

افزایش مقاومت دارویی درماتوفیت‌ها، اهمیت انجام تست حساسیت دارویی و بررسی روش‌های آن

آذین آیت‌اللهی^۱
پگاه تمیمی^۲
علی اصغر قادری^۱
مهسا فتاحی^{۳،۴*}

۱. مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جدام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسنده مسئول:
مهسا فتاحی

تهران، بلوار کشاورز، خیابان قریب، پلاک ۶
پست الکترونیک:
dr.mahsafattahi@gmail.com

تعارض منافع: اعلام نشده است.

اخیراً موارد ابتلا به درماتوفیتوزیس به شدت افزایش یافته است که با گزارش‌های مکرری از موارد مزمن بیماری، تظاهرات پوستی غیرشایع و شکست درمان همراه است. موارد ظهور گونه‌های مقاوم به درمان در سایر نقاط جغرافیایی مانند دانمارک، سوئیس، چین، بلژیک، آلمان، ژاپن، ایران، فنلاند، سوئیس، فرانسه، عراق و بحرین نیز شناخته شده است. تست حساسیت دارویی ضدقارچی برای گونه‌های جنس درماتوفیت هنوز استانداردسازی نشده است. تست حساسیت ضدقارچی (Antifungal Susceptibility Tests [AFST]) برای تعیین حداقل غلظت مهاري رشد در شرایط آزمایشگاهی (Minimal Inhibitory Concentration [MIC]) یک داروی خاص با هدف پیش‌بینی اینکه آیا بیمار به درمان استاندارد ضدقارچی پاسخ می‌دهد یا خیر، استفاده می‌شود. در ادامه این مقاله مروری کلی بر تست حساسیت ضدقارچی از جمله نقاط قوت و نقاط ضعف و نقش آن در کمک به تصمیم‌گیری‌های درمانی پرداختیم.

کلیدواژه‌ها: مقاومت، تربینافین، درماتوفیت

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۲۸

پوست و زیبایی؛ زمستان ۱۴۰۲، دوره ۱۴ (۴): ۲۳۰-۲۲۱

مقدمه

زیادی به یکدیگر دارند و مسئول طیف وسیعی از بیماری‌های پوستی هستند که مشترکاً کچلی یا درماتوفیتوزیس نامیده می‌شوند. بسته به محل آناتومیک، درماتوفیتوزیس شامل چندین فرم کلینیکی می‌باشد. آسیبی که در بدن میزبان ایجاد می‌شود، در واقع یک واکنش آگزمایی بوده و به دنبال آن تظاهرات آلرژیک و التهابی ایجاد می‌شود. این واکنش‌ها، با سیستم ایمنی میزبان و نیز سوش‌ها و گونه‌های عامل عفونت ارتباط دارند.^۱ تاکنون بیش از چهل گونه درماتوفیت شناخته شده

عفونت‌های قارچی جلدی در انسان شامل انواع زیادی از بیماری‌هایی است که پوست، مو و ناخن را درگیر می‌کند. این عفونت‌ها معمولاً محدود به نواحی شاخی و غیرزنده می‌شوند و تغییرات پاتولوژیک در میزبان غالباً به دلیل وجود عامل عفونت و فراورده‌های متابولیکی آن می‌باشد. اکثر این عفونت‌ها توسط یک گروه همگن از قارچ‌های کراتین دوست که درماتوفیت نامیده می‌شوند، ایجاد می‌گردند.^۱ درماتوفیت‌ها دسته‌ای از قارچ‌های کراتولیتیک می‌باشند که از نظر خصوصیت ساختمانی شباهت

که مجموعاً در سه جنس میکروسپوروم، ترایکوفایتون و اپیدرموفیتون طبقه‌بندی شده‌اند. درماتوفیت‌ها از نظر منشأ آلودگی به سه دسته انسان دوست، حیوان دوست و خاک دوست تقسیم می‌شوند.^۳

درماتوفیتوزیس یک بیماری با انتشار جهانی است که به‌عنوان یک بیماری ژئونوز از دسته بزرگی از حیوانات به انسان قابل انتقال است. در سال‌های اخیر وفور و شیوع عفونت‌هایی که به‌وسیله قارچ‌ها ایجاد می‌شوند، روزبه‌روز در حال افزایش است. این عفونت‌ها به‌خصوص در افراد با نقص ایمنی بسیار افزایش یافته‌اند. بیماری به‌ویژه در انواع مزمن برای سال‌ها با بیمار باقی می‌ماند و به درمان‌های رایج با داروهای ضدقارچی سنتتیک نظیر آزول‌ها، گریزئوفلوین و تربینافین پاسخ نمی‌دهد (به‌دلیل ایجاد مقاومت دارویی). هم‌چنین داروهای سنتتیک موجود، عوارض جانبی فراوان نظیر سمیت شدید کبدی، مشکلات جدی نادر پوستی مثل سندرم استیون جانسون و برهمکنش احتمالی دارو - دارو به‌دلیل متابولیسم از راه سیستم سیتوکروم P-450 دارند.^{۴،۵}

