فصلنامه (علمی – پژوهشی)
زیست شناسی تکوینی
سال سیزدهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۰ ص. ۱۸-۷

مقاله پژوهشی

مقایسه اثرات ضد قارچی عصاره‌های آبی و الکلی و اسانس پونه با داروی فلوکونازول بر رشد سویه‌های قارچ *کاندیدا آلبیکنس*

توحید پیری قراقیه[1*]، شیدا بیرانوند[1]، سامه حاجی محمدی[2]، اسکندر حسین نژاد لزرجانی[3]

[1] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
[2] گروه برق، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه غیرانتفاعی عالی واحد ایوانکی، ایوانکی، ایران.
[3] گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

*Email: tohidpirie@yahoo.com

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۹

چکیده

در سال‌های اخیر شیوع بیماری‌های قارچ‌های فرصت‌طلب افزایش چشم‌گیری یافته است. کاندیدا آلبیکنس یکی از پاتوژن‌های قارچی معمول است که نسبت به داروهای گروه آزول مقاوم شده است. در این تحقیق به مقایسه اثر ضدقارچی عصاره آبی و الکلی و اسانس گیاه پونه روی رشد کاندیدا آلبیکنس با داروی فلوکونازول پرداخته شده است. در این مطالعه ۱۰۰ نمونه قارچی کاندیدایی از بیماران تهیه شد. با انجام تست‌های تشخیصی میکروسکوپی، بیوشیمیایی و آزمایش جذب قند توسط کیت API20C نمونه‌های قارچی کاندیدا آلبیکنس جدا شد. سپس روش مولکولی PCR-RFLP برای شناسایی گونه‌های مختلف مخمر کاندیدا و افتراق آن‌ها از یکدیگر (با کاندیدا آلبیکنس) مورد استفاده قرار گرفت. طبق استاندارد انتشار از دیسک NCCLS، دیسک‌های ۲۵ میلی‌گرمی فلوکونازول تهیه شد. استخراج عصاره به روش پرکولاسیون و استخراج اسانس به روش تقطیر با آب صورت گرفت. سویه استاندارد کاندیدای ATCC14053 جهت ارزیابی کنترل کیفی کار استفاده شد. مقایسه اثر ضدقارچی عصاره‌های پونه به همراه اسانس پونه با داروی فلوکونازول، روی این جدایه‌ها با دو روش دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن انجام شد. بیش‌ترین فراوانی نسبی مخمر جدا شده از نمونه‌های کاندیدایی مربوط به کاندیدا آلبیکنس بود که در روش تشخیص بیوشیمیایی ۳۵% و در روش PCR-RFLP میزان ۳۸% از کل نمونه‌ها را شامل شد. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد برای عصاره‌های آبی و الکلی پونه ۱، اسانس پونه ۲۳/٤ و برای فلوکونازول ۲٦/۱٦ میلی متر بود که نشان دهنده عملکرد ضد قارچی بهتر فلوکونازول و تفاوت معنی دار آن نسبت به اسانس پونه بود ($P \leq 0.05$). میزان حداقل غلظت عصاره الکلی و آبی پونه و فلوکونازول به ترتیب ٤ و ۸ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای MIC و ۸ و ۱٦ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای MFC بود. میزان انحراف معیار عصاره الکلی پونه در تست MFCبرابر با ۳/۵۵ بود؛ در حالی‌که برای فلوکونازول ۳/٦۸ بود. با توجه به اینکه از لحاظ آماری هر چه انحراف معیار کمتر باشد، عملکرد بهتر است؛ از این رو عصاره الکلی پونه عملکرد

بهتری نسبت به فلوکونازول داشت. این نتایج بیانگر عملکرد بهتر و تفاوت معنی‌دار عصاره الکلی پونه نسبت به فلوکونازول می‌باشد ($P\leq 0.05$). با توجه به نتایج حاصل از تحقیق فوق، به نظر می‌رسد عصاره الکلی گیاه پونه می‌تواند به عنوان یک کاندید دارویی مناسب با عملکردی ضد قارچی بهتر از فلوکونازول در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: کاندیدا آلبیکنس، عصاره پونه، فلوکونازول، تست‌هایMIC و MFC.

۱. مقدمه

کاندیدا آلبیکنس به عنوان یک فلور طبیعی در بخش‌های مختلف بدن انسان از جمله دستگاه گوارش، دستگاه ادراری تناسلی و به میزان کمتری پوست زندگی می‌کند و در شرایطی که فرد دچار ضعف سیستم ایمنی به دلایل مختلف می‌شود، به یک پاتوژن فرصت طلب تبدی می‌گردد [۱]. با توجه به این که کاندیدا آلبیکنس یک پاتوژن قارچی یوکاریوت است، بسیاری از مسیرهای بیولوژیکی آن با انسان مشترک است. از طرفی، بیشتر داروهای ضد قارچی مورد استفاده دارای اثرات جانبی در دوزهای مورد استفاده می‌باشند [۲]. بنابراین شناسایی داروهای ضد قارچی که اثرات جانبی کمتری بر بدن انسان داشته و سبب از بین رفتن کامل پاتوژن قارچی گردد، بسیار حائز اهمیت است. این قارچ فرصت طلب می‌تواند موجب بیماری‌هایی از قبیل برفک، واژنیت، عفونت پوست، اندوکاردیت[1]، مننژیت[2]، آبسه مغزی و حتی آرتریت[3] در میزبان انسانی شود [۲]. آزول‌ها از جمله رایج ترین داروهای ضد قارچی مورد استفاده در درمان هستند که فعالیت آن‌ها از طریق مهار آنزیم لانوسترول دی متیلاز و ممانعت از تبدیل لانسترول به ارگوسترول (استرول اصلی غشای کاندیدا آلبیکنس) می‌باشد. یکی از داروهای تری آزولی رایج، فلوکونازول است که در درمان عفونت‌های قارچی سطحی و سیستمیک ناشی از کاندیدا آلبیکنس استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر گزارشات متعددی از شکست در درمان مبتلایان به اشکال بالینی متفاوت کاندیدیازیس به خصوص داروهای آزولی ارائه شده است [۳].

تقریباً ۱۰ % بیماران مبتلا به واژنیت کاندیدایی، به درمان آغازین پاسخ نمی‌دهند. با وجود گذشت بیش از ۵۰ سال از کشف عفونت‌های سیستمیک کاندیدایی، داروی اصلی در درمان، همچنان آمفوتریسین B می‌باشد، هرچند که این مسئله ممکن است با معرفی آزول‌های جدیدی مانند وریکونازول تغییر کند [٤]. مشکل اصلی در درمان با آمفوتریسین B، سمّیت این دارو بوده که هزینه بالای فرمولاسیون‌های لیپیدی، استفاده عملی از آن را تحت الشعاع قرار داده است [٥]. برخی استفاده از فلوکونازول را در دوزهای بالا در بسیاری از موارد برای عفونت کاندیدایی پیشنهاد می‌کنند که نه تنها کاندیدا کروزئی و کاندیدا گالبراتا به فلوکونازول مقاوم هستند؛ بلکه در اثر استفاده درمانی مکرر و طولانی مدت از فلوکونازول، حتی کاندیدا آلبیکنس نیز به آن مقاوم می‌گردد. از این رو تحقیقات مختلفی در زمینه یافتن ترکیبات ضد قارچی موثر با منشاء طبیعی و اثرات جانبی کمتر انجام پذیرفته است [٦]. به دلیل افزایش مقاومت در بین گونه هاي کاندیدیایي به داروهاي شیمیایي و همچنین اثرات نامطلوبی مثل تهوع، درد شکمی، استفراغ و سردرد، راش‌های پوستی و... این ترکیبات روي بیماران، لازم است تحقیقات بیشتري در جهت جایگزیني این ترکیبات با ترکیبات گیاهي بدون عارضه جانبی یا ترکیبات شیمیایي و یا سنجش هم اثري این ترکیبات با آنتي‌بیوتیک‌ها، جهت کاهش سمیت داروهاي شیمیایي انجام شود [۱۰-۷]. پونه از دسته سبزیجات با طبیعت گرم و خشک است که مصرف زیادی در بین خانواده‌های ایرانی دارد. دم کرده این سبزی برای درمان اسهال بسیار مفید است. پونه برای رفع عصبانیت خوب است و همچنین خاصیت اشتها آوری دارد و به هضم غذا نیز کمک می‌کند. گیاه پونه حاوی گلیکوزیدهای دیوسمین و دیوسمتین، لیمونن، کارواکرول،

