تحقیقی

دارای رتبه علمی-پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره خام ناخالص جدایه های اکتینومیست فعال با داروهای تربینافین، گریزئوفولوین، کتوکونازول و فلوکونازول علیه میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیپسئوم و تریکوفیتون منتاگروفایتیس در شرایط آزمایشگاهی

ناصر کیخا
کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران

سید امین آیت اللهی موسوی
دانشیار قارچ شناسی پزشکی، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

علیرضا نخعی
دانشیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی پزشکی، دانشکده پزشکی زاهدان، دانشگاه علوم

سعید امانلو
کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران

سمیه امیری
کارشناس ارشد مدیریت دولتی، سازمان امور اقتصادی و دارایی زاهدان، ایران

غلامحسین شهیدی بنجار
استاد مهندسی گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

نویسنده مسئول: ناصر کیخا

پست الکترونیک: Nasserkeikha@gmail.com
تلفن : ۰۹۳۳۷۷۰۸۲۰۰
آدرس: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران

دریافت: ۹۲/۸/۱۳
ویرایش پایانی: ۹۳/۵/۸
پذیرش: ۹۳/۵/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: *درماتوفیت ها قارچ هایی هستند که توانایی حمله به بافت های کراتین دار بدن مانند پوست، مو و ناخن را دارند و عفونت های ایجاد شده توسط این ارگانیسم ها درماتوفیتوزیس نامیده می شود. این تحقیق با هدف مقایسه حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) از رشد عصاره خام ناخالص جدایه های اکتینومیست فعال با داروهای تربینافین، گریزئوفولوین، کتوکونازول و فلوکونازول علیه میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیپسئوم و تریکوفیتون منتاگروفایتیس در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، جهت یافتن حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد توسط جدایه های اکتینومیست ابتدا ۱۰۰ جدایه از جنبه اثرات آنتاگونیستی مورد بررسی قرار گرفتند. سپس از جدایه های اکتینومیست فعال، عصاره خام ناخالص در شرایط سترون تهیه و در نهایت از عصاره خام ناخالص بدست آمده در غلظت های مختلف جهت بدست آوردن MIC قارچ های میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیپسئوم و تریکوفیتون منتاگروفایتیس استفاده شد. همچنین از داروهای تربینافین، گریزئوفولوین، کتوکونازول و فلوکونازول در حلال دی متیل سولفوکساید غلظت های مختلف تهیه و اثرات مهار کنندگی رشد هر کدام مورد ارزیابی و با نتایج بدست آمده از عصاره خام ناخالص جدایه های اکتینومیست فعال مورد مقایسه قرار گرفتند.*

یافته ها: *عصاره های خام ناخالص بدست آمده از جدایه های اکتینومیست فعال و داروهای تربینافین، گریزئوفولوین، کتوکونازول و فلوکونازول رشد میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیپسئوم و تریکوفیتون منتاگروفایتیس را وابسته به غلظت مهار کردند.*

نتیجه گیری: *در مقایسه با MIC عصاره خام ناخالص جدایه های اکتینومیست فعال، داروی تربینافین اثر فوق العاده ای در مهار رشد هر سه قارچ درماتوفیتی داشته و پس از آن به ترتیب گریزئوفولوین، کتوکونازول و فلوکونازول قرار گرفتند.*

واژه های کلیدی: *عصاره خام ناخالص اکتینومیست، میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیپسئوم، تریکوفیتون منتاگروفایتیس، تربینافین*

آدرس مقاله
کیخا ن، ا، آیت اللهی موسوی س، نخعی ع، امانلو س، ، امیری س، شهیدی بنجار غ " مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره خام ناخالص جدایه های اکتینومیست فعال با داروهای تربینافین، گریزئوفولوی ن، کتوکونازول و فلوکونازول علیه میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیپسئوم و تریکوفیتون منتاگروفایتیس در شرایط آزمایشگاهی" مجله علوم آزمایشگاهی، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴، دوره نهم (شماره ۱): ۵۳-۶۰