اخیراً موارد ابتلا به درماتوفیتوزیس به‌شدت افزایش یافته است که با گزارش‌های مکرری از موارد مزمن بیماری، تظاهرات پوستی غیرشایع و شکست درمان همراه است. افزایش استفاده غیرمنطقی از ترکیبات ضدقارچی حاوی کورتیکواستروئید که بدون نسخه به‌فروش می‌رسند، در روند مقاومت اکتسابی درماتوفیت‌ها به عوامل ضدقارچی رایج نقش دارد.^{۶،۷}

موارد ظهور گونه‌های مقاوم به درمان در سایر نقاط جغرافیایی مانند دانمارک، سوئیس، چین و بلژیک،^۸ آلمان،^۹ ژاپن و ایران^{۱۰،۱۱}، فنلاند^{۱۲}، سوئیس^{۱۳} و فرانسه، عراق و بحرین^{۱۴} نیز شناخته شده است. ترایکوفایتون کمپلکس متاگروفایتس (اینتردیجیتال / متاگروفایتس ژنوتایپ VIII)، ترایکوفایتون روبروم^{۱۵-۱۸} و ترایکوفایتون تونسورس به‌ترتیب شایع‌ترین عوامل درماتوفیتی مقاوم به تربینافین در بیماران مبتلا به

درماتوفیتوزیس می‌باشند. رنج این مقاومت بین ۷۱-۱۷ درصد برحسب مطالعات مختلف متفاوت است^{۱۹،۲۰}. شایع‌ترین فرم ابتلا در بیماران مقاوم به تربینافین، کچلی بدن و به‌دنبال آن کچلی کشاله ران است^{۲۱}. کچلی بدن عارضه درماتوفیتی قسمت‌های مختلف پوست است. در این بیماری ضایعات از فرم پوسته‌دار ساده تا فرم گرانولوم زخمی عمیق در تغییرند. قارچ در طبقه شاخی اپیدرم جایگزین شده و علائم بالینی ایجادشده در نتیجه مواد مترشحه توسط قارچ به‌وجود می‌آید.^۵

مکانیسم مقاومت تربینافین در میان گونه‌های ترایکوفایت 22ون به پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) در ژن اسکوالن اپوکسیداز نسبت داده می‌شود. جهش نقطه‌ای در ژن اسکوالن اپوکسیداز منجر به جایگزینی اسید آمینه عمدتاً در یکی از چهار موقعیت (Leu 393, Phe 397, Phe 415 و His 440)، در ترایکوفایتون روبروم می‌شود. جایگزینی اسید آمینه Phe397Leu عمدتاً در ژن اسکوالن اپوکسیداز ترایکوفایتون متاگروفایتس مقاوم به تربینافین می‌شود^{۱۹}. جایگزینی اسید آمینه Q408L در ژن اسکوالن اپوکسیداز ترایکوفایتون متاگروفایتس مقاوم به تربینافین در ژن اسکوالن اپوکسیداز ترایکوفایتون متاگروفایتس مقاوم به تربینافین در فرد مبتلا به درماتوفیتوزیس بدن گزارش شده است.^{۱۰}

در ادامه این مقاله، مروری کلی بر تست حساسیت ضدقارچی از جمله نقاط قوت و نقاط ضعف و نقش آن در کمک به تصمیم‌گیری‌های درمانی پرداختیم.