[1] Endocardit
[2] Meningitis
[3] Arthritis

کربوهیدرات‌ها و ترکیبات فنولی می‌باشد [۱۵-۸]. عصاره این گیاه همچنین بر سیستم گوارش اثر داشته و دارای اثرات تب بری و ضد برونشیت است. از خواص دیگر این گیاه می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد اضطرابی و ... اشاره کرد [۸]. از آنجا که مطالعه‌ای روی اثرات ضد قارچی عصاره گیاه پونه بر رشد کاندیدا آلبیکنس بررسی نشده است، لذا در این مطالعه به منظور مقایسه اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی و الکلی پونه با داروی فلوکونازول روی رشد کاندیدا آلبیکنس پرداخته شد.

۲. مواد و روش کار

۲-۱. جداسازی و تشخیص

۲-۱-۱. بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی سویه‌ها

دراین مطالعه توصیفی-مقطعی نمونه گیری به صورت کاملاً تصادفی انجام گرفت. البته انتخاب افراد، میزان نمونه و روش برداشت نمونه برعهده پزشک متخصص بود. حجم نمونه از فرمول ۱ محاسبه شد.

$$x = \frac{z2pq}{d2}$$

در این فرمول x حجم نمونه، z درصد خطای معیار، p ضریب اطمینان قابل قبول، q (1-p) نسبتی از جمعیت فاقد صفت معین و d درجه اطمینان یا دقت احتمالی مطلوب می‌باشد [۱٤].

به دنبال کشت ۱۰۰ نمونه قارچی کاندیدایی جداسازی شده از بیماران مبتلا به اشکال بالینی مختلف کاندیدیازیس از بیمارستان‌های شهرکرد، تمام نمونه‌ها جهت جداسازی مخمرها روی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت داده شده و پلیت‌ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. پس از تهیه لام از کلنی‌های حاصل و رنگ آمیزی گرم، کلنی‌ها از لحاظ حالت مخمری بودن مورد بررسی قرار گرفتند. کلنی‌های مخمر حاصله روی محیط کروم آگار کاندیدا به صورت Streak کشت داده شده و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. سپس وجود یا عدم وجود کلامیدوکونیدی در محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ بررسی گردید. به منظور مطالعه تولید لوله زایا، قسمتی از کلنی مخمر به لوله حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم انسان منتقل و سوسپانسیون حاصله به مدت ۳-۲ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه، قطره ای از سوسپانسیون مزبور بین لام و لامل در زیر میکروسکوپ بررسی گردید. سپس آزمایش جذب قند با کیت API20C (شرکت Biomerieux SA، فرانسه) انجام شد.

۲-۱-۲. بررسی مولکولی سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* با PCR-RFLP

در این مطالعه روش مولکولي PCR-RFLP برای شناسایي گونه‌های مختلف مخمر کاندیدا و افتراق آنها از یکدیگر (با کاندیدا آلبیکنس) مورد استفاده قرار گرفت. منطقه ژني ITS(Internal transcript spacer) مربوط به ژن ریبوزومال DNA برای تکثیر انتخاب گردید. برای تکثیر این ناحیه ژني از یک روش بدون نیاز به استخراج بنام- Rapid Colony PCRاستفاده گردید **[۳۳]**.

سلول‌های مخمری مستقیماً به پروفایل PCR برده شد. در فرآیند اخیر از یک جفت پرایمر یونیورسال اشاره شده در جدول ۱ استفاده شد. برای تأیید آمپلیفیکاسیون قطعه ژني، محصول PCRالکتروفورز افقي بکار برده شد. سپس با کاربرد آنزیم محدودالاثر Msp I، اقدام به هضم قطعات تکثیر یافته DNA ناحیه ژني ITS نموده تا با توجه به الگوهای برش متفاوت در گونه‌های مختلف، امکان شناسایي و تفکیک بین گونه‌های کاندیدا از روی جداول الگو فراهم گردد (۳٤).

جدول ۱. توالی پرایمر مورد استفاده در این پژوهش

نوع پرایمر	سکانس پرایمر (/3 to /5)	ژن هدف
یونیورسال	F: 5-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3 R: 5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3	ITS

۲-۲. تهیه مواد دارویی و گیاهی:

۲-۲-۱. تهیه دیسک‌های دارویی فلوکونازول:

طبق استاندارد انتشار از دیسک NCCLS، برای تهیه دیسک‌های ۲۵ میلی‌گرمی فلوکونازول (داروسازی امین، ایران)، ۲ میلی‌گرم پودر آن را در ۱ میلی لیتر بافر فسفات سالین حل کرده، پس از ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه استریل و توسط فیلتر سرنگی، فیلتر و به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر استوک دارویی بر روی دیسک‌ها با قطر ۵ میلی‌متر تلقیح و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شده و پس از خشک شدن در دمای ۴ درجه نگهداری گردید.

در این بررسی داروی ضدقارچی به صورت پودری بود که از فرمول زیراستفاده شد:

$$\text{وزن } \boldsymbol{mg} = (\text{غلظت } (\mu\boldsymbol{g})/\boldsymbol{ml} \times \text{حجم } \boldsymbol{ml})/(\text{درجه خلوص } (\mu\boldsymbol{g})/\boldsymbol{ml})$$

۲-۲-۲. تهیه عصاره‌های گیاهی

الف: تهیه عصاره آبی و الکلی پونه

۵۰ گرم از گیاه پونه ازموسسه استاندارد گیاه شناسی کرج با کد هرباریوم ۲۱٤٦۹۵ تهیه شد، سپس گیاه مذکور در مجاورت هوا و در سایه خشک و سپس پودر شده و آنگاه ۱۰۰ گرم از پودر خشک و آسیاب شده را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کرده و پس از نیم ساعت خیس خوردن، روی هیتر برقی در دمای ۷۰-۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت قرار گرفت. سپس عصاره‌ی آبی جمع‌آوری شده و در دمای ۷۰- درجه جهت مصارف بعدی نگهداری شد. جهت تهیه عصاره الکلی ۵۰ گرم گیاه در الکل ۷۰ % پس از سه روز در دستگاه روتاری در دمای ٦۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه گذاشته شد. سپس عصاره حاصله به وسیله تنظیف که قبلا اتوکلاو شده است، طی ۲ مرحله صاف شد. با به کارگیری دستگاه روتاری، حلال جداشد. سپس توسط فیلتر سر سرنگی ٤٤ % عصاره فیلتر شد، تا عصاره استریل شود و آلودگی‌های احتمالی از بین برود. در نهایت درون ظرفی ریخته و در یخچال ۰-٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اطراف لوله آزمایش توسط فویل برای جلوگیری از رسیدن نور به عصاره پوشانده شد [۲۱].

ب: تهیه رقت‌های عصاره

عصاره به دست آمده از گیاه توسط محیط کشت 1640 RPMI (Thermo Fisher، USA) رقت‌سازی شد. برای این منظور عصاره الکلی توسط دی متیل سولفوکساید و عصاره آبی توسط محیط RPMI 1640 با غلظت‌های mg/ml ۰/٦٤، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۸ رقت‌سازی شد [۲۵].