Downloaded from goums.ac.ir at 21:09 +0330 on Wednesday December 12th 2018

Downloaded from goums.ac.ir at 21:09 +0330 on Wednesday December 12th 2018

مقدمه

درماتوفیت ها قارچ هایی هستند که توانایی حمله به بافت های کراتین دار بدن مانند پوست، مو و ناخن را دارند. عفونت های ایجاد شده توسط این ارگانیسم ها درماتوفیتوزیس نامیده می شود و شایع ترین بیماری های ایجاد شده توسط آنها کچلی پا، کچلی ناخن، کچلی بدن و کچلی سر می باشد (۲،۱). در میان داروهای ضد قارچی برای درمان درماتوفیتوزیس، گریزئوفولوین داروی خط اول درمان برای چندین سال بوده است. با این حال، پس از ظهور داروهای دیگر مانند ایتراکونازول، استفاده از آن محدود شده است. از مزیت های عمده این داروهای جدید می توان به دوره کوتاه درمان، افزایش اثر دارو و کاهش سمیت این عوامل در مقایسه با گریزئوفولوین اشاره کرد (۴،۳). گریزئوفولوین و داروهای ضد قارچی جدیدتر مانند کتوکونازول، فلوکونازول و تربینافین داروهای اصلی در درمان درماتوفیتوزیس هستند گریزئوفولوین اولین داروی ضد قارچ سیستمیک بود ولی امروزه به طور گسترده استفاده نمی شود(۵). کتوکونازول اولین ایمیدازول خوراکی و فعال برعلیه درماتوفیتوزیس بوده ولی دوز های بالای کتوکونازول ممکن است سطح تستوسترون و کورتیزول را کاهش دهد و در نتیجه ممکن باعث بی نظمی های قاعدگی در زنان و ناتوانی جنسی در مردان شود. همچنین مسمومت کبدی نیز از عوارض جانبی شناخته شده این دارو می باشد (۷،۶). تربینافین دارای فعالیت بسیار بالایی برعلیه عفونت های درماتوفیتی بوده و مکانسیم آن مسدود کردن سنتز ارگوسترول می باشد(۸). تربینافین از دسته آلیل آمین ها بوده، از نظر ساختمانی شبیه نفتیفین است و یک عامل ضد قارچ صناعی می باشد که بسیار لیپوفیل بوده و تمایل به تجمع در پوست، ناخن و بافت های چرب دارد (۸،۴). حدود ۴۰ سال، گریزئوفولوین تنها عامل ضد قارچ خوراکی در دسترس برای درماتوفیتوزیس بوده است. با این حال، درمان ناقص و یا موارد مقاوم به درمان و عود مکرر بیماری به دلیل ضعیف‌بودن داروهای ضد قارچی برای نفوذ به بافت جلدی بدن و ضعف فارماکوکینتیک دارو مشاهده شده است. اکتینومیست‌ها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت متعلق بـه شـاخه اکـتینوباکتریاسه هستنـد. از جمله ترکیبات مترشحه توسط اکتینومیست‌ها می‌توان: آنتی‌بیوتیک‌ها، ویتامین‌ها، آلکالوئیدها، عوامل تحریک‌کننده رشد گیاهان، آنزیم‌ها و ترکیبات بازدارنده آنزیم‌ها را نام برد. تقریباً بیش از ۸۵ درصد آنتی‌بیوتیک‌هایی که به طور طبیعی تولید و استفاده می‌شوند، از اکتینومیست‌ها و عمدتاً توسط گونه‌های مختلف استرپتومایسس *Streptomyces* جدا شده اند(۹). از آنجایی که قارچ‌های بیماری‌زا یوکاریوت هستند، درمان با داروهای ضد قارچی شیمیایی ممکن است سلول‌های بافت میزبان را هم تحت تأثیر قرار دهد (۱۰). با توجه به افزایش شیوع عفونت‌های قارچی در دهه‌های اخیر به ویژه در بیماران با ایمنی تضعیف‌شده، کشف داروهای ضد قارچی جدید، هنوز لازم و ضروری می‌باشد .این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی با هدف تعیین مقایسه MIC عصاره خام ناخالص جدایه های اکتینومیست فعال با داروهای تربینافین، گریزئوفولوین، کتوکونازول و فلوکونازول علیه میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیپسئوم و تریکوفیتون منتاگروفایتیس در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۰ نمونه از خاک‌های شهرستان کرمان و خاک مناطق سایه‌انداز پارک مطهری، پارک سنگی، پارک نشاط و مسجد صاحب‌الزمان، از پنج نقطه مختلف هر کدام از این مناطق، با استفاده از اوگر تهیه شد. به این ترتیب که پس از برداشتن ۱۰ سانتی‌متر از سطح خاک، از عمق ۱۰-۲۰ سانتی‌متری، به میزان ۰/۵ کیلوگرم، خاک برداشته شد. سپس نمونه‌های ۴ منطقه فوق، به طور جداگانه، مخلوط و در دمای اتاق، به مدت ۷-۱۰ روز در معرض هوا، خشک شد. این نمونه‌ها پس از عبور از الک با مش ۰/۸ میلی‌متری، تا زمان آزمایش در کیسه‌های پلی‌اتیلنی نگهداری شدند. به هنگام استفاده، ۱۰ گرم از نمونه خاک مورد نظر با ۹۰ml آب مقطر استریل مخلوط و روی شیکر دوار (۳۰ دقیقه و g ۱۳۰) قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه به حالت ساکن رها شد و از مایع رویی مقدار ۱ml برداشته و به لوله آزمایش محتوی ۹ml آب مقطر استریل اضافه شد و بدین ترتیب غلظت 10^{-2} به دست آمد. به همین ترتیب، از طریق

