مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
شماره ۹۵، سال ۵۰
بهار ۱۳۸٦ ، صفحه: ۹٤ - ۸۹

Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol.50, No: 95, P: 89 - 94
Spring 2007

مقاله اصلی

اثرات داروهای ضد قارچی متداول در نمونه های بالینی انواع مختلف کاندیدا آلبیکنس

***محمد جواد نجف زاده[۱] PhD، مهربان فلاحتی[۲] PhD ، لامع اخلاقی[۳] PhD ،**
کامران پوشنگ باقری[۴] MD

[۱]مربی گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، [۲،۳]استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران، [۴]دانشجوی دکترای میکروبیولوزی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۵/۹/۱ - تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲

خلاصه

مقدمه: در چند دهه اخیر، میزان وقوع عفونت‌های قارچی در بسیاری از کشورها افزایش یافته است. به دلیل پیدایش مقاومت به عوامل ضد قارچی تعیین طرح استراتژیک مؤثر برای درمان بیماری‌های قارچی یک موضوع مهم در قارچ‌شناسی بالینی است.

روش کار: روش‌های زیادی برای تعیین تست حساسیت آزمایشگاهی معرفی شده‌اند. اخیراً، فلوسیتومتری برای حل مشکل معرفی شده است. مقالات زیادی به مفید بودن این تکنیک استناد کرده‌اند.این مطالعه با هدف بررسی حساسیت آزمایشگاهی یک سوش استاندارد PTCC و تعدادی ایزوله‌های بالینی از کاندیدا مطابق با دستورالعمل NCCLS با روش ماکرودیلوشن براث و تست حساسیت فلوسیتومتری انجام شده است. این مطالعه توصیفی بر روی قارچ ها در دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شد. نمونه های بالینی کاندیدایی جدا شده تحت اثر دارهای ضدقارچی مانند آمفوتریسینB، فلوکونازول، کلوتریمازول، کتوکونازول، میکونازول به روش فلوسیتومتری و ماکرودیلوشن قرار گرفتند. مشخصات نمونه ها، نتایج آزمایشات در پرسشنامه و برگه مشاهده جمع آوری و سپس با استفاده از آمار توصیفی و جداول توزیع فراوانی پردازش شد.

نتایج: داده‌ها نشان دادند که روش ماکرودیلوشن براث و فلوسیتومتری نتایج مشابه در تعیین MIC برای آمفوتریسین B، کتوکونازول، کلوتریمازول، فلوکونازول و میکونازول داشتند.

نتیجه گیری: مقایسه نتایج حاصله با روش ماکرودیلوشن براث و فلوسیتومتری در مورد کاندیدا آلبیکنس PTCC5027 و همین طور ایزوله‌های بالینی نشان داد که فلوسیتومتری خیلی راحت‌تر و سریعتر از روش‌های براث است.پیشنهاد می‌شود که تست حساسیت فلوسیتومتری به‌عنوان یک ابزار قوی در تعیین MIC و تجویز بهترین داروی ضد قارچی در درمان بیماران با عفونت‌های کاندیدائی به خصوص کاندیدیازیس سیستمیک استفاده شود.

کلمات کلیدی: داروهای ضد قارچی، فلوسیتومتری، روش ماکرودیلوشن

*مشهد - دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی -
Emaile:mjd-najafzadeh@mums.ac.ir – نویسنده رابط
Jjavadi2000@yahoo.com

مقدمه

طی دهه های اخیر شمار بیماران مستعد به عفونت با میکروارگانیسم های فرصت طلب از قبیل سوش های کاندیدا، به خصوص در بیماران با نقص سیستم ایمنی، به طور قابل توجهی در خیلی از کشور ها افزایش یافته است و همچنین نشان داده شده است که مخمرهای پاتوژن زیادی مقاومت ذاتی یا اکتسابی نسبت به داروهای ضد قارچی دارند.

بنابراین تعیین طرح استراتژیک موثر برای درمان بیماریهای قارچی یک موضوع مهم در قارچ شناسی بالینی است (۹ - ۱).