جدول۲. استاندارد داروهای ضد قارچی

مرحله	غلظت $\mu g/ml$	منبع	حجم ml	DMSO ml	غلظت میانی $\mu g/ml$	غلظت نهایی ۱:۱۰۰ $\mu g/ml$
۱	۱۶۰۰	Stock	-	-	۱۶۰۰	۳۲
۲	۱۶۰۰	Stock	۰/۵	۰/۵	۸۰۰	۱۶
۳	۱۶۰۰	Stock	۰/۵	۱/۵	۴۰۰	۸
۴	۱۶۰۰	Stock	۰/۵	۳/۵	۲۰۰	۴
۵	۲۰۰	مرحله۴	۰/۵	۰/۵	۱۰۰	۲
۶	۲۰۰	مرحله ۴	۰/۵	۱/۵	۵۰	۱
۷	۲۰۰	مرحله ۴	۰/۵	۳/۵	۲۵	۰/۵
۸	۲۵	مرحله ۷	۰/۵	۰/۵	۱۲/۵	۰/۲۵
۹	۲۵	مرحله ۷	۰/۵	۱/۵	۶/۲۵	۰/۱۲۵
۱۰	۲۵	مرحله ۷	۰/۵	۳/۵	۳/۱۳	۰/۰۶۲۵

۳-۲. ارزیابی تاثیر دارو و عصاره پونه

۱-۳-۲. ارزیابی تاثیر داروی فلوکونازول و عصاره‌های گیاهی به روش دیسک دیفیوژن:

روش دیسک گذاری طبق متد موسسه استاندارد کلینیکی و آزمایشگاهی انجام شد. برای این کار در ابتدا از کاندیدا آلبیکنس کشت ٢٤ ساعته تهیه شد. سپس از این نمونه‌ها سوسپانسیونی با رقت نیم مک فارلند آماده شد (با طول موج ۵۳۰ نانومتر و اپتیکال دنسیتی بین ۰/۱۳- ۰/۰۹). قبل از کشت، سوسپانسیون به مدت ۳-۵ دقیقه ورتکس و به صورت کشت متراکم بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. بعد از حدود ۱۵ دقیقه دیسک‌های استریل فلوکونازول و دیسک های استریل حاوی رقت‌های مختلف گیاه پونه که توسط دی متیل سولفوکساید و RPMI 1640 رقیق شده بود به کمک پنس استریل بر روی محیط‌کشت قرار داده شد. دیسک‌ها باید با فاصله مناسب از هم و فاصله مناسب از دیواره قرار بگیرند. سپس قطر هاله ممانعت از رشد پس از ٢٤-٤٨-٧٢ ساعت انکوباسیون پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتي‌گراد اندازه گیری شد. همچنین اثر ضدمیکروبي این عصاره و اسانس ها در مقایسه با دیسک‌های آنتي بیوتیک فلوکونازول مورد بررسي قرار گرفت.

۲-۳-۲. ارزیابی تاثیر دارو فلوکونازول و عصاره آبی و الکلی پونه به روش میکرودایلوشن

به‌منظور ارزیابی تاثیر داروهای ضدقارچی، میکروپلیت‌های ٩٦ خانه‌ای ته صاف به ابعاد ۱۲×۸ استفاده گردید. در هر سری یک چاهک کنترل در نظر گرفته شد، که حاوی ۰/۱ سی‌سی محیط‌کشت RPMI1640 و ۰/۱ سی-سی سوسپانسیون قارچی رقیق شده بود. در چاهک ۱ بالاترین رقت دارویی به میزان ۰/۱ میلی لیتر ریخته شد تا چاهک ۱۰ که کمترین رقت دارویی ریخته می‌شود. سپس در هر چاهک ۰/۱ سی‌سی سوسپانسیون قارچ مورد نظر افزوده و پیپتاژ شد. رقت‌های دارویی فلوکونازول در مجاورت قارچ‌ها ۳۲، ١٦، ٨، ٤، ٢، ١، ٠/٥، ٠/٢٥، ٠/١٢٥، ٠/٠٦٢٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر و رقت عصاره ها ٠/٦٤، ٠/١٢٥، ٠/٢٥، ٠/٥، ١، ٢، ٤، ٨ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی (MFC) عصاره‌ها با توجه به نتایج MIC تعیین شد [۲۷].

از چاهک‌هایی که رشد قارچ در آنها کاملا متوقف شده بود، با سوآپ استریل نمونه برداری و روی محیط کشت نوترینت و سابورو دکستروز آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ٢٤ ساعت کمترین غلظتی از عصاره و دارو فلوکونازول که قارچ در آن رشد نکرده بود، به عنوان مقادیر MFC گزارش شدند. از سویه کاندیدا ATCC14053 به منظور صحت عملکرد و کنترل کیفیت کار استفاده شد.

٤-۲. روش‌های آماری بکاررفته در نرم افزار SPSS برای هر سه روش

تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) یکی از تحلیل‌های پرکاربرد است که در تمامی علوم کاربرد دارد. آنالیز داده‌ها MIC و MFC میانگین رشد ۳ تیمار با استفاده از واریانس یک طرفه توسط نسخه ۱۹ نرم افزار SPSS به دست آمد.

۳. نتایج

۱-۳. نتایج جداسازی و شناسایی نمونه های قارچی

از ۱۰۰ نمونه کاندیدا تحت بررسی تعداد ۳۵ نمونه (35%) از نظر وجود کاندیدا آلبیکنس مثبت بودند. این ۳۵ ایزوله ازنظر وجود جرم تیوب، تولید کلامیدیوسپور مثبت و در محیط کروم آگار کاندیدا، کلنی به رنگ سبز روشن ایجاد کردند. فراوانی پراکندگی سایر کاندیداها در جدول ۳ نمایش داده شده است.