Downloaded from goums.ac.ir at 21:09 +0330 on Wednesday December 12th 2018

رقیق سازی متوالی مخلوط خاک، غلظت‌های $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۶}$ تهیه شد. برای جداسازی و رشد اکتینومیست‌ها، محیط کشت کازئین-گلیسرول-آگار (CGA) استفاده شد. جهت تهیه این محیط، ترکیبات موجود (جدول۱) را با آب مقطر به حجم نهایی یک لیتر رسانده و پس از تنظیم pH محلول در محدوده خنثی، محیط کشت مورد نظر در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. سپس ۱ml از رقت‌های متوالی $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۶}$ به دست‌آمده، در هر یک از پلیت های سترون، ریخته (هر رقت در سه تکرار) و مقدار ۲۵-۲۰ml از محیط کشت CGA (در دمای تقریبی ۴۵°C) به آن اضافه گردید. این پلیت‌ها در دمای۲۸°C انکوبه شدند(۱۱). پس از ۱۰-۷ روز انکوباسیون، پرگنه‌های اکتینومیست و همچنین برخی قارچ‌ها و باکتری‌ها، روی محیط ظاهر شد. از هر پرگنه اکتینومیست، کشت خطی *Streak culture* بر روی محیط کشت CGA جدید، تهیه و نمونه‌های خالص در دمای ۲۸°C انکوبه شدند. جهت نگهداری طولانی‌مدت اکتینومیست‌های خالص، درون لوله آزمایش، محیط کشت CGA به صورت شیب‌دار تهیه شد و پس از کشت هر جدایه اکتینومیست در یک لوله آزمایش، نمونه‌ها در دمای ۲۸°C انکوبه شدند (۱۱). پس از رشد پرگنه‌های اکتینومیست و اطمینان از آلوده نبودن آنها، لوله ها به دمای ۴°C منتقل شدند. میکروسپورم جیپسئوم (PTCC5057)، میکروسپوروم کانیس (PTCC5069) و تریکوفایتون منتاگروفایتیس (PTCC5054) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی-صنعتی ایران، تهیه شد. برای رشد این قارچ ها، محیط PDA ساخت شرکت Merck استفاده شد.

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت CGA (۱۵)

Ingredients	Amount
Casein	۰/۳ gr
KNO_3	۲ gr
NaCl	۲ gr
K_2HPO_4	۲ gr
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۰۵ gr
$CaCO_3$	۰/۰۲ gr
$FeSO_4.7H_2O$	۰/۰۱ gr
Glycerol or Starch	۱۰ gr
Agar	۱۸ gr
Distilled water	۱ L
pH	۷ تا ۷/۲

تهیه مخلوط قارچی: برای این کار با سرم فیزیولوژی سترون از جدایه های کشت شده بر روی محیط PDA مخلوط یکنواختی تهیه گردید. مخلوط حاصل جهت حذف ذرات اضافی و قطعات هایفا از چند لایه تنظیف سترون عبور داده شد. بدین ترتیب اسپور های قارچی جداسازی و جمع آوری شدند. مخلوط حاوی اسپور در لوله های سترون جمع آوری شده و تعداد اسپورها در میلی لیتر با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید. در انتها غلظتی معادل $۱۰^{۳}$cfu/ml از هر یک از گونه ها به دنبال انتقال حجم مشخصی از مخلوط های قارچی به محیط کشت پتیتو دکستروز آگار و شمارش تعداد کلنی ها آماده گردید (۱۳،۱۲).