تست حساسیت دارویی ضدقارچی برای گونه‌های جنس درماتوفیت هنوز استانداردسازی نشده است. تست حساسیت ضد قارچی (Antifungal Susceptibility Tests, [AFST]) برای تعیین حداقل غلظت مهاري رشد در شرایط آزمایشگاهی (Minimal Inhibitory Concentration; [MIC]) یک داروی خاص با هدف پیش‌بینی اینکه آیا بیمار به درمان استاندارد ضدقارچی پاسخ می‌دهد یا خیر،

اپیدمیولوژیک (ECV) برای هرگونه معین و عامل ضدقارچی تعیین شود. مقدار MIC برای متمایز کردن جدایه‌های نوع وحشی (که عموماً حساس در نظر گرفته می‌شوند) از انواع غیروحشی (به‌طور کلی به‌عنوان جدایه‌های مقاوم در نظر گرفته می‌شوند) استفاده می‌شود.^{۲۳} نتایج MIC به سه صورت تفسیر می‌شود: (S) حساس، رژیم درمانی با دوز استاندارد دارو احتمال موفقیت درمانی بالایی دارد؛ (I) حساس اما مستلزم افزایش قرارگرفتن در معرض عامل ضدقارچی با دوز بالا است و (R) مقاوم، حتی در صورت افزایش مواجهه احتمال شکست درمانی زیاد است.^{۲۴}

از آنجایی که تکنیک برات میکرودايلوشن پرزحمت است و نیاز به تخصص دارد، تنها چند آزمایشگاه قارچ‌شناسی می‌توانند این آزمایش را انجام دهند. در سناریوی فعلی افزایش مقاومت به درمانتوفیت‌ها، حداقل در مواردی که درمانتوفیتوز مزمن/عودکننده یا شکست/عود درمان وجود دارد، نیاز به انجام تست‌های حساسیت دارویی ضدقارچی است. از آنجایی که هنوز CBP تعریف نشده است، نیاز فوری به ECV برای درمانتوفیت‌ها وجود دارد و این مقدار ممکن است پزشک را حین مدیریت درمانتوفیتوزیس مقاوم به درمان راهنمایی کند.^{۲۱}

روش‌های ارزیابی ترکیبات ضدقارچی

تست حساسیت ضدقارچی به‌منظور ارائه اطلاعاتی به پزشکان انجام می‌شود که به هدایت درمان در بیماران مبتلا به عفونت قارچی کمک می‌کند.

روش‌های رقیق‌سازی

در روش مذکور از رقت‌های مختلف عامل ضد میکروبی استفاده می‌شود که خود در قالب چند روش مختلف انجام می‌شود:

۱. روش لوله

این روش خود به دو صورت است:

- Microdilution Method
- Macrodilution Method

استفاده می‌شود. براساس مستندات موجود داده‌های حداقل غلظت مهاري رشد در شرایط آزمایشگاهی در مواردی با نتایج بالینی مطابقت ندارد. با این وجود، با افزایش موارد مقاومت به داروی تربیتافین به‌ویژه در میان گونه‌های تریکوفایتون، شناسایی زودهنگام جدایه‌های درمانتوفیت مقاوم به تربیتافین برای مدیریت درمان مناسب بیماری الزامی است. به‌منظور تعیین حساسیت به داروی قارچی، از روش‌های مبتنی بر کشت و روش‌های غیر مبتنی بر کشت استفاده می‌شود.

روش‌های مبتنی بر کشت عبارتند از دیسک دیفیوژن، برات میکرودايلوشن، E-Test و آگار دایلوژن. اگرچه مطالعاتی به‌منظور مقایسه نتایج تست حساسیت داروی ضدقارچی به روش تست دیسک دیفیوژن و برات میکرودايلوشن موجود است؛ ولی طبق دستورالعمل استاندارد CLSI، تست دیسک دیفیوژن و E-Test و آگار دایلوژن برای تست حساسیت ضدقارچی درمانتوفیت‌ها توصیه نمی‌شود.

براساس مطالعات انجام‌شده مشخص شده است که تست برات میکرودايلوشن CLSI-M38-A2، دستورالعمل استاندارد برای انجام تست حساسیت داروی ضدقارچی علیه درمانتوفیت‌ها است. علی‌رغم وجود دستورالعمل استاندارد، تفسیر بالینی مقادیر MIC یا Breakpoint برای بررسی اینکه آیا عامل آزمایش‌شده از نظر بالینی حساس است یا مقاوم، هنوز به وضوح تعریف نشده است. در بالین، برای مدیریت بهتر بیماران، نقطه شکست بالینی درمان (CBP) نقش مهمی دارد. CBP به عوامل متعددی مانند توزیع MIC، داده‌های فارماکوکینتیک/فارماکودینامیک (PK/PD) داروی ضدقارچ‌ها و مهم‌تر از همه، نتیجه درمان بیماری بستگی دارد.^{۲۲}