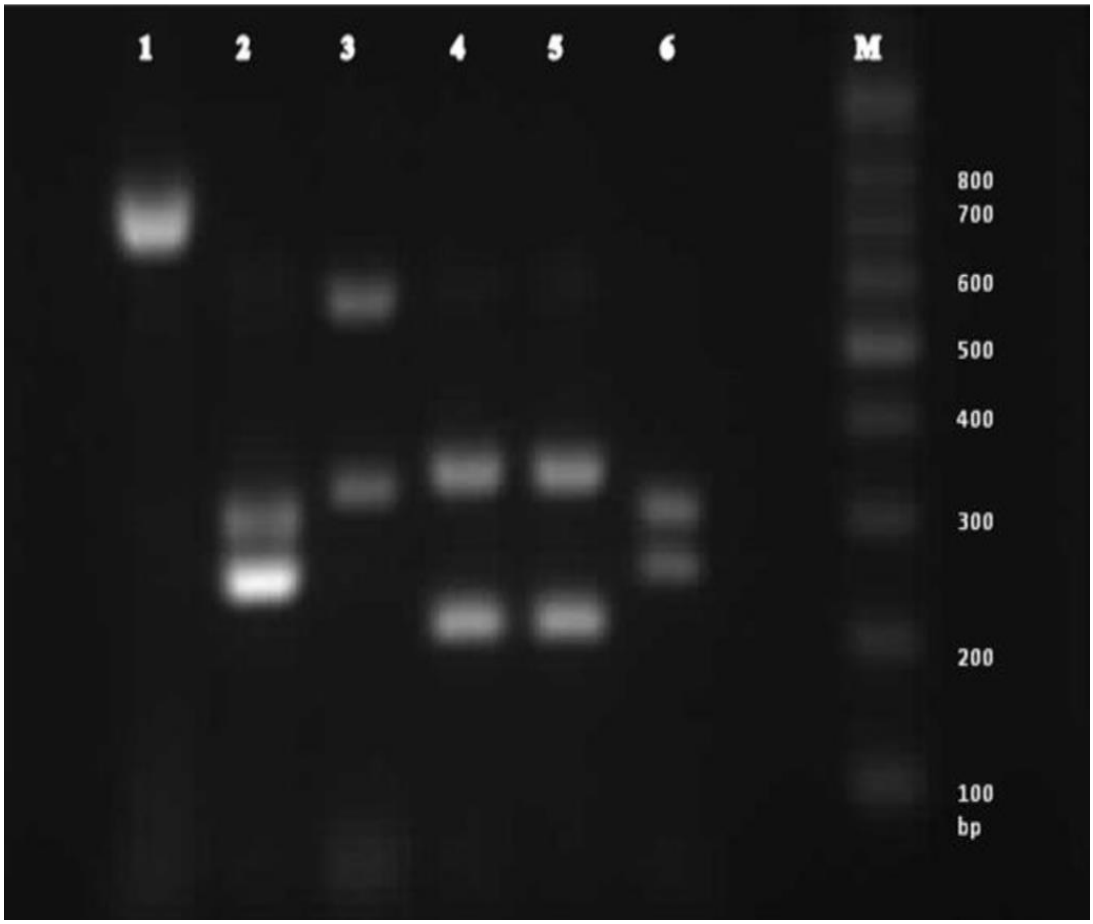
شناسایي مخمرها با دو روش، مورفولوژیک و مولکولي انجام گرفت که با اختلاف کمي منتهي به شناسایي گونه‌های کاندیدا گردید. در روش مورفولوژیک با کاربرد محیط کشت افتراقي مخمرها (CHA) و کیت API20C گونه‌های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا دابلینسیس و کاندیدا کروزئي شناسایي شدند (جدول ۳). نسبت درصد کاندیدا آلبیکنس و گونه‌های دیگر در جدول ۲ مشاهده

مي‌گردد. چنانکه ملاحظه مي‌گردد، کاندیدا آلبیکنس نسبت به گونه های دیگر کاندیدا درصد فراواني بالايي ۳۵% (۳۵ نمونه) نشان داد. این در حالیست که کاندیدا کروزئی دارای کمترین فراوانی با تعداد ۱۸ نمونه (۱۸%) بود.

سپس شناسايي بر پايه مولكولي با روش PCR-RFLP اختلاف چنداني به لحاظ درصد فراواني با روش بیوشیمیایی و میکروسکوپی نداشت (جدول ۳). در روش اخیر نیز گونه کاندیدا کروزئی کمترین درصد فراواني (۱۵%) را تشکیل داده بود با این تفاوت که تعداد ۳ نمونه از گونه‌های کاندیدا کروزئی به عنوان کاندیدا آلبیکنس (۳۸%) شناسایی شد.

جدول ۳. غربالگری پراکندگی انواع مخمر کاندیدا در بیماران مورد مطالعه

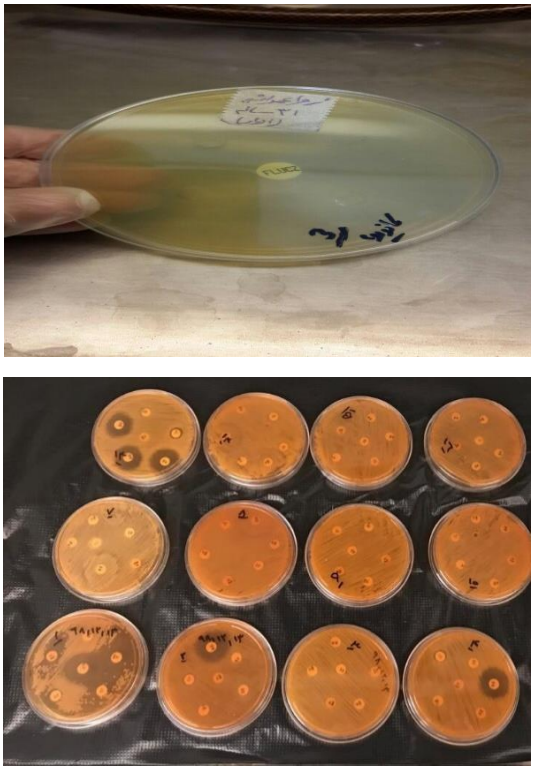
تشخیص فراوانی مخمر ها به روش PCR-RFLP		تشخیص فراوانی مخمر ها به روش بیوشیمیایی		گروه	تعداد بیماران
درصد نمونه	تعداد نمونه	درصد نمونه	تعداد نمونه		
%۳۸	۳۸	%۳۵	۳۵	کاندیدا آلبیکنس	۱۰۰
%۲۸	۲۸	%۲۸	۲۸	کاندیدا گلابراتا	
%۱۹	۱۹	%۱۹	۱۹	کاندیدا دابلینسیس	
%۱۵	۱۵	%۱۸	۱۸	کاندیدا کروزئی	



شکل ۱. نتیجه RFLP محصولات PCR از ایزوله های مخمری. M: لدر 100bp

۱: قطعه DNA محصول PCR بریده نشده است. ۲: کاندیدا گلابراتا ۳: کاندیدا دابلینسیس ٤ و ٥: کاندیدا آلبیکنس ٦: کاندیدا کروزئی

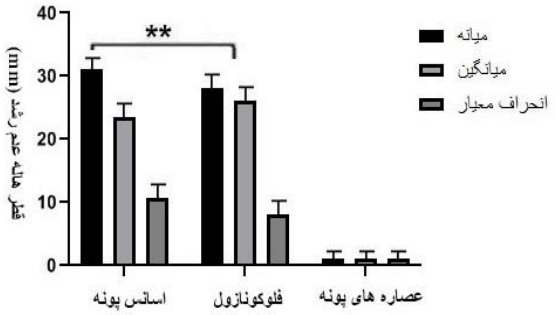
سپس با استفاده از دیسک‌های تهیه شده طبق پروتکل موسسه استاندارد کلینیکی و آزمایشگاهی M- 27-A، با رقت۱۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تست آنتی بیوگرام سویه‌های قارچی انجام و مطابق با شکل ۲ هر یک از سویه‌ها درصدی از مقاومت را از خود نشان دادند.



شکل ۲. دیسک آنتی بیوتیک تهیه شده فلوکونازول عصاره‌ها و تست آنتی بیوگرام سویه‌ها

۲-۳. نتایج دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) فلوکونازول و عصاره پونه:

در این روش ٤ تیمار مختلف را برای نمونه های مختلف قارچ کاندیدا آلبیکنس درنظر گرفته شد. داروی شیمیایی فلوکونازول با ۲ تیمار عصاره آبی و الکلی پونه و ۱ تیمار اسانس پونه مقایسه و عملکرد آن‌ها ارزیابی شد. در این روش، بیش‌ترین عدد در هر ردیف نمونه بهترین عملکرد محسوب می‌شود. هر چه اندازه‌ی هاله بیشتر باشد، باکتری مقاومت کمتری نسبت به آن دیسک دارد. هیچ هاله عدم رشدی در این روش برای عصاره‌های آبی و الکلی در تمام تیمار ها وجود نداشت که برای محاسبه آماری برابر با یک در نظر گرفته شده و مقادیر هاله عدم رشد برای داروی فلوکونازول و اسانس پونه در شکل ۳ ثبت شد. در روش آماری به جای عدد حداقل ۱ و به جای بیشتر از ۳۰ عدد ۳۱ را قرار دادیم، تا از لحاظ آماری قابل توجیه باشد. در این روش داروی فلوکونازول با اسانس پونه و ۲ تیمار دیگر مقایسه شد، و طبق مجموع داده اندازه‌ی هاله‌ها و میانگین آن‌ها مشخص شد که داروی فلوکونازول عملکرد بهتری نسبت به اسانس دارد. چون هر چه اندازه ی هاله بیشتر باشد خاصیت ضد قارچی بهتر است. انحراف معیار اسانس پونه بسیار زیاد بود. داده‌های اسانس پونه پراکنش بیشتری داشتند. عصاره‌ی آبی و الکلی پونه در این روش واکنشی نشان ندادند.