تهیه محلول دارویی جهت تعیین MIC: رقت های دارویی از چهار داروی تربینافین، گریزئوفولوین، کتوکونازول و فلوکونازول در غلظت های ۱۰۰ µg/ml، ۱۰ µg/ml، ۱µg/ml و ۰/۱µg/ml و ۰/۰۱µg/ml. با استفاده از حلال دی‌متیل‌سولفوکساید و متانول، با نسبت حجمی ۱:۱، تهیه گردید. در ضمن به عنوان شاهد از غلظت دی متیل سولفوکساید و متانول استفاده شد و اثر سوئی بر رشد عوامل فوق در محیط کشت مشاهده نشد. در نهایت برای تعیین حساسیت هر یک از رقت های تهیه شده از داروها، ابتدا ۰/۱

Downloaded from goums.ac.ir at 21:09 +0330 on Wednesday December 12th 2018

میلی لیتر از مخلوط قارچی تهیه شده به صورت یک دست بر روی محیط کشت پخش و سپس چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر با چوب‌پنبه سوراخ کن (کرک‌بردار) ایجاد گردید و از رقت های دارویی با غلظت های ۱۰۰ µg/ml، ۱۰ µg/ml، ۱µg/ml و ۰/۱ µg/ml و ۰/۰۱µg/ml به ترتیب به محیط های کشت افزوده شد. هر پلیت حاوی دو چاهک یک چاهک برای دارو و دیگری شاهد (دی متیل سولفوکساید و متانول) انتخاب گردید و به مدت ۶ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد برای *میکروسپوروم کانیس* و ۲۹ درجه سانتی گراد برای *میکروسپوم جیپسئوم* و *تریکوفیتون منتا گروفایتیس* انکوبه گردید (۱۲).

آزمون‌های زیستی تعیین فعالیت ضد قارچی جدایه های اکتینومیست: برای تعیین توانایی ایزوله‌های اکتینومیست در ممانعت از رشد قارچ های مذکور، از سه روش دیسک‌گذاری، روش کشت متقابل و روش نشت چاهک استفاده شد.

تهیه عصاره خام ناخالص: پس از اینکه حداکثر بازدارندگی از رشد ماده ضد قارچی و مدت زمان لازم برای رسیدن به آن (نقطه اوج منحنی)، در شرایط کشت مایع (محیط کازئین گلیسرول براث) تعیین شد، ایزوله‌های فعال، مجدداً در محیط کشت CG مایع، تلقیح شده و فلاسک‌ها، در شیکر انکوباتور (۱۲۰g و دمای ۲۸°C) قرار گرفتند. پس از سپری شدن مدت زمان اختصاصی مذکور برای هر ایزوله، محتویات هر یک از فلاسک‌های ارلن مایر، به طور جداگانه، توسط قیف بوخنر و یک لایه پنبه به ضخامت ۵ سانتی‌متر صاف شدند. مایع صاف‌شده، پس از منجمدشدن در فریزر ۲۰°C- توسط دستگاه فریزدرایر (دمای ۴۰°C- و فشار ۲bar-) به مدت ۵ روز خشک شد. پودر به دست‌آمده، برای انجام مراحل بعدی، در یخچال نگهداری شد (۱۳).

تهیه حداقل غلظت بازدارنده از رشد (*Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)) عصاره خام ناخالص جدایه های اکتینومیست فعال: به منظور تعیین MIC در یک لوله آزمایش، ابتدا مقداری از عصاره خام ناخالص هریک از جدایه های اکتینومیست فعال (پودر بدست آمده در مرحله تهیه عصاره خام ناخالص) وزن شد (این مقدار وزنی را در مقدار سی سی بدست آمده از تناسب حاصل از مقدار وزنی با غلظت ۱۰۰ درصد تهیه و سپس به بقیه لوله ها که حاوی یک سی سی دی متیل سولفوکساید و متانول هست، پاساژ می دهیم) عصاره خام ناخالص در حلال دی‌متیل‌سولفوکساید و متانول با نسبت حجمی ۱:۱ آماده و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس شد. سپس ده رقت متوالی از این غلظت ۱۰۰ درصد شامل: ۱۰۰(غلظت توتال)، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۰/۱۵۶، ۰/۷۸۱، ۰/۳۹ و ۰/۱۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از آن تهیه شد و آزمون آنتی‌بیوگرام به روش چاهک و میکرودایلوشن در پلیت ۹۶ خانه علیه قارچ های مورد مطالعه انجام شد(۱۵).