کمیته بین المللی استانداردهای آزمایشگاهی بالینی(NCCLS[1])، روش دیلوشن براث (M27-A) را در آزمایشگاههای تشخیصی به عنوان روش منبع برای تست حساسیت ضد قارچی مخمر های پاتوژن معرفی کرده اند، ولی استفاده از این روش نیاز به زمان زیادی دارد (۱۰).

تعداد زیادی از محققین روش فلوسیتومتری را برای بدست آوردن سریع نتایج حساسیت برای کاندیداها گزارش کرده اند (۹ - ۱).

مکانسم عمل فلوسیتومتری برای تست حساسیت ضد قارچی در این جا افتراق میکروارگانیسم های مرده از زنده با استفاده از رنگ حیاتی منتقل شونده به DNA سلول است.

در این روش از سدیم داکسی کولات برای افزایش نفوذ پذیری و پروپیدیوم یدید، یک رنگ حیاتی متصل شونده به DNA، برای تشخیص افزایش نفوذ پذیری غشاء سلولی بعد از درمان ضد قارچی استفاده شده است.

این مطالعه با هدف بررسی اثرات درمانی داروهای ضدقارچی مانند: آمفوتریسین B ، فلوکونازول، کلوتریمازول، کتوکونازول، میکونازول را بر روی کاندیدا آلبیکنس (PTCC 5027)، کاندیدا آلبیکس،کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا،کاندیدا کفایر و کاندیدا دابلینینسیس با دو روش ماکرودیلوشن براث و فلوسیتومتری انجام شده است.

روش کار

این مطالعه توصیفی بر روی قارچها در آزمایشگاه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده شامل کاندیدا آلبیکنس (PTCC 5027) که از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران (وابسته به سازمان و پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) تهیه گردید و نیز کاندیدا آلبیکس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کفایر و کاندیدا دابلینینسیس که نمونه‌های بالینی جدا شده بوده و با استفاده از کیت API20C AUX تعیین گونه شده بودند و داروهای ضد قارچی شامل آمفوتریسین B ($C47H73No_{13}$-A_{4888}-10T47H1247) که از شرکت سیگما خریداری شد و نیز دارای فلوکونازول (Batch no: 104/70) (اهدایی شرکت پارس‌دارو) و کلوتریمازول (Lot Number = 200211060136) کتوکونازول (Batch Number: Det “50” 02-03) و میکونازول (Lot: ZRO14889pud67) (اهدایی شرکت بهوزان رشت) بودند.

برای تهیه سوسپانسیون تلقیحی از نمونه‌های مخمری ۱۸ تا ۲۴ ساعته به کمک آنس استریل چند تکه کلنی در کنار شعله به داخل لوله در پیچ‌دار حاوی سرم فیزیولوژی استریل منتقل کرده و خوب تکان داده شد. بعد از یکنواخت شدن سوسپانسیون مقداری از سوسپانسیون فوق روی لام شمارش سلولهای خونی قرار داده و تعداد سلولهای مخمری در خانه‌های شمارش گلبول‌های سفید شمرده شده و طبق فرمول زیر محاسبه گردید :

مخمر در $mL = 10^4 *$ تعداد مخمر (در یک خانه)

رقت حاصله طوری تهیه شده که مقدار سلولهای موجود در آن 10^6 سلول به‌ازای هر میلی‌لیتر سوسپانسیون مخمری باشد.

[1]NCCLS: National Criteria of Clinical Laboratory Standards

سوسپانسیون حاصل در طول موج ۵۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری دارای عبور نوری ۹۰٪ است که اندازه‌گیری شد. مایع تلقیحی تهیه شده باید بلافاصله مورد استفاده قرار گیرد تا در فاصله زمانی پس‌از استاندارد کردن، تکثیر صورت نگیرد (۱۰، ۱۱، ۱۲).

در روش اندازه‌گیری MIC در محیط مایع به روش ماکرودیلوشن براث ابتدا یک میلی‌لیتر محلول استوک هر یک از داروهای مورد آزمایش را با ۹ میلی‌لیتر از محیط مایع استریل رقیق کرده و غلظت نهایی ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر را به‌دست آورده شد برای آمفوتریسین B از غلظت نهائی ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده می‌کنیم.