به‌دلیل کمبود اطلاعات در مورد نتایج بالینی با داده‌های حساسیت ضدقارچی، تصمیم‌گیری در مورد CBP برای یک گونه خاص دشوار است بنابراین، در چنین شرایطی، ممکن است مقدار Cutoff

این روش علی‌رغم اینکه بسیار دقیق است؛ اما به‌علت طولانی بودنش از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نبوده، لذا معمولاً استفاده نمی‌شود مگر در مواردی نظیر تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد عوامل ضدقارچی. در این روش رقت‌های مختلف عامل ضدمیکروبی به همراه محیط کشت مایع در مجاورت غلظت ثابتی از کشت قارچی با رعایت زمان مناسب قرار می‌گیرد، سپس رشد یا عدم رشد میکروارگانیسم مورد آزمایش با توجه به غلظت عامل ضد قارچی تعیین می‌شود، سپس کم‌ترین غلظت از عوامل ضدمیکروبی که از رشد قارچ‌ها جلوگیری می‌کند، به‌عنوان MIC تعیین می‌گردد.^{۶۷}

تست حساسیت دارویی در حقیقت فعالیت یک ماده ضدقارچ خاص را در شرایط آزمایشگاهی بر روی ارگانیسم قارچی نشان می‌دهد. با این حال، مقادیر MIC به‌تنهایی برای ایجاد تفاسیر حساس یا حساس وابسته به دوز و مقاوم کافی نیست و باید به فاکتورهای محیطی دخیل در نتایج و فارماکوکینتیک دارو نیز توجه شود. فارماکوکینتیک دارو شامل دوز مصرف و محل ضایعه می‌باشد.

۲. روش پلیت با استفاده از محیط جامد^{۲۱}

در این روش به‌جای محیط مایع از محیط جامد استفاده می‌شود. دقت آن نسبت به روش لوله کمتر است. در این روش غلظت‌های مختلفی از عوامل ضدمیکروبی را به داخل پلیت‌های آگار وارد کرده به این صورت که برای هر غلظت یک پلیت مورد استفاده قرار می‌گیرد.

میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش در سرم فیزیولوژی را به‌گونه‌ای حل کرده که کدورت برابر استاندارد نیم مک‌فارلند باشد. بعد از یک شب گرم خانه‌گذاری، رشد میکروارگانیسم‌ها در پلیت‌های فاقد غلظت کافی از عوامل ضدمیکروبی بررسی شده و در نهایت کم‌ترین غلظت عامل مورد نظر که اجازه رشد به میکروارگانیسم‌ها را نداده است، به‌عنوان MIC

تعیین می‌گردد.

۳. روش گرادپانت پلیت^{۲۵}

در این روش از محیط جامد به‌جای محیط مایع استفاده می‌شود. ممکن است برای هر یک از غلظت‌های ماده مورد آزمایش چندین میکروارگانیسم بررسی شود. تلقیح‌کننده‌های چند نقطه‌ای قادرند که چندین میکروارگانیسم را بر روی یک پلیت بررسی کنند.

جهت انجام این تست به محیط، نوترینت آگار ذوب‌شده از محلول مورد آزمایش اضافه می‌شود. سپس این مجموعه را به داخل پلیت استریلی ریخته، پلیت را کج قرار داده تا محیط داخلی آن به‌صورت یک گوه سفت شود، سپس باقی‌مانده آگار به داخل گوه ریخته می‌شود و با قراردادن پلیت بر روی محیط صاف آگار به‌صورت صاف، در پلیت قرار می‌گیرد.

پلیت‌ها را یک شب در گرمخانه گذاشته تا محلول مورد آزمایش به سطح خشک نفوذ کند. میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش باید به‌طور خطی از سمت بالاترین غلظت به پایین‌ترین غلظت حرکت کنند. در این روش امکان بررسی شش میکروارگانیسم وجود دارد. برای ارزیابی نتایج، طول رشد قارچ و طول کلی آگار سطحی که کشت داده‌شده اندازه‌گیری می‌شود.

روش کدورت‌سنجی^{۲۲}

روش فوق در مورد ترکیباتی کاربرد دارد که قدرت انتشار آن‌ها به داخل آگار کم باشد. در این روش محیط کشت مایع مورد استفاده قرار می‌گیرد. در روش کدورت‌سنجی کشت میکروارگانیسم‌های مورد نظر در محیط کشت مایع و در مجاورت غلظت‌های مختلف از ماده ضدمیکروب مورد نظر انجام می‌شود و با سنجش کدورت‌های حاصل در لوله‌ها، می‌توان مقدار ماده مورد آزمایش را تعیین کرد.

