 41; 5209-5211.

20. C.J.Jessup,J.Warner, N. Isham, I. Hasan, and M.A. Ghannoum. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes : Establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates, Journal of Clinical Microbiology, January 2000, 38; 341-344.