برای آزمایش هریک از داروها بر روی هر قارچ، ۱۱ لوله در پیچ‌دار (۱۶mm*۱۱۰) که هر یک حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط مایع استریل بوده در جا لوله‌ای قرار داده و از شماره ۱ تا ۱۱ شماره‌گذاری شد. سپس یک میلی‌لیتر از داروی مورد آزمایش رقیق شده (۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) به اولین لوله اضافه کرده و پس از مخلوط کردن، ۱ میلی‌لیتر از محتویات لوله اول به لوله دوم انتقال می یابد و این ترتیب رقیق شدن پی‌در پی تا لوله نهم ادامه یافته و از این لوله ۱ میلی‌لیتر مخلوط ماده داروئی و محیط کشت مایع خارج و دور ریخته می شود. بدین‌ترتیب غلظت‌های (۶۴تا۰.۲۵٪) میکروگرم در میلی‌لیتر ماده مورد آزمایش بدست می آید و برای آمفوتریسین غلظت‌های ۱۶ تا ۰/۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست می‌آوریم. به کمک سمپلر ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی مورد آزمایش به ۱۰ لوله اول اضافه کرده.

لوله شماره ۱۰، شاهد مثبت و فاقد دارو و لوله شماره ۱۱ شاهد منفی بوده و فاقد دارو و میکروارگانیسم است.

لوله‌ها در گرمخانه ۳۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرارگرفت و در نهایت مخمرها بعد از ۴۸ ساعت که شاهد مثبت رشد کرده بود نتایج خوانده شد و کمترین غلظتی که از رشد قارچ جلوگیری کرده بود به عنوان MIC دارو برای گونه مربوط ثبت گردید (۱۰، ۱۱، ۱۳).

برای انجام تست حساسیت به‌وسیله فلوسیتومتری ابتدا باید پارامترهای دستگاه (BD کالیبر FACS)را برای مخمر تنظیم کرد. برای این‌کار ابتدا یک سوسپانسیون مخمری زنده را با رنگ پروپیدیوم یدید(PI) رنگ‌آمیزی کرده و به دستگاه داده شد. سپس یک سوسپانسیون مخمری کشته شده با حرارت را با رنگ PI رنگ‌آمیزی کرده و تهیه می شود و در نهایت مخلوطی از سلولهای زنده و مرده را با رنگ PI رنگ‌آمیزی نموده و در دستگاه قرار گرفته می شود.

پروپیدیوم یدید (PI) یک رنگ فلورسنتی است که از غشاء سلولهای مرده عبور می‌کند و به DNA این سلولها متصل می‌شود. این رنگ قادر به عبور از غشاء سلولهای زنده نیست. PI با طول موج ۴۸۸nm تحریک می‌شود و نور فلورسنس با طول موج ۵۵۰ تا ۶۷۰ nm را از خود منتشر می‌کند. در مطالعه اخیر از سدیم داکسی کلات برای افزایش نفوذپذیری رنگ پروپیدیوم یدید (PI) از بین دیوارهٔ سلولی سلولهای مخمری استفاده شده است. در این روش ابتدا از کشت ۲۴- ۱۸ ساعته مخمر (جدا شده روی محیط سابوردکستروزآگار)، سوسپانسیون مخمری در سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪ تهیه شد. دانسیته سلول‌های مخمری به وسیله اسپکتروفتومتر برابر با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد. یک میلی‌لیتر محلول استوک هریک از داروهای مورد آزمایش را با ۹ میلی‌لیتر از محیط مایع استریل رقیق کرده و غلظت نهائی ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر را به‌دست آمد (برای آمفوتریسین B غلظت نهائی ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر).