به‌علت اینکه مدت کشت در گرم‌خانه کوتاه است، کنترل حرارت گرم‌خانه بسیار مهم است. بدین جهت حرارت باید کاملاً یکنواخت باشد؛ لذا از بن‌ماری مجهز به دستگاه دوران آب استفاده می‌شود و چون آب،

می‌شوند که منحنی لگاریتمی به صورت خطی به دست نیاید. به همین دلیل باید توجه داشت که تمام پلیت‌ها به یک ضخامت پر شده باشند.

۲. خشکی آگار: خشکی آگار یک مورد بسیار مهم است چراکه خشک نبودن آن به حد کافی باعث ایجاد هاله‌هایی با کناره‌های نامشخص می‌شود. خشک کردن آگار باید به صورتی انجام گیرد که از ورود هرگونه آلودگی از طریق هوا جلوگیری به عمل آید. این مشکل را می‌توان با برگرداندن پلیت‌ها روی در آنها برطرف نمود.^{۱۸}

۳. مقدار آگار: با کم کردن مقدار آگار، جنس و منبع آگار در محیط کشت، می‌توان حساسیت روش انتشار را افزایش داد.^{۱۸}

ب) pH آگار و محلول مورد اندازه‌گیری

تغییرات pH در فعالیت و پایداری مواد مورد اندازه‌گیری مؤثر می‌باشد. انتخاب pH آگار باید به صورتی انجام شود که مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌ها، فعالیت و پایداری ماده مورد آزمایش باشد. اندازه و قطر هاله با تغییر pH آگار و همچنین pH محلول مورد اندازه‌گیری تغییر می‌نماید.^{۱۹}

ج) شرایط کشت در گرم‌خانه

زمان لازم و درجه حرارت برای نگهداری کشت‌ها در گرم‌خانه نسبت به نوع میکروب و مواد سنجش متفاوت بوده و تنظیم این دو عامل بستگی به خصوصیات و شرایط لازم در هر اندازه‌گیری دارد.

چون هر دو مورد در اندازه‌هاله‌های به دست آمده تأثیرگذارند، در نتیجه اگر بخواهیم هاله‌های بزرگتری داشته باشیم، باید فاز وقفه رشد میکروب‌ها را تغییر داد. بدین منظور جهت انتشار بهتر و ایجاد هاله‌های بزرگتر، نمونه‌ها را در یخچال یا در حرارت آزمایشگاه قرار می‌دهند.

طرز قراردادن میکروارگانیسم‌ها روی آگار

میکروارگانیسم‌ها به طرق مختلف در پلیت‌ها قرار داده می‌شوند که سه روش اصلی آن عبارتند از:

انتقال حرارت را سریع‌تر انجام می‌دهد، به هوای گرم ترجیح دارد. برای سنجش کدورت‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده می‌شود.

لوله‌هایی که در این روش مورد استفاده قرار می‌گیرند باید هم‌قطر و هم‌ضخامت باشند و خراش، لکه یا هرگونه عیبی در لوله نباشد، چون قطره‌های مختلف اختلاف دمایی ایجاد می‌کند (ظروف یکسان – دمای یکسان). ظروف باید به دقت شسته و آب کشیده شوند تا کوچکترین آثار میکروارگانیسم روی لوله‌ها باقی نماند.

روش انتشار^{۲۳}

در روش انتشار، ماده مورد آزمایش روی محیط جامد قرار می‌گیرد تا به داخل آگار انتشار پیدا کند. چنانچه ماده مورد آزمایش از عوامل باکتریواستاتیکی یا باکتریوسیدی باشد، نتیجه به صورت یک هاله عدم رشد ظاهر می‌شود.

اندازه هاله‌ها به غلظت ماده مورد اندازه‌گیری و مقدار آن بستگی دارد. ارتباط بین اندازه هاله‌ها و لگاریتم غلظت ماده مورد آزمایش خطی است. با اندازه‌گیری فاصله‌ای که ماده مورد آزمایش انتشار پیدا نموده، به صورت رشد یا عدم رشد میکروب مورد آزمایش و مقایسه آن با استاندارد مشخص، قدرت نمونه مورد آزمایش محاسبه می‌گردد.

عوامل مؤثر در اندازه‌گیری به روش انتشار

الف) آگار

آگار یکی از مهم‌ترین عوامل در این روش می‌باشد. اندازه‌گیری به روش انتشار بستگی به انتشار ماده مورد سنجش در آگار دارد.