شکل ۳. نمودار مربوط به مقایسه میانگین، میانه و انحراف معیار در روش Disk برای ٤ تیمار. **P<0.01

انحراف معیار فلوکونازول (۸/۱۸۸۸) کمتر از اسانس پونه (۱۰/۶۶۵۳) بود که نشان دهنده عملکرد ضد قارچی بهتر فلوکونازول نسبت به اسانس پونه می‌باشد. همچنین میانگین قطر هاله عدم رشد فلوکونازول (۲۶/۱۶) بیشتر از اسانس پونه (۲۳/۴) بود که نشان از خاصیت ضد قارچی بهتر آن نسبت به اسانس پونه داشت. نتایج کلی تست دیسک دیفیوژن به عملکرد بهتر فلوکونازول دلالت دارد. ضمن اینکه اسانس پونه نمی تواند کاندید مناسبی به عنوان جایگزین برای داروی شیمیایی فلوکونازول باشد.

۲-۳. نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) فلوکونازول و عصاره پونه:

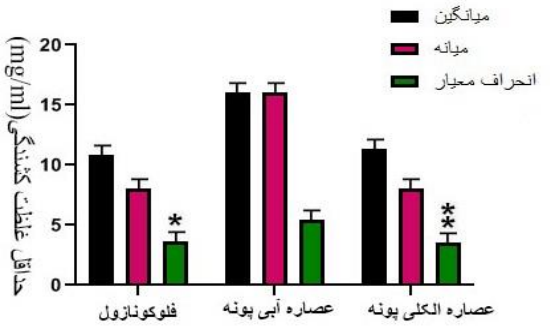
در این تست حداقل غلظت بازدارندگی داروی فلوکونازول با ۲ عصاره از گیاه پونه مقایسه و عملکرد آن ها ارزیابی شد. کمترین عدد در هر ردیف نمونه، بهترین عملکرد برای MIC

محسوب شد. چون در همان غلظت کم از دارو رشد قارچ متوقف شده است. هر چه در غلظت کمی رشد قارچ متوقف شود، اثر پذیری دارو بیشتر می باشد (جدول ٤).

با توجه به جمع داده‌ها و مقدار میانگین عصاره ی الکلی پونه [٦] در مقایسه با تیمار شاهد فلوکونازول (۷/۳٦)، عملکرد بهتری داشته است. از لحاظ آماری نیز هر چه انحراف معیار کم‌تر باشد بهتر است، یعنی عصاره‌ها همخوانی بهتری در هر تیمار نسبت به داروی شیمیایی فلوکونازول داشتند. از این رو انحراف معیار عصاره الکلی پونه ۲/۰۲۰ بود که نسبت به داروی شیمیایی فلوکونازول (٤/۲۲۷) کمتر بود ونشان دهنده عملکرد بهتر عصاره الکلی پونه بود.

٤-۲. حداقل غلظت‌کشندگی (MFC = Minimum fungicidal concentration) فلوکونازول و عصاره پونه:

در این روش نیز (MFC) برای هر ۳۵ نمونه‌ی مختلف قارچ کاندیدا آلبیکنس ۳ تیمار درنظر گرفته، داروی شیمیایی فلوکونازول با ۲ عصاره مختلف آبی و الکلی از گیاه پونه مقایسه شد. کمترین عدد در هر ردیف نمونه بهترین عملکرد محسوب شد. چون در همان غلظت کم از دارو قارچ می‌میرد. هر چه در غلظت کمتری دارو باعث مرگ قارچ شود، اثر پذیری دارو بیشتر می‌باشد. طبق روش MFC، عصاره الکلی پونه عملکرد بهتری نسبت به فلوکونازول داشت و در بین تیمارهای دیگر بهترین بود. میزان انحراف معیار عصاره الکلی پونه در این تست ۳/۵۵ بود در حالیکه برای فلوکونازول ۳/٦۸ بود. با توجه به اینکه از لحاظ آماری هر چه انحراف معیار کمتر باشد، بهتر است؛ از این رو عصاره الکلی پونه عملکرد بهتری نسبت به فلوکونازول داشت.



شکل ۴. مقایسه انحراف معیار، میانگین و میانه عصاره‌های پونه با فلوکونازول در روش MFC. **P<0.01

نتایج حاصل از تست MFC بیانگر تاثیر مناسب عصاره الکلی پونه می‌باشد، به طوری که خاصیت کشندگی بیشتر از فلوکونازول داشت.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

در دهه‌های اخیر روش‌های تشخیص مولکولي با استقبال زیادی در تشخیص‌های آزمایشگاهي روبرو شده‌اند. این روش‌ها به سرعت در حیطه تشخیص عفونت‌ها و شناسايي عوامل ایجاد کننده راه یافته‌اند. از جمله مواردی که ردپای تشخیص‌های مولکولي را مي‌توان در آن جستجو نمود، تشخیص کاندیدیازیس و شناسايي عوامل کاندیدایی مي‌باشد [٤٤]. به طور کلي روش‌های شناسايي گونه‌های کاندیدا و افتراق بین آن‌ها در چند حیطه قابل بررسي مي باشد. استفاده از خصوصیات مورفولوژیک رشد شامل: بررسي رشد، آرایش سلول‌های جوانه دار در کنار هم، تشکیل هیف کاذب و حقیقي و ایجاد کلامیدوکونیدی های متورم یکي از راه‌های تشخیصي مي‌باشد [٤٦]. در این پژوهش شیوع و فراوانی گونه های مختلف کاندیدا بررسی شد و مطابق با نتایج گونه کاندیدا آلبیکنس بیشترین فراوانی (۳۵%)

جدول ٤: نتایج آزمایشگاهی روش MIC ترکیب دارویی

	فلوکونازول *	عصاره ی آبی پونه	عصاره ی الکلی پونه **
جمع داده ها	۳٦۸	۴۳۶	۳۰۰
میانگین	۷/۳۶	۸/۷۲	۶
میانه	۸	۸	۶
انحراف معیار	۴/۲۲۷۰۲۷	۲/۸۷۸۷۷۵	۲/۰۲۰۳۰۵
*تیمار شاهد (ستاره دار)		**تیمار بهینه (دو ستاره)	

را در بین بیماران کاندیدازیس به خود اختصاص داده بود. نتایج حاصل از مطالعات Mahmoudi Rad در تهران [۱۱] و Adesiji در نیجریه [۱۲]نیز با مطالعه ما هماهنگ بود.

K. Prabhakar و همکاران (۲۰۰۸) مطالعه ای تحت عنوان فعالیت ضد قارچی عصاره ی گیاهان علیه گونه های کاندیدای ناشی از عوارض دهانی را مورد بررسی قرار دادند. فعالیت ضد قارچی برای Syzygium jambolanum، Cassia siamea و Caulerpa scalpelliformis و Sargassum wightii مشاهده شد. یعنی گیاهان مورد بررسی فعالیت ضدقارچی مناسبی در مقابل قارچ کاندیدا از خود نشان دادند [٤]. Avijgan و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی مقایسه ای اثر ضد قارچی محصولات دارویی حاوی عصاره هیدروالکلی Echinophora platyloba DC و فلوکونازول در زنان مبتلا به واژینیت مزمن ناشی از کاندیدا آلبیکنس با استفاده از مطالعه in vivo پرداختند. در این مطالعه ٦٠ خانم با واژینیت کاندیدا آلبیکنس مورد ازمایش قرار گرفتند. بیماران به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول کرم اکینو به همراه فلوکونازول دریافت کرد و گروه دوم تنها فلوکونازول را دریافت کرد. بیماران دو هفته و ٦ ماه بعد برای عود مجدد بررسی شدند. میزان واژینیت کاندیدیای مجدد ۱۷ مورد (۵٦/۷٪) در گروه تحت درمان با فلوکونازول و ۸ مورد (۲٦/۷٪) در گروه دوم بود. آن‌ها نتیجه گرفتند که عصاره E. platyloba DC در زنان مبتلا به واژینیت کاندیدا موثر بوده است. نتایج نشان می دهد استفاده ی ترکیبی از داروهای شیمیایی و گیاهی نیز می تواند در جلوگیری از رشد این قارچ مؤثر باشد [۷].