یافته ها

جداسازی اکتینومیست‌ها از خاک: از رقت‌های 10^{-2}-10^{-6} کشت خاک، بیش از ۱۰۰ جدایه اکتینومیست خاکزی به دست آمد که بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی از یکدیگر متمایز بودند. مهار رشد هر یک از قارچ های مورد بررسی در تمامی غلظت های دارویی در مقایسه با غلظت های تهیه شده از عصاره خام ناخالص بدست آمده از جدایه های اکتینومیست فعال معنا دار گزارش گردید ($P<0/05$). نتایج حاصل از بررسی تاثیر غلظت های مختلف داروهای تربینافین، گریزئوفولوین، کتوکونازول و فلوکونازول نشان داد که این داروها در تمامی غلظت های مورد استفاده در محدوده µg/ml ۱۰۰-۰/۰۰۱µg/ml توانایی جلوگیری از رشد *میکروسپوروم کانیس*، *میکروسپوروم جیپسئوم* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* را دارند. MIC ایزوله‌های اکتینومیست 115، Kn10 و Ks10 به ترتیب برابر با ۱۲/۵ mg/ml، ۵۰ mg/ml و ۵۰ mg/ml برای قارچ *میکروسپوروم جیپسئوم*، MIC ایزوله‌های اکتینومیست D5، Km10، Ks8 ، 115، Ks1، Ks2 و Ks10 به ترتیب برابر با ۱۰۰ mg/ml، ۵۰ mg/ml، ۲۵ mg/ml، ۱۰۰ mg/ml، ۱۰۰mg/ml، ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ mg/ml برای قارچ *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* و MIC جدایه های اکتینومیست Ks2، Ks10، Ks4، Km2، Kn10، Ks8، L1، Ks1 و D5 به ترتیب برابر با ۲۵ mg/ml، ۲۵ mg/ml، ۱۲/۵ mg/ml، ۲۵mg/ml، ۲۵ mg/ml، ۰/۳۹ mg/ml، ۲۵ mg/ml، ۲۵mg/ml و ۲۵ mg/ml برای *میکروسپوروم کانیس* بود.

Downloaded from goums.ac.ir at 21:09 +0330 on Wednesday December 12th 2018

همچنین MIC گریزئوفولوین برای *میکروسپوروم کانیس*، *میکروسپوروم جیپسئوم* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* به ترتیب برابر با ۰/۱ µg/ml، ۱ µg/ml و ۱ µg/ml، MIC داروی تربینافین برای *میکروسپوروم کانیس*، *میکروسپوروم جیپسئوم* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* به ترتیب برابر با ۰/۰۰۱µg/ml، ۰/۱µg/ml، ۰/۰۱µg/ml، MIC داروی کتوکونازول برای *میکروسپوروم کانیس*، *میکروسپوروم جیپسئوم* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* برابر با ۱ µg/ml و MIC داروی فلوکونازول برای *میکروسپوروم کانیس*، *میکروسپوروم جیپسئوم* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* به ترتیب برابر با ۱۰ µg/ml، ۱۰۰ µg/ml و ۱۰ µg/ml بود. نسبت به داروی گریزئوفولوین، *میکروسپوروم کانیس* حساس ترین و *میکروسپوروم جیپسئوم* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* مقاومت بیشتری از خود نشان دادند. در برابر تربینافین *میکروسپوروم کانیس*، *میکروسپوروم جیپسئوم* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* در محدوده غلظت های ۰/۱µg/ml-۰/۰۰۱µg/ml حساس بوده و رشد نکردند. نسبت به اثرات ضد قارچی داروی کتوکونازول *میکروسپوروم کانیس*، *میکروسپوروم جیپسئوم* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* دارای حساسیت یکسان در غلظت ۱ µg/ml بودند و در این غلظت از دارو قادر به رشد نبودند. در برابر داروی فلوکونازول *میکروسپوروم کانیس*، *میکروسپوروم جیپسئوم* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* در محدوده غلظت ۱۰ µg/ml - ۱۰۰ µg/ml این دارو حساس بوده و رشد نکردند.