۱. عمق آگار: آگار را در پلیت‌های نازک تقسیم می‌کنند؛ چون لایه‌های نازک، هاله‌های بزرگتر ایجاد می‌کند. بدین جهت اکثر محققین، لایه‌هایی با قطر ۳-۵ میلی‌متر را برای اندازه‌گیری مناسب می‌دانند. ضخامت لایه‌ها بسیار مهم است چون لایه‌های آگار خیلی نازک یا خیلی ضخیم باعث

هاله‌های رشد و عدم رشد

ممکن است هاله‌های مختلفی در نتیجه رشد یا عدم رشد ایجاد گردد که در محاسبه و به‌دست آوردن نتایج، مؤثرند. غلظت و سن میکروب مورد آزمایش در ایجاد هاله‌های مناسب مؤثر است. در ایجاد هاله‌های نادرست نوع ترکیبات محیط کشت و محلول مورد اندازه‌گیری دخالت دارند.

خط‌کش، کیپلر یا وسایل مخصوص دیگری جهت اندازه‌گیری قطر هاله‌های رشد یا عدم رشد استفاده می‌شود. برای دقت بیشتر می‌توان پلیت‌ها را روی جعبه‌هایی در زیر نور مناسب قرار داده و سپس آن‌ها را با کمک ذره‌بین با بزرگنمایی بالا مشاهده و قطر هاله‌ها را اندازه‌گیری کرد.

صحت نتایج حاصل

در روش انتشار، فاکتورهایی در ایجاد خطاها دخالت دارند. این فاکتورها عبارتند از:

۱. مهارت شخص آزمایش‌کننده، اصلاحات در کلینیک
۲. توسط افرادی که کار می‌کنند، تعداد دیسک‌ها، سیلندرها یا چاهک‌ها که برای هر رقت مصرف می‌شوند.

بهترین روش برای کاهش خطاها، ایجاد تعداد زیادی هاله می‌باشد. در مواردی که به نتایج دقیق‌تری نیاز است، بهتر است آزمایش را تکرار نموده و میانگین نتایج را به‌دست آورد.

حداقل غلظت مهارتی

حداقل غلظت مهارتی عبارت است از غلظتی از آنتی‌بیوتیک که لازم است تحت شرایط استاندارد، رشد میکروب مشخصی را مهار کند.

روش‌های تعیین MIC^{۲۱}

- ◆ Broth Serial Microdilution
- ◆ Broth Serial Macrodilution
- ◆ Agar serial dilution

عوامل مؤثر در تعیین MIC

میزان نمونه اسپور تلقیحی: معمولاً هرچه مقدار باکتری که به کار می‌رود بیشتر از حد استاندارد باشد،

۱. مقداری از سوسپانسیون میکروبی را در سطح آگار ریخته به طوری که تمام سطح به آن آغشته شود، سپس سوسپانسیون اضافی از روی آگار تخلیه می‌شود. در این روش رشد یکنواختی به علت ناهمگن بودن پخش میکروبی حاصل نخواهد شد.

۲. سوسپانسیون میکروبی در تمام سطح آگار ریخته و سپس آن را در پلیت‌ها تقسیم می‌کنند. برخلاف روش قبل در این روش پخش کامل و یکنواخت سوسپانسیون میکروبی انجام می‌گیرد.

۳. یک لایه از آگار محتوی سوسپانسیون میکروبی در روی آگار مغذی موجود در پلیت‌ها ریخته می‌شود. این روش نسبت به روش دوم مستلزم وقت بیشتری جهت پرکردن پلیت‌ها است؛ اما هاله‌هایی یک اندازه و مناسب به‌دست خواهند آمد. درجه حرارت آگار مذاب باید مورد توجه باشد. در صورتی که در موقع ریختن میکروارگانیسم‌ها آگار داغ باشد، باعث کشته شدن تعدادی از میکروارگانیسم‌ها شده و اگر سرد باشد، منجمد می‌گردد و نمی‌توان از آن استفاده کرد.

بهترین درجه حرارت برای آگار مذاب جهت ریختن سوسپانسیون میکروبی در آگار، ۴۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد است.

ه) ماده مورد اندازه‌گیری

۱. خصوصیات لازم: ماده‌ای که برای تعیین مقدار به کار می‌رود، بایستی خصوصیات زیر را داشته باشد:

- اثر محرک یا جلوگیری‌کننده نسبت به رشد میکروارگانیسم داشته باشد؛
- در حلالی قابل انحلال بوده و در آن غلظت با اندازه‌گیری تداخل نداشته باشد و
- قابل انتشار در آگار باشد.