برای آزمایش هریک از داروها بر روی هر قارچ، ۱۱ لوله در پیچ‌دار (۱۶mm*۱۱۰) که هریک حاوی نیم میلی لیتر RPMI 1640 حاوی گلوتامین بدون بی‌کربنات که با MOPS (مورفولین پروپان سولفونیک اسید) در PH = ۷ بافری شده است در جالوله‌ای قرار داده و از شماره ۱ تا ۱۱ شماره‌گذاری شد. نیم میلی‌لیتر از داروی مورد آزمایش رقیق شده به اولین لوله اضافه شده و پس‌از مخلوط کردن، نیم میلی‌لیتر از محتویات لوله اول را به لوله دوم انتقال داده و این ترتیب رقیق شدن پی‌درپی تا لوله نهم ادامه یافته و از این لوله نیم میلی‌لیتر

دور ریخته شد.

سپس نیم میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمری به نیم میلی‌لیتر رقت داروئی سریال اضافه کرده و در ۳۵°C انکوبه شد. لوله کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون مخمری و محیط $RPMI_{1640}$ بدون دارو است. لوله کنترل منفی حاوی محیط کشت و بدون مخمر است.

مخلوط دارو و سوسپانسیون مخمری برای آمفوتریسین B۴-۲ ساعت و برای دیگر داروها ۶-۴ ساعت انکوبه شدند. (۱) سدیم داکسی کلات و PI در پایان انکوباسیون اضافه شد و شدت فلورسنت با فلوسیتومتری (Becton Dickinson) FACS calibour اندازه‌گیری شد.

مرحله رنگ‌آمیزی به‌وسیله PI (پروپیدیوم یدید)

الف) بدون سدیم داکسی کولات (SDC): در پایان انکوپاسیون ۴۰۰ میکرولیتر از مخلوط مخمر و دارو را در لوله‌های فالکون ۷۵*۱۲ ریخته و ۱۰µl از رنگ PI (۲۰۰µg/ml) به هر رقت اضافه گردید و به مدت ۱/۵ تا ۴ ساعت بسته به نوع دارو و نوع فیزیولوژی مخمر انکوبه می‌کنیم سپس در دستگاه گذاشته شد.

ب) با سدیم داکسی کولات (SDC): ابتدا یک غلظت استوک ۲۵mM، سدیم داکسی کولات تهیه کرده و آن را به میزان $\frac{1}{8}$ ، $\frac{1}{16}$ و $\frac{1}{32}$ با آب مقطر رقیق گردید، ۲۰۰ میکرولیتر از این SDC رقیق شده را به ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت داروئی درون لوله فالکون اضافه کرده و ۵ میکرولیتر از رنگ PI (۲۰۰ µg/ml) به هر لوله نیز اضافه شد و لوله‌ها را بسته به نوع فیزیولوژی مخمر و نوع دارو بین زمان ۱۰ دقیقه تا ۳۰ دقیقه انکوبه می‌کنیم و سپس نمونه در دستگاه گذاشته شد.

تعیین MIC به وسیله فلوسیتومتری (FCM): کمترین غلظت دارو که ۵۰٪ افزایش در MCF[2] در مقایسه با کنترل مثبت نشان می‌دهد به‌عنوان MIC برگزیده شد (۱). مشخصات نمونه های، نتایج هر یک از آزمایشات در پرسشنامه ای ثبت گردید و سپس به وسیله آمار توصیفی و جداول توزیع فراوانی پردازش گردید.

نتایج

اثرات ضد قارچی داروهای آمفوتریسین B، فلوکونازول، میکونازول، کلوتریمازول و کتوکونازول بر روی سوش‌های مخمری کاندید آلبیکس PTCC5027، کاندیدا کفایر، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا دابلینینسیس به دو روش ماکرودیلوشن براث و فلوسیتومتری تعیین گردید که در جدول ۱ نشان داده شده است.

آزمایش‌ها برای هر دارو حداقل ۲ بار تکرار گردید. شکل ۱ کمترین غلظت مهار کنندگی(MIC)آمفوتریسینB بر روی سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس PTCC5027 به روش ماکرودیلوشن براث و به روش فلوسیتومتری را نشان می دهد.که در هر دو روش جواب یکسان است.