Suarez [٤۳]، Linhares [٤٤] و Hernando [٤٥] برای شناسايي گونه‌های کاندیدایي و افتراق آن‌ها از کاندیدا آلبیکنس روش‌های مورفولوژیک شامل اسلایدهای میکروسکوپي و محیط‌های کشت را بکار بردند.

در مطالعه حاضر مطابق با مطالعه این ۳ گروه از روش‌های مورفولوژیک و بیوشیمایی برای تشخیص و جداسازی گونه‌های قارچی کاندیدا آلبیکنس استفاده شد. علاوه بر این، از روش مولکولی PCR-RFLP برای تایید نهایی سویه‌ها استفاده شد که نشان دهنده اختلاف اندک در جداسازی توسط این دو روش بود. روش‌های بیوشیمیايي شامل محیط‌های‌کشت حاوی نشانگرهای رنگي از روش‌های سریع و مطلوب برای شناسايي مخمرها مي‌باشند و محیط کشت معروف CHROM agar Candida با حساسیت نسبتاً بالايي در شناسايي گونه‌های کاندیدا توسط دیگران نیز بکار رفته است [٤٦]. گذشته از کارايي نسبي روش کشت کروم آگار، این روش نیز باتوجه به محدودیت دامنه شناسايي مخمرها و نیاز به طي زمان برای نتیجه‌گیری قطعي نتوانسته است رقیب قدرتمندی برای روش‌های شناسايي بر پایه PCR باشد. از طرفی، شیوع عفونت های کاندیدایی و استفاده بی‌رویه از ترکیبات ازولی مثل فلوکونازول باعث ایجاد مقاومت قارچی به این دارو شده است. لذا استفاده از ترکیبات جایگزین به ویژه گیاهان دارویی جهت درمان و پیشگیری از مقاومت ثانویه توصیه می‌گردد [۱۷].

فلاحتی و همکاران در سال ۱۳۹۱ مطالعه‌ای با عنوان اثرات ضد کاندیدایی عصاره‌های موسیر بر عوامل کاندیدیازیس مزمن انجام دادند. طبق نتایج به دست آمده ی این گروه فعالیت ضد قارچی عصاره موسیر ایرانی بر ضد تمامی گونه‌های کاندیدایی مورد آزمایش را نشان داد و مشخص شد تاثیر عصاره‌ی آبی بسیار کمتر از عصاره‌ی الکلی این گیاه می باشد [۹].

فرانک بیداد و همکاران در سال ۲۰۱۷ پژوهشی با عنوان ارزیابی اثرت ضد کاندیدایی گیاه آلیوم سارکالیوم انجام دادند. مطابق با این پژوهش بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد عصاره های گیاهی بر همه گونه ها در غلظت ۲۵۰ گرم بر میلی متر مشاهده گردید و با کاهش غلظت، قطر هاله ممانعت از رشد کاهش یافت. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، عصاره‌های متانولی و پترولیوم اتری آلیوم سارالیکوم، دارای اثرات ضد کاندیدایی بوده و این گیاه قابلیت استفاده به عنوان منبع طبیعی ضد میکروبی را دارد. در حالی که نتایج حاصل از پژوهش ما در مورد اسانس گیاه پونه مطابق با تحقیق این گروه بر ضد کاندیدا آلبیکنس می‌باشد [۲].

Ankri و Mirelman با بررسی اثر مهاری آلیسین موجود در سیر تازه با استفاده از روش ماکرودایلوشن بر گونه‌های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گالبراتا، کاندیدا کروزه‌ای به این نتیجه دست یافتند که آلیسین ترکیب اصلی مسئول برای جلوگیری از مهار رشد قارچ‌ها می‌باشد. همچنین از تولید مایکوتوکسین، آفلاتوکسین در آسپرژیلوس

پاراسیتیکوس، ممانعت به عمل می‌آورد. براساس نتایج MIC (3/0 میکروگرم برمیلی‌لیتر)، تأثیر ترکیبات ضد قارچی استخراج شده از گیاهان دارویی بیشتر از عصاره گیاهی بود. نتایج MIC مربوط به تأثیر آلیسین بر نمونه‌های کاندیدا آلبیکنس جداشده از بیمار نیز بهتر ازعصاره بود [۳۳و۱].

در تحقیق حاضر بیشترین و کمترین قطر هاله های به دست آمده در روش دیسک دیفیوژن برای عصاره پونه، عدم تشکیل هاله بود که ۱ در نظر گرفته شد و برای اسانس پونه این مقدار 37mm و 6mm (میانگین 23.4 mm) بود. عصاره‌ها به دلیل غلظت کمی که داشتند، دارای اثر مهارکنندگی نبودند. در حالی که اسانس گیاه به علت غلظت بیشتر، تاثیری مهاری داشته و هاله عدم رشد اسانس در مقایسه با عصاره‌ها بسیار بیشتر بوده که تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد ($P \leq 0.05$).

عصاره گیاه محلولی است که تمام مواد مفید یک گیاه مانند موسیلاژ، تانن، ویتامین‌ها و املاح آن را دارا می باشد. امکان دارد عصاره‌ها حلال های متفاوتی مانند الکل، روغن و آب را در خود داشته باشند که این در واقع اصلی ترین تفاوت عصاره گیاه و اسانس گیاهی است. عصاره الکلی عصاره ای است که برای استخراج از الکل به عنوان حلال استفاده می شود در حالی که اسانس گیاهی روغنی است که از طریق پرس کردن و له کردن مستقیم گیاه حاصل می‌گردد. اسانس به محصولات معطر حاصل از جداسازی به روش تقطیر اطلاق می‌گردد. در واقع عصاره گیاهی همان شیرابه‌ی گیاه است که که تمامی ترکیبات گیاه از جمله اسانس را شامل می‌شود. از طرفی، اصلی‌ترین تفاوت عصاره آبی و الکلی آن است که در عصاره آبی از آب و در عصاره الکلی از الکل استفاده می شود. هر یک از این عصاره‌ها ممکن است در نوع ماده موثر استخراج شده توسط حلال نیز متفاوت باشند [۳۹]. همچنین مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد فلوکونازول به عنوان شاهد با میانگین mm ۲۶/۱۶ نشان دهنده عملکرد ضد قارچی بهتر و تفاوت معنی دار آن نسبت به اسانس پونه می‌باشد ($P \leq 0.05$). اگرچه اسانس پونه نسبت به عصاره ها عملکرد بهتری داشت اما به دلیل عملکرد ضعیف آن نسبت به فلوکونازول شاهد نمی تواند به عنوان کاندید مناسبی برای جایگزین دارویی فلوکونازول باشد. از طرفی میزان حداقل غلظت عصاره الکلی و آبی پونه به ترتیب 4 mg/ml و 8 mg/ml برای MIC و 8 mg/ml و 16 mg/ml برای MFC بود. در روش میکرو دایلوشن براث عصاره‌ها موثر واقع شدند که بیش‌ترین MIC مربوط به عصاره اتانولی پونه با غلظت 4 mg/ml بود. در روش میکرو دایلوشن غلظت‌های مهارکننده عصاره‌ها به دست آمد، به گونه‌ای که غلظت مهارکنندگی از رشد عصاره الکی [٤] به ترتیب بیشتر از عصاره آبی پونه و فلوکونازول [۸] به عنوان شاهد بود. این نتایج بیانگر عملکرد بهتر و تفاوت معنی دار عصاره الکلی پونه نسبت به فلوکونازول می‌باشد ($P \leq 0.05$). حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی پونه با نمونه شاهد فلوکونازول برابر و این مقدار 8 mg/ml بود. عصاره آبی پونه نمی‌تواند به عنوان جایگزین برای فلوکونازول باشد اما عصاره الکلی پونه خاصیت مهارکنندگی بهتری نسبت به فلوکونازول دارد. همچنین بررسی حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی و الکلی پونه نسبت به داروی شاهد فلوکونازول نشان از عملکرد کشندگی بهتر داروی شاهد فلوکونازل نسبت به عصاره آبی پونه بود. این در حالی است که عصاره الکلی پونه کشندگی بیشتری نسبت به فلوکونازول را نشان داد، هر چند تفاوت معنی داری بین میزان کشندگی آن‌ها وجود نداشت ($P \leq 0.05$). به نظر می‌رسد که عصاره الکلی پونه کاندید مناسبی برای جایگزینی فلوکونازول در بیماری‌های قارچی کاندیدایی باشد. با این وجود ممکن است انتشار عصاره های فوق الذکر در محیط کشت حاوی آگار با مشکل مواجه گردیده و یا در اثر ترکیب با مواد موجود در محیط‌کشت از اثر ممانعت کنندگی آنها کاسته شده باشد.