۲. مقدار لازم برای تعیین مقدار: انتخاب مقدار لازم از ماده مورد سنجش، بستگی به فعالیت آن ماده نسبت به میکروارگانیسم آزمایش دارد.^{۲۰}

روش مولکولی^{۲۴}

روش‌های غیرمبتنی بر کشت متعددی برای تشخیص مؤثر SNP‌های موردنظر در سایر قارچ‌ها ارزیابی شده‌اند. SNP‌ها را می‌توان با تکنیک‌های پیشرفته مانند سنجش Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)، اسپکتروفتومتری MALDI TOF MS، سنجش مبتنی بر پروب و توالی‌یابی مستقیم DNA شناسایی کرد؛ اما این تکنیک‌ها یا در اکثر آزمایشگاه‌های معمولی موجود نیستند یا به دلیل پیچیدگی و هزینه بالای این روش‌ها امکان‌پذیر نیستند. در میان این روش‌ها، توالی‌یابی DNA بهترین ابزار تعیین ژنوتیپ است؛ اما این روش گران و زمان‌بر است و در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیصی معمولی در دسترس نیست. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (ARMS PCR) که به‌عنوان واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اختصاصی آلل نیز شناخته می‌شود، یک تکنیک کارآمد برای شناسایی SNP‌ها و جهش‌های نوع حذفی است. اخیراً محققان از روش Real-Time PCR برای شناسایی گونه‌های مقاوم به داروهای ضدقارچی و میکروبی استفاده کردند. محققان با روش Resistance Real-Time PCR به‌طور مؤثر گونه‌های ترایکوفایتون را شناسایی کرد و سویه‌های مقاوم با ژنوتیپ جهش یافته اسکوالن اپوکسیداز متمایز کرد که شامل Phe397Leu و Leu393Phe است.

اثر ضد میکروبی دارد و متعاقباً مقدار MIC کمتر از میزان واقعی تعیین می‌شود.

۱. سرعت رشد باکتری؛
۲. مدت زمان قرارگیری میکروب در انکوباتور؛
۳. ماهیت محیط کشت مورد استفاده و عدم آلودگی آن؛
۴. pH محیط؛
۵. عمق محیط کشت؛
۶. پایداری ماده ضد میکروبی؛
۷. فعالیت متابولیک میکروارگانیسم؛
۸. خلوص و سن کشت میکروبی و
۹. شرایط گرم‌خانه‌گذاری که شامل دما، مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری و فشار هوای داخل گرم‌خانه است. انتخاب شرایط گرم‌خانه‌گذاری با توجه به خصوصیات میکروارگانیسم و همچنین ماده مورد بررسی می‌باشد^{۲۱}.

حداقل غلظت کشندگی

حداقل غلظت کشندگی عبارت است از غلظتی از آنتی‌بیوتیک که تحت شرایط استاندارد ۹۹/۹ درصد از میکروب‌های تلقیح اولیه را می‌کشد. در برخی از عفونت‌ها ضروری است که میکروارگانیسم‌های عامل به‌طور کامل کشته شوند. برای تعیین توانایی عامل ضد میکروبی در از بین بردن و کشتن میکروارگانیسم عامل، انجام آزمایشات تعیین MBC / MFC ضروری است.

References

1. Zhan P, Liu W. The changing face of dermatophytic infections worldwide. *Mycopathologia* 2017; 182: 77-86.
2. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 2008; 51: 2-15.
3. Symoens F, Jousson O, Packeu A, et al. The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: Intraspecies variability and mating behaviour. *J Med Microbiol* 2013; 62: 377-85.
4. Leyden J. Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38: S42-7.
5. Hayette MP, Sacheli R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. *Curr Fungal Infect Rep* 2015; 9: 164-79.