بحث

از آنجایی که اکثر داروهای ضد قارچی شناخته شده به دلیل تشابه ساختاری قارچ ها با سلول های پستانداران (یوکاریوت بودن) دارای اثرات جانبی گسترده به ویژه در مصرف مکرر و طولانی مدت می باشند (۱۶)، تحقیق حاضر جهت مقایسه اثرات ضد قارچی عصاره خام ناخالص جدایه های اکتینومیست فعال با داروهای تربینافین، گریزئوفولوین، کتوکونازول و فلوکونازول علیه *میکروسپوروم کانیس*، *میکروسپوروم جیپسئوم* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. شهیدی و همکاران از میان ۱۳۰ جدایه اکتینومیست توانستند ۱۲ جدایه را در غربال اولیه بر علیه *Phytophthora* dreschleri جداسازی کنند(۱۷). مشابه این پژوهش، Augustine و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ای که انجام دادند، اثبات کردند که *استرپتومایسس راکی* (*Streptomyces rochei* AK39) AK39 دارای اثر ضد درماتوفیتی می‌باشد (۱۸). همچنین در مطالعه حاضر از بین بیش از ۱۰۰ جدایه اکتینومیست خاکزی تعداد ۱۰ جدایه دارای ترکیبات ضد قارچی بودند که با مطالعات انجام شده در خصوص دارا بودن اثر ضد قارچی اکتینومیست های خاکزی همخوانی دارد. فعالیت ضد قارچی این جدایه ها، مبین اهمیت و توان بالقوه آنها برای بررسی‌های بیشتر، پیرامون کاربرد آنها به عنوان عوامل بیوکنترل *میکروسپوروم جیپسئوم*، *میکروسپوروم کانیس* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* است. هرچند باید در نظر داشت که تمامی غربالگری‌های آزمایشگاهی، از جمله پژوهش حاضر، تنها امکان انتخاب اولیه این ۱۰ جدایه به عنوان عوامل مناسب بیوکنترل را فراهم می‌آورند. برای نخستین بار در ایران، بررسی اثرات ضددرماتوفیتی اکتینومیست‌های خاکزی بر علیه *میکروسپوروم جیپسئوم* *میکروسپوروم کانیس* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* از عوامل مسبب درماتوفیتوزیس انسانی انجام گرفته است. حداقل غلظت بازدارنده از رشد اندازه‌گیری‌شده برای متابولیت فعال ناخالص جداشده از ایزوله‌های منتخب، بین ۱۰۰mg/ml-۰/۳۹ بود. طی مطالعه انجام‌شده توسط Zakir و همکاران (۲۰۰۲)، حداقل غلظت بازدارنده از رشد یک متابولیت فعال جداشده از گونه‌های استرپتومایسس، علیه چهار باکتری گرم مثبت و گرم منفی، بین mg/ml ۳۲-۶۴ به دست‌آمد (۱۹). همچنین در بررسی که ناصر کیخا و همکاران (۲۰۱۳) بر روی تأثیر ضد قارچی اکتینومیست های خاکزی علیه *میکروسپوروم جیپسئوم* انجام دادند نشان دادند که حداقل غلظت بازدارنده از رشد اندازه‌گیری‌شده، برای متابولیت فعال ناخالص جداشده از جدایه های منتخب، بین mg/ml ۵۰-۱۲/۵ بود (۲۰). از آنجایی که جدایه‌های بررسی‌شده در این تحقیق در غلظت‌های بسیار پایین‌تر نیز قادر به کنترل قارچ ها می‌باشند، می‌توان نتیجه گرفت که از نظر آنتاگونیستی، اثر بسیار خوبی در کنترل ارگانیسم‌های مورد مطالعه دارند. Korting و

Downloaded from goums.ac.ir at 21:09 +0330 on Wednesday December 12th 2018

همکاران در بررسی آزمایشگاهی حساسیت دارویی، گریزئوفولوین، تربینافین، ایتراکونازول، کتوکونازول، فلوکونازول و سیکلوپیروکسامین برعلیه ۵۲ جدایه *تریکوفیتون روبروم* و ۴۰ جدایه *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* به این نتیجه رسیدند که تربینافین بر علیه تمامی جدایه ها در شرایط آزمایشگاهی بیشترین تاثیر را داشته و پس از آن داروهای ایتراکونازول، سیکلوپیروکسامین، کتوکونازول و فلوکونازول مؤثر واقع شدند (۲۱). رجب و همکاران در سال ۱۳۸۵ مطالعه ای که روی ارزیابی اثرات ضد قارچی گریزئوفولوین و تربینافین علیه برخی از درماتوفیت های شایع انجام دادند نشان داند که حساسیت درماتوفیت ها در مقابل تربینافین به مراتب بیشتر از گریزئوفولوین است که با یافته های این پژوهش همخوانی دارد (۲۲). داروی تربینافین اثر فوق العاده ای در مهار رشد *میکروسپوروم جیپسئوم*، *میکروسپوروم کانیس* و *تریکوفیتون منتاگروفایتیس* داشته و پس از آن به ترتیب گریزئوفولوین، کتوکونازول و در نهایت فلوکونازول دارای اثرات مهاری کمتری بود. هرسه قارچ نسبت به کتوکونازول در غلظت های متفاوت دارای حساسیت و مقاومت یکسان بودند. *میکروسپوروم کانیس* نسبت به گریزئوفولوین حساس تر از بقیه بود. *میکروسپوروم جیپسئوم* نسبت به فلوکونازول مقاومت بیشتری دارد. به نظر می رسد فلوکونازول داری خوبی در درمان عفونت های ناشی از این عوامل درماتوفیتی نباشد.