[2] Mean Channel Fluorescence

جدول ۱- اثرات ضدقارچی داروهای ضدقارچ بر روی مخمرهای انواع مختلف کاندیداآلبیکانس

	میکونازول		آمفوتریسین B		فلوکونازول		کلوتریمازول	
سوش قارچی	FCM	NCCLS	FCM	NCCLS	FCM	NCCLS	FCM	NCCLS
کاندیداآلبیکانس	۱	۱	۰/۵	۰/۵	۱۶	۸	۱	۲
کاندیدا کفیر	۱	۰/۵	۱	۰/۵	۴	۲	۱	۰/۵	۳۲
کاندیدا آلبیکانس	۲	۲	۰/۵	۰/۱۲۵	۸	۸	۲	۰/۵	۰/۵	۴
کاندیدا کلابراتا	۱	۱	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۴	۴	۴	۸	۸	۸
کاندیدا پاراپلوزیس	۲	۱	۰/۵	۰/۵	۱	۲	۱	۴	۴	۲
کاندیدا دابلینیسیس	۰/۵	۱	۱	۰/۲۵	۲	۴	۶۴	۰/۵	۰/۵	۳۲

بحث

امروزه به علت کشف داروها و ترکیبات ضد قارچی جدید از یک سو و مشاهده مقاومت پاره‌ای از عوامل قارچی نسبت به بعضی داروها مانند فلوروسیتوزین و آمفوتریسین B و همچنین افزایش میزان بروز عفونتهای قارچی و استفاده از داروهای ضد قارچی مختلف، از طرف دیگر بیش از پیش نیاز به آزمایش تعیین حساسیت داروئی جهت قارچ‌ها احساس می‌شود (۱۲). پزشکان معتقدند حداقل برای درمان مناسب بیمارانی که به عفونت‌های سیستمیک و خطرناک قارچی مبتلا هستند، انجام آزمایش برای تعیین حساسیت عامل بیماری نسبت به داروهای ضد قارچی ضروری است (۱۳، ۱۴).

علاوه بر کاندیدا آلبیکنس گونه‌های دیگر کاندیدا نیز مکرراً باعث عفونت در بیماران با نقص ایمنی می‌شوند. بعضی از این پاتوژن‌ها مقاومت ذاتی یا الگوی حساسیت متفاوت در برابر آزول‌های معمولی دارند.

باتوجه به مراتب یاد شدهٔ بالا روش حساسیت سنجی دقیق، سریع و کارآمد مورد نیاز است. در این بررسی آزمایش‌های انجام شده به‌روش فلوسیتومتری و نیز روش NCCLS با هم قابل مقایسه و همچنین تکرارپذیر بودند و از آنجائی که تعداد زیادی سلول آزمایش می‌شوند و سلولهای مرده و زنده حتی در حد تعداد بسیار کم مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند می‌توان گفت از دقت بالائی برخوردار است.

در مورد سرعت نیز نظر به این که زمانی که برای انجام آزمایش لازم است حدود ۶-۴ ساعت است که در مقایسه با روش‌های دیگر که حداقل ۴۸ ساعت می‌باشد از این بابت هم ارزش این روش مشخص می‌گردد.

ضمن تجربیات این نتیجه بدست آمد که سرعت کار در شرایط یکسان برای آزمایش بستگی به نوع دارو، نوع رنگ فلورسنس و گونهٔ و حتی نژاد قارچ مورد استفاده دارد.

با مراجعه به کارهای انجام شده در این مطالعه رنگ PI با غلظت 200µg/ml به‌عنوان رنگ فلورسانس و محیط کشت RPMI1640 و نیتروژن حاوی ۱٪ دکستروز جهت رقیق‌سازی دارو و از سدیم داکسی کولات جهت افزایش نفوذپذیری رنگ استفاده شد (۱۲). نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که اثر داروهای ضد قارچی بر روی گونه‌های مخمری را می‌توان در طی ۶-۴ ساعت انکوباسیون به وسیله فلوسیتومتری بدست آورد و نتایج بدست آمده در این تحقیق مشابه مطالعات انجام شده توسط رامانی[3] و همکارانش (۷،۱) و گرین[4] و همکارانش (۸) بود. در این مطالعه همانند روش محققین دیگراز سدیم داکسی کولات برای افزایش نفوذپذیری رنگ به داخل سلول استفاده شد (۱، ۷، ۱۵). اما غلظت پیشنهادی توسط این محققین (۲۵mM) بر روی مخمرهای زنده مورد مطالعه اثر کشندگی داشت که طی یک رشته آزمایش‌های نمونه جهت انتخاب غلظت مناسب انجام شد و

[3] Ramani
[4] Green

غلظت ۱/۳۲، ۱/۱۶ و ۱/۸ از غلظت پیشنهادی آنها برای مطالعه مناسب شناخته شد.