نتیجه‌گیری کلی: با توجه به نتایج عصاره الکلی گیاه پونه کاندید مناسبی در مقایسه با داروی فلوکونازول برای درمان عفونت های قارچی کاندیدایی می‌باشد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خویش را از عوامل مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد شهرکرد اعلام می دارند.

منابع:

[1] Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes Infect 1999; 1(2):125-9.

[2] Bidad F, Madani M, Masoumi M. Evaluation of Anticandidal Effects of Allium saralicum. Qom Univ Med Sci J. 2017; 11 (6) :10-18.

[3] Casalinuovo IA, Francesco PD, Garaci E. Fluconazole resistance in Candida albicans: areview of mechanism. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2004; 8 (2): 69-77.
[4] Chen, T. C., Y. H. Chen, J. J. Tsai, C. F. Peng, P. L. Lu, K. Chang, H. C. Hsieh, and T. P. Chen. 2005. Epidemiologic analysis and antifungal susceptibility of Candida blood isolates in southern Taiwan. J. Microbiol. Immunol. Infect. 38:200–210.
[5] Clark, T. A., S. A. Slavinski, J. Morgan, T. Lott, B. A. Arthington-Skaggs, M. E. Brandt, R. M. Webb, M. Carrier, R. H. Flowers, S. K. Fridken, and R. A. Hajjeh. 2004. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of Candida parapsilosisbloodstream infections in a community hospital. J. Clin. Microbiol. 42: 4468–4472.
[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved standard, M44-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
[7] Esmaeilzadeh S, Mahdavi OS, Rahmani Z. Frequency and etiology of vulvo-vaginal candidiasis in women referred to agynecological center in babol, lran. Int J FertilSteril 2003; 3(2): 74-7.
[8] Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Management of Candida species infections in critically ill patients. Lancet Infect Dis 2003; 3: 772-785.
[9] Falahati Mehraban*, Fateh Ruhollah, Sharifi Nia Somayeh. Anti-candida effects of shallot extracts on the causes of chronic candidiasis. Razi Medical Sciences (Journal of IranUniversity of Medical Sciences). October 2012, Volume 19, Number 100; From page 22 to page 28.
[10] Furletti VF, Teixeira IP, Obando-Pereda G, Mardegan RC, Sartoratto A, Figueira G. M, et al. Action of Coriandrum sativum L. Essential Oil upon Oral Candida albicans Biofilm Formation. Evid Based Complement Alternat Med 2011; 2011: 985832.
[11] Mahmoudi Rad M, Zafarghandi AS, Amel Zabihi M, Tavallaee M, Mirdamadi Y. Identification of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. Infectious diseases in obstetrics and gynecology2012: 872169.
[12] Adesiji Y, Ndukwe N, Okanlawon B. Isolation and antifungal sensitivity to Candida isolates in young females. Open Medicine 2011; 6(2): 172-176
[13] Helander I, Alokomi H, Latvakal K, Sandholm M. Characterization of the action of essential oil components on Gram negative bacteria. J Agriculture and Food Chemistry. 2008; 230:191-5.
[14] Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, et al. Antifungal susceptibilities of Candida species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. Journal of Clinical Microbiology 2005; 43(5): 2155-62.
[15] Höfling JF, Mardegan RC, Anibal PC, Furletti VF, Foglio MA, Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral Candida albicans and proteinases, Mycopathologia. 2011 Aug; 172(2):117-24. doi: 10.1007/s11046-011-9404-z. Epub 2011 Mar 16
[16] Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, FishmanJA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, PfallerMA, Chang CH, Webster KM. Epidemiologyand outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapyalliance registry. Clin Infect Dis 2009; 48(12): 1695-703.
[17] Hosseini Seyedeh Sediqeh*, Rudbar Mohammadi Shahla, Joshaghani Hamid Reza.Evaluation of antifungal activity of carvacrol essential oil on standard strains of Candida albicans sensitive and resistant to fluconazole. Medical Laboratory Journal. Fall and Winter 2011, Volume 5, Number 2; From page 28 to page 33.
[18] Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. Candida albicans dimorphism as a therapeutic target. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012; 10:85–93.
[19] Jafari Nodoushan AA, Dehghani M, Mirbagheri SM. In vitro antifungal effect of aqueous garlic (allium sativum) extract and its combination with fluconazole against five common clinical candida isolated from candidiasis lesions. J Kerman Univ Med 2003; 14(3): 153-62. [Full Text in Persian]
[20] Jazayeri Mina, Raadi Shahrbanoo, Abdolsamadi Hamidreza, Madanipour Azadeh, Sami Leila. Comparison of the inhibitory effect of thyme essential oil (Thymus Eriocalyx) and thyme (Thymus Kotschyanus) with nystatin on the growth of Candida albicans. Journal of Mashhad Dental School. 2016, Volume 40, Number 2; From page 133 to page 142.
[21] Mukhtari Mukhtar, Shariati Mehrdad, and Khodaparast Laleh. "Effects of aqueous-alcoholic extract of peppermint leaves on liver function factors in male rats." 73-81.
[22] K. Prabhakar, L. Sathish Kumar, S. Rajendran, M. Chandrasekaran, K. Bhaskar, and A. K. Sajit Khan, Antifungal Activity of Plant Extracts against Candida Species from Oral Lesions, Received 2006 May 30; Revised 2008 May 26; Accepted 2008 Dec 10. www.10.4103/0250-474X.49128 .Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008 Nov-Dec; 70(6): 801–803.
[23] Lemar KM, Turner MP, Lloyd D. Garlic (Allium sativum) as an anti-Candida agenta comparison