نتیجه گیری

استرپتومایسس‌های خاکزی، دارای اثرات ضد قارچی بر علیه درماتوفیت های مورد بررسی می‌باشند. از این رو لازم است تا تحقیقات فراتری مانند شناسایی گونه، شناسایی ترکیبات فعال از نظر تعیین ساختار شیمیایی ترکیبات مؤثر، آزمایش روی حیوانات حساس آزمایشگاهی و انجام بررسی‌های بالینی *In Vivo* جهت دستیابی به عوامل شیمیایی مؤثر در جدایه های فعال، انجام پذیرد تا پس از انجام آزمایشات تکمیلی، بتوان از آنها در درمان عفونت‌های درماتوفیتی مربوطه بهره‌مند شد

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از کار پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد می‌باشد که توسط دانشگاه علوم پزشکی کرمان حمایت گردیده است.

References

1. Sahin I, Oksuz S, keya D, Sencan I, Cetinkaya R. *Dermatophytosis in the natural area of Duzce, Turkey*. Mycoses. 2004; 47(11-12): 470-474.

2. Rippon JW . *Medical Mycology*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 1988; 169-275.

3. Hecker D. *Current trends in onychomycosis therapy: a literature review*. Mount Sinai Journal of Medicine. 1997; 64(6): 399-405.

4. Lyman CA and Walsh TJ. *Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications*. Drugs.1992; 44(1): 9-35.

5. Gupta AK, Ahmad I, Summerbell RC. Comparative efficacies of commonly used disinfectants and antifungal pharmaceutical spray preparations against dermatophytic fungi. Med Mycol. 2001; 39(4): 321-8.

6. Thompson DF, Carter JR. *Drug-induced gynecomastia*. Pharmacotherapy. 1993; 13(1): 37-45.

7. O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS. *Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyroid modulators*. Toxicological Science. 2002; 69(1): 79-91.

8. Elewski BE. *Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management*. Clinical Microbiology Review. 1998; 11(3): 415-429.

9. Rothrock CS, Gottleib D. *Importance of antibiotic production in antagonism of selected Streptomyces species to two soil-borne plant pathogens*. Journal of Antibiotics. 1981; 34(7): 830-5.

10. Agrios GN. *Introduction to plant pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press. San Diego. 2005; 494-500.

11. Lee JY, Hwang BK. *Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea*. Canadian Journal of Microbiology. 2002; 48(5): 407-417.

12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi*. Approved standard M38-A. Wayne, PA: NCCLS; 2000.

13. Favre B, Hofbauer B, Hildering KS, Ryder NS. *Comparison of in vitro activities of 17 antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay*. J Clin Microbiol. 2003; 41(10): 4817-9.

14. Shafii Baftii S, Shahidi Bonjar GH, Aghighi S, Biglari S, Rashid Farrokhi P, Aghelizadeh A. *Biological control of Fusarium oxysporum f. sp. melonis the causal agent of root rot disease of greenhouse cucurbits in Kerman province of Iran*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2005; 1(1): 22-26.

15. Shahidi Bonjar GH, Karimi Nik A. *Antibacterial activity of some medicinal plants of Iran against Pseudomonas aeruginosa and P. fluorescens*. Asian Journal of plant Sciences. 2004; 3(1): 61-64.

16. Zaias N, Glick B, Rebell G. *Diagnosing and treating onychomycosis*. J Fam Pract. 1996; 42(5): 513-8.

17. Shahidi Bonjar GH, Barkhordar B, Pakgohar N, Aghighi S, Biglary S, Rashid Farrokhi P, et al. *Biological control of Phytophthora drechsleri Tuker the causal agent of Pistachio Gummosis under Greenhouse Conditions by use of Actinomycetes.* Plant Path. 2006; 5(1): 20-23.

18. Augustine SK, Bhavsar SP, Kapadnis BP. *Production of a growth dependent metaboliteactive against dermatophytes by Streptomyces rochei AK 39*. Indian J Med Res. 2005; 121(3): 164-170.