نتیجه گیری

بعضی از ترکیبات نظیر آزول‌ها به علت حلالیت کم در آب و ایجاد تیرگی در محیط‌های کشت تعیین دقیق و صحیح MIC برای آنها براساس روشهای کدورت سنجی دشوار و شاید هم غیر ممکن باشد که در چنین مواردی برای درگیر نشدن با این مشکلات می‌توان از فلوسیتومتری سود جست که این یکی از دلایل کارآمد بودن روش فلوسیتومتری می‌باشد. روی هم رفته می‌توان نتیجه گرفت که این روش دقیق، سریع و کارآمد می‌باشد.

تشکر و قدر دانی

به این وسیله از شرکتهای دارویی بهوزان رشت وپارس دارو جهت اهدای داروهای ضد قارچی تشکر وقدر دانی می شود.

****

References:

1- Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptitility testing of pathogenic yeasts other than candida albicans and comparison with the NCCLS broth MICrodilution test. AntiMICrob. Agent Chemother. 2000; 44: 2752 - 8.

2- Kirk S M, Callister S. M, Lim L.C.L, Schell R.F. Rapid susceptibility testing of candida albicans by flow cytometry. J Clin-MICrobiol 1997; 35: 358-363.

3- Wenisch C, Moore C, Krause R, Presterl E Antifungal susieptibility testing of fluconazole by flow cytometry correlates with clinical outcome. J Clin MICro July 2001; 2458-62.

4- Chaturvedi V, Ramani R Pfaller M.A.Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal testing of candida albicans. J Clin Microbiol 2004; 42:2249-51.

5- Rudensky B, Broidie E, et al. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of candida species.J of Antimicrobial chemotherapy 2005;55:106-109.

6- Mitchell M, Hudspeth M, Wright A. Flow Cytometry Susceptibility Testing for the Antifungal Caspofungin J Clin Microbiol June 2005; 2586–9.

7- Ramani R, Ramani A, Wong SJ. Rapid Flow cytometric susceptibility Testing of candida albicans. J Clin MICrobiol 1997; 35: 2320-4.

8- Green L, Petersen B, Steimel L. Haeber P. Current W. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. J Clin MICrobiol 1994; 32: 1088-91.

9- Wenisch C, Linnau KF, Parschalk B, Zed twitz – Liebenstein K, Georgopoulos A. Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. J Clin MICro 1997; 35: 5-10.

10- National Committee for clinical loboratory standards. 2002. Reference Method for Broth Dilution antifungal Susceptibility Testing of yeasts; Approved Standard second Edition.

۱۱- اوانس ای جی، ریچارد سن ان جی. «قارچ شناسی پزشکی روشهای عملی» ترجمه خسروی، علیرضا. فصل ۱۱. صفحهٔ ۳۴۹-۳۱۳، انتشارات جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. چاپ دوم ۱۳۸۲.

۱۲ - زینی، فریده. امامی، مسعود و مهبد، امیرسید علی «قارچ‌شناسی پزشکی جامع» فصل ۹ صفحهٔ ۴۵۵-۴۱۳، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ پنجم، پائیز ۱۳۷۶.

13- Ghannoum M A, Rex JH, Galgiani J. N. Susceptibility testing of Fungi: current status of correlation of in vitro data with clinical outcome. J Clin MICrobiol 1996; 34: 489-495.

14- O'Gorman M R, Hopfer RL. Amphotericin B suceptibility testing of candida species by flow cytometry Cytometry 1991; 12: 743-7.

15- Martin E, Schlasius U, Bhakdi S. Flow cytometric assay for estimating fungicidal activity of amphotericin B in human serum. Med MIC Immun 1992; 181: 117-126.