of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts J App Microbiol 2002;93(3):398-405.
[24] Madani M, Khosravi AR, Shirani M. Comparisono f the In vitro effect of different Allium jesdianum extracts on candida spp. J Biology Sci 2010; 3(1):63-71. [Full Text in Persian]
[25] Panahi Y, Monnazah M A, Vafaei G. STUDY OF THE USE OF DIMETHYL SULFOXIDE (DMSO) AS A SOLVENT IN THE ADMINISTRATION OF ANTIEPILEPTIC DRUGS. Stud Med Sci. 2020; 31 (4) :316-324
[26] Manolakaki, D. Velmahos, G, Kourkoumpetis, T, Chang, Y, Alam, H. B, De Moya, M. M, .Mylonakis, E. (2010). Candida infection and colonization among trauma patients. Virulence, 1(5), 367-375.
[27] Tajik-Ijdan, Fatemeh, Ali Kazemi, and Hossein Nowrozi. "Comparing the effects of alcoholic extract of ginseng with itraconazole against Candida albicans and Candida krusei." Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences 21.3 (2017): 211-217.
[28] Mirzaei N. Supervising teacher:Khozeimeh F.Comparative study of percent of Candida albicans carriers in smokers& non-smokers [Thesis]. Isfahan, Iran: School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences; 2008.
[29] Neppelenbroek KH, Campanha Nh, Spolidorio DMP, Spolidorio LC, Seó RS, Pavarina AC. Molecular fingerprinting Methods for discrimination between C. albicans and C. dubliniensis. Mycoses 2006; 12: 242-253.
[30] Nouri F, Raoofi A, Dadfar S. Antifungal Activity of Lavandula Angustifolia and Quergues Infectoria Extracts in Comparison with Nystatin on Candida Albicans. Avicenna J Clin Med. 2016; 23 (2): 172-178
[31] Odds FC. Candida and Candidiasis: a review and bibliography. 2nd ed. London, UK: Bailliere Tindall; 1988.
[32] Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones RN. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of Candida glabrata. J Clin Microbiol. 2012; 50:1199–203
[33] Mirhendi H, Diba K, Rezaie A and Hosseinpur L . Colony PCR is a reliable and rapid method for DNA extraction of Candida species. Iran J Public Health 2007. 36: 40-44.
[34] Mirhendi H, Makimura K and Khoramizadeh M. A one-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important Candida Species. Jpn Med Mycol 2006.47:225-229.
[35] Razzak parast A, Shams Ghahfarokhi M, Yadegari M, Razaghi Abyaneh M. The effect of aqueous garlic extract individually and in combination with fluconazole, itraconazole and Ketoconazole on pathogenic yeasts. J Gorgan Univ Med Sci 2009; 11(1):49-56. [Full Text in Persian]
[36] Sangetha S, Zuraini Z, Suryani S, Sasidharan S. In situ TEM and SEM studies on the antimicrobial activity andprevention of Candida albicans biofilm by Cassia spectabilis extract. Micron 2009; 40(4):439-43.
[37] Shin ES, Chung SC, Kim YK, Lee SW, Kho HS. The relationship between oral Candida carriage and the secretorstatus of blood group antigens in saliva. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003; 96(1): 48-53.
[38] Shirani M, Madani M, Khosravi AR, Hoseindoust SR. Evaluation of Antifungal activity of essential oil of Allium jesdianum on Malassezia furfur and candida Krusei. Jundishapour J Microbiol 2013; Special Edition.
[39] Richter, Jana, and Ingo Schellenberg. "Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography." *Analytical and bioanalytical chemistry* 387.6 (2007): 2207-2217.
[40] Taheri Sarvtin M, Zand Parsa A, Kordbacheh P, Hashemi J, Mahmoudi M, Daie R, et al. The comparison of oral candida flora in smokers and non-smokers. J Arak Univ Med Sci 2010; 13(1): 78-82.
[41] Worth LJ, Blyth CC, Booth DL, Kong DC, Marriott D, Cassumbhoy M, Ray J, Slavin MA, Wilkes JR. Optimizing antifungal drug dosing and monitoring to avoid toxicity and improve outcomes in patients with haematological disorders. Intern Med J 2008; 38(6b): 521–37.Zordan R, Cormack B. Adhesins on Opportunistic Fungal Pathogens. In: Calderone RA, Clancy, C.J., ed. Candida and Candidiasis: ASM Press, Washington, DC, pp 243-259, 2012.
[42] Suarez V and Lanch M R. Identification of yeasts in pap smears: clinical characteristics associated with candidiasis. Rev Cubana Med Trop 2004.56(1):21-57.
[43] Linhares LM, Witkin SS, Miranda SD, Fonseca AM, Pinotti JA and Ledger WJ. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for Candida species by culture.Infect Dis Obstet Gynecol 2001. 9(4): 221-5.
[44] Hernando FL, Estevez JJ, Cebrian M, Poulain D and Ponton J. Identification of Candida albicans cell wall antigens lost during subculture in synthetic media. J Med Vet Mycol 1993.31(3): 227-37.
[45] Gultekin B, Yazici V, Aydin N. Distribution of Candida species in vaginal specimens and evaluation of CHROMagar Candida medium. Mikrobiyol Bul 2005.39(3):319-24.

Journal of Developmental Biology
Vol. 13, No. 2, Spring 2021

In Vitro comparison of the efficacy of peppermint aqueous, alcoholic extract, essential oil and Fluconazole against *Candida Strains*

Piri Gharaghie T.[1*], Beiranvand Sh.[1], Haji-Mohammadi S.[2], Hosein-Nezhad Lazarjani E.[3]

[1] Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[2] Department of Electrical Engineering, Faculty of Engineering, Higher Non-Profit University, Ivanki Branch, Ivanki, Iran.
[3] Department of Biolog, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

[*] Email: tohidpirie@yahoo.com

Received: September 2020 Accepted: January 2021

Abstract

In recent years, the prevalence of opportunistic fungal diseases has increased significantly. Candida albicans is a common fungal pathogen that has become resistant to azole drugs. In this study, the antifungal effect of aqueous and alcoholic extracts and peppermint essential oil on the growth of Candida albicans with fluconazole was investigated. In this study, 100 candidate fungal samples were prepared from patients. Candida albicans fungal samples were isolated by microscopic, biochemical, and glucose uptake tests by API20C kit. Then, the molecular PCR-RFLP method was used to identify different species of Candida yeast and differentiate them from each other (with Candida albicans). According to the NCCLS disc release standard, 25 mg fluconazole discs were prepared. The extract was extracted by percolation and the essential oil was extracted by water distillation. The standard strain of the ATCC14053 candidate was used to evaluate the quality control of the work. Comparison of the antifungal effect of Mentha pulegium extracts with peppermint essential oil with fluconazole was performed on these isolates by disk diffusion and microdilution methods. The highest relative frequency of yeast isolated from Candida albicans samples was 35% in the biochemical detection method and 38% of total samples in the PCR-RFLP method. The mean diameter of non-growth halos for aqueous and alcoholic extracts of Mentha pulegium was 1, Mentha pulegium essential oil was 23.4 mm and for fluconazole was 26.16 mm, which showed better antifungal performance of fluconazole and a significant difference compared to Mentha pulegium essential oil ($P \leq 0.05$). The minimum concentrations of alcoholic and aqueous extracts of Mentha pulegium and fluconazole were 4, 8, and 8 mg/ml for MIC and 8, 16, and 8 mg/ml for MFC, respectively. The standard deviation of Mentha pulegium alcoholic extract in the MFC test was 3.55; While for fluconazole, it was 3.68. Given that statistically the smaller the standard deviation, the better the performance; Therefore, Mentha pulegium alcoholic extract had a better performance than fluconazole. These results indicate better performance and significant difference between Mentha pulegium alcoholic extract than fluconazole ($P \leq 0.05$). According to the results of the above study, it seems that the alcoholic extract of Mentha pulegium can be used as a suitable drug candidate with better antifungal performance than fluconazole in the pharmaceutical industry.

Keywords: Candida albicans, Mentha pulegium extract, Fluconazole, MIC and MFC tests.