6. Singh A, Masih A, Khurana A, et al. High terbinafine resistance in Trichophyton interdigitale isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. *Mycoses* 2018; 61: 477-84.
7. Gupta AK, Foley KA, Versteeg SG. New antifungal agents and new formulations against dermatophytes. *Mycopathologia* 2017; 182: 127-41.
8. Sacheli R, Harag S, Dehavay F, et al. Belgian National survey on tinea capitis: Epidemiological considerations and highlight of terbinafine-resistant T. mentagrophytes with a Mutation on SQLE Gene. *J Fungi* 2020; 6.
9. Nenoff P, Verma SB, Ebert A, et al. Spread of terbinafine-resistant Trichophyton mentagrophytes Type VIII (India) in Germany-"the tip of the Iceberg?". *J Fungi* 2020; 6.
10. Fattahi A, Shirvani F, Ayatollahi A, et al. Multidrug-resistant Trichophyton mentagrophytes genotype VIII in an Iranian family with generalized dermatophytosis: Report of four cases and review of literature. *Int J dermatol* 2021; 60: 686-92.
11. Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, et al. Terbinafine resistance of Trichophyton Clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61.
12. Taghipour S, Pchelin IM, Zarei Mahmoudabadi A, et al. Trichophyton mentagrophytes and T. interdigitale genotypes are associated with particular geographic areas and clinical manifestations. *Mycoses* 2019; 62: 1084-91.
13. Järv H, Uhrlass S, Simkin T, et al. Terbinafine resistant Trichophyton mentagrophytes genotype VIII, Indian type, isolated in Finland. *J Fungi* 2019; 5:P039.
14. Süß A, Uhrlaß S, Ludes A, et al. Extensive tinea corporis due to a terbinafine-resistant Trichophyton mentagrophytes isolate of the Indian genotype in a young infant from Bahrain in Germany. *Der Hautarzt* 2019;70: 888-96.
15. Mukherjee PK, Leidich SD, Isham N, et al. Clinical Trichophyton rubrum strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47: 82-6.
16. Osborne CS, Leitner I, Favre B, et al. Amino acid substitution in Trichophyton rubrum squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 2840: 4-49.
17. Saunte DML, Hare RK, Jørgensen KM, et al. Emerging terbinafine resistance in Trichophyton: Clinical characteristics, squalene epoxidase gene mutations, and a reliable EUCAST method for detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63: 10-1128.
18. Noguchi H, Matsumoto T, Hiruma M, et al. Tinea unguium caused by terbinafine-resistant Trichophyton rubrum successfully treated with fosravuconazole. *J dermatol* 2019; 46: e446-e47.
19. Ebert A, Monod M, Salamin K, et al. Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study. *Mycoses* 2020;63:717-28.
20. Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Dogra S, et al. Mutation in the squalene epoxidase gene of Trichophyton interdigitale and Trichophyton rubrum associated with allylamine resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62: 10-128.
21. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. M38Ed3ed. Clinical and Laboratory Standards Institute 2017.
22. Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, et al. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1811-20.

23. Pfaller MA, Barry A, Bille J, et al. Quality control limits for voriconazole disk susceptibility tests on Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue. *J clin microbiol* 2004; 42: 1716-8.
24. Singh A, Singh P, Dingemans G, et al. Evaluation of DermaGenius(®) resistance real-time polymerase chain reaction for rapid detection of terbinafine-resistant *Trichophyton* species. *Mycoses* 2021; 64: 721-26.
25. Arendrup M, Meletiadis J, Mouton J, et al. EUCAST definitive document e.Def 9.3.1: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. Basel: EUCAST 2017.

Increasing the drug resistant dermatophytes, the importance of antifungal susceptibility testing and its methods

Azin Ayatollahi, MD¹
Pegah Tamimi, MD²
Aliasghar Ghaderi, MD²
Mahsa Fattahi, PhD^{3,4*}

1. Center for Research and Training in Skin Disease and Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Immunology, Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: Jan 28, 2024
Accepted: Feb 17, 2024
Pages: 221-230

Corresponding Author:
Mahsa Fattahi, PhD

No. 6, Qarib St., Keshavarz Blvd., Tehran
Iran
Email: dr.mahsafattahi@gmail.com

Conflict of interest: None to declare

Recently, the cases of dermatophytosis have increased sharply, which is associated with frequent reports of chronic cases of the disease, uncommon skin manifestations, and treatment failure. Cases of emergence of resistant species in other geographical areas such as Denmark, Switzerland, and China, Belgium, Germany, Japan, Iran, Finland, Switzerland, France, Iraq and Bahrain are also known. Antifungal drug susceptibility testing for dermatophyte species has not yet been standardized. Antifungal Susceptibility Tests (AFST) are used to determine the minimum growth inhibitory concentration (MIC) of a specific drug in laboratory conditions with the aim of predicting whether a patient will respond to standard antifungal treatment or not. In the continuation of this article, we gave an overview of the antifungal sensitivity test, including its strengths and weaknesses and its role in helping to make therapeutic decisions.

Keywords: resistant, terbinafine, dermatophyte