19. Zakir Sultan M, Ara Khatune N, Sultana Sathi Z, Shah Alam Bhuiyan MD, Golam Sadik M, Akteruzzaman Choudury M, et al. *In Vitro Antibacterial Activity of an Active Metabolite Isolated from Streptomyces Species.* Biotechnology, 2002; 1(2-4): 100-107.

20. Keikha N, Ayatollahi Mousavi SA, Shahidi Bonjar GH *In Vitro Investigation of Antifungal Activities of Actinomycetes against Microsporum gypseum.* Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2013; 19(4): 376-388.

21. Korting HC, Schafer-Korting M, Zienicke H, Georgii A, Ollert MW. *Treatment of Tinea unguium with medium and high doses of ultramicrosize griseofulvin compared with that with itraconazole. Antimicrob.* Agents Chemother. 1993; 37(10): 2064-8.

22. Amirrajab N, Shams-Ghahfarokhi M, Ghajari A, Razzaghi-Abyaneh M. *In Vitro antifungal activities of griseofulvin and terbinafin against common dermatophytes.* Hakim 2006; 9(1): 28-33.

Downloaded from goums.ac.ir at 21:09 +0330 on Wednesday December 12th 2018

In Vitro Comparison of MIC Crude extracts of Active Actinomycetes Isolates with Terbinafine, Griseofulvin Ketoconazole and Fluconazole against *Microsporum canis, Microsporum gypseum and Trichophyton mentagrophytes*

Downloaded from goums.ac.ir at 21:09 +0330 on Wednesday December 12th 2018

Keikha, N. (MSc)
MSc of Medical Mycology, Department of Laboratory Sciences, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Ayatollahi Mousavi, SA. (PhD)
Associate Professor of Medical Mycology, Deptartment of Medical Mycology & Parasitology, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Nakhaei, AR. (PhD)
Associate Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Amanloo, S. (MSc)
MSc of Medical Mycology, Department of Medical Mycology & Parasitology, Zabol University of Medical Science, Zabol, Iran

Shahidi Benjar, GH. (PhD)
Professor of Plant Pathology, Faculty of Agricultural Engineering, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Amiri, S. (MSc)
MA in State Management, Zahedan Economic and Finance Organization, Zahedan, Iran

Corresponding Author: Keikha, N.

Email: Nasserkeikha@yahoo.com

Received: 4 Nov 2013
Revised: 30 Jul 2014
Accepted: 2 Aug 2014

Abstract

Background and Objective: Dermatophytes are the fungi that have the ability to attack the keratinized tissues such as the skin, hair and nails. Infections caused by these organisms are named dermatophytosis. We aimed to compare Minimum inhibitory concentration (MIC) of Crude extracts of Active Actinomycete Isolates with Terbinafine, Griseofulvin, Ketoconazole and Fluconazole Drugs against *Microsporum Canis*, *Microsporum gypseum* and *Trichophyton mentagrophytes.*

Material and Methods: In this experimental study, in order to find MIC by actionmycete, 100 isolates were studied and then crude extracts of the active actinomycete isolates were prepared in sterile conditions. Finally, the crude extracts obtained at different concentrations were used to obtain the MIC of *Microsporum Canis*, *Microsporum gypseum* and *Trichophyton mentagrophytes*. Moreover, various concentrations of the drugs such as terbinafine, griseofulvin, ketoconazole and fluconazole in solvent Dimethyl sulfoxide (DMSO) were prepared and their growth inhibitory effect was evaluated and then compared with the results obtained from the crude extract of active actinomycete isolates.

Results: the crude extracts obtained from active Actioiomycetes isolates and the drugs such as terbinafine, griseofulvin, ketoconazole and fluconazole, in a dose-dependent manner, could inhibit the growth of *Microsporum Canis*, *Microsporum gypseum* and *Trichophyton Mentagrophytes.*

Conclusion: compared to MIC of Crude extract of active actinomycete isolates, Terbinafine has a significant effect on the growth inhibition in all of the fungal Dermatophytes and then griseofulvin, ketoconazole and fluconazole are in the next rank, respectively.

Keywords: Actinomycetes Crude Extract, *Microsporum Canis*, *Microsporum Gypseum*, Terbinafine

This paper should be cited as: Ayatollahi Mousavi SA, Nakhaei AR, : Keikha N, Amanloo S, Shahidi Benjar GH, Amiri S. [In Vitro Comparison of MIC Crude extracts of Active Actinomycetes Isolates with Terbinafine, Griseofulvin Ketoconazole and Fluconazole against Microsporum canis, Microsporum gypseum and Trichophyton mentagrophytes]. mljgoums. 2015; 9(1): 53-60[Article in Persian]